

尿中蓂酸測定キット (Sigma 社) の有用性

金沢医科大学泌尿器科学教室 (主任: 津川龍三教授)

鈴木孝治・百成智津枝

DETERMINATION OF URINARY OXALATE USING A SIGMA KIT

Koji Suzuki and Chizue Domiki

From the Department of Urology, Kanazawa Medical University

(Director: Prof. R. Tsugawa)

Many methods for measuring urinary oxalate have been reported. However, most of them are unsuitable for clinical use because of complexity and difficulty. We tested the value of the Sigma kit for measuring urinary oxalate. In principle, after extraction from urine, oxalate is oxidized to hydrogen peroxide in the presence of oxalate oxidase and the hydrogen peroxide reacts with 3-methyl-2 benzothiazolone hydrazone and 3-(dimethylamino) benzoic acid in the presence of peroxidase to yield an indamine dye with a maximum absorbance at 590 nm.

The linearity of the standard curve and reproducibility of this method were measured and good results were obtained. (Linearity: $r=0.998$, within assay: C.V.=1.5 to 5.0%, between assays: C.V.=4.0 to 11.6%). The correlation between this method and modified Hodgkinson and Williams' method or ionchromatographic method were 0.922 and 0.796, respectively. The overestimation effect of added ascorbic acid was completely inhibited by priorly added $FeCl_3$.

Key words: Urinary oxalate, Oxalate oxidase, Sigma kit, Ascorbic acid, Urolithiasis

はじめに

従来, 尿中蓂酸の測定は複雑で特殊な測定装置を要するものが多く日常臨床での測定には応用できないものが多かった。われわれも colorimetric method で測定してきたが¹⁾ 複雑であり, さらに塩酸や硫酸を使用することから測定操作を行なう者にとっては危険な面もあった。今回 Sigma 社の蓂酸測定キットを試用する機会があったので, その有用性につき検討した。また従来測定上問題となっている ascorbic acid の影響についても検討した。

対象および測定方法

金沢医科大学病院泌尿器科に入院した生体腎移植希望のペアのうち腎提供予定者15名, 腎機能良好で結石以外の患者10名および泌尿器科スタッフ5名の男子計30名を対象とした。病院常食摂取下に24時間蓄尿し, 水分は自由摂取とした。蓄尿瓶にはあらかじめ濃塩酸を10 ml 添加しておいた。

本キットの測定原理および手順: 尿1 ml を蓂酸と選択的に結合する吸着剤150 mg の入った抽出用バ

イアルに入れ5~6分振盪する。尿をすてたあと, 蒸留水2 ml で洗浄し捨てる。残った吸着剤に0.2 N NaOH 1 ml を加え蓂酸を溶出させる。ここに蓂酸化酵素を添加すると蓂酸は酸化され CO_2 と H_2O_2 になる。 H_2O_2 は peroxidase の存在により 3-methyl-2 benzothiazolone hydrazone (MBTH) と 3-(dimethylamino) benzoic acid (DMAB) に反応して indamine dye と H_2O になる。この色素は 590 nm の最大吸光度を持つことからブランクおよび標準蓂酸液の同時測定で定量が可能となる。

以上の方法で標準曲線, 再現性, 回収率, ascorbic acid の影響, 他の測定法との比較, などの諸点について検討した。

結 果

1) 標準曲線

蓂酸の各濃度における 590 nm での吸光度をみたものが Fig. 1 である。相関係数 0.998 で有意であった ($P<0.01$)。この際, 蓂酸として potassium oxalate monohydrate (MW: 184.23) を使用した。1.0231 g を 100 ml の蒸留水に溶解すると 5 mg/ml の無水蓂

酸 (MW: 90.03) を含有することになる。

2) 添加回収率

既知尿酸量 (25 mg/L) を尿検体に添加しその添加量の回収率を測定したものが Table 1 である。66.8 ~ 113.2% で平均 100.6% であった。

