自動記録滴定装置による尿中酸の測定

酸排泄機能の研究. 第1報

中 嶋 久 雄
札幌医科大学泌尿器科学教室 熊 本 悦 明
古 屋 聖 児

BASIC STUDIES ON TITRATION-CURVE ANALYSIS OF URINE

—Studies on Urinary Acidification I—

Hisao Nakajima, Yoshiaki Kumamoto and Seiji Furuya

Department of Urology, Sapporo Medical College

(Director: Prof. Y. Kumamoto)

The previous method which measures urinary acid excretion has various disadvantages in its measurement. The auto-recording titrable apparatus, by which the titration curve and its differential curve were calculated, were used to the measurement of the level of urinary weak acids.

Using this apparatus, we investigated the influences of 1) temperature 2) hematuria 3) urinary protein and 4) bacteriuria on the urinary pH and the urinary level of weak acids.

The results were as follows:

1. Urine specimens, when they had been left at room temperature for only 2 days, showed marked changes in the urinary pH and the level of weak acids. The specimens frozen at -20°C for 30 days, however, did not produce any changes.

2. The hematuria, which was clinically recognized as a marked macroscopic hematuria, does not influence on the level of weak acids in specimens. The slight increase of urinary pH was shown in the same experiments. This, however, does not seem to bring any unfavorable results to clinical practice.

3. Urinary pH and the level of titrable acid were not influenced by the addition of albumin and γ -globulin to the specimens, although the urinary level of NH_4^+ was slightly increased in a few samples.

4. Bacteriuria with either *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa* or *Proteus mirabilis*, produced some increase of urinary pH and the level of NH_4^+ , and some decrease of the level of urinary titrable acid. The most prominent changes were observed in the cases of bacteriuria with *Proteus mirabilis* even after incubation of urine for 5 hours. In cases of bacteriuria, therefore, careful interpretation of results is necessary in the measurement of urinary pH, the level of urinary titrable acid and NH_4^+ .

要旨: 従来の尿中酸排泄量の測定方法は、尿 pH、滴定酸(TA)、アンモニウムイオン(NH_4^+)、重炭酸イオン(HCO_3^-)、をそれぞれ個々に測定しなければならず、またその測定方法は熟練を要する。そこで、自動記録滴定装置を用いて、尿にアルカリを添加した時の滴定曲線およびその微分曲線により、尿中弱酸の種類と量を求めた。この方法は簡便で、正確であり、充分実用に供され得る。

次にこの方法を用いて、種々の条件下における尿 pH および弱酸の量の変化を検討した。検体の尿は室温放置では2日目ですでにかなりの変化をきたしたが、 -20°C の冷凍保存では30日目でも全く変化が見られなかった。また血尿の有無による変化を調べるため、尿へ血液を混入して測定したところ、10ml/l urine のかなりの肉眼的血尿でも、pH が軽く上昇する程度で、滴定酸、 NH_4^+ はほとんど変化しなかった。次に尿中蛋白の影響を調べるため、尿中へアルブミン、 γ -グロブリンを混入して測定したところ、尿 pH、滴定酸はほとんど変化しなかったが、 NH_4^+ で一部軽度上昇するものがあり、注意を要すると思われる。また細菌尿による影響を *E. coli*, *Ps. aeruginosa*, *P. mirabilis* で調べたところ、*P. mirabilis*, *Ps. aer-*

uginosa, E. coli の順で、尿 pH 上昇、滴定酸下降、 NH_4^+ 上昇の作用が強い。P. mirabilis では 5 時間 incubation でも強い変化が起き、感染尿の測定には充分な注意が必要である。

緒 言

腎は肺とともに生体の酸塩基平衡維持に重要な役割を担っている。生体に酸あるいはアルカリが負荷されたとき、緩衝系と呼吸により pH が調節され、次に腎により HCO_3^- の補充と酸あるいはアルカリの排泄が行なわれる。また腎は 1 日に生体で発生する 40~80mEq の不揮発性の酸を排泄している。このため腎は最高 4.4 まで尿の pH を低下させ得るが、この free の H^+ イオンの量は全体の 40~80mEq と比較するとはるかに微量で、大部分は滴定酸および NH_4^+ の形で排泄される。この H^+ の排泄は腎の尿細管において行なわれるため、酸排泄能は腎機能のうちでも尿細管機能を反映すると考えられ、泌尿器科疾患の腎機能の評価のためには特に重要と考えられる。しかしこの場合 free の H^+ のみを反映する尿 pH だけを測定しても分泌された H^+ の全体量を知る事はできず、 H^+ イオンの排泄量を知るには、尿中の滴定酸と NH_4^+ の両方を測定し検討する必要がある。

従来の尿中酸排泄量の測定方法は考按の項で詳しくのべるが、非常に煩雑で熟練を要する。しかし尿の滴定曲線およびその微分曲線を描けば比較的簡単に滴定酸、 NH_4^+ 、 HCO_3^- の濃度を算出することが可能であるということから、我々は自動滴定記録装置を用い、それら曲線を描き、尿中酸排泄量を測定した。この方法は今までは十二指腸液等の検査に用いられていたが、尿への応用はいまだ一般化していない。しかしこの方法は、一連の自動操作で測定できるため、きわめて簡便であり、またその測定精度も高く、臨牀的に有用と考えられた。そこで本測定法の尿への応用上考えられる種々の問題を基礎的に検討したのでここに報告する。

