

蓼酸酸化酵素を用いた新しい尿中蓼酸定量法 (市山法)について

京都大学医学部泌尿器科学教室 (主任: 吉田 修教授)

野々村光生・岡田 裕作

川村 寿一・吉田 修

浜松医科大学化学教室 (主任: 市山 新教授)

市 山 新

THE DETERMINATION OF OXALATE IN URINE BY NEW ENZYMIC METHOD USING OXALATE OXIDASE

Mitsuo NONOMURA, Yusaku OKADA,
Juichi KAWAMURA and Osamu YOSHIDA

*From the Department of Urology, Faculty of Medicine, Kyoto University
(Director: Prof. O. Yoshida)*

Arata ICHIIYAMA

*From the Department of Biochemistry, Hamamatsu University of Medicine
(Director: Prof. A. Ichiiyama)*

Oxalate is one of the most important constituents in urine of urinary stone. But the determination of oxalate in urine has not been performed as a routine laboratory examination because of difficulty or inaccuracy in measuring oxalate in urine.

We tried to measure oxalate in urine by the newly developed enzymic method with oxalate oxidase. This method is not only simple but also accurate enough. The reproducibility S.D./mean was 2.3~9.0%, the recovery rate was $95.2 \pm 4.0\%$ (mean $\pm$ S.D.)

With this method, the normal range of urine oxalate in 24 hours was determined to be 11.8 mg~39.4 mg, the upper limit was 40 mg.

By taking the regular diet which contains 500 mg of calcium and 1,000 mg of phosphorus a day, the excretion of oxalate in urine was significantly decreased in the stone formers. This suggests that the influence of the diet upon the excretion of oxalate in urine for 24 hours is important especially in stone formers.

Key words: Urolithiasis, Oxalate in urine, Enzymic methods

緒 言

尿路結石症は、泌尿器科領域で高頻度にみられる疾患のひとつであり、わが国での生涯罹患率は3.96%と算出され、その成分の大部分は蓼酸カルシウムよりなっている¹⁾。この結石形成にあずかる尿中成分因子としてカルシウム、リン、蓼酸、尿酸、尿のpH その

他が挙げられるが、なかでも、尿中蓼酸がとくに重要な因子だといわれている。したがって、尿中蓼酸の定量は、結石の成因を探り、尿路結石患者を治療するうえで必要不可欠な検査といえる。しかし、この尿中蓼酸の定量は、操作が煩雑であるとか、精度が不十分であるとか、あるいは、高価で特殊な測定機器を必要とするなどの点で、一般には、病院の臨床検査としては

ほとんどなされていないのが現状である。

最近、市山らによって開発された、尿酸酸化酵素を用いた酵素法²⁾による尿中尿酸定量法は、操作が簡便であるばかりでなく、精度も充分であり、本論文では、その方法を追試し、基礎的な検討を試みるとともに、尿路結石患者および対照群の24時間尿中尿酸排泄量を、それぞれ、カルシウム、リン一定食（以後一定食と略す）を3日間摂取前後で比較検討したのでここに報告する。

対象ならびに方法

京都大学医学部附属病院泌尿器科入院の結石患者18名、および、その対照群として、入院患者のうち、腎機能正常で、感染、代謝異常、悪性腫瘍のない非結石患者24名を選んだ。

測定原理は、尿中尿酸を尿酸酸化酵素で酸化させ、その際生ずる過酸化水素とペルオキシダーゼによりMBTH HALPSを重合させて582 nmに吸光度のPeakを持つchromophoreを生成させて、分光光度計での582 nmの吸光度の増加から尿酸量を計算するという簡単なものである（Fig. 1）。

測定に使用する試薬（特級）はつぎのとおりである。

- 1) 6 N 塩酸
- 2) 1 N 水酸化ナトリウム
- 3) 琥珀酸
- 4) EDTA-Na₂
- 5) 尿酸ナトリウム
- 6) MBTH (和研薬)
- 7) HALPS (同仁化学研究所)
- 8) アスコルビン酸酸化酵素 (Ⅲ) (東洋紡)

9) Horse-raddish peroxidase (Grad I) (Boehringer)

10) 尿酸酸化酵素 (barley seedings) (Boehringer)

