

新しいシスチン尿症診断キットについて

大阪大学医学部泌尿器科学教室（主任：園田孝夫教授）

武本 征人, 板谷 宏彬

八竹 直, 古武 敏彦

木下 勝博, 園田 孝夫

A SIMPLE, SAFE AND QUALITATIVE SCREENING METHOD
FOR CYSTINURIAMasato TAKEMOTO, Hiroaki ITATANI, Sunao YACHIKU,
Toshihiko KOTAKE, Katsuhiko KINOSHITA and Takao SONODA*From the Department of Urology, Osaka University Hospital
(Director: Prof. T. Sonoda, M. D.)*

A new screening method for cystinuria is presented in this paper. The method is so simple that the diagnosis can be made only by pouring 4 ml of urine into the reagent.

Reactions are as follows: Cystine is reduced to cysteine with $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ in the presence of Ni^{2+} , and then cysteine forms the mixed ligand complex with Ni^{2+} and S^{2-} .

The reagent is so adjusted to be sensitive at 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ or higher cystine concentration. Although not specific for cystine but for other thiols, the clinical results accord with those of the cyanide nitroprusside method both in false positive and false negative.

The method is characterized by such points that no pretreatment of urine is necessary and that results is obtained so quickly within three minutes. Also it is more safe without such a dangerous reagent as cyanide.

尿路結石症のなかでも、シスチン尿症による場合は、治療ならびに結石再発予防の面で他の尿路結石症とは異なった注意が必要である。このためシスチン尿症の診断はきわめて重要である。

尿中シスチンの検出法として、以前より数多くの方法が提唱されてきた。優れた方法としては、Sullivan 反応³⁾、シアナイド・ニトロプルシド反応¹⁾、Fleming-Vassel 氏法²⁾ 等が知られている。しかしこれらの方法は、検査ごとに試薬を調整しなければならないこと、きわめて危険な試薬を用いること、判定に時間を要すること等の欠点を有する。このためシスチン尿症の第一次スクリーニング（ことに診療科外来、あるいは集団検診でのスクリーニング）には適さない。

今回、われわれは参天製薬 K. K. 研究部の協力を得て、危険な試薬を全く含まず、かつ迅速に判定可能なシスチン尿症診断キット（ウロシスチン）を開発し

た³⁾。ここに、このシスチン尿症診断キットの紹介と、その使用経験を報告する。

反 応 原 理

詳しくは千葉ら²⁾の報告にゆずるが、概略は次のとおりである (Fig. 1)。シスチンが $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ により還元され、生じたシステインがニッケルイオンと反応し、システイン・ニッケルイオン錯体を形成する。これに $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ が反応して S^{2-} を生じ、この S^{2-} がシステイン・ニッケルイオン錯体に取り込まれて、混合配位子錯体を生じ、茶かっ色を呈する。シスチン含量の低い正常者の尿では、Table 1 に示すキットの構成成分の EDTA- Na_2 とニッケルイオンの青色のキレート形成のため、淡青色を呈し、容易に判別し得る。

キット（ウロシスチン）の特徴

1) 操作について

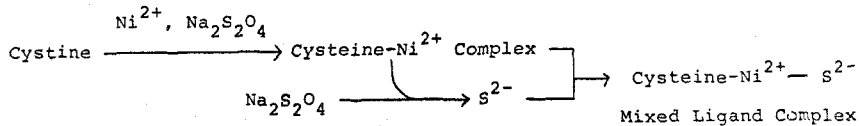


Fig. 1. Mechanism of coloration by the reaction of cystine with $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ in the presence of Ni^{2+} . Chiba et al. (1974) Personal communication.

