

尿酸値の測定に影響を与える尿中低分子物質

福田 典子、山下 義昭

要 旨

ウリカーゼ・ペルオキシダーゼ (POD) 系からなる尿酸測定試薬を用いて、濃度の異なる2種類の尿標品の尿酸値を測定した結果、高濃度の尿の方が低濃度よりも低い尿酸値を示した。この原因について検討したところ、次の結果を得た。(1)尿酸値は尿の希釈濃度が0～約20%までは濃度に依存して上昇したが、さらに尿の濃度を増加すると逆に低下した。この低下作用は、尿を121℃、15分間加熱した場合には発現されなかった。(2)希釈した尿(希釈尿)に、各種の方法で処理した尿を加えた場合、尿酸値の低下がみられた。(3)希釈尿に尿酸を添加したところ、尿酸の濃度に伴い尿酸値は上昇した。(4)一定量の尿酸に処理した尿を加えた場合、尿酸値の低下がみられ、この尿を90℃で15分間放置しても低下作用は消失しなかった。以上の結果から、ウリカーゼおよび POD 反応の阻害因子が尿中に存在し、この因子が尿酸の分解ならびに POD 反応を抑制し、尿中の尿酸測定値の低下を引き起こすと推察される。

キーワード：尿酸、尿、ウリカーゼ、ペルオキシダーゼ、尿酸値低下作用

緒 言

尿酸は、核酸プリン誘導体の代謝終産物で、摂取した食物中の核酸から生成されるが、体細胞の核酸の分解によっても生成される。したがって、血清・尿中の尿酸値は多くの疾患の予防・治療のための臨床検査の重要項目となっている。

今回、尿濃度が異なる尿中の尿酸値を求めるために、広く用いられている特異性の高いウリカーゼ (EC 1.7.3.3)・ペルオキシダーゼ (EC 1.11.1.7) 系で構成された尿酸測定試薬^{1,2)}を用いて測定した。その結果、尿酸値は高濃度の尿の方が低い値を示したので、その原因を追究したところ、尿酸値の測定に影響する因子が尿中に存在することが認められたので報告する。

方 法

1. 尿の保存

5℃に保った容器に尿を入れ、尿量が約3,000mlになったものを実験に供した。

2. 尿酸の測定

尿酸の測定および尿酸下への影響を試験するための標準測定法には、尿0.25ml存在下に各種の方法で処理された尿0.5mlを加えたのち、血清尿酸測定用キット(和光純薬製尿酸C-テストキット)に備えられた試薬、発色剤と緩衝液とをあらかじめ混和して調製された発色試薬を3ml加え、37℃で5分間加温した。加温後、発色した青紫色について分光光度計を用い、波長555nmの吸光度によって尿酸値を求めた。

調製された発色試薬は、ウリカーゼ(*Arthrobacter*属由来)0.04単位/ml、ペルオキシダーゼ(西洋ワサビ由来)2.0単位/ml、4-アミノアンチピリン0.59mmol/l、リポプロテインリパーゼ(*Chromobacterium*属由来)39

単位/ml、アスコルビン酸オキシダーゼ（カボチャ由来）3.9単位/ml、N-エチル-N（2-ヒドロキシ-3-スルフォプロピル）m-トルイジンナトリウム（TOOS）0.57mmol/l およびリン酸緩衝液（pH6.4）から構成されている。

3. 尿中のアスコルビン酸およびビリルビンの測定

体外診断用医薬品（和光純薬製 プレテスト 9 a II）を用いて尿中のアスコルビン酸およびビリルビン濃度を測定した。

4. 尿の調製

(1) 加熱処理尿

尿を121°Cで15分間加温したのち、生じた沈殿をろ紙でろ過した。

(2) 濃縮尿

ロータリーエバポレーターを用い、水温を50°Cに保ちながら減圧下で尿30mlを15mlまで濃縮したのち、生じた沈殿をろ紙でろ過した。

(3) 膜ろ過尿

尿30mlについてウルトラフィルター Q0100（Advantec）を用いて分画した。実験に使用したウルトラフィルターは分子量10,000以下のものをろ過するので、尿のろ液を低分子画分とし、ろ過されなかったものを高分子画分とした。分画後、低分子画分を23mlから10mlに、高分子画分を30mlから10mlに上記と同様な方法で濃縮した。

