

固定化ウリカーゼを利用した血清尿酸の自動 螢光測定法の研究

池 本 正 生, 田 畑 勝 好

Fluorometric Determination of Serum Uric Acid Using Immobilized Uricase

Masaki IKEMOTO and Masayoshi TABATA

ABSTRACT: We propose a novel method for the continuous-flow analysis of uric acid in serum using immobilized uricase in the column phase combined with fluorescence detection.

The method is based on the determination of fluorescence formed by homovanillic acid and hydrogen peroxide which is produced by the action of uricase on uric acid. The ratio of the dialysis rate of uric acid in serum to that in uric acid standard solution and the fluorescence intensity produced by the action of peroxidase depended on the kind of buffers used. When bistris propane buffer was used, the dialysis rate of uric acid in serum corresponded to that in uric acid standard solution, and, furthermore, the high fluorescence intensity was obtained.

The present method was found to give perfect linearity up to 15.0 mg uric acid/dl with satisfactory precision, reproducibility, sensitivity and recoveries, and the results were well correlated with those obtained by the uricase-catalase colorimetric method.

Key Words: immobilized uricase column, homovanillic acid, dialysis, fluorometric method, uric acid

は じ め に

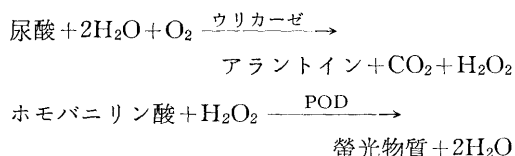
尿酸の測定法は、尿酸のアルカリ性下での還元性を利用する還元法^{1~5)}と尿酸分解酵素を用いた酵素法^{6~11)}に大別される。還元法は、アル

カリ化剤の選択、多量の試料が必要であること、また非尿酸性還元物質の影響を受けるという大きな問題点がある。一方、酵素法は、尿酸を特異的に分解するウリカーゼを用いた方法で還元法にみられた尿酸以外の還元物質の影響を受けないことが特徴である。すなわち、ウリカーゼを尿酸に作用させ生成する過酸化水素（以下 H_2O_2 と記す）をペルオキシダーゼ（以下 POD と記す）の存在下において色原体（4-アミノア

京都大学医療技術短期大学部衛生技術学科
京都市左京区聖護院川原町53
Division of Medical Technology, College of Medical
Technology, Kyoto University
1984年7月31日受付, 同年8月15日受理

ンチピリンとフェノール、4-アミノアンチピリンとジメチルアニリンなど)と反応させて生成する色素を定量する方法が一般的である。しかしながら感度の点でまだ十分とは言えない。

そこで我々は、その点を克服するために蛍光法¹²⁻¹⁵⁾を用いて血清尿酸の自動蛍光測定法を試みた。その測定原理は、反応式



により尿酸を固定化ウリカーゼで分解して H_2O_2 を得、その H_2O_2 とホモバニリン酸 (HVA) を POD の存在下で反応させ、その結果生じる蛍光物質を励起波長 315 nm、蛍光波長 425 nm の波長で測定するものである。本蛍光法は、 H_2O_2 に対する影響物質をできるだけ除去するため 3 インチのダイアライザーを用いているが、同時に透析される血清中尿酸と標準液(水溶液)中尿酸のそれぞれの透析率が、その受容液となる緩衝液の種類の違いによって異なることを見出したので、Good 緩衝液の種類およびその pH と血清および標準液中尿酸のそれぞれの透析率との関係について検討し、さらに試料希釈液が尿酸の透析率に及ぼす影響についての検討も行ない、透析率に差が生じる原因の解明を行った。また従来用いられているホウ酸緩衝液より蛍光強度の高い緩衝液を見つけてきたので、使用する緩衝液の至適条件をも併わせて検討した。さて HVA による蛍光法は、血清中共存物質による減蛍光作用はなく試薬も安定で高感度であることから試料の微量化が可能であり、前述の検討に基づいて尿酸の自動蛍光測定法の開発を試みた。

材 料 と 方 法

〔機器〕

1. 蛍光分光光度計: Hitachi 650-10S (フローセル; 90 μl 用)
2. テクニコン・オートアナライザー I 型

〔試薬〕

1. ウリカーゼ (EC 1. 7. 3. 3, 4. 1 U/mg, *Candida Utilis*, Grade II, Lot. 1296, 東洋紡)
 2. ペルオキシダーゼ (EC 1. 11. 1. 7, 117 Purpurogallin U/mg, 0. 87 RZ, Horseradish, Grade III, Lot. 2158, 東洋紡) 蒸留水で溶解し、冷蔵庫保存した。4 週間は安定。
 3. ホモバニリン酸 (特級, Lot. M2N 1858, 半井化学) 0. 01 N 酢酸に溶解した。4 週間は安定。
 4. Good 緩衝液 (半井化学)
 - 1) Bistris Propane {1, 3-Bis [tris (hydroxymethyl) methylamino] propane, Lot. M3K 3586}
 - 2) Bistris [2, 2-Bis (hydroxymethyl)-2, 2', 2''-nitrilotriethanol, Lot. M3H 2961]
 - 3) TES-Na [N-Tris (hydroxymethyl) methyl-2-aminoethane sulfonic Acid Salt, Lot. V9E 2884]
 - 4) Tricine [N-Tris (hydroxymethyl) methylglycine, Lot. M2N 1818]
 - 5) TAPS [N-Tris (hydroxymethyl) methyl-3-aminopropane sulfonic Acid, Lot. M3A 6407]
 - 6) HEPES-Na [N-(2-hydroxyethyl) piperazine-N'-2-ethane sulfonic Acid Sodium Salt, Lot. M3F 3849]
 5. 過酸化水素水 (特級, 30% 水溶液, Lot. 61 20, 三徳化学)
 6. 牛血清アルブミン (Fraction V, 96~99% アルブミン, Lot. 31F-0587, Sigma)
 7. 尿酸 (特級, Lot. M2K 8636, 半井化学)
 - 1) 尿酸標準水溶液: 尿酸を 60 mg/dl 炭酸リチウム水溶液で溶解して 15 mg/dl 溶液とし、その後蒸留水で希釈して希釈系列を調整する。
 - 2) 尿酸標準アルブミン溶液: 尿酸を 5 g/dl 牛アルブミン水溶液で溶解して 15 mg/dl 溶液とし、その後 5 g/dl 牛アルブミン水溶液で希釈して希釈系列を調整する。
- その他の試薬は、半井化学のものを使用した。
8. 多孔性アルキルアミンガラス粒子 (孔径 500 $\text{\AA}$, 粒子サイズ 125~177 μ , Lot. 092980-3,

