

博 士 論 文

BCP 改良法との乖離を低減させる 2 点校正 BCG 法の考案

2024 年 3 月

埼玉県立大学大学院保健医療福祉学研究科

巖 崎 達 矢

目 次

要旨	5
1. 序論	7
1.1 ヒト血清アルブミンの構造	7
1.2 体内分布	9
1.3 アルブミンの生理作用	10
1.3.1 膠質浸透圧の維持	10
1.3.2 結合輸送タンパク質	12
1.3.2.1 遊離脂肪酸	12
1.3.2.2 ビリルビン	13
1.3.2.3 脂溶性ホルモン	14
1.3.2.4 2 価金属イオン	15
1.3.2.5 薬物	17
1.4 血清アルブミン測定 of 臨床的意義	21
1.5 血清アルブミン測定法の変遷	26
1.6 日常検査法で使用される色素結合法の特徴	34
1.6.1 BCG 法	34
1.6.2 BCP 法	37
1.6.3 BCP 改良法	40
1.7 アルブミン測定法の標準化の現状	43
1.8 国内におけるアルブミン測定法の状況	45
1.9 諸外国におけるアルブミン測定法の状況	46
1.9.1 諸外国のアルブミン測定法の普及率	46
1.9.2 諸外国のアルブミン測定法の問題点	47

1.10	BCG 法と BCP 改良法が普及するアルブミン測定法の課題	48
1.10.1	臨床判断値への影響	48
1.10.2	アルブミン測定の矛盾	49
1.11	本論文で使用する分析法について	50
1.11.1	自動分析法	50
1.11.2	分光光度分析法	50
1.11.3	Lambert-Beer の法則	51
1.11.4	自動分析法による校正法	52
1.11.5	終点分析法	52
1.11.6	二波長法	53
1.11.7	1 ポイント法および 2 ポイント法	53
1.12	本論文で使用する単位の取り扱い	54
2.	本研究の目的	55
3.	材料および方法	56
3.1	材料	56
3.2	試薬	56
3.3	分析装置	57
3.4	分析条件	57
3.5	校正用標準溶液	58
3.5.1	蛋白標準血清	58
3.5.2	ヒト血清アルブミン標準溶液 1	58
3.5.3	ヒト血清アルブミン標準溶液 2	58
3.6	方法	59
3.6.1	BCG 法, BCG-HSA 法, BCP 改良法および BCP 改良-HSA 法の	

比較	59
3.6.2 2点校正 BCG 法の校正値の決定	59
3.6.3 蛋白分画測定	59
3.6.4 2点校正 BCG 法の校正効果	60
3.7 統計分析	60
3.8 倫理承認	61
4 結果	61
4.1 蛋白標準血清およびヒト血清アルブミン標準溶液の 評定	61
4.2 校正物質の相違による BCG 法と BCP 改良法のアルブミン濃度の比 較	62
4.3 BCG-HSA 法と BCP 改良-HSA 法のアルブミン濃度差とグロブリン 分画の相関	65
4.4 2点校正 BCG 法の校正値の決定	70
4.5 2点校正 BCG 法と BCP 改良-HSA 法の比較	72
5 考察	75
6 結語	79
7 謝辞	80
8 引用文献	81
9 発表論文	97

要 旨

【目的】血清アルブミン測定は全身の健康状態のスクリーニング検査のみならず診断基準や病態分類に利用されている。日常検査では色素結合法が利用され、その色素にはブロムクレゾールグリーン（BCG）法およびブロムクレゾールパープル（BCP）法の 2 種類の色素が普及しているがアルブミンに対する特異性は異なる。BCG 法はアルブミン以外のタンパク質（グロブリン分画）と反応するため、その比率が増加する特に臨床的意義の高い低アルブミン濃度域での臨床判断に影響を与える。国内ではアルブミンに特異的な BCP 改良法が主要な検査法として普及しているのに対して、諸外国では BCG 法が主要な検査法として普及している状況である。この一因として諸外国では、自動分析装置で使用する測定試薬が選択できない状況が挙げられる。さらにグロブリン分画の影響を回避する反応時間を短縮した BCG 法も自動分析装置では利用できないため、正確度の低いアルブミン測定に繋がっている。そこで本研究では既存の測定試薬と自動分析装置を使用可能なグロブリン分画の影響を低減する 2 点校正 BCG 法の条件設定を考案し、その校正効果を評価した。

【方法】患者血清 60 例をアルブミン正常値群 35.0 g/L 以上（Normal Albumin: NA 群）とアルブミン低値群 35.0 g/L 未満（Low Albumin: LA 群）に設定し、ヒト血清アルブミン標準溶液（HSA）を用いて校正した BCG（BCG-HSA）法および BCP 改良（BCP 改良-HSA）法で両群の平均値を比較し 2 点校正 BCG 法の HSA の校正値を決定した。新たに採取した 136 例の患者血清を対象に 2 点校正 BCG 法のアルブミン濃度を BCP 改良-HSA 法を比較対象法として評価した。

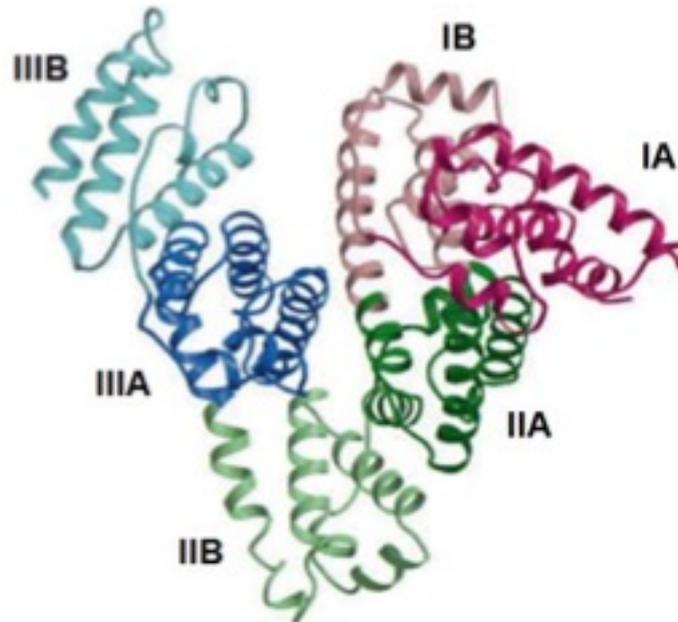
【結果】患者血清 60 例の BCG-HSA 法と BCP 改良-HSA 法のアルブミン濃度の平均値は、NA 群で 49.51 g/L と 45.03 g/L (差 4.48 g/L) . LA 群で 32.45 g/L と 25.54 g/L (差 6.91 g/L) であった. これらの結果より, 2 点校正 BCG 法で使用する 2 濃度の標準溶液の校正値は実際の濃度から NA 群および LA 群で得られた平均値の差を引くことにより決定した [標準溶液 1 (濃度: 45.0 g/L、校正値: 40.5 g/L) , 標準溶液 2 (濃度: 25.5 g/L、校正値: 18.6 g/L)]. 新たに採取した患者血清 136 例を用い 2 点校正 BCG 法と BCP 改良-HSA 法で測定したところ、両群のアルブミン濃度の平均値に有意差は認められなかった [(NA 群: 39.18 ± 3.42 g/L, 39.37 ± 3.14 g/L, $p = 0.768$, Student's t 検定) , (LA 群: 26.20 ± 6.23 g/L, 26.23 ± 5.67 g/L, $p = 0.976$, Student's t 検定)].

【結論】本法は臨床的意義が高い低アルブミン濃度域においてもグロブリン分画の BCG 法への影響を低減する校正効果があることに加え, BCP 改良法の選択が難しい状況である諸外国においても採用可能な校正法であり, アルブミン測定の標準化に寄与する役割を果たすものと考えられる.

1. 序論

1. 1 ヒト血清アルブミンの構造

ヒト血清アルブミン (HSA) は 585 個のアミノ酸残基からなる 1 本のペプチド鎖で分子量約 66 kDa, 等電点 4.8, 半減期 15~20 日の糖鎖を持たない単純タンパクである^{1,2)}. HSA 遺伝子は, 第 4 染色体 q11-13 に存在し, その長さは 16961 ヌクレオチド, 15 個のエクソンのスプライシングを経て肝細胞内で 2078 ヌクレオチドの mRNA に転写される³⁾. HSA の基本構造は, α ヘリックスとそれを結ぶヒンジ領域より形成される. 3 つのドメイン (ドメイン I, ドメイン II, ドメイン III) から構成され, それぞれのドメインはさらに 2 つのサブドメイン (A, B) からなる^{4,5)}. 水溶液中では, これら 3 つのドメインが折り重なってハート型の特有の立体構造をとっている⁶⁾ (図 1). また, その分子中に 35 個のシステイン残基 (Cys) を有しており, そのうち 17 対は分子内ジスルフィド結合 (S-S 結合) を形成し, 構造安定化に大きく寄与している. 一方, N 末端から 34 番目の Cys (Cys-34) は SH 基が唯一遊離な状態で存在している. Cys-34 の SH 基は抗酸化能やリガンド輸送などの HSA 特有な機能発現に重要な役割を果たしている^{7,8)}. この Cys-34 の SH 基が他の物質と結合していない状態を還元型アルブミン (human mercaptalbumin: HMA), システインや還元型グルタチオンなどの SH 基を有する物質と S-S 結合している状態を酸化型アルブミン (human nonmercaptalbumin: HNA) と呼び, 生体内ではこれら両者は混在している⁸⁾.



1	DAHKSEVAHR	FKDLGEENFK	ALVLIAFAQY	LQQCPFEDHV	KLVNEVTEFA
51	KTCVADESAE	NCDKSLHTLF	GDKLCTVATL	RETYGEMADC	CAKQEPERNE
101	CFLQHKDDNP	NLPRLVRPEV	DVMCTAFHDN	EFTFLKKYLY	EIARRHPYFY
151	APELLFFAKR	YKAAFTECCQ	AADKAACLLP	KLDELRDEGK	ASSAKQRLKC
201	ASLQKFGERA	FKAWAVARLS	QRFPKAEFAE	VSKLVTDLTK	VHTECCHGDL
251	LECADDRADL	AKYICENQDS	ISSKLKECCE	KPLLEKSHCI	AEVENDEMPA
301	DLPSLAADFV	ESKDVCKNYA	EAKDVFLGMF	LYEYARRHPD	YSVVLLLRLA
351	KTYETTLEKC	CAAADPHECY	AKVFDEFKPL	VEEPQNLIKQ	NCELFEQLGE
401	YKFQNALLVR	YTKKVPQVST	PTLVEVSRNL	GKVGSKCKKH	PEAKRMPCAE
451	DYLSVVLNQL	CVLHEKTPVS	DRVTKCCTES	LVNRRPCFSA	LEVDETYVPK
501	EFNAETTFH	ADICTLSEKE	RQIKKQTALV	ELVKHKPKAT	KEQLKAVMDD
551	FAAFVEKCKK	ADDKETCFAE	EGKKLVAASQ	AALGL	

図 1. ヒト血清アルブミンの立体構造とアミノ酸配列（文献 4, 5 より引用改変）

折り重なった 3つのドメインから構成されたハート型の立体構造である。ドメイン I（赤色），ドメイン II（緑色），ドメイン III（青色）。

1. 2 体内分布

血液は人間の体重の約 8 %を占め、成人の場合、体重 1 Kg あたり約 80 mL が血液とされている（体重 60 kg では血液の総量は約 5 L）¹⁰⁾。血液は赤血球，白血球，血小板からなる細胞成分と血漿成分から成り，細胞成分が 40～45 %，血漿成分が 55～60 %の割合で構成されている¹¹⁾。さらに血漿成分は，水分（約 90 %）とタンパク質（約 7～8 %）およびその他（グルコース，無機物質，ビタミンなど）の成分からなり，HSA は総タンパク質の約 60 %を占め血清中で最も豊富に存在するタンパク質である¹¹⁾。HSA は 1 日当たり約 6～15 g（100～200 mg/kg/日）が肝臓で合成され血管内に分泌される。一方，同量の HSA が筋肉，皮膚，肝臓および腎臓にて異化されており平衡状態を保っている¹²⁾。総 HSA 量の 30～40 %は血管内に分布する一方で，残りの 60～70 %は血管外に存在する。血管内と血管外アルブミンは相互に交換可能で平衡状態を保っているが，血管内アルブミンが低下すると血管外アルブミンが血管内に移動することで血管内アルブミンは維持されている。これらのことから血管内における HSA の量的変動は，肝疾患や栄養状態の指標として臨床で用いられている¹¹⁾。

1. 3 アルブミンの生理作用

1. 3. 1 膠質浸透圧の維持

体液は細胞外と細胞内に分かれて存在し細胞膜によって隔てられ、それぞれ細胞外液および細胞内液に分類される。さらに細胞外液は血管壁によって隔てられ、間質と血管内に分類される。細胞内液と細胞外液は 2:1 の割合で存在し、細胞内液は体重の 40 %、細胞外液は体重の 20 %を占める。また間質と血管内は 2:1~3:1 の割合で存在し、間質は体重の 13~15 %、血管内は体重の 5~7 %を占める¹³⁾。

体液調整での細胞膜は半透膜として機能し、水や分子量の小さな溶質は細胞膜を透過することが可能であるが、多くの物質は透過することができないため細胞内外の移動をすることができない。さらに細胞膜は脂質二重層で構成されており、Na⁺や K⁺などの荷電性分子は受動的には通過することができない¹⁴⁾。半透膜を透過できる物質は、その濃度勾配に従って移動し膜を隔てた両側で均等に分布する。一方、透過できない物質が存在すると膜の両側でその物質の濃度勾配が存在したままとなり、それを解消するため水が移動し濃度勾配を緩衝するように働く。この半透膜を介した水の移動にかかる圧力を浸透圧とよぶ。

細胞外液の浸透圧物質の代表的な分子は、Na⁺、血糖、尿素窒素であり臨床では血漿浸透圧の計算（血漿浸透圧 [mOsm/L] = 2 × [Na⁺: mEq/L] + [血糖: mg/dL] / 18 + [尿素窒素: mg/dL] / 2.8）¹⁵⁾に利用される。この中で非荷電性物質である尿素窒素は細胞膜を透過することができるため、浸透圧を形成することができない。一方、Na⁺や血糖は細胞膜に存在にする Na⁺/K⁺ -ATPase^{16, 17)}やインスリン作用での GLUT4^{18, 19)}からの細胞内への移動は行われるが、濃度勾配による拡散は行われなため Na⁺や血糖は浸透圧物質として細胞膜における体液調節に関与している。

血管壁は血管内皮細胞により構成され間質と血管内を隔てている。血管内皮細胞は細胞間接着により接着しているが、細胞膜に比べ疎な構造であり水や非荷電性分子に加え Na^+ などの小さな荷電性分子もその接着間を通過することができる。一方、アルブミンなどの分子量の大きい物質はその接着間を通過することができない¹⁴⁾。このことは、血管内に存在するアルブミンを主としたタンパクは、間質から血管内へ水を引き込む浸透圧を形成することができ、これを膠質浸透圧とよぶ。アルブミンは血管壁における体液調整に関与しており、肝硬変やネフローゼ症候群などの低アルブミン血症を呈する病態では、血管内から間質へと体液が漏出し浮腫や腹水の原因となる^{20, 21)}。

1. 3. 2 結合輸送体タンパク質

HSA は内因性および外因性物質と結合し組織に運搬する機能を持つ。今日では、それぞれの物質に対する特定の結合部位が解析^{22, 23)}され、輸送のみならず生体内での酸塩基平衡の維持²⁴⁾、抗酸化作用^{25, 26)}、抗炎症作用^{24), 27)}などの生理作用が知られている。内因性結合物質の代表的な物質は、(1)遊離脂肪酸、(2)ビリルビン、(3)脂溶性ホルモン、(4)2価金属イオン (Cu^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+}) であり、外因性結合物質の代表的な物質は、(5)薬物である。

1. 3. 2. 1 遊離脂肪酸

脂肪組織に蓄えられた中性脂肪は組織のエネルギー源としてインスリンの作用により遊離脂肪酸として放出される²⁸⁾。脂肪酸は疎水性物質のため、血液中では HSA と結合し組織へ輸送される。生理的状況下では1分子の HSA の特定の部位に1~5分子の遊離脂肪酸が結合²⁹⁾している。Curry ら³⁰⁾は HSA と中鎖脂肪酸 (ミスチリン酸, C14:0) との複合体の結晶構造を解析し、その結合部位はサブドメイン IA, IB および IIIA, IIIB であることを報告した。その後、同グループは他の飽和および不飽和脂肪酸 (カブリン酸, C10:0. ラウリン酸, C12:0. パルミチン酸, C16:0. ステアリン酸, C18:0. オレイン酸, C18:1. アラキドン酸, C20:4) の結合状態についても報告している^{31, 32)}。

1. 3. 2. 2 ビリルビン

ヘモグロビンのプロトヘムがヘムオキシゲナーゼにより α 位で開環し、ビリベルジンIX α がビリベルジン還元酵素によりビリルビンIX α が生成される。生成されたビリルビンIX α は、上述の遊離脂肪酸と同様の疎水性物質のため、HSA と結合し血流を介して肝で輸送タンパク (organic anion transporting polypeptide1B1: OATP1B1/3) ³³⁾により取り込まれる。肝細胞内小胞体膜に局在するビリルビン・UDP-グルクロン酸転移酵素 (UGT1A1) ³⁴⁾によりグルクロン酸抱合され抱合型ビリルビンとなり、毛細胆管側肝細胞膜上の輸送タンパク (multidrug resistance protein 2: MRP2) ^{33, 34)}によって胆汁中に排泄される。一部は類洞側肝細胞膜にある輸送タンパク (MRP1 および MRP3) ³³⁾により肝細胞から血中に移動する。血中の抱合型ビリルビンは、再び OATP1B1/3 により肝細胞内に取り込まれることに加え、腎での排泄が行われるため健常者では血中の抱合型ビリルビン量はわずかである。一方、血中の抱合型障害や胆汁うっ滞時には、MRP2 の発現が低下し胆汁中に排泄できないため、MRP1 および MRP3 によって血中の抱合型ビリルビンが増加し黄疸がみられる。黄疸が蔓延した場合は、抱合型ビリルビンと HSA が共有結合して生成される δ -ビリルビンが生成される ³⁵⁾。 δ -ビリルビンは肝細胞や腎での代謝排泄ができないため血中に長く留まる。Minomo ら ³⁶⁾は、HSA のサブドメイン II A がビリルビンIX α の結合部位であり、ビリルビンの腎排泄にも重要な役割を果たしていると報告している。このように HSA は生体内でのビリルビンの輸送および代謝を担っている。

1. 3. 2. 3 脂溶性ホルモン

ホルモンは組織や内分泌腺で生合成され，血流に乗って標的臓器へと運ばれ，受容体に結合しシグナルを伝える微量化学物質である．生体内では 100 種類以上のホルモンが確認されているが，作用機序により水溶性ホルモンおよび脂溶性ホルモンに大きく分類される³⁷⁾．水溶性ホルモンは細胞膜を通過できないため，細胞膜受容体より G タンパク質，cAMP，カルシウムおよびチロシンキナーゼ系を介してシグナルを伝達する．脂溶性ホルモンは，非水溶性のチロシンやコレステロールから合成され，主にホルモン結合グロブリンと結合して標的臓器へ輸送される．細胞膜や核膜を通過し細胞膜内および核内受容体と結合してシグナルを伝達する¹⁴⁾．

脂溶性ホルモンである甲状腺ホルモンは，恒温動物の熱産生，エネルギー代謝および細胞の分化発達に関与するホルモンである．甲状腺でアミノ酸のチロシン骨格からヨードの有機化を経て，ヨードを 3 つ有するトリヨードサイロニン (T3) と 4 つ有するサイロキシシン (T4) が合成分泌される¹⁴⁾．分泌された T3 は速やかに組織へ取り込まれるのに対して，T4 は輸送タンパクと結合して末梢へと輸送される．この輸送タンパクとして親和性が高い順にサイロキシシン結合タンパク (TBG) ，トランスサイレチン (TTR) ，HSA が知られている．HSA の T4 に対する親和性は TBG に対して 1/10000 と低いが，血漿濃度が高いため，総 T4 の 75 % は TBG，10~15 % は TTR，10 % は HSA に結合し，その輸送に関与している³⁸⁾．HSA をコードする遺伝子の点変異からタンパク翻訳上，1 アミノ酸が置き換わることによって，サイロキシシンに対する親和性が増加する家族性異常アルブミン血症性高サイロキシシン血症 (familial dysalbuminemic hyperthyroxinemia: FDH) が知られている．Petitpas

ら³⁹⁾は、HSA の 2 つの FDH 変異体 (R218H, R218P) の結晶構造の解析から、R218 の変異がサイロキシンに対する親和性を著しく高めることに加え、HSA のサイロキシン結合部位はサブドメイン II A, III A, III B に存在することを報告した。

1. 3. 2. 4 2 価金属イオン

生体内には金属イオンが存在し生体内酵素の活性化、筋の収縮、神経伝達など様々な生理作用を持っている。その多くは血中で HSA と結合しており、特に 2 価遷移金属に対する結合性は大きく HSA は運搬に加え、 Cu^{2+} や Zn^{2+} の必須微量元素の貯蔵としての役割も持っている⁴⁰⁾。HSA と 2 価金属イオン (Ni^{2+} , Ca^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+}) の結合部位は、N 末端領域 (N-Asp-Ala-His-)、特にヒスチジンが結合配位子の 1 つとして関与している^{41, 42)}。

人体の約 95 % は酸素・炭素・水素・窒素で構成され、残りの 5 % はミネラルで構成されている。この中でカルシウム (Ca) は体内で最も多く存在し、体重の 1~2 % を占めている。その約 98 % は骨組織や歯などの硬組織にあり、リン酸とともにリン酸カルシウムの結晶として存在している⁴³⁾。残りは血中に存在し約 50 % が非タンパク結合のイオン化 Ca、約 45 % が主に HSA と結合しているタンパク結合型、約 5 % がリン酸やクエン酸などと結合した複合型で存在する¹⁴⁾。細胞のシグナル伝達の役割を持ち、血管の収縮と拡張、神経インパルス伝達、筋収縮およびインスリンなどのホルモン分泌を媒介する⁴⁴⁾。生理活性として作用するのはイオン化 Ca であり、副甲状腺ホルモン、活性型ビタミン D、カルシトニン、腸管からの吸収、腎での濾過および再吸収によって調整されている¹⁴⁾。臨床では、血清総 Ca (イオン化 Ca+タンパク結合型+複合型) とイ