3) 再現性

Within assay と between assay につき検討した結果を Table 2 に示す。4種類の尿を同時に5回測定した結果、変動係数 (CV) は1.5%, 2.5%, 5.0%, 2.6% で平均2.9% であった。また4種類の尿を5日間測定した結果、CV は8.1%, 6.4%, 4.0%, 11.6

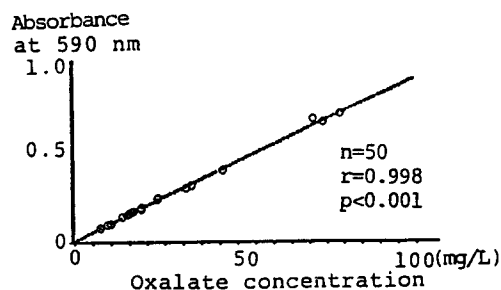


Fig. 1. Relation between the absorbance of the final color and oxalate concentration.

Table 1. Recovery of added oxalate to urine samples.

Sample No.	Oxalic acid in Control (mg/L)	Oxalic acid found after addition of oxalic acid (25 mg/L)	Recovery (%)
1	10.7	35.7	100
2	8.4	34.2	103.2
3	27.7	54.2	106.0
4	11.8	38.3	106.0
5	11.8	38.3	106.0
6	7.6	24.3	66.8
7	10.6	32.8	88.8
8	7.4	35.3	111.6
9	8.9	35.0	104.4
10	13.0	41.3	113.2

Mean 106.6
(SD=13.6)

% で平均 7.5% であった。

4) 他の測定法との比較

Modified Hodgkinson and Williams 法との相関をみたものが Fig. 2 である。相関係数は 0.833 で有意な相関をみた ($P < 0.01$)。しかし Hodgkinson 法の方が高値を示した。

日本ケミファ株式会社研究所に依頼して測定した尿酸排泄量 (イオンクロマトグラフィー法) との比較をしたものが Fig. 3 である。明らかな正の相関をみた ($P < 0.001$)。

5) Ascorbic acid 添加時の変化

Ascorbic acid (1 mM/L) を添加した時の尿酸測定の結果を Fig. 4 に示した。ascorbic acid 単独でも尿酸測定値に大きく影響するが、 FeCl_3 (final concentration 7.6 mM) を加えておくことによってその影響はほぼ除外することが可能であった。

6) 正常男子の尿中尿酸排泄量

腎機能良好な男子 30 名 (24 ~ 65 歳, 平均 32.5 歳) の

Table 2. Precision analysis of urinary oxalate.

	N.	Mean.	SD.	CV (%)
Within assay	5	20.5	0.3	1.5
	5	53.6	1.3	2.5
	5	18.4	1.4	5.0
	5	49.8	1.3	2.6
Between assay	5	20.7	1.7	8.1
	5	52.1	3.3	6.4
	5	19.1	2.2	11.6
	5	47.0	1.9	4.0

尿中尿酸排泄量は 8.6 ~ 54.5 mg/day. で平均 21.8 mg/day (SD: 14.1 mg/day) であった。

考 察

尿路結石症研究のみならず日常臨床の場で尿中尿酸測定は不可欠なものとなりつつあるが、その測定上の

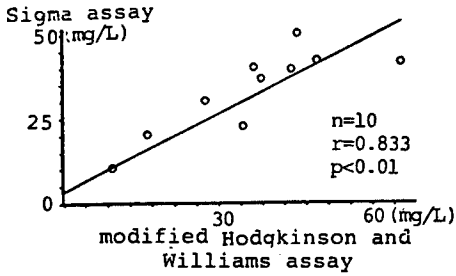


Fig. 2. Comparison of 24-hour urine oxalate excretion between Sigma method and the method of modified Hodgkinson and Williams.

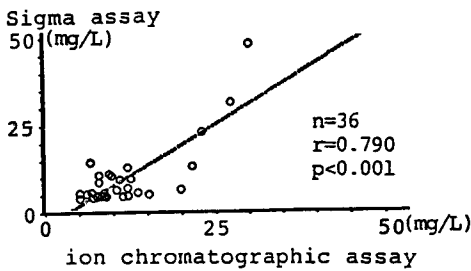


Fig. 3. Comparison of 24-hour urine oxalate excretion between Sigma method and the method of ion chromatography.