実験方法

1. 測定装置

pH の測定には HM-5BS 型 pH 計（東亜電波株式会社）にガラス電極 GST-155C を付して使用した。被検液をマグネティックスターラーにて攪拌しながら、HMS 10 型スタットで 0.1 規定 NaOH を 2 ml/min の速度で滴定し、その pH の変化を EPR-200A 記録計にて記録した。

2. 予備実験

まず本装置において、滴定酸の主成分である NaH_2PO_4 、および NH_4^+ の解離指数 (pKa) を算出すべく、

それぞれの溶解液を 0.1 規定 NaOH で滴定し、滴定曲線およびその微分曲線を作成した。

1) NaH_2PO_4 の pKa 算出

0.1 規定 NaH_2PO_4 3 ml に蒸留水 30 ml を加え、0.1 規定 NaOH で滴定した。

Fig. 1 がその滴定曲線と一次微分曲線である。縦軸が加えた NaOH 量をあらわす。最初 pH は NaOH を加え始めた時点で急激に上昇するが、これはすぐに緩やかな pH 上昇に移行する。この最初の pH の急変は溶液に急にアルカリが加えられたための、非特異的な反応と思われる。次に pH は NaOH が加えられるに従って徐々に上昇するが、pH が 8 のあたりで勾配が急になり、微分曲線もピークを形成する。これは pH 飛躍 (pH Jump) とよばれ、NaOH の一定微量をもつて pH の変化値を割つてえた商、すなわち微分商 ($\Delta \text{pH} / \Delta V$) が最大の点であつて、理論上当量点に一致する¹⁾。この当量点に達するまでに滴定された NaOH の半量を滴下したときの pH が解離指数 (pKa) で、各物質について一定の値を持っている。

NaH_2PO_4 に NaOH を滴下したときの pKa は 6.80~6.90 (6.85 ± 0.012) であつた。また横軸から

Fig. 1 Titration of NaH_2PO_4

NaH₂PO₄量を測定したところ、3.00~3.10ml となり、
実際に加えた NaH₂PO₄量とはほぼ一致した。

2) NH₄Cl の pKa 算出

0.1規定 NH₄Cl 5ml に蒸留水30ml を加え、0.1規定
NaOH で滴定した、このときの滴定曲線および微分曲
線が Fig. 2 である。

pH Jump は NaH₂PO₄ よりもピークがなだらかで
あるが、この pKa は9.45~9.50(9.48±0.008)であつ
た。また横軸から NH₄Cl 量を 測定したところ
5.0~5.1ml となり、実際に加えた NH₄Cl 量にほぼ一
致した。

3) NaH₂PO₄ と NH₄Cl 混合液の pKa 算出

尿には NaH₂PO₄ と NH₄⁺が混在しているため、両
者を混合した場合、それぞれの pKa が上記の単独測定
と差異があるか否かを検討した。両者の混合は、0.1規
定 NaH₂PO₄ (2, 4 ml), NH₄Cl (1, 2, 3, 4,
5 ml)の各種の組合せで作成し、それぞれを滴定した。
この滴定曲線およびその微分曲線が Fig. 3 である。
この時の pH Jump は2つ見られ、最初の pH Jump の
pKa は6.88~7.00 (6.93±0.014) で NaH₂PO₄に相当
する。第2の pH Jump の pKa は9.35~9.45 (9.41±
0.015)であり、NH₄Cl に相当する。また横軸から Fig.

Fig. 2 Titration of NH₄⁺

Fig. 3 Titration of mixed solution of NaH₂PO₄ and NH₄⁺

3 のごとく H₂PO₄⁻および NH₄⁺を測定した結果が
Table 1 である。このように、測定値と実際に加えた
量とはほぼ同じ値を示している。

4) HCO₃⁻測定の精度の検定

0.1規定 NaH₂PO₄ 2ml, 0.1規定 NH₄Cl 2ml の混合
液中に、さらに0.1規定 NaHCO₃⁻を加えたものをA液
とし、このA液に HCl を加えて pH4.0以下とし、更に
煮沸して HCO₃⁻を CO₂として追い出したものをB液

Table 1 Titration of mixed solution of NaH₂PO₄ and NH₄Cl

Composition of mixed solution (ml)		Value obtained from titration curve (ml)	
NaH ₂ PO ₄	NH ₄ Cl	NaH ₂ PO ₄	NH ₄ Cl
2.00	1.00	2.00	1.00
2.00	2.00	2.00	2.00
2.00	3.00	2.10	3.00
2.00	4.00	2.00	4.00
2.00	5.00	1.90	5.20
4.00	1.00	3.90	0.90
4.00	2.00	3.90	2.10
4.00	3.00	3.90	2.90
4.00	4.00	4.00	4.00
4.00	5.00	3.90	5.10

とした。このA、B両液を0.1規定 NaOH で滴定し、両 deta から HCO_3^- 量を算出し、実際に付加した HCO_3^- 量との比較を行った。

HCO_3^- の回収率は92~99%であった。

5) 尿の pKa 算出と type 分類

正常及び各種腎疾患患者40例の24時間蓄尿から10 ml を取り、蒸留水30ml で4倍希釈ののちに、0.1規定 NaOH で滴定曲線を描き、尿中酸の pKa を解析した。