オン化 Ca は連動しているため、多検体処理可能な血清総 Ca で測定されている。そのため、低アルブミン血症の場合はタンパク結合型の割合が変動するため、血清アルブミン値で補正する必要がある⁴⁵⁾。国内では、日本透析医学会が推奨⁴⁶⁾する Payne ら⁴⁵⁾の補正式が広く用いられている。一方、米国腎臓財団の KDOQI (Kidney Disease Outcomes Quality Initiative) ガイドラインでは、KDOQI-2 式を推奨している⁴⁷⁾。

Payne 式:

$$\text{補正 Ca(mg/dL)} = \text{実測 Ca 濃度(mg/dL)} + [4 - \text{ALB 濃度(g/dL)}]$$

KDOQI-2 式:

$$\text{補正 Ca(mg/dL)} = \text{実測 Ca 濃度(mg/dL)} + 0.8 \times [4 - \text{ALB 濃度(g/dL)}]$$

いずれの補正式においても後述するアルブミン測定法の相違による影響に加え、補正 Ca とイオン化 Ca の相関が肝疾患や腎疾患などの病態毎で異なるため、全ての症例で総 Ca を補正することの危険性が指摘されている⁴⁸⁻⁵⁰⁾。

1. 3. 2. 5 薬物

生体での薬物動態は薬物が体内に投与されてから排泄されるまでの過程を示すものであり、体内に投与された薬物は、吸収 (absorption) 過程を経て循環血流から体内組織に分布 (distribution) したのち、酵素により代謝 (metabolism) されることで別の化合物へと変換し、排泄 (excretion) されることで体内から消失する。これら4つの過程 (ADME) における薬物濃度の変化を追うことで、薬物の効能や毒性発現の関連性などを調べることができる⁵¹⁾。薬物の生体膜透過や代謝速度は、タンパク質と結合していない非結合型の薬物濃度に依存するため、薬物の結合タンパクは薬物動態、薬効および毒性発現に大きな関わりを有している。その種類は HSA をはじめ、 α_1 -アシドグリコプロテイン、グロブリン、リポプロテインなどが知られている⁵²⁾。HSA は総タンパク質の約 60% を占めることに加え、多くの薬物と結合することから、薬物の結合タンパクを考える上で重要なタンパクである。

HSA は、分子上に複数の薬物結合サイトを有しており、大きく分けてサイト I、サイト II、金属イオン結合サイト、Cys-34 における結合サイトが知られている⁵³⁾。サイト I、サイト II はそれぞれ HSA のサブドメイン II A、サブドメイン III A に位置しており、それぞれの結合サイトへ結合する薬物の種類が解明されている^{11), 23)} (表 1, 2)。臨床においては HSA 濃度の減少や遊離脂肪酸、尿毒症物質、ビリルビンなどの内因性タンパク結合物質が薬物と同一の結合サイトで競合することで、薬物と HSA の結合性は大きく変化する²³⁾。Vanholder ら⁵⁴⁾は、腎不全の患者を対象に 9 種類の薬剤を高速液体クロマトグラフィー (HPLC) を用いて HSA との結合性を評価した。その結果、テオフィリン、フェニトインが健常者群に対してそれぞれ、-20.1% および -16.0% と著しく低下したこ

とを報告している.

表 1 HSA のサイト I (サブドメイン II A) に結合する代表的リガンド
(文献 11, 22, 23 を参考に作成)

薬物	内因性物質	その他
Warfarin	Bilirubin	BCG
Azapropazone	Eicosanoids	BCP
Acenocoumarol	CMPF	Methyl Orange
Phenylbutazone	Thyroxin	Phenol Red
Salicylate		Dansylamide
Indomethacin		Dansylasparagine
Phenytoin		Butylaminobenzoate
Tolbutamide		
Chlorpropamide		
Iophenoxate		

表 2 HSA のサイト II (サブドメイン IIIA) に結合する代表的リガンド
(文献 11, 22, 23 を参考に作成)

薬物	内因性物質	その他
Diazepam	Medium-chain	Dansylsarcosine
Ketoprofen	fatty acid	Dansylglycine
Chlofibrate	L-tryptophan	Hydroxyflavone
Ibuprofen	Chloride ion	
Iopanoate	Indolacetate	
Azidodeoxythymidine	Indoxyl sulfate	
Flufenamate	Hippurate	
Ethacrynate	Thyroxin	
Naproxen		
Flurbiprofen		

1. 4 血清アルブミン測定 of 臨床的意義

体内 HSA の変動は、代謝動態（合成、分解）および体内分布の調整により、その恒常性を維持している。HSA は肝細胞でのみ合成されるため、血清 HSA 濃度の測定は肝合成能の有用な指標である。半減期は 15～20 日と他のタンパク質に比べ長いことから^{1, 2)}、一過性の急性肝障害では保たれる場合が多い。合成の調整は、栄養素摂取量^{55, 56)}、血漿浸透圧^{57, 58)}、ホルモン⁵⁹⁾などにより調整される。Baynes ら⁶⁰⁾は、ラットを用いて標識したアルブミン分解物の臓器分布から、HSA の分解は特定の臓器ではなく、筋肉や皮膚をはじめ肝臓や腎臓など多くの臓器で分解されると報告しているが詳細は明らかになっていない。体内の分布は、30～40 %が血管内に分布し、60～70 %が血管外に分布する。血管内および血管外アルブミンは相互に交換可能で、血管内アルブミンが低下すると血管外アルブミンが血管内に移動するため血清アルブミン濃度は血管外プールによっても調整されている¹¹⁾。外因性に投与されたアルブミンは 10～15 分で血管内に均一に拡散し、その内 60 %は血管外プールへ移動し、4～7 日で血管外プールに均一に分布することが知られている⁶¹⁾。

臨床では低アルブミン血症が重要でありその要因は ①合成素材の不足、②体外喪失、③体腔内漏出、④合成障害、⑤異化亢進、⑥血液の希釈に分類されアルブミン値は全身のスクリーニング検査に利用される^{12), 61)}

(表 3)。また以下のように診断基準や重症度分類の臨床判断値などとしても利用されており、血清アルブミン測定は臨床で頻繁に実施されている臨床検査の 1 つであり正確な測定が求められている。

表 3 生体内での低アルブミン血症の要因（文献 12, 61 より引用改変）

要因	代表的な疾患および病態
1. 合成素材の不足	栄養不足, 摂食不良, 吸収障害など
2. 体外喪失	ネフローゼ症候群, 下痢, 出血, 熱傷など
3. 体腔内漏出	胸水や腹水の貯留
4. 合成障害	肝硬変, 劇症肝炎など
5. 異化亢進,	急性炎症性疾患, 外傷, 手術, 熱傷など
6. 血液の希釈	妊娠, 水血症など

表 4 成人ネフローゼ症候群の診断基準（文献 21 より引用改変）

-
1. 蛋白尿: 3.5 g/日以上が持続する
 2. 低アルブミン血症: 血清アルブミン値 3.0 g/dL 以下
 3. 浮腫
 4. 脂質異常症（高 LDL コレステロール血症）
-
- 1) 上記の尿蛋白量, 低アルブミン血症の両所見を認めることが診断の必須条件である.
 - 2) 浮腫は必須条件ではないが, 重要な所見である.
 - 3) 脂質異常症は必須条件ではない.
 - 4) 卵円形脂肪体は診断の参考となる.

ネフローゼ症候群とは腎糸球体系障害による蛋白透過性亢進により尿タンパク漏出に伴う低アルブミン血症を特徴とする症候群である。診断には血清アルブミン値 3.0 g/dL 以下が必須条件として挙げられている²¹⁾。

表 5 Child-Pugh 分類 (文献 20 より引用改変)

評点	1 点	2 点	3 点
肝性脳症	なし	軽度 (I・II)	昏睡 (III以上)
腹水	なし	軽度	中度量以上
血清ビリルビン値 (mg/dL)	2.0 未満	2.0~3.0	3.0 超
血清アルブミン値 (g/dL)	3.5 超	2.8~3.5	2.8 未満
プロトロンビン 時間活性値 (%)	70 超	40~70	40 未満
国際標準比 (INR)	1.7 未満	1.7~2.3	2.3 超

各項目のポイントを加算し、その合計点で以下の通り分類する。

Class A	5~6 点
Class B	7~9 点
Class C	10~15 点

手術や抗がん剤などの治療方針の決定に利用される肝予備能力の評価法である。評価ポイントには血清アルブミン値 3.5 g/dL および 2.8 g/dL が識別値として利用されている^{20), 62)}。

表 6 CONUT スコア (文献 63 より引用改変)

ALB (g/dL)	≥ 3.50	3.00~3.49	2.50~2.99	< 2.50
スコア①	0	2	4	6
総リンパ球数 (/ μ L)	≥ 1600	1200~1599	800~1199	< 800
スコア②	0	1	2	3
総コレステロール (mg/dL)	≥ 180	140~179	100~139	< 100
スコア③	0	1	2	3
栄養レベル	正常	軽度異常	中等度異常	高度異常
CONUT 値 (①+②+③)	0~1	2~4	5~8	9~12

各項目のポイントを加算し、その合計点で栄養レベルを抽出する。

蛋白、免疫、脂質の生体指標から栄養状態を評価する方法であり、重症化してアルブミン値が低下する前の軽度栄養不良患者を抽出することができる。血清アルブミン値 3.0 g/dL がスコア値に利用され、血清アルブミン値のスコアが他の 2 項目の 2 倍になっているのが特徴である⁶³⁾。

1. 5 血清アルブミン測定法の変遷

血清アルブミンを定量的に測定する方法は、塩分画法、電気泳動法、色素結合法、免疫学的測定法に分類される。物理化学的測定法として1921年に Howe⁶⁴⁾によって塩析ケルダール法が報告された。この方法は、血清中のグロブリンを硫酸ナトリウムで沈殿除去したのち、ケルダール法⁶⁵⁾によってタンパク質含量をもとにアルブミン値として推定する方法である。その後、ケルダール法に代わりビウレット法⁶⁶⁾を用いて、アルブミン値が推定されたが、どちらの方法もグロブリンを除いたタンパク濃度をアルブミン値として推定しているため、アルブミンを直接定量することができない。

1937年に Tiselius⁶⁷⁾によって電気泳動法が開発された。自由溶液中での荷電物質が電場のもとで移動する現象を用いた方法である。溶液中のタンパク質は、その種類によって電荷や分子の大きさ、形状が異なることを利用し、アルブミン、 $\alpha 1$ -、 $\alpha 2$ -、 β -、 γ -グロブリンの5分画に分離する方法である。その後、支持体には濾紙、デンプン、ポリアクリルアミドゲル、セルロース・アセテート膜、アガロースゲルなどが開発された⁶⁸⁾。電気泳動法を用いたアルブミン測定は、別に測定した総タンパク濃度からアルブミン分画の割合に基づいてアルブミン濃度を算出するため、塩析法と同様にアルブミンを直接定量することができない。

1953年に Brackenら⁶⁹⁾がアルブミンを直接定量することができるメチルオレンジを用いた色素結合法を報告した。色素結合法は、 H^+ 濃度の変化、すなわち pH 変化に応じてスペクトルが変化する色素を用いて、酸性条件下で正に荷電するアルブミンに色素が結合することで pH 変化がなくてもスペクトルの変化が起こる蛋白誤差と呼ばれる現象を利用した方法である。色素結合法の特徴は、操作が簡便で自動分析への適用が

容易な点であり，現在でも日常検査の主流となっている測定方法である．その後，フェノールレッド⁷⁰⁾や 2-(4'-hydroxyazobenzene)benzoic acid (HABA)⁷¹⁾など種々の色素が検討されてきたが，いずれの方法もアルブミンに対する特異性や共存物質の影響などの問題がある⁷²⁻⁷⁵⁾．その中において，後述するブロムクレゾールグリーン (bromocresol green: BCG) およびブロムクレゾールパープル (bromocresol purple: BCP) の色素を使用した方法は，現在の日常検査法において広く普及している．

アルブミン特異性が高い方法として，アルブミンと抗アルブミン抗体の抗原抗体反応を利用した免疫学的測定法があり，国際化学連合 (International Federation of Clinical Chemistry: IFCC) はロケット免疫電気泳動法をアルブミン測定の標準法と設定している⁷⁶⁾．種々の免疫学的測定法の中で，現在の日常検査では抗原抗体複合物によって生じた濁りの吸光度を測定する免疫比濁度と散乱光を測定する免疫比ろう法が主に使用されている⁷⁷⁾．免疫学的測定法は色素結合法に比べ操作が煩雑で測定時間が長いことや試薬が高価であるが，測定感度が高いため日常検査では，尿や髄液などのアルブミン濃度が微量な臨床検体を対象に利用されている．

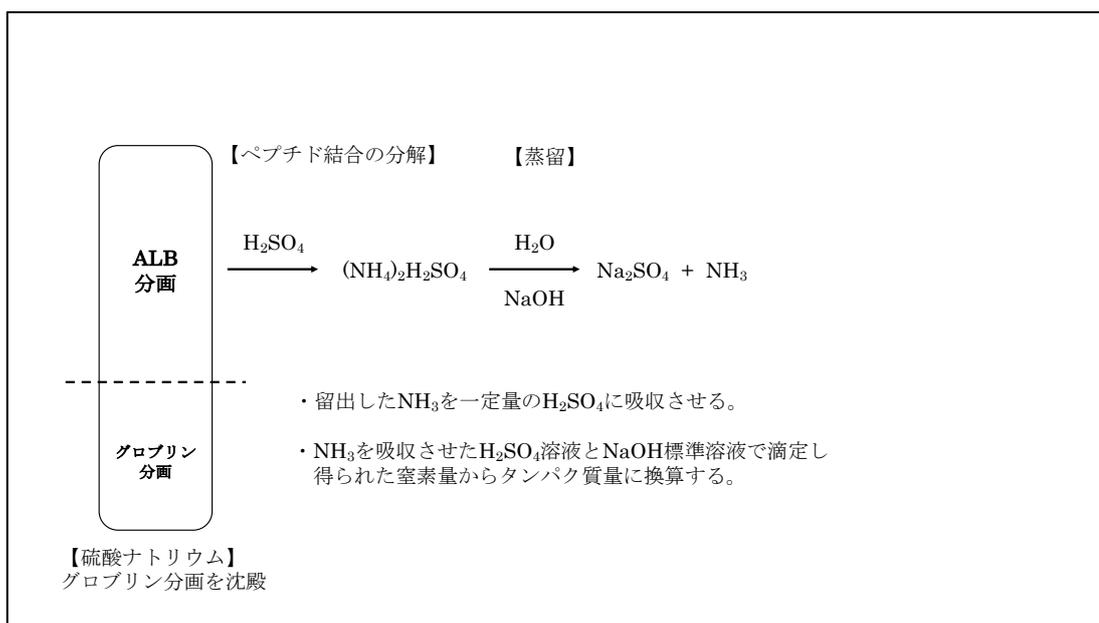


図 2 沈殿ケルダール法（文献 64, 65 を参考に作成）

タンパク質の陰性荷電を塩類（硫酸ナトリウム）の Na^+ で中和しタンパク分子を囲む水分子を外すことでグロブリン分画を沈殿させ、上清部のタンパク質中の窒素量をケルダール法で測定する。ケルダール法はタンパク質試料に硫酸（ H_2SO_4 ）を加え加熱するとペプチド結合（ $-\text{CO}-\text{NH}-$ ）の $\text{NH}-$ からアンモニア（ NH_3 ）が遊離する。 NH_3 は H_2SO_4 と直ちに反応し硫酸アンモニウム（ $(\text{NH}_4)_2\text{H}_2\text{SO}_4$ ）となる（分解反応）。 $(\text{NH}_4)_2\text{H}_2\text{SO}_4$ 溶液に過剰の NaOH を加え加熱すると NH_3 が留出する（蒸留操作）。この留出した NH_3 を一定量の H_2SO_4 に吸収させると H_2SO_4 から乖離した H^+ と反応し NH_4^+ となる。 NH_3 と反応せずに残った H^+ を水酸化ナトリウム（ NaOH ）で滴定し NH_3 量を測定する（逆滴定）。この NH_3 量はタンパク質の窒素量に相当するため、沈殿法でグロブリンを除いたタンパク質量がアルブミン値として推定される。

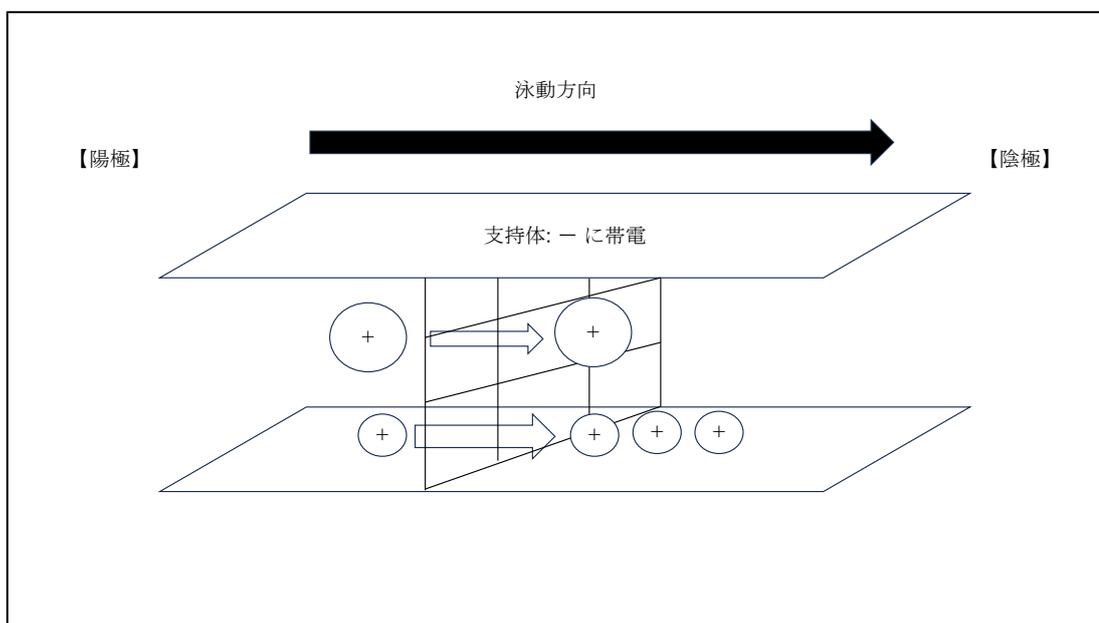


図3 アガロースゲルの支持体を用いた電気泳動法(文献68を参考に作成)

血清試料(溶媒)とアガロースゲル(支持体)が接すると、その境界面において正負2層の電気二重層を生じる(支持体は負に帯電、溶媒は正に帯電)。その支持体に直流電圧をかけると正に帯電した溶媒分子が陰極に移動する。その際、アガロースゲルの網目により抵抗を受けることで分子はそのサイズに依存してゲル中を泳動する。具体的には、血清試料では大きな分子(アルブミン)は遅く、小さな分子(グロブリン)ほど早く陰極側に泳動され各タンパク質に分画される(図4)。各分画に含まれる主な成分を示す(表7)。分画されたタンパク質を染色し、デシントメーターで染色パターンを解析することで得られたタンパク分画の割合と総蛋白濃度からアルブミン値を推定する。

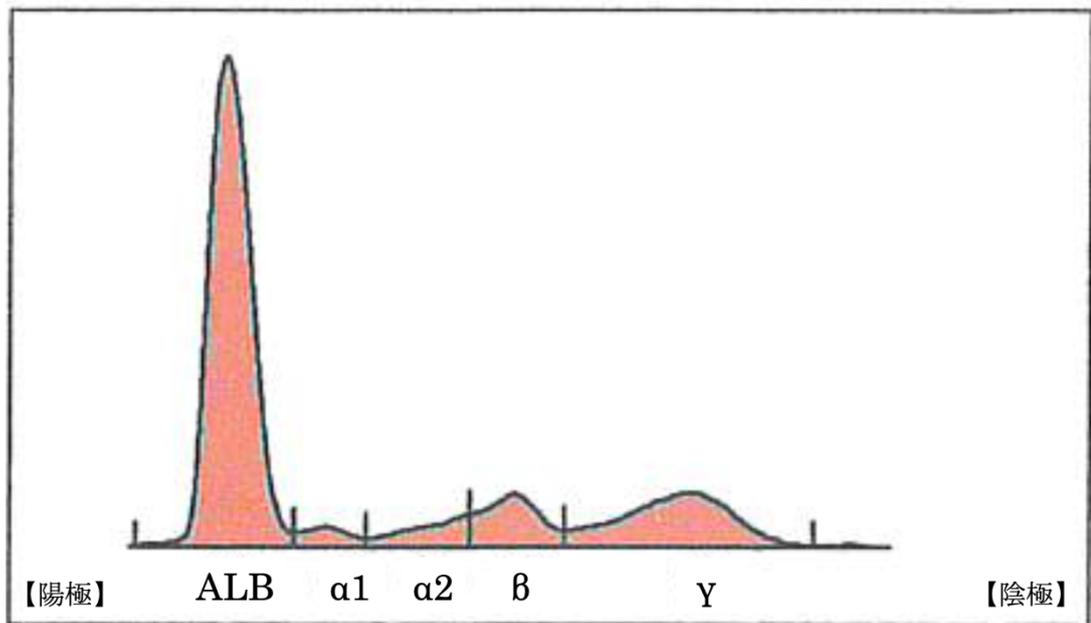


図4 タンパク分画の泳動パターン

陽極側からアルブミン, $\alpha 1$ -, $\alpha 2$ -, β -, γ -グロブリン分画の5分画に分離される. 全ピーク面積を100%としたとき, それぞれのタンパク分画面積を割合として求め総蛋白量から分画量を算出する.

