

## 尿中蓂酸測定キット (Sigma) の改良使用法

和歌山県立医科大学泌尿器科学教室 (主任: 大川順正教授)

戎野庄一, 大川順正

### A MODIFICATION OF ESTIMATION OF URINARY OXALATE USING SIGMA KIT

Shoichi EBISUNO and Tadashi OHKAWA

From the Department of Urology, Wakayama Medical College

(Director: Prof. T. Ohkawa)

The Sigma kit for estimating urinary oxalate is an enzymatic procedure. However, some errors were encountered using the standard assay system of the kit. Firstly, an overestimate of oxalate may arise from the oxidation of ascorbate during the alkaline wash stage of the extraction of oxalate from urine. Secondly, an underestimate of oxalate may occur because of incomplete extraction of oxalate.

A modified assay system for measurement of urinary oxalate using the kit is reported. The following points were modified: urine was diluted two-fold with 0.2 M EDTA and 0.2 M citrate buffer (pH 3.0), oxalate from urine was extracted with 0.06 N sodium hydroxide to prevent the overestimation by the oxidation of ascorbate, and a plate mixer and addition of a small magnet to the vial were used in the steps of both absorption and extraction of oxalate to keep the accuracy of the estimation.

The linearity of standard curve, reproducibility and recovery rates of the modified method were studied, and good results were obtained (linearity;  $r=0.999$ , CV of reproducibility; 5.3%, recovery rate; 101% (300  $\mu\text{M}$ ) and 103% (600  $\mu\text{M}$ ). A good correlation was seen between the modified Sigma method and high performance liquid chromatography ( $r=0.991$ ).

**Key words:** Urinary oxalate, Oxalate oxidase, Estimation, Sigma kit

#### はじめに

著者らは、以前より尿路結石症患者の尿中 risk factor の重要なもの一つとして尿中蓂酸の測定を行ってきた。当初は Chiriboga (1963)<sup>1)</sup>の方法に準じて、barley seedlings から蓂酸酸化酵素を精製して尿中蓂酸の測定を行ったが、尿中に蓂酸酸化酵素そのものを阻害する種々の物質が存在することが認められ、イオン交換樹脂などを使用して阻害物質の除去を試みたりあるいは前処理として尿中蓂酸の分離を試みたがいずれも信頼でき得る測定法には至らず、現在では著者らが考案した high performance liquid chromatography<sup>2)</sup>により行っている。しかしながら、この方法は装置が高価であるうえに、running cost もきわめて高いものであり、時間もかかることなどの欠点をもっており、どこの施設においても臨床の routine 検査として使用でき得るものとはなっていない。

最近、Sigma 社から蓂酸酸化酵素を用いた尿中蓂

酸測定キットが発売され、すでにその使用経験は本邦においても鈴木および百成<sup>3)</sup>により報告されているところである。この方法は尿中の蓂酸を、まず蓂酸吸着樹脂により分離し、その後 NaOH で抽出したうえで酵素反応を利用する比色法であり、尿中での本酵素阻害物質の影響は大部分は除外され得るという優れた点を持つとともに、大量の検体が比較的短時間で測定できるという簡便さをもっている。しかし、この測定法は著者らの使用経験によると、尿中のビタミンCの影響をはじめとし、各段階での操作により測定値の不安定なことが認められた。そこで、今回 Sigma 社のキットを用いた尿中の蓂酸測定法について、問題点をあげるとともに、著者らの改良方法を述べる。

#### 対象および方法

検体は和歌山県立医科大学泌尿器科に通院あるいは入院中の尿路結石患者の24時間尿を用いた。24時間蓄尿は、尿 pH およびクエン酸などの他の尿路結石関

Table 1. 尿中尿酸測定キットの標準測定法

- ①尿 1 ml を尿酸吸着剤 (150 mg) 入った尿酸抽出用バイアルに入れ 5-6 分間ゆっくり振盪する。
- ②吸着剤を沈澱させた後、固層を乱さずに尿を捨てる。
- ③蒸留水 2 ml をバイアルに加え、1-2 分間振盪し、同様に除去する。
- ④0.2N NaOH を 1 ml 加え、5-6 分間ゆっくり混和し、尿酸を抽出する。
- ⑤尿酸抽出液 100  $\mu$ l および尿酸測定薬 (oxalate oxidase, peroxidase, 3-methyl-2-benzothiazolone hydrazone (MBTH), 3-(dimethylamino)benzoic acid (DMAB) が調合されたもの) 1 ml を 37°C で 20 分間反応させる。ブランクおよび尿酸標準液も同様の反応を行い 590 nm における吸光度を測定し定量する。

