

尿酸の測定法について

— 自動分析法 (Patel 法) の検討 —

西村佳子*・青木宏子**・御船政明**

*岡山大学温泉研究所 温泉内科学部門

**岡山大学医学部附属病院 三朝分院

(指導 森永 寛 教授)

(1980年1月9日受付)

1. 緒言

現在、体液中の尿酸の測定には、主として還元法とウリカーゼ法 (酵素法) とが利用されている。1979年の College of american pathologists の Basic survey (Table 1) によると、尿酸の測定法として、リンタングステン酸還元法が多用されている。

テクニコン AutoAnalyzer (以下A. A. と略す) -I型による尿酸の測定法には、還元法のうちの N-13b 法が用いられており、著者らはこの方法により測定を行ったが、感度が不良であった。また A. A. -I 型で EDTA-ヒドラジン還元法を利用した Patel 法 (Fig. 1) を追試したところ、ピーク間の分離が悪く、キャリーオーバーが危惧された。

今回著者らは、Patel 法の再検討を行ない、Patel 法の一部を改変して健常者の血清尿酸値の測定を試み、ほぼ満足すべき結果を得た。その Patel 変法による成績について報告する。

2. 試薬および装置

2-1. 試薬

尿酸は Merck の特級を用い、他はすべて、市販の特級試薬を使用した。

尿酸保存標準液 (100mg/100ml) : 炭酸リチウム 60 mg を 100.0ml のメスフラスコにとり、約 50~60ml の脱イオン水を加えて、60°C の恒温槽中で加温溶解する。次に尿酸 100.0mg を加えて加温溶解し、冷却した後に脱イオン水を加えて全量を 100.0ml とした。

尿酸使用標準液 : 尿酸保存標準液を用いて、尿酸濃度が 3.0, 6.0, 9.0, 12.0, 15.0, 20.0, 25.0 (mg/100 ml) となるように脱イオン水で希釈した。

タングステン酸ナトリウム溶液 (60g/100ml) : タングステン酸ナトリウム 60g を脱イオン水に溶かして 1000ml とした。

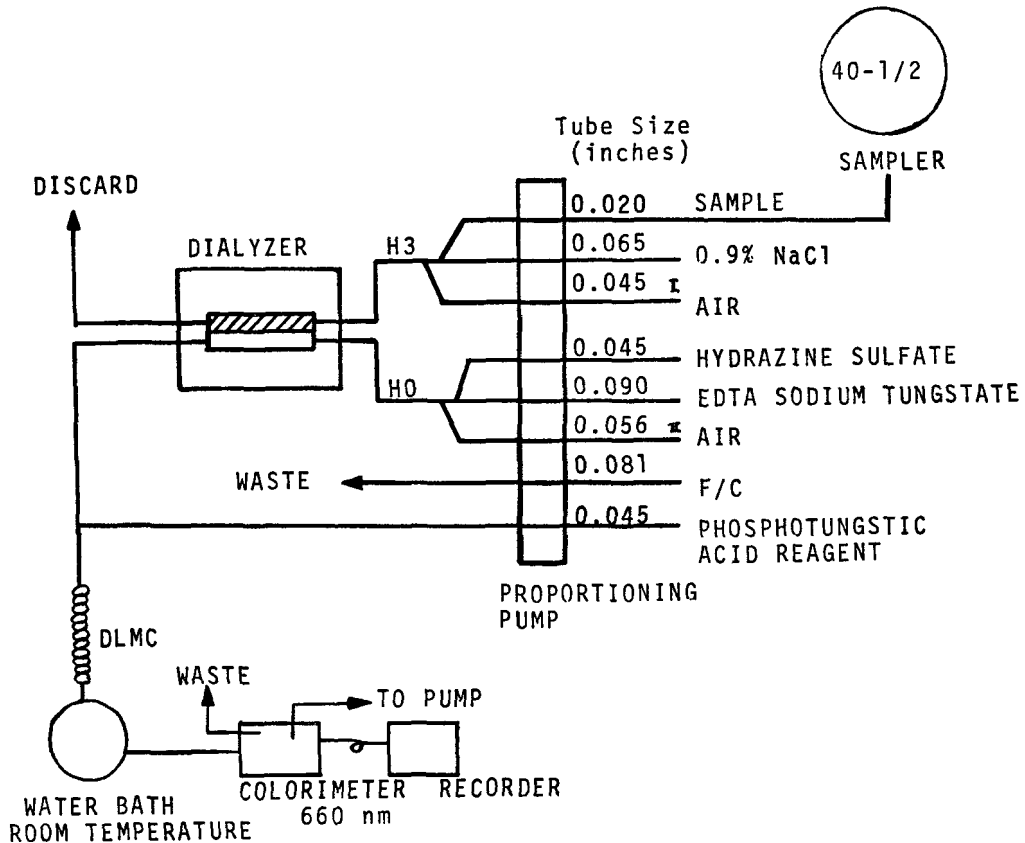
EDTA・4ナトリウム (5g/100ml) : エチレンジアミン 4 酢酸-4ナトリウム 50g を脱イオン水に溶かして 1000ml とした。

