

表8 赤坂地区降下ばいじん 測定日 昭和44年11月25日～12月25日

測定地点	PH	不溶解性物質		溶解性物質				総量
		t/km <sup>2</sup> /月	%	Ca	Mg	t/km <sup>2</sup> /月	%	t/km <sup>2</sup> /月
1	7.70	19.73	84.3	2.94	0.32	3.68	15.7	23.41
2	7.85	18.22	71.4	4.26	0.11	7.30	28.6	25.52
3	7.95	18.70	69.8	5.41	0.88	8.11	30.2	26.81
4	7.75	18.13	70.5	4.20	1.14	7.57	29.5	25.70
5	7.70	49.09	89.4	4.11	0.10	5.85	10.6	54.94
6	7.90	13.03	71.9	3.90	0.99	5.08	28.1	18.11
7	7.95	16.95	73.7	4.77	0.06	6.06	26.3	23.01
8	7.90	6.26	69.8	2.30	0.38	2.71	30.2	8.97
9	7.65	6.90	66.9	3.26	0.13	3.41	33.1	10.31
10	7.65	19.08	78.0	3.71	0.08	5.37	22.0	24.45
11	7.62	32.04	83.1	4.23	0.08	6.52	16.9	38.56
12	7.65	18.56	71.2	4.63	1.76	7.51	28.8	26.07

降下ばいじん：簡易法， Ca, Mg：EDTA法

## 5. 要 約

以上大垣市における大気汚染の概要を示したが、大垣市の大気汚染源は西部・南部工場群による産業公害と主要道路沿い地域における交通公害が主要であり、産業公害は工場群の防除施設の設置や操業転換等により汚染濃度が減少することを認めた。交通公害については別に報告する。また赤坂町の降下ばいじんは不溶解性物質が多いことを認めた。

杉浦 衛， 小木曾太郎， 佐々木正憲， 加納邦雄\*<sup>1</sup>， 加山直宏\*<sup>1</sup>：

酵母ウリカーゼに関する研究(2)

酵母ウリカーゼによる血清および尿中尿酸量の測定について\*<sup>2</sup>

(酵素剤の研究，第57報\*<sup>3</sup>)

Mamoru Sugiura, Taro Ogiso, Masanori Sasaki, Kunio Kano\*<sup>1</sup> and

Naohiro Kayama\*<sup>1</sup>: Studies on Yeast Uricase. 2.

Determination of Uric Acid in Serum and Urine with Yeast Uricase\*<sup>2</sup>

(Studies on Enzymes. LVII. \*<sup>3</sup>)

(Received October 5, 1970)

## Summary

Methods for determination of uric acid in serum and urine with highly purified uricase from

\*<sup>1</sup> 小野薬品中央研究所

\*<sup>2</sup> 本研究は日本薬学会東海支部45年9月例会にて発表した。

\*<sup>3</sup> 杉浦衛，佐々木正憲，薬誌，91，457(1971)

yeast were studied. A more simplified method which does not require stopper of the reaction and precipitating protein in serum and urine subsequent to filtration has been developed. Values of uric acid in serum with this uricase method, Folin's colorimetric method and Sigma's kits were very correlative. An attempt to make a kit for determination of uric acid with this method was successful.

尿酸は人間においては核酸代謝の最終産物であり, 尿中に排泄されている。プリン含有食物の摂取は, 腎臓疾患で血中尿酸含量が上昇する場合を除いて, 血中尿酸量に対して影響をおよぼさない。プリン含有食物の摂取に関係ない疾病, たとえば, 尿毒症, 白血病, 肺炎および痛風の場合には血液中に尿酸の異常な増加がみられる。<sup>1,2)</sup>

血液中の尿酸量の測定には多くの方法が使用されている。Folin らの燐タングステン酸比色法,<sup>3-5)</sup> Praetorius のウリカーゼにより分解される尿酸量を測定する方法および尿酸分解により生成する過酸化水素をパーオキシダーゼで分解し, O-トリジンを発色させる方法などがある。<sup>6-10)</sup> 著者らは比活性の高いウリカーゼ標品を酵母 (*Candida utilis*)<sup>11)</sup> より抽出, 精製して得たので, これを用いて酵素による尿酸の定量法を検討したところ, 好結果を得たので報告する。<sup>12)</sup>