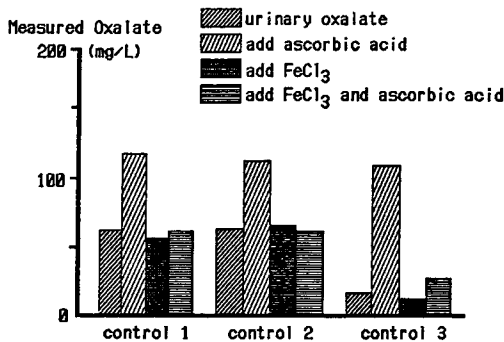


Fig. 4. Measured oxalate level of urinary sample with or without ascorbic acid and FeCl_3 .

理論上の複雑さ、手技上の複雑さからすべての病院においてルーチン検査の一つとしてはまだ採用されていないのが現状である。従来より種々の尿酸測定法が報告されている。① gas chromatography^{3,4)}, isotachopheresis^{5,6)}, ion-chromatography^{7,8)}, high performance liquid chromatography^{9~11)} のような特殊な装置を必要とするもの、② oxalate decarboxylase を使用するもの^{12~17)}、③ oxalate oxidase 法^{18~20)}、④ radioisotope 法^{21~23)}、⑤ colorimetric method^{24, 25)} などがあるが、日常臨床検体を扱う研

究室や検査室という立場から考えてみると①および④は測定装置が高値でありかつ操作が複雑である。②に関して、発生された CO_2 を測定する方法は簡単ではあるが熟練を要すること、発生 formate を測定する方法では2つの酵素を必要とし高価になることが問題としてあげられている²⁶⁾。また、⑤のうち一つの方法でわれわれも数年間測定しているが^{1,2)}、塩酸、硫酸などを使用するため白衣や衣類を損傷したり、火傷の経験も多い。さらに結果が判明するまで24時間必要とするなど臨床的には不都合である。③には今回検討した Sigma 社の尿酸測定キットが含まれるが、極めて簡便かつ安全で2時間で duplicate 30検体の測定が可能である。また前述したごとく精度が比較的良好であることからこれを利用し Rose ら²⁶⁾は automated immobilized oxalate oxidase 法を考案開発し実用化に成功している。少数の検体しか扱わない一般の施設では本キットのみで十分な信頼性を持つデータを得ることができる。

本法で直接尿酸と尿酸酸化酵素を反応させれば精度が良いはずであるが、Potezny ら¹⁹⁾はこれに関して、尿中には oxalate oxidase inhibitor が存在し加熱、イオン交換樹脂、セルロースカラムによっても除外できなかったと報告しており、このため本法では alumina に尿酸を吸着させるという前処理を必要としている。

本法で測定するに当たっての問題点として以前から ascorbic acid が測定値に大きく影響を与えることがあげられる。ascorbic acid は酸化され、dehydro-ascorbate から diketogluconate を経て尿酸に変化することが知られているが、この反応は尿が酸性の場合は進行せずアルカリ性の場合に著明に進行すること、排尿後の sample preparation の間にも進行することなどが判明している²⁷⁾。一方 FeCl_3 は ascorbic acid から尿酸への変化を阻止することが知られており diketogluconate と安定した複合体を形成するためとされている²⁸⁾。このため尿酸測定にあたっては著尿時から pH を 1 以下にしておくことが必要で、この操作は尿酸カルシウム結晶の溶解という意味でも重要なことである。また尿酸測定の48時間前からは尿酸のみならず ascorbic acid を多く含有する食品類の摂取は控えた方が良くとされている。これは特に夏季における果実類摂取の時や治療としての ascorbic acid 大量療法の際に問題となるが、通常の食事摂取下では尿中排泄量は 0.2 mM 以下と微量で²⁸⁾特に測定上の問題とはならないと考えられ、従って全検体に FeCl_3 を加える必要はないと思われる。われわれも常食摂取