長沢²⁾によると尿の滴定曲線は pH Jump の数により3 type に分類される。すなわち pH Jump が1つある J type、2つある JJ type、3つある JJJ type、である。J type は尿 pH 7.1以上の3検体に認められた。JJ type (Fig. 4) は pH 6.2~7.0までの17検体であった。また JJJ type は pH 6.1以下の20検体であった。J type の pH Jump、JJ type の第2の pH Jump、および JJJ type の第3の pH Jump に相当する pKa は9.2~9.5 (9.34 ± 0.019) であり、 NH_4^+ に相当すると考えられる。JJ type の第1の pH Jump、JJJ type の第2の pH Jump に相当する pKa は6.5~7.0 (6.90 ± 0.028) で H_2PO_4^- に相当する部分と考えられる。また JJJ type の第1の pH Jump に相当する部分の pKa は5.1~6.2 (5.6 ± 0.056) であった。これはクエン酸 (pKa 5.89)、尿酸 (pKa 5.4) クレアチニン (pKa 4.97) などの有機酸に相当する部分と考えられる¹⁾³⁾。

滴定酸は H_2PO_4^- とこの有機酸から成り立っていると考えられている。有機酸が滴定酸に占める割合は、 H_2PO_4^- に比較すると小さい。すなわち尿 pH が低い場合 H_2PO_4^- だけでなく、pKa の低い有機酸も H^+ と結合し滴定酸の一部を構成するようになるが、pH が6.1以下のこのような場合でも、滴定酸に占める有機酸の割合は10~45%であった。

Fig. 4 Titration curve of urine

実験結果

尿の保存状態および種々の尿の条件下で、尿 pH および含有酸量が変化するか検討した。

1. 尿の保存状況

成人男子5例の中間尿をそれぞれ室温および-20℃に保存し、48時間後、7日後および30日後に尿 pH、滴定酸、 NH_4^+ 量を測定し、採尿直後に測定した結果と比較した。また室温保存2日目の5検体について尿培養を行った。

1) pH の変化 (Table 2)

〔室温保存〕：48時間で pH は0.3~1.1の上昇を3検体に認め、7日後には5検体全部が0.3~2.2の上昇を

Table 2 Urinary pH changes stored at different temperatures

Subject	Immediate determination	48 hours at		7 days at		30 days at
		20℃	-20℃	20℃	-20℃	-20℃
1	6.0	0.7	0	2.2	0	0
2	5.5	0.3	0	1.9	0	0
3	7.1	-0.2	0.2	0.3	0.1	0
4	5.7	-0.1	0	0.5	0	-0.1
5	6.4	1.1	0	1.6	0	0
mean	6.14	0.36	0.04	1.30	0.02	-0.02

Increase over immediate determination of pH

Table 3 Urinary TA changes stored at different temperatures

Subject	Immediate determination	48 hours at		7 days at		30 days at
		20 °C	- 20 °C	20 °C	- 20 °C	- 20 °C
1	11.0	- 7.0	- 1.0	- 11.0	0	- 1.0
2	31.0	- 3.0	- 0	- 31.0	- 1.0	0
3	2.0	1.0	- 1.0	- 2.0	0	0
4	33.0	- 1.0	- 2.0	- 10.0	- 1.0	0
5	20.0	- 20.0	- 1.0	- 20.0	- 1.0	- 1.0
mean	19.6	- 6.0	- 1.0	- 14.8	- 0.6	- 0.4

Increase over immediate determination of TA, mEq/l

Table 4 Urinary NH₄⁺ changes stored at different temperatures

Subject	Immediate determination	48 hours at		7 days at		30 days at
		20 °C	- 20 °C	20 °C	- 20 °C	- 20 °C
1	46.0	- 29.0	0	70.0	- 1.0	- 1.0
2	64.0	- 5.0	- 2.0	52.0	0	- 2.0
3	32.0	3.0	- 1.0	3.0	2.0	1.0
4	97.0	4.0	3.0	20.0	2.0	1.0
5	86.0	30.0	- 3.0	90.0	- 2.0	- 1.0
mean	65.0	0.6	0.6	47.0	0.2	- 0.4

Increase over immediate determination of NH₄⁺, mEq/l

示した。

〔-20℃冷凍保存〕：30日後においても、尿 pH はほとんど変化しなかった。

2) 滴定酸の変化 (Table 3)

〔室温保存〕：尿 pH が上昇するに従って滴定酸は減少していき、48時間で平均 6 mEq/l 減少し、7日後には14.8 mEq/l の減少が認められた。

〔-20℃冷凍保存〕：滴定酸は30日後においても、平均0.4mEq/l の減少のみでほとんど不変であつた。

3) NH₄の変化 (Table 4)

〔室温保存〕48時間後では平均0.6mEq/l の増加でほとんど変化は認められないが、7日後では平均47 mEq/l と著明な上昇が認められた。

〔-20℃冷凍保存〕：30日後には平均0.4mEq/l の減少で、変化はほとんど認められなかつた。

4) 尿中細菌

上記の変化のほとんどは保存尿中の細菌増殖によると考えられた。そこで上記尿を細菌学的に検索した。48時間後の室温保存尿の培養では3検体に *S. epidermidis* 10⁷~10⁸/ml が検出された。また *S. fecalis* 10¹⁰/

ml, *S. aureus* 10⁷/ml がそれぞれ1検体に検出された。

尿中蛋白はいずれも陰性であつた。

2. 血尿の影響

血尿の場合、血液の pH および血液含有物質による影響が、尿の pH、滴定酸、NH₄⁺に変化を及ぼすかを検討した。

5検体の尿に、血液をそれぞれ10ml/l urine, 25ml /l urine, 50ml/l urine になるように混入した検体を測

Table 5 Urinary pH changes after adding blood

Initial pH	Blood added, ml/l, urine		
	10	25	50
5.6	0.1	0.1	0.1
5.3	0.1	0.2	0.3
6.3	0.1	0.2	0.3
5.7	0.1	0.4	0.4
5.8	0	0.1	0.2
Mean	0.08	0.20	0.26

