

尿蛋白を指標とした運動負荷に関する研究

第 1 報

尿微量蛋白定量法とその検体尿の保存法の検討

岡山大学医学部公衆衛生学教室（主任：緒方正名教授）

泉 武 寛

（昭和56年12月22日受稿）

Key words：尿微量蛋白定量法，尿保存法，
尿蛋白試験紙，
三塩化酢酸-Ponceau S

緒 言

尿は被検者への侵襲がなく，採取も簡単で量も充分に得られ易く，全身状態を総合的に反映するため臨床検査に広く用いられている。中でも尿蛋白は，尿糖，潜血，沈渣などと共に高頻度利用され，腎疾患のみならず学校・職場での集団検診，産業中毒，産業疲労の早期発見，予防及びスポーツにおける健康管理のための指標として公衆衛生領域，産業医学領域において，その利用価値は極めて大きい。学童の健康状態を知るために実施されてきた集団検尿も，いわゆる Chance proteinuria から，潜在的な腎・泌尿器疾患の早期発見に至るまでがその目的とされ，小児腎疾患の早期発見，早期治療に大きく貢献している¹⁾。また，産業医学分野では，有機溶剤²⁾ならびにカドミウム又はその化合物³⁾，水銀又はその無機化合物⁴⁾，ニトログリコール⁵⁾，硫酸ジメチル⁶⁾等を使用する作業者に対しては，有機溶剤中毒予防規則，特定化学物質等障害予防規則などの法規により，健康診断に尿蛋白検査が義務付けられている。このように尿蛋白は作業者の早期健康診断に続く健康管理において重要な位置を占めており，カドミウム中毒で骨病変重視の傾向が腎病変重視へと移行し，比較的早期から出現する近位尿細管障害の指標として Retinol Binding Protein (RBP)： β_2 -microglo-

bulin 等の低分子蛋白の測定が行なわれている⁷⁾のはその好例である。これらの広範な尿蛋白出現のスクリーニング法として，簡便なことから尿蛋白定性試験紙（以下試験紙と略）が広く用いられている。しかしながら試験紙に用いられているブロームフェノールブルー等の色素は，アルブミンに対して比較的特異的に反応することが知られており^{8,9,10)}，グロブリンに対しては反応が弱く，更には pH によって判定が左右されるという欠点がある。尿微量蛋白のスクリーニングという目的及びその性格から問題となる境界付近の低濃度（30mg/dl 以下）では，試験紙の表示濃度の変化が少なく，また裸眼による観察法であるため検者の主観によって大きく左右される欠点も有する。

本研究においては，近年の学童期から高令者に至るまでのスポーツ愛好家の増加に対応した健康管理のための一指標として，尿蛋白を取り上げ，運動負荷過程と回復過程での量的変化を検討すること，及び実用化を目的として，1) 試験紙の判定成績とアルブミン・グロブリン比 (A/G 比と略) の影響が少ないとされている三塩化酢酸-Ponceau S を用いた尿微量蛋白定量法¹¹⁾ (P-S 法と略) による測定成績の関係，2) 検体数，検査項目の増加に伴う試料尿の保存の必要性が生じるため，各種保存法の試験紙の判定及び P-S 法による測定値に及ぼす影響につ