EDTA-タングステン酸試薬 : 60g/100ml タングステン酸ナトリウム液と 5g/100ml EDTA・4ナトリウ

Table 1. The main methods for the determination of uric acid

Phosphotungstate Reduction Method	Manual Method	1730	} 58.5%
	Automated Method	1766	
Uricase Method	Manual Method	182	} 36.5%
	Automated Method	1997	
Oxygen Rate Method		52	} 4.9%
Iron Reduction	Manual Method	147	
	Automated Method	96	

Basic survey (Set A-A), College of american pathologists,
p.8, 1979.



PATEL, C.P. Semimicro method for determination of serum uric acid using EDTA-hydrazine. Clin.Chem. 14, p.768, 1968.

Fig. 1. Flow diagram of Patel's method

ム液とを3対1の割合に混合する。

硫酸ヒドラジン試薬 (0.025g/100ml) : 硫酸ヒドラジン 250mg と酢酸ナトリウム 16.6g を脱イオン水で溶解して、全量を 1000ml とした。

リンタングステン酸試薬 : 1000ml の丸底フラスコに タングステン酸ナトリウム 40g, 蒸留水 300ml, リン酸 (85% オルトリン酸) 32ml を加えて混和溶解し, フラスコに還流冷却器を接合して, 約 2・3 時間おだやかに煮沸する。室温になるまで放置した後, 内容を蒸留水で 1000ml とした。ただし, リンタングステン酸試薬 (和光自動分析用試薬) を代用してもよい。