11) 活性炭 (Shirasagi) (武田薬品工業)

12) ステアリン酸

分光光度計は島津 UV-260 を用いた。

測定方法は Fig. 2 に示すごとく、採取した尿に1/100容量の6 N HClを加え、よく攪拌した後、1/4容量の0.2 M EDTA-Na₂を加え、1 N NaOHを点下してpHを5.6に調製する。ついで、液体1 mlあたり80 mgの活性炭（あらかじめ、塩酸で活性化し、ステアリン酸で部分的に不活性化したもの）を加え10分間室温下で攪拌し、4°C、10分間、3,000 rpmで遠沈し、上澄液をmillipore filter (0.45 μm)で濾過し、その濾過尿を以下の測定（Fig. 3）に用いる。こうして得られた尿に0.12 M 琥珀酸緩衝液（pH 5.2）を加え、同時に、14.5 mU/μl アスコルビン酸酸化酵素を加えて、尿中に含まれている可能性のあるアスコルビン酸を分解しておく。つぎに、4 mM MBTH, 66.7 mM HALPS, 250 mU/μl ペルオキシダーゼを加え、反応前のOD 582 nmを測定しておき、ついで尿酸酸化酵素を加え、ときに攪拌しつつ、37°Cに45分間保ちOD 582 nmの増加を読みとる。尿酸のεmMが40であることから、原尿中の尿酸濃度を逆算すれば、24時間尿中尿酸排泄量が求められる。なお、詳細は、市山らの原著を参照されたい²⁾。

今回、われわれは、以上に述べた方法を用いつぎの手順で尿中尿酸の定量をおこない、本法の有用性を検討した。

1) 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 μM 尿酸溶液を作成し、本測定系で、尿酸濃度とΔOD 582 nmとの