Pierce 化学社)

〔酵素の固定化と固定化酵素カラムの作成〕

グルタルアルデヒドを用いたシッフ塩基結合法¹⁶⁾により, ウリカーゼをアルキルアミンガラス粒子に固定化した。ウリカーゼの固定化率を遠藤らの方法¹⁰⁾により計算しタンパク質の収率として75%を得た。この固定化酵素は, 内径 1.5 mm, 長さ 10 mm のカラムに充填して, 固定化ウリカーゼカラムを作成した¹⁰⁾。

〔分析方法〕

1. 用手法

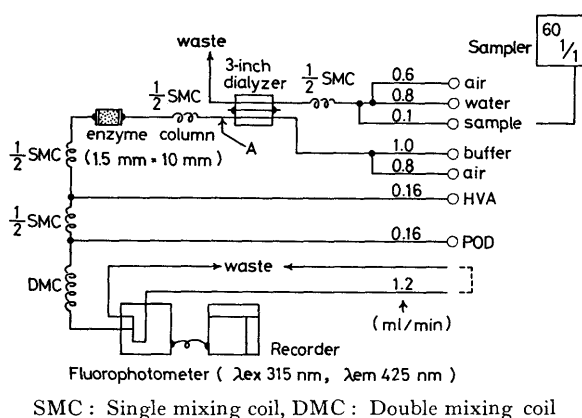
用手法は, 以下に示す順序で測定した。

- 1) 試料 (H_2O_2 , 尿酸標準水溶液または患者血清) 各 0.05 ml に緩衝液 3.0 ml を加え混和した。 H_2O_2 は $5 \times 10^3 \sim 1 \times 10^4$ 倍に希釈して用いた。
- 2) 1) の混合液に 5 mg/dl POD 試薬, 20 mg/dl HVA 試薬をそれぞれ 0.02 ml ずつ添加し十分に混和した。
- 3) 2) の混合液に 10U/ml ウリカーゼ緩衝液 (0.1M ほう酸緩衝液, pH 8.5) を 0.01 ml 添加しよく混和する。10分間反応させた後, 各緩衝液を対照として螢光強度を測定した。
- 4) 盲検は, 試料の測定と同様に各試薬を添加混和しウリカーゼ緩衝液の代わりにほう酸緩衝液を加え, 緩衝液を対照として, 螢光強度を測定した。なお反応はすべて 37°C で実施した。

2. 自動分析法

(透析法)

図 1 に尿酸測定用フローダイアグラムを示した。固定化ウリカーゼカラムリアクターをフローダイアグラムに示されている位置に組み込んだ。3 インチのダイアライザーを用い緩衝液を受容液として尿酸を透析後, カラムリアクターに導き, ここで H_2O_2 を生成させた。生成した H_2O_2 に HVA, POD 試薬を添加しミキシングコイルを介して室温で約 2 分間反応させた。そして 315 nm の励起波長を照射し, 425 nm の螢光強度を測定した。



SMC: Single mixing coil, DMC: Double mixing coil

図 1 オートアナライザーに固定化ウリカーゼカラムリアクターを装着した血清尿酸の分析システム

(非透析法)

図 1 のフローダイアグラムから 3 インチダイアライザー, 水ラインおよびその空気ラインを取り除き, サンプルチューブ (0.1 ml/min) を A の位置に接続して直接試料を挿入し, 最終的に螢光物質の螢光強度を測定した。

尿酸標準水溶液と尿酸標準アルブミン溶液および患者血清中の尿酸の透析率は, 透析法によって最終的に得られた螢光物質の螢光強度を非透析法で最終的に得られた螢光物質の螢光強度の百分率として求めた。非透析法に使用した試料はあらかじめ 40 倍に希釈した。