塩化ナトリウム溶液 (0.9g/100ml) : 塩化ナトリウム 9g を脱イオン水に溶かして 1000ml とした。

水酸化ナトリウム溶液 (0.1N) : 水酸化ナトリウム 4g を脱イオン水に溶かして 1000ml とした。

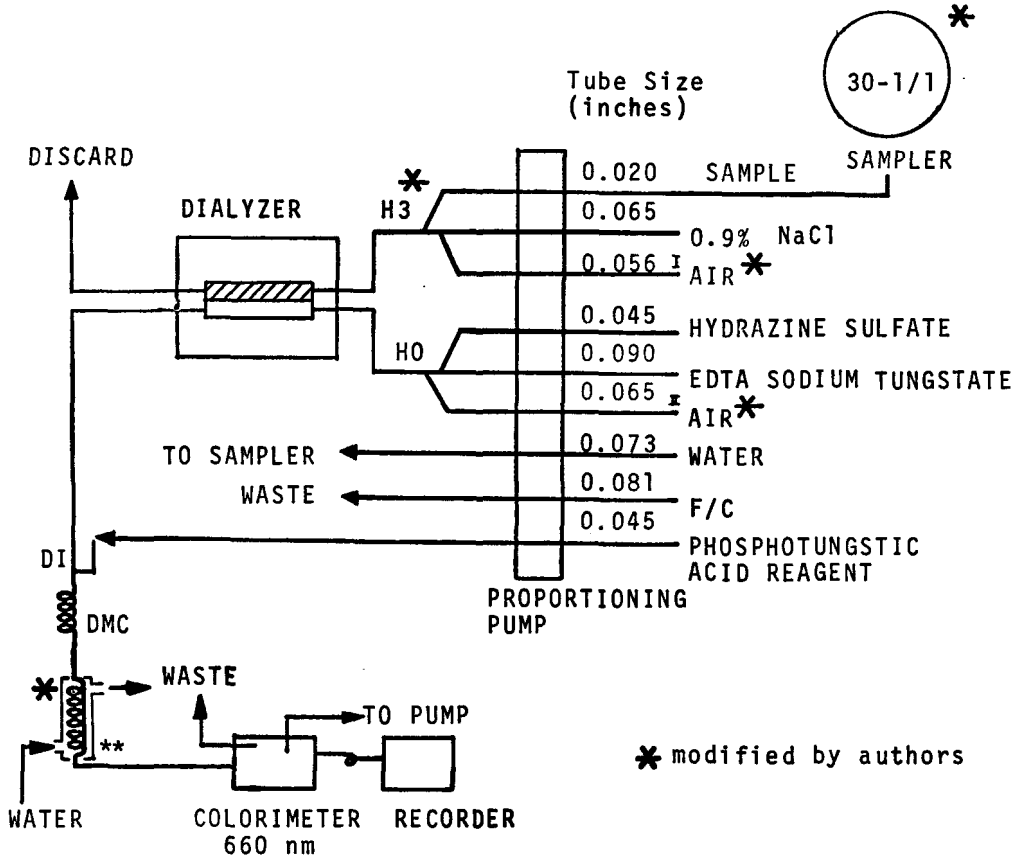
2-2. 装置

テクニコン社製の A. A.-I 型を使用した。

3. 測定方法の検討

3-1. 測定条件

Patel 法による測定方法を検討し, サンプラーのカムを原法の (40-1/2) から (30-1/1) に変え, サンプルラインの空気吸引チューブの内径 0.045 インチ (I), および発色試薬ラインの空気吸引チューブの内径 0.056 インチ (II) をそれぞれ 0.056, 0.065 インチに変え, また, H 3 型ガラスフィッティングに接続させた空気とサンプルのチューブの位置を逆にし, ウォーターバスコイルを冷却器つきミキシングコイルに変えたフローダイアグラム (Fig. 2) を利用すれば, ピーク間の分離がよいことがわかった。この測定条件によって記録されたフローチャートを Fig. 3 に示した。



