

簡単な尿中蓐酸の測定法

京都大学医学部泌尿器科学教室 (主任: 吉田 修教授)

竹 内 秀 雄*
岡 田 裕 作
吉 田 修

A SIMPLE COLORIMETRIC METHOD FOR DETERMINATION OF URINARY OXALATE

Hideo TAKEUCHI*, Yusaku OKADA and Osamu YOSHIDA

From the Department of Urology, Faculty of Medicine, Kyoto University

(Director: Prof. O. Yoshida)

Oxalate is a major constituent of more than two-thirds of urinary stones, but because of difficulty and complexity in measuring urinary oxalate, it has not been extensively studied.

A simple colorimetric method for measuring urinary oxalate is developed, modifying Snell and Snell's qualitative method. Oxalate is reduced to glyoxylate with zinc and hydrochloric acid and glyoxylate is determined by reaction with phenylhydrazine hydrochloride and subsequent oxidation with potassium ferricyanide to give a red-coloured formazan, which is measured colorimetrically at 530 m μ . Potassium ferricyanide is used instead of hydrogen peroxide because the colour fades rapidly with the latter.

The average excretion of urinary oxalate in non-urolithiasis patients was 31.3 ± 11.0 (Mean $\pm$ S.D.) mg/day.

Oxalate recovery was $90.2 \pm 13.0\%$ (Mean $\pm$ S.D.).

Other similar compounds except glyoxylate did not react with this method.

We think that this simple method for determination of urinary oxalate is reliable and useful for routine laboratory examination.

ここに報告する。

緒 言

尿路結石のなかでも蓐酸カルシウム含有結石は全体の70%以上を占め、たびたび再発をきたす临床上重要な疾患である。にもかかわらず、尿中蓐酸量の測定は、手技の煩雑さ、困難さにより一般にはほとんどなされておらず、その代謝も十分にとらえられていない。

最近われわれは、Snell, F.D. and Snell, C.T.¹⁾の定性法に改良を加え検討した結果、比較的簡単に尿中蓐酸量を測定しえるようになり、十分臨床検査として用いることができるようになったと思われるので、こ

測 定 原 理

Snell らの方法の原理は尿中蓐酸を塩酸酸性条件下で亜鉛末にて還元してグリオキシル酸とし、そのアルデヒド基の性質を利用してフェニルヒドラジンと作用させ、過酸化水素で酸化し、生ずる赤色化合物をみるというものである。当初われわれはこの方法で定量を試みたが、発色後すみやかに退色が起こり測定が不可能であった。そこで過酸化水素に代わる酸化剤としてフェリシアン化カリウムを用い定量法の改良を試みた。なお夾雑物質を除くため活性炭処理を加えた。

* 現 滋賀医科大学医学部泌尿器科学教室 (主任: 友吉唯夫教授)

測定方法

試薬

- 1) 0.1 M citrate buffer pH 6.0
- 2) 2 N HCl
- 3) 1%塩酸フェニルヒドラジン溶液：塩酸フェニルヒドラジン 100 mg を蒸留水 10 ml に溶解，用時調製。
- 4) Conc. HCl
- 5) 6%フェリシアン化カリウム溶液：フェリシアン化カリウム 300 mg を蒸留水 5 ml に溶かす。用時調製。
- 6) 活性炭粉末（半井化学）
- 7) 亜鉛末（無砒素亜鉛，砂状：半井化学）
- 8) 無水蓆酸（半井化学）：標準曲線作製のため。用時調製。

方法

- 1) 検体尿 2 ml に 0.1 M citrate buffer pH 6.0 を 2 ml 加え混和後活性炭 300 mg を加える。
- 2) thermo-mixer で20~30秒充分混和し，15分静置後濾過する。
- 3) 濾液 2 ml に 2 N HCl 2 ml と Zn 末 200 mg を加える。混和後15分静置し濾過する。
- 4) 濾液 2 ml に 1%塩酸フェニルヒドラジン溶液を 50 μ l 加え，煮沸水溶液中で2分間加熱した後流水中で冷却する。
- 5) 冷却後濃塩酸 1.8 ml を加え 6% フェリシアン化カリウム溶液 50 μ l 加え，10分後に 530 m μ 比色定量する。