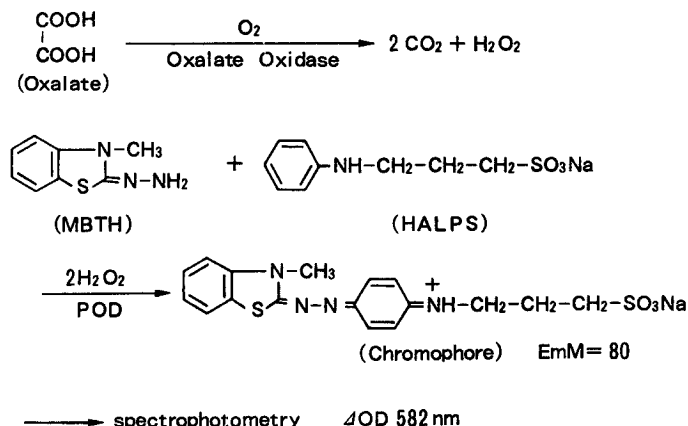


Fig. 1. The principle of the determination on oxalate in urine

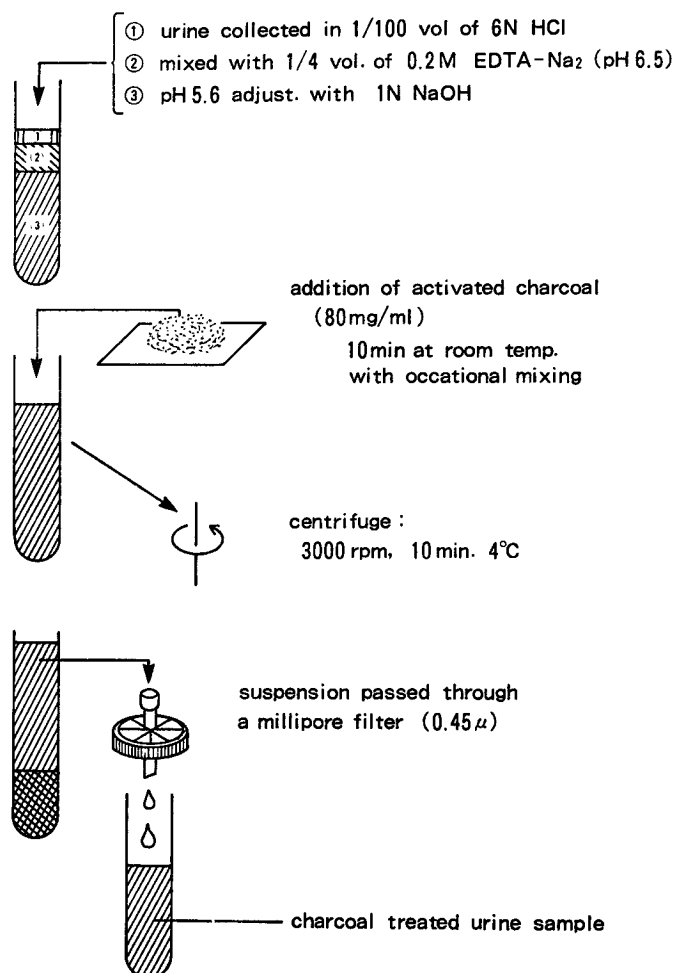


Fig. 2. The method of the preparation of charcoal-treated urine

間の標準曲線を求めると同時に、本反応系の中間産物である H_2O_2 についても同様の標準曲線を求めた。

2) 同様の関係が、尿と $\Delta\text{OD } 582 \text{ nm}$ の間にみられるか否かをみるため、11名の患者の尿それぞれについて、反応液 $800 \mu\text{L}$ あたり、患者尿を 10, 20, 30 μL 加え、加えた尿量と $\Delta\text{OD } 582 \text{ nm}$ との関係を調べた。

3) 本測定法の再現性をみるため10名の患者尿について、それぞれ6回の測定をおこなった。

4) 回収率をみる目的で、同様の10名の患者尿それぞれについて $1.25 \mu\text{M}$ の尿酸ナトリウムを添加し、 $\Delta\text{OD } 582 \text{ nm}$ の増加分から添加尿酸の回収率を求め、この操作を各4回ずつおこなった。

5) 対照群の23名に、カルシウム 500 mg/day 、リン $1,000 \text{ mg/day}$ 、 $1,800 \text{ Kcal/day}$ の一定食を3日間摂取させ、その前後で、それぞれ、24時間厳重蓄尿さ

せ24時間尿中尿酸排泄量を測定した。その間、水以外の飲食物は厳重に制限した。

6) ついで、入院中の尿路結石患者についても同様にして24時間尿中の尿酸排泄量を測定した。

結 果

1) 標準曲線

尿酸濃度および過酸化水素の濃度と $\Delta\text{OD } 582 \text{ nm}$ との間には、尿酸濃度 $7 \mu\text{M}$ 、 $\text{OD } 582 \text{ nm } 0.280$ までは直線関係が得られた（尿酸濃度 $9 \mu\text{M}$ 、 $\Delta\text{OD } 582 \text{ nm } 0.360$ 以上では直線関係にならない）（Fig. 4）。

2) 尿酸を含む患者尿を用いた3点検定では、11例すべてにおいて、加えた尿量と $\Delta\text{OD } 582 \text{ nm}$ との間に直線関係が得られた（Fig. 5）。

3) 同一検体測定による再現性は Table 1 のごとく $\frac{\text{S.D.}}{\text{mean}}$ は $2.3\% \sim 9.0\%$ ($\text{mean} \pm \text{S.D. } 5.9 \pm 2.0$)