Increase over initial pH

定し、血液を混入する前の検体の測定値と比較した。いずれも肉眼的に明らかな血尿であった。

1) pH の変化 (Table 5)

血尿が10ml/l, 25ml/l, 50ml/l と濃くなるに従って、尿 pH は平均0.08, 0.20, 0.26 と上昇が認められた。

2) 滴定酸の変化 (Table 6)

滴定酸は減少しているが、最大でも血液混入前の測定値の10%以下の減少にすぎない。

3) NH₄⁺の変化 (Table 7)

NH₄⁺の減少も、最大でも血液混入前の測定値の10%以下にすぎない。

3. 蛋白尿の影響

5 検体の尿蛋白陰性の尿に、ヒトアルブミンおよびγグロブリンをそれぞれ1g/l, 5g/l, および10g/l の割合で溶解した検体を測定し、溶解前の検体の測定値と比較した。

1) pH の変化 (Table 8)

アルブミン、γグロブリン共に pH の変化はほとんど認められない。

Table 6 Urinary TA changes after adding blood

Initial TA	Blood added, ml/l, urine		
	10	25	50
52	-1.0	-4.0	-4.0
25	0	-1.0	-1.0
5	0	0	0
10	0	0	0
35	0	-1.0	-3.0
Mean	-0.2	-1.2	-1.6

Increase over initial TA, mEq/l

Table 7 Urinary NH₄⁺ changes after adding blood

Initial NH ₄ ⁺	Blood added, ml/l, urine		
	10	25	50
132	-2.0	-2.0	-4.0
32	0	-1.0	-1.0
14	0	0	-1.0
21	0	0	-1.0
62	0	0	0
Mean	-0.4	-0.6	-0.4

Increase over initial NH₄⁺ mEq/l

Table 8 Urinary pH changes after adding protein

Initial pH	Albumine added, g/l			Globuline added, g/l		
	1	5	10	1	5	10
6.4	0	0	-0.1	0	0	0
7.5	0	0	0	0	0	0
6.5	0	0	-0.2	0.1	0.1	-0.1
5.2	0	0	0	0	0	0
6.6	0	0	0	0.1	0	-0.1
Mean	0	0	-0.06	0.04	0.02	-0.04

Increase over initial pH

2) 滴定酸の変化 (Table 9)

アルブミン、γグロブリン共に滴定酸の変化はわずかである。しかし蛋白溶解前の滴定酸測定値が5 mEq/l と低値であった1検体は、2 mEq/l (40%) の上昇が認められた。

3) NH₄⁺の変化 (Table 10)

これもアルブミン、γグロブリン共に測定値の変化は小さい。しかし最初の NH₄⁺値が24mEq/l と低値で

Table 9 Urinary TA changes after adding protein

Initial TA mEq/l	Albumine added, g/l			Globuline, added, g/l		
	1	5	10	1	5	10
29	0	0	2.0	-3.0	-3.0	-3.0
0	0	0	0	0	0	0
5	-1.0	1.0	2.0	1.0	0	0
46	-1.0	-1.0	4.0	-1.0	-1.0	-1.0
11	-1.0	1.0	1.0	-1.0	-1.0	0
Mean	-0.6	0.2	1.8	-0.8	-1.0	-0.8

Increase over initial TA, mEq/l

Table 10 Urinary NH₄⁺ changes after adding protein

Initial NH ₄ ⁺ mEq/l	Albumine added, g/l			Globuline, added, g/l		
	1	5	10	1	5	10
78	-1.0	-1.0	7.0	-1.0	-4.0	0
31	-2.0	1.0	2.0	0	-1.0	0
29	0	0	1.0	1.0	0	0
68	-1.0	-1.0	5.0	2.0	2.0	2.0
24	4.0	7.0	7.0	5.0	6.0	7.0
Mean	0	1.2	4.5	1.4	0.6	1.8

Increase over initial NH₄⁺ mEq/l

あつた1検体は7mEq/l (29%) の上昇が認められた。
全体として、滴定酸、NH₄⁺の変化はそれ程大きくないが、測定値が低値の場合は、変化の値が小さくとも増加率としては大きくなるので注意を要すると思われた。

4. 細菌尿の影響

5検体の無菌的に採取した中間尿の pH, 滴定酸、NH₄⁺を測定した。なおこの5検体の尿は尿培養では陰性であつた。次にこの尿に、当科保存の尿路感染症症例より分離した下記の細菌を継代培養後1白金耳接種し、37℃で5時間、10時間、24時間 incubation した。このそれぞれの尿の細菌数、滴定酸、NH₄⁺を測定し、最初の無処置の尿と比較した。

細菌は urease 陰性のものとしては E. coli, 弱陽性のものとして Ps. aeruginosa, 陽性のものとして P. mirabilis を用いた。

1) pH の変化 (Table 11)

[E. coli] 5 時間後、10 時間後、24 時間後における pH の上昇はそれぞれ平均 -0.16, -0.10, 0.16 とごく軽度である。

[Ps. aeruginosa] 5 時間後では pH の変化はほとんどないが、10 時間後では平均 0.30 上昇し、24 時間後では 1.10 と著明に上昇している。

[P. mirabilis] 5 時間後で 1.24, 10 時間後で 2.26, 24 時間後で 1.64 と著明に上昇している。

2) 滴定酸の変化 (Table 12)

[E. coli] 5 時間後、10 時間後、24 時間後で滴定酸の変化はごくわずかである。

[Ps. aeruginosa] 5 時間後で変化は見られないが、10 時間後、24 時間後では滴定酸値は著明に減少する。

[P. mirabilis] 滴定酸値は 5 時間後ですでに著明に減少し、0 に近づいている。

3) NH₄⁺の変化 (Table 13)

