

タンパク質一次標準物質の確立・供給のための 測定技術に関する調査研究

加藤 愛*

(平成17年11月28日受理)

A survey on Measurement Technique to Establish and Supply Protein Primary Reference Materials

Megumi KATO

1. 緒言

病院での血液や尿等の臨床検査は、個人の健康管理を行う上で必須の診断技術になっている。近年、これらの測定結果について、測定機器や測定検査薬、検査機関によらない結果を得られるよう、標準化の整備が叫ばれている。特にBIPM (Bureau International des Poids et Mesures, 国際度量衡局), IFCC (International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, 国際臨床化学連合), WHO (World Health Organization, 世界保健機構), ILAC (International Laboratory Accreditation Cooperation, 国際試験所認定機構) が中心となって設立された, JCTLM (Joint Committee for Traceability in Laboratory Medicine, 検査医学のトレーサビリティに関する合同委員会) は、2003年12月からヨーロッパで施行された「欧州におけるIVD (体外診断検査) に関するEU指令」に対応して、臨床化学分野における国際整合性の取れた測定法や標準物質を定義することを目指している。近い将来バイオメディカル分野において、国際的な国家計量標準によりトレーサビリティが確保されていない計測機器やバイオメディカル関連商品は市場から受け入れられなくなる可能性がある。

標準化体制の整備が叫ばれているIVD標準物質のひとつにタンパク質がある。タンパク質に関する臨床化学検査項目としては、たとえば癌の早期発見や治療後のモニタリングなどに役立つ腫瘍マーカー検査や、エイズやB型肝炎に代表される感染症検査があり、この際、種々の血漿タンパク成分、尿中タンパク成分、(ペプチド) ホルモン、酵素、ウイルス抗原などが主な検査対象となってい

る。近年、タンパク質に対する診断薬の需要が急増しており、様々な新規診断薬や検査システムが開発されている。また、基礎研究分野のプロテオミクス¹⁾研究においても、様々な疾病の指標としての新規マーカータンパク質探索が精力的に行われており、今後タンパク質標準物質の整備は益々重要性を増していくものと考えられる。

そのような状況を踏まえ、計量標準総合センター (NMIJ) としても早急に臨床化学分野における標準化の体制を整備しなければならないとの必要性から、2004年4月に我々の有機分析科バイオメディカル標準研究室は発足した。発足に先立ってのニーズ調査²⁾においては、約90種類のタンパク質を整備計画リスト中に挙げている。

本調査研究においては、まずタンパク質測定体系の現状と各国での認証標準物質 (Certified Reference Material ; CRM) の開発状況について調査し、どのような標準物質が必要とされているか、またそれに対して諸外国の対応がどのようなかについて考察した。その後、タンパク質標準物質の値付けに必要なとされる主な測定方法と、諸外国で実際に用いられている測定方法について調査し、今後のNMIJにおける開発方針について検討した。

2. タンパク質標準物質開発の現状と課題

タンパク質標準物質として国際的に共通に使用されている代表的なものに、ERM-DA-470 (血漿タンパク標準品)³⁾がある。同製品は1993年にEU (European Union, 欧州連合) のIRMM (Institute for Reference Materials and Measurements) により開発された、15項目の血漿タンパク質のために設定された標準物質である (表1参照)。本製品を国内あるいは国際間で共通に使用にすることによ

* 計測標準研究部門 有機分析科

表1 血漿タンパク標準品ERM-DA-470の成分表

タンパク質名	認証値 (g/L)	不確かさ (*)
プレアルブミン (PREA)	0.243 (a)	0.018
アルブミン (ALB)	39.7 (b)	0.8
α1-酸性糖タンパク (α1-AG)	0.656 (a)	0.005
α1-アンチトリプシン (α1-AT)	1.206 (a)	0.011
セルロプラスミン (Cp)	0.205 (b)	0.011
α2-マクログロブリン (α2-M)	1.64 (b)	0.05
ハプトグロビン (Hp)	0.893 (b)	0.009
トランスフェリン (Tf)	2.45 (a)	0.06
補体第3成分 (C3)	1.091 (b)	0.027
補体第4成分 (C4)	0.151 (b)	0.005
C反応性タンパク (CRP)	0.0392 (c)	0.0019
免疫グロブリンG (IgG)	9.68 (b)	0.1
免疫グロブリンA (IgA)	1.96 (b)	0.04
免疫グロブリンM (IgM)	0.797 (b)	0.023
α1-アンチキモトリプシン (α1-ACT)	0.245 (d)	0.015

Values transferred from:

(a)= Pure Proteins

(b)= USNRP 12-0575c

(c)= 1st intl. Std. CRP85/506

(d)= highly purified and recombinant ACT

(*)不確かさ=認証値の片側95%信頼区間

表2 諸外国のタンパク質標準物質開発状況

標準物質名	認証機関	開発年度	病的意義	濃度決定法
Thyroglobulin (BCR-457)	IRMM (EU)	1994	内分泌 (甲状腺) 腫瘍マーカー	比色定量法
Alpha-foetoprotein (BCR-486)	IRMM (EU)	1996	肝癌腫瘍マーカー	アミノ酸組成分析
Prostate Specific Antigen (BCR-613)	IRMM (EU)	1999	前立腺癌 腫瘍マーカー	アミノ酸組成分析
Bovine Serum Albumin (SRM927c)	NIST (USA)	2004	栄養状態 検査マーカー	前ロット (SRM927b) を標準物質とした吸光度測定

り、測定法間あるいは施設間の誤差が大いに減少したとの報告も多い。

一方、本製品に含まれる各々のタンパク質の認証値をSIトレーサブルな物質濃度として定義するには、化学量論的に正確に値付けされた(純物質系)一次標準物質の開発・供給が必要である^{2),3)}。またERM-DA-470に含まれない血漿タンパク質や、尿中タンパク成分、(ペプチド)ホルモン、酵素、ウイルス抗原などについても、(純物質系)一次標準物質の精製や化学量論的な値付けを順次行っていく必要がある。

代表的な国家標準機関における(純物質系)一次標準物質⁴⁾⁻⁷⁾の供給の現状を表2に示す。これらはJCTLM Databaseに登録されているReference Material List II⁸⁾より抜粋したものである(同データベースは約150種類の

標準物質が登録されているが、そのなかでList IIはSIトレーサブルあるいは国際的承認の得られた測定法により値付けされたもののリストであり、List IIは非SIトレーサブル標準物質もしくは国際的承認の得られた測定法が存在しない物質についてのリストである)。(純物質系)一次標準物質に関しては、米国のNIST (National Institute of Standards & Technology)とEUのIRMMが開発・供給を行い始めている。いずれにしても、まだ始まったばかりということもあり、(1)標準物質の評価に関し、国際的合意の得られる方法が確立されているとは言い難い、(2)化学量論的に正確な濃度決定を行っているとは言い難い、といった問題点が挙げられる。

3. タンパク質認証標準物質の開発

タンパク質認証標準物質の開発は、定性的な「純度」「物質の同定」の評価と、定量的な「均質性」「安定性」の評価、「濃度の決定」の、大きく5つの項目について総合的に行うことが重要である。以下に、各々の評価における主要な分析方法と、表2に挙げた標準物質開発に用いられた評価方法の詳細について記す。