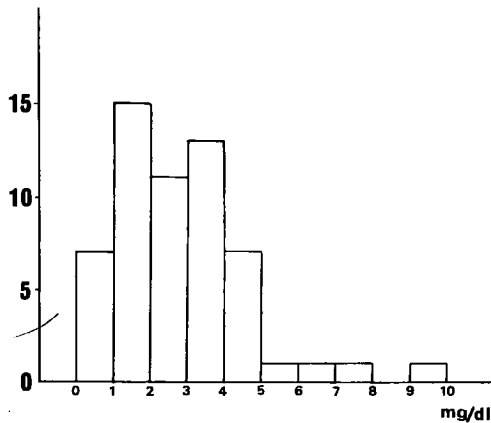
いて検討し、報告する。

実験材料並びに実験方法

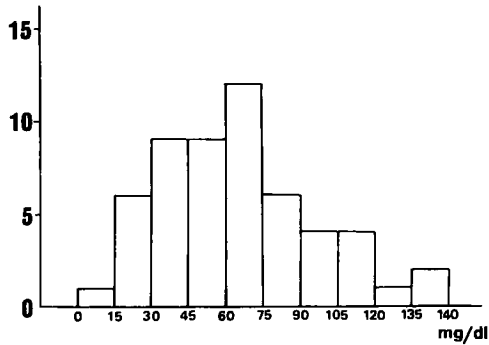
実験材料

健康人尿及び運動負荷尿：各種の尿蛋白濃度を有する尿を入手するために、健康な大学生男子運動部員（平均年齢20.8歳）の運動負荷前・後に採取したものを用いた。

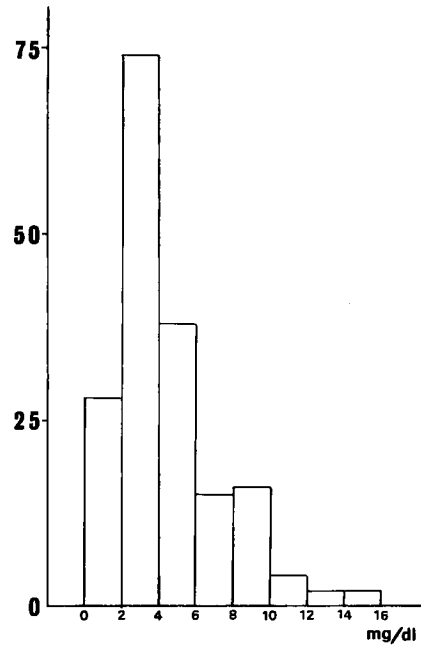
病的尿：細胞成分の測定値に与える影響を知るために、沈渣所見として多数の細胞成分が認



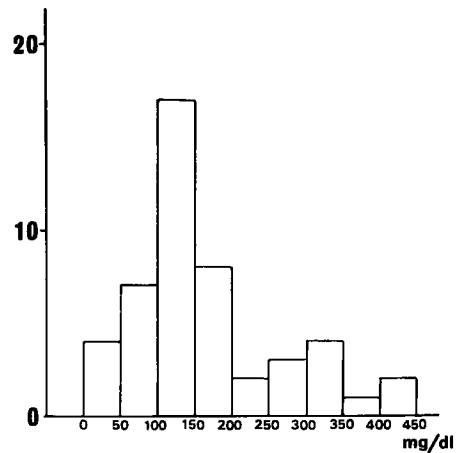
1a



1c



1b



1d

Fig. 1a—d: Frequency distributions of dip-stick readings and urinary protein concentration quantified by Ponceau S-Trichloroacetic acid method for urine specimens of normal subjects.

1a : (−) group (n=57)

1b : (±) group (n=185)

1c : (+) group (n=54)

1d : (++) group (n=48)

められた膀胱炎患者及び、肉眼的血尿患者の尿を用いた。

定量用蛋白質標準品：新鮮なヘパリン添加人血清を屈折法（D-Z型蛋白計，共栄製作所）で

定量した後、生食水で稀釈して用いた。

実験方法

試験紙法：KIDSTIX（マイルズ・三共）を用い、判定は同一検者が行なった。

Table 1: Relationship between the dip-stick readings and the ranges of urinary protein concentration quantified by Trichloroacetic acid-Ponceau S method.

Reading of dip-stick	n	m±S.D.	range of m±S.D.	m*	range of m± S.*
(-): negative	57	2.8±1.7	1.1—4.5	2.6	1.6—4.5
(±): trace	185	5.2±5.4	-0.2—10.6	4.1	2.1—8.0
(+): 30mg/dl	54	64.2±31.9	32.3—96.1	55.6	31.0—90.8
(++): 100mg/dl	48	164.7±100.7	64.0—265.4	135.8	69.8—264.2

Unit: mg/dl

n: number of urine specimens m: mean

S.D.: standard deviation *: geometric mean

Table 2: Coincidence of the dip-stick readings before freezing and after freezing for 22 days.

		IMMEDIATE						T	C.R. %
		-	+	++	+++	++++			
FREEZING 22 DAYS	-	3	3	0	0	0	0	6	50.0
	+	0	50	5	0	0	0	55	90.9
	++	0	2	11	1	0	0	14	78.6
	+++	0	0	2	6	0	0	8	75.0
	++++	0	0	0	5	5	0	10	50.0
	++++	0	0	0	0	1	1	2	50.0
T		3	55	18	12	6	1	75	65
C.R. %		100.0	90.9	61.1	50.0	83.3	50.0		80.0

T: Total

C.R.: Coincident Rate

尿微量尿蛋白定量法: 予め KIDSTIX で半定量後, 前述の P-S 法に準拠して行なった。P-S 法の概略は, 尿試料 (1.0ml あるいは 0.1ml) に Ponceau S の三塩化酢酸溶液を加え混和し, 遠沈後上清を除去し, 蛋白とともに共沈した色素を NaOH 溶液で溶解し, 560nm の吸光度で測定する方法である。