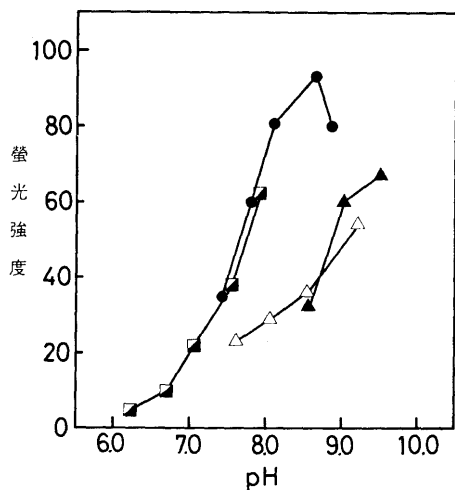
3. ウリカーゼ・カタラーゼ・ハンチ反応法¹¹⁾

本法との相関関係を求めるために, 比色法として一般的に規準法に準ずる方法とされているウリカーゼ・カタラーゼ・ハンチ反応法を選んだ。その原理は, 尿酸をウリカーゼでアラントインに分解し, このとき生じた過酸化水素とカタラーゼの共存下でメチルアルコールをホルムアルデヒドに酸化する。ホルムアルデヒドにアセチルアセトンとアンモニウム塩を作用させ, 生成する 3,5-ジアセチル-1,4-ジヒドロルチジンの黄色を波長 410 nm で比色定量する。

結 果

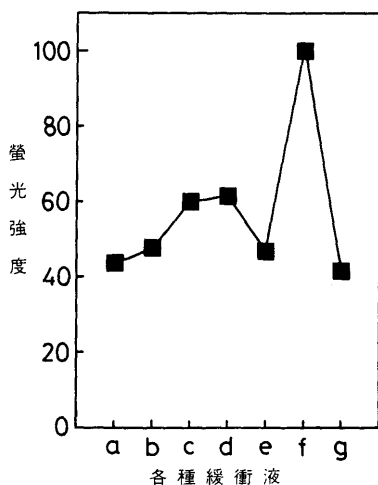
1. 緩衝液の種類とその pH の螢光強度への影響

試料として H_2O_2 を用い緩衝液としてトリス塩酸、リン酸、グリシン、ホウ酸の各緩衝液（それぞれ0.1M）を用いて pH 5.5~9.5 の範囲で用手法により蛍光強度を求めたところ、トリス塩酸緩衝液, pH 8.5 で最大の蛍光強度が得られた。それぞれの緩衝液の pH がアルカリ側ほど蛍光強度は高い傾向を示した（図2）。そ



Phosphate (■), Tris (●), Borate (△), Glycine (▲)
(緩衝液濃度はすべて0.1Mとした。試料: H_2O_2)

図2 緩衝液の種類とその pH の蛍光強度への影響



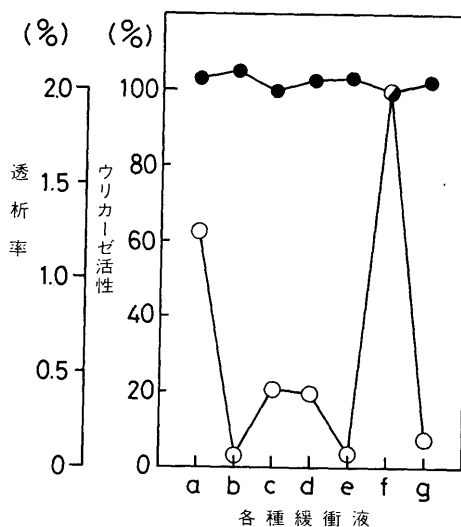
Tris (a), TAPS (b), HEPES (c), TES (d),
Tricine (e), Bistris Propane (f), Bistris (g)
緩衝液(a~g): 0.1M, pH8.5
非透析法(Bistris Propaneの蛍光強度を100とした。試料 H_2O_2)

図3 各種緩衝液の蛍光強度

こでさらに Good 緩衝液の pH を8.5に固定し、自動分析法の非透析法により H_2O_2 を試料として Good 緩衝液間の蛍光強度の差の検討を行なった。その結果, Bistris Propane 緩衝液の場合は、他の緩衝液に比べて約2倍の蛍光強度を示した（図3）。

2. 各種 Good 緩衝液における固定化ウリカーゼの活性と pH 8.5 での各緩衝液に対する尿酸標準水溶液の透析率の吟味

図1の分析システムの非透析法により $1 \times 10^4 \sim 1 \times 10^5$ 倍に希釈した H_2O_2 と尿酸標準水溶液を用いて、固定化ウリカーゼの Tris, TAPS, HEPES, TES, Tricine, Bistris Propane, Bistris の各緩衝液中での活性を測定した。その結果、固定化ウリカーゼはどの緩衝液においてもほとんど同一の活性を示した（図4）。一方、各緩衝液に対する尿酸標準液中の尿酸の透析率を求めるために、尿酸標準水溶液の希釈系列を用い、透析法と非透析法により最終的に得られる蛍光物質の蛍光強度をそれぞれ測定し、それ



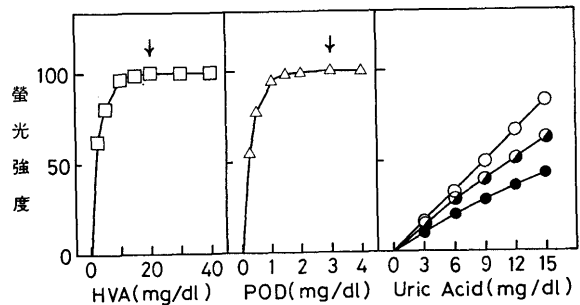
Tris (a), TAPS (b), HEPES (c), TES (d),
Tricine (e), Bistris Propane (f), Bistris (g)
緩衝液(a~g): 0.1M, pH8.5
○: 尿酸標準水溶液の透析率, ●: ウリカーゼ活性
(Bistris Propane 緩衝液中での透析率およびウリカーゼ活性を100%とした。試料 6.0mg/dl 尿酸標準水溶液)