3.1 タンパク質の純度評価

タンパク質の純度評価においては、同物質が別のタンパク質を含んでおらず、タンパク質としての純度が確保されているかの確認を行う。生体組織や細胞を原材料として目的タンパク質の精製を行う場合、ファミリータンパク²やアイソザイム³、スプライスバリエント⁴、など相同性の高い配列をもった目的外のタンパク質と一緒に精製されてくる場合があり、これらは臨床検査の際にノイズとして検出されてしまう可能性がある。よって純度評価(3.1)は測定方法を変えるなどして、厳密に行う必要がある。純度評価によって不純物が認められた場合には、同定(3.2)を行い、場合によっては再度目的タンパク質の精製を繰り返すといった操作も必要である。純度評価の主な方法としては3.1.1電気泳動分析、3.1.2 クロマトグラフィー分析、3.1.3質量分析がある。

3.1.1 電気泳動分析

電気泳動分析は、ポリアクリルアミドゲルなどの支持体の中でタンパク質試料を分離分析する方法である。ポリアクリルアミドゲルは網目状の構造を持っているので、一定の方向に電場をかけた場合、小さい分子は網目をすり抜けながら速く移動し、大きい分子は網目に引っかかりながら、よりゆっくりと移動する。これを「分子ふるい効果」と呼び、タンパク質を個々の大きさに応じて分離する手段として利用されている。

一般には、タンパク質を予めドデシル硫酸ナトリウム(Sodium Dodecyl Sulphate; SDS)という界面活性剤で処理し、タンパク質を棒状の分子にしてから、電気泳動分析に供する(Laemmli法⁹)。SDSはほとんどのタンパク質に同じ割合で結合するため、この処理によってタンパク質のもともとの電荷は覆われ、SDSで処理したタンパク質は皆同じ割合の電荷、同じような形を持つ。したがって、タンパク質をSDSを含むゲルで電気泳動すると、タンパク質は分子量によって分離される。タンパク質の相対的移動度は分子量の対数に逆比例するので、分子量既知のマーカータンパク質とともに電気泳動して、目的

タンパク質の分子量を推定することができる。また、目的外のタンパク質についても、個々の存在量と分子量を一枚のゲル上で同時に測定することができる。

同法の長所としては、

- ・サンプルが微量で良い
- ・同時に多数のサンプルを分析できる

といった点が、短所としては、

- ・分解能がそれほど高くない

といった点が挙げられる。分解能や定量性はそれほど高くないが、簡易的な純度測定を行うのに非常に有用である。

3.1.2 クロマトグラフィー分析

クロマトグラフィー分析は、タンパク質試料と固定相物質との様々な相互作用を利用して、目的のタンパク質と他のタンパク質を分離する方法である。タンパク質が抗体あるいは酵素に代表されるような生理作用を示すには、高次構造を保持していることが大事であり、高次構造が破壊されると、その生理活性は失われる。このような状況をタンパク質の変性と呼び、高次構造が破壊されたタンパク質をポリペプチドと呼ぶ。クロマトグラフィー分析の分離モードは、高次構造を保持したままタンパク質を分離したいのか、あるいは高次構造は破壊されていてもポリペプチドとして分離されれば良いのか、によって大きく2つに分けられる。一般に前者の要求を満たすには、分離モードはゲルろ過クロマトグラフィー¹⁰が最適である。一方で、後者の場合には、高次構造の保持を考慮する必要はないわけであるから、溶解度が許す限り様々な取り扱いが可能である。分離モードとしては、逆相クロマトグラフィー¹⁰が汎用されている。以下、各々の分離モードについて簡単に記す。

ゲルろ過クロマトグラフィーは、タンパク質の分子サイズ、すなわち大きさと形状の差を利用して分離する方法で、原理的には充填剤粒子の細孔にタンパク質がどの程度拡散できるかによって、溶出される時間が異なってくる。大きな分子サイズのタンパク質は充填剤の細孔内に拡散できないため早く、小さな分子のタンパク質は充填剤の細孔内に十分に拡散するため、遅く溶出されることになる。溶離液は目的のタンパク質の高次構造が安定的に保たれるように、穏和なイオン強度、pH、有機溶媒濃度を検討し、アイソクラティックモードで分離することが多い。

本法の長所としては、

- ・タンパク質を、抗体あるいは酵素に代表されるような、生理活性をもった状態で分離できる

といった点が、一方短所としては、

- ・分離度が悪い

といったことが挙げられる。特に分離度に関しては、2種のタンパク質間での分子量に数十万以上の差がなければ分離は難しい。

逆相クロマトグラフィーは、固定相の表面にリガンドとして、疎水基（アルキル基、フェニル基など）を化学的に結合させたシリカや合成ポリマーを利用し、含水有機溶媒で試料を溶出させる方法である。試料と固定相との結合は主として疎水的相互作用であり、そこに疎水性の強い溶媒を加えて、疎水度の小さい順に溶出を行う分析法である。溶離液としては、一般的にアセトニトリルやイソプロパノールなどの有機溶媒を用いる。また、固定相とタンパク質とのイオンの相互作用をなくすために、イオン対試薬であるトリフルオロ酢酸（Trifluoroacetic Acid; TFA）を加え、グラディエントモードで分離することが多い。

本法の長所としては、

- ・分離度が非常に高い
- ・定量再現性が高い
- ・微量、大量に関わらず、分離が短時間でできる
- ・溶離液として塩を含まない溶媒が使用できる

といった点が、一方短所としては、

- ・タンパク質が変性してしまう

といった点が挙げられる。逆相クロマトグラフィーは、各種クロマトグラフィーの中で最も高い分解能を持っており、現在タンパク質化学の領域では必須の技術の一つになっている。

クロマトグラフィー分析は、他の純度評価法と比較した場合の長所として、

- ・再現性が高い
- ・分離モードや検出器の種類についてバリエーションが多い

といった点が、一方短所として、

- ・比較的多くのサンプルを必要とする
- ・同時に多くのサンプルを扱えない

といった点が挙げられる。他の方法に比べて再現性が高いため、定量的な純度分析に利用されることが多い。

3.1.3 質量分析法

質量分析法は、試料をイオン化し、生じたイオン分子を真空中で飛行あるいは運動させ、その質量/電荷比（ m/z ）に基づいて分離、検出する方法である。分子固有の質量あるいは電荷のわずかな違いにより分離を行うことが出来るため、分解能が非常に高いのが特徴である。

質量分析計は以下の3つの部分から構成されている。

- 1) イオン源：試料をイオン化し、生成したイオンを質量分析部へ加速させる
- 2) 質量分析部：イオンを m/z に基づいて分離する
- 3) イオン検出部： m/z により分離されたイオンの検出

各々の部分について、原理の違う様々な分析装置が存在するが、タンパク質を試料とした場合、イオン源としてはMALDI（matrix-assisted laser desorption/ionization, マトリックス支援レーザー脱離イオン化法）¹¹⁾を、質量分析部としてはTOF-MS(time-of-flight mass spectrometry, 飛行時間型質量分析法)¹¹⁾を組み合わせ用いられることが多い。

MALDIは分子量数十万までのタンパク質やDNAなどの高分子物質を結晶マトリックスに包み込み、パルスレーザーを照射することにより、イオン化された分子を気体中に放出させる方法である（図1.1参照）。

他のイオン化法と比較した場合の長所としては、

- ・ほぼ一価のイオンだけが生成するので、マスペクトルの解析が容易である
- ・ソフトなイオン化なので、測定中の試料分子の断片化が起こりにくい

といった点が、一方短所としては、

- ・予めマトリックスとの結晶固体を作成しなければならず、クロマトグラフィーとの接続が出来ない
- ・イオン化の条件検討が個別に必要である

といった点が挙げられる。

TOF-MSとは、イオン化された試料を電場によって加速、一定距離を飛行させ、その飛行時間を測定することで試料の分子量を求める、といった原理を持つ装置である（図1.2参照）。