[E. coli] NH₄⁺の上昇は 5 時間後で 0.2mEq/l, 10 時間後で 0.6mEq/l, 24 時間後で 5.4mEq/l でそれ程大きな変化は認められなかつた。しかし最初の NH₄⁺測定値が 20mEq/l と小さな 1 検体では 10mEq/l (50%) の上昇が認められた。すなわち最初の測定値が小さな検体では変化の比率が大きくなり、この点に注意が必要であると思われる。

Table 11 Urinary pH changes after adding bacteria

Initial pH	5 hours with			10 hours with			24 hours with		
	E.coli	Ps.aerug.	P.mirab.	E.coli	Ps.aerug.	P.mirab.	E.coli	Ps.aerug.	P.mirab.
5.8	-0.2	0	1.4	-0.2	1.4	2.8	-0.2	2.5	2.2
5.7	-0.1	0	1.1	-0.2	0	2.8	-0.1	0.1	2.3
6.5	0	0.1	0.3	0.3	0.1	1.6	1.4	0.4	0.3
7.2	-0.3	-0.1	1.4	-0.2	-0.2	1.7	-0.2	0.4	1.9
6.6	-0.2	0	2.0	-0.2	0.2	2.4	-0.1	2.1	1.5
Mean	-0.16	0	1.24	-0.10	0.30	2.26	0.16	1.10	1.64

Increase over initial pH

Table 12 Urinary TA changes after adding bacteria

Initial TA	5 hours with			10 hours with			24 hours with		
	E.coli	Ps.aerug.	P.mirab.	E.coli	Ps.aerug.	P.mirab.	E.coli	Ps.aerug.	P.mirab.
26	3.0	0	-22.0	6.0	-23.0	-26.0	4.0	-26.0	-26.0
28	1.0	0	-17.0	2.0	-25.0	-28.0	3.0	0	-28.0
6	0	0	-2.0	-2.0	-2.0	-4.0	-6.0	-3.0	-2.0
2	2.0	0	-2.0	2.0	1.0	-2.0	1.0	-2.0	-2.0
4	0	0	-4.0	2.0	0	-4.0	0	-4.0	-4.0
Mean	1.2	0	-11.4	2.0	-9.8	-12.8	0.4	-7.0	-12.4

Increase over initial TA, mEq/l

Table 13 Urinary NH₄⁺ changes after adding bacteria

Initial NH ₄ ⁺	5hours with			10hours with			24hours with		
	E.coli	Ps.aerug.	P.mirab.	E.coli	Ps.aerug.	P.mirab.	E.coli	Ps.aerug.	P.mirab.
90	4.0	1.0	75.0	7.0	79.0	125.0	11.0	103.0	160.0
54	- 4.0	0	42.0	3.0	5.0	135.0	1.0	5.0	166.0
20	0	0	1.0	0	- 3.0	3.0	10.0	- 2.0	10.0
31	0	0	38.0	- 5.0	5.0	60.0	2.0	0	68.0
30	1.0	- 1.0	39.0	- 2.0	7.0	111.0	3.0	40.0	168.0
Mean	0.2	0	39.0	0.6	18.6	86.8	5.4	29.2	114.4

Increase over initial NH₄⁺, mEq/l

Table 14 Count of bacteria in urine

Subject	5hours with			10hours with			24hours with		
	E.coli	Ps.aerug.	P.mirab.	E.coli	Ps.aerug.	P.mirab.	E.coli	Ps.aerug.	P.mirab.
1	10 ⁷	10 ⁵	10 ⁴	10 ⁷	10 ⁶	10 ⁵	10 ⁸	10 ⁸	10 ⁶
2	10 ⁷	10 ⁵	10 ⁴	10 ⁷	10 ⁶	10 ⁶	10 ⁸	10 ⁸	10 ⁷
3	10 ⁶	10 ⁶	10 ³	10 ⁷	10 ⁵	10 ⁴	10 ⁵	10 ⁸	10 ⁷
4	10 ⁶	10 ⁶	10 ³	10 ⁷	10 ⁵	10 ⁴	10 ⁸	10 ⁹	10 ⁶
5	10 ⁶	10 ⁶	10 ⁶	10 ⁷	10 ⁶	10 ⁶	10 ⁸	10 ⁸	10 ⁶

〔Ps. aeruginosa〕5時間後においてNH₄⁺の変化はほとんど認められないが、10時間後で18.6mEq/l、24時間後で29.2mEq/lと大きく増加している。

〔P. mirabilis〕5時間後ですでに39.0mEq/lと著明に上昇が認められた。

4) 尿中細菌と尿pH、滴定酸、NH₄⁺の変化との相関性 (Table 14)

5時間後、10時間後、24時間後のE. coli, Ps. aeruginosa, P. mirabilisの菌数を調べた。

いずれも時間がたつに従つて菌数は上昇しているが、それぞれの菌数とpH、滴定酸、NH₄⁺測定値の変化との間には直接の相関は認められない。しかし、それぞれの検体の中では、5時間、10時間、24時間、と時間がたつに従い菌数が上昇して行き、pH、滴定酸、NH₄⁺の変化が増加して行く。Ps. aeruginosaの5時間後の菌数は10⁵~10⁶で、10時間後とそれ程差は見られないが、5時間後のpH、滴定酸、NH₄⁺がほとんど変化していないのに対し、10時間後ではそれぞれ著明に変化しているのが特徴的であつた。