結果

1) 発色の安定性について

発色のため酸化剤として用いるフェリシアン化カリの濃度を検討した結果，加える量を 50 μ l と定めた場合 4%以下では濃度に依存して発色の程度が異なるが，それ以上ではほとんど変化がないため 6%と定めた。本法にて呈した赤色は Fig. 1 のごとく1時間後も安定であった。

2) 標準曲線

Fig. 2 に示すごとく 10 mg/dl までばらつきもわずかで，一般に認められる尿中蓆酸量の測定範囲内では十分に直線関係が得られた。

3) 再現性について

同一検体を2度測定し平均と測定値のばらつきをみると Table 1 のごとくで，ばらつきも比較的少なく，

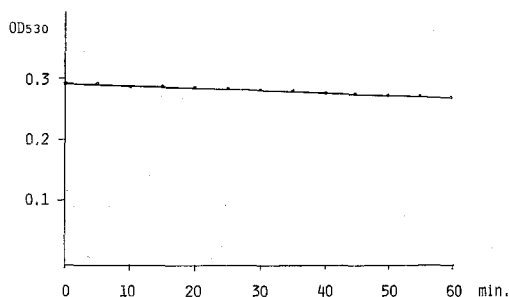


Fig. 1. Alteration of optical density.

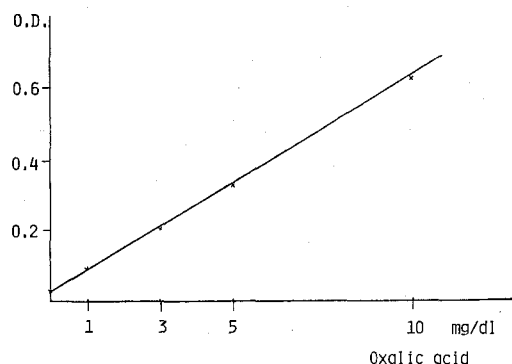


Fig. 2. Standard curve.

Table 1. Reproducibility of determination of urinary oxalic acid.

	Conc. of oxalic acid (mg/dl)	Variance of determination for mean value (%)
1	1.35	2.5
2	2.52	3.9
3	2.88	4.5
4	1.90	6.1
5	2.60	6.8
6	1.63	8.7
7	2.40	2.6
8	1.32	4.7
9	2.20	8.1
10	0.70	0.7

Mean $\pm$ S.D. 4.86 $\pm$ 2.57

ほぼ満足のいく再現性がみとめられた。

4) 回収率について

検体尿 1 ml に 0.01 mg の蓆酸を加えてその回収率をみると Table 2 のごとく平均90.2%であった。

5) 非結石患者の尿中蓆酸排泄量

泌尿器科入院の非結石患者10人（男4名，女6名，

Table 2. Recovery of oxalic acid added to urine.

Sample No.	Conc. of oxalic acid in control urine (mg/dl)	Conc. of oxalic acid after addition of 0.01 mg oxalic acid to 1 ml urine (mg/dl)	Recovery (%)
1	2.18	3.03	85
2	1.39	2.43	104
3	1.79	2.79	100
4	1.50	2.34	84
5	1.39	2.04	65
6	0.70	1.72	102
7	0.62	1.40	78
8	0.82	1.75	93
9	1.85	2.90	105
10	1.14	2.00	86

Mean $\pm$ S.D. 90.2 $\pm$ 13.0

Table 3. Urinary oxalic acid in non-urolithiasis patients.

	Conc. of oxalic acid (mg/dl)	Volume (ml)	Excretion of oxalic acid (mg/dny)
1	1.45	2980	43.2
2	2.98	780	23.2
3	1.80	1200	21.6
4	3.45	1450	50.0
5	1.00	2660	26.6
6	1.40	2480	34.7
7	3.34	1360	45.4
8	1.64	1320	21.6
9	1.80	1300	23.4
10	3.70	640	23.7

Mean $\pm$ S.D. 2.26 $\pm$ 1.00 1617 $\pm$ 803 31.3 $\pm$ 11.0

22歳～83歳)について尿中蓚酸排泄量を本法により測定したところ Table 3 のごとく 31.3 $\pm$ 11.0 mg/day (Mean $\pm$ S.D.) であった。