同法の他の質量分析部と比較した場合の長所としては、

- ・原理上測定できる質量に制限がない
- ・高感度である
- ・測定時間が短い
- ・軽量である

といった点が挙げられる。唯一、タンパク質などの高分子物質を本来の大きさのまま測定できる方法であるといえる。

質量分析法は、他の純度評価法と比較した場合の長所として、

- ・分解能が高い
- ・高感度である
- ・測定時間が短い

といった点が、一方短所として、

- ・装置が高価である

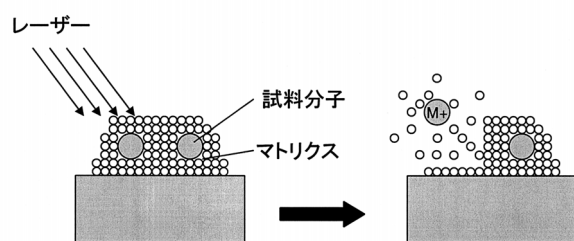
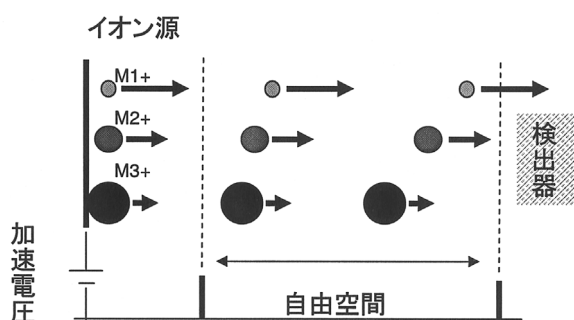


図1.1 MALDIによるイオン化の概略



M1, M2, M3の電荷数は同じ、質量はM1<M2<M3

図1.2 TOFによる質量分析の概略

・定量再現性が余り良くない
 といった点が挙げられる。定性的な純度評価においては最も分解能が高い方法であるため、目的タンパク質がアイソザイムや非タンパク質性の不純物を含んでいないかの最終確認に使用されることが多い。

3.1.4 各CRMIにおける純度評価法

BCR-457 (IRMM)：電気泳動分析(3.1.1)のみでの解析を行っている。同タンパク質は糖鎖付加型タンパク質⁵⁾であるため、還元剤存在下・非存在下での泳動や等電点電気泳動など、泳動条件をいくつか変化させ、糖鎖修飾の度合いについて解析を行っている。

BCR-486 (IRMM)：電気泳動分析(3.1.1)のみでの解析を行っている。同タンパク質もまた糖鎖付加型タンパク質であるため、還元剤非存在下での泳動や等電点電気泳動など、泳動条件をいくつか変化させて電気泳動分析を行っている。

BCR-613 (IRMM)：電気泳動分析(3.1.1)、クロマトグラフィー分析(3.1.2)、質量分析(3.1.3)と、3つの方法により解析を行っている。同タンパク質もまた糖鎖付加型タンパク質である。電気泳動分析は還元剤存在下での泳動と等電点電気泳動を行っている。クロマトグラフィー分析は、アセトニトリルのグラジエント勾配を変えた2種類

のパターンで分解能を変えた逆相HPLCを行っている。質量分析はMALDI-TOF-MSにより、糖鎖修飾構造の違う5種類のアイソフォームの検出を行っている。

SRM-927c (NIST)：クロマトグラフィー分析(3.1.2)、質量分析(3.1.3)を行っている。クロマトグラフィーは逆相HPLCを、質量分析はESI-MS (Electrospray Ionization-Mass Spectrometry, エレクトロスプレーイオン化-質量分析法)により分子量の違う2種類の分子の検出を行っている。

3.2 タンパク質の同定

タンパク質の同定では、精製されたタンパク質が目的のタンパク質であるかどうか、あるいは不純物が何であるかを評価する。主な方法としては3.2.1ウェスタンブロットティング、3.2.2アミノ酸配列決定法、3.2.3質量分析法がある。

3.2.1 ウェスタンブロットティング

ウェスタンブロットティング¹²⁾は抗原である目的タンパク質に対し、それを認識する抗体が特異的に反応することを利用した物質の同定法である。抗体とはそもそも、生体内に病原菌やウイルスなどが感染した際に、それらを異物として認識・結合し、免疫機構を活性化させる役割を担った分子であるが、現在は、精製したタンパク質をマウスやウサギなどの小動物に免疫することで、任意のタンパク質を特異的に認識する抗体が得られる。一般に分析頻度の高いタンパク質については、市販品の抗体も多数存在する。

同法での分析の際には、まず電気泳動分析により、目的のタンパク質が他のタンパク質と分離されている必要があるが、電気泳動法の詳細については3.1.1に記した通りである。電気泳動分析後のタンパク質試料をニトロセルロース膜に転写、固定後、抗体溶液を加えてメンブレン上で抗原抗体反応を行わせると、目的のタンパク質とのみ抗体が結合し、検出されることになる(図2参照)。

同法の長所としては、

- ・試料に目的外のタンパク質が存在していても特異的な検出が可能
- ・感度が高い

といった点が、一方短所としては、

- ・抗体を必要とする

といった点が挙げられる。抗体によっては、目的のタンパク質以外のものとも非特異的に反応してしまうことがあるので、予め抗体の評価をきちんと行う必要はあるが、それさえクリアできれば非常に手軽に行える分析方法である。

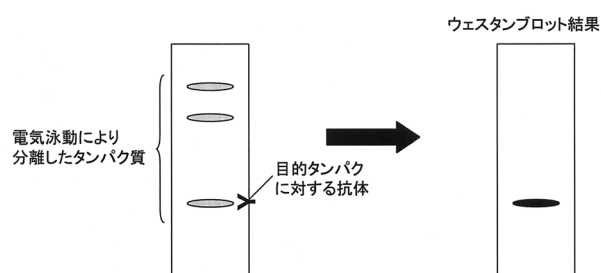


図2 ウェスタンブロット反応の概略

3.2.2 アミノ酸配列決定法

タンパク質は20種類のアミノ酸が任意に連なったポリペプチドであり、タンパク質は各々固有のアミノ酸配列を有している。そのため、アミノ酸配列決定は目的のタンパク質を同定するのにも非常に有効である。アミノ酸配列決定法の中で最も一般的なものに、エドマン分析法¹³⁾がある。同法は以下の3つのステップから構成されている(図3参照)。

- 1) PITC (Phenylisothio-cyanate, フェニルイソチオシアネート) とタンパク質の ϵ -アミノ基が反応する過程 (カップリング反応)
- 2) カップリング反応で生成した2-アミノ, 5-チアゾリン-アミノ酸誘導体 (PTZアミノ酸) を酸で加水分解する過程 (クリーベッジ反応)
- 3) PTZアミノ酸を安定で同定に適したPTHアミノ酸に変換する過程 (コンバージョン反応)

生成されたPTHアミノ酸は逆相HPLC等で分析するが、その溶出位置とピークの大きさを各種PTHアミノ酸標準品の溶出パターンと比較することにより、切断されたアミノ酸の種類と量が同定される。3)クリーベッジ反応後のタンパク質はN末端アミノ酸が1残基短くなったものとなり、以後、1)~3)の反応を繰り返すことで、N末端からの配列が順次解析されていくことになる。現在では種々の改良が行われ、HPLCによるPTHアミノ酸の検出操作までを全自動化した装置が開発されている。