Table 1. Materials in diagnostic kit for cystinuria.

	mg
NiSO_4	28.0
$\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$	4.0
EDTA- Na_2	25.0
NaH_2PO_4	4.0
NaHCO_3	50.0
Sucrose	adequate

キットの本体を Fig. 2 に示す。検体尿を 4 ml とり、キット内に注入する。この際、検体尿の前処置は全く不要である。注入後ただちに発泡し、キット内の試薬との混和が自発的におこなわれる。

2) 判定について

検体尿注入後 2～3 分以内に、その色調を肉眼で観

察、茶かっ色を呈するものを陽性、淡青色を呈するものを陰性、中間の青かっ色を呈するものを疑陽性とする (Fig. 2)。この際注意すべきことは、正常者尿では検体添加後、約 6 分で微細な黒色の沈殿を生ずる。このため判定は 2～3 分以内におこなうことが必要である。

3) キット内試薬の組成について

本キットの構成試薬を Table 1 に示した。本キットは 6 種の試薬により構成されているが、危険な試薬は全く含まれていない。

i) NiSO_4 は本キットによる呈色反応の key substance であり、ii) $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ はシスチンの還元物質であると同時に、 S^{2-} を発生せしめ、呈色物質である混合配位子錯体を形成する。iii) EDTA- Na_2 はそのキレート作用により本呈色反応の感度を調節することが可能である。iv) NaH_2PO_4 ならびに NaHCO_3 は緩

Table 2. Comparing results by Kit, cyanide nitroprusside method and automatic amino acid analyser.

* Judgements using Kit in two occasions by two judges of A and B.

** Cyanide nitroprusside method.

No. of specimens	Pt.	Sex	Age	Judgements* using Kit				C N P**	Cystine Concentration $\mu\text{g/ml}$
				1	2	1	2		
1	F. S.	M	23	+	+	+	+	+	385.0
2	T. F.	> M	42	±	+			+	28.4
3	T. F.			+	+	+	+	+	58.0
4	T. F.	F	38	+	+	+	+	+	166.0
5	Y. F.	F	5	+	+	+	+	+	232.0
6	F. N.	F	41	+	+	+	+	+	132.0
7	T. Y.	M	6	-	-	-	-	±	15.0
8	H. Y.	M	39	+	+	+	+	±	62.5
9	H. K.	F	7	+	+	+	+	+	347.0
10	S. F.	M	4	+	+	+	+	+	75.5
11	S. F.	F	11	-	-	-	-	±	10.0
12	K. F.	M	1	+	+	+	+	+	401.0
13	K. F.	M	3	+	+	+	+	+	169.0
14	M. F.	F	28	-	-	±	±		38.0

衝物質であり、尿の液性 (pH 5~8) の影響を受けない。ことに NaHCO_3 は検体尿添加により発泡し、キット内試薬との混和が自発的におこなわれる。

4) 感度について

本キットは尿中シスチン濃度 $50 \mu\text{g/ml}$ 以上で陽性 (茶かつ色)、 $30 \sim 40 \mu\text{g/ml}$ で疑陽性 (青かつ色)、 $20 \mu\text{g/ml}$ 以下では陰性淡青色になるよう設計されている。

呈色に関して

本キットに関する千葉^{2,3)}の基礎実験の結果を要約すると次のとおりである。

1) 本キットによるシスチン濃度 $50 \mu\text{g/ml}$ 以上の反応液は茶かつ色を呈するが、可視領域のスペクトルには吸収極大がみられず、 $400 \sim 700 \text{ m}\mu$ の間の任意の波長で呈色強度の測定が可能である。シスチン濃度 $20 \mu\text{g/ml}$ 以下の反応液は淡青色を呈し、 $580 \text{ m}\mu$ 付近に弱い吸収スペクトルがみられた (Fig. 3)。