図4 各種緩衝液におけるウリカーゼ活性と尿酸標準液中の尿酸の透析率

から各緩衝液における測定感度の補正を行なった。その結果 Bistris Propane 緩衝液に対する透析率が最も高く、最も低い透析率を示した TAPS 緩衝液の約15倍であった(図4)。

3. HVA, POD および緩衝液の至適濃度の検討

尿酸標準アルブミン溶液を用い HVA, POD 及び Bistris Propane 緩衝液の至適濃度の検討を行なった。図5より HVA 20 mg/dl, POD 3 mg/dl 以上の濃度では、蛍光物質の蛍光強度は変化がなかった。したがって、HVA, PODの使用濃度は最少必要量で十分であるので、それらの至適濃度は、HVA 20 mg/dl, POD 3.0 mg/dl であった。また、緩衝液濃度が低濃度(0.05M, 0.075M)では、本蛍光法による尿酸の検量線は直線性を得ることができず、かつ蛍光物質の蛍光強度も緩衝液濃度の減少とともに低下した。0.1 M の濃度では検量線の直線性が尿酸濃度にして 15 mg/dl まで得られ、さらに蛍光物質の蛍光強度は緩衝液濃度が3種類のうちで最も高かった。したがって、自動分析法による以後のデータは、20 mg/dl HVA, 3.0



- 1) 試料: 15mg/dl 尿酸標準アルブミン溶液, 緩衝液: Bistris Propane, 0.1M, pH8.5
- 2) 直線性の検討に使用した緩衝液及び濃度: Bistris Propane (0.1M:○, 0.075M:●, 0.05M:●)
試料: 尿酸標準アルブミン溶液, HVA, PODの濃度はそれぞれ 20mg/dl, 3mg/dlとした。

図5 HVA, POD の至適濃度と直線性に及ぼす緩衝液濃度の影響

mg/dl POD, 0.1 M の緩衝液濃度を使用して得た。

4. Good 緩衝液の種類とその pH 変化に伴う尿酸標準液及び血清の透析率の変動

緩衝液として Tris, Bistris Propane, TES, TAPS (それぞれ 0.1 M) を用いて各緩衝液に設定されたそれぞれの pH での尿酸標準液(水溶液, アルブミン溶液)と患者血清の透析率を求めた(図6, 7)。図6から Tris 緩衝液では

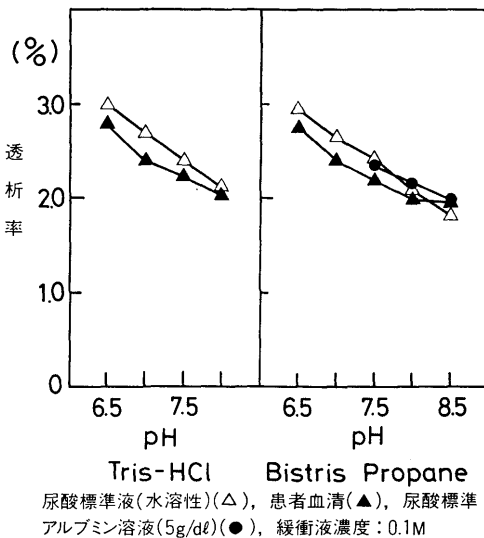


図6 Tris, Bistris Propane 緩衝液の pH 変化に伴う尿酸標準液及び血清中尿酸の透析率の変動

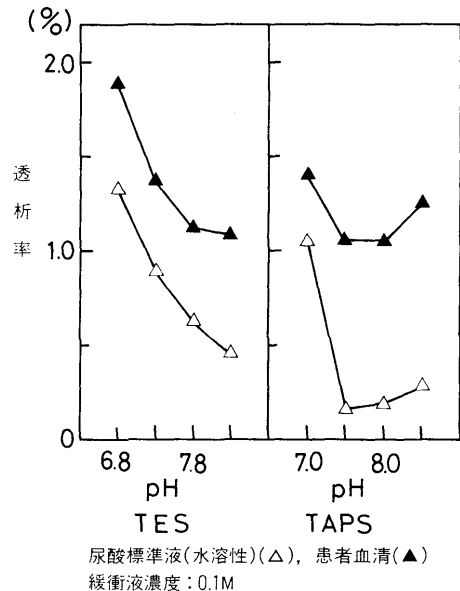


図7 TES, TAPS 緩衝液の pH 変化に伴う尿酸標準液及び血清中尿酸の透析率の変動

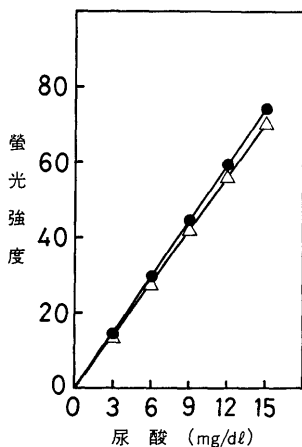
pH のすべての範囲 (6.5~8.0) で尿酸標準液 (水溶液) と患者血清を用いて得られた透析率は一致せず前者の方が高い値を示した。同様に Bistris Propane 緩衝液でも, pH が6.5~8.0の範囲では同じ傾向を示したが, pH 8.5 ではその傾向は逆転した。しかし尿酸標準水溶液の代わりに尿酸標準アルブミン溶液を用いると, 患者血清の透析率と尿酸標準アルブミン溶液のそれとはほぼ一致した。