下にて FeCl_3 添加の有無で検討したが有意な尿酸値の変動は認められなかった。しかし測定結果が高値の場合 FeCl_3 を添加して再測定をする必要がある。また尿を水で希釈して測定した場合も高値を示すことがあり、これは ascorbic acid が多く含有されていたためと考えられ、 FeCl_3 添加により解決できると Crider²⁹⁾ は報告している。Scurr ら³⁰⁾ は原法のまま測定すると 2~15% underestimate してしまうとし、pH を 1 以下にすることで改善したとしている。また彼らは、このように良好な結果となるのは偶然の結果で、alumina に吸着した尿酸をアルカリで抽出するさいに ascorbic acid も酸化をおこし尿酸の overestimate をひきおこす一方、alumina への吸着と抽出は不完全で 85~90% と underestimate してしまい、これらが相殺されてしまうため良好な結果を示すのではないかとしている。われわれは尿に FeCl_3 単独、 FeCl_3 と ascorbic acid の両者を添加した時の変化を実験したが、 FeCl_3 を加えておくことにより ascorbic acid の影響をほぼ完全に除去した。また Sigma の推奨する pH 3 以下ではなく pH 1 以下にし duplicate して測定した。それぞれの測定値にバラッキのあるときは FeCl_3 を添加して再測定した。

われわれは尿酸を modified Hodgkinson and Williams 法にて測定してきたが、精度は良好なものの塩酸、硫酸などを使用し危険であること、測定検体数が24時間で14検体と少数であることなどの欠点があった。今回検討した Sigma 社のキットとは有意な相関があること、さらにイオンクロマト法とも相関が認められたことより、今後同社の方法で測定していく予定である。

結 語

尿酸酸化酵素を利用した尿酸測定キット (Sigma 社) の有用性につき検討し次の結果を得た。

- 1) 本法における添加尿酸の回収率は 66.8% ~ 113.2%, 平均 110.6% であった。
- 2) 再現性は, within assay では 1.5~5.0%, between assay では 4.0~11.6% であった。
- 3) modified Hodgkinson and Williams 法および ion chromatography 法とよく相関しそれぞれの相関係数は 0.833, 0.796 であった。
- 4) 健康男子の尿酸排泄量は 8.6~54.5 mg/day で平均 21.8 mg/day (SD: 14.1 mg/day) であった。

文 献

- 1) 鈴木孝治：尿路結石症の研究—尿中尿酸測定法の検討。泌尿紀要 26：393~399, 1980
- 2) 鈴木孝治：尿路結石症の研究—尿酸カルシウム結石患者における結晶凝集の検討。日泌尿会誌 72：842~855, 1981
- 3) Wolthers BG and Hayer M: The determination of oxalic acid in plasma and urine by means of capillary gas chromatography. Clin Chim Acta 120: 87~102, 1982
- 4) Gorcia AD, Samperi R, Vinci G and D'Ascenzo G: Simple, reliable chromatographic measurement of oxalate in urine. Clin Chem 28: 1457~1460, 1982
- 5) Tschöpe W, Brenner R and Ritz E: Isotachopheresis for the determination of oxalate in unprocessed urine. J Chromatography 222: 41~52, 1981
- 6) Schwendtner N, Achilles W, Engelhardt W, Schwille PO and Sigel A: Determination of urinary oxalate by isotachopheresis. Practical improvement and clinical evaluation. J Clin Chem Clin Biochem 20: 833~836, 1982
- 7) Robertson WG, Scurr DS, Smith A and Orwell RL: The determination of oxalate in urine and urinary calculi by a new ion-chromatographic technique. Clin Chim Acta 123: 91~99, 1982
- 8) Ogawa Y and Kitagawa R: Determination of urinary oxalate by ion chromatography: some modification. Acta Urol Jpn 30: 147~152, 1984
- 9) Hughes H, Hagen L and Sutton L: Determination of urinary oxalate by high performance liquid chromatography. Anal Biochem 119: 1~3, 1982
- 10) 戎野庄一・北川道夫・森本鎮義・宮崎善久・南方茂樹・安川 修・大川順正：尿路結石症における尿酸代謝の研究。1. High performance liquid anion exchange chromatography による尿中尿酸の測定。日泌尿会誌 74: 1598~1605, 1983
- 11) 杉本俊門・西尾正一・前川正信・早原信行・今岡進・船江良彦：高速クロマトグラフィーによる尿中尿酸測定について。泌尿紀要 29: 287~292, 1983
- 12) Mayer GG, Markow D and Karp F: Enzymatic oxalate determination in urine. Clin Chem 9: 334~339, 1963
- 13) Hallson PC and Rose A: A simplified and rapid enzymatic method for determination of urinary oxalate. Clin Chim Acta 55: 29~39, 1974
- 14) Hatch M, Bourke E and Costello J: New enzymic method for serum oxalate determination. Clin Chem 23: 76~78, 1977
- 15) Yriberry J and Posen S: A semiautomatic