(4) 酢酸エチル処理尿

分液ロートに尿80ml、酢酸エチル200ml、水40ml、メタノール40mlを加えてよく振とうし、上層、中間層、下層を得た。上層および下層はろ紙を用いてろ過した。沈殿物からなる中間層は使用しなかった。分画後、上層は80mlを7mlに、下層は80mlを27.5mlに上記と同様の方法で濃縮した。

結 果

Fig. 1 に示すように、10段階に調製した尿（未処理尿）濃度の尿酸値を求めたところ、0～約20%希釈までは濃度に依存して尿酸値の上昇がみられたが、濃度がさらに濃くなると逆に尿酸値は尿濃度に応じた低下がみられた。すなわち30%希釈尿の尿酸値29.7 μ gが原液（100%尿）では10.3 μ gと低い値となった。尿を121°C、15分間加熱処理した（加熱処理尿）場合にはもっとも高い値を示した40%希釈尿と100%の尿酸値の差は僅か3.4 μ gで、尿酸値は尿濃度の増加に殆んど依存しなかった。

尿中のアスコルビン酸およびビリルビン濃度をプレテストを用いて測定した結果、本実験で用いた尿（非加熱処理尿）には、ビリルビンは0.5mg/dl以下で、アスコルビン酸を含む還元性物質は検出されなかった。

尿酸値の測定に影響を与える尿中低分子物質

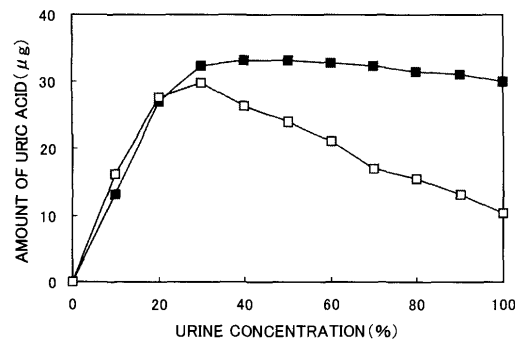


Fig. 1 Effects of increasing concentrations of urine on uric acid amounts. The assays of uric acid were carried out with control (none-treated urine)(□) or heat-treated urine which was kept at 121°C for 15min(■).

尿酸濃度の増加と波長555nmの吸光度との関係を調べた。Fig. 2で明らかのように、尿酸70μgまでは直線的に吸光度は上昇し、尿酸75μgから100μgまでは緩やかな上昇となった。尿酸105μgで極大となり、それ以降は、吸光度が2.2前後でほぼX軸と平行な値を示した(データには示していない)。

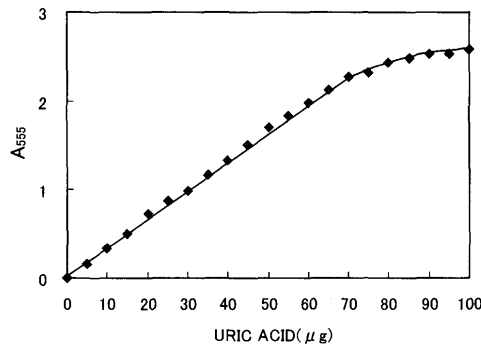


Fig. 2 Calibration curve of uric acid. The assays of uric acid were carried out as described in the text except as follows : varying concentrations of uric acid were added to enzyme solution (3ml) containing coloring in a total volume of 4ml.

未処理尿、121°C、15分間加熱処理を施した尿(加熱処理尿)それぞれ(control)に、各処理尿の添加による影響を比較した結果をFig. 3に示した。Fig. 1でもっとも高い尿酸値を示した尿30%付近の希釈尿(尿25%)にさらに尿を追加すると、尿酸値は添加前の未処理尿(Control)の尿酸値(26.8μg)を1.5μg低下し、加熱処理尿の場合、20.8μgが3.1μg増加した。同様に、未処理尿に加熱処理尿を加えると尿酸値はControlに比べ3.9μg低くなり、加熱処理尿にさらに加熱処理尿を加えると尿酸値は3.3μg高くなった。未処理尿に2倍に濃縮した尿(濃縮尿)を加えると尿酸値は4.0μg低下し、加熱処理尿に濃縮尿を加えると尿酸値は2.6μg減少した。未処理尿に膜ろ過尿(低分子)を加えると、尿酸値はControlに比べて7.3μgと処理尿の中でもっとも低い値を示し、加熱処理尿に膜ろ過尿(低分子)を加えると1.2μg低下した。未処理尿に膜ろ過尿(高分子)を加えてもほとんど影響されなかったが、加熱処理尿に膜ろ過尿(高分子)加えると尿酸値は3.3μg高くなった。