一方, TES, TAPS 緩衝液については図7から尿酸標準水溶液と患者血清の透析率が一致する pH は, 設定された pH の範囲内では存在しなかった。特に TAPS 緩衝液では, pH 7.5~8.5 の範囲で患者血清に比べて尿酸標準水溶液の透析率が極端に低いことが明らかとなった。

5. 直線性

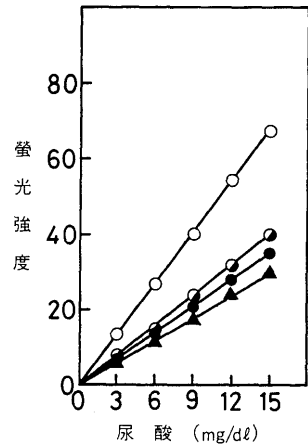
図8に, 透析法による pH 8.5, 0.1 M Bistris Propane 緩衝液を用いた時の尿酸標準水溶液と尿酸標準アルブミン溶液の検量線を示す。検量線は両者とも 15 mg/dl まで直線性を得ることができた。しかし尿酸標準アルブミン溶液のほうが, 若干高い透析率を示した。

6. 蛍光強度 (透析率) に及ぼす試料希釈液の影響



尿酸標準液: 水溶性(△), アルブミン溶液(●)
緩衝液: 0.1M Bistris Propane, pH8.5

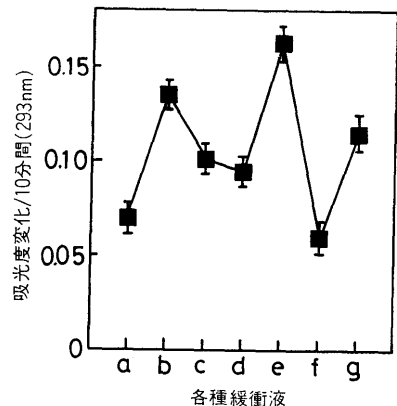
図8 尿酸の透析率に及ぼすアルブミン溶液の効果と直線性



試料希釈液: 蒸留水(○), 0.05M-NaCl(●), 0.1M-NaCl(●), Bistris Propane(0.1M, pH8.5)(▲)
試料: 尿酸標準アルブミン溶液

図9 試料希釈液の違いによる透析率の変動

蒸留水, 0.05 M および 0.1 M NaCl 溶液, 0.1 M Bistris Propane 緩衝液 (pH 8.5) の4種を試料希釈液として用い, 尿酸標準アルブミン溶液を試料として, 図1の分析システムの透析法により蛍光強度を測定して, それにより試料希釈液の違いによる尿酸の Bistris Propane 緩衝液に対する透析率の比較検討を行なった (図9)。最も高い透析率を示した試料希釈液は蒸留水であった。



Tris (a), TAPS (b), HEPES (c), TES (d), Tricine (e), Bistris Propane (f), Bistris (g)
緩衝液(a~g): 0.1M, pH8.5

この実験は用手法で行った。尿酸, ウリカーゼの終濃度: 1.66mg/dl, 0.0137 U/ml。

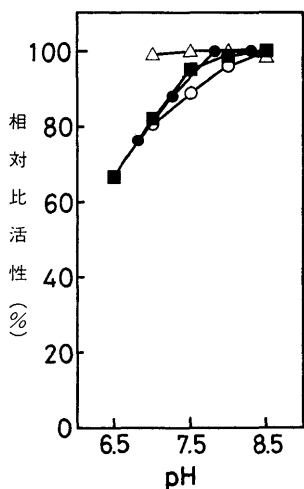
図10 各種緩衝液中でのウリカーゼ活性の比較

7. 液性ウリカーゼ活性に及ぼす各種緩衝液の影響

液性ウリカーゼ活性に及ぼす緩衝液の影響を用手法で調べた。図10は、基質（尿酸）濃度をウリカーゼの尿酸に対する K_m 値の約10倍量とし、それぞれの緩衝液の濃度を 0.1 M, pH を8.5とした系でウリカーゼ添加後 37°C, 10分間の分解反応を尿酸の 293 nm の吸収の変化として捉えたものである。なお反応は零次反応であった。図10から、これらの緩衝液の中で最もウリカーゼ活性が高かったのは Tricine 緩衝液で、最も低かったのは Bistris Propane 緩衝液であった。

8. 液性及び固定化ウリカーゼの pH 活性曲線

液性ウリカーゼの pH 活性曲線はホウ酸緩衝液を用い、固定化ウリカーゼの pH 活性曲線は Bistris Propane, TES, TAPS の各緩衝液を用いて行なった。図11より、液性及び固定化ウリカーゼの pH 活性曲線は TAPS 緩衝液を除いてほとんど一致した。固定化ウリカーゼで、TAPS 緩衝液を用いた時は、Bistris Propane, TES の各緩衝液を用いた時に比べて至適 pH の範囲が酸性側に少し拡がりを見せた。



液性ウリカーゼ(■), 固定化ウリカーゼ(△, ○, ●)
緩衝液: Borate(■), TAPS(△), TES(●),
Bistris Propane(○)。試料: 6.0mg/dl 尿酸標準液

