

蓂酸酸化酵素を用いた尿中蓂酸測定法の検討

順天堂大学医学部泌尿器科学教室（主任：北川龍一教授）

小 川 由 英・山 口 千 美・田 中 徹
諸 角 誠 人・北 川 龍 一

EVALUATION OF THE ENZYMATIC METHOD USING OXALATE OXIDASE FOR URINARY OXALATE ASSAY

Yoshihide OGAWA, Kazumi YAMAGUCHI, Tohru TANAKA,
Makoto MOROZUMI and Ryuichi KITAGAWA

*From the Department of Urology, School of Medicine, Juntendo University
(Director: Prof. R. Kitagawa)*

The principle of this kit method is that urinary oxalate is extracted and subsequently assayed by measuring the amount of hydrogen peroxide produced in an oxidation reaction catalyzed by oxalate oxidase. The reproducibility and accuracy of the method were tested: the within-run and day-to-day coefficients of variation were 5.4~20.0% and 16.1~18.0%, respectively, and the overall recovery rate of the added oxalate (5~25 mg/l) was 40~50%. These abnormally low recovery rates may be related to the presence of sulfate and phosphate in the extracted fluid. Therefore, the above method was modified by performing a recovery test by adding 25 mg/l oxalate to all urine samples. By the modified method, the correlation coefficient obtained between this method and the ion-chromatographic method was 0.851 ($p<0.01$). Urinary pretreatment with either acid ferric chloride or EDTA yields a higher recovery than with HCl. However, a good correlation of oxalate values is consistently observed for HCl-processed urine as measured by the above two methods. If the interference of ascorbic acid is negligible, no special urinary treatment except for HCl is necessary. The 24-hour urinary oxalate excretions were 24.4 ± 9.1 mg (mean $\pm$ SD) in 8 healthy males and 19.9 ± 10.3 mg in 24 calcium-stone formers (21 males and 3 females).

Key words: Oxalate assay, Oxalate oxidase, Human urine, Ion chromatography

緒 言

尿路結石は蓂酸カルシウム成分とするものが多い¹⁾。したがって、その結石形成の原因を診断するうえで、尿中の蓂酸濃度を測定することは大切である。尿中蓂酸排泄が増加する原因としては、蓂酸およびその前駆物質を含有する食物の摂取、原発性過蓂酸尿症、回腸疾患などがあげられる²⁾。また、最近ではラットの蓂酸カルシウム尿症を用いた結石形成およびその抑制実験が盛んに行なわれている³⁾。その際に尿中蓂酸測定は必須のものである。しかし、蓂酸測定は現在の測定機器の進歩にもかかわらず、難しいとされている。著者はラジオエンザイム法を1981年に紹介した⁴⁾が一般化しなかった。また、1984年にイオンクロマトグラフィーを用いた測定法を紹介した⁵⁾が、測定

機器およびカラムが高価であることより一般化は難しいと考えている。蓂酸を測定する多くの研究者はその蓂酸に特異的酵素を用いることと、測定操作が簡単であることより酵素法を用いて測定している。したがって、蓂酸測定キットは蓂酸研究のためにおおいに望まれるところである。そこで、Crider らにより報告⁶⁾されたキットを用いた尿中蓂酸測定を行なったのでその結果を報告する。

対 象 ・ 方 法

順天堂大学に外来通院患者の蓄尿を用いた。蓄尿に20%ヒビテングルコネート 2 ml を容器に加えたものに行ない、攪はん後その一部を塩酸にて pH 2 以下とし測定した。

測定法：蓂酸測定に用いたアスカ、シグマ蓂酸キッ

トは Sigma 社より提供された。検体を抽出用バイアルに 1 ml 入れ、約 5 分振とう後液層を捨てる。2 ml の蒸留水にて洗浄し、0.2 N の水酸化ナトリウムにて吸着剤より抽出する。それぞれの反応用試験管に検体抽出液、またはブランクとしての水 0.1 ml を加える、それぞれに尿酸試薬 A 調整液 1 ml を加え、混和し、37°C 20 分間インキュベートする。水 2 ml をおのおのに加え、590 nm でブランクを対照として、吸光度を日立 557 Double Wave Length Double Beam Spectrophotometer にて測定した。結石を有さぬ健康男性 8 名 (24.8±3.3 歳)、カルシウム結石患者 24 名 (49.7±10.9 歳、男 21、女 3) の 24 時間蓄尿 (20% ビテングルコネート 2 ml 添加した容器に蓄尿) を行ない、攪はん後その一部を塩酸にて酸性化し、尿酸測定を行なった。相関性に関する検討は単回帰分析を用い、推計学的有意性に関しては F 検定を行なった。