尿試料の保存: いずれの試料も採取当日に測定し, その値に対して, 各々下記の条件で保存した後に測定した値と比較した。

a) 健康人尿及び運動負荷尿: 運動負荷前後に採尿したもの (試料数 101) を, ①当日測定用尿, ②8 日間凍結保存用尿, ③22 日間凍結保存用尿の 3 群に分け保存した。

b) アルブミン添加尿: 保存による影響が, アルブミンの変性によるものか否かを調べるために,

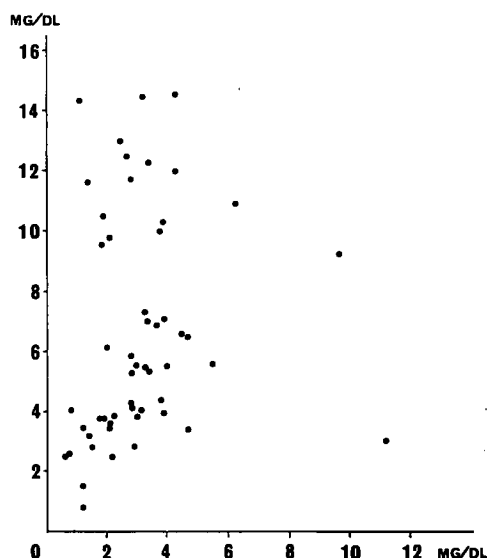


Fig. 2 Relationship between the concentrations of urinary protein quantified immediately and after freezing for 8 days in the (-), (+) group. correlation coefficient: 0.308 regression line: $y=0.654x+4.869$; where x (abscissa) is the concentration before freezing and y (ordinate) is the concentration after freezing for 8 days.

アルブミン添加尿について検討した。すなわち, 健康人尿 (尿蛋白濃度は 3 mg/dl) 100ml に人血清アルブミン (PENTEX® HUMAN ALBUMIN Fraction V, MILES LABORATORIES, INC.) をそれぞれ 5 mg, 50mg, 100mg 添加したアルブミン添加尿を作成し, 各々 3 群に分けて, ①室温保存用尿, ②冷蔵保存用尿, ③凍結保存用尿とし①②は 1 日, 3 日, 8 日間, ③は 1.5 時間, 1 日, 2 日, 4 日, 7 日間保存したもの

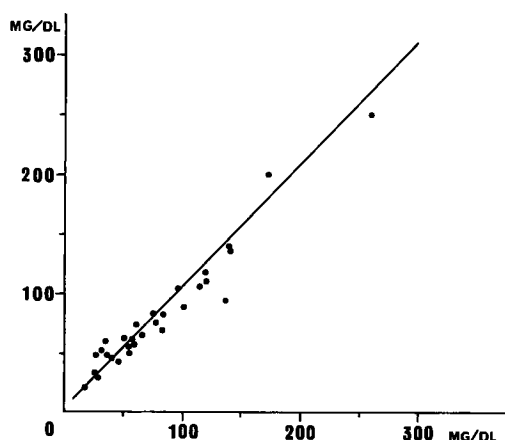


Fig. 3 Relationship between the concentrations of urinary protein quantified immediately and after freezing for 8 days in the (+), (++) group.
correlation coefficient: 0.975
regression line: $y = 1.013x + 2.450$; where x (abscissa) is the concentration before freezing and y (ordinate) is the concentration after freezing for 8 days.

のを試料とした。

c) 細胞成分を多く含む尿：本試料尿では、保存による細胞の破壊もしくは細菌などによる分解、菌数数の増加に変化が大きいと推測されることから、尿試料をそれぞれ3,500rpm, 1,500rpmで10分間遠沈し、上部1/2を上清部分、下部1/2を沈渣部分とに分ち、凍結保存した。

尚、尿試料はいずれもプラスチック製試験管に入れて密封して保存した。凍結は冷凍庫内(−20℃)、冷蔵は冷蔵庫内(4℃)、室温は実験室机上にて保存した。凍結保存試料は室温にて解凍後、他の試料も測定直前に充分攪拌して測定に用いた。

実験結果

A. 健康人尿及び運動負荷尿における試験紙法の判定とP-S法による尿蛋白濃度測定値の関係：

a) 尿蛋白濃度測定値の度数分布：試験紙法により(−)と判定された群についてはFig. 1a(±)群はFig. 1b, (+)群はFig. 1c, (++)群はFig. 1dにP-S法による測定濃度の度数分布を示す。それぞれの分布型を確率試験紙で調べる