* modified by authors

** Technicon code No. 116-102-1

Fig. 2. Flow diagram for automated uric acid assay

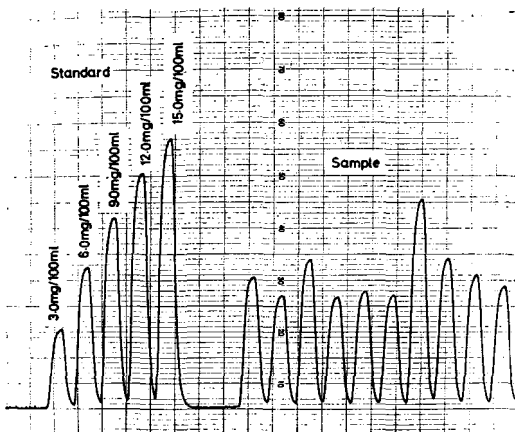


Fig. 3. Actual recording of automated uric acid assay

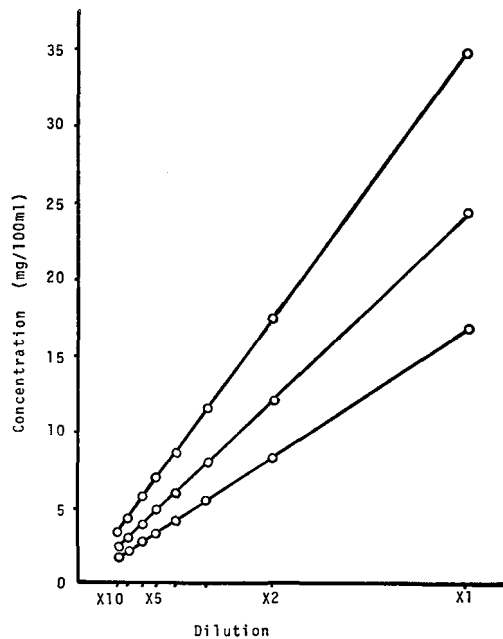


Fig. 4. Relation between uric acid concentrations and dilution of urine

Table 2. Recovery rate of uric acid added to serum and urine

No.	Uric Acid in serum (mg/100ml)		Uric Acid (mg/100ml)		Recovery rate (%)	Uric Acid in urine (mg/100ml)		Uric Acid (mg/100ml)		Recovery rate (%)
	Added	Found	Added	Found		Added	Found			
1	3.8	5.0	8.9	102.0	5.9	5.0	11.1	104.0		
2	5.0	5.0	10.1	102.0	4.4	5.0	9.6	104.0		
3	5.4	5.0	10.7	106.0	7.9	5.0	13.1	104.0		
4	4.3	5.0	9.5	104.0	6.0	10.0	16.2	102.0		
5	5.8	5.0	11.0	104.0	4.4	10.0	14.6	102.0		
6	3.8	10.0	14.1	103.0	7.9	10.0	18.3	104.0		
7	5.0	10.0	15.0	100.0	14.9	10.0	25.3	104.0		
8	5.4	10.0	15.9	105.0	5.9	20.0	25.8	99.5		
9	4.3	10.0	14.8	105.0	4.4	20.0	24.8	102.0		
10	5.8	10.0	16.3	105.0	7.9	20.0	27.7	99.0		
Mean (%)				103.6				102.5		
Range (%)				100.0 106.0				99.0 104.0		

Table 3. Precision of uric acid analysis

No.	Uric acid in serum (mg/100ml)			Uric acid in urine (mg/100ml)		
	Sample 1.	Sample 2.	Sample 3.	Sample 1.	Sample 2.	Sample 3.
1	5.4	6.5	8.4	4.7	8.8	24.8
2	5.4	6.6	8.3	4.7	8.9	25.0
3	5.4	6.8	8.3	4.8	9.0	24.9
4	5.5	6.8	8.2	4.8	9.0	24.9
5	5.5	6.7	8.4	4.8	8.9	25.0
6	5.5	6.7	8.3	4.8	9.0	24.8
7	5.5	6.6	8.4	4.9	9.1	24.9
8	5.5	6.5	8.4	4.8	9.0	24.9
9	5.6	6.7	8.4	4.8	9.0	24.9
10	5.6	6.6	8.4	4.8	9.1	24.8
Mean	5.49	6.65	8.35	4.79	8.98	24.89
S.D.	0.07	0.11	0.07	0.06	0.15	0.07
Range	5.4 5.6	6.5 6.8	8.2 8.4	4.7 4.9	8.8 9.1	24.8 25.0
C.V. (%)	1.35	1.62	0.84	1.19	1.68	0.28

3-2. 希釈試験

尿中尿酸は高濃度のことが多いので、原尿を脱イオン水で適当に希釈して測定試料とした。原尿を脱イオン水で2~10倍に希釈した場合の測定値間の変化について検討した結果、希釈倍数と測定値との間には、良好な直線性が認められた。原尿は5倍に希釈することとした(Fig. 4)。

3-3. 回収試験

プール血清に5.0,10.0mg/100mlの尿酸を、また5倍希釈した尿に5.0,10.0,20.0mg/100mlの尿酸を添加した時の回収率について検討した。血清では、100.0~