結 果

標準曲線は尿酸濃度 0.5~100 mg/l の範囲で直線関係を示し、推計学上有意であった (Fig. 1)。15 検体の尿にそれぞれ 5, 10, 25 mg/l の標準尿酸を添加し測定した値より得られた添加回収量は直線関係を示した (Fig. 2)。しかし、標準曲線と尿をサンプルとした添加回収曲線より得られた添加回収率の平均は 45% であり、標準曲線との比較で尿中尿酸濃度を求めることは不可能であった。また、回収率をよくするための EDTA⁷⁾、塩化第二鉄⁶⁾などの尿サンプル処理による標準尿酸との比較の回収率に及ぼす影響は Table 1 に示すごとくである。ここで、添加量と回収量とは有意な相関 (Fig. 2) をすることより、尿中尿酸濃度に近い 25 mg/l の尿酸をそれぞれの尿に添加して測定した。すなわち、一検体より無添加と尿酸 25 mg/l

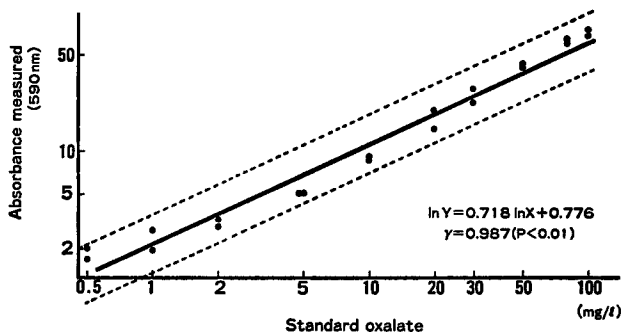


Fig. 1. The relationship between the absorbance of the final color and the oxalate concentration is linear. Dotted lines represent 95% confidence limits for line of regression.

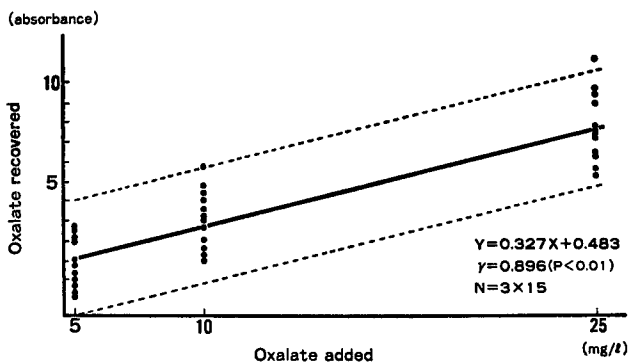


Fig. 2. Three levels of oxalate were added to each of 10 urine specimens containing normal amounts of oxalate (10~30 mg/l). The overall recovery rate was 45%, but the relation between the recovered amounts at 3 different levels is linear. Dotted lines represent 95% confidence limits for line of regression.

Table 1. Effects of pretreatment with HCl, EDTA, or FeCl₃ on recovery of oxalate. Ten fresh-voided urine samples were pretreated with HCl, EDTA, or FeCl₃.

Urine-processing substance	Initial oxalate (mg/L)	Oxalate added (25 mg/L)	Recovered oxalate (%)
HCl	7.59±2.53	21.15±2.53	54.18±6.44
FeCl ₃	7.13±2.40	24.30±2.47	68.71±5.48
EDTA	12.55±4.28	29.18±5.06	66.54±4.46

Table 2. Reproducibility of enzymatic method of urinary oxalate.

	n	mg/L		CV, %
		Mean	SD	
Within-run	5	4.62	0.25	5.4
	5	11.62	2.32	20.0
	5	19.56	3.33	17.0
Day-to-day	10	13.72	2.47	18.0
	10	25.98	4.18	16.1

添加したものをそれぞれ測定し、その検体の尿酸濃度を決定した。この方法の再現性を検討した結果での CV は 5.4~20% であった (Table 2)。アスコルビン酸の干渉に関しては、尿 5 検体に対してアスコルビン酸 1, 3 mmol/l をそれぞれ添加し測定するとアスコルビン酸 1 mmol/l 添加で平均 13.81 mg/l, アスコルビン酸 3 mmol/l 添加で平均 60.44 mg/l の誤差がでる (Table 3)。また、40 検体の尿より得られた尿中尿酸濃度を酵素法とイオンクロマトグラフィーとを比較したところ、推計学上有意な相関関係が示された (Fig. 3)。また、これを EDTA または塩化第二鉄

Table 3. Effect of urinary ascorbic acid levels on oxalate assays.