## 実験方法

### 1. 供試材料

ウリカーゼは *Candida utilis* 6020 より抽出したのち前報の方法により部分精製した酵素標品を使用した。<sup>12)</sup> 尿酸および他の薬品はいずれも特級試薬を用いた。

### 2. 酵素活性の測定

#### 1) ウリカーゼ活性の定量

ウリカーゼ活性の測定は尿酸の 293 m $\mu$  における吸光度の減少を測定する方法を用いた。0.1M ホウ酸緩衝液 (pH 8.5) の 1 ml 当り, 尿酸 10  $\mu$ g を含む溶液の 2 ml に, 精製水 0.3 ml および酵素液 0.5 ml を 25° で加えて反応を行ない, 5 分後に 0.2 ml の 20% KOH 溶液を添加し, 酵素反応を停止した。その混液の 293 m $\mu$  における吸光度を測定した。対照としては, 20% KOH 溶液を酵素を添加する前に加えた。単位は上記条件下で 1 分間に尿酸 1  $\mu$ mol を酸化するのに要する酵素活性を 1 単位とした。

#### 2) 血清または尿中のウリカーゼ活性の定量

10 倍に希釈した血清 2 ml (尿の場合は 100 倍希釈) および 0.2M ホウ酸緩衝液 (pH 8.5) 3.0 ml の混液に酵素液に 1.0 ml を加え, 室温で 40~60 分反応した。なお反応には基質を完全に酸化しうる大過剰の酵素を使用したので, 特に反応停止液は用いなかった。反応液の吸光度を 293 m $\mu$  で測定し, 対照としては, 酵素液を加えない基質および緩衝液の混液を用いた。なお Fig. 1 に尿酸の紫外吸収曲線を示した。

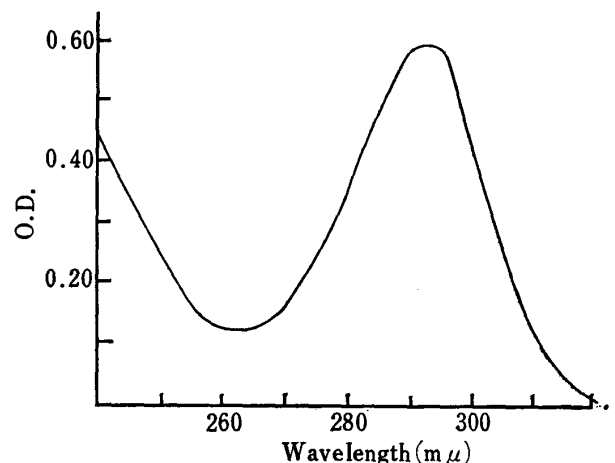


Fig. 1. Ultraviolet Absorption Spectrum of Uric Acid (8 mg/dl)

実験結果

1. 定量条件の検討

尿酸の定量法を確立するにあたり、定量条件の検討を行なった。

1) ウリカーゼの必要量の検討

尿酸量を測定する際に必要なウリカーゼの量について検討した。下記に示す組成(第1法)の系で各種濃度のウリカーゼ(1.4単位/mg)を作用させ、293 m $\mu$ で、Sampleを対照としてControlの吸光度を測定した。その結果をTable 1に示したが、0.014単位のウリカーゼ濃度にて十分使用できることが判明した。

第1法

(Control)				(Sample)		
Uricase+	0.2M Borate buffer(pH 8.5)	Uric acid (Serum)	+0.1 N KCN	Uricase +	0.2M Borate buffer (pH 8.5)	Uric acid (Serum)
1.0 ml	3.8 ml	0.2 ml	1.0 ml	1.0 ml	3.8 ml	0.2 ml
↓ Incubation for 60 min. at 37°				↓ Incubation for 60 min. at 37° + 0.1 N KCN 1.0 ml		