考 按

血液のpHは種々の機構により7.4付近のアルカリ性に維持されている。この恒常性を保つのは血液自体

の緩衝系と腎および肺の働きによる。腎では生体で生理的代謝過程で生ずる1日当り40~80mEqの酸の排泄が行なわれる⁴⁾。腎はこれを滴定酸およびNH₄⁺の形で排泄している。

このため尿はpH 4.40まで低下することができる。このfreeの形でH⁺はpH 4.40でも10^{-4.4}mEq/l、すなわち0.06mEq/lであり、H⁺排泄量としては、全体の40~80mEqに比較するごく微量にすぎない⁵⁾。しかし尿のpHはH⁺排泄量に占める割合はごくわずかであるが、NH₄⁺および滴定酸の排泄量に大きく影響をあたえる。すなわちpHが下がることによりNa₂HPO₄/NaH₂PO₄の比が低下し、そのためNaH₂PO₄すなわち滴定酸の排泄量が増加する。また尿pHが低いと尿細管で生成したアンモニアがNH₄⁺になる率が大きくなる。

尿の緩衝系としてはリン酸の他にクレアチニン、クエン酸、尿酸などがあるが、量的にはリン酸系が最も大きい。

このように尿細管でH⁺を受け取りH₂PO₄⁻となり、これが滴定酸を構成している。この尿をアルカリすなわちNaOHで滴定すると、NaH₂PO₄ + NaOH → Na₂

$\text{HPO}_4 + \text{H}_2\text{O}$ となる。この滴定を pH 7.40 まで行ない、糸球体濾液の状態にかえすことにより、この時使用された NaOH 量からリン酸を介して排泄された H^+ の量を知る事ができる。これが滴定酸である⁹⁾。

アンモニアは尿細管細胞の中でグルタミナーゼのような脱アミノ化酵素により、アミノ酸あるいはグルタミンから生成される⁹⁾。アンモニアは荷電を持たないため、細胞膜を介して自由に拡散し尿細管腔内に入る。尿細管腔内に入ったアンモニアは H^+ と結合し、 NH_4^+ となるが、 NH_4^+ は細胞膜を通過できないため、そのまま尿中へ排泄される⁹⁾。

このように腎における酸排泄の状態を検討する場合には尿 pH だけでは不十分であり、尿中の滴定酸、 NH_4^+ 、 HCO_3^- の排泄量を併せて調べる必要がある。

〔測定方法〕

従来の検査方法では NH_4^+ は微量拡散法、イオン交換樹脂法、あるいは直接比色法などによつて測定されている。また HCO_3^- は超微量ガス分析器あるいは Conway 拡散装置により測定されている⁹⁾。しかし、このような方法では、それぞれ個々に測定しなければならず、また操作に熟練が必要であるという欠点がある。

Jørgensen¹⁰⁾、Kildeberg¹¹⁾、Sorensen¹²⁾ は滴定法により滴定酸、 NH_4^+ を測定する方法を報告している。また Gyory and Edwards¹³⁾ は同様に HCO_3^- の測定法を報告している。さらに Chan¹⁴⁾¹⁵⁾ らはこの方法を更に修正して報告している。すなわちこの方法によると、1 ml の検体の尿の pH をまず測定し、次に 0.1 mol/l の HCl を 1 ml 加えて加熱し、尿中の HCO_3^- を HCl と反応させて CO_2 と H_2O の形にして除去する。次にこの検体を再びもとの pH まで NaOH で滴定し、必要な NaOH 量から HCO_3^- 量をもとめる。この検体を更に pH 7.4 に滴定するのに必要な NaOH 量から滴定酸をもとめる。つづいてこの検体に 1 ml の 8% formaldehyde を加えると、

となり、 NH_4^+ から H^+ が遊離し pH が下がるが、これをさらに pH 7.4 まで滴定するのに必要な NaOH から NH_4^+ 量をもとめられる。この方法は同一の sample に対して一連の操作で pH、滴定酸、 HCO_3^- 、 NH_4^+ を測定する事ができ、簡便である。

長坂²⁾ は同じ滴定法であるが、滴定曲線およびその微量曲線から滴定酸、 NH_4^+ 、 HCO_3^- を測定する方法を報告している。この方法によると尿 pH、滴定酸、 NH_4^+ 、 HCO_3^- を一連の操作で測定でき、測定方法は

Chan らの方法と比較しても更に簡便で、短時間で測定でき、またその精度も高い。

我々もそれと同じ方法を用いて測定した訳である。それによる検討 data でも、本論文に報告した様に NH_4Cl 、 NaH_2PO_4 単独、および NH_4Cl と NaH_2PO_4 の混合液を NaOH で滴定し、それぞれの NH_4Cl 、 NaH_2PO_4 量をもとめた所、この測定値は実際に加えられた量とほぼ同じであり、測定法としての精度は高いものであつた。 NH_4Cl と NaH_2PO_4 の混合液を滴定した場合、第 1 と第 2 の pH jump の間に費やされる NaOH 量が NH_4Cl 量となる。この事からこの混合溶液ではまず H_2PO_4^- が滴定され、それが中和されて初めて NH_4^+ の滴定が始まる事がわかる。