表 7 各タンパク分画に含まれる主な成分（文献 113 より引用改変）

分画名	主な成分
アルブミン分画	アルブミン
α_1 -グロブリン分画	α_1 -アンチトリプシン α_1 -アンチキモトリプシン α_1 -アシッドグリコプロテイン
α_2 -グロブリン分画	α_2 -マクログロブリン ハプトグロビン セルロプラスミン
β -グロブリン分画	トランスフェリン β -リポプロテイン 補体 (C ₃ , C ₄)
γ -グロブリン分画	IgG, IgA, IgM, IgD, IgE

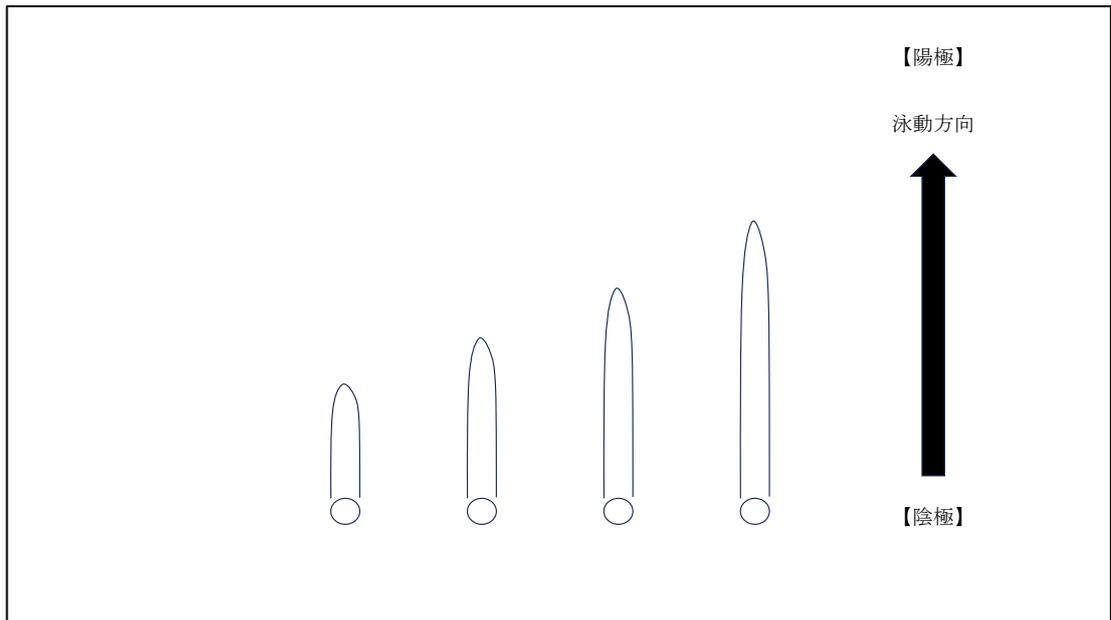


図 5 ロケット免疫電気泳動（文献 76 を参考に作成）

抗体含有アガロースゲルで電気泳動を行うと，試料中の抗原は上方（陽極側）へ泳動される．ゲル内の抗体は pH を調整することで泳動されることなくとどまる．抗原はゲル内の移動に従い，その部分の抗体と反応し沈降線を形成する．試料中の抗原がすべて消費されると沈降線は延長しなくなりロケット型の沈降線が形成される．ロケットの高さは試料中の抗原量と比例するため，ロケットの高さを標準曲線と比較することでアルブミン値を算出する．

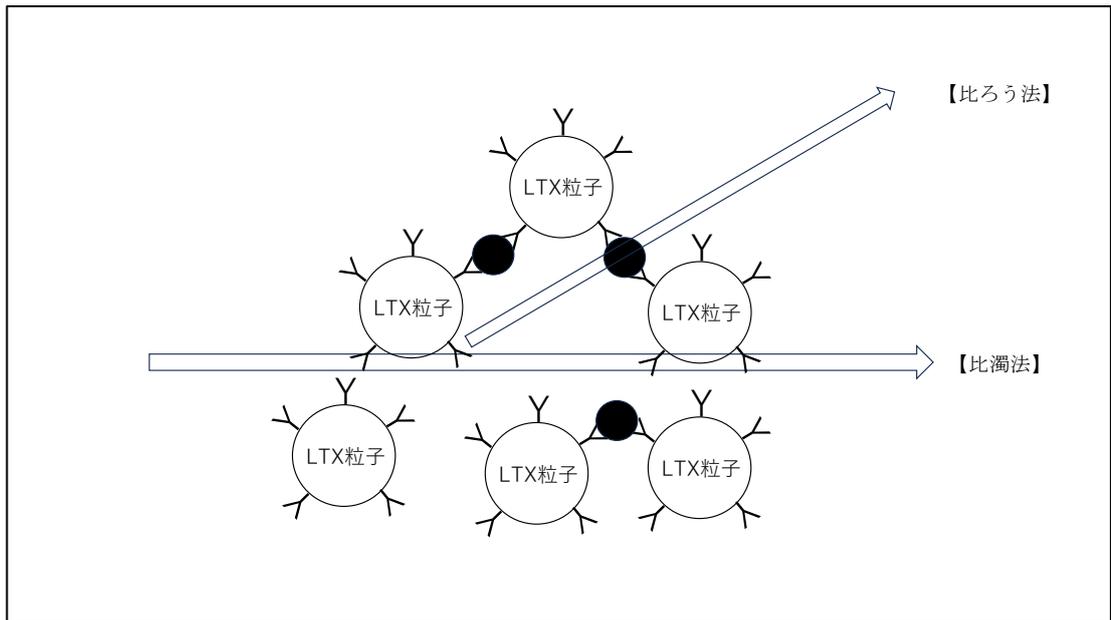


図 6 ラテックス粒子を利用した免疫比濁法と免疫比ろう法(文献 77 を参考で作成)

ラテックス粒子に結合させた抗体に抗原を反応させ、抗原-抗体複合体を形成することでラテックス粒子は凝集を起こす。免疫比濁法は凝集塊に光を照射し散乱による照射光の減衰を測定する。一方、免疫比ろう法は散乱した光を測定することでアルブミン値を定量する。

1. 6 日常検査法で使用される色素結合法の特徴

1. 6. 1 BCG 法

1965年に Rodkey⁷⁸⁾により最初に報告され、pH 7.0 付近のリン酸緩衝液中での吸収スペクトルの減少を捉える方法を原理としたが、この方法は吸光度が高く、アルブミンとの結合が比較的弱い pH 条件であった。その後 Doumas ら⁷⁹⁾が、pH 4.2 のクエン酸緩衝液に、Brij35（非イオン性界面活性剤）を添加する改良がなされた。これにより pH によるタンパク質の濁りや沈殿が生じることなく、アルブミンとの結合性が強く感度が高いことに加え、安価なウシアルブミンを標準液として利用できることから広く用いられるようになった。一方、BCG 法の問題点として臨床的意義の高い低アルブミン濃度域で正誤差を生じることである⁸⁰⁾。この要因として BCG 法はアルブミンのみならずグロブリン分画⁸¹⁾、特に急性相反応タンパク⁸²⁾と反応することにある。村本⁸³⁾や Gustafsson⁸²⁾は BCG 法と反応するグロブリンとして、 α_1 -アシドグリコプロテイン、 α_2 -マクログロブリン、セルロプラスミン、ハプトグロビン、トランスフェリンを報告している。肝硬変やネフローゼ症候群では、グロブリンに対してアルブミンの割合は低下するため、BCG 法によるアルブミン値は偽高値となる^{84, 85)}。この問題点についてグロブリンと BCG の反応速度はアルブミンに比べ遅いため、反応時間を短縮（10 秒以下で測定）させることでグロブリンによる正誤差の影響を低減させる方法が報告されている^{82), 86, 87)}。しかし、反応初期からグロブリンはある程度の反応性を示し⁸⁸⁾、その濃度にも正誤差の程度は関係⁸⁹⁾することに加え、現在の自動分析装置においても反応開始 10 秒以下の吸光度測定は利用できないため、グロブリンの影響を十分に回避することは困難である。また、前処理時間の短縮を目的に緊急検査において使用されるヘパリン加血漿

では、ヘパリンによる負誤差⁹⁰⁾とフィブリノーゲンとの交差反応および混濁形成による正誤差⁸³⁾が報告されている。

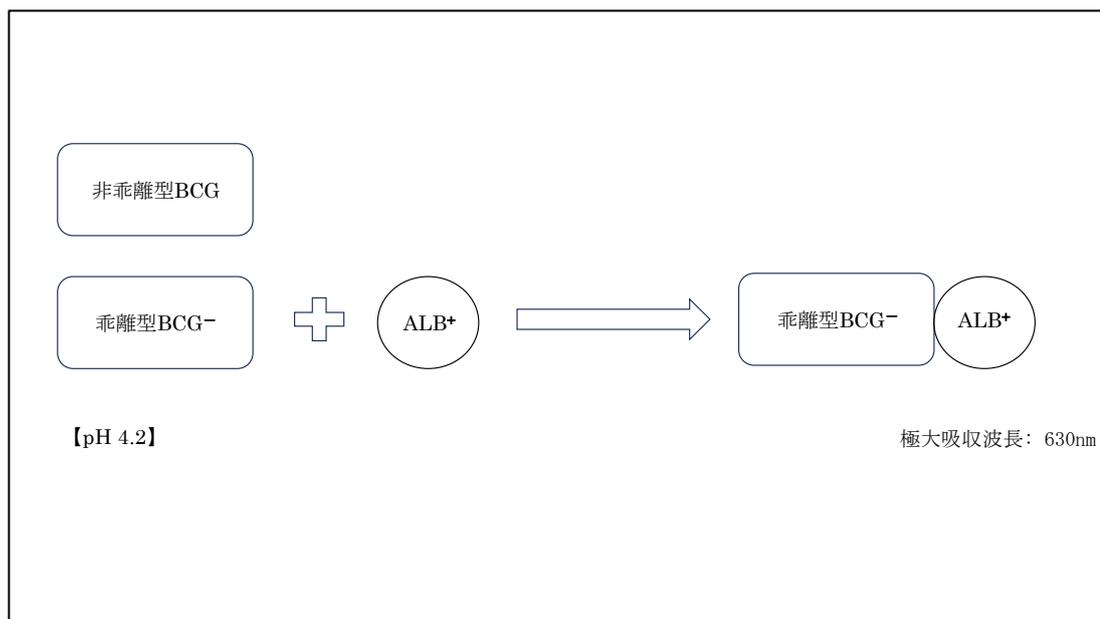


図 7 BCG 法の測定原理（文献 79 を参考に作成）

pH 指示薬に使用される BCG 色素は、酸性条件下で非乖離型と乖離型分子の陰イオンとして存在する。また、この条件下ではアルブミンは正電荷となるため、陰イオンとして存在する BCG と結合し複合体を形成する。この複合体はアルブミン濃度依存的に形成され BCG の構造変化により極大吸収波長が 630 nm にシフトする。この 630 nm 付近の吸光度を測定することでアルブミン値を定量する。BCG とタンパク質の相互作用は pH に依存し、BCG 法によるアルブミン測定では吸光度と測定範囲の関係から pH4.2 の条件で測定される。酸性条件下ではグロブリン分画が沈殿しやすく吸光度測定に影響を与えるため、タンパク質溶解能を持つ界面活性剤であるポリオキシエチレンラウリルエーテル（Brij-35）を BCG 試薬に添加しその影響を回避している。一方、BCG 法は一部のグロブリン分画とも反応しアルブミンと同様に BCG との複合体を形成するため、濃度依存的に 630 nm 付近における吸光度は上昇する。

1. 6. 2 BCP 法

1968年に Louderback ら⁹¹⁾により, その後 Pinnell ら⁹²⁾によって自動化法が報告され, BCG 法の問題点であったグロブリン分画との反応を示さない方法である. また, いくつかのグループにより, 免疫学的測定法との一致に基づくアルブミンに対する特異性が確認されている⁹³⁻⁹⁵⁾. 一方, BCP 法の問題点としてアルブミンの異性体である HMA と HNA の反応に差があることである. 具体的には, HMA に比べ HNA の反応性が高いことである. 血清を保存すると HMA は HNA への変換が起こり, 血清アルブミン中の両者の比率は HMA が減少し HNA は増加する⁹⁶⁾. この変換は, -20°C でも起こり⁹⁶⁾, 保存温度が高いほど変換速度は速くなる⁹⁷⁾. また, 健常者の HMA の比率は約 75%であるのに対して, 個々の病態でその比率は異なり, 慢性腎不全, ネフローゼ症候群, 人工透析, 各種の肝疾患(急性肝炎, 肝硬変, 肝細胞癌)などでは, HNA の比率が増加している^{96), 98)}. よって, これらの患者では, BCP 法での測定値は真値より高い傾向を示すことになる. しかし, 人工透析患者では HNA の比率が増加しているのにも関わらず, BCP 法は免疫学的測定法に比べ低値に測定されることが多い⁹⁹⁾. この要因として尿毒症患者血清に存在する内因性薬物結合阻害因子 3-carboxy-4-methyl-5-propyl-2-furanpropanoic acid (CMPF) が関与していることが確認されている¹⁰⁰⁾. また, Ihara ら¹⁰¹⁾は δ -アルブミン, Kok ら¹⁰²⁾はカルバミル化アルブミンによって負誤差を生じることを報告している. ヘパリン加血漿の影響は, BCG 法とは挙動が異なり, ヘパリンの影響とフィブリノーゲンとの交差反応および混濁形成ともに正誤差となることが報告されている^{83), 90)}. さらに, ウシアルブミンとの反応性が低い^{103, 104)}ため, 標準液として利用できない. 標準液にはヒト由来アルブミンを利用する必要がある

が、市販ヒトアルブミンは健常者血清に比べ HNA の比率が高く、かつその比率も一定でないため⁹⁾、BCP 法の標準液の測定値は校正値と一致しない場合が多い¹⁰⁵⁾。このように、BCP 法はアルブミンに対する特異性が非常に高い方法であるが、多くの要因が測定値に影響するため BCG 法に変わる測定法には至っていない。

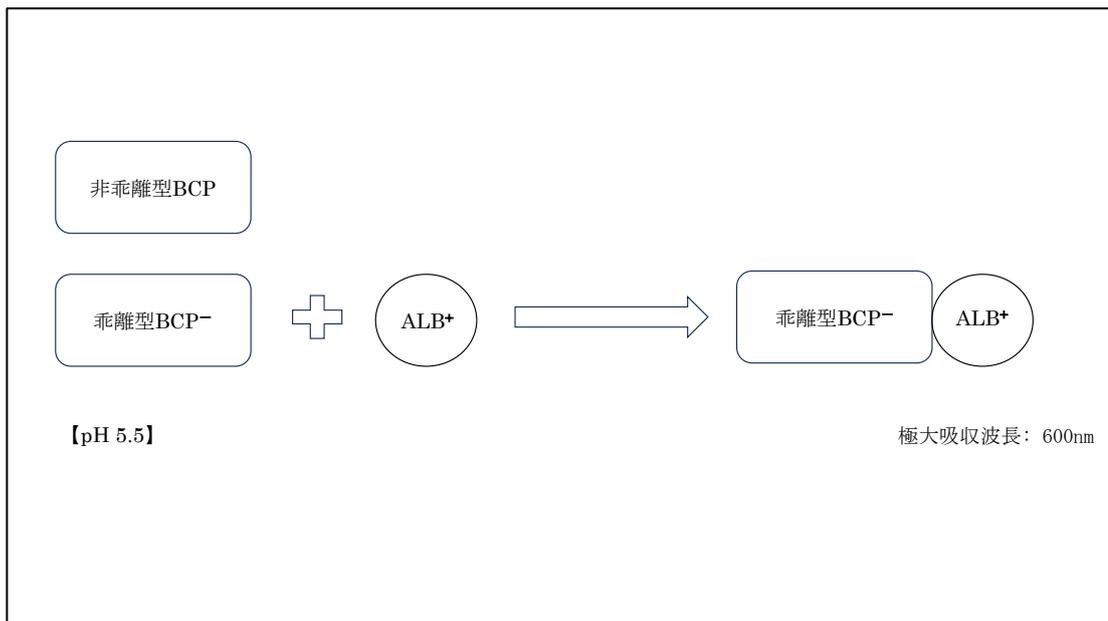


図 8 BCP 法の測定原理（文献 91, 92 を参考に作成）

pH 指示薬に使用される BCP 色素は、酸性条件下で非乖離型と乖離型分子の陰イオンとして存在する。また、この条件下ではアルブミンは正電荷となるため、陰イオンとして存在する BCP と結合し複合体を形成する。この複合体はアルブミン濃度依存的に形成され BCP の構造変化により極大吸収波長が 600 nm にシフトする。この 600 nm 付近の吸光度を測定することでアルブミン値を定量する。BCP とタンパク質の相互作用は pH に依存し、BCP 法によるアルブミン測定では吸光度と測定範囲の関係から pH 5.5 の条件で測定される。酸性条件下ではグロブリン分画が沈殿しやすく吸光度測定に影響を与えるため、タンパク質溶解能を持つ界面活性剤であるポリオキシエチレンオクチルフェニルエーテル (Triton X-100) を BCP 試薬に添加しその影響を回避している。BCG のようにグロブリン分画との反応性は認められないが、還元型アルブミン (HMA) に対して酸化型アルブミン (HNA) の反応性が高いため、その比率に応じ吸光度が異なることとなりアルブミン測定値に影響を与える。

1. 6. 3 BCP 改良法

1999年に Muramoto ら¹⁰⁶⁾により、ドデシル硫酸ナトリウム(sodium dodecylsulfate: SDS) および 5,5'-ジチオビス(2-ニトロ安息香酸)(5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid): DTNB) で HMA をすべて HNA に変換したのち BCP と反応させることにより両者の BCP との反応性の差を解消する方法が報告された。BCP 法の問題点を解消する方法であり、血清保存による影響も回避されている¹⁰⁷⁾。第1反応で HMA から HNA の変換を行い、第2反応で吸収スペクトルの変化を伴う BCP との本反応を行う2試薬系試薬で組み立てられていることから、2ポイント分析法を利用することが可能である。これによって、溶血や乳びなどの血清由来の色の影響を回避することが可能になる。またこの方法は、HMA と HNA の反応差の解消だけではなく、BCP 法で負誤差の原因となる CMPF や δ -アルブミンの影響も認められていない。これは SDS によりアルブミンの構造が変化した効果であると考えられている¹⁰⁸⁾。さらに、ヘパリン加血漿の影響の程度は小さく日常検査ではほぼ問題なく測定可能である⁸³⁾。一方、ヒト以外の動物種に対する反応性は従来の BCP 法同様に低い。また静脈内に大量のペニシリン G 投与による治療を受けた患者検体において、負誤差を示した症例が報告されている¹⁰⁹⁾。Muramoto ら^{106), 108), 110)}は、BCP 改良法と BCG 法を用いて特異性の確認として α_2 -、 β -、 γ -グロブリン分画の反応性および正確度の確認として残余血清を用いて免疫学的測定法との比較を調査している。各グロブリン分画に対する反応性は BCG 法が 3~49 %、BCP 改良法は全ての分画で 4 %以下であり、免疫学的測定法との相関は BCG 法が $r = 0.978$, $y = 0.841x + 0.72$ 。BCP 改良法は $r = 0.995$, $y = 1.011x - 0.07$ と BCP 改良法は高い特異性を示し、回帰式は免疫学的測定法に対して $y = x$ に近似

する正確度の高い方法であると報告している。BCP 改良法は免疫学的測定法とも一致しており，アルブミンに対する高い特異性を保ちつつ，従来の BCP 法の問題点を軽減した方法であり，現在日常検査における最も正確度の高い血清アルブミン測定法とされている。

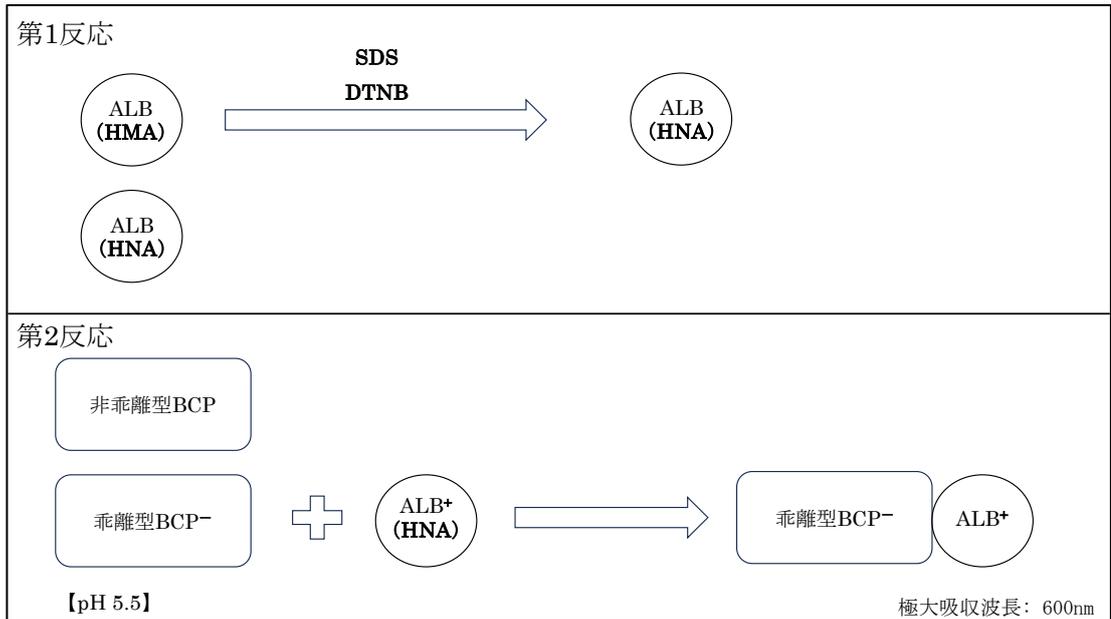


図9 BCP改良法の測定原理（文献106を参考に作成）

HMAをドデシル硫酸ナトリウム（SDS）により構造変化させることに加え、5,5'-ジチオビス2-ニトロ安息香酸（DTNB）によりHMA中のSH基を酸化させることで、HMAをHNAに変換する。全てのアルブミンをHNAにすることで、BCP法の欠点である両者の反応性を回避した方法である。BCPとの反応原理は、上記図8と同様である。これにより、BCG法のグロブリン分画の影響およびBCP法のHMAとHNAの反応性差を回避した、現在アルブミンに対する正確度が最も高い日常検査法である。