同法の長所としては、

- ・非常に正確である
 - ・配列未知のタンパク質のアミノ酸配列が決定できる
- という点が、短所としては、
- ・N末端が修飾等によりブロックされていると分析が難しい

という点が挙げられる。最終的な同定を行う場合には、一番信頼性が高い分析法である。

3.2.3 質量分析法

近年のゲノムプロジェクトの進展に伴い、ほぼすべてのDNA塩基配列が決定されている生物種が数多く存在している¹⁴⁾。そのような生物種については、質量分析の測定結果とデータベースとを照合することによるタンパク質の同定が可能である。

質量分析法によるタンパク質の同定においては代表的なものにPMF (peptide mass finger printing, ペプチドマスマフィンガープリンティング)^{15, 16)}法がある。PMF法においては、まずタンパク質をトリプシンなどのペプチダーゼにより消化する。ペプチダーゼの多くは厳密な基質特異性を有し、それによって生成したペプチドは固有の断片化様式(表3参照)、および各々のアミノ酸残基組成に応じた固有の質量値をもつことになる。一方で、データベース上では、あるタンパク質について、あるペプチダーゼで消化を行った場合に生成すべきペプチドの各々の理論上の質量値が登録されている。断片化ペプチドの実測の質量値と、登録されているタンパク質の断片の理論分子量の全てを照合すれば、目的のタンパク質がかなりの高確率で同定されることになる。

同法の長所としては、

- ・サンプルが微量でよい
- ・測定が短時間である

といった点が、一方短所としては、

- ・データベースに登録されていないタンパク質の同定は出来ない
- ・装置が高価である

といった点が挙げられる。近年、プロテオーム解析が可能になったのも、同法の発展の寄与するところが大きい。今後、データベースへの登録量が増えるにつれ、益々、タンパク質のスタンダードな同定法として利用されていくことになると思われる。

3.2.4 各CRMにおける同定法

BCR-457 (IRMM) : ウェスタンブロット (3.2.1), アミノ酸組成分析 (3.5.1) による同定を行っている。ウェスタンブロットは還元剤存在下でサンプルを電気泳動後、ポリクローナル抗体⁶⁾により目的タンパク質を検出している。アミノ酸組成分析においては、測定により得られた各アミノ酸のモル分率を、cDNA⁷⁾の配列から推測される理論値と比較している。

BCR-486 (IRMM) : ウェスタンブロット (3.2.1) による同定を行っている。ウェスタンブロットは還元剤存在下でサンプルを電気泳動後、5種類の市販抗体により目的タンパク質を検出している。

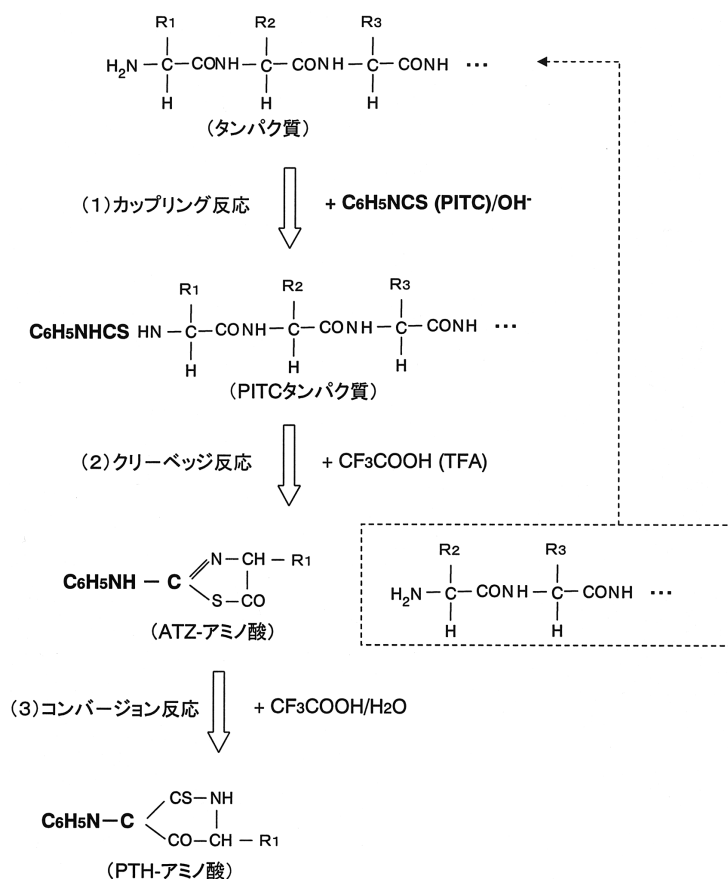


図3 エドマン分析における主な反応

表3 ペプチダーゼの切断特異性

酵素(エンドペプチダーゼ)	酵素源	特異性	備考
トリプシン	ウシ膵臓	Rn-1=Arg, Lys; Rn≠Pro	特異性は厳密
キモトリプシン	ウシ膵臓	Rn-1=Phe, Trp, Tyr; Rn≠Pro	次の残基も切るが遅い
エラスターゼ	ウシ膵臓	Rn-1=Ala, Gly, Ser, Val; Rn≠Pro	
サーモライシン	<i>Bacillus thermoproteolyticus</i>	Rn=Ile, Met, Phe, Trp, Tyr, Val; Rn≠Pro	耐熱性、Rn=Ala, Asp, His, Thrにも作用する時あり
ペプシン	ウシ胃粘膜	Rn=Leu, Phe, Trp, Tyr; Rn≠Pro	特異性は低く何でも切る。最適pH=2
エンドペプチダーゼV8	<i>Staphylococcus aureus</i>	Rn=Glu	
酵素(エキソペプチダーゼ)	酵素源	特異性	備考
カルボキシペプチダーゼA	ウシ膵臓	Rn=Arg, Lys, Pro; Rn-1≠Pro	
カルボキシペプチダーゼB	ウシ膵臓	Rn=Arg, Lys; Rn-1≠Pro	
カルボキシペプチダーゼC	ミカンの葉	C末端全ての残基	最適pH=3.5
カルボキシペプチダーゼY	酵母	C末端全ての残基	Rn=Glyのときは遅い
ロイシンアミノペプチダーゼ	ブタ腎臓	Rn≠Pro	
アミノペプチダーゼM	ブタ腎臓	N末端全ての残基	

* R₁=N末端残基; R_n=C末端残基

BCR-613 (IRMM) : アミノ酸配列決定 (3.2.2), アミノ酸組成分析(3.5.1)による同定を行っている。アミノ酸配列決定においてはN末端配列の他に、ペプチダーゼ消化により得られた分子内配列についても2箇所について分析を行っている。最終的に得られたペプチド配列の分子量の理論値は、ペプチダーゼ分解産物の電気泳動分析による分子量の測定値とも比較を行い、一致することを確認している。アミノ酸組成分析においては、測定により得られた各アミノ酸のモル分子数を、cDNAの配列から推測される理論値と比較している。

SRM-927c (NIST) : 質量分析 (3.1.3) における分子量の測定値が理論値と一致することを確認し、目的タンパク質の同定を行っている。

3.3 均質性評価

タンパク質標準物質は一度にある程度まとまった量を作製し、それらを等量ずつアンプルに小分けにする。均質性評価は、各アンプルに小分けにした標準物質の「量」に関してアンプル間差がないかどうかを評価する。特定の起源の特定のタンパク質を、多数個、同時に測定する必要があるため、評価の方法としては簡便性が高ければつきの少ないものが好まれる。また本評価においては、特に得られた定量値そのものというよりも、そのばらつきの度合いを測定したいとの理由から、何か便宜的な物質を用いて検量線作成を行い定量を行っても良い。代表的なものに、3.3.1比色定量法、3.3.2吸光度測定法、3.3.3標識抗体法がある。