実際の尿を滴定した場合、JJ type では NH_4^+ はこのように第 1 と第 2 の pH jump の間で費やされる NaOH 量から測定される。また滴定酸は pH 7.4 まで滴定するのに必要な NaOH 量であり、これは H_2PO_4^- およびクレアチニン、クエン酸、尿酸などの有機酸であるが、pKa が 7.2 と糸球体濾過液の pH に最も近い H_2PO_4^- が大部分を占めている。これが第 1 の pH jump としてあらわれている。しかし尿 pH が下がるにつれて $\text{HPO}_4^{2-}/\text{H}_2\text{PO}_4^-$ が小さくなつて、リン酸緩衝系の大部分が H_2PO_4^- で置きかわり、pH が 6 以下となると第 1 の pH jump のさらに前にもう 1 つの pH jump があらわれてくる (JJJ type)。この pH jump の pKa は 5.1~6.2 とばらつきが大きく、それぞれクレアチニン (pKa 4.97)¹³⁾、クエン酸 (pKa 5.89)、尿酸 (pKa 5.4) などの有機酸をあらわしているものと考えられる。すなわち尿 pH が 6 以下になるとリン酸だけでなく、その他の有機酸も、 H^+ を受け取り滴定酸を構成する事ができる条件になるわけである。しかしこの場合でも有機酸はリン酸に比較すると割合は小さい¹⁴⁾。これと反対に尿 pH が高く、7.0 以上になると、 H_2PO_4^- の割合も小さくなり、ついには第 1 の pH jump が無く、第 2 の pH jump に相当する部分に pH jump が 1 つだけある type となつてしまう (J type)。

〔尿の保存状況〕

尿の保存状況による尿中酸量は Chan¹⁵⁾ が滴定法を用いて検討している。すなわち 24 時間では、室温放置でも尿中酸量は変化しないが、5 日後においては -20℃ の検体は変化しないが、室温放置の検体では 4 検体中 2 検体で上昇する。また 30 日後では 4℃ の冷所保存の検体でも 3 検体が上昇するが、-20℃ では変化していないとしている。

我々の検討でも -20°C の冷所保存では30日後でも全く測定値に変化は無かったが、室温放置では48時間で5検体中3検体にpH上昇、滴定酸下降が見られた。また NH_4^+ は2検体で著明な変動が見られた。7日後では全検体でpH上昇、滴定酸下降、 NH_4^+ の著明な上昇が認められた。48時間後の室温放置の検体を培養してみたところ、すべてに菌が検出された。すなわち3検体で、*S. epidermidis*、残りはそれぞれ*S. fecalis*、*S. aureus*であつた。この事から長時間尿を室温に放置すると、尿道常在菌が増殖し、ureaseによりアンモニアが生じpHが上昇したものと思われる。

〔血尿の影響〕

泌尿器科疾患においては血尿となつている症例で腎機能検査が必要な事が多いが、この血尿が尿中酸排泄量にどのような影響を与えるかを検討した。尿に血液を混入して人工的な血尿をつくり、pH、滴定酸、 NH_4^+ の変動を測定した。pHは軽度の上昇が認められたが、滴定酸、 NH_4^+ はほとんど変動せず、50ml/l urineの強い肉眼的血尿でも、酸排泄量の測定は可能であると考えられる。

〔蛋白尿の影響〕

同じく泌尿器科および内科領域で問題となる蛋白尿の酸排泄量に与える影響についてはLitkowski¹⁷⁾らが、やはり滴定法を用いて報告している。これによると、albumin, globulin共に NH_4^+ 量を増加させるが、特にalbuminにおいて強く、最初の NH_4^+ 測定値の50%も増加する検体があるとしている。

我々の検討でも、最初の NH_4^+ 測定値が24mEq/lと低値であつた検体では、albumin, globulin 負荷共に29%もの上昇が認められている。これは蛋白尿がある場合、 NH_4^+ 量が過大に評価される危険がある事を示唆している。しかし NH_4^+ 測定値が29mEq/l以上の4検体ではalbumin, globulin 負荷による NH_4^+ 上昇は10%以内の変動に止つていた。一方、pHに関しては変動はごくわずかであつた。また滴定酸に関しては、一部には5 mEq/lから7 mEq/lへと40%上昇している検体もあつた。しかしそれもわずかに2 mEq/lの上昇にすぎず問題にならないと考えられる。残りの4検体もalbumin, globulin 負荷でも10%以内の変動であつた。

このように、尿中に蛋白が存在する場合、特に尿中酸の測定値が小さい時には尿中蛋白による測定値の上昇率が高くなる事がわかつた。ことに内科的腎疾患においては、尿中albumin上昇例¹⁸⁾が多く、尿中酸の定

量においてはglobulinよりalbuminの影響が大きい傾向があることでもあり注意が必要と言えよう。しかしそのような症例を除けば、蛋白尿における尿中酸排泄量の測定は一般的に可能であると考えられる。

〔感染尿の問題点〕

尿路感染症の症例、特に腎結石あるいは海綿腎等で尿中にProteus sp.の検出される症例においては、24時間蓄尿後の尿がpH 8以上とアルカリ尿の最大値を超えたり、 NH_4^+ 量も異常に高い値となる事がしばしば経験されている。またProteus属を筆頭とする尿素分解菌は尿pHを上昇させリン酸塩とくにリン酸マグネシウムアンモン(struvite)の析出を容易にし、尿路結石の原因として重要視されている¹⁸⁾。

このように尿素分解菌は、尿路結石の原因として非常に重大な問題であるが、尿の酸排泄量を測定しようとする際にも非常に大きな障害となる。すなわち、24時間蓄尿の検体はもちろんの事、採尿直後の尿であっても、尿流停滞がある場合にはこのureaseの作用により尿pH、 NH_4^+ 量に大きな誤差が生ずる事になる。たとえば腎の酸排泄機能を知るために塩化アンモニウム負荷を行つた場合、尿pHは充分に下降できず腎機能としては過少に評価され、また逆に NH_4^+ は上昇するための腎機能として過大に評価される危険がある。