2) 呈色の経時変化

吸光度はシスチン尿添加 6 分後まで直線的に増加する。前述したごとく、正常者尿では 4 分以後、黒色の微細沈殿を生じ、見かけの吸光度増加をきたす。

3) 尿 pH の影響

酸性側でやや呈色強度が低下するが、通常の尿 pH (5~8) では判定に影響しない。

4) 尿の温度による影響

尿温度 4°C と 25°C で、ほとんど吸光度に差がみられず、 25°C を基準とすれば 40°C で 20% の増加を示すが、肉眼での観察に影響を与えない。

5) 呈色強度とシスチン濃度

シスチン濃度にはほぼ比例して吸光度が増加した。肉眼によっても、シスチン濃度の高いものほど、茶かつ色の色調が増強されるのが観察された。

キット (ウロシスチン) の使用経験

われわれは、このキットについて、シスチン尿症 22 名を含む 81 名の尿につき検討した。そのうち 61 検体はシアナイド・ニトロプルシド反応を併用し、さらに 14 検体に、日立液体クロマトグラフ 034 型を用いて、アミノ酸分析をおこない、キットによる判定と比較検討した。

1) 同一検体を同一試験者が 2 回以上実施した場合の成績

81 検体中 80 検体は同じ判定であった (再現性 98.7%)。判定に差の生じた 1 検体は、1 回目疑陽性、2 回目陽性と判定され、シアナイド・ニトロプルシド反応で陽性、アミノ酸分析で、シスチン濃度 $28.4 \mu\text{g/ml}$

であった。このため、機会をあらためて採尿し、同様にキットを用いて検討したところ、2 回とも陽性と判定され、シアナイド・ニトロプルシド反応で陽性、アミノ酸分析で、シスチン濃度 $58.0 \mu\text{g/ml}$ であった。

2) 同一検体を異なった試験者が実施した場合の成績

69 検体中、同一の判定をされた検体数は 56 (再現性 81.2%) で、13 検体の判定に差がみられた。いずれも陰性を疑陽性と、あるいは疑陽性を陰性と判定されたもので、陰性と陽性という全く相反する判定はなかった。

3) シスチン尿症患者およびその家族の尿を異なった時期に採取し、異なった試験者が実施した成績

12 検体中 2 検体に判定の差がみられた。そのうち 1 検体は、陰性と疑陽性と判定され、アミノ酸分析ではシスチン濃度 $38 \mu\text{g/ml}$ であった。この症例は 3 人のシスチン尿症の小児の母親である。同じく判定に差の生じた他の 1 検体は、疑陽性と陽性と判定されたが、この症例は、結石の自然排石があり、この結石の成分は赤外線分光分析法にてシスチンであることが確かめられている。

4) シアナイド・ニトロプルシド反応との比較成績

61 検体中 49 検体は全く同じ結果を得た。判定差の生じた 12 検体に陰性と陽性という全く相反する判定は 1 検体もなかった。このうち 2 検体はキットで陰性、シアナイド・ニトロプルシド反応で疑陽性であったため、アミノ酸分析をおこなったところ、おのおののシスチン濃度は 10.0 、 $15.0 \mu\text{g/ml}$ であった。

5) 13 症例 14 検体にアミノ酸分析によるシスチン濃度を測定し、キットによる判定と比較検討した (Table 2)。これによれば、シスチン濃度 $20 \mu\text{g/ml}$ 以下の 2 検体では陰性、 $28.4 \mu\text{g/ml}$ であった検体が 1 回疑陽性、 $38.0 \mu\text{g/ml}$ であった検体が、陰性または疑陽性と判定された。50 $\mu\text{g/ml}$ 以上の検体では 100% 陽性であった。

考 察

シスチン尿症のスクリーニング法として、現在なお、Brand¹⁾の提唱したシアナイド・ニトロプルシド反応が、第一に選択される検査法であろう。Crawhall⁴⁾によれば、シアナイド・ニトロプルシド反応のシスチン検出限界は尿中濃度 $75 \text{ mg/g creatinine}$ であり、その確実性と、比較的簡単な操作法が評価されているためと思われる。しかし、シスチンの還元試薬としてシアン化ナトリウムというきわめて危険な試薬を用いるため、最近では還元試薬に硼素化合物を使用した Rosenthal and Yaseen⁷⁾ のスクリー