Table 2. 尿中尿酸測定キットの改良法

- ①尿 1 ml, 0.2M EDTA-2 Na 0.5 ml および 0.2M citrate buffer (pH 3.0) 0.5 ml を vortex mixer を用いて良く混和し、30 分間放置する。
- ②上記の 2 倍希釈尿 1 ml を尿酸吸着剤 (150 mg) 入った尿酸抽出用バイアルに加え、小さな magnet を入れ 20 分間 plate mixer を用いて振盪、攪拌する。
- ③吸着剤を沈澱させた後、固層を乱さずに尿を捨てる。
- ④蒸留水 2 ml をバイアルに加え、2 分間同様に振盪したうえで除去する。
- ⑤0.06N NaOH を 1 ml 加え、20 分間②と同様にして持続的に混和し、尿酸を抽出する。
- ⑥尿酸抽出液 100  $\mu$ l および尿酸測定試薬 (oxalate oxidase, peroxidase, 3-methyl-2-benzothiazolone hydrazone MBTH), 3-(dimethylamino)benzoic acid (DMAB) が調合されたもの 0.5 ml を 37°C で 20 分間反応させる。ブランクおよび尿酸標準液も同様の反応を行い 590 nm における吸光度を測定し定量する。

連物質をも測定するために、何らの添加物も加えずに行い、また、水分や食事は自由摂取とした。

本キットの測定原理の詳細については、原著<sup>4)</sup>あるいは使用説明書に記載されているので本稿では触れないこととする。

尿中尿酸測定キットの標準測定法および著者の改良方法は、Table 1 および Table 2 に記載した。おもな改良点は測定前に尿の処理を加えたこと、尿酸抽出に 0.06N の NaOH を用いたこと、および尿酸の吸着および抽出操作に plate mixer (Advantec Tokyo Kaisha Ltd., Model PM-1) を使用し確実にした点などである。なお、尿酸標準液はキットに添付されている尿からの抽出尿酸と市販されている尿酸 Na のどちらでもその測定値には差は認められなかったことから、添加回収などの検討は尿酸 Na を用いた。

## 結 果

### I 標準測定法の検討

#### (1) 測定結果

Fig. 1 に示したものは尿酸 Na を、X 軸に示す濃度になるように蒸留水および尿の検体に加えて、キットに添付されている測定法で測定したものである。蒸留水に溶解したときにはきわめて優れた直線性を示すが、尿に加えると 200  $\mu$ M 以上では低値を示し、この 2 本の直線の傾きは違ったものであった。

Table 3. Recovery rate using standard assay system

Sample No.	Urine Ox ( $\mu$ M)	500 $\mu$ M Ox added ( $\mu$ M)	Ox found ( $\mu$ M)	recovery rate (%)
1	228	603	375	75
2	133	531	398	79.6
3	126	487	361	72.2
4	199	599	400	80
5	109	489	380	76

(mean  $\pm$  SD 76.6  $\pm$  3.3)

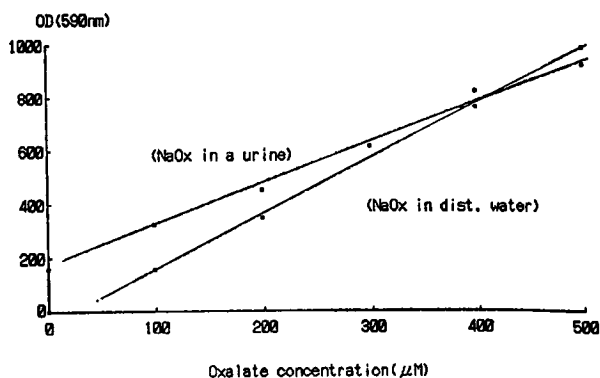


Fig. 1. Calibration curve using standard method in water and a urine

Table 4. Is an acidification or adding of ferric chloride better?