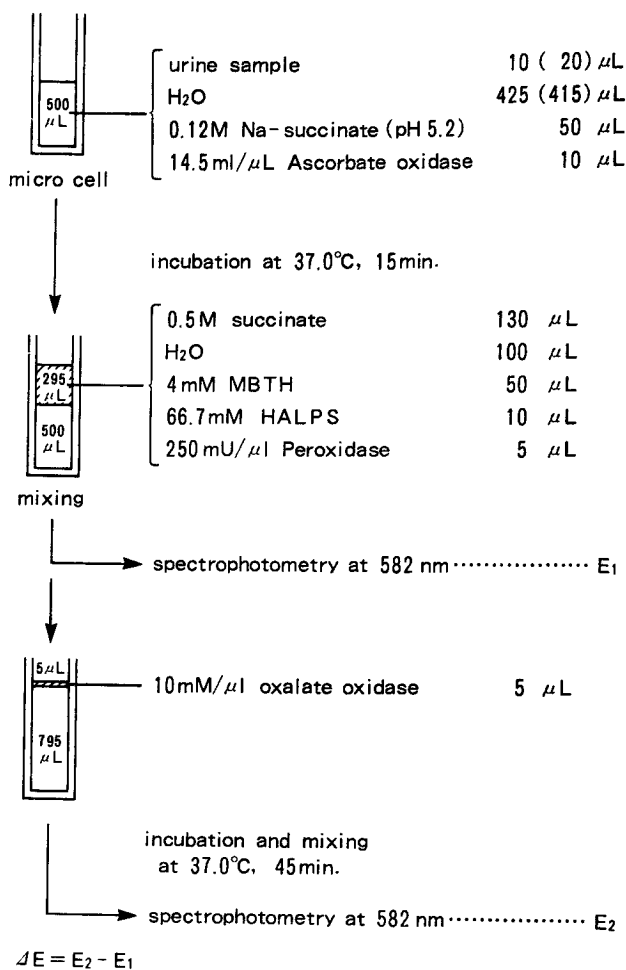
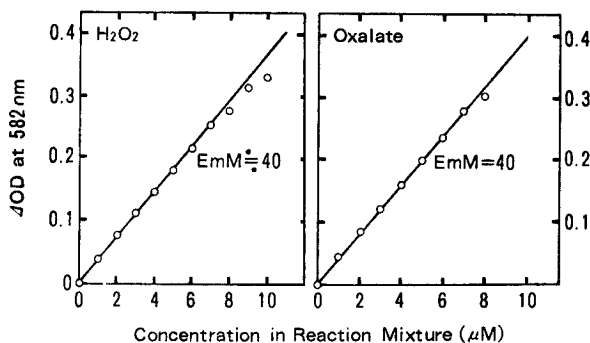


Fig. 3. The method of the determination of oxalate in urine

Fig. 4. The lineality of H₂O₂ and oxalate determination. The lineality was obtained from 0 to 7 μ M of oxalate sodium

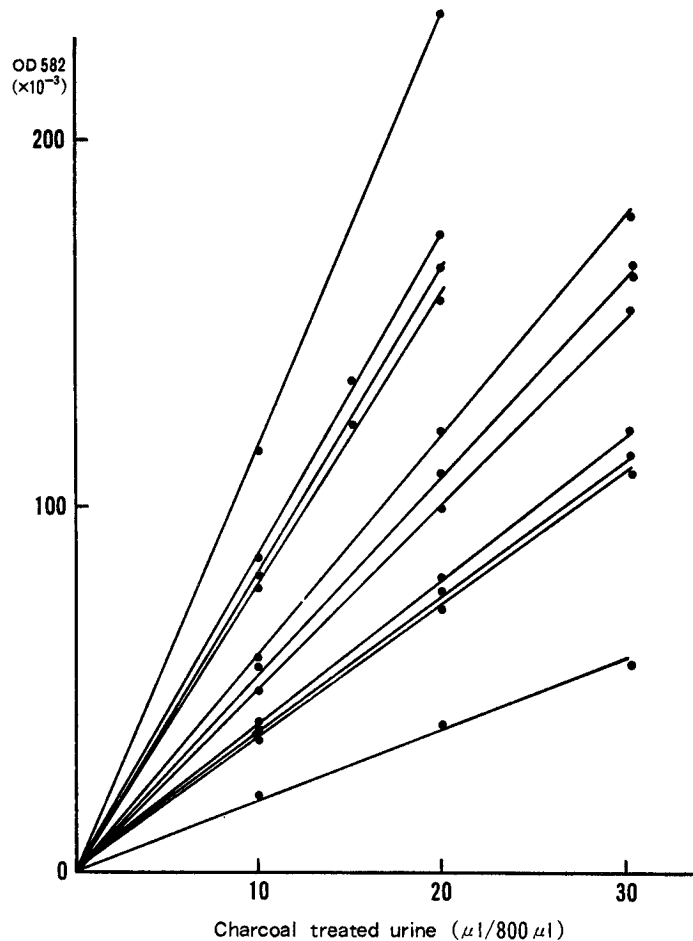


Fig. 5. The determination of oxalate in charcoal treated urine and its linearity. Eleven urine samples were measured and good linearity was obtained

であり (Table 1),

4) 添加蓚酸回収率は $95.2 \pm 4.0\%$ (mean $\pm$ S.D.) であった (Table 1).