図11 液性及び固定化ウリカーゼの各緩衝液における pH 活性曲線

9. 回収率と再現性について

Bistris Propane (0.1 M, pH 8.5) 緩衝液を用いて、添加回収試験を行なった。尿酸の濃度が 2.7 mg/dl, 8.6 mg/dl の 2 種のプール血清 9 容に対し、25 mg/dl, 50 mg/dl の尿酸標準液 1 容の割合に加え、よく混和後試料として用い、図 1 の分析システムの透析法により測定した。低濃度プール血清で回収率はそれぞれ98, 102%, 高濃度プール血清で回収率はそれぞれ100, 98 %と非常に満足できる結果となった。

また再現性としては、3.0 mg/dl, 9.7 mg/dl の患者血清を用いて同時再現性を検討したところ、変動係数 (C.V.) はそれぞれ1.1, 1.4%と非常に良好な結果が得られた。

10. 固定化ウリカーゼカラムの使用安定性

図12のように、固定化ウリカーゼカラムは3

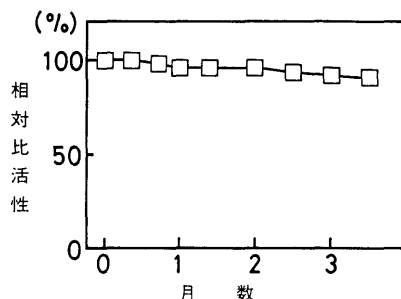
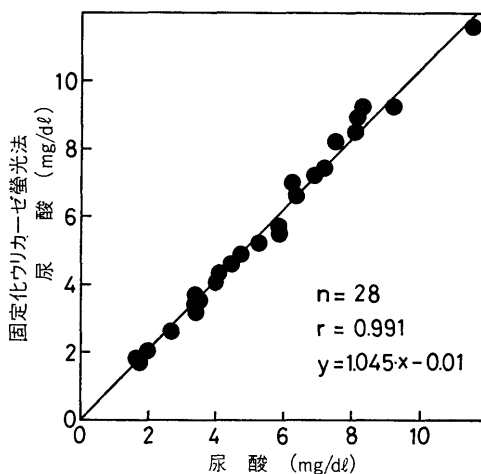


図12 固定化ウリカーゼカラムの使用安定性



ウリカーゼ・カタラーゼ・ハンチ反応法

図13 比色法と蛍光法との相関図

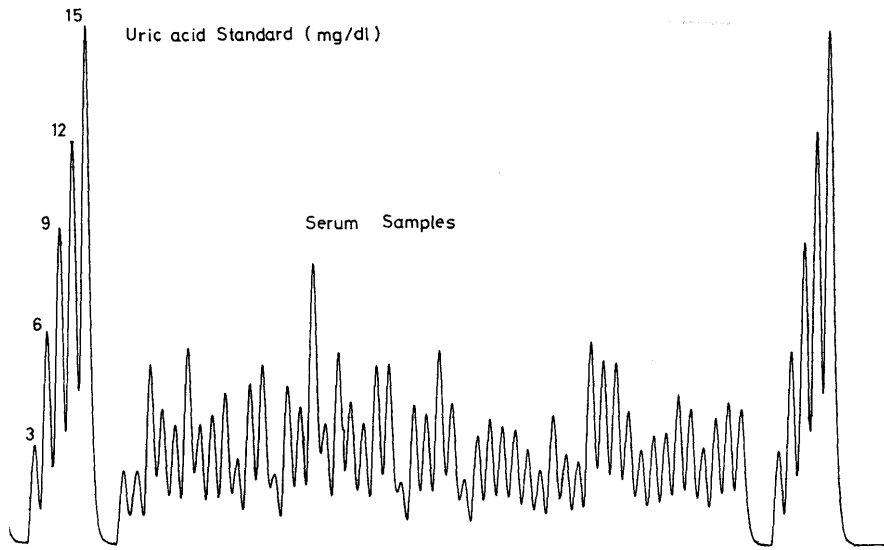


図14 螢光法のフローチャート(血清)

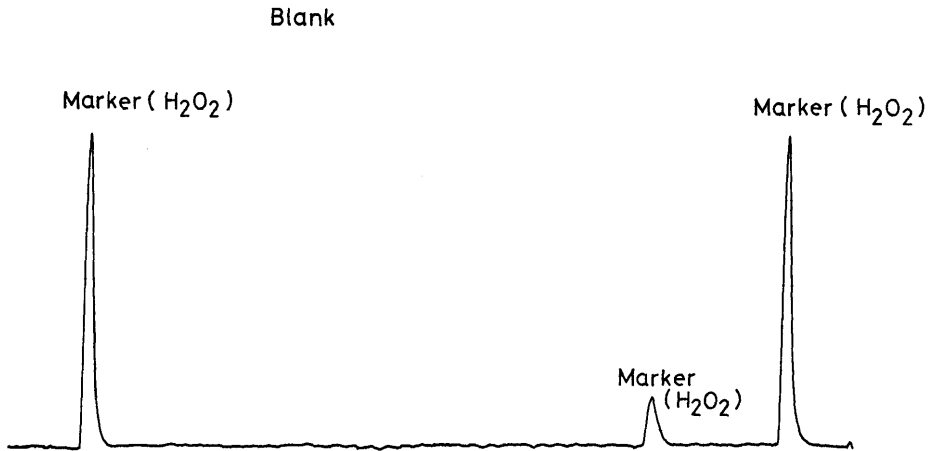


図15 螢光法のフローチャート(ブランク)

ヶ月余りたっても約10%の活性低下にすぎず，使用安定性は極めて高かった。なお，カラムの保存には pH 7.0～7.5 の 0.1 M リン酸緩衝液を用い，固定化ウリカーゼカラムは，図1の分析システムの中で使用された。