Sample	Ascorbic acid (mmol/L) added to urine		
	None	1	3
1	13.87	27.74	68.48
2	11.47	26.76	73.03
3	6.56	18.04	55.76
4	4.56	14.79	80.70
5	5.19	23.36	65.88
Mean±SD	8.33±3.68	22.14±5.00	68.77±8.22

Table 4. Comparison between enzyme method and ion chromatography for measuring urine oxalate pretreated by 3 different methods. A significant relation is observed between the HCl-processed enzyme method and the chromatography method. A good correlation is observed for HCl-processed urine as measured by either method.

Enzyme method			Ion chromatography		
①			①	HCl-processed	
**	②		②	FeCl ₃ -processed	
0.785	**	③	③	EDTA-processed	
* 0.758	** 0.778				
** 0.780	N.S. 0.401	N.S. 0.342	④		
** 0.898	N.S. 0.539	N.S. 0.576	** ⑤		
** 0.790	N.S. 0.545	N.S. 0.444	** 0.849	*	⑥
				0.748	

** P<0.01 * P<0.05
N.S. Non-significant

処理による尿サンプルと比較すると Table 4 に示すごとくであった。正常対照およびカルシウム尿路結石患者の 24 時間尿中尿酸排泄量 (mean±SD) はそれぞれ、24.4±9.1 mg, 19.9±10.3 mg であった。抽出液をイオンクロマトグラフィーにて陰イオン分析を行

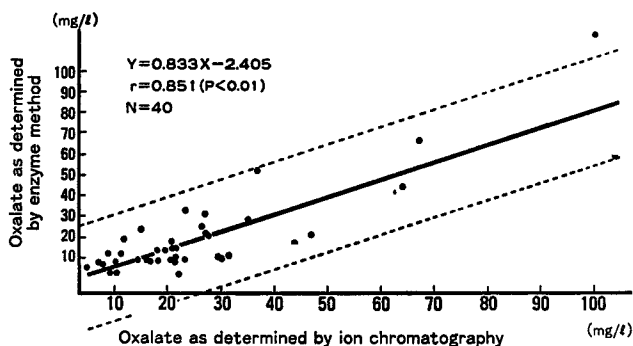


Fig. 3. Comparison between enzyme method and ion chromatography. Urine oxalate in 40 different urine samples was measured by the enzyme method and by ion chromatography.

なうとほとんど尿中に含まれる陰イオン（クロール、
 燐酸、硫酸）の量と同様なパターンを示した。これらの
 陰イオンの回収率は90%以上であった。

考 察

本法は Crider らにより1984年報告され、測定が
 簡単であり再現性も良好で注目された。また同様な方
 法が市山ら⁹⁾、野々村ら¹⁰⁾により紹介され、再現性お
 よび添加回収率も良好と報告されている。本法は市販
 のキットであり、誰でもがほぼ同様に尿酸が測定でき
 る点が特徴である。したがって、本法の検討を行なっ
 た結果、二三の問題点を発見したので明らかにした
 い。まず、本法で Crider らの報告した添加回収率は
 100%前後である。しかし、市販のキットを用いて本
 法にて500検体以上の尿サンプルを測定した結果、標
 準尿酸と比較すると尿酸 25 mg/l の添加回収率は40
 ～50%であった。この原因としては酵素の阻害物質で
 ある硫酸と燐酸などが考えられる。Crider らによる
 と樹脂による抽出の過程で硫酸と燐酸は除かれると
 しているが、抽出液のイオンクロマトグラフィーによ
 る分析が示すごとく尿中硫酸と燐酸は抽出にて除去さ
 れずに抽出液中に残っている。尿中の硫酸と燐酸を除く
 目的で樹脂の抽出を行なうのであるとすると不必要な
 操作と考えざるをえない。したがって、これらの物質
 が反応液中には存在し、酵素阻害をする可能性がある。
 そこで、現在のキットの添加回収率が低いことはやむ
 をえないとして、それぞれの検体に対して尿酸 25
 mg/l を添加したのも同時に測定してもとの検体の
 濃度を求めることにより正確な測定が可能と考える。
 この方法が正確であることはイオンクロマトグラフィー
 による測定と推計学上有意な相関を示すことにより
 証明された。もう一つの問題点はアスコルビン酸の干
 渉である。アスコルビン酸の標準物質中に尿酸が混入
 している可能性も否定はできない。この点に関し
 Crider らは、尿酸測定時にはアスコルビン酸摂取を