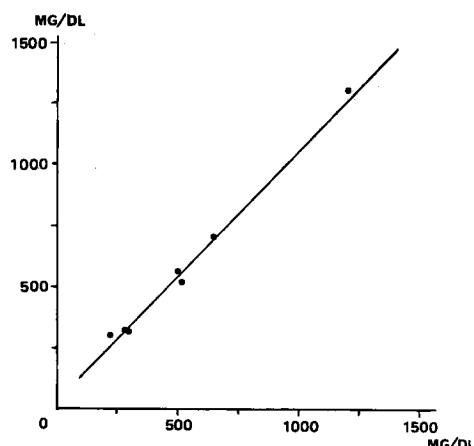


Fig. 4 Relationship between the concentrations of urinary protein quantified immediately and after freezing for 8 days in the (+++), (++++) group.
correlation coefficient: 0.997
regression line: $y = 1.032x + 35.849$; where x (abscissa) is the concentration before freezing and y (ordinate) is the concentration after freezing for 8 days.

と、(−)群、(±)群、(++)群は対数正規に近い分布、(+)群は正規分布に近い分布を示した。各群におけるP-S法での測定値の算術平均±標準偏差、対数変換後求めた平均値±標準偏差を実数に再変換した値、及びrangeはTable 1に示す通りであった。すなわち(±), (+), (++)の各々の平均値は試験紙添付の資料の表示濃度にはほぼ一致していた。

b) 試験紙法による判定尿の保存前後の一致率：Table 2に示す如く、当日と22日間凍結保存後では、全体を通じての一致率80%で良く一致しており、一致しなかった判定のうち10.5%は上昇、9.5%が下降していたが、その上昇、下降ともにすべて一段階であり、凍結保存の試験紙法による判定に対する影響は少ないと思われる。尚、いずれの尿試料もpHは5～8の範囲にあった。

B. 健康人尿及び運動負荷尿の凍結保存のP-S法による尿蛋白濃度測定値に及ぼす影響

a) 保存前、後の測定値の相関：当日と8日間凍結保存後で一回帰をとると、試験紙法による判定が(−)・(±)の群ではFig. 2に示す様に相関係数0.308と相関が悪いが、(+)・(++)

Table 3 Comparison of paired data by the usual t-test in the concentrations of urinary protein before freezing and after freezing for 8 days.

Reading of dip-stick	df	t ₀	t _{0.05}	95% C.L. (mg/dl)
(-), (±) group	58	5.054	2.000	2.24—5.18
(+), (++) group	28	0.733	2.045	-3.17—6.71
(+++), (++++), group	5	2.349	2.447	0.01—108.11

df: degree of freedom
t₀: observed t
C.L.: confidence limit

Table 4 Comparison of paired data by the usual t-test in the protein concentrations of albumin added urine specimens before and after the preservation under the several conditions.

		(Duration of preservation)						
		1.5 hours	1 day	2 days	3 days	4 days	7 days	8 days
(Urine) dip-stick : (-)	-20°C	n.s.	**	**	—	**	**	—
(Added albumin : 5 mg/dl)	Room temperature	—	***	—	**	—	—	**
dip-stick : (±)	4 °C	—	n.s.	—	n.s.	—	—	n.s.
	-20°C	n.s.	**	**	—	**	**	—
(Added albumin : 50mg/dl)	Room temperature	—	n.s.	—	n.s.	—	—	n.s.
dip-stick : (+)	4 °C	—	n.s.	—	*	—	—	**
	-20°C	n.s.	n.s.	n.s.	—	n.s.	**	—
(Added albumin : 100mg/dl)	Room temperature	—	n.s.	—	n.s.	—	—	n.s.
dip-stick : (++)	4 °C	—	n.s.	—	*	—	—	*
	-20°C	n.s.	n.s.	n.s.	—	n.s.	n.s.	—

*** : p<0.001 ** : p<0.01 * : p<0.05 n.s. : p>0.05

群では Fig. 3, (⦿)・(⦿)群では Fig. 4 に示す様に相関係数がそれぞれ0.975, 0.997で、いずれも良く相関しており、直線の傾きもほぼ1であった。試験紙法による判定で(+)以上すなわち、試験紙添付の資料では30mg/dl以上、P-S法による測定値では31.0mg/dl以上の群では凍結保存による影響は少なかった。これらの結果からP-S法を用いて尿蛋白濃度を測定する場合、予め試験紙法によって(-)あるいは(±)と判定された尿試料については、その日のうちに定量操作を開始することが必要とされることが明らかになった。

b) 保存前、後の測定値の対応のある平均値差の検定: Table 3 に示す様に、試験紙法で(-)及び(±)の群では、8日間の凍結保存により尿蛋白濃度測定値は1%の危険率で有意の