11. 螢光法と比色法との相関について

螢光法とウリカーゼ・カタラーゼ・ハンチ反応法との相関について検討したところ，相関係数 $r=0.991$ ，回帰直線 $y=1.045x-0.01$ という満足できる結果となった(図13)。本分析システムによって得られたフローチャートを図14，

15に示す。なお，ブランク(図15)は，図1の分析システムからウリカーゼカラムリアクターを取り除き，その他の条件は，透析法と同様に操作して得られた。

考 按

図1のように固定化ウリカーゼカラムを用いて尿酸を測定する場合，血清尿酸をダイアライザーで透析する必要がある。その際尿酸標準水溶液と患者血清中の尿酸の透析率が一致しなければならないことは，この分析システムにおい

ては前提条件である。ところが、各種の Good 緩衝液を受容液としてそれぞれの緩衝液に対する尿酸標準水溶液及び患者血清中の尿酸の透析率を調べたところ、緩衝液の種類によって両者の間に大きな差を生じた。したがってそのような緩衝液は、本分析法には使用できない。このように尿酸標準水溶液と患者血清中の尿酸の透析率が異なる原因は、ダイアライザーの透析膜を介して尿酸の供与側と受容側との間における流体力学的な作用と緩衝液との性質に起因するのではないかと考えた。流体力学的な影響を調べるために試料希釈液に NaCl を添加してその影響を検討したところ、蒸留水の場合の透析率が最も高く、受容液との相対的な浸透圧が低くなるにつれて透析率が低下した。これは NaCl を試料希釈液に添加した結果、尿酸が透析される方向とは逆の方向に流体力学的な力を発生させることにより、尿酸の透析率に影響を与える相対的な水力学の圧力の作用が低下し、尿酸の透析率を下げたことを意味しているものと考えられる。一方、試料希釈液に蒸留水を共通に用いた場合でも Good 緩衝液間で尿酸標準水溶液と患者血清の透析率が大きく異なったことから、緩衝液自身の尿酸に対する静電的親和性の性質もそれらの透析率に強い影響を与えるものと考えられる。そこで、本研究で使用した一部の緩衝液成分の構造を構造式で示す。

Tris: $(\text{HOCH}_2)_3 \cdot \text{C} \cdot \text{NH}_2$ (8.1)

TAPS: $(\text{HOCH}_2)_3 \cdot \text{CNH} \cdot \text{CH}_2 \cdot \text{CH}_2 \cdot \text{CH}_2 \cdot \text{SO}_3\text{H}$ (8.4)

HEPES: $\text{HOCH}_2 \cdot \text{CH}_2\text{N} \begin{array}{c} \diagup \quad \diagdown \\ \diagdown \quad \diagup \end{array} \text{N} \cdot \text{CH}_2 \cdot \text{CH}_2 \cdot \text{SO}_3\text{H}$ (7.5)

TES: $(\text{HOCH}_2)_3 \cdot \text{CNH} \cdot \text{CH}_2 \cdot \text{CH}_2 \cdot \text{SO}_3\text{H}$ (7.5)

Tricine: $(\text{HOCH}_2)_3 \cdot \text{CNH} \cdot \text{CH}_2 \cdot \text{COOH}$ (8.8)

Bistris Propane: $(\text{HOCH}_2)_3 \cdot \text{CNH} \cdot \text{CH}_2 \cdot \text{CH}_2 \cdot \text{NHC} \cdot (\text{CH}_2\text{OH})_3$ (6.8, 9.0)

Bistris: $(\text{HOCH}_2\text{CH}_2)_2 \cdot \text{NC} \cdot (\text{CH}_2\text{OH})_3$ (6.5)

() 内の数値は pKa 値 (25°C) である。これ

らの緩衝液を用いて得た透析率の差は、緩衝液成分の分子構造とそれに基づく緩衝液の荷電状態による尿酸との親和性、尿酸が膜を介して拡散するときの動力学的圧力および尿酸自身の荷電状態などの諸因子が関与するものと考えられる。低い透析率を示す TAPS, HEPES, TES, Tricine 緩衝液の共通項として分子内に解離基である $-\text{SO}_3\text{H}$, $-\text{COOH}$ が存在し、pH 8.5 では大部分が解離しているが、他の緩衝液に比べて高い透析率を示す Tris, Bistris Propane にはそれらの基がない。すなわち、解離基を有する緩衝液は pH 8.5 では大部分が解離しており全体として陰性に帯電するが、ダイアライザーは全体として電気的中性を維持するため透析膜は陽性に帯電する。一方尿酸は、pH が約 6.5 付近では一価の陽イオンとして存在するため、遊離の尿酸の場合、陽性に帯電した透析膜との間で静電的反発力を受け、結果として透析されにくくなる。しかし血清の場合は、尿酸はタンパク質と軽く結合しており、タンパク質が透析膜と接触することにより透析膜の陽電荷を一時的に中和し、尿酸に対する反発力をなくすため、結果的に遊離の尿酸に比べて透析率を高めるように作用するものとする (図 8)。逆に Bistris Propane のような解離基を有しない緩衝液は、そのような静電的効果は少なく、ひいては水溶性の尿酸標準液と患者血清の透析率の差を小さくするものと思われる。したがって尿酸の透析率は、緩衝液の尿酸に対する静電的親和性および流体力学的圧力の総合的結果として影響を受けるものと思われる。しかし我々は、緩衝液を Bistris Propane とし pH を 8.5 に設定し、かつ尿酸標準水溶液をアルブミン溶液とすることによって患者血清の尿酸と標準液の尿酸の透析率を一致させることに成功した (図 6)。さらに Bistris Propane 緩衝液は、本研究で使用した緩衝液の中では、蛍光反応において最も強い蛍光強度を得ることができた。