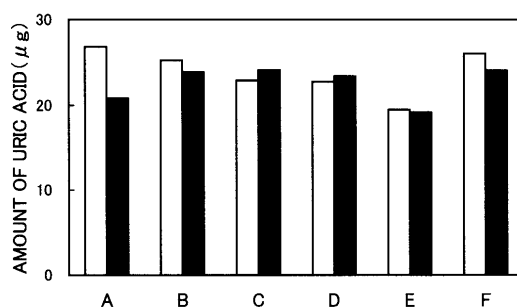


Fig. 3 Effects of various treated urines on uric acid amount in the diluted urine. Incubations were carried out with each (0.5ml) of water(A), none-treated urine(B), heat-treated urine(C), concentrated urine(D), filtrated urine(low molecule)(D) or none- filtrated urine(high molecule)(E) in the presence of each (0.25ml) of none-treated urine (□) or heat-treated urine which was kept at 121°C for 15min (■) and enzyme solution (3ml) containing coloring in a total volume of 4ml. The other assay conditions were described in the text.

Fig. 3と同様に、25%希釈尿（非加熱、加熱処理）に酢酸エチル処理尿（上層、下層）を加えて、その影響を調べた。Fig. 4で明らかなように、非加熱尿と加熱処理尿に酢酸エチル処理尿（上層）を加えると、どちらもControlと比べ尿酸値が約3μg高くなった。しかし、未処理尿に酢酸エチル処理尿（下層）を加えると逆に、尿酸値は9.8μg低くなり、加熱処理尿に酢酸エチル処理尿（下層）を加えると16.8μg低下した。

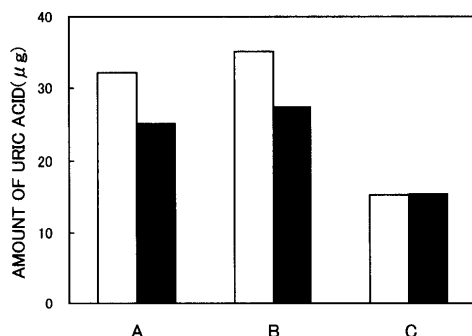


Fig. 4 Effects of ethyl acetate-treated urine on uric acid amount in the diluted urine. Incubations were carried out with each (0.5ml) of water(A), ethyl acetate-treated urine (upper layer)(B) or ethyl acetate-treated urine (lower layer) (C) in the presence of each (0.25ml) of none-treated urine (□) or heat-treated urine which was kept at 121°C for 15min(■) and enzyme solution (3ml) containing coloring in a total volume of 4ml. The other assay conditions were described in the text.

希釈尿に処理尿の代わりに各濃度の尿酸溶液を添加して、尿酸値に及ぼす影響について検討した結果、Fig. 5で明らかなように、Controlに対し、未処理尿、加熱処理尿ともに尿酸溶液の濃度の増加に伴って尿酸値が増大した。

尿酸値の測定に影響を与える尿中低分子物質

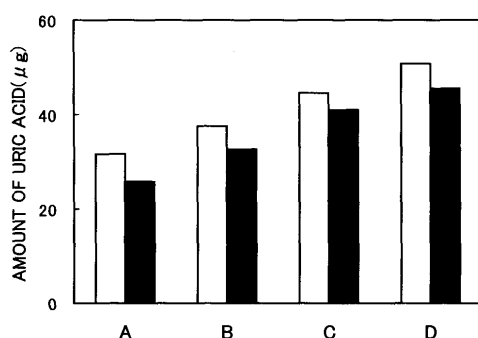


Fig. 5 Effects of increasing concentrations of uric acid on uric acid amount in the diluted urine

Incubations were carried out with each solution (0.5ml) of water(A), 25 μg (B), 75 μg (C) or 125 μg (D) of uric acid in the presence (0.25ml) of none-treated urine (□) or heat-treated urine which was kept at 121°C for 15min(■) and enzyme solution (3ml) containing coloring in a total volume of 4ml. The other assay conditions were described in the text.