106.0%平均103.6%尿では、99.0~104.0%平均102.5%であった(Table 2)。

3-4. 精度

血清および尿(5倍希釈)の各3試料について、各々10回連続測定した時の精度について検討した結果、変動係数(C.V.)は血清では、0.84~1.62%平均1.27%、尿では、0.28~1.68%平均1.05%であった(Table 3)。

3-5. 本法とUAテスト(Wako)法による測定値間の相関について

血清95試料と尿35試料につき、本法(Patel変法)とUAテスト(Wako)法による測定値間の相関性に

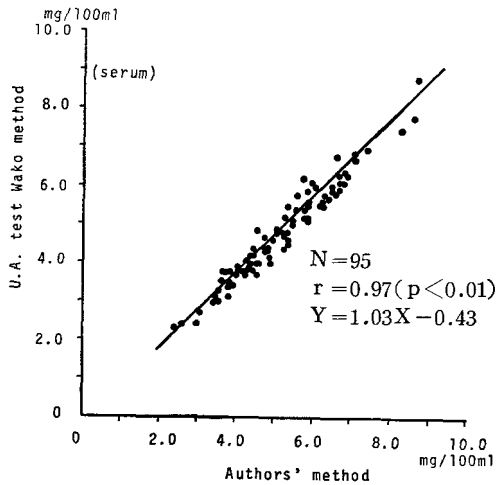


Fig. 5. Correlation between U. A. test Wako method and authors' method

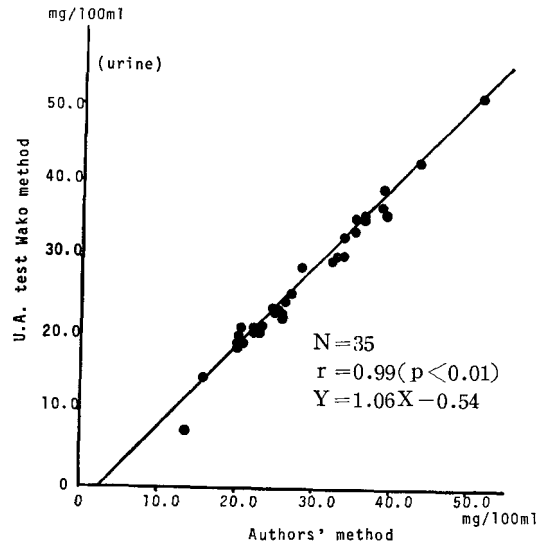


Fig. 6. Correlation between U. A. test Wako method and authors' method

Table 4. Normal mean values of serum uric acid

Author	Year	Method	Numbers of subjects	Mean (mg/100ml)	
				males	females
KAGEYAMA et al	1972	enzymatic colorimetry	170	4.7	3.5
MIKKELSEN et al	1965	enzymatic spectrophotometry	6000	4.9	4.2
GJORUP et al	1955	"	300	5.0	3.8
KITAMURA et al	1963	colorimetric	137	5.3	3.9
ALPER	1957	"	143	5.4	4.0
CROWLEY	1964	auto analyzer		5.6	4.4
KITAMURA et al	1966	"	196	5.7	4.3
TISE REPORTER	1979	"	68	5.8	4.4
FEICHTWEIR et al	1955	enzymatic spectrophotometry	78	5.9	3.8

ついて検討した。血清では、 $r = 0.97$ 、 $Y = 1.03X - 0.43$ (Fig. 5)、尿では、 $r = 0.99$ 、 $Y = 1.06X - 0.54$ (Fig. 6)であり、血清・尿試料とも良好な相関性が認められた。

4. 測定試料および結果

4-1. 測定試料

岡山大学温泉研究所および岡山大学医学部附属病院三朝分院に勤務する職員で、定期健康診断で異常を認めなかった健常者68例、(男子29例、女子39例)の肘静脈から採血して得た血清を試料とした。

4-2. 測定結果

健常者の血清尿酸値は、男子は $5.8 \pm 0.9 \text{ mg/100ml}$ 、女子は $4.4 \pm 0.8 \text{ mg/100ml}$ で、男子が女子に比べて平