- enzymic method for estimating urinary oxalate. *Clin Chem* 26: 881~884, 1980
- 16) Bennett DJ, Cole FE, Frohlich ED and Erwin DT Radioenzymatic procedure for urinary oxalate determination. *J Lab Clin Med* 91: 822~830, 1978
- 17) 小川由英 : 尿路結石症における蓚酸に関する研究. I. Radioenzyme 法による尿中蓚酸の測定. *日泌尿会誌* 72 : 694~700, 1981
- 18) Ichiyama A, Nakai E, Funai T, Oda T and Katahuchi R : Spectrophotometric determination of oxalate in urine and plasma with oxalate oxidase. *J Biochem* 98 : 1375~1385, 1985
- 19) Potenzny N, Bais R, O'Loughlin PD, Edwards JB, Rofe AM and Conyers RA : Urinary oxalate determination by use of immobilized oxalate oxidase in a continuous flow system. *Clin Chem* 29: 16~20, 1983
- 20) Crider QE and Curran DF : Simplified method for enzymatic urine oxalate assay. *Clin Biochem* 17: 351~355, 1984
- 21) Hockaday TDR, Frederick EW, Clayton JE and Smith LH: Studies on primary hyperoxaluria. II. Urinary oxalate, glycolate, and glyoxylate measurement by isotope dilution methods. *J Lab Clin Med* 65 677~686, 1965
- 22) Gibbs DA and Watts RWE The variation of urinary oxalate excretion with age. *J Lab Clin Med* 73: 901~908, 1969
- 23) Duggan DE, Walker RW, Noll RM and VandenHeuvel WJA : Determination of urinary oxalic acid and of oxalate pool size by stable isotope dilution. *Anal Biochem* 94: 477~482, 1979
- 24) Hodgkinson A and Williams A: An improved colorimetric procedure for urine oxalate. *Clin Chim Acta* 36: 127~132, 1972
- 25) 八竹 直・古武敏彦・西井易穂・清水トシ子 : 尿中蓚酸に関する検討. 第I報, 尿中蓚酸の新しい測定法について. *日泌尿会誌* 70 : 286~290, 1979
- 26) Rose GA : Advances in analysis of urinary oxalate : The ascorbate problem solved. Urolithiasis and related clinical research. Schwille, P.O., Smith, L.H., Robertson, W. G. and Vahlensieck, W. (Eds.), p. 637~644. Plenum Press, New York, 1985
- 27) Rundquist RT, Smith, LH and Werness PG : Factitious hyperoxaluria from ascorbic acid. *Clin Research* 29: 778A, 1981
- 28) 日本生化学会 (編): 生化学データブック. p.1607, 東京化学同人正1979
- 29) Crider QE : Effect of diluting samples for enzymic determination of urinary oxalate. *Clin Chem* 31: 1080~1081, 1985
- 30) Scurr DS, Januzovich N, Smith A, Sergeant VJ and Robertson WG : A comparison of three methods for measuring urinary oxalate —with a note on ascorbic acid interference. Urolithiasis and related clinical research. Schwille, P.O., Smith, L.H., Robertson, W. G. and Vahlensieck, W. (Eds), p.645~648. Plenum Press, New York, 1985

(1986年12月11日迅速掲載受付)