次に、一定濃度の尿酸溶液 (25 μg) Control に、処理尿を加え、その影響を比較した結果を Fig. 6 に示す。濃縮尿では Control の尿酸値が3.1 μg 低くなった。酢酸エチル処理尿 (上層) では Control の尿酸値に殆んど影響を与えなかったが、酢酸エチル処理尿 (下層) では、Control の約半分の値となった。

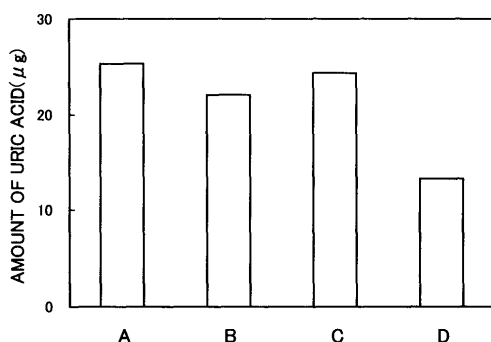


Fig. 6 Effects of ethyl acetate-treated urine on a constant amount of uric acid. Incubations were carried out with each (0.5ml) of water(A), ethyl acetate-treated urine (upper layer)(B) or ethyl acetate-treated urine (lower layer) (C) at a amount of 35 μg uric acid (0.25ml) and enzyme solution (3ml) containing coloring in a total volume of 4ml. The other assay conditions were described in the text.

酢酸エチル処理尿 (下層) 中の尿酸値低下作用を有する因子の熱の安定性を調べるため、Fig. 4 において著しい尿酸値低下作用があった酢酸エチル処理尿 (下層) を用いて調べた。酢酸エチル処理尿 (下層) を30°C、60°C、90°Cにそれぞれ15分間加温したのち、尿酸溶液 (25 μg) に加えて、尿酸値におよぼす影響を試験した結果、Fig. 5 に示すように、30°Cで15分間加温した尿は Control の尿酸値を約半分に低下し、温度をさらに60°C、90°Cと高めてもこの作用に変化がみられなかった。

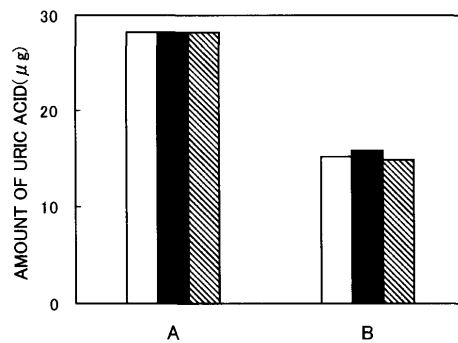


Fig. 7 Heat stability of inhibitor. Incubations were carried out with each (0.5ml) of water(A) or ethyl acetate- treated urine (upper layer)(B) at a amount of 35 μg uric acid (0.25ml) and enzyme solution (3ml) containing coloring in a total volume of 4ml. The other assay conditions were described in the text. Preparations with (A) or without (B) inhibiting activity were kept at 30°C (□) , 60°C (■) and 90°C (▨) for 15min. Water instead of inhibitor was added as control.

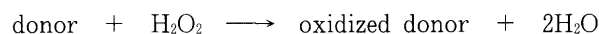
考 察

濃度が異なる2種類の尿標品の尿酸値を求めた結果、高濃度の方が希釈尿よりも低い尿酸値を示した。この原因を明らかにするために、尿酸の測定値を減少させる尿中物質の確認と性質を検討した。

今回用いた血清中の尿酸測定用キットは、我々の分析方法では少なくとも尿酸70 μg までは尿酸値を求めるのに信頼できるものであった。これに対して同じ尿酸測定用キットを尿中の尿酸測定に用いたとき、尿酸値が25~30 μg を超えると、すなわちこれ以上に尿酸濃度が増加すると尿酸標品単独では70 μg まで吸光度の増加がみられたが、尿中の尿酸値は逆に減少した。したがって測定には、尿を20%以下に希釈して用いるか、試料を少量にしないと誤差が生じることがわかった。これは、希釈尿(少量の尿を使用した場合と同じ)にさらに尿を追加すると、尿酸値が減少する (Fig. 1、Fig. 3、Fig. 4) ことから明らかである。先に述べたように、使用キットは尿を希釈しないで大量添加した場合のみ測定に適さないのであり、少量の希釈尿では問題が生じないと思われる。事実、Fig. 5 に示すように、尿酸添加量の増加に伴った尿酸値の増加がみられ、定量性が認められた。尿中の阻害物質について目下精製中であるので、詳細は不明であるが、分子量10,000以下の低分子であること (Fig. 3)、極端な脂溶性ではないこと (Fig. 4) 比較的熱に安定であること (Fig. 7) が認められた。またこの作用は、特定の尿だけでなく、有数の尿検体からも認められたこと (未発表データ) から薬物や特別な食物によるものではないと考えられる。