5) 24時間尿中蓚酸排泄量は, 本法によると, 対照群では, カルシウム, リン一定食摂取前では 25.6 ± 6.9 mg (mean $\pm$ S.D., $n=19$), 一定食摂取後は 21.7 ± 7.1 mg ($n=24$) であった (Fig. 6). したがって正常範囲は, 普通食摂取時は, 1日 11.8 mg~39.8 mg, 上限は約 40 mg と考えられた.

6) 結石患者の24時間尿中蓚酸排泄量は, 一定食前では 34.3 ± 18.7 mg/day ($n=18$) であるのに対して, 一定食後では 21.75 ± 7.5 mg/day ($n=18$) と有意の減少を示した ($p<0.02$) (Fig. 6).

考 察

尿中の蓚酸カルシウムの飽和状態の変化には, カル

シウム濃度の変化よりも, 蓚酸濃度の変化の方が, 15倍も大きい影響力を持つといわれている³⁾. また, Robertson らも, 尿中蓚酸排泄量の増加が, 尿路結石形成の main risk factor であり, hypercalciuria はさほど重要なものではないと述べている⁴⁾. また, 結石成分の分析からも, 蓚酸カルシウム結石が高頻度を占め, しかも再発しやすい点を考えると, 結石成因の risk factor のひとつとしての蓚酸の動態を知ることがきわめて重要である. したがってこの点から, 尿中蓚酸の定量は, 尿路結石患者の治療方針を決めるうえで必要な要件といえる.

簡単な構造式をもつ蓚酸の定量については, これまで, 実にさまざまな方法が考案されてきた. 過マンガン酸カリ滴定法^{5,6)}, 比色分析法^{7,8)}, 蛍光分析法⁹⁾, 原子吸光分析法¹⁰⁾, 同位元素希釈法^{11,12)}, 酵素法^{13~17)}, ガスクロマトグラフィー法^{18~20)}, 高速液体クロマト

Table 1. Reproducibilities and recovery rates of oxalate in urine

	reproducibility (mg/day)	S. D. Mean (%)	recovery rate (%)
	Mean $\pm$ S. D. (*)		Mean $\pm$ S. D.
T. Y.	18.2 $\pm$ 1.11	6.1	98.2 $\pm$ 5.57
S. C.	17.5 $\pm$ 0.65	3.7	97.4 $\pm$ 3.25
S. R.	36.1 $\pm$ 1.99	5.5	96.3 $\pm$ 4.77
U. S.	52.6 $\pm$ 2.68	5.1	89.4 $\pm$ 5.03
S. S.	25.0 $\pm$ 1.85	7.4	103.0 $\pm$ 7.85
T. K.	12.8 $\pm$ 0.83	6.5	95.9 $\pm$ 3.82
K. T.	37.7 $\pm$ 1.88	5.0	90.0 $\pm$ 2.65
K. T.	12.9 $\pm$ 1.17	9.0	91.4 $\pm$ 4.30
K. Y.	100.9 $\pm$ 2.35	2.3	97.2 $\pm$ 2.31
T. K.	11.1 $\pm$ 0.94	8.5	93.6 $\pm$ 3.98
		5.9 $\pm$ 2.0 (%) (mean $\pm$ S. D.)	95.2 $\pm$ 4.0 (%) (mean $\pm$ S. D.)

(*) measured 6 times for each sample

グラフィー法²¹⁾など、さまざまな方法による定量法の報告が、これまでなされてきたが、これらの分析法は、操作が煩雑であったり、精度が不十分であったり、あるいは、精度が良好でも測定に長時間を要したり特殊な測定機器を要するなどの短所があり、また、従来の酵素法、すなわち、蓚酸脱炭酸酵素や、蟻酸脱水素酵素を用いた酵素法では反応系の停止が不十分であった。