上昇が認められたが、(+)群、(++)群、(⦿)群、(⦿)群ではいずれも5%の危険率で有意差なしという結果が得られた。

C. アルブミン添加尿のP-S法による蛋白濃度測定値の保存による変化:

保存前、及び保存後の測定値について対応のある平均値差の検定を行なうと、Table 4 に示す様に試験紙法の判定が(±)である5mg/dl添加尿では、室温、冷凍保存で1日後より有意の増加が認められたが、冷蔵保存では8日後でも保存前後の平均値に有意差は認められなかった(p>0.05)。試験紙法による判定が(+)である50mg/dl添加尿で、室温では8日後まで、冷蔵保存で1日後まで、冷凍保存で4日後までは保存前後の平均値には有意差を認めず(p>0.05)、更に高濃度の100mg/dl添加尿で、室温、冷凍保

Table 5: Effect of freezing in urine specimens which are rich in cell component.

		(Duration of freezing)		
		initial conc.	36 hours	3 weeks
(sample 1)	original urine	39.8	21.1 (−47.0%)	21.9 (−45.0%)
	upper phase (1500 rpm, 10 min.)	13.8	14.2 (+ 2.9%)	18.1 (+31.2%)
	upper phase (3500 rpm, 10 min.)	12.5	12.5 (+ 0 %)	13.3 (+ 6.4%)
	lower phase (1500 rpm, 10 min.)	29.5	31.8 (+ 7.8%)	31.4 (+ 6.4%)
	lower phase (3500 rpm, 10 min.)	37.1	42.6 (+14.8%)	37.8 (+ 1.9%)
(sample 2)	original urine	41.2	11.6 (−71.8%)	28.4 (−31.1%)
	upper phase (1500 rpm, 10 min.)	30.0	22.8 (−24.0%)	26.7 (−11.0%)
	upper phase (3500 rpm, 10 min.)	25.9	25.8 (− 0.4%)	25.4 (− 1.9%)
	lower phase (1500 rpm, 10 min.)	66.1	59.8 (− 9.5%)	60.2 (− 8.0%)
	lower phase (3500 rpm, 10 min.)	64.4	64.1 (− 0.5%)	56.3 (−12.6%)
(sample 3)	original urine	19.7	19.8 (− 0.5%)	21.1 (+ 7.1%)
	upper phase (1500 rpm, 10 min.)	17.0	16.8 (− 1.2%)	18.1 (+ 6.5%)
	upper phase (3500 rpm, 10 min.)	19.2	15.5 (−19.3%)	16.3 (−15.1%)
	lower phase (1500 rpm, 10 min.)	22.4	19.8 (−11.6%)	20.2 (− 9.8%)
	lower phase (3500 rpm, 10 min.)	22.8	22.8 (+ 0 %)	21.9 (− 3.9%)

Unit: mg/dl

"upper phase" indicates the upper half of the urine and "lower phase" indicates the lower one after centrifugation at 1,500 rpm, 3,500 rpm for 10 minutes.

Sample 1,2 : Urine with many leucocytes from cystitis-patient

Sample 3 : Macro hematuria

存ではそれぞれ8日、7日経過しても保存前後の平均値には有意差がなかった($p>0.05$).この結果は、健康人尿及び運動負荷尿の保存前、後での測定結果とほぼ一致していた。

D. 細胞成分の測定値に及ぼす影響

a) 細胞成分を多量に含む尿の蛋白濃度測定値に及ぼす影響: Table 5 に示す様に、多種多様の細胞成分を含む尿を凍結保存した時、沈渣所見として白血球、上皮等を多く含む膀胱炎尿では1,500 rpm, 3,500 rpm の上清部分、沈渣部分共に蛋白濃度測定値の変化は一樣ではなく原尿では2例共、保存前より減少していた。しかし、赤血球を主たる沈渣とする血尿では原尿、上清部分、沈渣部分のいずれの部分も、本研究に用いた膀胱炎尿の場合に比べ、凍結保存による変化は少なかった。少数例ではあるが、細胞成分などを多量に含む尿試料では保存による影響に一定の傾向がなく、測定に際して注意を要する