1. 7 アルブミン測定法の標準化の現状

臨床検査における標準化は、図 10 に示す通り基準測定法と一次標準物質の設定から作成される。これにより日常検査法での測定値の信頼性が上位の基準測定法に求めていくことが可能となる（トレーサビリティ連鎖）^{111, 112)}。一方、アルブミン測定法においては現在のところ基準測定操作法、1次標準物質、常用基準測定操作法および実用標準物質が確立していないのが現状である¹¹³⁾。現時点では、血漿蛋白国際標準物質 IRMM ERM-DA470k/IFCC (ERM-DA470k)¹¹⁴⁾を基準とした日常検査法へのトレーサビリティ連鎖が利用されている。しかし、上述の通り日常検査ではアルブミンに特異性が異なる複数の方法が普及しているため、標準物質による標準化はアルブミン測定においては効果がないとされている¹¹³⁾。アルブミン測定の標準化には、免疫学測定法と一致する BCP 改良法に日常検査法を統一していくことが必要である。

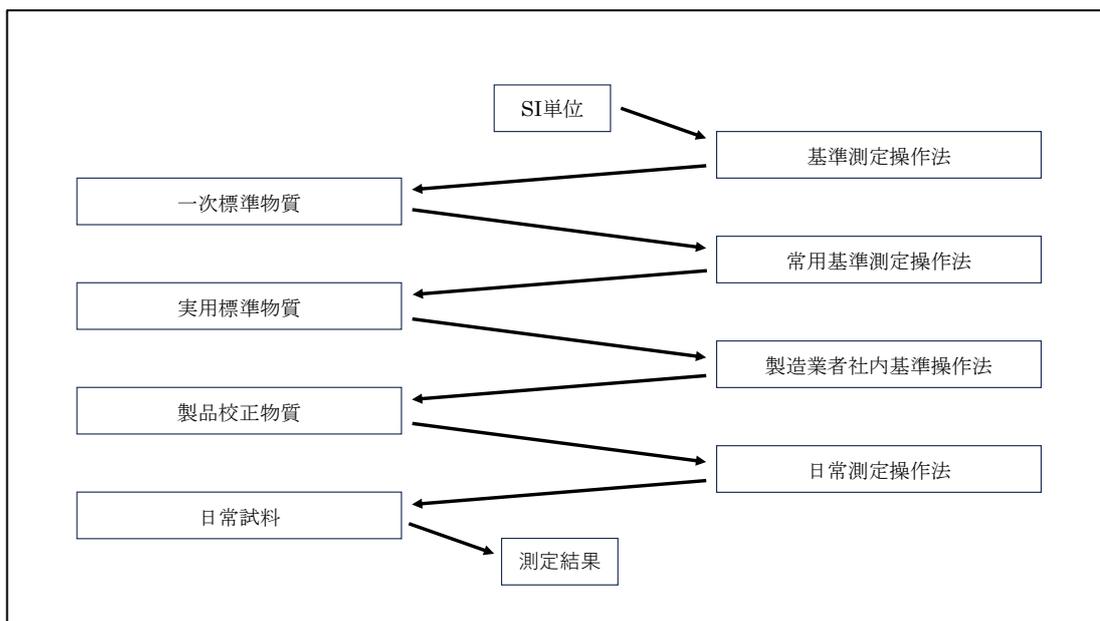


図 10 血清物質濃度測定の特レーサビリテイ連鎖（文献 112, 113 より引用改変）

1. 8 国内におけるアルブミン測定法の状況

アルブミンの標準化には、日常検査法にアルブミンへの特異性が高く他の物質の影響が最も少ない BCP 改良法が普及する必要がある。このような状況の中で、国内の日常検査法として用いられているアルブミン測定法の普及率は、国内の大規模臨床検査精度管理調査の 1 つである日本医師会の 2021 年日本医師会精度管理調査の調査報告書¹¹⁵⁾によると、日常検査法のアルブミン測定法は BCG 法、BCP 法および BCP 改良法の色素結合法の 3 法のみである。参加施設 2931 施設の中で BCG 法、BCP 法、BCP 改良法の普及率はそれぞれ 12.8 %、1.6 %、85.6 %であり、アルブミンの特異性が高い日常検査法が多くの施設で普及しており標準化が進展している状況である。このことは、国内では自動分析装置とそれに使用する測定試薬の組み合わせがユーザーで選択することが可能になっている自動分析装置のオープンシステム制が採用されていることが一因と考えられる。これにより国内では、より特異性の高い測定法が開発された場合は容易に測定方法を変更することが可能な状況である。

1. 9 諸外国におけるアルブミン測定法の状況

1. 9. 1 諸外国のアルブミン測定法の普及率

諸外国の日常検査法の状況においては 2021 年現在, 113 カ国の臨床検査施設が参加している米国病理医協会 (College of American Pathologists: CAP) の技能試験プログラム報告書¹¹⁶⁾によると, BCG 法, BCP 法の色素結合法に加え, 免疫学的測定法の 3 法が使用されている. BCP 法と BCP 改良法の分類はないため, その詳細は不明である. 参加施設 5825 施設の中で色素結合法に注目してみるとその参加施設は 5787 施設で, 色素結合法の普及率は 99 %以上である. 諸外国においても国内同様に BCG 法と BCP 法が広く利用されている. 一方, その普及率は国内と状況が異なり BCG 法, BCP 法の普及率はそれぞれ 63.8 %, 36.2 % と諸外国では BCG 法が主要の検査法となっている. 諸外国では, 自動分析装置とそれに使用する測定試薬の組み合わせがユーザーで選択することができない自動分析装置のクローズシステム制が採用されていることが一因と考えられる. これにより諸外国では, より特異性の高い測定法が開発された場合においても測定方法を変更することが困難な状況であることが, 国内に比べ BCP 改良法が普及していないものと考えられる. さらに BCG 法および BCP 法は 1 試薬系で組み立てられる測定系^{79), 91), 92)}に対して BCP 改良法は 2 試薬系で組み立てられる測定系¹⁰⁶⁾であるため試薬が高コストとなることも原因の一因と推察される.

1. 9. 2 諸外国のアルブミン測定法の問題点

上述の通り諸外国のアルブミン測定の日常検査法の問題点として、① BCG 法が主要の検査法となっていること、②回避法が利用できない点である。①については、国内と同様に色素結合法が広く利用されている状況である^{115, 116)}。一方、普及している色素結合法は国内と諸外国では大きく異なり国内ではアルブミンに特異性の高い BCP 改良法が主要な検査法に対して、諸外国ではアルブミンに偽高値を示す BCG 法が主要な検査法となっている。このことは、自動分析装置と選択可能な測定試薬のシステムの違いが国内と諸外国において大きく異なることである。②については、BCG 法の偽高値の回避法として反応時間を短縮した方法が報告されている^{82), 86, 87)}。この方法は 10 秒以下の反応時間において十分な効果が得られる方法であり、現在の自動分析装置では 10 秒以下の吸光度は利用することができない。利用可能な 1 分反応などの短縮法では十分に回避することは困難である。アルブミン測定を含む臨床化学分野での日常検査法の反応時間は 10 分反応を基本として組み立てられている^{111), 125)}。国内および諸外国においても 10 分反応が基本となっており、BCG 法においても 10 分反応が日常検査で使用されている状況である。

1. 10 BCG 法と BCP 改良法が普及するアルブミン測定法の課題

1. 10. 1 臨床判断値への影響

現在、日常検査法で普及する色素結合法の歴史的な視点から考えると BCG 法が普及し、その後 BCP 法および BCP 改良法が普及してきた経緯がある。このことは BCG 法から BCP 法に測定法を変更した場合、アルブミン測定値は低値になる。特に臨床的意義の高い低アルブミン濃度域では、それはさらに顕著である。測定法の変更の影響について、清宮ら¹¹⁷⁾は肝疾患、腎疾患患者などを対象に免疫学的測定法、BCG 法、BCP 改良法を使用して、測定法の相違が病態識別に与える影響について調査している。測定法の相違は、肝機能の指標として用いられる Child-Pugh 分類ではアルブミン値によるスコアの上昇やグレード分類が変化する症例があることやネフローゼ症候群の診断基準において必須条件であるアルブミン濃度 3.0 g/dL 以下に変化する症例があり病態識別に影響を与えることが報告されている。これらのことから日本臨床検査医学会は、BCP 改良法によるアルブミン値が 3.5 g/dL 以下の場合、一律に 0.3 g/dL を加えた値を BCG 法での推測値とすることを提言している¹¹⁸⁾。また、両色素法が普及する現状においては、測定法の選択が栄養状態の評価に影響する^{119, 120)}ことや選択するアルブミン測定値の処方への影響¹²¹⁾など選択する測定法により臨床判断値や患者状態の評価に関わる報告がされている。

1. 10. 2 アルブミン測定の矛盾

上述のとおり BCG 法と BCP 改良法のアルブミン特異性に関わる大きな点は、グロブリン分画との反応性^{81, 82)}である。両法のアルブミンに対する特異性を考えた場合、測定されるアルブミン値はどの濃度域においても BCG 法が BCP 改良法に比べて常に高値になるはずである。しかし日常検査では、アルブミン正常値域において両測定法は同程度となるのに対して、低アルブミン濃度域ではアルブミン濃度が低くなるに従い BCG 法が高値に乖離し両測定法のアルブミンに対する特異性を反映しない矛盾した現象が報告されている^{117), 122)}。この矛盾した現象に対して中島ら¹²³⁾は、蛋白標準血清およびヒトアルブミン標準液で校正した BCG 法と BCP 改良法を使用して、 α および β -グロブリン濃度が一定で異なるアルブミン濃度に調整した試料を測定し蛋白標準血清の校正効果について調査している。日常検査でのアルブミン測定の問題は、低アルブミン濃度域においてアルブミンに対する α および β -グロブリンの割合が増加していることに加え、 α および β -グロブリンを含む蛋白標準血清で校正することがこの矛盾した現象の原因となることが報告されている。

1. 11 本論文で使用する分析法について

1. 11. 1 自動分析法

1950年代に自動分析装置が開発され、1960年代に国内に導入されて以来、様々な機構の分析装置が開発されてきたが、現在では分光光度法を原理とするディスクリート方式の自動分析装置が主流である¹²⁴⁾。基本的な用手法での分析は試験管に試料および試薬を分注し攪拌後、37°Cで一定時間反応させ吸光度を測定する。自動分析法ではこの用手法の操作の流れを自動化して分析を行っている。自動分析法の特徴として以下のことが挙げられる。

- ① 微量化：用手法の1/10程度の試料や試薬量で分析が可能である。
- ② 多波長光度計：用手法で使用する分光光度計の場合、単一波長を選択し吸光度を測定（一波長法）するのに対して、自動分析法では光が試料を通過後に分光させることで多波長から目的波長を選択可能である。これにより選択した2波長の吸光度差を使用することで、試料の濁りや色調の影響、試験管にあたる反応セルの傷の影響、光量の補正を行うことが可能である（二波長法）。

1. 11. 2 分光光度分析法

分子スペクトルは分子内で異なる軌道への電子の遷移によって生じる。その内部エネルギーは電子エネルギー、振動エネルギー、回転エネルギーの総和で表されるため連続スペクトルとなる。この電子遷移によって可視部もしくは紫外部の光が吸収される波長から目的成分の構造を確認することが可能である（定性）。また、目的成分の標準物質（標準液）から吸収される光の強さ（吸光度）を比較することで目的成分の濃度を測定することができる（定量）。血清の目的成分には有色成分が

ほとんどないため試薬を用いて呈色させ、その吸光度を求めて定量する。臨床化学分析における呈色反応には、目的成分を基質として酵素反応を利用する酵素法と色素結合やキレート反応を利用した化学法に大別される¹²⁵⁾。血清中のアルブミンは上述の通り種々の物質が結合しており酵素法を用いることができないため、BCG や BCP 色素による色素結合反応を利用した化学法で呈色を行う。

1. 11. 3 Lambert – Beer の法則

目的成分濃度 c (concentration) の呈色液に I_0 の強さの単色光を入射し、光路長 l (length) cm を通過する間に光が溶液に溶けている物質に吸収され、単色光の強さが I となったとすると I_0 は指数関数的に弱まり、次式が成り立つ (ϵ : モル吸光係数)。

$$I = I_0 \cdot 10^{-\epsilon \cdot c \cdot l}$$

吸光度 A (Absorbance) は、入射光 (I_0) の透過光 (I) に対する比率の対数で次式に表すことができる。

$$A = \log (I_0 / I) = \epsilon \cdot c \cdot l$$

この式を Lambert-Beer の法則といい、吸光度は目的成分濃度 c と光路長 l に比例することを意味する。光路長 l に比例することを Lambert の法則、目的成分濃度 c に比例することを Beer の法則といい、実際の分析では光路長は一定のため Beer の法則が利用される。よって、検量線の作成における吸光度は濃度の一次関数になる。また、モル吸光係数 ϵ

は分析法の感度を表し、分析法（BCG 法や BCP 法）が一定なら吸光度を求めることで目的成分 c を求めることができる。この ϵ の値が大きいほど感度の高い分析法となり検量線の傾きに相当する。

1. 11. 4 自動分析法による校正法

校正とは、上述の Beer の法則より目的成分濃度と吸光度の関係は、一次関数のため既知濃度の標準液を用いて、標準液濃度とその吸光度の比率の関係より目的成分濃度を決定するために行うものである。その際、標準液の吸光度から生理食塩水などの目的成分を含まない試料の吸光度（ブランク値）を差し引き試薬固有の吸光度を差し引く。この関係をグラフ化したものを検量線という。自動分析装置では目的成分の吸光度から濃度を演算するために検量係数として数値化する。

検量係数

$$= (\text{標準液濃度} - \text{ブランク濃度}) / (\text{標準液吸光度} - \text{ブランク吸光度})$$

濃度演算

$$= \text{検量係数} \cdot (\text{目的成分の吸光度} - \text{ブランク吸光度}) + \text{ブランク濃度}$$

1. 11. 5 終点分析法

目的成分と試薬を反応させ、一定時間経過後の反応終了時の吸光度の変化量を測定し目的成分濃度を定量する方法。自動分析装置では、全体の反応が 10 分間で終了するように試薬処方が組み立てられている。分析法の種類には 1 ポイント-二波長法および 2 ポイント-二波長法がある。

1. 11. 6 二波長法

二波長法は同じ時間に異なる2つの波長で吸光度を測定し、その差の吸光度を用いて目的成分濃度を定量する方法である。試料の濁りや色調の影響、反応セルの傷の影響軽減の効果があるが、後述する2ポイント法でこれらはほとんど回避することができるため、主な目的は光量補正の効果である。

1. 11. 7 1ポイント法および2ポイント法

2ポイント法は異なる時間に同一の波長で吸光度を2回測定し、その差から目的成分濃度を定量する方法である。2試薬系試薬で構成される測定法に利用され第1反応で検体盲検および試薬ブランクを差し引くこと、または内因性の共存物質を消去する（BCP改良法の場合は、HMAからHNAの変換）利点がある。一方、1ポイント法は1試薬系で使用され、本反応のみであるため検体盲検が測定できないことに加え、同一反応セル内で試薬ブランクが測定できない。試料の濁りや色調の影響、反応セルの傷の影響軽減は二波長法に比べ2ポイント法での効果が大きい。1ポイント法では、その影響を受ける可能性がある。自動分析法では、上述の二波長法と組み合わせ、2試薬系試薬では2ポイント-二波長法、1試薬系試薬では1ポイント-二波長法により分析を行っている。アルブミン測定法であるBCG法とBCP法は1試薬系、BCP改良法は2試薬系の分析法であり、このような視点からもBCP改良法は従来の測定法に比べ正確度が高い測定法であると言える。

1. 12 本論文で使用する単位の取り扱い

国際的な治療指針を利用する場合や治験データあるいは学術研究，文献などの正しい理解と交流を得るために，臨床検査においても諸外国との基準測定法の統一など国際的な標準化が進められている¹²⁶⁾．一方，単位については慣用単位が使用され SI 単位系が採用されていないのが現状である¹²⁷⁾．

アルブミン値においては，国内では慣用単位として「g/dL」が使用されている．文献のデータを確認すると海外においても「g/dL」と「g/L」が混在しているが，SI 単位と併記してよい非 SI 単位として容積では「リットル」が認められているため¹²⁷⁾，「g/L」が多く見られる．また，ヒトアルブミンは 1 次構造が解明され分子量が明確になっていることより，SI 単位の表記に従うと「g」ではなく「mol」表記のはずであるが，生体内では種々の物質と結合しているため，そのアルブミン値は「g」表記であると考えられる．このような背景から，本論文の序論では過去の文献や国内のガイドラインなどを引用するため「g/dL」を使用し，研究データは SI 単位系の表記に従い「g/L」を使用した．

2. 本研究の目的

アルブミン測定は全身の健康状態のスクリーニング検査のみならず低アルブミン血症の診断基準や肝予備能力の Child-Pugh 分類などの病態識別としても利用されている重要な臨床検査の 1 つである^{12), 20, 21), 63)}. 一方, 日常検査で使用される色素結合法には BCG 法, BCP 法および BCP 改良法が普及しており, 測定法の標準化が確立されていないのが現状である¹¹³⁾. 標準化にはアルブミンに特異性の高い BCP 改良法を日常検査法に統一することが重要である. 国内では, BCP 改良法が主要の検査法に対して, 諸外国ではグロブリン分画と類似反応を示す BCG 法が主要の検査法として普及している. これは国内に対して, 自動分析装置と選択する測定試薬のシステムの違いが BCP 改良法の普及しない原因の一因となっている状況がある. BCG 法の偽高値の回避法として反応時間短縮法が報告されている^{82), 86, 87)}. これまでの BCG 法の偽高値に対するアプローチは, BCG とグロブリン分画の反応をいかに小さくすることを視点として報告されてきた. しかし, 現在の自動分析装置では利用できないため日常検査では普及していない. このような背景において, アルブミンは特異的に測定することが重要であり BCG 法を採用する場合においてもその必要性があると考え.

そのため本研究では, 既存の自動分析装置の機能を利用し BCG 法の偽高値を回避する方法として, BCG 法のグロブリン分画の反応性を解析し BCG 法で用いるヒト血清アルブミン標準溶液の値を補正することで, その影響を低減させることが可能となると考えた. また, アルブミン正常値域に対して低アルブミン濃度域ではグロブリン分画の比率が増加しているため, アルブミン正常値域と同程度のグロブリン分画で構成された蛋白標準血清を使用する現在の 1 点校正法では低アルブミン濃度域の

グロブリン分画を校正するには不十分である。そのため校正法には異なる 2 濃度のヒト血清アルブミン標準溶液を用いて、アルブミン正常値域と低アルブミン濃度域の BCG 法に影響するグロブリン分画の違いを考慮した校正法にすることで、全てのアルブミン濃度域で BCG 法へのグロブリン分画の影響を低減することが可能であると考えた。

以上のように、既存の測定試薬と自動分析装置を使用可能なグロブリン分画の影響を低減する 2 点校正 BCG 法の条件設定を考案し、その校正効果を評価することを目的とした。

3. 材料および方法

3. 1 材料

治療残血清を対象に病態識別値^{20), 62), 63)}に利用される 35.0 g/L を基準に BCP 改良法で測定したアルブミン値 35.0 g/L 未満をアルブミン低値群 (Low Albumin: LA 群), 35.0 g/L 以上をアルブミン正常値群 (Normal Albumin: NA 群) と設定した。

3. 2 試薬

血清アルブミン測定は BCG 法, BCG-HSA 法, 2 点校正 BCG 法, BCP 改良法および BCP 改良-HSA 法の 5 種類の方法で実施した。BCG 法, BCG-HSA 法および 2 点校正 BCG 法は, アルブミン II-HA テストワコーを使用した。また BCP 改良法, BCP 改良-HSA 法は, L タイプワコー ALB-BCP を使用した。ビウレット法による総蛋白測定は, L タイプワコー TP を使用した。アルブミンおよび総蛋白の試薬は富士フイルム和光純薬工業株式会社 (大阪) を使用した。アガロースゲル電気泳動法による蛋

白分画検査には，クイックジェル SP（株式会社ヘレナ研究所，埼玉）を使用した．

3. 3 分析装置

アルブミンおよび総蛋白の測定はすべて 7180 型日立自動分析装置（株式会社日立ハイテク，東京）を使用した．また血清蛋白分画はエパライザ 2 ジュニア（株式会社ヘレナ研究所，埼玉）を使用した．

3. 4 分析条件

BCG 法，BCG-HSA 法および 2 点校正 BCG 法は試料 2.5 μ L と BCG 試薬 250 μ L を混和後，590 秒後に主波長 660 nm および副波長 700 nm で測定した（1 ポイント 2 波長法）．BCP 改良法および BCP 改良-HSA 法は試料 3.0 μ L と第 1 試薬 160 μ L を混和後，230 秒後に主波長 600 nm および副波長 660 nm で測定，次に 300 秒後に第 2 試薬 80 μ L を混和後，590 秒後に主波長 600 nm および副波長 660 nm で測定した（2 ポイント 2 波長法）．またビウレット法およびアガロースゲル電気泳動法は，取扱説明書に従って測定した．

3. 5 校正用標準溶液

3. 5. 1 蛋白標準血清

BCG 法, BCP 改良法およびビウレット法の校正は, TP/ALB キャリブレータ (富士フイルム和光純薬工業株式会社, 大阪) を使用した. その校正値は, 指定されているビウレット法 (70.9 g/L), BCG 法 (47.4 g/L), BCP 改良法 (47.3 g/L) の値を用いた.

3. 5. 2 ヒト血清アルブミン標準溶液 1

純度 99 %以上のヒト血清アルブミン A8763 (シグマアルドリッチジャパン合同会社, 東京) を電子天秤で 4.5 g 秤量し, 生理食塩水で溶解し 100 mL とした. この溶液のアルブミン濃度は 45.0 g/L であり, 標準溶液 1 とした. BCG-HSA 法および BCP 改良-HSA 法は, この標準溶液 1 を用いて校正する方法であり, その校正値は 45.0 g/L とした.