Sample	OD(590nm)
1. H <sub>2</sub> O 4 ml + 6 mM O × 0.5ml + H <sub>2</sub> O 0.5ml	1272
2. H <sub>2</sub> O 4 ml + 6 mM O × 0.5ml + 1 N HCl 0.5ml	943
3. H <sub>2</sub> O 4 ml + 6 mM O × 0.5ml + FeCl <sub>3</sub> (1 N HCl) 0.5ml	932
4. H <sub>2</sub> O 4 ml + 6 mM O × 0.5ml + FeCl <sub>3</sub> (3 N HCl) 0.5ml	914
1. Urine 4 ml + 6 mM O × 0.5ml + H <sub>2</sub> O 0.5ml	994
2. Urine 4 ml + 6 mM O × 0.5ml + 1 N HCl 0.5ml	952
3. Urine 4 ml + 6 mM O × 0.5ml + FeCl <sub>3</sub> (1 N HCl) 0.5ml	825
4. Urine 4 ml + 6 mM O × 0.5ml + FeCl <sub>3</sub> (3 N HCl) 0.5ml	869

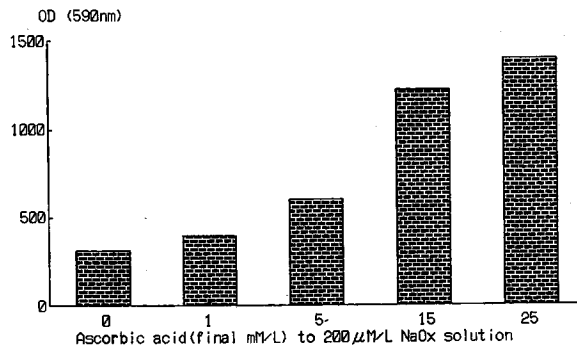


Fig. 2. Influence of ascorbic acid on urinary oxalate determination using standard method

(2) 回収率の検討

5例の患者尿を用いた結果は Table 3 に示したが、満足でき得るものではなかった。

(3) 検体尿の酸性化および塩酸に溶解した塩化第二鉄による尿酸測定に与える影響

Table 4 に示したごとく、強酸性あるいは強酸性下での塩化第二鉄の添加は本測定法の感度を下げるものと考えられた。

(4) 尿中ビタミンCの測定値に与える影響

尿に ascorbic acid を Fig. 2 に示した最終濃度になるように添加すると、ascorbic acid 1 mM (最終濃度) から、濃度依存的にその測定値は高値を示した。

II 尿の前処理法の検討

尿 1 ml にたいして 0.2 M EDTA-2 Na および 0.2 M citrate buffer (pH 3.0) をそれぞれ 0.5 ml 加え尿を 2 倍希釈して、よく攪拌して 30 分放置することにより、尿酸カルシウム塩の溶解あるいは各種の尿酸酸化酵素の阻害物質や測定に影響を及ぼす物質の希釈を計った。その結果、測定値は安定し、10 例の尿での 300 μM および 600 μM の尿酸 Na の添加回収率は各々、平均 101.6% (82~107%), 102% (92~105%) であった。しかし、ascorbic acid の大量添加

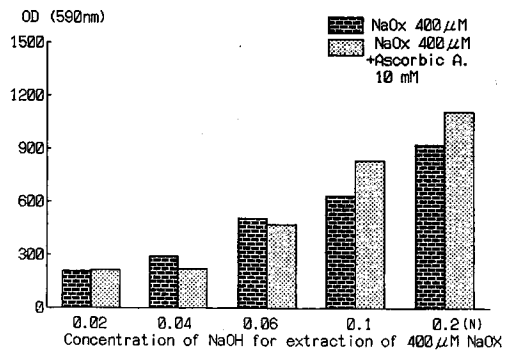


Fig. 3. Influence of NaOH concentration for extraction of NaOx and ascorbic acid

(10 mM/l まで) ではその影響は前項 (4) に示したものの約 50% に抑えられたに過ぎなかった。

III 尿中ビタミンCの影響を除外する方法の検討

(1) 尿酸抽出に用いる NaOH 濃度の検討

尿に ascorbic acid を 10 mM (最終濃度) を添加し、尿酸吸着剤からの尿酸の抽出に用いる NaOH 濃度を 0.02~0.2 N の間の 5 濃度で行い、その測定値を検討した。その結果、0.06 N の NaOH 濃度までは ascorbic acid の影響が受けにくいことが認められた (Fig. 3)。