しかし本方法は、基本的な実験機器 (pH メーター、冷却遠心器、分光光度計) と簡単な試薬で蓚酸定量をおこなうことができ、しかも、Fig. 5, Table 1 のごとく、精度も充分満足の得られるものであった。また、本方法においては、尿中蓚酸カルシウム析出防止、蓚酸新生防止などに充分留意がなされており (pH 5.6)、尿中の反応阻止物質の除去 (charcoal 処理) のほか、尿中に混入する可能性のある、蓚酸の前駆体であるアスコルビン酸の分解処理 (アスコルビン酸酸化酵素前処置による) がなされている点、発色反応の停止の明確な反応系を用いている点 (HALPS と MBTH) など、かずかずの点できわめてすぐれた方法といえる。

わが国での、24時間尿中蓚酸排泄量の正常値については、これまでいろいろな報告が、1966年高崎ら以後、

諸家によってなされており、24.4 mg/day~33.4 mg/day である (Table 2)。われわれの得た値 25.6 $\pm$ 6.9 mg/day もこれらの値と矛盾のないものであった。

しかし、これまでの報告では、食事摂取が一定でなく、単純には比較しがたい面もある。一般に、尿中に排泄される蓚酸は、食事から吸収されたものが約10%、代謝の終末産物として肝で生成され尿中に排泄されるものが90%を占め、そのうち、約40%はアスコルビン酸に、約40%はグリシニンに、残りはグリコール酸を生成する代謝系に由来するといわれており^{22,23)}、尿中蓚酸排泄には、直接的、間接的に食事の影響が大きいと考えられる。

これまでの諸家の報告には、蓚酸カルシウム結石患者は、非結石患者に比べて、尿中蓚酸排泄量が多いとするものもあれば、不変であるとするものもあるが、これらのほとんどは、無制限食のもとの報告であり、測定当日あるいは前日に、蓚酸あるいはその前駆物質の含有量の多い食事を摂取したかいかによって異なる結果となりうる。

われわれの観察では、自由に食事摂取させていると、結石患者の方が、非結石患者よりも、尿中蓚酸排泄量の多い傾向がみられ、カルシウム・リン一定食による

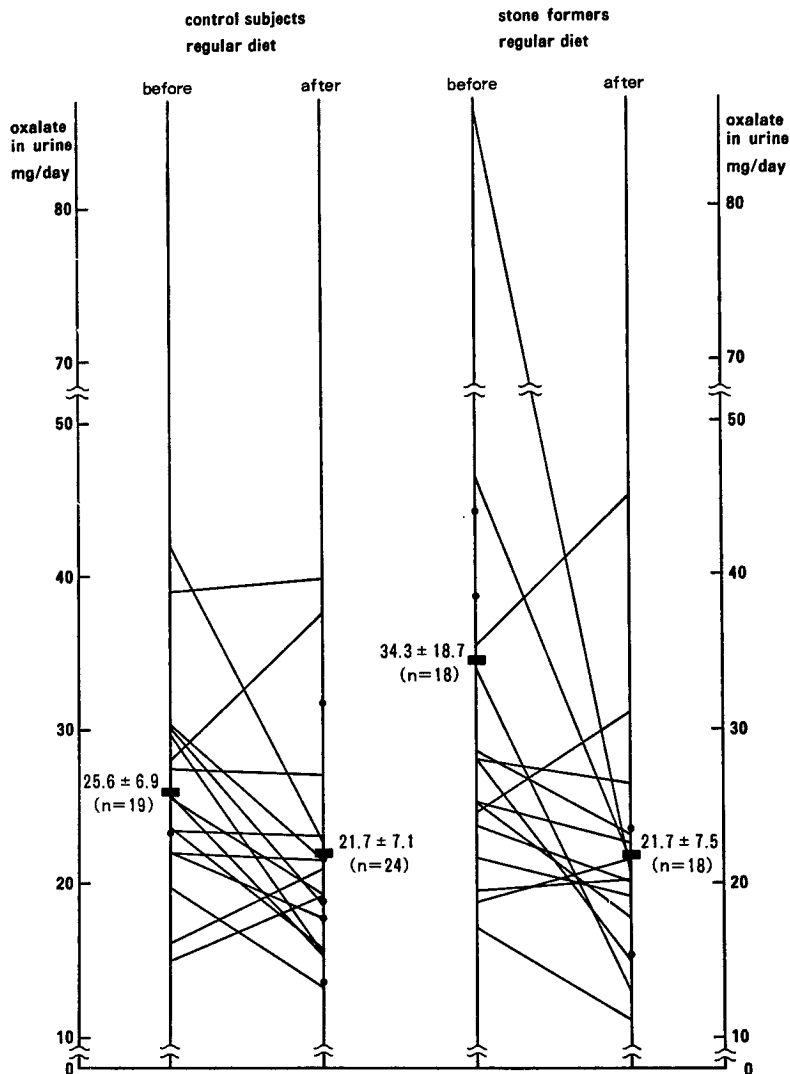


Fig. 6. Oxalate in urine in the control subjects and stone formers before and after regular diet which contains 500 mg of calcium and 1,000 mg of phosphorus per day