3. 5. 3 ヒト血清アルブミン標準溶液 2

上記標準溶液 1 の 10 mL と生理食塩水 7.64 mL を混合した溶液を調整した. この溶液のアルブミン濃度 25.5 g/L であり, 標準溶液 2 とした. この標準溶液は 2 点校正 BCG 法のみで使用した.

3. 6 方法

3. 6. 1 BCG 法, BCG-HSA 法, BCP 改良法および BCP 改良-HSA 法の比較

BCG 法, BCG-HSA 法, BCP 改良法および BCP 改良-HSA 法の 4 法で患者血清 60 例 (NA 群 28 例, LA 群 32 例) のアルブミンを測定し, 結果を比較した.

3. 6. 2 2 点校正 BCG 法の校正値の決定

2 点校正 BCG 法の校正はヒト血清アルブミン標準溶液 1 および 2 を用いて実施する. そのため, 上記[3. 6. 1 BCG 法, BCG-HSA 法, BCP 改良法および BCP 改良-HSA 法の比較]における BCG-HSA 法および BCP 改良-HSA 法のアルブミン値の相違から 2 点校正 BCG 法におけるヒト血清アルブミン標準溶液 1 および 2 の校正値を算出した. 算出された校正値は, ヒト血清アルブミン標準溶液 1 が 40.5 g/L, および標準溶液 2 が 18.6 g/L である.

3. 6. 3 蛋白分画測定

患者血清 60 例 (NA 群 28 例, LA 群 32 例) を対象にアガロースゲル電気泳動で蛋白分画を測定した. ビウレット法で測定した総蛋白値から α , β および γ グロブリン分画量を算出した.

3. 6. 4 2点校正 BCG 法の校正効果

患者血清 136 例 (NA 群 52 例, LA 群 84 例) を対象に 2 点校正 BCG 法の校正効果を NA 群および LA 群について BCP 改良-HSA 法と比較した。

3. 7 統計分析

データは Microsoft Excel (マイクロソフト株式会社, レドモンド, ワシントン州) で集計し, すべての統計解析には EZR¹²⁸⁾を使用した。EZR は R および R コマンダーの機能を拡張した統計ソフトウェアである。各測定法のアルブミン値のデータは, Kolmogorov-Smirnov の検定による正規性の検証を行い Kruskal-Wallis 検定で群間比較を実施した。相関係数には Pearson の相関係数または Spearman の相関係数を用いた。回帰式は BCG 法, 2 点校正 BCG 法および BCP 改良法の 2 方法間比較の相関では, 2 方法間の測定誤差を考慮し両法の誤差の面積の総和が最小となる標準主軸回帰式を用いた¹²⁹⁾。グロブリン分画量とアルブミン値の相関では, 測定対象物が異なることから最小二乗法を利用した直線回帰式を用いた¹²⁹⁾。校正物質の相違による測定方法間の比較は Mann-Whitney U 検定を用い, 2 点校正 BCG 法と BCP 改良-HSA 法の平均値の差は, F 検定による等分散の検証を行い Student's t 検定を用いた。データは平均値±SD で示した。全ての統計的有意水準は $p < 0.05$ とした。

3. 8 倫理承認

患者血清は，東松山医師会病院での治療残血清を使用し，包括的同意を得た．本研究は，東松山医師会病院倫理委員会（承認番号：21-1）の承認を得て実施した．

4. 結果

4. 1 蛋白標準血清およびヒト血清アルブミン標準溶液の評定

校正に使用する蛋白標準血清およびヒト血清アルブミン標準溶液 1 に含まれるタンパク成分を確認するため，アガロースゲル電気泳動法で蛋白分画を実施した．その結果，蛋白標準血清ではアルブミン分画が 64.8 %， α 分画が 11.2 %， β 分画が 9.4 %， γ 分画が 14.8 %であった．ヒト血清アルブミン標準溶液 1 ではアルブミン分画が 100 %であった．これらのことより蛋白標準血清は健常者血清と同程度の蛋白分画成分で構成され，ヒト血清アルブミン標準溶液はグロブリン分画を含まないことが確認された．また，調整したヒト血清アルブミン標準溶液 1 および 2 の濃度が理論値と一致することを確認するため，総蛋白濃度をビウレット法で 3 重測定した．その結果，平均値はヒト血清アルブミン標準溶液 1 で 44.7 g/L，標準液 2 で 25.3 g/L であり，調整した両試料の理論値（ヒト血清アルブミン標準溶液 1 が 45.0 g/L，標準液 2 が 25.5 g/L）とほぼ一致することが確認された．

4.2 校正物質の相違による BCG 法と BCP 改良法のアルブミン濃度の比較

健常者血清と同程度のグロブリンを含む蛋白標準血清およびヒト血清アルブミン標準溶液 1 で校正した BCG 法と BCP 改良法のアルブミン濃度を比較するため、患者血清 60 例を対象に血清アルブミン濃度を測定した。蛋白標準血清で校正した両法の血清アルブミン濃度（平均値±SD）は、NA 群および LA 群でそれぞれ BCG 法は 46.20 ± 3.27 g/L, 30.53 ± 4.56 g/L. BCP 改良法は 45.07 ± 4.06 g/L, 25.06 ± 4.89 g/L であった。NA 群では測定方法間に有意差は認められず（ $p = 0.219$ Mann-Whitney U 検定），LA 群では測定方法間に有意差が認められた（ $p < 0.001$ Mann-Whitney U 検定）（図 11-A, 表 8）。ヒト血清アルブミン標準溶液 1 で校正した両法の血清アルブミン濃度（平均値±SD）は、NA 群および LA 群でそれぞれ BCG-HSA 法は 49.51 ± 3.24 g/L, 32.45 ± 5.01 g/L. BCP 改良-HSA 法は 45.03 ± 3.72 g/L, 25.54 ± 5.08 g/L であった。NA 群および LA 群とも測定方法間に有意差が認められた（[NA 群] $p < 0.001$, [LA 群] $p < 0.001$ Mann-Whitney U 検定）（図 11-B, 表 8）。BCP 改良法は両校正物質ともアルブミン濃度は一致した（図 11-C）。表 8 に校正物質別の BCG 法および BCP 改良法の両群血清アルブミン濃度を示した。これらの結果から、ヒト血清アルブミン標準液で校正した BCG 法は、BCP 改良法に比べ LA 群および NA 群ともに有意に高値でありアルブミンに対する特異性を反映した結果となった。

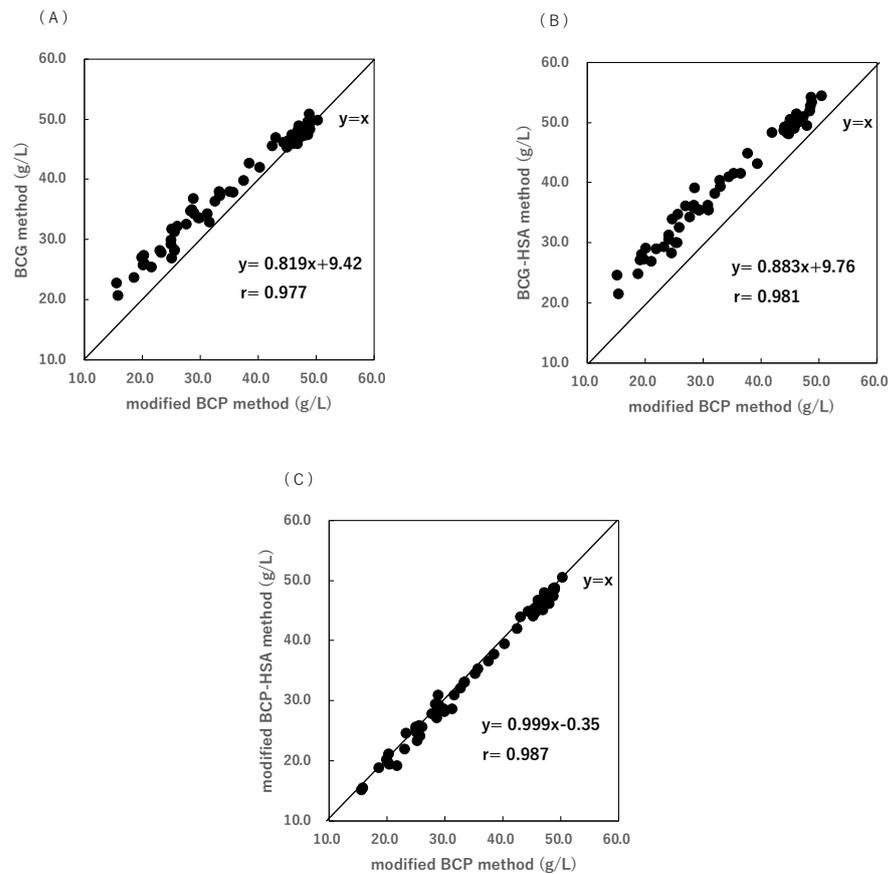


図 11. 校正物質の相違による BCG 法と BCP 改良法によるアルブミン濃度の比較

A: 蛋白標準血清で校正 ($y = 0.819x + 9.42$, $r = 0.977$, $p < 0.01$)

B: ヒト血清アルブミン標準溶液で校正 ($y = 0.883x + 9.76$, $r = 0.981$, $p < 0.01$)

C: 蛋白標準血清とヒト血清アルブミン標準溶液で BCP 改良法を校正 ($y = 0.999x - 0.35$, $r = 0.987$, $p < 0.01$)

相関係数は、Spearman の相関係数を用いて評価し、有意水準は $p < 0.05$ で有意とした。

表 8 校正物質の相違による BCG 法と改良 BCP 法の NA 群および LA 群の比較

校正物質	Groups	BCG 法	BCP 改良-HSA 法	p 値
		(mean ± SD: g/L)	(mean ± SD: g/L)	
蛋白標準物質	NA (n = 52)	46.20 ± 3.27	45.07 ± 4.06	0.219
	LA (n = 84)	30.53 ± 4.56	25.60 ± 4.89	< 0.001
ヒト血清アルブミン 標準溶液	NA (n = 52)	49.51 ± 3.24	45.03 ± 3.72	< 0.001
	LA (n = 84)	32.45 ± 5.01	25.54 ± 5.08	< 0.001

データは平均値 ± SD で示した。NA 群および LA 群の BCG 法と BCP 改良法の測定方法間の有意差は Mann-Whitney U 検定を用いて比較した。

4.3 BCG-HSA 法と BCP 改良-HSA 法のアльブミン濃度差とグロブリン分画の相関

BCG-HSA 法と BCP 改良-HSA 法のアльブミン濃度の差とグロブリン分画の相関関係を比較するため、患者血清 60 例を対象にアガロースゲル電気泳動で蛋白分画を実施した。その結果、両法のアльブミン濃度の差と α グロブリン分画量には強い正の相関を示した ($r = 0.885$, $p < 0.01$ Pearson の相関係数)。両法のアльブミン濃度の差が大きくなるほど α グロブリン分画量は増加していた (図 12-A)。 β グロブリン分画量とは負の相関を示し、両法のアльブミン濃度の差が大きくなるほど β グロブリン分画量は低下していた ($r = -0.528$, $p < 0.01$ Pearson の相関係数) (図 12-B)。 γ グロブリン分画量とは弱い正の相関を示し、両法のアльブミン濃度の差が大きくなるほど γ グロブリン分画量は増加を示した ($r = 0.292$, $p < 0.05$ Pearson の相関係数) (図 12-C)。

α グロブリン分画量を 3 分位法にて Group1~Group3 の 3 群に分け、アльブミン濃度と α グロブリン分画量の関係を比較した (図 13, 表 9)。その結果、BCP 改良-HSA 法と、BCG-HSA 法と BCP 改良-HSA 法の差との相関は、強い負の相関を示した ($r = -0.745$, $p < 0.01$, Spearman の相関係数) (図 13-A)。BCP 改良-HSA 法と α グロブリン分画量とは負の相関を示し、アльブミン濃度が高くなるほど α グロブリン分画量は低下を示した ($r = -0.663$, $p < 0.01$, Spearman の相関係数) (図 13-B)。アльブミン濃度および BCG-HSA 法と BCP 改良-HSA 法の差 (平均値 \pm SD) は、Group1~Group3 で 43.31 ± 8.12 g/L,

35.28±9.43 g/L, 25.31±5.83 g/L および 3.82±0.83 g/L, 5.48±1.34 g/L, 7.77±1.19 g/L であった。アルブミン濃度および BCG-HSA 法と BCP 改良-HSA 法の差とも群間に有意差が認められた（[アルブミン] $p < 0.001$, [BCG-HSA 法と BCP 改良-HSA 法の差] $p < 0.001$ Kruskal-Wallis 検定）（表 9）。これらの結果より、BCG-HSA 法と BCP 改良-HSA 法のアルブミン濃度の差には、 α 分画が強い相関を示し、両法のアルブミン濃度の差が大きくなる低アルブミン濃度域になるほど増加することが確認された。

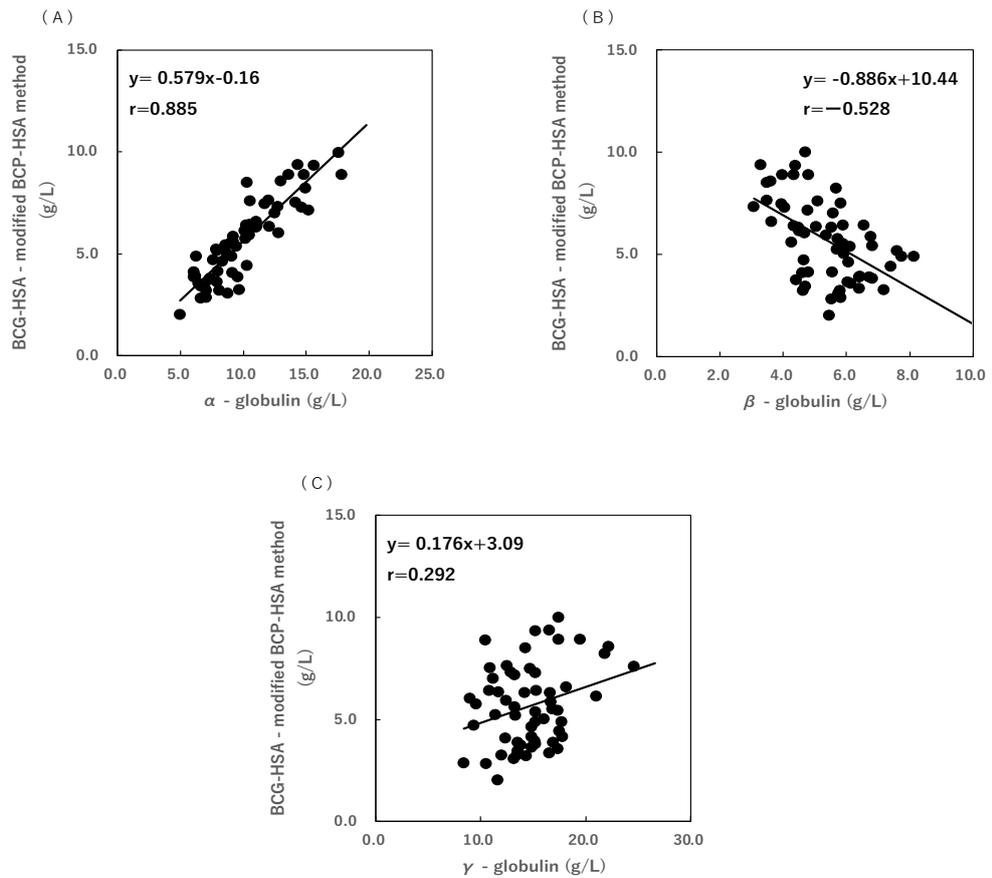


図 12 BCG-HSA 法と BCP 改良-HSA 法によるアルブミン濃度の差とグロブリン分画の関係

A: α -グロブリン分画と両法の差の相関 ($y = 0.579x - 0.16$, $r = 0.885$, $p < 0.01$)

B: β -グロブリン分画と両法の差の相関 ($y = -0.886x + 10.44$, $r = -0.528$, $p < 0.01$)

C: γ -グロブリン分画と両法の差の相関 ($y = 0.176x + 3.09$, $r = 0.292$, $p < 0.05$)

相関係数は、Pearson の相関係数を用いて評価し、有意水準は $p < 0.05$ で有意とした。

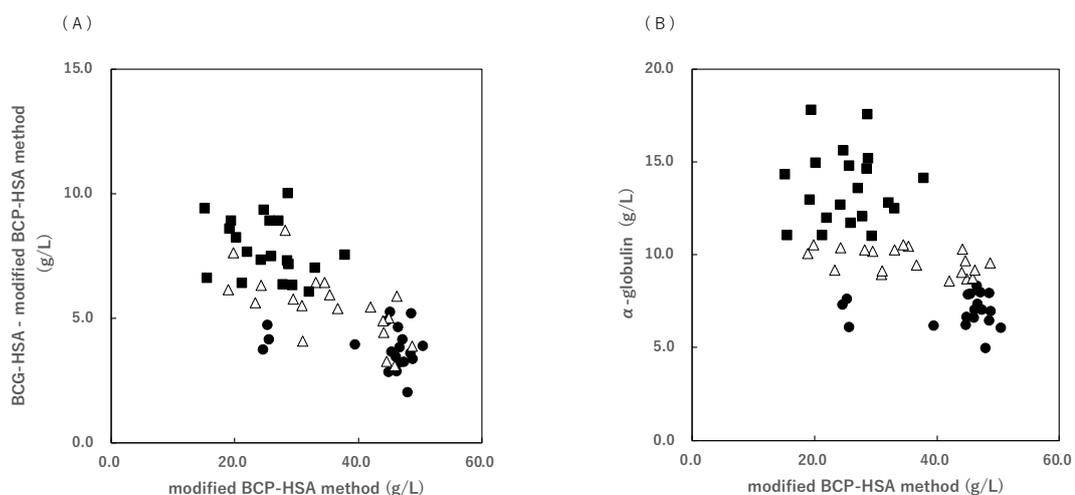


図 13 BCP 改良-HSA 法のアルブミン濃度と BCG-HSA 法と BCP 改良-HSA 法によるアルブミン濃度の差および α グロブリン分画量の関係

α グロブリン分画を 3 分位法で Group 1 (●) , Group 2 (△) , Group 3 (■) に群分けをして相関図を作成した.

A: BCP 改良-HSA 法と BCG-HSA 法と BCP 改良-HSA 法との差の相関 ($r = -0.885$, $p < 0.01$)

B: BCP 改良-HSA 法と α グロブリン分画の相関 ($r = -0.663$, $p < 0.01$)

相関係数は, Spearman の相関係数を用いて評価し, 有意水準は $p < 0.05$ で有意とした.

表 9 グロブリンとアルブミン濃度の群間比較

	α-グロブリンを3分位で群分け				p 値
	Total (n = 60)	Group 1 (n = 20)	Group 2 (n = 20)	Group 3 (n = 20)	
α-グロブリン (g/L)	10.09 ± 3.03	7.02 ± 0.88	9.65 ± 0.68	13.61 ± 2.01	<0.001
β-グロブリン (g/L)	5.36 ± 1.18	5.87 ± 0.99	5.79 ± 1.14	4.43 ± 0.82	<0.001
γ-グロブリン (g/L)	14.70 ± 3.31	13.78 ± 2.64	15.64 ± 3.31	14.72 ± 3.78	0.256
アルブミン (BCP改良-HSA法: g/L)	34.63 ± 10.77	43.31 ± 8.12	35.28 ± 9.43	25.31 ± 5.83	<0.001
BCG-HSA法とBCP改良-HSA法の アルブミン濃度差 (g/L)	5.69 ± 1.98	3.82 ± 0.83	5.48 ± 1.34	7.77 ± 1.19	<0.001

データは平均値±SDで示した。αグロブリン分画を3分位法でGroup 1～3に群分けをし、Kruskal-Wallis法を用いてそれぞれの項目について群間を比較した。有意水準は $p < 0.05$ で有意とした。

4. 4 2点校正 BCG 法の校正値の決定

2点校正 BCG 法の校正に使用する標準溶液の設定には、上記 [4. 2 校正物質の相違による BCG 法と BCP 改良法のアルブミン濃度の比較]の結果よりヒト血清アルブミン標準溶液 1 は、BCP 改良-HSA 法の NA 群の平均値からアルブミン濃度を 45.0 g/L に調整した。校正値は、NA 群の BCG-HSA 法と BCP 改良-HSA 法の平均値の差 4.48 g/L を差し引いた 40.5 g/L とした。ヒト血清アルブミン標準溶液 2 は、BCP 改良-HSA 法の LA 群の平均値からアルブミン濃度を 25.5 g/L に調整した。校正値は、LA 群の BCG-HSA 法と BCP 改良-HSA 法の平均値の差 6.91 g/L を差し引いた 18.6 g/L として NA 群と LA 群の α グロブリン分画量の違いを考慮し、HSA の校正値を決定した 2点校正 BCG 法を確立した (表 10)。

表 10 BCG 法の標準溶液と校正値

	ヒト血清アルブミン標準溶液 1 (校正値: g/L)	ヒト血清アルブミン標準溶液 2 (校正値: g/L)
BCG-HSA 法	45.0 g/L ヒト血清アルブミン 溶液 (45.0)	-
2点校正 BCG 法	45.0 g/L ヒト血清アルブミン溶液 (40.5)	25.5 g/L ヒト血清アルブミン溶液 (18.6)

4. 5 2点校正 BCG 法と BCP 改良-HSA 法の比較

2点校正 BCG 法の校正効果を評価するため、新たに採取した患者血清 136 例を対象に 2点校正 BCG 法、BCG-HSA 法のアルブミン濃度を BCP 改良-HSA 法と比較した。その結果、BCG-HSA 法と BCP 改良-HSA 法の相関は $y = 0.927x + 7.96$, $r = 0.978$, $p < 0.01$ (Pearson の相関係数) であった。2点校正 BCG 法と BCP 改良-HSA 法の相関は $y = 1.029x - 0.99$, $r = 0.978$, $p < 0.01$ (Pearson の相関係数) であった (図 14-A,B)。2点校正 BCG 法および BCP 改良-HSA 法の血清アルブミン濃度 (平均値 \pm SD) は、NA 群および LA 群でそれぞれ、2点校正 BCG 法は、 39.18 ± 3.42 g/L, 26.20 ± 6.23 g/L。BCP 改良-HSA 法は、 39.37 ± 3.14 g/L, 26.23 ± 5.67 g/L であった。NA 群および LA 群とも両測定法の平均値に有意差は認められなかった ([NA 群] $p = 0.768$, [LA 群] $p = 0.976$ Student's t 検定) (図 14-B, 表 11)。NA 群および LA 群とも 2点校正 BCG 法の平均値は BCP 改良-HSA 法の平均値と比べ有意差を認めない結果となり、BCG 法と呈色する α グロブリン分画量を差し引く校正効果が確認された (表 11)。