Table 1. Effect of Concentration of Uricase on Hydrolysis of Uric Acid

Concentration of uricase (%)	10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-5</sup>
E <sub>cm</sub> <sup>293m<math>\mu</math></sup>	0	0	0.030	0.242	0.241

2) 反応経過と反応温度の検討

第1法を用いて、血清中の尿酸量を測定する際の反応時間と反応進行経過との関係を20°と37°で検討した結果をFig. 2に示した。温度の影響は20°と37°では、ほとんど差がなく、反応時間30分で基質は完全に加水分解された。またウリカーゼ量を2倍にした場合、反応完結時間は20分であった。

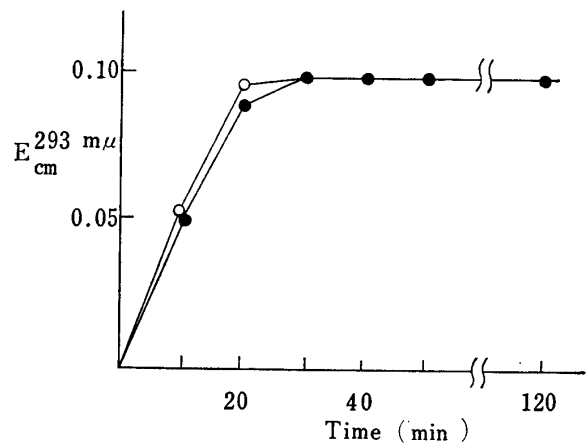


Fig. 2. Effects of Incubation Temperature and Time on Hydrolysis of Uric Acid

○ — 37°C      ● — 20°C

3) 反応停止剤の検討

停止剤0.1N KCN溶液のかわりに、20% KOH溶液を用い、第2法(A)を用いて測定した。

第2法(A)

(Control)				(Sample)		
Uricase +	0.2M Borate buffer(pH 8.5)	Uric acid (Serum)	+ 20% KOH	Uricase +	0.2M Borate buffer (pH 8.5)	Uric acid (Serum)
1.0 ml	3.8 ml	0.2 ml	1.0 ml	1.0 ml	3.8 ml	0.2 ml
↓ Incubation for 40-60 min. at room temperature				↓ Incubation for 40-60 min. at room temperature + 20% KOH 1.0 ml		

Sample を対照として Control の吸光度を測定した結果, 20% KOH 溶液を用いる第2法(A)が, 0.1 N KCN 溶液を用いる第1法よりも危険性が少ないことおよび定量値のバラツキが少ないことが判明した。しかし尿酸のかわりに血清を用いて測定すると, Sample 自体の吸光度が第1法の測定値よりも大きくなったが, 0.1 N KCN 溶液を用いる場合はあまり増大しなかった。このため停止剤を入れない測定方法 (第2法(B)) について検討した。

第2法(B)

<p>(Control)</p> <p>Pure water + 0.2M Borate Uric acid buffer(pH 8.5) + (Serum) 1.0 ml 4.8 ml 0.2 ml</p> <hr style="width: 100%;"/> <p style="text-align: center;">Incubation for 40-60 min. at room temperature</p>	<p>(Sample)</p> <p>Uricase + 0.2M Borate Uric acid buffer (pH 8.5) + (Serum) 1.0 ml 4.8 ml 0.2 ml</p> <hr style="width: 100%;"/> <p style="text-align: center;">Incubation for 40-60 min. at room temperature</p>
--	---

この方法は反応停止剤を用いないため Control にはウリカーゼのかわりに精製水を加えた。なお反応に使用する濃度のウリカーゼの 293 mμ での吸収は 0.002 であるので, その影響は無視し得るものと思われる。この方法で尿酸の検量線を作成したところ, Fig. 3 に示すように良好な結果が得られた。

次に, 第1法と第2法(B)とで血清 10 例について尿酸値を測定した結果を Table 2 に示した。その結果, 第1法および第2法(B)による定量値は比較的よく一致したが, No. 5 のように大きな変動のあるものもみられた。また第2法(B)を用いて同一血清について再現性を検討したところ, 誤差は約 10% であった。これは 293mμ における吸収値の高い血清を 0.2 ml 取る際の誤差によるものと思われる。