この尿素分解菌の尿pH、滴定酸、 NH_4^+ に与える影響を自動記録滴定装置を用いて時間毎に検討した。強いurease産生菌である*P. mirabilis*、弱産生菌である*Ps. aeruginosa*、ureaseを持たない*E. coli*²⁰⁾²¹⁾の3株を選んで実験を行つたところ、やはり*E. coli*ではpH、滴定酸、 NH_4^+ ともにほとんど変化しなかつた。一方、*Ps. aeruginosa*では5時間ではほとんど変化はなかつたが、10時間、24時間では著明に増加していた。ところが、*P. mirabilis*では5時間からすでにいずれもが著明に変動していた。特に、 NH_4^+ は、時間と共に増加が著明である。

このように、Proteus sp.だけでなく、弱いurease活性しか持たない*Ps. aeruginosa*あるいは*Klebsiella*において尿pH、滴定酸、 NH_4^+ が大きく変化しうる事は、特に24時間蓄尿の検体を測定する場合には注意が必要と思われる。

結 語

1) 自動滴定装置によるpH、滴定酸、 NH_4^+ 、 HCO_3^-

の測定法は簡便であり、充分な信頼性が得られる。

2) 尿 pH, 滴定酸, NH_4^+ は -20°C 冷凍保存では、全く変化は認められなかった。

3) 尿中へ血液を混入しても 10ml/l urine までは pH が軽く上昇する程度で、滴定酸, NH_4^+ はほとんど変化しなかった。

4) 尿中へ albumin および globulin を混入した場合、尿 pH, 滴定酸はほとんど変化しないが、 NH_4^+ は albumin 10g/l urine において $1 \sim 7 \text{ mEq/l}$ 上昇し注意が必要と思われる。

5) 細菌尿による影響を *E. coli*, *Ps. aeruginosa*, *P. mirabilis* で調べたところ、*E. coli* < *Ps. aeruginosa* < *P. mirabilis* の順に尿 pH 上昇、滴定酸下降、 NH_4^+ 上昇の作用が強い事がわかった。このため細菌尿での尿中酸排泄量の測定は注意を要する。

文 犬

- 1) 高木誠司：定量分析の実験と計算。第2巻(定量分析法)。改訂版, p. 147—182, 共立出版, 東京, 1971.
- 2) 高沢脩一：尿の滴定曲線による分析と臨床的応用：第一報。自動記録滴定装置を用いた尿中酸の定性および定量分析。日腎誌, 16, 963—984, 1974.
- 3) Sober, H.A.: Handbook of biochemistry selected data for molecular biology. The Chemical Rubber Co., Ohio, 1963.
- 4) Hamberger, J. (本田西男訳)：腎の構造と機能。p. 71—77, 医歯薬出版, 東京, 1975.
- 5) 越川昭三：血液 pH の調節。新内科学大系48A, p. 34—64, 中山書店, 東京, 1979.
- 6) 越川昭三：酸—塩基平衡の知識, 第4版, p. 43—57, 中外医学社, 東京, 1972.
- 7) Wrong, O.: Urinary hydrogen ion excretion, J. Clin. Pathol., 18, 520—526, 1965.
- 8) Wrong, O. and Davis, H.E.F.: The excretion of acid in renal disease. Quart. J. Med., 28, 259—313, 1959.
- 9) 金井 泉, 金井正光：臨床検査法提要, 改訂第27版。VII-44—47, VIII 25-30, 金原出版, 東京, 1975.
- 10) Jørgensen, K.: Titrimetric determination of the net excretion of acid/base in urine. Scand. J. Clin. Lab. Invest., 9, 281—291, 1957.
- 11) Kildeberg, P.: Clinical acid-base physiology. Studies in neonates, infants and young children. Williams and Wilkins, Baltimore, 1968.
- 12) Sorensen, S.P.O.: Enzymstudien. I. Über die quantitative Messung proteolytische Spaltungen. Biochem., 7, 45—101, 1908.
- 13) Gyory, A.Z. and Edwards, K.D.G.: Simultaneous titrimetric determination of bicarbonate and titratable acid of urine. Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci., 45, 141—147, 1967.
- 14) Pitts, R.F.: Physiology of the Kidney and Body Fluids. 3rd ed., p. 198—241, Year Book Medical Publishers, Chicago, 1974.
- 15) Chan, J.C.M.: The rapid determination of urinary titratable acid ammonium and evaluation of freezing as a method of preservation. Clin. Biochem., 5, 94—98, 1972.
- 16) Lin, S.L. and Chan, J.C.M.: Urinary bicarbonate: A titrimetric method for determination. Clin. Biochem., 6, 207—211, 1973.
- 17) Litkowski, L.J. and Wilson, T.L.: Effect of protein on titrimetry of bicarbonate, titratable acid, and ammonium in urine. Clin. Chem., 25, 362—365, 1979.
- 18) Broch, O.J. and Brodwall, E.: Urinary proteins in renal diseases. Acta. Med. Scand., 160, 335, 1958.
- 19) 平島攻治, 中島幹夫, 香川 征: Urease 阻害剤による感染性尿路結石の発生および増大抑制実験。西日泌尿, 38, 633—636, 1976.
- 20) Griffith, D.P., Musher, D.M. and Itin, C.: Urease, the primary cause of infection-induced urinary stones. Invest. Urol., 13, 346—350, 1976.
- 21) Griffith, D.P.: Struvite stones. Kidney internat. 13, 372—382, 1978.

(1982年12月7日受付, 特別掲載)