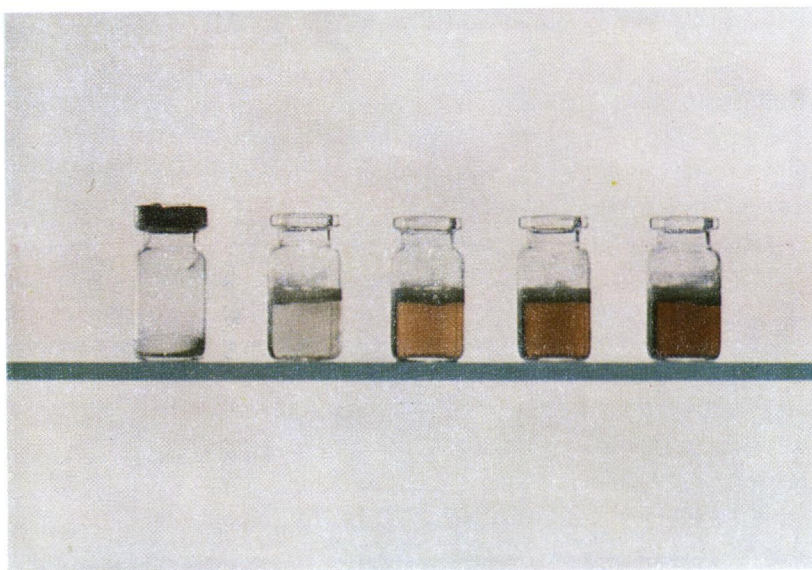


Fig. 2. キットの本体.

左端は検体尿添加前のもの。左端から2番目は陰性例。右の2つは陽性例。中央は疑陽性例。

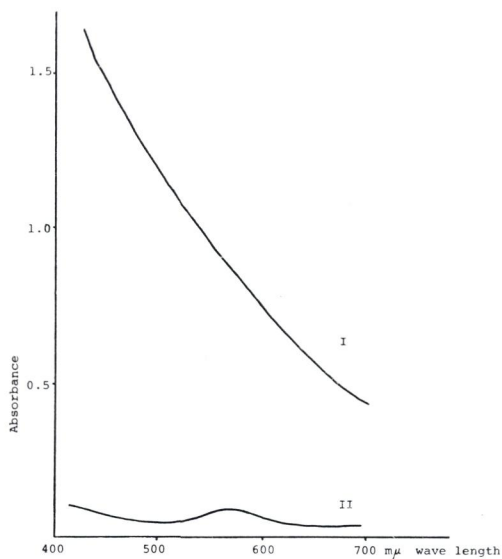


Fig. 3. 反応液の吸収スペクトル

曲線 I：シチチン濃度 $50 \mu\text{g/ml}$ 以上では、可視領域での吸収極大はみられない。

曲線 II：シスチン濃度 $20 \mu\text{g/ml}$ 以下では、 $580 \text{ m}\mu$ 付近に弱い吸収がみられる。

ニングテスト、その変法である Kelly ら⁵⁾ のスクリーニングテスト、さらには亜鉛とケトスティックスを用いた Middleton⁶⁾ の方法など、比較的安全なものが報告されている。これらの方法の検出感度は、かなり優れたものであると考えられるが、操作ならびに試薬の安定度に問題があると考えられる。今回開発したキ

ット（ウロシチン）は、前述のごとく、安全性、簡便性および迅速性に優れており、また判定に際して、再現性、感度についてもシアナイド・ニトロプルシド反応を凌駕する性能を有するものと考えている。

Crawhall ら⁴⁾ によれば尿中シスチン濃度の正常上界は $18 \text{ mg/g creatinine}$ であり、本キットではシスチン濃度 $30 \sim 40 \mu\text{g/ml}$ で疑陽性、 $50 \mu\text{g/ml}$ 以上で 100% 陽性と判定可能であるため、シスチン尿症の第一次スクリーニングテストとして、きわめて満足すべきものである。