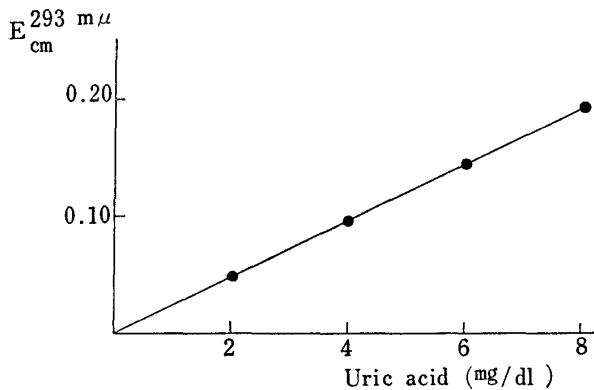


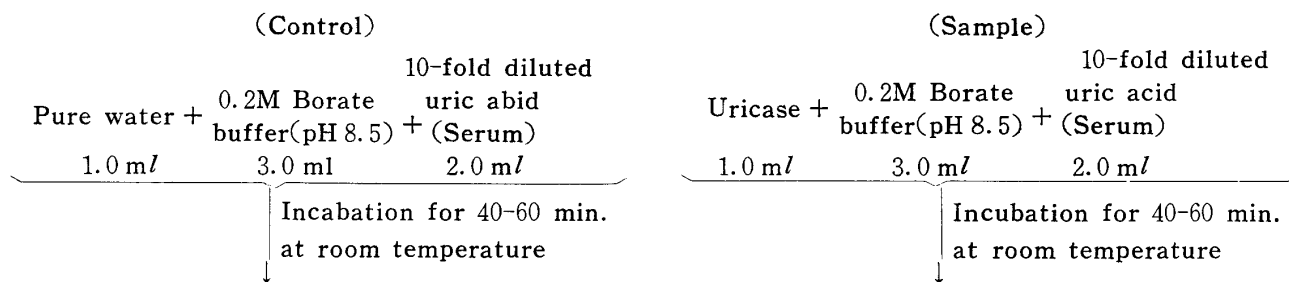
Fig. 3. Calibration Curve of Uric Acid  
Uric acid was dissolved in 0.2M borate buffer, pH 8.5

Table II. Comparison of Determination Methods for Uric Acid in Serum

Sample No.	First method (mg/dl)	Second method (B) (mg/dl)
1	4.1	3.8
2	5.8	5.8
3	3.1	3.4
4	2.5	2.1
5	3.6	4.5
6	5.8	5.2
7	6.4	6.2
8	3.8	4.0
9	3.2	3.4
10	6.6	8.0
Average	4.5	4.6

4) 希釈血清を用いて測定する方法 (第3法) 第2法(B)が再現性において若干劣ることから, 血清を 0.2 ml 使用するかわりに, 0.2M ホウ酸緩衝液 (pH 8.5) で 10 倍に希釈した血清を 2 ml 用いて測定した。

## 第3法



第3法を用いて血清中の尿酸を測定した結果を Table III に示したが, Sample と Control の血清量の採取誤差を少なくすることができた. さらに同一血清をもちいて, 再現性を検討したところ, 誤差は 3.7% に低下した.

## 5) 血清の除蛋白についての検討

除蛋白後の血清と除蛋白しない血清について比較した.

a) 加熱除蛋白血清での尿酸定量 血清に 0.1M 酢酸カルシウム (pH 7.0) を加えて 10 分間加熱遠沈し, その上清の尿酸量を測定した値と, 血清を希釈し, そのまま尿酸を測定したものと, 前者の方が約 1 mg/dl 程度大きい定量値を示した.

b) 除蛋白剤によって除蛋白した血清での測定 Folin-リンタングステン酸比色法の除蛋白剤を用い血清を処理後, 尿酸量を測定した値と, 血清をそのまま測定したものとを比較したところ, 尿酸定量値は完全に一致した.

a), b) の違いを確かめるために血清 1 ml と精製水 4 ml を加え, 10 分間加熱した検体と未処理の血清について同時に測定した結果, 両者の尿酸定量値は一致した. したがって血清の除蛋白は行なわなくても測定値には影響を与えない. しかしながら除蛋白する方が Sample の吸光度が低くなり, 読み取り誤差を少なくすることができる.