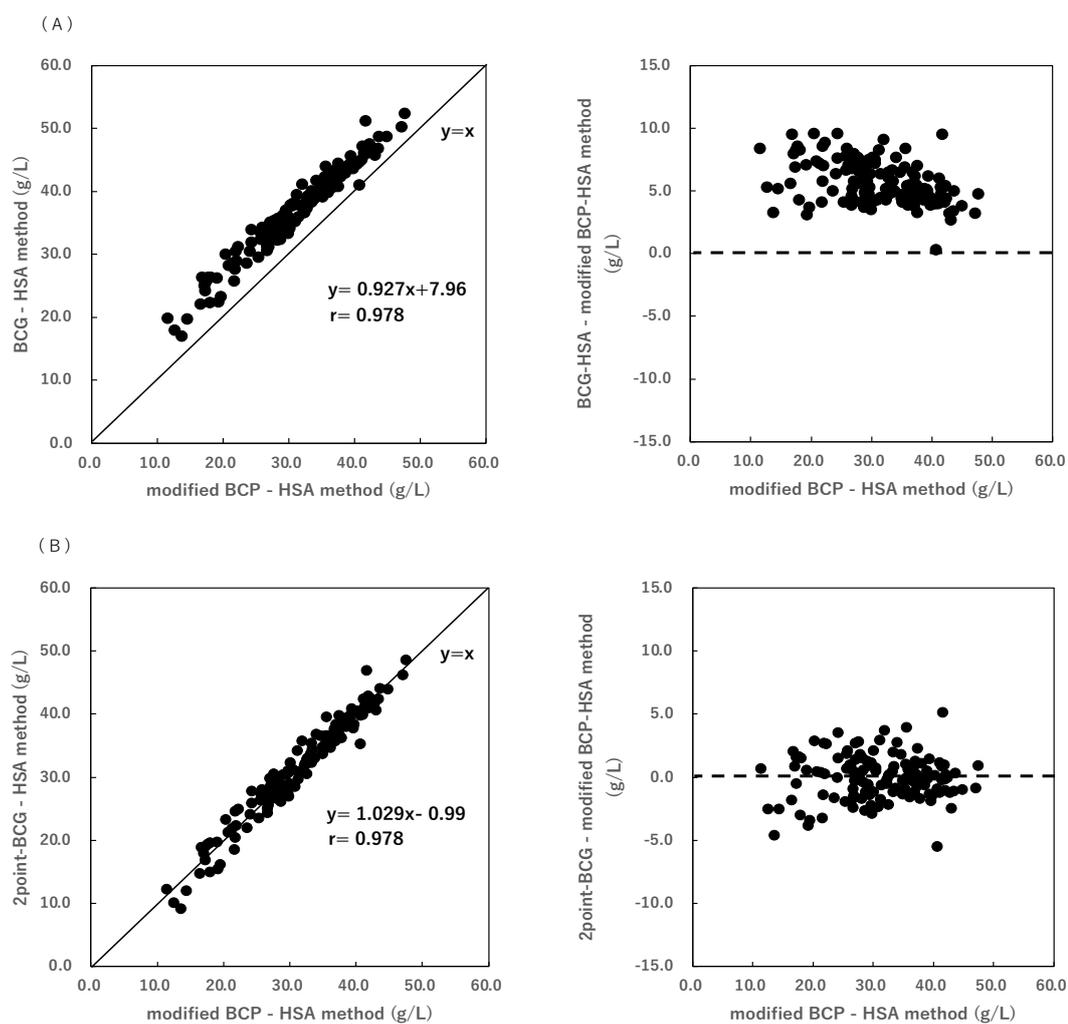


図 14 2 点校正 BCG 法と BCP 改良-HSA 法との比較

A: BCG-HSA 法と BCP 改良-HSA 法との相関 ($y = 0.927x + 7.96$, $r = 0.978$, $p < 0.01$)

B: 2 点校正 BCG 法と BCP 改良-HSA 法との相関 ($y = 1.029x - 0.99$, $r = 0.978$, $p < 0.01$)

相関係数は、Pearson の相関係数を用いて評価し、有意水準は $p < 0.05$ で有意とした。

表 11 2点校正 BCG 法と BCP 改良-HSA 法の NA 群および LA 群の比較

Groups	2点校正 BCG 法 (mean ± SD: g/L)	BCP 改良-HSA 法 (mean ± SD: g/L)	p 値
NA (n = 52)	39.18 ± 3.42	39.37 ± 3.14	0.768
LA (n = 84)	26.20 ± 6.23	26.23 ± 5.67	0.976

データは平均値 ± SD で示した。NA 群および LA 群の 2点校正 BCG 法と BCP 改良-HSA 法との平均値の有意差は Student's t 検定を用いて比較した。

5. 考察

アルブミン測定に使用される色素結合法である BCG 法および BCP 法はアルブミンに対する特異性が異なる。特に諸外国においてはグロブリンと類似反応を示す BCG 法が主要な検査法となっている¹¹⁶⁾。これは国内では自動分析装置に使用する測定試薬の組み合わせがユーザーで選択可能な自動分析装置のオープンシステム制が採用されていることに対して、諸外国ではその組み合わせが選択することができないクローズシステム制が採用されていることが一因となっている。さらに 1 試薬系^{79), 91, 92)}で組み立てられる BCG 法および BCP 法に対して、BCP 改良法は 2 試薬系¹⁰⁶⁾で組み立てられているため試薬が高コストであることが諸外国では正確度が高い BCP 改良法が選択できない状況になっている。これら BCG 法の問題点に対してグロブリン分画に対する回避法が報告されているが、反応時間を 10 秒以下に設定する必要があり自動分析装置では利用できない^{82), 86, 87)}。これらのことは、特にグロブリン分画の比率が増加する低アルブミン濃度域での臨床判断に影響を与える可能性があることが報告されている^{119), 121), 130, 131)}。さらに、両法のアルブミンに対する特異性を考えた場合、ヒト血清試料にはアルブミン分画とグロブリン分画が含まれているため BCG 法は BCP 改良法に比べてアルブミン値はどの濃度域においても高値になるはずである。しかし、日常検査では両法においてアルブミン正常値付近ではその値がほぼ一致するのに対して、低アルブミン濃度域では BCG 法が高値となる矛盾した現象が発生している^{117), 122)}。この矛盾した現象に

対して、中島ら¹²³⁾は異なる濃度に調整したヒトアルブミンおよび α β グロブリン試料を使用して両法の校正に使用される蛋白標準血清の校正効果について評価し、ヒト血清をベースにした蛋白標準血清で校正することが日常検査での矛盾した現象の原因となることを報告している。これらのことより BCG 法の問題点は①含まれるグロブリン分画の比率が異なるアルブミン正常値域および低アルブミン濃度域に関係なくどの濃度域においてもグロブリン分画に類似反応が認められる特異性の低い BCG 法に 1 濃度の蛋白標準血清による校正を行っていること。②諸外国においてはより特異性の高い BCP 改良法が選択できないことに加え回避法も利用できない状況であることと考えた。

これらの問題点を解決するため、BCG 法に影響するアルブミン正常値域と低アルブミン濃度域に含まれる異なる比率のグロブリン分画を校正するため、異なる濃度のヒト血清アルブミン標準溶液を用いた 2 点校正 BCG 法を既存の自動分析装置の機能を利用して設定し患者血清を対象にその校正効果の評価した。

まず、ヒト血清アルブミン標準液で校正した BCG-HSA 法および BCP 改良-HSA 法で患者血清を測定した。その結果、両測定法の平均値の差は NA 群で 4.48 g/L, LA 群で 6.91 g/L と両群において方法間で有意差を認め、全ての濃度域で BCG 法が高値と両法の特異性を反映した結果となった（図 11-B, 表 8）。次に、アガロースゲル電気泳動で患者血清の蛋白分画を実施し両法の測定値の差とグロブリン分画との関係を調べた。

その結果、 α 分画との相関係数が $r = 0.885$ と強い相関を示した。この結果は先行研究と一致した結果であった (82, 83), 117), 122)。さらに低アルブミン濃度域では α グロブリン分画量が増加していることが確認された (図 13, 表 9)。蛋白標準血清で校正した場合は、校正物質に含まれる α および β グロブリンも反応した状態で校正することになる。よってアルブミン正常値域ではこの校正効果により BCG 法の正誤差は補正される。しかし、1 濃度の蛋白標準血清による校正は全てのアルブミン濃度域でアルブミン量と α および β グロブリン量の比率が蛋白標準血清のそれと同一であると仮定し校正されることになるため、BCG 法は低アルブミン濃度域で真値よりも高値に測定されるものと考えることができる。また、低アルブミン濃度域ではアルブミン正常値域に比べ α グロブリン量がより増加することから、BCG 法によるアルブミン値は BCP 法のそれに比べさらに高値に測定されるものと考えられる。そこでアルブミン正常値域と低アルブミン濃度域に影響するグロブリン分画量の違いを考慮し両群の BCG-HSA 法と BCP 改良-HSA 法のアルブミン測定値の相違から 2 濃度の標準溶液とその校正値を設定し、BCG 法と呈色した α グロブリン分画量を差し引く 2 点校正 BCG 法を検討した。比較対象法は、免疫学的測定法で測定したアルブミン量と一致する測定値が得られる BCP 改良法を使用した (106), 108), 110)。その結果、NA 群および LA 群でそれぞれ、2 点校正 BCG 法は 39.18 ± 3.42 g/L, 26.20 ± 6.23 g/L. BCP 改良-HSA 法は 39.37 ± 3.14 g/L, 26.23 ± 5.67 g/L と平均値に有意差は認められず、2 点校正 BCG 法

は比較対象法と強い相関を認めた（図 14-B, 表 11）. これらの結果から 2 点校正 BCG 法は, 蛋白標準血清を用いた校正法での影響が回避されたことに加えて, 臨床的に意義の高い低アルブミン濃度域での α グロブリン量の影響を低減する校正法であることを示している. ヒトを対象にしたアルブミン測定法は臨床判断に影響を与える可能性があることから正確度の高い方法を採用することが望ましく, 標準化の観点からも日常検査法には特異性の高い BCP 改良法が普及することが必要不可欠である. 一方, BCG 法を採用している場合, 特に諸外国において BCP 改良法が選択できない状況においては, 分析装置の機能を利用し既存測定試薬での利用が可能であることから本校正法に変更することが好ましいと考える. BCP 改良法とのアルブミン濃度差を低減する本校正法は現在のアルブミン測定において標準化に寄与する研究であるといえる.

本研究の限界は, 低アルブミン血症を伴う疾患毎でのグロブリン量を考慮していないことである. α グロブリン分画以外のグロブリン分画が増加する疾患やグロブリン分画の増加を伴わない低アルブミン血症の場合は, アルブミン濃度は過大評価および過小評価する可能性がある. 従って, 本研究の今後の課題として個々の症例やグロブリン分画量の変化による評価を検証する. また, 本研究での比較対象法は先行研究より免疫学的測定法と一致する BCP 改良法を採用したが, 諸外国に向けて本校正法の知見を更に広げるために, 免疫学的測定法との比較も同時に検証していく予定である.

6. 結語

本研究では、NA 群と LA 群でのグロブリン分画量の違いを考慮し濃度の異なるヒト血清アルブミン標準溶液を用いて 2 点校正 BCG 法の条件設定を考案し、BCP 改良-HSA 法と比較検討した。2 点校正 BCG 法は、比較した試料において BCP 改良-HSA 法と一致する結果となった。これらの結果から、本校正法は臨床的意義が高い低アルブミン濃度域においてもグロブリン分画の BCG 法への影響を低減する校正効果があることに加え、BCP 改良法の選択が難しい状況である諸外国においても採用可能な校正法であり、アルブミン測定の標準化に寄与する役割を果たす。

7. 謝辞

本研究の遂行にあたりご指導，ご鞭撻とご援助をいただいた方々に深く感謝の意を表します。

本論文の主査，副査として，ご指導ならびにご鞭撻頂きました 埼玉県立大学 保健医療福祉学部 健康開発学科 検査技術科学専攻 有竹清夏教授，埼玉県立大学 保健医療福祉学部 理学療法学科 村田健児助教，国際医療福祉大学 保健医療学部 医学検査学科 清宮正徳教授に心より感謝申し上げます。

本論文の投稿にあたり格別なる御指導と御高配を賜りました指導教員である 埼玉県立大学 保健医療福祉学部 健康開発学科 検査技術科学専攻 廣渡祐史教授に深く感謝申し上げます。

本研究の指導補助として，ご指導賜りました 埼玉県立大学 保健医療福祉学部 共通教育科 滑川道人教授，埼玉県立大学 大学院研究科 飯岡由紀子教授に心からの感謝の意を表します。

大学院での研究活動では，沢山の方達との出会いと縁に恵まれました。特に所属研究室では多くの時間を共有しました大学院生の中島一樹さん，山口奈摘美さん，新田祥子さん，田中麻里奈さん，小林麻里子さん，渡辺駿太さん，久米幸夫さんに感謝を申し上げます。そして大学院生活を支えてくれた妻と息子に心より感謝申し上げます。

最後に，博士課程前後期にわたり格別なるご指導とご高配を賜りました 群馬パース大学 医療技術学部 検査技術学科 松下誠教授に深く感謝申し上げます。

8. 引用文献

1. Garcovich M, Zocco MA, and Gasbarrini A. Clinical use of albumin in hepatology. *Blood Transfus* 2009; 7: 268-277.
2. Ranjbar S, Shokoohinia Y, Ghobadi S et al. Studies of the interaction between isoimperatorin and human serum albumin by multispectroscopic method: identification of possible binding site of the compound using esterase activity of the protein. *Sci World J* 2013; 2013: 305081.
3. Minghetti PP, Ruffner DE, Kuang WJ et al. Molecular structure of the human albumin gene is revealed by nucleotide sequence within q11-22 of chromosome 4. *J Biol Chem* 1986; 261: 6747-6757.
4. Bhattacharya AA, Grune T, Curry S. Crystallographic analysis reveals common modes of binding of medium and long-chain fatty acids to human serum albumin. *J Mol Biol* 2000; 303: 721-732.
5. Bhattacharya AA, Curry S, Franks NP. Binding of the general anesthetics propofol and halothane to human serum albumin. High resolution crystal structures. *J Biol Chem* 2000; 275: 38731-38738.
6. Ferrer ML, Duchowicz R, Carrasco B et al. The conformation of serum albumin in solution: a combined phosphorescence depolarization-hydrodynamic modeling study. *Biophys J* 2001; 80: 2422-2430.
7. Nagumo K, Tanaka M, Chuang VT et al. Cys34-cysteinylated human serum albumin is a sensitive plasma marker in oxidative stress-related chronic disease. *PLoS One* 2014; 9: e85216.

8. Setoyama H, Tanaka M, Nagumo K et al. Oral branched-chain amino acid granules improve structure and function of human serum albumin in cirrhotic patients. *J Gastroenterol* 2017; 52: 754-765.
9. Sogami M, Nagoka S, Era S et al. Resolution of human mercapt- and nonmercaptalbumin by high-performance liquid chromatography. *Int J Pept Protein Res* 1984; 24: 96-103.
10. 認定輸血検査技師制度協議会カリキュラム委員会. スタンダード輸血検査テキスト第2版. 医歯薬出版株式会社: 東京, 2008.
11. Peters Jr T. All About Albumin: Biochemistry, Genetics, and Medical Applications. Academic Press: San Diego, 1996.
12. 矢田豊, 渡辺明治. 血清アルブミン測定の臨床的意義. *臨床検査* 2004; 48: 513-519.
13. 中山裕史, 富田公夫. 輸液 病態別メニューの考え方. *日腎会誌* 2008; 50: 100-109.
14. Victor W, Rodwell DA, Bender KM et al. Harper's Illustrated Biochemistry, Thirtieth Edition (清水孝雄監訳). 丸善出版株式会社: 東京, 2016.
15. Hoffman RS, Smilkstein MJ, Howland MA et al. Osmol gaps revisited: normal values and limitations. *J Toxicol Clin Toxicol* 1993; 31: 81-93.
16. Skou JC. The identification of the sodium-potassium pump. *Angew Chem Int Ed Engl* 1998; 37: 2320-2328.

17. Aperia A. 2011 Homer Smith Award: To serve and protect: classic and novel roles for Na⁺, K⁺-adenosine triphosphatase. *J Am Soc Nephrol* 2012; 23: 1283-1290.
18. Van Gerwen J, Shun-Shion AS, Fazakerley DJ. Insulin signalling and GLUT4 trafficking in insulin resistance. *Biochem Soc Trans* 2023; 51: 1057-1069.
19. Leto D, Saltiel AR. Regulation of glucose transport by insulin: traffic control of GLUT4. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2012; 13: 383-396.
20. 日本消化器病学会・日本肝臓学会. 肝硬変診療ガイドライン 2020 (改訂第3版). <https://www.jsge.or.jp/guideline/guideline/pdf/kankouhen2020>
21. 厚生労働科学研究費補助難治性疾患等政策研究事業難治性腎障害に関する調査研究班. エビデンスに基づくネフローゼ症候群診療ガイドライン 2020. https://jsn.or.jp/academicinfo/report/evidence_nephrotic_guideline2020.pdf
22. Wang Y, Wang S, Huang M. Structure and enzymatic activities of human serum albumin. *Curr Pharm Des* 2015; 21: 1831-1836.
23. 渡邊博志, 丸山徹, 小田切優樹. ヒト血清アルブミン分子上の薬物結合部位のトポロジー解析. *薬物動体* 2001; 16: 264-270.
24. Nicholson JP, Wolmarans MR, Park GR. The role of albumin in critical illness. *Br J Anaesth* 2000; 85: 599-610.
25. Domenicali M, Baldassarre M, Giannone FA et al. Posttranscriptional changes of serum albumin: clinical and prognostic significance in hospitalized patients with cirrhosis. *Hepatology* 2014; 60: 1851-1860.

26. Taverna M, Mrie AL, Mira JP et al. Specific antioxidant properties of human serum albumin. *Ann Intensive Care* 2013; 3: 4. doi: 10.1186/2110-5820-3-4.
27. Neubert E, Senger-Sander SN, Manzke VS et al. Serum and serum albumin inhibit in vitro formation of neutrophil extracellular traps (NETs). *Front Immunol* 2019; 10: 12. doi: 10.3389/fimmu.2019.00012.
28. Sugimoto D, Tamura Y, Takeno K et al. Clinical Features of nonobese, apparently healthy, japanese men with reduced adipose tissue insulin sensitivity. *J Clin Endocrinol Metab* 2019; 104: 2325-2333.
29. Ashbrook JD, Spector AA, Santos EC et al. Long chain fatty acid binding to human plasma albumin. *J Biol Chem* 1975; 25: 2333-2338.
30. Curry S, Mandelkow H, Brick P et al. Crystal structure of human serum albumin complexed with fatty acid reveals an asymmetric distribution of binding site. *Nat Struct Biol* 1998; 5: 827-835.
31. Curry S, Brick P, Franks NP. Fatty acid binding to human serum albumin: new insights from crystallographic studies. *Biochim Biophys Acta* 1999; 23: 131-140.
32. Petitpas I, Grune T, Bhattacharya AA et al. Crystal structures of human serum albumin complexed with monounsaturated and polyunsaturated fatty acids. *J Mol Biol* 2001; 314: 955-960.

33. Sticova E, Jirsa M. New insights in bilirubin metabolism and their clinical implications. *World J Gastroenterol* 2013; 19: 6398-6407.
34. Memon N, Weinberger BI, Hegyi T et al. Inherited disorders of bilirubin clearance. *Pediatr Res* 2016; 79: 378-386.
35. Ye W, Rosenthal P, Magee JC et al. Factors determining δ -bilirubin levels in infants with biliary atresia. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2015; 60: 659-663.
36. Minomo A, Ishima Y, Chuang VT et al. Albumin domain II mutant with high bilirubin binding affinity has a great potential as serum bilirubin excretion enhancer for hyperbilirubinemia treatment. *Biochim Biophys Acta* 2013; 1830: 2917-2923.
37. 猪又晃. 創薬シリーズ 化合物を医薬品にするために必要な安全性試験 内分泌毒性. *日本薬理学雑誌* 2008; 132: 297-300.
38. 鈴木悟. 甲状腺ホルモン輸送: 甲状腺から標的核受容体への旅路. *信州医学雑誌* 2011; 59: 403-410
39. Petitpas I, Peterse CE, Ha CE et al. Structural basis of albumin-thyroxine interactions and familial dysalbuminemic hyperthyroxinemia. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100: 6440-6445.
40. 森田繁. 金属と生体. *生活衛生* 1987; 31: 64-87.
41. Klapper JA Jr, Cann JR. Inhibition of peptic digestion of serum albumin by fatty acids. *Arch Biochem Biophys* 1964; 108: 531-534.
42. Lau SJ, Sarkar B. Ternary coordination complex between human serum albumin, copper (II), and L-histidine. *J Biol Chem* 1971; 246: 5938-5943.