6) 類似化合物の発色について

グルタミン酸・乳酸・ピルビン酸・コハク酸・マロン酸・蟻酸・グリシン・グリオキシン酸・グリコール酸あるいは核酸代謝産物である尿酸・アラントインなどは、この方法で陽性となる可能性も考えられるので、それぞれ蓚酸と同じモル濃度の溶液で同様の操作をおこない、発色の程度を検討した。その結果グリオキシル酸をのぞく他の物質はほとんど発色せず、吸光

度は blank 程度であった (Table 4)。

考 察

尿路結石症における尿中蓚酸量の測定の重要性は、言をまたない。これまで種々の方法²⁻⁴⁾が報告されているが、いずれも手技が煩雑なため一般にはほとんど行なわれていない。われわれはより簡単な方法をと考え種々の方法を検討してきた。その1つとして Snell and Snell¹⁾の方法を改良した方法(八竹ら⁵⁾の方法とほぼ同様の方法)にて蓚酸測定を試みたが、過酸化水素を用いた発色は時間的に不安定なため、より安定

Table 4. Optical density of various compounds.

	0.D.
Oxalic acid (0.4 mM)	0.350
1 Uric acid	0.028
2 Allantoin	0.021
3 Sodium glutamate	0.026
4 Sodium lactate	0.021
5 Sodium pyruvate	0.023
6 Sodium succinate	0.021
7 Glycine	0.018
8 Malonic acid	0.032
9 Sodium formate	0.027
10 Glyoxalic acid	0.670
11 Glycolic acid	0.026
Blank	0.020

な発色剤としてフェリシアン化カリを用い、今回発表した方法を行なった。

本法は時間も短く、手技も簡単であり、回収率もよく十分に日常検査として利用できると思われる。ただ本法も八竹ら⁵⁾も述べているごとく、室温および試薬の状態などで多少の変動があり、測定日ごとに標準曲線の作成を行なう必要がある。

本法の測定方法の原理上、種々の物質が本法にて陽性となる可能性があると考えられたが、グリオキシル酸を除く他の物質はほとんど発色されなかった。グリオキシル酸の発色は当然であるが、尿酸と等モルで約1.9倍の吸光度を示すことからグリオキシル酸の濃度が高い場合は尿酸とグリオキシル酸の総和を測定していることになり、blankとしてグリオキシル酸のみの呈色を差し引く必要がある。グリオキシル酸の尿中排泄量は2.2~6.0 mg/dayとの報告があり⁴⁾、わずかであり、試みに行なった10人の結石患者でもグリオキシル酸は認めなかった。従って普通は考慮の必要はない

が、primary hyperoxaluriaの場合、尿中グリオキシル酸が高いと報告されており⁴⁾、このような場合には同一検体で亜鉛還元操作をするものとし、その差を真の尿酸量とすべきである。

またアラントインが発色しないことはラットを用いた動物実験でも尿中尿酸量の測定は可能と思われる。

結 語

簡単な尿中尿酸測定法を確立すべく、Snell and Snellの方法を改良した。改良のおもな点は酸化剤として過酸化水素の代わりにフェリシアン化カリを用いた点である。本法は回収率もよく日常臨床検査として十分利用できると思われる。

本実験に協力頂いた保坂久美子、樋口房子両氏に感謝する。

文 献

- 1) Snell, F.D. and Snell, C.T.: Colorimetric Methods of Analysis, 3rd. ed. p.378, D. Van Nostrand Company, Inc., Princeton, 1957.
- 2) Hodgkinson, A. and Williams, A.: An improved colorimetric procedure for urine oxalate. Clin. Chim. Acta, **36**: 127, 1972.
- 3) Ribeiro, M.E. and Elliot, J.S.: Direct enzymatic determination of urinary oxalate. Invest. Urol., **2**: 78, 1964.
- 4) Hockaday, T.D.R., Frederick, E.W., Clayton, J.E. and Smith, L.H., Jr.: Studies on primary hyperoxaluria II. Urinary oxalate, glycolate, and glyoxylate measurement by isotope dilution methods. J. Lab. & Clin. Med., **65**: 677, 1965.
- 5) 八竹 直・古武敏彦・西井易穂・清水トシ子: 尿中尿酸に関する検討. 第1報, 尿中尿酸の新しい測定法について. 日泌尿誌, **70**: 286, 1979.

(1980年12月11日受付)