食事制限により、結石患者、対照群ともに、24時間尿中蓂酸排泄量の減少を認めたが、この減少も、対照群に比して、結石患者により著明であり、蓂酸カルシウム結石患者では、非結石患者に比べて、尿中蓂酸排泄量に与える食事の影響がより大きいことを示唆していると考えられる。

今後、本法を用いて各種結石症例の尿中蓂酸を測定し、単発結石症例、多発結石症例に分けて、蓂酸排泄の特性をあきらかにするとともに、蓂酸以外の尿中結石形成因子の測定もおこない、結石形成に関与するこれら諸因子の相互関係をあきらかにしてゆきたい。

結 語

1) 蓂酸酸化酵素を用いた尿中蓂酸定量法(市山法)は、操作が簡便であるばかりでなく、充分な精度が得られる方法である。

2) 24時間尿中蓂酸排泄量の正常範囲はおよそ11.8~39.4 mgで、正常上限は約40 mgまでと考えられた。

3) カルシウム500 mg、リン1,000 mgの一定食摂取(食事制限)により、結石患者では、24時間尿中蓂酸排泄量が有意に低下し、これらの結石患者の結石

Table 2. Comparison of the normal ranges of oxalate in urine for 24 hours between the authors in Japan

reporters in Japan		methods or first reporter	oxalate in urine (mg/day)
Takasaki	1966	Yambro	29.1 ± 9.9
Itō	1978	Hodgkinson (colorimetry)	30.2 ± 1.5
Suzuki	1980	"	27.2 ± 14.3
Hōnoki	1980	"	26.9 ± 8.3
Yachiku	1979	Yachiku	29.5 ± 12.6
Ueda	1984	"	29.1 ± 10.2
Takeuchi	1981	"	31.3 ± 11.0
Ogawa	1981	Benett (radioenzyme)	24.4 ± 6.9
Yanagawa	1982	Gas chromatography	32.1 ± 10.4
Ichiyama	1983	Ichiyama (enzyme)	33.4 ± 8.5
Present study	1984	"	25.6 ± 6.9

再発予防の点から、蓂酸を多量に含有する食物の摂取を避けるべき食事指導の重要性が示唆された。

文 献

- 吉田 修：日本における尿路結石症の疫学。日泌尿会誌 **70**：975～983, 1979
- Ichiyama A, Funai Y and Nakai E : An improved method of the determination of oxalate in urine and plasma with oxalate oxidase. Anal Biochem: in preparation
- Finlayson B : Renal lithiasis review. Urol Clin North Am **1** : 181～212, 1974
- Robertson WG and Peacock M : The cause of idiopathic calcium stone disease : Hypercalciuria or hyperoxaluria? Nephron **26** : 105～110, 1980
- Archer HE, Dormer AE, Scowen EF and Watts RWE : Studies on the urinary excretion of oxalate by normal subjects. Clin Sci **16** : 405～411, 1957
- Yarbro CL and Simpson RE : The determination of total urinary oxalate. J Lab Clin Med: 304～310, 1956
- 八竹 直・古武敏彦・西井易穂・清水トシ子：尿中蓂酸に関する検討。第1報，尿中蓂酸の新しい測定法について。日泌尿会誌 **70** 286～290, 1979
- Baadenhuijsen H and Jansen AP : Colorimetric determination of urinary oxalate recovered as calcium oxalate. Application of a simple correction factor for incomplete precipitation. Clin Chim Acta **62** : 315～324, 1975
- Zarembski PM and Hodgkinson A The fluolometric determination of oxalic acid in blood and other biological materials. Biochem J **96** : 717～721, 1965
- Koehl C and Abecassis J: Determination of oxalic acid in atomic absorption spectrophotometry. Clin. Chim Acta **70** : 71～77, 1976
- 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** : 677～687, 1965