3.3.1 比色定量法

本法は、ある色素がタンパク質中のあるアミノ酸と特異的に結合する性質を利用し、タンパク質-色素複合体が固有に示す吸光度の変化から定量を行う方法である。タンパク質に結合させる色素の違いによって、いくつかの方法が存在するが、その中で最も汎用されている方法にLowry法¹⁷⁾、BCA法¹⁸⁾、Bradford¹⁹⁾法がある。Lowry法は、フェノール試薬(リンモリブデン酸、リンタングステン酸混液)とタンパク質中の芳香族アミノ酸(チロシン、トリプトファン)とが結合する際の吸光度の変化($\lambda_{\max}=750\text{ nm}$)を測定する。BCA法は Cu^{2+} が強アルカリ性の条件下でポリペプチドと錯塩を形成して呈色したものを吸光計($\lambda_{\max}=562\text{ nm}$)により測定する。Bradford法は、色素Coomassie Brilliant Blue G-250 (CBB)が、タンパク質のアルギニン残基および芳香族アミノ酸の側鎖と結合する際の吸光度の変化($\lambda_{\max}=595\text{ nm}$)を測定する。

これらの方法はいずれも共通の長所として、

- 操作が非常に簡便であり、多数個の試料を同時に測定できる
- 感度が高い
- 反応が早い

といった点が、一方短所としては、

- 測定時の妨害物質(還元剤、EDTAなど)が多い
- といった点が挙げられる。生化学の分野では最も多用されている方法であり、最近は上記の短所を克服した各種市販試薬も多い。

3.3.2 吸光度測定法

本法は、ある一定波長の紫外光を試料に与えると、物質濃度に比例して吸光度が変化する(Lambert-Beerの法則^{*8)})ことをタンパク質濃度測定に応用した方法で、紫外光の波長の違いにより測定対象が若干変わる。

$\lambda_{\max}=280\text{ nm}$ で測定する場合には、タンパク質中の芳香族アミノ酸(チロシン、トリプトファン)の吸光度を測定する²⁰⁾。一方、 $\lambda_{\max}=215-225\text{ nm}$ で測定する場合には、ペプチド結合の吸光度を測定する²⁰⁾。測定感度としては、後者の方が数倍良いが、 $\lambda_{\max}=215-225\text{ nm}$ の波長域に吸光を示す溶媒も多いので、サンプルによって適当な波長を選択する。

これらの方法はいずれも共通の長所として、

- 操作は試料を希釈後測定するだけなので非常に簡便で、多数個の試料を同時に測定できる
- 試料の回収が出来る

といった点が、一方短所としては、

- 感度は、必ずしも良くない
- 紫外部に吸光を示す共存物質が存在する時は、それらを除くための前処理操作が必要となる

といった点が挙げられる。測定が迅速に終わるため、カラムクロマトグラフィーで汎用されている方法である。

3.3.3 標識抗体法

本法²¹⁾は、抗原抗体反応により目的タンパク質と抗体が特異的に反応生成した複合体の量から、目的タンパク質の定量を行う方法である。抗体もしくは抗原タンパク質は予め標識物質により標識されているため、複合体を分離精製後、標識物質由来の活性もしくは光強度を測定すれば定量が行える。測定原理(競合法、非競合法)および標識物質(放射性同位体、蛍光物質、酵素など)によって、RIA(放射性同位体標識競合法)、IRMA(放射性同位体標識非競合法)、EIA(酵素標識競合法)、ELISA(酵素標識非競合法)など多くの測定方法が開発されている。

競合法の場合、標識抗原と非標識抗原が抗体に対して、競合的に結合することを利用する。つまり、一定量の抗体に対し、一定量の標識抗原と非標識抗原を反応させると、標識抗原と抗体との結合を非標識抗原が競合阻害する。反応後、抗原抗体複合体 (Bound) と未結合抗原 (Free) の分離 (B/F分離) を行い、標識抗原の遊離型または結合型の量を測定し、試料中の抗原量を算出する。

非競合法の場合、汎用法としてサンドイッチ法があり、予め固相に固定した十分量の一次抗体に対して目的のタンパク質抗原が結合し、一次抗体に結合した抗原のみを標識した二次抗体と反応させる。共通のタンパク質上の別々のエピトープ⁹部位を認識する抗体でサンドイッチすることにより、特異性の向上を図ることができる。

これらの方法はいずれも共通の長所として、

- ・反応が特異的である
- ・抗体を上手く選べば、立体構造についての情報も得られる
- ・感度が高い

といった点が、一方短所としては、

- ・抗体を必要とする
- ・操作時間が長い

といった点が挙げられる。共存する妨害物質の影響を受けずに、目的のタンパク質のみを検出できることから、臨床の現場においては最も汎用されている測定法である。

3.3.4 各CRMにおける均質性評価法

BCR-457 (IRMM) : 比色定量法(3.3.1)と酵素標識法(3.3.3)による均質性評価を行っている。前者においては、凍結乾燥標品20本のアンブルについて同様に滅菌水で溶解後、各々のアンブルにつき測定を行っている。測定に関しては、市販のBovine serum albuminを用いて検量線を作成し、Lowry法による定量を行っている。一方、後者においては、こちらも20本のアンブルについて同様に滅菌水に希釈後、各々のアンブルにつき測定を行っている。測定に関しては、目的タンパク質の精製標品を用いて検量線を作成し、RIA法による定量を行っている。

BCR-486 (IRMM) : 吸光度測定法(3.3.2)による均質性評価を行っている。約30本のアンブルについて同様に緩衝液で溶解後、各々のアンブルにつき $\lambda_{\max}=280 \text{ nm}$ での吸光度を測定している。

BCR-613 (IRMM) : 均質性評価の詳細は不明である。

SRM-927c (NIST) : 均質性評価の詳細は不明である。

3.4 安定性評価

安定性評価はタンパク質標準物質を長期的に保存した

場合の安定性を評価する。保存状態の悪いタンパク質はすぐに分解したり、分解せずとも立体構造が壊れて抗原抗体反応が起こらなくなり臨床検査に使用出来なくなったりするため、同評価は非常に重要である。概ね生化学的どの程度安定かをみる生化学的安定性評価と、抗原抗体反応を起こすのに十分な立体構造をとっているかをみる免疫学的安定性評価に分けられる。代表的な方法として、3.4.1電気泳動分析、3.4.2クロマトグラフィー分析、3.4.3標識抗体法がある。

3.4.1 電気泳動分析

生化学的安定性評価の代表的な手法として汎用される。原理の詳細については、「3.1.1電気泳動分析」に同じ。

3.4.2 クロマトグラフィー分析

電気泳動分析と同じく、生化学的安定性評価の代表的な手法として汎用される。原理の詳細については、「3.1.2クロマトグラフィー分析」に同じ。

3.4.3 標識抗体法

免疫学的安定性評価の代表的な手法として汎用される。原理の詳細については、「3.3.3標識抗体法」に同じ。

3.4.4 各CRMにおける安定性評価法

BCR-457 (IRMM) : 標識抗体法(3.4.3)による安定性評価を行っている。凍結乾燥品をある一定温度 (-70°C, +4°C, +20°C, +37°C, +45°C, +56°C) で、一定期間 (1, 3, 5, 9ヶ月) 保存した後、滅菌水で溶解したものについて測定を行い、-70°Cで同期間保存したサンプルに対する相対的な安定性を算出している。測定系に関してはRIA法と、抗体の違う2種類のIRMA法の、合計3種類の方法を採用している。また、同試験は1研究機関のみで行っているが、測定機関間差に関しては、予め別にデータを取っている。