## 6) 尿中尿酸量の測定

尿 (24 時間尿) を 100 倍に希釈し, 第3法を用いて測定した. 尿の場合は血清と異なり Sample 自体の吸光度も少なく, そのうえ尿酸量が多いので 100 倍に希釈できるが, 24 時間尿を採取しなければならないのが難点である.

## 7) 尿酸の回収率

血清に尿酸 (2.0~4.0 mg/dl) を添加し, その回収率を, 第3法を用いて検討した. Table IV に示すように, 平均回収率 97.5%, 誤差 ± 2.8% と良好な結果が得られた.

## 8) 麟タングステン酸比色法と第3法との比較

ヤトロン・キットによる麟タングステン酸比色法とを比較した. Fig. 4 に示すように両者は相関が認められたが, 第3法による値が全般に低値を示した. これはウリカーゼの基質特異性によるものと思われる.

## 2. 尿酸測定キットの試作

## 1) 凍結乾燥アンプルの作製

Table III. Comparison of the Amount of Uric Acid in Serum Obtained with Third Method

Sample No.	Determined value (mg/dl)	
	1	2
1	5.5	5.1
2	4.9	4.9
3	0.4	0.5
4	5.8	6.2
5	3.8	3.7
6	6.0	6.0
7	3.3	3.1
8	4.7	4.9
9	6.5	6.3
10	4.3	4.1
Average	4.5	4.5

Table N. Recovery of added Uric Acid from Serum

No.	Serum (mg)	Uric acid added (mg)	Uric acid found (mg)	Uric acid expected (mg)	Recovery (%)
1	4.3	2.0	6.2	6.3	98.4
2	7.6	2.0	9.4	9.6	98.0
3	5.7	2.0	7.8	7.7	101.2
4	5.4	2.1	7.0	7.5	93.4
5	2.2	2.1	4.0	4.3	93.0
6	4.8	2.1	6.7	6.9	97.1
7	3.5	2.2	5.7	5.7	100
8	4.0	2.2	5.8	6.2	93.5
9	6.9	4.0	10.5	10.9	96.3
10	5.5	4.0	9.9	9.5	104.2

10 ml容アンプルに血清(尿酸)を除いた Sample の組成液を入れ, 凍結乾燥を行ない, ウリカーゼの安定性を測定した. 5°および37°では, 1ヶ月後も失活は認められなかった.

2) 反応液アンプルの作製と測定法

ウリカーゼの水溶液のキットが可能か否かを知るため Control の組成液(血清を除く)を試験管に入れ, これにカビ, バクテリア名々4種類を植え, 25°で1週間および1ヶ月間放置した. その結果, 濁りの生成もみられず, また酵素の失活も安定剤(EDTA)の添加により防止することが可能であった.<sup>12)</sup> なお EDTA 10<sup>-4</sup>M を含む Sample の組成液(血清を除く)を室温で1ヶ月放置後もウリカーゼ活性の低下は認められなかった.

次に実際にアンプルを作製し, 尿酸を定量した. アンプル(10 ml容) Aに Sample の組成液を, アンプル Bには Control の組成液を封入した.

a) 測定法 精製水で10倍に希釈した血清 2.0 ml を A, B両アンプルに入れ, 室温にて40~60分放置後, Aを対照としてBの293 mμにおける吸光度を測定した. 尿(24時間尿)の場合は, 100倍に希釈し, その2 ml をもちい, 同様に測定した. 尿酸量の算出には下記の式を用いた.

$$\text{血清中の尿酸量 (mg/dl)} = \frac{\text{吸光度(B - A)}}{0.24} \times 10$$

$$\text{尿中の尿酸量 (mg)} = \frac{\text{吸光度(B - A)}}{0.24} \times 100 \times 24 \text{時間尿量 (dl)}$$

0.24は尿酸の分子吸光係数から算出した係数であり, 血清の場合の10, 尿の場合の100は, それぞれ希釈率を表わす.