避けることと尿に塩化第二鉄を加えることにより解決
 した¹⁰⁾。しかし、今回の酵素法とイオンクロマトグラ
 フィー法による検討では塩酸処理尿のみが相関性を示
 し、EDTA、塩化第二鉄処理は両方で相関性がなかつ
 た。塩酸処理尿の酵素法測定はいかなる尿処理のイオ
 ンクロマトグラフィーによる測定とも相関がよいこと
 より、酵素法による測定の尿処理は塩酸処理がよいと
 考えられる。本邦における尿中尿酸に関する報告より
 24時間尿酸排泄の平均はほぼ同様な傾向を示してい
 た (Table 5)。

結 語

今回検討した尿酸測定キットは測定が手軽で簡単で
 ある。標準尿酸との比較では回収率は低い、各サン
 プルごと既知量尿酸 (25 mg/l) 添加との比較でより
 正確に測定可能である。アスコルビン酸による干渉も
 あるが、その測定法の特徴を理解したうえで用いられ
 ばよい方法であると考えられる。

文 献

- 1) 高崎悦司：わが国における尿路結石症。日本医師
 会雑誌 95：2059～2063, 1986
- 2) 小川由英：腎結石の新しい診断法。循環器科 17：
 279～287, 1985
- 3) Ogawa Y, Yamaguchi K, Tanaka T and
 Morozumi M: Effects of pyruvate salts,
 pyruvic acid and bicarbonate salts in pre-
 venting experimental oxalate urolithiasis in
 rats. J Urol 135: 1057～1060, 1986
- 4) 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
- 5) Ogawa Y and Kitagawa R: Determination
 of urinary oxalate by ion chromatography:
 some modifications. Acta Urol Jpn 30: 147
 ～152, 1984
- 6) Crider QE and Curran DF: Simplified
 method for enzymatic urine oxalate assay.
 Clin Biochem 17: 351～355, 1984
- 7) Sheldon W, Smith PA and Flaker M: An
 improved procedure for measuring urinary
 oxalate using a commercial enzyme kit. Ann
 Clin Biochem 22: 428～429, 1985
- 8) Ichiyama A, Nakai E, Funai T, Oda T and
 Katafuchi R: Spectrophotometric determina-
 tion of oxalate in urine and plasma with
 oxalate oxidase. J Biochem 98: 1375～1385,
 1985
- 9) 野々村光生・岡田裕作・川村寿一・吉田修・市山
 新：尿酸酸化酵素を用いた新しい尿中尿酸定量法
 (市山法) について。泌尿紀要 31：397～405,
 1985
- 10) Crider QE: Effect of diluting samples for
 enzymic determinations of urinary oxalate.
 Clin Chem 31: 1080～1081, 1985

(1986年12月9日受付)

Table 5. 24-hour urinary oxalate excretions
 reported in the Japanese literature.

Author	Method	Urinary oxalate (mean±SD, mg/day)
Takasaki (1966)	Yarbro	29.1±9.9
Itoh (1978)	Hodgkinson	30.2±1.5 (SE)
Yachiku (1979)	Yachiku	29.5±12.6
Suzuki (1980)	Hodgkinson	27.2±14.3
Hohnoki (1980)	Hodgkinson	26.9±8.3
Takeuchi (1981)	Yachiku	31.3±11.0
Ogawa (1981)	Bennett	24.4±6.9
Yanagawa (1982)	Gas chromatography	32.1±10.4
Nonomura (1985)	Ichiyama	25.6±6.9
Ogawa (1986)	Ion chromatography	25.1±9.0
Ogawa (1986)	Crider	24.4±9.1