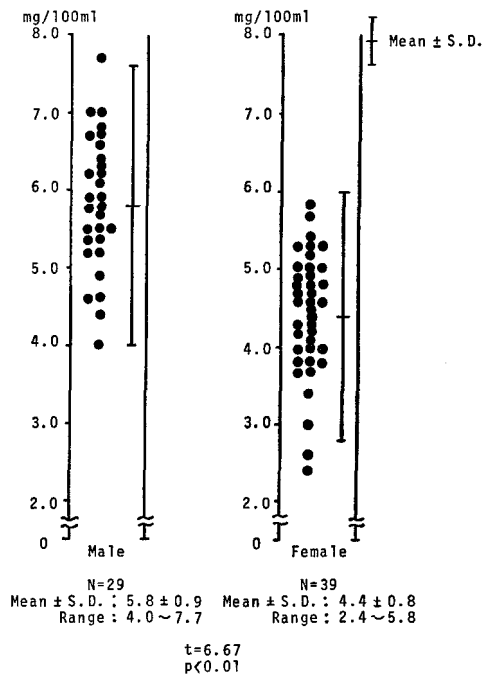


Fig. 7. Serum uric acid concentrations of normal subjects

均 1.4mg/100ml 高い値を示し、両者の間には、推計学的に有意な差を認めた (Fig. 7)。

5. 考按

現在、尿酸の測定法は、還元法から特異性の高い酵素法に移行する趨勢にあるが、酵素法では測定条件がデリケートで精度が十分でないなどの問題があるため、酵素法を日常検査に使用する施設は少なく、一般の臨床検査では還元法が多用されていることは、緒言に述べた如くである。他方、試料処理数の増加に伴って、還元法を用いたオートアナライザー法が広く行われ、同法による尿酸測定の結果が報告されている (CROWLEY 1964, BYWATERS 1964, PATEL 1968, WHEAT 1968)。

著者らは、A. A.-I 型を用い、尿酸のオートアナライザー法としては実用性があるといわれている Patel 原法に一部改良を加えた結果、テクニコン N-13 b 法および Patel 原法に比べて、感度もピーク間の分離もともにすぐれており、また回収率・精度については、血清・尿試料とも良好な成績を得ることができた。また、この改良方法による尿酸の測定は UA テスト (Wako) 法と良好な相関を示した。

著者らが改良を加えた Patel 変法は、A. A.-I 型による尿酸測定法として、日常の臨床検査に十分利用できるものと思われる。

尿酸の測定値は、測定方法によって差があることが知られており、BUCHANAN (1965) は、還元法は酵素法より約 0.5mg/100ml 高値を示すと報告している。Table 4. に記載した血清尿酸正常平均値をみても、測定値は各報告者によって差がみられるが、平均値では、男子の方が女子より 1~2mg/100ml 高値を示す傾向にあることは各報告とも同様である。著者らが Patel 変法によって測定した健常者の血清尿酸値を、Table 4. の測定値と比較すると、北村ら (1966)、CROWLEY (1964) が報告している、オートアナライザー法による測定値とはほぼ一致した。

6. 結語

AutoAnalyzer-I 型を用いる尿酸測定法である Patel 法を検討し、次の結果を得た。

- ① Patel 法のフローダイアグラムを改良し、サンプラーのカムを (30-1/1)、2カ所の空気の吸引チューブの内径を I = 0.056, II = 0.065 インチに変え、H 3 型ガラスフィッティングへの空気とサンプルの接続位置を逆にし、冷却器つきミキシングコイルを使用した結果、良好なフローチャートを得ることができた。
- ② 回収率は、血清で 103.6%、尿で 102.5% であり、変動係数は、それぞれ 1.27%、1.05% であった。
- ③ Patel 変法と UA テスト (Wako) 法との相関は、血清 : $r = 0.97$, $Y = 1.03X - 0.43$, 尿 : $r = 0.99$, $Y = 1.06X - 0.54$ と良好な相関が認められた。
- ④ この改良した Patel 変法を用いて、健常者 68 例 (男子 29 例、女子 39 例) の血清尿酸値を測定した結果、測定値は、男子 : 5.8 ± 0.9 mg/100ml、女子 : 4.4 ± 0.8 mg/100ml となり、有意な性差が認められた。