このキットを用いての尿酸定量は第3法と全く同様に行うことができる.

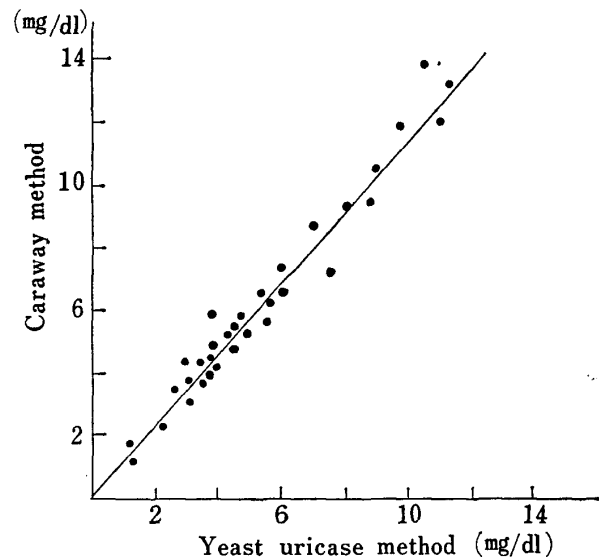


Fig. 4. Comparison of Results with the Two Methods for Uric Acid Determination

## 考 察

前述したように血液中の尿酸定量法には種々の方法が報告されている<sup>3-11)</sup>。血中および尿中の尿酸定量を尿素法（第3法）と燐タングステン酸比色法で行なったところ、酵素法（第3法）での定量の結果が真の尿酸値に近い値を示した。この方法は標準曲線を作成する必要がなく、しかも高単位のウリカーゼを使用できるので、操作が非常に簡単であり、誤差の原因となる停止剤を使用する必要もない。

血液の場合は血清自体の293 mμにおける吸光度が高いので、できるだけ正確に測らなければならない。ネフローゼ様血清など幾分濁りのある場合でも測定にはほとんど影響を与えなかった。さらに血清量も少量でよく、ヤトロソ・キットにみられるような吸光度を測定する時間は考慮する必要がない。

酢酸カルシウムを入れて加熱するとき、約20%ほど定量値が増加したが、これは普通の除蛋白や単なる加熱では定量値の増加がみられないことから、血清中の蛋白などと結合している尿酸がこれによって遊離され、それだけ定量値が高く出るものと思われる。

なお東大分院臨床化学教室において、Sigma製の尿酸UVキット（No 292-UV）、日常検査によく用いられる燐タングステン酸比色法（caraway-Henryの変法）および第3法とで同一血清の尿酸量について測定した結果、Fig. 5に示すように、三者の値はよい一致を示した。この場合、燐タングステン酸比色法と第3法との相関係数は0.955、Sigma-UV法と第3法とのそれは0.99であった。したがって著者らの第3法が血清および尿中の尿酸定量に十分利用しうるが、さらに操作を簡便にするには、第3法での0.2Mホウ酸緩衝液の代わりに、0.2Mホウ酸緩衝液で25倍に希釈した血清5mlを使用する。