以上より、透析率の差が生じる要因としては、1) 使用する緩衝液成分の解離状態に基づくイオン性と構造的性質、2) 試料希釈液の特性によっ

て生じる透析膜を介しての流体力学的な力の差の影響, 3)尿酸の解離状態とその状態での尿酸分子の挙動などが総合された結果であり, 換言すれば尿酸と緩衝液の親和性の違いによるものと理解した。したがって, ダイアライザーを用いたフロー方式の測定法を利用する場合, 標準液と試料の透析率が等しいことを確認してから使用することが望ましい。

また図10, 11からウリカーゼが液性として使用される場合, 緩衝液によってウリカーゼ活性が異なるが, 固定化した場合は, ウリカーゼ活性に差を生じないという特徴ある結果となった。したがって, ウリカーゼを液性として使用する場合には, 使用する緩衝液を適当に選択する必要がある。

他方, Blank には全く蛍光物質は検出されなかった。これはダイアライザーを用いることで, 試料中のタンパク質及び影響物質の大部分が取り除かれることによるものと思われる。その結果, 血清中の蛍光物質やHVAを酸化縮合させる血清中の酸化物による影響は無視できるものと考えられる。添加回収試験, 再現性も十分満足できるものであり, ウリカーゼ・カタラーゼ・ハンチ反応法との相関も良好であった。また, 使用血清量も従来の1/20の量で測定でき, 日常検査法として十分使用できる方法と考えられる。

ま と め

固定化ウリカーゼを利用した尿酸の蛍光測定法は, 高感度で測定できるため検体量が従来の1/20の量で測定できるという長所を有するが, 使用する緩衝液の性質により尿酸の透析率が異なるという理由から緩衝液の種類の選択とその緩衝液のpHの調整に十分注意する必要がある。本研究で開発した蛍光測定法で使用するBistris Propane 緩衝液ではブランクもほとんど無視でき, 再現性, 回収率, 特異性のすべてに優れている方法である。また, 固定化ウリカーゼの安定性も極めて優れており, ウリカーゼ・カタラーゼ・ハンチ反応とも非常によい相関を

示し, 日常検査法として十分利用できる測定法である。

謝 辞

本研究に対し, 御協力いただいた京大病院中央検査部化学検査室の皆様に深謝の意を表します。

文 献

- 1) Folin, O. : An improved method for the determination of uric acid in blood. *J. Biol. Chem.*, 86: 179-182, 1930.
- 2) Benedict, S. R., Hitchcock, E. H. : On the colorimetric estimation of uric acid in urine. *J. Biol. Chem.*, 20: 619-624, 1914.
- 3) Brown, H. : The determination of uric acid in human blood. *J. Biol. Chem.*, 158: 601-606, 1945.
- 4) Caraway, W. H. : Determination of uric acid in serum by a carbonate method. *Am. J. Clin. Path.*, 25: 840-848, 1955.
- 5) Henry, R. J., Sobel, C. & Kim, J. : A modified carbonate phosphotungstate method for the determination of uric acid and comparison with the spectrophotometric uricase method. *Am. J. Clin. Path.*, 28: 152-158, 1957.
- 6) Praetorius, E. : An enzymatic method for the determination of uric acid by ultraviolet spectrophotometry. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, 1: 222-227, 1949.
- 7) Erichmeir, T. V., Wrenn, H. T. : Direct determination of uric acid using uricase. *Am. J. Clin. Path.*, 25: 833-838, 1955.
- 8) Ramesh, C. T. : New ultraviolet (340 nm) method for assay of uric acid in serum or plasma. *Clin. Chem.*, 24: 562-566, 1978.
- 9) Gochman, N., Schmitz, J. M. : Automated determination of uric acid, with use of a uricase-peroxidase system. *Clin. Chem.*, 17: 1154-1158, 1971.
- 10) Endo, J., Tabata, M., Okada, M. & Murachi, T. : Use of immobilized enzymes in automated clinical analysis. : Determination of uric acid and glucose using immobilized enzymes in column

- form. Clin. Chim. Acta 95 : 411-418, 1979.
- 11) Kageyama, N. : A direct colorimetric determination of uric acid in serum and urine with uricase-catalase system. Clin. Chim. Acta 31 : 421-425, 1971.
 - 12) Kamoun, P., Lafourcade, G. & Jerome, H. : Ultramicromethod for determination of plasma uric acid. Clin. Chem., 22 : 964-967, 1976.
 - 13) Guilbault, G. G., Brignac, P. J. & Juneau, M. : New substrates for the fluorometric determination of oxidative enzymes. Anal. Chem., 40 : 1256-1263, 1968.
 - 14) Guilbault, G. G., Brignac, P. J. & Juneau, M. : Homovanillic acid as a fluorometric substrate for oxidative enzymes. Anal. Chem., 40 : 190-196, 1968.
 - 15) Guilbault, G. G., Kramer, D. N. & Hackley, E. : A new substrate for fluorometric determination of oxidative enzymes. Anal. Chem., 39 : 271, 1967.
 - 16) Mosbach, K. : Immobilized Enzymes, Method in Enzymology. Vol. XLIV, p. 134-148, Academic Press, New York, 1976.