BCR-486 (IRMM) : 標識抗体法(3.4.3)と吸光度測定法(3.3.2)による安定性評価を行っている。評価の内容としては、前者の場合、長期安定性試験について、後者の場合、凍結融解安定性試験について分析を行っている。長期安定性試験の場合、凍結乾燥品を一定温度 (-20°C, +4°C, +20°C, +37°C, +45°C, +56°C) で、一定期間 (1, 2, 3, 4, 5, 6ヶ月) 保存した後、滅菌水で溶解したものについて測定を行い、-20°Cで同期間保存したサンプルに対する相対的な安定性を算出している。同試験においては、3つの研究機関が参加し、各々RIA法、IRMA法、ELISA法といった別の測定原理や抗体を用いた測定

・加水分解条件の違いによる測定値のばらつきが大きいといった点が挙げられる。同法の推奨測定範囲は最も感度の高いもので0.5~5 μg/タンパク質であり、通常扱う濃度レベルのタンパク質溶液を直接濃度決定することは、原理的には可能である。

3.5.2 窒素含量分析

窒素は、高分子有機化合物の中で、炭水化物や糖には含まれず、タンパク質に固有に含まれる原子であることから、タンパク質の定量に用いられる。簡易的にはタンパク質の窒素含量を16%として計算する場合もあるが、タンパク質の分子式が正確にわかっている場合は、1分子に含まれる窒素含量を正確に求めることが出来る。最終的に得られた窒素濃度に理論的窒素含量の逆数を掛けることで、タンパク質の定量を行うことが出来る。

同法の長所としては、

- ・分析時間が短い
- ・測定値のばらつきが小さい

といった点が、一方短所としては、

- ・タンパク質を予め（バッファー等も含めての）他の窒素化合物から分離する必要がある

といった点が挙げられる。

窒素含量分析は原理の違いにより(1)ケルダール法²⁵⁾、(2)デュマ法²⁶⁾、(3)燃焼式発光法²⁷⁾の3つに分けることが出来る。

(1) ケルダール法

本法は、試料を熱濃硫酸により分解してアンモニアとし、NH₄⁺の形で滴定により定量する方法である。分解反応によるアンモニアの生成機作は、次のように考えられている。

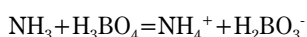
- 1) 硫酸は有機物をまず脱水し、ついで炭化させてCを生成する。
- 2) このCは硫酸を還元してSO₂を生じさせ、CはCO₂になる。
- 3) SO₂はNを還元してNH₃を生じ、SO₂はSO₃になる。
- 4) 有機物の分解過程で生じるHは、NH₃の生成を大いに促進する。

この場合、アンモニアは硫酸アンモニウムの形で安定化され、反応途中に生ずる水および無水硫酸は、高温のために揮発し去る。分解促進剤である硫酸カリウムは、次式にしたがって、まず硫酸を分解する。



この結果、K₂SO₄の濃度が次第に高まり、沸点は上昇し、残存する有機物に対する作用が益々強くなる。また、特に分解促進のために、HgO、CuSO₄またはSeOCl₂などが触媒として微量添加される。

生成されたアンモニアの定量法としては、一次標準測定法²⁸⁾である滴定法を用いる。得られた分解液を強アルカリ性として、水蒸気蒸留法によってアンモニアを蒸留し、ホウ酸液に捕集後、アンモニアとホウ酸の反応で生じたホウ酸アンモニウムを濃度既知の酸で滴定する。この反応は次式により表すことが出来る。



滴定用の酸として、化学量論的に正確な値付けしたものをを用いれば、原理的にはSIトレーサブルな測定が可能となる。

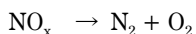
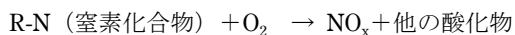
同法は窒素分析の公定法として認定されているが、短所としては、

- ・サンプルの調製に時間がかかる
- ・有害、あるいは危険な溶媒（硫酸、水酸化ナトリウムなど）を使用しなければならない
- ・検出感が悪い

などの点が挙げられる。同法の推奨測定範囲は5mg~10mg/タンパク質（固体）であり、通常扱う濃度レベルのタンパク質溶液を直接濃度決定することは難しい。

(2) デュマ法

本法は、試料を燃焼させて得られたN₂ガスをガスクロマトグラフィーにより定量する方法である。まず、試料に対して適切な酸素供給量を制御し、高温で試料を完全燃焼させる。燃焼によって生成したガスはキャリアガス（ヘリウム）によって還元管内に送られ、NO_xはN₂に還元されるとともに、過剰の酸素は吸収される。以上の反応は次式により表すことが出来る。



生成ガスはさらにガスクロマトグラフィーにより精製され、N₂はキャリアガスにより熱伝導度検出器（TCD）に送り込まれ、予め適当な標準物質を用いて作成した検量線を用いて、試料中の窒素の定量が行われる（図5.1参照）。標準物質として化学量論的に正確な値付けしたものをを用いれば、原理的にはSIトレーサブルな測定が可能となる。

ケルダール法と比較した場合の同法の長所としては、

- ・非常に短時間での分析が可能
- ・有害な溶媒・触媒によるサンプルの前処理を必要とし

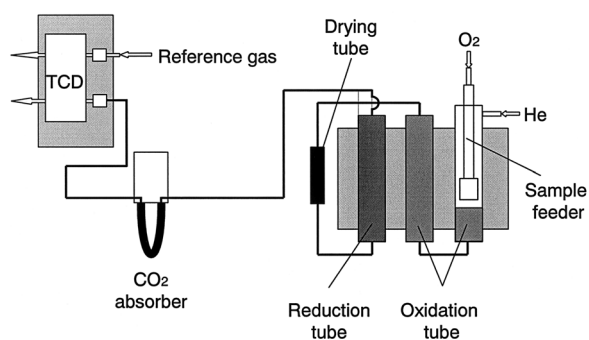


図5.1 デュマ法の測定装置の概要

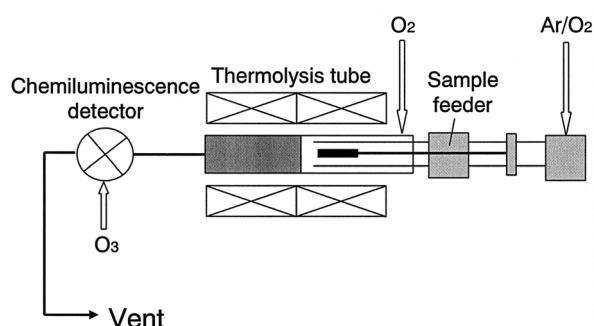


図5.2 燃焼式発光法の測定装置の概要

ない

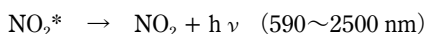
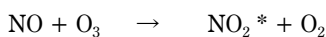
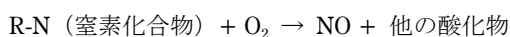
といった点が、一方短所としては、