しかしながら、次のような問題点が考えられる。

i) 本キットによる反応はシスチンに特異的なものではなく、他のチオール化合物でも false positive の結果を与える。例えば、4名の正常人にシスチン尿症の治療剤である α -mercaptopropionyl glycine（チオラ）を 500 mg 内服させて2時間後に採取した検体を本キットで検討したところ、4検体中3検体は強陽性、1検体は疑陽性と判定された。 α -mercaptopropionyl glycine の影響は10時間前後で消失したが、判定の際には、チオール化合物の摂取のないことを確認のうえでおこない、摂取している場合は、じゅうぶんな時間を経てから判定をおこなえば、解決できる問題である。

ii) 肉眼的血尿の場合も、その類似した色調から判定を誤る可能性があるが、この場合は尿を加熱し、蛋白を変性させたのちに操作すれば、呈色に対する妨害を防止することができる。

iii) 千葉ら³⁾によればクエン酸は false negative の結果を与えるが、クエン酸の異常排泄以外は妨害しないという。

iv) 同一検体を同一試験者が実施した場合の再現性が98.7%であったのに対し、同一検体を異なった試験者が実施した場合の再現性が81.2%と、試験者の相異により再現性に多少の差がみられた。本キットによる判定が肉眼による主観的なものであるためと考えられるが、試験者が数回の操作ならびに判定に慣れてからおこなうようにしたところ、試験者による判定の差はほとんどみられないようになった。

われわれは、以上のような問題点に注意しさえすれば、本キットは従来法と比較してあらゆる面で優れていると考え、外来での使用はもとより、多くの検診にも使用してすでに、数名のシスチン尿症を発見、治療をおこなっているしだいである。

結 語

1) 今回開発したシスチン尿症診断キット（ウロシスチン）は、全く危険な試薬を含まず、検体尿の前処置も不要で、3分以内に判定することができる。

2) 尿中シスチン濃度 20 $\mu\text{g/ml}$ 以下では陰性、50 $\mu\text{g/ml}$ 以上では100%陽性と判定可能である。

3) 本キットの呈色反応はシスチンにのみ特異的なものでなく、他のチオール化合物によっても false positive の結果を与える。他のチオール化合物の摂取による false positive の結果である場合は摂取中止

後、じゅうぶんな時間経過ののちに判定すれば、解決可能な問題である。肉眼的血尿の場合は、尿を加熱して蛋白変性させたのちに操作すれば、呈色に対する妨害防止をすることができる。

4) 以上から、このシスチン尿症診断キットは、安全性、簡便性、迅速性ならびに感度など、あらゆる点で優れたものである。

稿を終えるにあたり、常にご協力下さった参天製薬K.K. 研究部の諸氏に深く感謝いたします。

参 考 文 献

- 1) Brand, E., Harris, M. M. and Biloon, S.: J. Biol. Chem., **86**: 315, 1930.
- 2) 千葉剛久・堀内正人: in press.
- 3) 千葉剛久・堀内正人: in press.
- 4) Crawhall, J. C. and Watts, R. W. E.: Am. J. Med., **45**: 736, 1968.
- 5) Kelly, S., Leikhim, E. and Desjardins, L.: Clin. Chim. Acta, **39**: 469, 1972.
- 6) Middleton, J. E.: J. Clin. Path., **23**: 90, 1970.
- 7) Rosenthal, A. F. and Yaseen, A.: Clin. Chim. Acta, **26**: 363, 1969.
- 8) Sullivan, M. X., Hess, W. C. and Howard, H. W.: J. Biol. Chem., **145**: 621, 1942.
- 9) Vassel, B.: J. Biol. Chem., **140**: 323, 1941.

(1974年9月5日迅速掲載受付)