ことが分かった。尚、試験紙法の判定では保存前、後の変化はなかった。

b) 遠沈による測定値の変化: Table 5に示す如く、1,500 rpm, 3,500 rpmで10分間遠沈した場合、蛋白濃度測定値はいずれも沈渣部分>原尿>上清部分であり、細胞成分などの沈渣がP-S法による測定値を高くしていることが推定された。更に、これらの尿試料はいずれも試験紙法による判定ではすべて(−)~(±)であることから、アルブミン以外の蛋白質の影響を示唆しているものと考えられる。

考 察

試験紙法とP-S法の定量感度:

前述の如く、試験紙に用いられている色素はアルブミンに対して比較的特異的に反応する。本研究で用いた尿試料の健康人尿及び運動負荷尿では、尿蛋白の主体はアルブミンである^{12,13)}。

そのため試験紙による判定と P-S 法による尿蛋白測定値の関係は比較的良好となったものと思われる。尿蛋白定量値と試験紙による判定の比較研究では、有江ら¹⁴⁾が Folin and Ciocalteu 法で測定した場合の平均値(m), 土標準偏差 (S.D.) は、(－) 群で $13.8 \pm 4.3 \text{ mg/dl}$ (±) 群で $23.5 \pm 14.7 \text{ mg/dl}$, (+) 群で $59.8 \pm 31.1 \text{ mg/dl}$ (＋) 群で $109.9 \pm 53.0 \text{ mg/dl}$ と報告し、また高杉ら¹⁵⁾は Biuret 法による成績では、(－) 群で $0 \sim 14 \text{ mg/dl}$, (±) 群で $2 \sim 2.3 \text{ mg/dl}$, (+) 群で $11 \sim 85 \text{ mg/dl}$, (＋) 群で $47 \sim 163 \text{ mg/dl}$, (＋) 群で $102 \sim 343 \text{ mg/dl}$ という結果を報告している。本研究で試験紙法により(－), あるいは(±)と判定された尿試料の P-S 法による測定値は有江, 高杉らの結果よりも低く算出されたが, P-S 法は高感度の色素結合法であり, 尿中アミノ酸ペプチドの影響もなく A/G 比による影響も少ない等の利点を有することを考えると, 運動負荷尿等への適用には優れた方法と言える。P-S 法あるいは他の方法によるいずれの結果においても, 試験紙の判定が(－)～(＋)では互いに尿蛋白濃度測定値の範囲の重複が認められた。このように, 試験紙法は簡便であり, 判定も迅速であることから, 多数の検体についてスクリーニング法としての有用性は充分認められるものの, 定量感度が低い試験紙法による判定結果のみで正常もしくは陰性とは言いがたいことも示唆している。特に, 尿蛋白の主成分がアルブミン以外のグロブリンや低分子蛋白であることが予測される場合には, 試験紙法によるスクリーニングでは不十分であり, A/G 比の影響等を考慮した尿蛋白の定量が必須であると考ええる。

一方, 凍結保存による試験紙の判定の変化が少ないのは, 凍結保存により P-S 法による尿蛋白濃度の測定値は変化するが, その変動範囲が肉眼による試験紙の半定量的な判定では判別できなかったためであろうと考える。この傾向は, 低濃度から高濃度の尿蛋白に至るまで一貫した傾向であった。

尿試料及びアルブミン添加尿の蛋白濃度測定値に及ぼす保存の影響：

健康人尿及び運動負荷後の尿試料を凍結保存した場合, 試験紙により(＋)以上と判定され

た試料では, 凍結後もほぼその日のうちに測定した値と良く相関し, 実用上何ら差し支えないものの, 30 mg/dl 以下の低濃度の試料尿では, 凍結保存, あるいは解凍操作による影響が大となった。これは, 本研究の試料である運動尿中の蛋白質の主体がアルブミンであり, 本研究において実験的に添加作成したアルブミン添加尿の保存実験結果とも良く一致している。すなわち, 測定値を変化させる不安定要素としての尿中細胞成分の含有量に比して, 尿蛋白測定値が高い試料ほど, 凍結保存による影響の少ないアルブミンの割合が高くなり, 結果として変化が少なく表われ, 一方, 低濃度の試料ほど, 不安定要素の含有割合が高くなり, 測定値の変化が大きくなったものと考えられる。