- ・検出感度が余り良くない
- ・装置が高価である

などが挙げられる。同法の推奨測定範囲は1 mg～1 g/タンパク質（固体）であり、通常扱う濃度レベルのタンパク質溶液を直接濃度決定することは難しい。

(3) 燃焼式発光法

酸素ガスとアルゴンガスをキャリアガスとし、高温に加熱された反応炉に試料ポートを導入することにより、試料中の窒素化合物は酸化分解されてNOに変化する。これを除湿後、酸素ガスから発生させたO₃ガスと反応させると、酸化反応が起こり励起状態のNO₂が産生する。励起状態のNO₂が基底状態に戻る際、590～2500 nmの発光をする。以上の一連の反応は次式により表すことができる。



この光強度は広い範囲でNO濃度に比例するため、この光を光電子増倍管で受光、増幅し、予め適当な標準物質

により作成した検量線を用いて、試料中の窒素の定量を行うことができる（図5.2参照）。標準物質として化学量論的に正確な値付けしたものを利用すれば、原理的にはSIトレーサブルな測定が可能となる。

ケルダール法と比較した場合の同法の長所としては、

- ・タンパク質溶液を直接測定できる
- ・非常に短時間での分析が可能
- ・有害な溶媒・触媒によるサンプルの前処理を必要としない
- ・検出感度が高い

といった点が、一方短所としては、

- ・装置が高価である

といった点が挙げられる。同法の推奨測定範囲は0.2 μg～10 μg/タンパク質であり、通常扱う濃度レベルのタンパク質溶液を直接濃度決定することは、原理的には可能である。同法はこれまで主に、石油などの揮発性溶媒中の微量窒素化合物を計るのに使用されてきたという経緯があるため、タンパク質溶液においても再現性良く濃度測定出来るかどうかについては、実験的に検証を重ねていく必要がある。

3.5.3 乾燥質量秤量法

どのようなタンパク質でも、純粋なものを完全に乾燥して質量を測れば、絶対的な値が得られ、測定値そのものがSI単位を有することになる。

乾燥質量を秤量する前に、まず目的のタンパク質を他のタンパク質成分を含まないよう極めて高度に精製し、凍結乾燥により、粉末状にした後天秤を用いて秤量する。1 μgの感度の天秤を用いて0.1～0.2 %の誤差で定量するには3～5 mgの試料を要する。タンパク質試料の含む塩成分や結合水量は、各タイオンクロマトグラフィー法、カールフィッシャー法により正確に測定し、先の秤量値より差し引くことで、タンパク質の定量値とする。

同法は長所として、

- ・測定原理が非常に基本的かつシンプルである
- ・最終的に定量したタンパク質は非常に安定的な形状で保存可能

といった点が、一方短所としては、

- ・予め目的タンパク質の純度の評価を厳密に行わなければならない
- ・測定の感度が悪く、かなりのタンパク質量を必要とする
- ・時間と労力がかかる
- ・凍結乾燥時にタンパク質の高次構造が壊れてしまう可能性が高い

といった点が挙げられる。特にタンパク質の高次構造が壊れてしまった場合、臨床検査に用いることは難しくなる。凍結乾燥の条件についてはターゲットタンパク質の各々について、随時検討していく必要がある。

3.5.4 各CRMにおける定量法

BCR-457 (IRMM) : アミノ酸組成分析(3.5.1), 窒素含量分析(3.5.2), 比色定量法(3.3.1), 吸光度測定(3.3.2)による定量を行っている。アミノ酸組成分析においては、「各々のアミノ酸の測定モル数」に「各々のアミノ酸の分子量」を掛けたものの和をタンパク質の定量値としている（この場合、CysteinやTyrosineなどの分解を受けやすいアミノ酸の測定については考慮されないことになる）。同分析は3研究機関により個別に行い、それらの平均値を定量値としている。窒素含量分析においては、5研究機関でケルダール分析を行い、平均値を定量値としている。比色定量法、吸光度測定においてはいずれもウシ血清アルブミンを用いて検量線を作成し、定量を行っている。前者については、Lowry法により11研究機関が測定した結果の平均値、またBCA法により1研究機関が測定した結果を、各々定量値としている。後者においては、 $\lambda_{\max}=280$ nmでの吸光度測定を4研究機関が行い、定量値を算出している。

以上、複数の方法で定量を試みてはいるものの、最終的には、過去にLowry法と窒素含量分析の測定結果が良く一致したとの理由で、Lowry法で得られた定量値を認証値としている。

BCR-486 (IRMM) : アミノ酸組成分析(3.5.1)のみによる定量を行っている。同分析においては、回収率が最も高いアミノ酸のひとつであるAlanineの「測定モル数」に「タンパク質1分子あたりに含まれる理論モル数の逆数」と「タンパク質の分子量」を掛けたものをタンパク質の定量値としている。あるひとつのサンプルについてアミノ酸組成分析と吸光度測定を行い、モル吸光係数を求めたのち、吸光度測定を行うことで定量値の均質性の確認を行っている。同分析は3研究機関により行い、それらの平均値を認証値としている。

BCR-613 (IRMM) : CRM-486の方法と同様。

SRM-927c (NIST) : 比色定量法(3.3.1), カラムクロマトグラフィー分析(3.3.2)により、前ロット (CRM-927b) の標準物質を用いた検量値をもとに定量を行っている。前ロット (CRM-927b) 更には初期ロット (CRM-927a) がどのようにして定量を行ったかについては不明である。

4. まとめ

本稿では、まず国内外において、トレーサビリティ体系の高位に位置するタンパク質（純物質）一次標準物質の開発・供給が急務であることについて述べた。タンパク質標準物質の開発は、「純度」「物質の同定」「均質性」「安定性」「濃度の決定」の5つの項目について総合的評価を行う必要がある。そこで同物質の開発に必要な主な分析測定方法の原理と、これまでに供給されているCRMの開発方法の実状について紹介した。このことから、各計測標準機関が各々の項目に関してどのような測定方法を採用するかについて、試行錯誤を繰り返している状況にあることを明らかにした。また、濃度決定に関しては、SIトレーサブルな標準物質として認証されている（純物質系）一次タンパク質標準物質が存在しないということについても明らかにした。

そこで、NMIJでは、まずSIにトレーサブルな一次標準物質を作製するための化学量論的な値付け方法の確立と、それによる（純物質系）一次標準物質の作製を行っていきたいと考えている。以上を踏まえ、今後の作業方針をまとめる。

- 1) (2つ以上の) SIトレーサブルなタンパク質濃度決定法の確立
- 2) 標準物質開発に関する様々な分析法（濃度決定以外のもの）の確立
- 3) 上記1), 2)で確立した方法をもとにした、タンパク質標準物質の迅速な開発・供給（候補標準物質としては、C反応性タンパク質、アルブミンなどを検討中）

1)に関しては、本稿に述べた測定方法について、まずは一通り試験を行い、各々測定結果を比較検討した上で、最善の方法を選択していきたいと考えている。これまでに供給されたタンパク質一次標準物質について、2つ以上のSIトレーサブルなタンパク質定量法により値付けされたものは存在しないため、もしこれが実現すれば、認証値の信頼性を格段に上げることが出来るものと考えている。2)に関しても、最初の標準物質作製においては、一通りの試験を行い、必要十分な測定法を選択していければと考えている。特にCRM-486とCRM-613は多くの分析方法により評価を行っているようなので参考にしたい。3)に関しては、これまでは律速になっていた、原材料からの目的タンパク質の精製過程において、我が国が得意とする遺伝子組み換え技術を生かし、迅速で生化学的均一性の高い標準物質を供給していきたいと考えている。これに関しては、産業界との連携を十分に図る必要があると考えている。同時に供給体制についても、産業界や