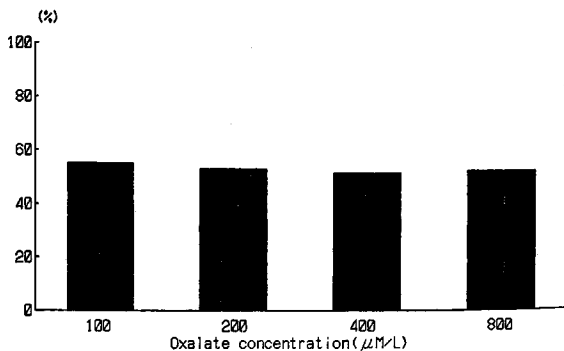


Fig. 4. Oxalate extraction rate of 0.06 N NaOH/0.2 N NaOH

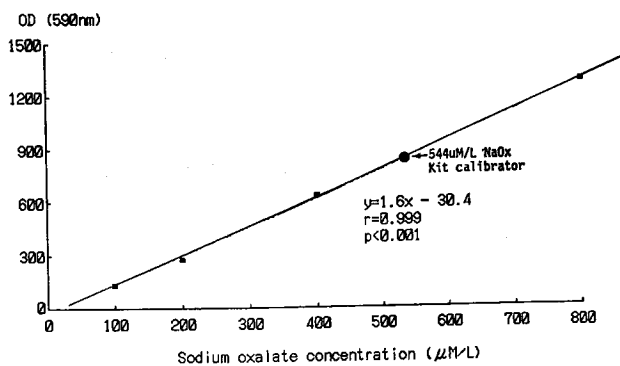


Fig. 5. Calibration curve using a modified method

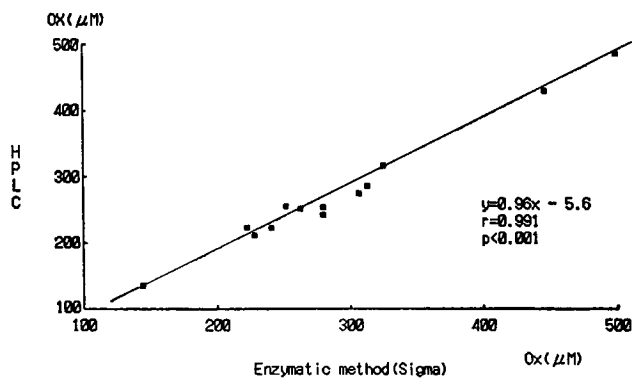


Fig. 6. Comparison of oxalate concentration between modified Sigma method and HPLC method

## (2) 0.06 N NaOH での尿酸回収率

Fig. 4 は各濃度の標準尿酸液における、その抽出に NaOH 0.06 N を用いた場合と NaOH 0.2 N を用いた場合での測定値の比率をみたものである。各尿酸濃度では NaOH 0.2 N に比べ 0.06 N ものをを用いると、その回収率は約半分となるが、いずれの濃度でも一定していることが認められた。

## IV 改良法の検討

### (1) 改良法の検量線

Fig. 5 に著者の改良法における尿酸標準液の検量線を示したが、きわめて優れた直線性が認められた。また、キット添付の尿酸標準液(尿中尿酸の抽出物)を用いても本検量線に合致することが示された。

### (2) 改良測定法と HPLC における測定値の相

Table 5. Reproducibility of triplicate determinations using a modified method

Sample No.	Oxalate concentration( $\mu\text{M}$ )			mean $\pm$ SD	CV(%)
	1	2	3		
1	120	118	134	127 $\pm$ 8.1	6.4
2	272	234	229	245 $\pm$ 23.5	9.5
3	468	463	465	465 $\pm$ 2.5	0.5
4	214	210	201	208 $\pm$ 6.6	3.1
5	71	80	72	74 $\pm$ 4.9	3.4
(mean $\pm$ 5.3)					

関性について

Fig. 6 にその結果を示したが, enzymatic assay が全般的にその測定値が僅かに低い傾向がみられたが, 両者の測定値は相関係数 0.991 と満足でき得る結果であった.