一般に尿を室温において保存する場合, 細菌の増殖に伴う細菌数の増加¹⁶⁾と蛋白定量値の上昇¹⁷⁾, あるいは, 細菌による蛋白質の分解からの測定値の低下の両面が問題点と考えられるものの, 尿中に存在する多種多様な細菌や細胞の性質にもより, その影響の解釈は困難である。保存条件を, 冷蔵して 4°C に保つと, 細菌の増殖は抑制され, 冷凍においては細菌による分解はほぼ阻止されると思われるが, 凍結, 解凍の過程で, 混在する他の細胞成分の破壊などは, 逆に亢進することも考えられる。P-S 法以外の蛋白定量法を用いた尿試料の保存に関する研究は, 安野ら¹⁷⁾のビュレット法による報告がある。それによると, 24 時間以内であれば, 4°C 保存が, 2 日以上保存を必要とする場合, 凍結保存が良いとしている。しかしながら, 安野らが測定に供した尿試料は, 55 mg/dl と本実験の最低濃度 5 mg/dl に比して高く, 試験紙による判定が(－)あるいは(±)となるような試料についての検討はなされていない。以上のことから, P-S 法による尿蛋白の測定を行なう場合, 必ずしも凍結保存すれば良いとは言えず, 特に低濃度の試料の場合, その日のうちに測定することが最良の方法と思われる。

多種の細胞成分を含む尿試料の凍結保存前, 後の測定値の変化：

先に述べた様に, 膀胱炎や血尿等の如く, 各種の細胞成分を含む尿を凍結保存した場合, 保

存後の測定値は、細胞の種類、尿試料により一定の傾向を示さなかった。この様な尿試料の場合の尿蛋白測定手技については、今後検討を要するものと思われる。すなわち、通常では尿への不溶蛋白である細胞成分とを合わせて測定し、いわゆる尿蛋白濃度として算出することの可否については、今後種々の病的尿等についての測定から明らかにして行く予定である。

ま と め

本研究は、公衆衛生学領域における尿蛋白測定による疾病、産業中毒、運動負荷のスクリーニング法に関連して、試験紙法による判定と尿蛋白濃度測定値の関係及び試料尿の保存の影響について検討し、以下の成績を得た。

1. KIDSTIX を用いた試験紙法による判定結果と三塩化酢酸-Ponceau S による尿蛋白濃度測定値の関係は、尿蛋白濃度が30mg/dl 以上の試料では半定量値と定量値の間に良い関係(+)・(+)群： $y=1.013x+2.450$, $r=0.975$, (-)・(-)群： $y=1.032x+35.849$, $r=0.997$ が得られた。しかしながら、尿蛋白濃度が30mg/dl 以下の試料では判定結果に対する測定値の範囲は大きく、試験紙法による判定は低濃度においては不確実であった。(+)：1.6~4.5mg/dl (±)：2.1~8.0 mg/dl)

2. 尿の保存の測定値に対する影響は、試験紙

法では、22日間の凍結保存後も判定の一致率は80%を示し、その影響は少ないものと考ええる。一方、蛋白濃度測定値に対しては、濃度が30mg/dl 以上の試料では密封してあれば、室温では3日後まで、冷蔵では1日後まで、冷凍では4日後まで保存後も測定値の変動は少なかった。一方、30mg/dl 未満の尿試料ではいずれの方法で保存しても測定値は変動し、その変動要因としては、尿中の各種細胞成分の混在及びその崩解などが推定された。

以上の結果から、試験紙法は大量の試料を迅速に検査することに有効ではあるが、30mg/dl 未満の尿試料については判定結果が不定であり、尿微量蛋白定量法により定量する必要があること、更に、尿微量蛋白定量法として、三塩化酢酸-Ponceau S を用いる方法は、測定限界が実用上1 mg/dl と低く、A/G比の影響も少ないことから有効であり、また尿試料の蛋白濃度が30 mg/dl 未満と試験紙法で判定されたものは当日のうちに定量することが望ましいとの結論を得た。

稿を終えるにあたり恩師緒方正名教授、ならびに直接御指導いただきました吉良尚平講師、尿採取に御協力いただきました岡山大学剣道部、日立造船健康保険組合因島総合病院臨床検査科の皆様、実験に御援助いただきました嶋田義弘、松浦久美子両氏に厚く御礼申し上げます。

文 献

1. 吉川俊夫：集団検尿法と異常者の頻度、小児期腎疾患診療の手引：集団検尿のために（厚生省小児腎研究班報告）、宇宙堂八木書店、東京、pp. 39—50, 1980.
2. 労働省安全衛生部労働衛生課編：有機溶剤中毒予防規則の解説、中央労働災害防止協会、東京、pp. 112—116, 1981.
3. 労働省安全衛生部労働衛生課編：改訂特定化学物質等作業主任者テキスト、中央労働災害防止協会、東京、p. 361, 1978.
4. 労働省安全衛生部労働衛生課編：改訂特定化学物質等作業主任者テキスト、中央労働災害防止協会、東京、p. 355, 1978.
5. 労働省安全衛生部労働衛生課編：改訂特定化学物質等作業主任者テキスト、中央労働災害防止協会、東京、pp. 362—363, 1978.
6. 労働省安全衛生部労働衛生課編：改訂特定化学物質等作業主任者テキスト、中央労働災害防止協会、東京、p. 358, 1978.