〔謝辞〕 稿を終るに当り御指導、御校閲をいただいた森永寛教授に深謝する。実験に際し、御協力いただいた岡山大学医学部附属病院三朝分院検査室の皆様にも厚く御礼申しあげる。

7. 文献

- ALPER, C., SEITCHIK, J. (1957) Comparison of the Archibaldk-ren and Stransky colorimetric procedure and the Praetorius enzymatic procedure for the determination of uric acid. *Clin. Chem.*, **3** (2), 95-101.
- BUCHANAN, M. J., ISDALE, I. C. and ROSE, B. S. (1965) Serum uric acid estimation chemical

- and enzymatic methods compared. *Ann. rheum. Dis.*, **24**, 285-288.
- BYWATERS, E. G. L. and HOLLOWAY, V. P. (1964) Measurement of serum uric acid in Great Britain in 1963. *Ann. rheum. Dis.*, **23**, 236-239.
- CROWLEY, L. V. (1964) An automated analysis based on a Carbonate method. *Clin. Chem.*, **10**, 838-844.
- FEICHTMEIR, T. V. and WRENN, H. T. (1955) Direct determination of uric acid using uricase. *Am. J. Clin. Path.*, **25**, 833-839.
- GJORUP, S., POULSEN, H. and PRAETORIUS, E. (1955) The uric acid concentration in serum determined by enzymatic spectrophotometry. *Scandinav. J. Clin. Lab. Invest.*, **7**, 201-203.
- 影山信雄 (1972) 新しい尿酸測定用キット 'ウリカラー・400' の検討. 臨床検査, **16**, 891-895.
- 御坐清允, 北村元仕 (1976) 尿酸—その数値をどう読むか—. 日本臨床, **34** (増刊号), 1860-1866.
- MIKKELSEN, W. H., DODGE, H. J., VAIKENBURG, H. (1965) The distribution of serum uric acid values in a population unselected as to gout or hyperuricemia: Tecumseh, Michigan 1959-1960. *Amer. J. Med.*, **39**, 242-251.
- PATEL, C. P. (1968) Semimicro method for determination of serum uric acid using EDTA hydrazine. *Clin. Chem.*, **14**, 764-775.
- WHEAT, J. L. (1968) An automated phosphotungstate method using NaOH as the alkali. *Clin. Chem.*, **14**, 630-636.

THE DETERMINATION OF URIC ACID USING MODIFIED PATEL'S METHOD

Yoshiko NISHIMURA*, Hiroko AOKI**, Masaaki MIFUNE** (Director: H. MORINAGA)

*Division of Internal Medicine, Institute for Thermal Spring Research, Okayama University
**Okayama University Hospital Misasa Branch

Abstract: N13-b method for determination of uric acid by AutoAnalyzer-I was proposed from Technicon Corporation, but the sensitivity of this method was insufficient. According to the modification by Patel, good sensitivity was obtained for determining of uric acid, but insufficient separation between peaks was accompanied. To get good separation, Patel's method was reexamined by the authors, and the results were as follows.

Sufficient separation was obtained by modifying the flow diagram of Patel's method. The mean recovery rates of uric acid added to serum and urine were 103.6% and 102.5%, and coefficients of variation were 1.27% and 1.05% respectively. The correlation between this modified Patel's method and the U. A. test Wako method was recognized (serum: n=95, r=0.97, urine: n=35, r=0.99). According to our modified method, uric acid concentration in serum of 68 subjects, were 5.8 ± 0.9 mg/100 ml in 29 males and 4.4 ± 0.8 mg/100 ml in 39 females.