(3) 改良法における再現性

5 症例の尿を用いて, 各々 3 回の測定を行いその再現性を検討したが, その変動係数は 5.3% と満足いくものであった (Table 5).

(4) 改良法における回収率

10 症例の尿を用いて, 300  $\mu\text{M}$  および 600  $\mu\text{M}$  の尿酸 Na を添付し, その回収率を検討した. その平均の回収率は, 各々 101% および 103% であり, 満足でき得るものであった (Table 6).

考 察

尿路結石症の尿中 risk factor の検討には尿中尿酸の測定は欠かすことのできないものであり, これまでに枚挙に暇のないほどの測定法の報告がある. しかしながら, 臨床のルーチン検査として各病院の臨床検査部門でその測定がなされるような測定法は少ないものと思われる. 今回, 開発された本キットは, その測定法の原理や手順から考えると, その点ではきわめて優れたものといえる. しかしながら, 本酵素法は, 前述のごとく, 尿中のビタミン C 濃度の測定値に対する影響をはじめとし, 2~3 の問題点を残されているところである. そこで, 本法に著者ら独自の改良を加えて, 尿中尿酸の測定をより正確に測定できる工夫を行い, ここに記載した検討結果を得た. 著者らの考えた問題点ならびにその改良点につき, 順を追って考察を加える.

まず, 本法を用いる検体の蓄尿に関してであるが, 確かに尿酸のみの測定を目標とする場合には, カルシウム塩の形成あるいはアルカリ尿における ascorbic acid への変換などを考慮すると塩酸蓄尿が望ましい. しかし, 尿の pH をはじめとし, 尿酸やクエン酸の測定も尿中の尿路結石症に対する risk

Table 6. Recovery rate using a modified method

Sample No.	Urine Ox ( $\mu\text{M}$ )	added Ox ( $\mu\text{M}$ )	Measured Ox ( $\mu\text{M}$ )	Found Ox ( $\mu\text{M}$ )	recovery rate (%)
1	260	300	554	294	98
2	325	300	647	327	109
3	202	300	529	327	109
4	114	300	419	305	101
5	135	300	445	310	103
6	208	300	510	302	100
7	199	300	494	295	98
8	186	300	475	289	96
9	135	300	525	290	96
10	126	300	429	303	101
(304 $\pm$ 12)					(101 $\pm$ 9.5)
Sample No.	Urine Ox ( $\mu\text{M}$ )	added Ox ( $\mu\text{M}$ )	Measured Ox ( $\mu\text{M}$ )	Found Ox ( $\mu\text{M}$ )	recovery rate (%)
1	260	600	925	665	110
2	325	600	985	660	110
3	202	600	801	599	99
4	114	600	701	597	99
5	135	600	744	609	101
6	208	600	719	580	96
7	199	600	801	602	100
8	186	600	779	593	98
9	135	600	843	608	101
10	126	600	789	663	110
(617 $\pm$ 32)					(103 $\pm$ 5.3)

factor を検討するには欠かすことのできないものであり、当初からの塩酸蓄尿は現実には不可能であろう。そこで、本キットの使用説明にも蓄尿後に塩酸を添付し、その pH を 3 以下に下げないように指示されており、また、Scurr ら<sup>6)</sup> はさらに蓚酸カルシウム塩の溶解を確実にするために、その pH を 1 以下にすることを勧めている。しかしながら、著者の検討では塩酸での強酸性下での本測定は、その測定感度を減じる可能性が示唆され、それは添加する塩酸濃度が増加すると顕著になる傾向がうかがえた。そこで、著者は検体尿の pH をほぼ 3 に保ち、かつ、クエン酸と EDTA の持つカルシウムのキレート作用を利用することを考え、Table 2 に示したごとく尿の前処理を行った。なお、この前処理により尿は 2 倍に希釈されることになり、尿中の ascorbic acid をはじめとする蓚酸測定値に影響を与える諸物質も希釈されることになる。