臨床分野の関係者との連携により、適切なモデルを構築していればと考えている。

用語の説明

- *1 プロテオミクス: プロテオーム (proteome) + 学 (ics) で、「全タンパク質の研究」、すなわち一般的にはタンパク質の大規模研究を示す言葉として使用されている。プロテオーム (protein + ome) はゲノム (genome = gene + ome) に対する造語。
- *2 ファミリータンパク: 生物種、細胞種を問わず保存性が高く、分子間で相同性の高いドメイン領域を有するタンパク質群の総称。
- *3 アイソザイム: 同一個体中にあり、化学的には異なるにもかかわらず、同じ化学反応を触媒する酵素。遺伝子上の突然変異により、アミノ酸配列が一部変化して生成されることが多い。
- *4 スプライスバリエント: 真核生物のmRNAはゲノム上の何箇所かに分散されてコードされていることが多い。成熟したmRNAが生成される際には、ゲノム上の不必要な部分 (intron, インtron) が切り取られ、mRNAになる部分 (exon, エキソン) が張り合わされる。この生成過程をスプライシング (splicing) という。遺伝子によっては、このスプライシングの過程において、エキソンの一部を除いたものとそうでないもののいくつかを生成するものがあり、これら生成物のことをスプライスバリエント (splice variant) と呼ぶ。
- *5 糖鎖付加型タンパク質: 糖とタンパク質が共有結合して出来た複合タンパク質の一群の総称。特定の生物や器管に限られず、広く全ての細胞に存在する。糖タンパク質の糖鎖部分の役割については、種々論じられているが、特に細胞膜糖タンパク質は細胞相互の認識や細胞間情報伝達に働いていると推定されている。
- *6 ポリクローナル抗体: 通常、単一の抗原を動物に免疫した場合でも、抗原分子上の抗原決定基 (epitope, エピトープ) に対する親和性や特異性が違う様々な抗体が産生される。これら種々の抗体分子の集団をポリクローナル抗体といい、1種のエピトープしか認識しない抗体の集団をモノクローナル抗体という。
- *7 cDNA: 相補的DNA (complementary DNA) のこと。mRNAを鋳型として逆転写酵素により合成された一本鎖DNAであり、真核細胞遺伝子のクローニングの実験に良く用いられる。
- *8 Lambert-Beerの法則: 試料の入ったセルに光を当てた際、透過する光の強度をI, 試料の入っていない溶媒のみの入ったセルを透過した光の強度を I_0 とした場合、

$\log(I_0/I)$ を吸光度という。Lambert-Beerの法則は、セル長 l [cm], モル濃度 c [mol/l], モル吸光係数 ϵ [l/mol·cm] としたとき、「 $\log(I_0/I) = \epsilon \cdot c \cdot l$ 」の関係が成り立つことを示したもので、この式より、吸光度測定をもとに物質濃度を求めることが出来る。

- *9 エピトープ: 構造の明らかな抗原決定部位のこと。タンパク質分子あるいは細胞などは一般に多数のエピトープから成る。

参考文献

- 1) 計量標準総合センター, 三菱総合研究所編: 平成15年度バイオメディカル計量ニーズ報告書 (2004) 2-4.
- 2) Baudner, S. *et. al.* The certification of a matrix reference material for immunochemical measurement of 14 human serum proteins. CRM470. *Community Bureau of Reference, Commission of the European Communities, Brussels.* (1993) 1-172.
- 3) Reimer, C. B. *et. al.* Collaborative calibration of the U.S. national and the College of American Pathologists reference preparations for specific serum proteins. *American Journal of Clinical Pathology.* 77(1982) 12-19.
- 4) Rasmussen, U. F. and Colinet, E. Purification and certification of human thyroglobulin reference material. CRM457. *Community Bureau of Reference, European Commission, Brussels.* (1994) 1-79.
- 5) Profilics, C. and Colinet, E. The production and certification of a highly purified human alphafoetoprotein preparation as a reference material. CRM 486. *Community Bureau of Reference, European Commission, Brussels.* (1996) 1-75.
- 6) Parfait, R. *et. al.* Preparation of a certified prostate specific antigen (PSA) reference material. CRM613. *Community Bureau of Reference, European Commission, Brussels.* (1999) 1-57.
- 7) NIST Standard Reference Material, SRM927c https://srmors.nist.gov/view_detail.cfm?srms=927C
- 8) JCTLM database: Laboratory medicine and *in vitro* diagnostics: Database of higher order reference materials and reference measurement procedures. <http://www.bipm.fr/en/committees/jc/jctlm/jctlm-db/>
- 9) Laemmlis, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 227 (1970) 680-685.
- 10) 牧野圭祐: 生体高分子の高速液体クロマトグラフィ

- ー・タンパク質・拡散・多糖類のHPLC (廣川書店, 1992) 1-42.
- 11) 丹羽利充: ポストゲノム・マススペクトロメトリーー生化学のための生体高分子解析・化学フロンティア 10 (化学同人社, 2003) 3-18.
- 12) 竹縄忠臣: タンパク質実験ハンドブック (羊土社, 2004) 152-157.
- 13) Edman, P. and Begg G. A protein sequenator. *Eur J Biochem.* 1(1967) 80-91.
- 14) Blast (Basic Local Alignment Search Tool) Web site <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>
- 15) McCloskey, J. A. (Ed.), Mass spectrometry, *Methods Enzymol.* 193 (1990)351-538.
- 16) Villafranca, J. J. (Ed.), Current Research in Protein Chemistry: Techniques, Structure, and Function, *Academic Press* (1990)105-116.
- 17) Lowry, O. H. *et. al.* Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193(1)(1951) 265-275.
- 18) Smith, P. K. *et. al.* Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.* 150(1)(1985) 76-85.
- 19) Read, S.M., and Northcote, D.H., Minimization of variation in the response to different proteins of the Coomassie blue G dye-binding assay for protein. *Anal. Biochem.* 116(1) (1981) 53-64.
- 20) Webster, G.C., Comparison of direct spectrophotometric methods for the measurement of protein concentration. *Biochem. Biophys. Acta.* 207(2) (1970) 371-373.
- 21) 金井正光編: 臨床検査法提要 (金原出版, 2005) 56-64.
- 22) 厚生省医薬安全局審査管理課監修: 日本薬局方フォーラム7(2) (1998) 49-57.
- 23) 雁野重威, 若林清史, 八木芳子, 崎山文夫: タンパク質・ペプチドの高速液体クロマトグラフィー (II) (化学同人, 1990) 3-10.
- 24) S.A. Cohen, D.P. Michaud, *Anal. Biochem.* 211(2) (1993) 279-287.
- 25) Lynch, J.M. and Barbano, D.M. Kjeldahl nitrogen analysis as a reference method for protein determination in dairy products. *J. AOAC Int.* 82(6) (1999) 1389-1398.
- 26) Wiles, P.G. and Gray, I.K., Kissling, R.C., Routine analysis of proteins by Kjeldahl and Dumas methods: review and interlaboratory study using dairy products. *J. AOAC Int.* 81(3)(1998) 620-32.
- 27) Jimenez, A.M. and Navas, M.J. Chemiluminescence detection systems for the analysis of explosives. *J. Hazard Mater.* 106(1)(2004) 1-5.
- 28) (独) 製品評価技術基盤機構Web site, CCQMによって推薦されている標準物質の分析手法 (一次標準測定法) <https://www.rminfo.nite.go.jp/refer/ccqm.html/>