7. 齊藤 寛, 古山 隆: 尿細管性蛋白尿—その概念・出現機序・臨床的意義, 尿蛋白・その基礎と臨床的意義, 臨床病理, 27巻, 特集第36号, 173—196, 1979.
8. Gryre, W.L.: Comparison of several methods for semiquantitative determination of urinary protein. *Clin. Chem.* 23, 876—879, 1977.
9. James, G.P., Bee, D.E. and Fuller, J.B.: Protein; Accuracy and precision of laboratory diagnosis by dip-stick analysis. *Clin. Chem.* 24, 1934—1939, 1978.
10. Bowie, L., Smith, S. and Gochman, N.: Characteristics of binding between reagent-strip indicator and urinary proteins. *Clin. Chem.* 23, 128—130, 1977.
11. Pesce, M.A. and Strande, C.S.: A new micromethod for determination of protein in cerebrospinal fluid and urine. *Clin. Chem.* 19, 1265—1267, 1973.
12. Alyea, E.P. and Parish, H.H.: Renal response to exercise-urinary findings. *JAMA. J. Am. Med. Assoc.* 167, 807—813, 1958.
13. Poortmans, J.P. and Jeanloz, R.W.: Quantitative immunological determination of 12 plasma proteins excreted in urine collected before and after exercise. *J. Clin. Invest.* 47, 386—393, 1968.
14. 有江醇子: 物質代謝の見地からみた運動負荷指標に関する研究, 第5報: トレーニング者12分走時の尿成分の消長. タンパク尿・乳酸・ビルビン酸・クレアチニン・アルカリフォスファターゼについて, 体質医研報, 27, 105—112, 1977.
15. 高杉昌幸, 吉田紗智, 中村時江: 尿蛋白検査法の検討. 検尿試験紙による蛋白及び潜血反応の検査, 診療と保険, 14, 1038—1043, 1972.
16. 岩村幸江, 郷ヒロ子, 近持由美子, 堀内 聡, 菅野剛史: 蓄尿試料の尿糖値低下阻止に関する検討, 臨床検査, 20, 741—744, 1976.
17. 安野律子, 中嶋 隆, 原田賢治: 尿中蛋白定量法について—biuret 法における試験法と検体(尿)の保存法の検討, 群馬県衛生研究所・公害センター年報, 8, 63—65, 1976.

A study on urinary protein excretion as an index of physical exertion

**Part I : A micromethod for determination of urinary protein
with special reference to preservation of urine
specimen**

Takehiro IZUMI

Department of Public Health, Okayama University Medical School

(Director : Prof. M. Ogata)

The present paper concerns the semi-quantification and micro-quantification of urinary proteins with emphasis on the application of them to the public health area for determining illness, industrial poisoning and physical fitness. The present experiments were designed to examine the relationship between the results in the reading of urinary protein levels by a dip-stick method and the levels measured by micro-quantification using the trichloroacetic acid-Ponceau S reagent method (P-S method). The effects of the preservation of urine specimens on the levels measured by the above methods were also examined.

The results were as follows:

1. Although the dip-stick method was useful for the semi-quantification of urine specimens with protein levels above 30mg/dl, readings below 30 mg/dl were uncertain. Levels measured by the P-S method had a range of 1.6 mg/dl to 8.0 mg/dl. For the micro-quantification of urinary protein in the above cases, the P-S method was suitable because of its low detection limit (1.0 mg/dl protein concentration) and of little discrepancy between the sensitivity to albumin and globulin.

2. The readings of the dip-stick method coincided in 80% of urine specimens preserved for 22 days in a freezer at -20°C with their initial readings. On the other hand, the protein levels measured by the P-S method below 30 mg/dl varied from the initial ones after the preservation airtightly at room temperature, at 4°C in a refrigerator and even at -20°C in a freezer for a day or more. In the case of urine specimens which contained 30 mg/dl protein or above, no significant change was observed after the preservation in a refrigerator or a freezer. The destruction of various cell components in urine might cause the variation, in contrast to albumin that is destroyed little during preservation.

The author concludes that the protein concentration of urine specimen with a dip-stick reading below 30 mg/dl should be measured as soon as possible by the P-S method, when a detailed quantification is required.