ついで、蓚酸の吸着および抽出操作についてであるが、Scurr らも指摘しているように、手動での安易な操作はかなり大きな誤差を生じることは事実である。著者も当初は手動での間欠的な攪拌のみで測定を行ったが、その得られた値は信頼のでき得るものではなかった。そこで、plate mixer を使用し、しかも、その攪拌条件および時間を厳密に一定にすることで良好な結果が得られた。ascorbic acid の蓚酸への転換による測定値に与える影響は、Rose<sup>6)</sup> や Crider<sup>7)</sup> により 3N の塩酸で溶解した塩化第 2 鉄（最終濃度 7.6 mM）を加えることにより容易に解消するとされているが著者らは前述のごとく強塩酸下での測定には疑問を持つところであり、また、著者らの改良点のひとつである検体尿の前処理を行うと、鉄と EDTA の結合が起こり、混濁が生ずるために塩化第 2 鉄の添加は不可能であった。ascorbic acid から蓚酸への変換は、その溶液のアルカリ性が増すと強くなるとされており<sup>6)</sup>、著者の検討では蓚酸と ascorbic acid の吸着剤への親和性が若干異なるものと考えられた。そこで、ascorbic acid 酸化酵素の利用や、煮沸など種々の方法を試みたが、最終的には 10 mM/l までの ascorbic acid の検体への添加においても、その測定値に影響を与えないのは蓚酸の抽出に用いる NaOH の濃度を 0.06 N まで下げることが最も良い方法であるとの結論に達した。ただ、NaOH 濃度を下げると抽出操作はきわめて慎重に行わねば、その測定値は多少の誤差を生じることがあることを強調しておきたい。すなわち、充分でかつ持続的な攪拌とその一定化が重要であり、plate mixer の使用を推奨する。

以上、本キットは尿中の蓚酸を測定するには、その

原理および簡便さなどから優れているものと思われるが、広く一般の臨床検査室で行う場合、なお若干の検討を要するものと判断され、ここに著者の改良法を提唱した。

## 結 語

蓚酸酸化酵素を利用した蓚酸測定キット (Sigma 社) は尿中蓚酸を測定するためには、その原理および簡便さから優れたものと思われるが、なお、いくらかの問題点を有しており、この点につき著者の改良法を記載した。

1) 改良法のおもな点は尿をクエン酸緩衝液および EDTA を用いて 2 倍希釈したこと、蓚酸吸着および抽出の操作を plate mixer を用いて一定にしたこと、および蓚酸抽出は 0.06N の NaOH を用いた点である。

2) 改良法における再現性は変動係数 5.3% であった。

3) 改良法における回収率は蓚酸 Na の 300  $\mu$ M および 600  $\mu$ M の添加では、各々 101% および 103% であり、標準測定法の 76.6% に比べて優れたものであった。

## 文 献

- 1) Chiriboga J: Some properties of an oxalic oxidase purified from barely seedlings. *Biochem Biophys Res Commun* 11: 277-282, 1963
- 2) 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蓚酸代謝の研究. 1. High performance liquid anion exchange chromatography による尿中蓚酸の測定. *日泌尿会誌* 74: 1598-1605, 1983
- 3) 鈴木孝治, 百成智津枝: 尿中蓚酸測定キット (Sigma 社) の有用性. *泌尿紀要* 33: 794-798, 1987
- 4) Crider QE and Curran DF: Simplified method for enzymatic urine oxalate assay. *Clin Biochem* 17: 351-355, 1984
- 5) 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), p645-648, Plenum Press, New York, 1985
- 6) 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), p637-644, Plenum Press, New York, 1985
- 7) Crider QE: Effect of diluting samples for enzymatic determination of urinary oxalate. *Clin Chem* 31: 1080-1081, 1985

(1987年7月7日迅速掲載受付)