- 12) Schmidt K, Hagmaier V, Bruchelt G and Rutishauser G: Analytical isotachopheresis: A rapid and sensitive method for determination of urinary oxalate. *Urol Res* **8**: 177~180, 1980
- 13) Shimazono H and Hayashi O: Enzymatic decarboxylation of oxalic acid. *J Biol Chem* **227**: 151~159, 1957
- 14) Ribeiro ME and Elliot JS: Direct enzymatic determination of urinary oxalate. *Invest Urol* **2**: 78~81, 1964
- 15) Hallson PC and Rose GA: A simple and rapid enzymatic method for determination of urinary oxalate. *Clin Chim Acta* **55**: 29~39, 1974
- 16) Costello J, Hatch M and Bourke E: An enzymic method for spectrophotometric determination of oxalic acid. *J Lab Clin Med* **87**: 903~908, 1976
- 17) Sugiura M, Yamamura H, Hirano K, Ito Y, Sasaki M, Morikawa M, Inoue M and Tsuboi M: Enzymic determination of serum oxalate. *Clin Chim Acta* **105**: 393~399, 1980
- 18) Farrington CJ and Chalmers AH: Gas-chromatographic estimation of urinary oxalate and its comparison with a colorimetric method. *Clin Chem* **25**: 1993~1996, 1979
- 19) Gerot MA, Lavoue G, Belleville F and Nabet P: Determination of oxalates in plasma and urine using gas chromatography. *Clin Chim Acta* **106**: 279~285, 1980
- 20) Park KY and Gregory J: Gas-chromatographic determination of urinary oxalate. *Clin Chem* **26**: 1170~1172, 1980
- 21) 杉本俊門・西尾正一・前川正信・早原信行・今岡進・船江良彦: 高速液体クロマトグラフィーによる尿中尿酸測定法について. *泌尿紀要* **29**: 287~292, 1983
- 22) Richardson KE and Farinelli MP: The pathways of oxalate biosynthesis. In: *Urolithiasis, Clinical and basic research*, ed. by Smith. L.H., Robertson, W. G. and Finlayson, B., pp 855~863, Plenum Press, New York, 1981
- 23) Hodgkinson A: Oxalate metabolism and hyperoxaluria. In: *Scientific Foundation of Urology*, ed. by Williams, D.I. and Chisholm, G.D., 1st ed., vol. I, pp. 289~296, William Heinemann Medical Books LTD, London, 1976
- 24) 高崎悦司・島野栄一郎: 尿路結石症と尿中尿酸量 I. 尿中尿酸定量法の検討と尿酸量測定. *日泌尿会誌* **57**: 1267~1274, 1966
- 25) 伊藤晴夫・真田寿彦・村上光右・宮内大成・島崎淳: 尿酸代謝異常と尿路結石 第4編, 尿酸カルシウム結石患者尿中への尿酸排泄量について. *日泌尿会誌* **69**: 643~646, 1978
- 26) 八竹 直・井口正典・郡健二郎・栗田 孝・武本征人・板谷宏彬: 尿中尿酸に関する検討, 第II報, 尿路結石症における尿中尿酸排泄量について. *日泌尿会誌* **70**: 291~299, 1979
- 27) 鈴木孝治: 尿路結石の研究—尿中尿酸測定法の検討. *泌尿紀要* **26**: 393~398, 1980
- 28) 朴木繁博: 尿路結石の研究, 尿酸カルシウム結石症における尿中尿酸排泄動態の意義について. *三重医学* **24**: 299~313, 1980
- 29) 小川由英: 尿路結石症における尿酸に関する研究 I. Radioenzyme 法による尿中尿酸の測定. *日泌尿会誌* **72**: 694~700, 1981
- 30) 柳川 真: 尿路結石に関する研究. 第2編, 男子尿酸カルシウム結石患者における尿中尿酸排泄動態. *三重医学* **26**: 476~482, 1983
- 31) 竹内秀雄・岡田裕作・吉田 修: 簡単な尿中尿酸の測定法. *泌尿紀要* **27**: 505~508, 1981
(1984年12月6日迅速掲載受付)