43. Heaney RP. Calcium, dairy products and osteoporosis. *J Am Coll Nutr* 2000; 19 (2 Suppl): 83-99.
44. Food and Nutrition Board, Institute of Medicine. Calcium, Dietary Reference Intakes. Calcium, Phosphorus, Magnesium, Vitamin D, and Fluoride. National Academies Press 1997. doi: 10.17226/5776.
45. Payne RB, Little AJ, Williams RB et al. Interpretation of serum calcium in patients with abnormal serum proteins. *Br Med J* 1973; 4: 643-646.
46. 日本透析医学会. 慢性腎臓病に伴う骨・ミネラル代謝異常の診療ガイドライン. *日本透析医学会雑誌* 2012; 45: 301-356.
47. KDIGO CKD-MBD Work Group. KDIGO clinical practice guideline for the diagnosis, evaluation, prevention, and treatment of chronic kidney disease-mineral and bone disorder (CKD-MBD). *Kidney Int Suppl* 2009; 113: 1-130.
48. Clase CM, Norman GL, Beecroft ML et al. Albumin-corrected calcium and ionized calcium in stable haemodialysis patients. *Nephrol Dial Transplant* 2000; 15: 1841-1846.
49. 王麗楊, 用稻栄, 寒川昌平 他. 血液透析患者における適切な補正カルシウム計算式の検討. *日本透析医学会雑誌* 2018; 51: 103-107.
50. 田中真輝人, 高橋祐輔, 梅森祥央 他. ALB測定方法の違いを考慮した新たなCa補正式の検討. *臨床病理* 2016; 64: 619-624.
51. 松本直樹. 薬物動態学の臨床的意義 薬物血中濃度に影響する因子. *日本消化器病学会雑誌* 2004; 101: 739-745.

52. 小田切優樹. 薬物の血清タンパク結合に関する研究. 薬学雑誌 2009; 129: 413-425.
53. Sudlow G, Birkett DJ, Wade DN. The characterization of two specific drug binding sites on human serum albumin. Mol Pharmacol 1975; 11: 824-832.
54. Vanholder R, Landschoot NV, Smet RDe et al. Drug protein binding in chronic renal failure: evaluation of nine drugs. Kidney Int 1988; 33: 996-1004.
55. Caso G, Scalfi L, Marra M et al. Albumin synthesis is diminished in men consuming a predominantly vegetarian diet. J Nutr 2000; 130: 528-533.
56. Caso G, Feiner J, Mileva I et al. Response of albumin synthesis to oral nutrients in young and elderly subjects. Am J Clin Nutr 2007; 85: 446-451.
57. Rothschild MA, Oratz M, Mongelli J et al. Albumin metabolism in rabbits during gamma globulin infusions. J Lab Clin Med 1965; 66: 733-740.
58. Rothschild MA, Oratz M, Mongelli J et al. Effect of albumin concentration on albumin synthesis in the perfused liver. Am J Physiol 1969; 216: 1127-1130.
59. 加藤陽一郎. 肝灌流法による肝アルブミン合成量におよぼす副腎皮質ホルモンの影響に関する研究. 肝臓 1975; 16: 1-9.
60. Baynes JW, Thorpe SR. Identification of the sites of albumin catabolism in the rat. Arch Biochem Biophys 1981; 206: 372-379.

61. 安村敏, 松本雅則, 牧野茂義 他. 科学的根拠に基づいたアルブミン製剤の使用ガイドライン (第2版). 日本輸血細胞治療学会誌 2018; 64: 700-717.
62. Pugh RN, Murray-Lyon IM, Dawson JL et al. Transection of the oesophagus for bleeding oesophageal varices. *Br J Surg* 1973; 60: 646-649.
63. Ignacio de Ulibarri J, Gonzalez-Madrono A, de Villar NG et al. CONUT: a tool for controlling nutritional status. First validation in a hospital population. *Nutr Hosp* 2005; 20: 38-45.
64. Howe PE. The use of sodium sulphate as the globulin precipitant in the determination of proteins in blood. *J Biol Chem* 1921; 49: 93-107.
65. 藤野冷子, 工藤智子, 重光裕子. 臨床化学定量標準法の検討. 残余窒素, 総蛋白質. 東京女子医科大学雑誌 1961; 31: 32-35.
66. Fine J. The biuret method of estimating albumin and globulin in serum and urine. *Biochem J* 1935; 29: 799-803.
67. Tiselius A. A new apparatus for electrophoretic analysis of colloidal mixtures. *Trans Faraday Soc* 1937; 33: 524-531.
68. 菅野浩. 電気泳動法の発展の歴史. 生物物理化学 1997; 21: 151-158.
69. Bracken JS, Klotz IM. A simple method for the rapid detection of serum albumin. *Am J Clin Pathol* 1953; 23: 1055-1058.
70. Rees VH, Fildes JE, Laurence DJ. The dye-binding capacity of human plasma determined fluorimetrically and its relation to the determination of plasma albumin. *J Clin Pathol* 1954; 7: 336-340.

71. Rutstein DD, Ingenito EF, Reynolds WE. The determination of albumin in human blood plasma and serum; a method based on the interaction of albumin with an anionic dye-2(4'-hydroxybenzeneazo) benzoic acid. *J Clin Invest* 1954; 33: 211-221.
72. Crowley LV. An evaluation of serum protein fractionation using a methyl orange method for determination of albumin. *Clin Chem* 1964; 10: 1131-1136.
73. Kragh-Hansen U. Effects of aliphatic fatty acids on the binding of phenol red to human serum albumin. *Biochem J* 1981; 195: 603-613.
74. Rodkey LF. Binding of phenol red by human serum albumin. *Arch Biochem Biophys* 1961; 94: 526-531.
75. Arvan DA, Ritz A. Measurement of serum albumin by the HABA-dye technique: a study of the effect of free and conjugated bilirubin, of bile acids and of certain drug. *Clin Chim Acta* 1969; 26: 505-516.
76. Pascucci MW, Grisley DW, Rand RN. Electroimmunoassay of albumin in human serum: accuracy and long-term precision. *Clin Chem* 1983; 29: 1787-1790.
77. Kumar D, Banerjee D. Methods of albumin estimation in clinical biochemistry: Past, present, and future. *Clin Chim Acta* 2017; 469: 150-160.
78. Rodkey FL. Direct spectrophotometric determination of albumin in human serum. *Clin Chem* 1965; 11: 478-487.

79. Doumas BT, Watson WA, Biggs HG. Albumin standards and the measurement of serum albumin with bromocresol green. *Clin Chim Acta* 1971; 31: 87-96.
80. Speicher CE, Widish JR, Gaudot FJ et al. An evaluation of the overestimation of serum albumin by bromocresol green. *Am J Clin Pathol* 1978; 69: 347-350.
81. Webster D. A study of the interaction of bromocresol green with isolated serum globulin fractions. *Clin Chim Acta* 1974; 31: 109-115.
82. Gustafsson JE. Improved specificity of serum albumin determination and estimation of “acute phase reactants” by use of the bromocresol green reaction. *Clin Chem* 1976; 22: 616-622.
83. 村本良三. 血清アルブミン定量法. *臨床検査* 2004; 48: 537-544.
84. Watanabe A, Matsuzaki S, Moriwaki H et al. Problems in serum albumin measurement and clinical significance of albumin microheterogeneity in cirrhotics. *Nutrition* 2004; 20: 351-357.
85. Ueno T, Hirayama S, Sugihara M et al. The bromocresol green assay, but not the modified bromocresol purple assay, overestimates the serum albumin concentration in nephrotic syndrome through reaction with α 2-macroglobulin. *Ann Clin Biochem* 2016; 53: 97-105.
86. Webster D. The immediate reaction between bromocresol green and serum as a measure of albumin content. *Clin Chem* 1977; 23: 663-665.

87. Plesher CJ. Continuous-flow analysis for serum albumin, by use of the immediate reaction with bromocresol green. Clin Chem 1978; 24: 2036-2039.
88. 村上恵美子, 村本良三, 櫛下町醇 他. BCG, BCP のアルブミン, α 1-, α 2-, β -, γ -グロブリンとの反応性. 衛生検査 1990; 39: 31-35.
89. Walsh RL. A comparison of dye binding methods for albumin determination: the effects of abnormal sera, reaction times, acute phase reactants and albumin standards. Clin Biochem 1983; 16: 178-181.
90. Bonvicini P, Ceriotti G, Plebani M et al. Heparin interferes with albumin determination by dye-binding methods. Clin Chem 1979; 25: 1459-1460.
91. Louderback A, Mealey EH, Taylor NA. A new dye binding technic using bromocresol purple for determination of albumin in serum. Clin Chem 1968; 14: 793-794.
92. Pinnell AE, Northam BE. New automated dye-binding method for serum albumin determination with bromocresol purple. Clin Chem 1978; 24: 80-86.
93. Hill PG, Wells TN. Bromocresol purple and the measurement of albumin. Falsely high plasma albumin concentrations eliminated by increased reagent ionic strength. Ann Clin Biochem 1983; 20: 264-270.
94. Krahm J. Evaluation of the Dupont aca bromocresol purple albumin method. Clin Biochem 1983; 16: 87-90.

95. 中村希紀士子, 奥田貴代, 川井俊子 他. 血清アルブミン定量に関する研究. 京都大学医療技術短期大学部紀要 1982; 2: 18-25.
96. Sogami M, Era S, Nagaoka S et al. High-performance liquid chromatographic studies on non-mercapt in equilibrium with mercapt conversion of human serum albumin. II. J Chromatogr 1985; 332: 19-27.
97. 村本良三, 櫛下町醇, 松下誠 他. 血清保存中のブロムクレゾールパープル法による血清アルブミン濃度の測定値の上昇に関する検討. 臨床化学 1991; 20: 13-17.
98. Sogami M, Era S, Nagaoka S et al. HPLC-studies on nonmercapt-mercapt conversion of human serum albumin. Int J Pept Protein Res 1985; 25: 398-402.
99. Wells FE, Addison GM, Postlethwaite RJ. Albumin analysis in serum of haemodialysis patients: discrepancies between bromocresol purple, bromocresol green and electroimmunoassay. Ann Clin Biochem 1985; 22: 304-309.
100. Mabuchi H, Nakahashi H. Underestimation of serum albumin by the bromocresol purple method and a major endogenous ligand in uremia. Clin Chim Acta 1987; 167: 89-96.
101. Ihara H, Nakamura H, Aoki Y et al. Effects of serum-isolated vs synthetic bilirubin-albumin complexes on dye-binding methods for estimating serum albumin. Clin Chem 1991; 37: 1269-1272.
102. Kok MB, Tegelaers FP, van Dam B, et al. Carbamylation of albumin is a cause for discrepancies between albumin assays. Clin Chim Acta 2014; 434: 6-10.

103. 菅原悦子, 長谷川敬彦, 武居能樹. 5,5'-ジブロモ-*o*-クレゾールスルホンフタレインのメタクロマジーによるアルブミンの定量 アルブミンの種差による呈色度の差異について. 分析化学 1983; 32: 11-15.
104. 鈴木優治. ブロムクレゾールパープルの蛋白誤差の化学特性に関する検討 蛋白誤差の化学平衡からみたヒトアルブミンとウシアルブミン間に著しい反応差を引き起こす要因. 医学検査 2003; 52: 1255-1260.
105. Doumas BT, Peters T. Serum and urine albumin: a progress report on their measurement and clinical significance. Clin Chim Acta 1997; 258: 3-20.
106. Muramoto Y, Matsushita M, Irino T. Reduction of reaction differences between human mercaptalbumin and human nonmercaptalbumin measured by the bromcresol purple method. Clin Chim Acta 1999; 289: 69-78.
107. 村本良三, 佐々木真弓, 青木洋一 他. 血清アルブミン測定における新ブロムクレゾールパープル法の日常検査法としての有用性. 医学検査 1997; 46: 823-828.
108. 村本良三. BCP を用いた新しい血清アルブミン定量法の特徴. 生物試料分析 2001; 24: 105-112.
109. Ono M, Aoki Y, Masumoto M et al. High-dose penicillin G-treatment cause underestimation of serum albumin measured by a modified BCP method. Clin Chim Acta 2009; 407: 75-76.
110. 村本良三, 松下誠, 入野勉. 正確度を改善したブロムクレゾールパープル法による血清アルブミン定量法の開発. 臨床化学 1997; 26: 38-43.

111. 浦山修, 奥村伸夫, 松下誠 他. 臨床化学検査学. 医歯薬出版株式会社: 東京, 2018.
112. 加藤尚志. 臨床医化学分析における標準化の現状と課題. 産総研計量標準報告 2006; 5: 81-95.
113. 村本良三. 血清アルブミン測定標準化を将来どう進めたらよいのですか?. 臨床検査 2012; 56: 1288-1289.
114. Zegers I, Keller T, Schreiber W et al. Characterization of the new serum protein reference material ERM-DA470k/IFCC: value assignment by immunoassay. Clin Chem 2010; 56: 1880-1888.
115. 日本医師会. 令和 3 年度第 55 回臨床検査精度管理調査報告書. 2021: 279.
116. College of American Pathologists. Surveys and Anatomic Pathology Education Programs. 2021: 40.
117. 清宮正徳, 大野さやか, 山本はるな 他. アルブミンの測定法変更が病態識別に与える影響. 日本臨床検査自動化学会会誌 2013; 38: 20-26.
118. 日本臨床検査医学会血清アルブミン定量値ワーキンググループ. 血清アルブミン測定についての提言書-BCG 法と BCP 改良法による測定値の差の取り扱い方-. 臨床病理 2014; 62: 5-9.
119. Ueno T, Hirayama S, Ito M et al. Albumin concentration determined by the modified bromocresol purple method is superior to that by the bromocresol green method for assessing nutritional status in malnourished patients with inflammation. Ann Clin Biochem 2013; 50: 576-584.

120. 橋本儀一, 片山寛次, 井村敏雄 他. 血清アルブミン値を計算に用いる臨床的栄養指標の問題点 測定法改良による指標値の乖離. 静脈経腸栄養 2013; 28: 1091-1099.
121. De Roij van Zuijdewijn CLM, de Haseth DE, van Dam B et al. Role of albumin assay on calcium levels and prescription of phosphate binders in chronic hemodialysis patients. Nephron 2018; 140: 211-217.
122. 刈米和子, 藤田淑香, 汐谷陽子. C 反応性蛋白の血清アルブミン測定への関与と栄養状態識別値への影響. 生物試料分析 2010; 33: 383-390.
123. Nakajima K, Nagai K, Iwasaki T et al. Calibration with the standard reference serum causes the discrepancy in the serum albumin level measured by the bromcresol green and the modified bromresol purple methods in patients with hypoalbuminemia. JJCLA 2019; 44: 610-617. (in Japanese)
124. 日本臨床検査自動化学会化学技術委員会. 汎用自動分析装置の基礎とその移り変わり. 日本臨床検査自動化学会会誌 2016; 41(suppl.1): 10-16.
125. 亀田貴寛. 臨床化学分析における呈色反応. 検査と技術 2021; 49: 874-879.
126. 山崎宏和. 2020年4月からALP・LD測定法がIFCC法に変更へ. Medical Technology 2020; 48: 348-349.
127. 大場康寛. 臨床検査測定単位の統一(SI単位). 日本内科学会雑誌. 1993; 82: 496-501.

128. Kanda Y. Investigation of the freely available easy-to-use software 'EZR' for medical statistics. Bone Marrow Transplant 2013; 48: 452-458.
129. 日本臨床化学会クオリティマネジメント専門委員会. バリデーシ
ョン算出用プログラム Validation-Support/Exel Ver6.3 の操作方法
第 16 版 . [https://jscc-jp.gr.jp/file/senmon/Validation-Support-
V6.3.pdf](https://jscc-jp.gr.jp/file/senmon/Validation-Support-V6.3.pdf)
130. Seimiya M, Ohno S, Asanon H, et al. Change in albumin measurement method affects diagnosis of nephrotic syndrome. Clin Lab 2014; 60: 1663-1667.
131. Seimiya M, Ohno S, Yamamoto H, et al. Child-Pugh score is altered by the albumin measurement method. Hepatology 2013; 57: 2093-2094.

9. 発表論文



Research Article



Annals of Clinical Biochemistry
2023, Vol. 0(0) 1–8
© The Author(s) 2023
Article reuse guidelines:
sagepub.com/journals-permissions
DOI: 10.1177/00045632231170554
journals.sagepub.com/home/acb

Evaluation of the two-point calibration bromocresol green method, showing reduced deviation from the bromocresol purple method in sera from patients with hypoalbuminemia

Tatsuya Iwasaki^{1,2}, Kazuki Nakajima³, Yuji Hirowatari⁴ and Makoto Matsushita⁵

Abstract

Background: The bromocresol green (BCG) and bromocresol purple (BCP) methods are widely used for albumin measurements in routine testing, but the BCG method is known to react with globulin fractions and to have low specificity for albumin. We evaluated a calibration method using different concentrations of human serum albumin standards (two-point calibration BCG method) with the aim of reducing the effect of globulin fractions on the BCG method in patients with hypoalbuminemia.

Method: In the two-point calibration BCG method, two concentrations of standard solutions and their calibration values are set based on the difference in albumin concentrations measured by the BCG method (BCG-HSA method) and the modified BCP (modified BCP-HSA method) calibrated with human serum albumin standard solution (HSA). Albumin concentrations were measured in 136 patient serum samples (healthy group: 52, hypoalbuminemic group: 84) by the two-point calibrated BCG method and compared with those obtained using the modified BCP-HSA method.

Results: The mean albumin concentrations obtained using the two-point calibrated BCG and modified BCP-HSA methods were 39.18 ± 3.42 g/L and 39.37 ± 3.14 g/L (healthy group) and 26.20 ± 6.23 g/L and 26.23 ± 5.67 g/L (hypoalbuminemia group), respectively. The results of the two-point calibration BCG method were in a close agreement over the entire concentration range tested compared to the modified BCP-HSA method.

Conclusions: Based on these results, this calibration method reduces the influence of the globulin fraction on the BCG method. In the hypoalbuminemic group, the calibration method was shown to provide results consistent with the BCP method, which is highly specific for albumin.

Keywords

Serum albumin, bromocresol green, bromocresol purple, human serum albumin standard solution, two-point calibration, hypoalbuminemia

Accepted: 30th March 2023

¹Department of Clinical Chemistry, Graduate School of Health and Social Services, Saitama Prefectural University, Koshigaya, Japan

²Department of Clinical Laboratory, Higashimatsuyama Medical Association Hospital, Higashimatsuyama, Japan

³Department of Blood Transfusion, The University of Tokyo Hospital, Bunkyo-ku, Japan

⁴Department of Health Sciences, Saitama Prefectural University, Koshigaya, Japan

⁵Department of Clinical Chemistry, Saitama Prefectural University, Koshigaya, Japan

Corresponding author:

Tatsuya Iwasaki, Department of Clinical Chemistry, Graduate School of Health and Social Services, Saitama Prefectural University, 820 Sannomiya, Koshigaya, Saitama 343-8540, Japan and Department of Clinical Laboratory, Higashimatsuyama Medical Association Hospital, 1-15-1 Shinmeichou, Higashimatsuyama, Saitama 355-0021, Japan.

Email: iwa7180@gmail.com

Introduction

The dyes bromocresol green (BCG) and bromocresol purple (BCP) are widely used in dye-binding methods for routine serum albumin measurements. Both methods use sulfonphthalein dyes to act as pH indicators, but they differ in their specificity for albumin. The BCG method has problems with albumin specificity because it reacts with some globulins^{1,2} such as acute phase reactant proteins.³ In response to this problem, the BCG method has been reported to avoid the effect of globulin by utilizing the difference in reaction time between albumin and globulin and shortening the measurement time, but this method remains inadequate.^{4,5} The BCP method does not react with globulin and is highly specific for albumin.^{6,7} However, the redox state of the thiol group of the albumin molecule causes differences in reactivity with the BCP method, and a modified BCP method was developed to reduce this effect.⁸ This method is considered a highly accurate assay that provides results consistent with albumin levels measured by immunoassay.⁹ In Japan, the modified BCP method is recommended and widely used in clinical laboratories. In contrast, the BCG method has a high prevalence in clinical laboratories internationally. It still has an important role in albumin measurement because it is used to measure albumin in animal serum and is not affected by drug-bound albumin due to penicillin G treatment.¹⁰ In addition, routine testing is calibrated with a single concentration of protein standard serum based on human serum containing globulin fractions. This leads to inconsistent measurements that do not reflect the relationship between the albumin specificity of the two methods.¹¹ In this study, serum albumin concentrations were measured by the BCG (BCG-HSA) and modified BCP (modified BCP-HSA) methods calibrated using human serum albumin solution. The results showed that the BCG-HSA method provided higher values for albumin than the modified BCP-HSA method for all concentrations tested, reflecting the specificity of the BCG method for albumin. Furthermore, the difference in albumin measurements between the healthy group and hypoalbuminemic group was found to be due to differences in the amount of globulin fractionation between the two methods. Therefore, we evaluated a two-point calibration BCG method using human serum albumin standard solutions of different concentrations with the aim of reducing the effect of globulin fractionation on the BCG method in hypoalbuminemic areas of clinical significance.

Materials and Methods

Materials

Patient serum albumin measurement values less than 35.0 g/L as measured by the modified BCP method were

set as the hypoalbuminemia group, and those greater than 35.0 g/L were set as the healthy group.

Reagents

Five different serum albumin measurements were performed: the BCG method, the BCG-HSA method, the two-point calibration BCG method, the modified BCP method, and the modified BCP-HSA method. The BCG method, the BCG-HSA method, and the two-point calibration BCG method used the Albumin II-HA Test Wako. For the modified BCP and modified BCP-HSA methods, L-type Wako ALB-BCP was used. For total protein measurement by the Biuret method, L-type Wako TP was used. Reagents for albumin and total protein were from FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation (Osaka, Japan). QuickGel SP (Helena Laboratories Corporation, Saitama, Japan) was used for protein fractionation testing by agarose gel electrophoresis.

Apparatus

All albumin and total protein measurements were performed using a Model 7180 Hitachi Automated Analyzer (Hitachi High-Tech Corporation, Tokyo, Japan). Serum protein fractionation was performed using an Eplyzer 2 junior (Helena Laboratories Corporation).

Analysis conditions

For the BCG method, BCG-HSA method, and two-point calibration BCG method, 2.5 μ L of sample and 250 μ L of BCG reagent were mixed and measured 590 s after mixing at 660 nm as the main wavelength and 700 nm as the secondary wavelength (one-point two-wavelength method). In the modified BCP and modified BCP-HSA methods, 3.0 μ L of sample was mixed with 160 μ L of the first reagent and measured at 600 nm as the main wavelength and 660 nm as the secondary wavelength 230 s after mixing, followed by mixing 80 μ L of the second reagent 300 s later and measuring at 600 nm as the main wavelength and 660 nm as the secondary wavelength 590 s later (two-point two-wavelength method). The Biuret and agarose gel electrophoresis methods were conducted according to the respective instrument instruction manual.