尿酸測定用に用いた今回のキットは、ウリカーゼの作用によって生じた H_2O_2 をペルオキシダーゼにより4-アミノアンチピリンと TOOS とを定量的に酸化縮合させ、青紫色の発色濃度によって尿酸の定量を行うのである。したがって、ウリカーゼやペルオキシダーゼの酵素反応に影響を与えるものが混在していると正確な数値が得られない。ウリカーゼは Cu^{2+} や Co^{2+} のような重金属イオンによって活性を阻害³⁾ されるが、通常尿中に排泄される CuSO_4 、 CoCl_2 がそれぞれ約50ng/ml、約3.5ng/ml と、酵素活性に影響を与える濃度を与える濃度ではなく⁴⁾、尿中重金属に依存したウリカーゼ阻害作用によるものではないと思われる。

いずれにしても、本実験において認められた尿中阻害物質は、ウリカーゼ活性またはペルオキシダーゼ反応系のどちらかに作用するかは、今後明らかにしたい。また、ウリカーゼ・ペルオキシダーゼ法による尿酸測定は、ペルオキシダーゼ反応が



であるので、ペルオキシダーゼ反応の水素供与体となるような還元物質等や H_2O_2 の受容体となりうるタンパク質、

ならびに H_2O_2 を消費するカタラーゼの混在が測定誤差を生じる原因となる。

本実験で用いた尿には、ビリルビンは 0.5mg/dl 以下、アスコルビン酸を含む還元性物質は検出されなかった。たとえ存在していたとしても、影山²⁾ および今回使用した尿酸測定用キットのデータ集⁵⁾ によるとアスコルビン酸 10mg/dl で 2.5% の、ビリルビン 10mg/dl 、 20mg/dl でともに 10% の誤差を示すに過ぎないので、実験で得られた尿酸値測定に影響する低分子物質はこれら以外のものであろうと推定され、さらに酵素分子に直接作用し、酵素阻害剤として尿中に存在する可能性も考えられる。

以上のことから、尿酸値を低下させる低分子物質が尿中存在することが認められたが、この物質の詳細については目下検討中である。

引用文献

- 1) Kabaskalian, P., Kalliney, S., and Wescott, A, Clin. Chem., 19, 522-524 (1973)
- 2) 影山信雄, Medical Technology, 11 (10), 1024-1029 (1983)
- 3) Itaya K., Yamamoto T., and Fukumoto J., Agr. Biol. Chem., 31 (11), 1256-1264 (1967)
- 4) Philip L. A. and Dorothy S. D., Biology Data Book, p.1496, Federation of American Societies for Experimental Biology, USA (1974)
- 5) 和光純薬株式会社データ集, 尿酸測定用 Uric Acid C-Test, p.2 (和光純薬カタログ, 臨床検査薬, p.2482 (2004) から参照)

Abstract. Urinary Low-Molecular Inhibitor on Determination of Uric Acid Amount. Noriko Fukuda, Yoshiaki Yamashita. Department of Food Science and Nutrition, School of Life Science, Sennri Kinran University, Suita, Osaka 565-0873, Japan

The uric acid amounts of two kinds of urine samples of which the concentration differed were assayed using uric acid determining reagent which consisted of uricase-peroxidase (POD) system. (1) Uric acid amount rose in a concentration-dependent manner at urine concentration from 0 to 20 %, but declining progressively at over 30 %. None of this action was observed by urine treated at 121°C for 15 min. (2) Amount of uric acid was reversely lowered by addition of non-treated urine, heat-treated urine or membrane-filtrated urine in the presence of urine diluted at 25 % (diluted urine). (3) The uric acid amount increased dependently with the concentration of uric acid, when uric acid was added at $25\ \mu\text{g}$, $75\ \mu\text{g}$ and $125\ \mu\text{g}$ in the diluted urine. (4) Uric acid amount lowered, when membrane-filtrated urine or ethyl acetate-treated urine (lower layer) were added in a constant level of uric acid ($25\ \mu\text{g}$). Heat treatment at 90°C for 15 min had no effect on inhibitory potency. It is guessed that from the above result, inhibiting factor of uricase and POD reaction in urine suppresses decomposition of uric acid by uricase and POD reaction, and that it causes the lowering of the urinary uric acid amount.