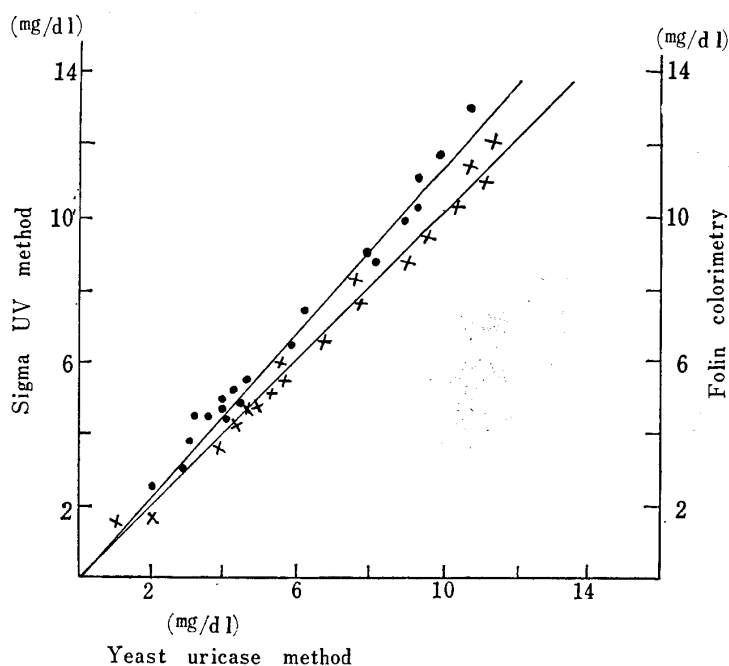


Fig. 5. Comparison of Results with the Three Methods for Uric Acid Determination  
 —●— Colorimetry and yeast uricase method  
 —×— Sigma UV and yeast uricase method

## 要 約

高純度の酵母ウリカーゼを用いて、血中および尿中の尿酸定量法について検討した。その結果、反応停止剤、血清および尿の除蛋白および汚過を必要としない、非常に簡便な方法を開発した。

このウリカーゼ法と燐タングステン酸比色法およびSigma製尿酸測定キットにおける血清尿酸定量値は良好な相関関係を示した。またこのウリカーゼ法による尿酸測定キットを試作し、尿酸の定量を行なったところ、満足すべ結果を得た。

文 献

- 1) Gutman, A. B. and Yu, T. F. : New Engl. J. Med., **273**, 252 (1965)
- 2) Montoya, H. J. et al. : Ann. Int. Med., **66**, 838 (1967)
- 3) Folin, O. and Wu, H. : J. Biol. Chem., **38**, 81 (1919)
- 4) Benedict, S. R. : J. Biol. Chem., **51**, 187 (1922)
- 5) Steel, A. E. : Biochem. J., **68**, 306 (1958)
- 6) Kalcker, H. M. : J. Biol. Chem., **167**, 429 (1947)
- 7) Praetorius, E. : Scand. J. Clin. Lab. Invest., **1**, 222 (1946)
- 8) Praetorius, E. and Poulson, H. : ibid., **5**, 273 (1946)
- 9) Rubbs, C. A. et al. : J. Biol. Chem., **218**, 497 (1956)
- 10) Klein, F. and Lafeber, G. J. H. : Clin. Chim. Acta. **14**, 708 (1966)
- 11) 日本特許公告 昭41-4440.
- 12) 杉浦 衛, 加納邦雄, 清水浩 : 岐阜薬大紀要 **19**, 37 (1969)

松原 弘 ; 地蜂の幼虫投与によるラットの発育に及ぼす影響について

Hiromu Matubara : Effect on the Growth of young Rat by  
Administration of Digger Wasp Larva  
(*Vespula Lewisi Saussure*)

(Received October 6, 1970)

Summary

The effects of digger wasp larva on the growth of young rats (Wistar strain) were observed for 30 days.

When the animals fed with basal diet were administered larva-homogenate of digger wasp at a level of 0.2 and 0.4 g per day, was shown a marked increase of body weight as compared with that of the control fed only with basal diet. Animals feeding on low protein showed not increase in weight, but the addition of larva-homogenate in it was effective for the growth of them. The rats given vitamin-deficient diet died in 24-26 days, but in the case where larva-homogenate was added to the same rats, the effect was all the same as the case of the addition of larva-homogenate to basal diet.

一般に蜂の幼虫は本草綱目などに強精剤として記載され、古くから薬用に供せられている。また、地蜂の幼虫は長野県や岐阜県の東濃地方では「ヘボ」または「ハエバチ」などと呼ばれ、実際に食用として珍重されている。しかし、その成分についてはこれまで殆んど報告されていない。

近年、蜜蜂の生産するローヤルゼリーが注目され、その成分研究が次第に行なわれるようになると共に滋養食品や薬剤などに利用されるようになった。著者は地蜂の幼虫の薬効的および栄養学的価値を検討する目的で、先ず地蜂の幼虫をラットに投与して、その成長におよぼす影響について検討し、栄養学的に価値あることを認めたので報告する。