Standard Solution

Protein standard serum. Calibration of the BCG, modified BCP, and Biuret methods was performed using a TP/ALB calibrator (FUJIFILM Wako Pure Corporation). The calibration values were those of the specified Biuret (70.9 g/L), BCG (47.4 g/L), and modified BCP (47.3 g/L) methods.

Human serum albumin standard solution 1. Human serum albumin A8763 (4.5 g, Sigma-Aldrich Japan, Tokyo, Japan) with a purity of 99% or higher was weighed on an electronic balance and dissolved in physiological saline solution to 100 mL. The albumin concentration of this solution was 45.0 g/L and was used as standard solution 1. The BCG-HSA method and the modified BCP-HSA method were calibrated using this standard solution 1, and its calibration value was set at 45.0 g/L.

Human serum albumin standard solution 2. A solution of 10 mL of the above standard solution 1 was mixed with 7.64 mL of physiological saline solution. The albumin concentration of this solution was 25.5 g/L and it was used as standard solution 2. This standard solution was used only for the two-point calibration BCG method.

Comparison of BCG, BCG-HSA, modified BCP, and modified BCP-HSA methods

The BCG, BCG-HSA, modified BCP, and modified BCP-HSA methods were used to measure albumin in sera from 60 patients (28 in the healthy group and 32 in the hypoalbuminemic group) and the results were compared.

Determination of calibration values for the two-point calibration BCG method

Calibration of the two-point calibration BCG method was performed using standard solutions 1 and 2. Therefore, the calibration values of standard solutions 1 and 2 in the two-point calibration BCG method were calculated from the differences in albumin values of the BCG-HSA method and the modified BCP-HSA method in section Comparison of BCG, BCG-HSA, modified BCP, and modified BCP-HSA methods. The calculated calibration values were 40.5 g/L for standard solution 1 and 18.6 g/L for standard solution 2.

Protein fractionation assay

Protein fractions were measured by agarose gel electrophoresis in sera from 60 patients (28 in the healthy group and 32 in the hypoalbuminemic group). The α -, β -, and γ -globulin fractions were calculated from the total protein value measured by the Biuret method.

Calibration effect of the two-point BCG method

The calibration effectiveness of the two-point calibration BCG method was compared with the modified BCP-HSA method for the healthy and hypoalbuminemic groups using

sera samples from 136 patients (52 in the healthy group and 84 in the hypoalbuminemic group).

Ethical approval

Patient sera were residual sera from medical treatments at Higashimatsuyama Medical Association Hospital, and comprehensive consent was obtained. This study was approved by the Ethics Committee of Higashimatsuyama Medical Association Hospital (approval No.: 21-1). The experiments were conducted in compliance with the relevant national laws and regulations and in accordance with the tenets of the Declaration of Helsinki.

Statistical analysis

Data were tabulated in Microsoft Excel (Microsoft Corporation, Redmond, WA), and EZR¹² was used for all statistical analyses. EZR is statistical software that extends the capabilities of R and R Commander. Comparison of albumin levels by different standard solutions is expressed as mean \pm SD, and correlation analysis was performed using Spearman's rank correlation coefficient test. Comparison of albumin levels by the two-point BCG method and modified BCP-HSA method is expressed as mean \pm SD, and correlation analysis was performed using Pearson's test. Differences were considered significant at $p < 0.05$.

Results

Grading of protein standard serum and human serum albumin standard

Protein fractionation was performed by agarose gel electrophoresis of protein standard serum and standard solution 1. The results showed that the albumin fraction was 64.8%, α fraction was 11.2%, β fraction was 9.4%, and γ fraction was 14.8% in the protein standard serum, and that the albumin fraction was 100% in standard solution 1. Standard solutions 1 and 2 were also measured in triplicate using the Biuret method. The average values were 44.7 g/L for standard solution 1 and 25.3 g/L for standard solution 2, similar to the theoretical values for both adjusted samples (45.0 g/L for standard solution 1 and 25.5 g/L for standard solution 2).

Comparison of albumin concentration between the BCG and modified BCP methods due to differences in calibrators

Serum albumin measurements were made for serum samples from 60 patients using the BCG method calibrated with protein standard sera and human serum

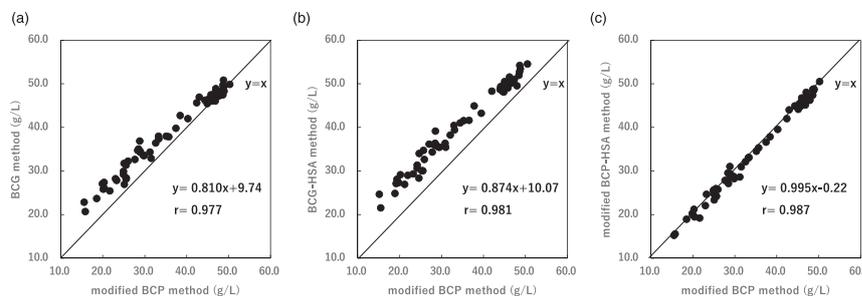


Figure 1. Comparison of albumin concentration obtained using the BCG method and the modified BCP method with different calibrators. The protein standard serum (a: $y = 0.810x + 9.74$, $r = 0.977$, $p < 0.01$) and human serum albumin standard (b: $y = 0.874x + 10.07$, $r = 0.981$, $p < 0.01$) were used as calibration standards. Protein standard serum and human serum albumin standard were used in the modified BCP method (c: $y = 0.995x - 0.22$, $r = 0.987$, $p < 0.01$). Correlation was evaluated using Spearman's rank correlation coefficient test.

albumin standard solutions, and using the modified BCP method. Serum albumin concentrations (mean \pm SD) for both methods calibrated with protein standard serum were 46.20 ± 3.27 g/L and 30.53 ± 4.56 g/L using the BCG method for the healthy and hypoalbuminemic groups, respectively, whereas the modified BCP method provided the values 45.07 ± 4.06 g/L and 25.60 ± 4.89 g/L, respectively. The results for the healthy group were almost identical for both methods, whereas the BCG method provided a mean value for the hypoalbuminemic group that was 5.08 g/L higher (Figure 1(a)). Serum albumin concentrations obtained using the BCG-HSA method calibrated with human serum albumin standards were 49.51 ± 3.24 g/L and 32.45 ± 5.01 g/L for the healthy and hypoalbuminemic groups, respectively, whereas the modified BCP-HSA method provided values of 45.03 ± 3.72 g/L and 25.54 ± 5.08 g/L. The BCG-HSA methods gave mean values for both the healthy and hypoalbuminemic groups that were 4.48 g/L and 6.91 g/L higher, respectively (Figure 1(b)). The modified BCP method matched albumin concentrations for both calibrators (Figure 1(c)). Table 1 shows the serum albumin concentrations obtained by the BCG and modified BCP methods for each calibrant.

Correlation of differences in albumin concentration and globulin fractions between the BCG-HSA and modified BCP-HSA methods

Protein fractionation was performed by agarose gel electrophoresis on serum samples from 60 patients, and the correlation between the difference in albumin

concentration and globulin fractionation was compared between the BCG-HSA and modified BCP-HSA methods. The results showed a strong correlation with the α fraction: $r = 0.885$, β fraction: $r = -0.528$, and γ fraction: $r = 0.292$ (Figure 2).

Determination of the calibration value for the two-point BCG-HSA method

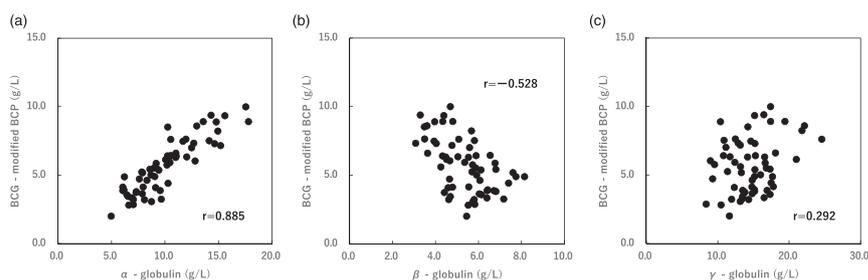
Based on the results presented in section Comparison of albumin concentration between the BCG and modified BCP methods due to differences in calibrators, standard solution 1 was adjusted to an albumin concentration of 45.0 g/L from the average value for the healthy group obtained using the modified BCP-HSA method. The calibration value was 40.5 g/L, obtained by subtracting the difference of 4.48 g/L between the BCG-HSA method and the modified BCP-HSA method for the healthy group. Standard solution 2 was adjusted to an albumin concentration of 25.5 g/L from the mean value obtained for the hypoalbuminemic group using the modified BCP-HSA method. The calibration value was 18.6 g/L, obtained by subtracting the difference of 6.91 g/L between the BCG-HSA and modified BCP-HSA methods for the hypoalbuminemia group (Table 2).

Comparison of the two-point calibration BCG method and the modified BCP-HSA method

The albumin concentrations obtained using the two-point calibration BCG and BCG-HSA methods were compared with the modified BCP-HSA method using 136 newly collected patient serum samples. The correlation between

Table 1. Comparison of albumin levels by the two methods with different standard solutions using sera from healthy and hypoalbuminemia subjects.

	Albumin level (mean \pm SD: g/L)			
	Calibration with protein standard serum		Calibration with human serum albumin standard	
	Healthy subjects (n = 28)	Hypoalbuminemia subjects (n = 32)	Healthy subjects (n = 28)	Hypoalbuminemia subjects (n = 32)
BCG method	46.20 \pm 3.27	30.53 \pm 4.56	49.51 \pm 3.24	32.45 \pm 5.01
Modified BCP method	45.07 \pm 4.06	25.60 \pm 4.89	45.03 \pm 3.72	25.54 \pm 5.08

**Figure 2.** Correlation coefficient for the difference between the BCG method and the modified BCP method and the α -globulin (a), the β -globulin (b), and the γ -globulin (c) fraction. (a) The correlation coefficient with the α -globulin fraction was $r = 0.885$, $p < 0.01$. (b) The correlation coefficient with the β -globulin fraction was $r = -0.528$, $p < 0.01$. (c) The correlation coefficient with the γ -globulin fraction was $r = 0.259$, $p < 0.05$. Correlation was evaluated using Pearson's test.**Table 2.** Calibration materials and calibration values for the BCG method.

	Calibration material 1 (calibration value: g/L)	Calibration material 2 (calibration value: g/L)
BCG-HSA method	45.0 g/L human serum albumin (45.0)	—
Two-point BCG method	45.0 g/L human serum albumin (40.5)	25.5 g/L human serum albumin (18.6)

the BCG-HSA method and the modified BCP-HSA method was $y = 0.907x + 8.58$, $r = 0.978$, $p < 0.01$ and that between the two-point calibration BCG method and the modified BCP-HSA method was $y = 1.006x - 0.27$, $r = 0.978$, $p < 0.01$ (Figure 3(a) and (b)). Serum albumin concentrations (mean \pm SD) obtained using the two-point calibration BCG method and the modified BCP-HSA method were 39.18 ± 3.42 g/L and 26.20 ± 6.23 g/L in the healthy and hypoalbuminemic groups, respectively, whereas the corresponding values obtained using the modified BCP-HSA method were 39.37 ± 3.14 g/L and 26.23 ± 5.67 g/L. Over the entire concentration range, the two-point calibration BCG method gave results in a close agreement with those of the modified BCP-HSA method (Table 3).

Discussion

The BCG and BCP methods, which are dye-binding methods used to measure albumin, differ in their specificity for albumin. This reportedly can affect clinical judgment, especially for hypoalbuminemic patients where the proportion of globulin fractions is increased.¹³⁻¹⁶ In routine testing, the two methods provided almost identical albumin level values in the healthy group, whereas the BCG method provided higher values for the hypoalbuminemic group, a contradictory result that does not reflect the specificity of the two methods for albumin. We previously evaluated the effects of calibration for both methods using human albumin and α - and β -globulin samples adjusted to different concentrations and reported that calibration with a protein

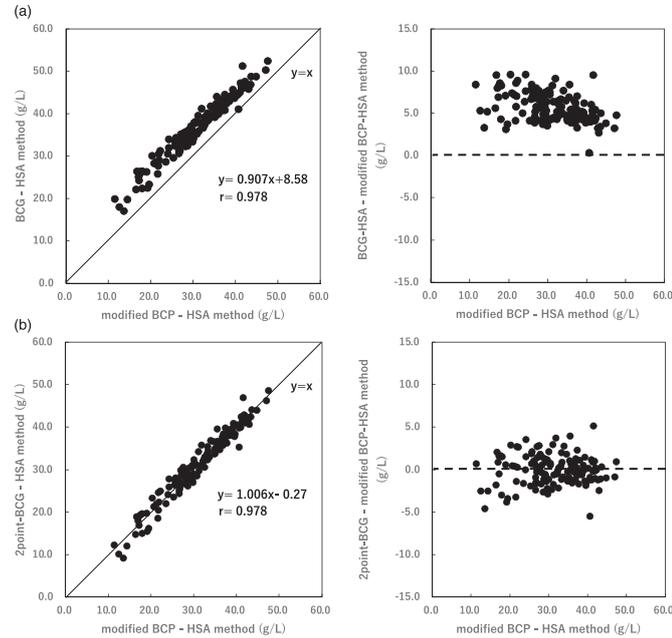


Figure 3. Correlation between the modified BCP-HSA method and the BCG-HSA method (a) and the two-point BCG method (b) and a plot of the differences. (a) The correlation with the BCG-HSA method was $y = 0.907x + 8.58$, $r = 0.978$, $p < 0.01$. (b) The correlation with the two-point BCG method was $y = 1.006x - 0.27$, $r = 0.978$, $p < 0.01$. Correlation was evaluated using Pearson's test.

Table 3. Comparison of albumin levels by the two-point BCG method and the modified BCP-HSA method using sera from healthy and hypoalbuminemia subjects.

	Albumin level (mean \pm SD: g/L)	
	Healthy subjects (n = 52)	Hypoalbuminemia subjects (n = 84)
Two-point BCG method	39.18 \pm 3.42	26.20 \pm 6.23
Modified BCP-HSA method	39.37 \pm 3.14	26.23 \pm 5.67

standard serum based on human serum was responsible for the observed inconsistency in routine testing.¹¹ Given the above, we considered that the problems with the BCG method for albumin measurements are its low specificity for albumin and the fact that it is calibrated with a single concentration of protein standard serum. Single-point calibration is inadequate because the BCG method generates similar coloration for several globulins, such as α -globulin, regardless of whether the patient is healthy or hypoalbuminemic. To address these problems, we developed a

two-point calibration BCG method using human serum albumin standards at different concentrations to calibrate the BCG method and evaluated this method using patient sera. First, patient serum was measured by the BCG-HSA and modified BCP-HSA methods calibrated with a human serum albumin standard. The mean difference between the two methods was 4.48 g/L for the healthy group and 6.91 g/L for the hypoalbuminemic group, with the BCG method providing higher values at all concentrations (Figure 1(b)). Protein fractionation of patient serum was performed by

agarose gel electrophoresis to determine the relationship between the differences in the measurement results obtained using the two methods and the globulin fraction. The results showed a strong correlation coefficient of $r = 0.885$ with the α -fraction, and patient sera with low albumin concentrations had increased levels of the α -globulin fraction (Figure 2). When calibrated with a protein standard serum, the α - and β -globulins in the calibrant are also calibrated in a reactive state using the BCG method. In the healthy group, this calibration effect corrects for α - and β -globulin effects of the BCG method. However, calibration with a single concentration of protein standard serum assumes that the ratio of albumin to α - and β -globulins is identical to that of the protein standard serum at all albumin concentrations. Therefore, the BCG method can be considered to measure higher than the true values for the hypoalbuminemic group. In addition, since the amount of α -globulin is higher in the hypoalbuminemic group than in the healthy group, the albumin value measured by the BCG method is expected to be even higher than that measured by the BCP method. The human serum albumin standard used in this study does not contain a globulin fraction. Thus, the BCG method calibrated with the human serum albumin standard did not correct for the globulin fraction at all albumin concentrations, reflecting its specificity for albumin. The difference in albumin concentration between the BCG-HSA and modified BCP-HSA methods therefore reflects the globulin fractions in the patient's serum, with a confirmed strong correlation with the amount of α -fraction. Given the difference in the amount of globulin fraction in sera from the healthy and hypoalbuminemic groups, two concentrations of standard solutions and their calibration values were established based on the difference in albumin measurements between the BCG-HSA method and the modified BCP-HSA method in the two groups. Furthermore, the modified BCP-HSA method and the two-point calibration BCG method, which subtract the amount of colored α -globulin fraction, were compared. The reference method used was the modified BCP method, which provides results consistent with albumin levels measured by immunoassay^{8,17}. The results were 39.18 ± 3.42 g/L and 26.20 ± 6.23 g/L for the two-point calibrated BCG method and 39.37 ± 3.14 g/L and 26.23 ± 5.67 g/L for the modified BCP-HSA method, respectively, for the healthy and hypoalbuminemic groups, and the results were similar across the entire concentration range tested (Table 3). These results indicate that the two-point calibration BCG method reduces the influence of α -globulin levels in the low albumin region of clinical significance, and avoids the influence of the calibration method using protein standard serum. The albumin assay should employ the modified BCP method, which is highly specific. If the BCG method is

employed, it would be desirable to change to this calibration method that reduces the difference in albumin concentration from the modified BCP method.

A limitation of this study is that it did not consider globulin levels in diseases associated with hypoalbuminemia. Albumin concentrations may be overestimated and underestimated in patients with diseases involving increased globulin fractions other than the α -globulin fraction, and in hypoalbuminemia where globulin fractions are not increased. Therefore, it is necessary to proceed with the evaluation of individual cases and changes in globulin fractions as an issue for this method.

Conclusion

In this study, considering the differences in globulin fractions in the healthy and hypoalbuminemic groups, the two-point calibrated BCG method was developed using human serum albumin standard solutions at different concentrations, and compared with the modified BCP-HSA method. The results of the two-point calibration BCG method were in a close agreement over the entire concentration range tested compared to the modified BCP-HSA method. Based on these results, this calibration method reduces the influence of the globulin fraction on the BCG method even in hypoalbuminemic areas, which is of high clinical significance.

Declaration of conflicting interests

The author(s) declared no potential conflicts of interest with respect to the research, authorship, and/or publication of this article.

Funding

The author(s) received no financial support for the research, authorship, and/or publication of this article.

Ethical approval

The study was approved by Higashimatsuyama Medical Association Hospital (approval no. 21-1).

Guarantor

MM.

Contributorship

TI and MM designed the study. MM and YH supervised the study. TI and KN carried out the research. TI and MM analyzed the data. TI and MM wrote the manuscript. MM and YH reviewed drafts of the manuscript. All authors have accepted responsibility for the entire content of this manuscript and approved its submission.

ORCID iDs

Tatsuya Iwasaki  <https://orcid.org/0000-0002-9411-1910>

Kazuki Nakajima  <https://orcid.org/0009-0000-5569-0254>

Yuji Hirowatari  <https://orcid.org/0000-0002-9332-4412>

References

1. Speicher CE, Widish JR and Gaudot FJ. An evaluation of the overestimation of serum albumin by bromocresol green. *Am J Clin Pathol* 1978; 69: 347–350.
2. Webster D. A study of the interaction of bromocresol green with isolated serum globulin fractions. *Clin Chim Acta* 1974; 53: 109–115.
3. Gustafsson JE. Improved specificity of serum albumin determination and estimation of “acute phase reactants” by use of the bromocresol green reaction. *Clin Chem* 1976; 22: 616–622.
4. Webster D. The immediate reaction between bromocresol green and serum as a measure of albumin content. *Clin Chem* 1977; 23: 663–665.
5. Plesher CJ. Continuous–flow analysis for serum albumin, by use of the immediate reaction with bromocresol green. *Clin Chem* 1978; 24: 2036–2039.
6. Pinnell AE and Northam BE. New automated dye-binding method for serum albumin determination with bromocresol purple. *Clin Chem* 1978; 24: 80–86.
7. Turley CP, Andries LA and Arnold WA. Dye-binding and electrophoretic techniques compared for albumin assay in hypoalbuminemic sera. *Clin Chem* 1985; 31: 336–337.
8. Muramoto Y and Irino T. Reduction of reaction differences between human mercaptalbumin and human non-mercaptalbumin measured by the bromocresol purple method. *Clin Chim Acta* 1999; 289: 69–78.
9. Muramoto Y. Usefulness of modified bromocresol purple method for determination of serum albumin. *J Anal Bio–Sci* 2001; 24: 105–112.
10. Ono M, Aoki Y, Masumoto M, et al. High-dose penicillin G-treatment causes underestimation of serum albumin measured by a modified BCP method. *Chin Chim Acta* 2009; 407: 75–76.
11. Nakajima K, Iwasaki T, Matsushita M, et al. Calibration with the standard reference serum causes the discrepancy in the serum albumin level measured by the bromocresol green and the modified bromocresol purple methods in patients with hypoalbuminemia. *JJCLA* 2019; 44: 610–617.
12. Kanda Y. Investigation of the freely available easy-to-use software ‘EZR’ for medical statistics. *Bone Marrow Transplant* 2013; 48: 452–458.
13. Seimiya M, Ohno S, Asano H, et al. Change in albumin measurement method affects diagnosis of nephrotic syndrome. *Clin Lab* 2014; 60: 1663–1667.
14. Seimiya M, Ohno S, Yamamoto H, et al. Child-Pugh score is altered by the albumin measurement method. *Hepatology* 2013; 57: 2093–2094.
15. Ueno T, Hirayama S, Ito M, et al. Albumin concentration determined by the modified bromocresol purple method is superior to that by the bromocresol green method for assessing nutritional status in malnourished patients with inflammation. *Ann Clin Biochem* 2013; 50: 576–584.
16. de Roij van Zuijdewijn CLM, de Haseth DE, van Dam B, et al. Role of albumin assay on calcium levels and prescription of phosphate binders in chronic hemodialysis patients. *Nephron* 2018; 140: 211–217.
17. Muramoto Y and Irino T. Accurate method of determining serum albumin with bromocresol purple. *Jpn J Clin Chem* 1997; 26: 38–43.