

室内飼い犬・猫の簡便な尿糖検出法の開発

永谷 尚紀・横山 大輔・宮原 敏郎

岡山理科大学工学部バイオ・応用化学科

1. 緒言

今日、空前のペットブームであり一般社団法人ペットフード協会が行った平成21年度犬猫飼育率全国調査¹⁾によると、犬を飼っている家庭が18.3%、猫を飼っている家庭は11.2%である。この飼育世帯率から推計される飼育頭数は、犬で1232万2千匹、猫は1002万1千匹にもなる。犬も猫も2007年から2009年にかけて、飼育頭数は変わりなく、横ばい傾向にある。しかしながら、同時に調査した犬、猫の飼育意向率は、犬で42.8%、猫で25.3%¹⁾と現在の飼育率と比べて倍以上の高い数字が出ており、今後も飼育頭数の大きな減少は、ないと考えられる。これら犬、猫の飼育頭数を合計すると、総務省統計局が平成22年4月1日に発表した日本の15歳未満人口1694万人よりも多い数字である。このように少子化に対して動物を飼う家庭が増えるに従い、「ペット」から共に生活していく伴侶としての「コンパニオンアニマル」という考え方が広まってきている。そのため、飼育している犬、猫の健康に対する関心が高まってきており、前述のペットフード協会が行った平成18年度の調査²⁾では、犬や猫の健康管理関心度について「大変気にしている」と答えた飼い主（二人以上世帯）が犬猫ともに約半数にのぼり、「やや気にしている」と合わせると9割以上を占め、飼育している犬や猫への健康への関心が、非常に高いことが分かる。

犬、猫の病気として、糖尿病・腎不全・肝障害・甲状腺機能亢進症などの生活習慣病やガン・遺伝性疾患など、人間と同じような病気があるが、動物病院で行われているこれらの検査・治療方法は高度になり、病気の早期発見ができるとともに完治の確率が高くなっている。また、家庭で犬や猫の血液や排泄物・体毛を採取し研究機関に分析依頼することで、健康チェックができるようになっている。しかしながら、飼育している犬、猫を頻繁に通院や血液採取を行い健康を管理することは困難である。簡便に犬、猫の健康診断を行う方法としては、人間と同様に便や尿を用いて検査する方法がある。便、尿を調べることにより表1のような健康診断が可能である。尿の検査だけでも多くの疾患の検査が可能である。

そこで本研究では、人間の健康診断でも尿糖試験紙

で使われている酵素グルコースオキシダーゼ/ペルオキシダーゼ法を応用して、犬や猫が使うペットシートや猫砂に尿が付着することで尿検査の項目の一つである尿糖の検出を簡便に行える手法の検討を行った。室内で飼育されている犬、猫は、ペットシート、猫砂の撒かれたトイレと決まった場所に便や尿を排泄する習性がある。ペットシート、猫砂に尿糖試験紙と同様の機能を持たせて犬、猫の健康状態を検査する手法は、非常に有効であると考えられる。

表1 犬、猫における健康診断のための便、尿検査

	検査項目	疑われる主な疾病など
便検査	潜血	消化器からの出血
	寄生虫	回虫、鉤虫、鞭虫など
	糖	糖尿病、ストレスなど
尿検査	蛋白	腎臓疾患、疲労など
	潜血	腎臓・尿路疾患、疲労など
	比重	腎臓機能低下、腎臓疾患など

2. 実験方法

2-1 試料・試薬

二匹の猫（アビシニアン 雌 6歳、雑種 雄 2歳）から採取した尿を実験に用いた。尿中の正確なグルコース濃度測定のために Glucose Assay Kit (BioVision) を用いた。尿中のグルコースを検出するための酵素としてグルコースオキシダーゼ (GOD) (TOYOBO)、ペルオキシダーゼ (POD) (TOYOBO) を用いた。発色試薬としては、TMBZ-PS (同仁化学研究所) を用いた。その他の試薬は、和光純薬より購入した特級をそのまま使用した。

2-2 尿中（猫）のグルコース濃度測定

本研究では、二匹の猫より採取した尿を用いて検討を行った。猫からの尿の採取は、猫のトイレに脱脂綿を配置し、尿の付着した脱脂綿を遠心分離することによって回収した。回収した尿は、4℃で保存し、実験には室温に戻し使用した。回収した尿中のグルコース濃度は、Glucose Assay Kit にて取扱説明書に従い測定した。

2-3 酵素、発色試薬の濃度検討

本研究では、以下の反応機構を利用している。

グルコースオキシダーゼ



ペルオキシダーゼ



グルコースからグルコースオキシダーゼの作用によって過酸化水素が生成され、生成した過酸化水素が、ペルオキシダーゼの作用により発色試薬を酸化し、青色の色素を生成する。ペットシート、猫砂に酵素、発色試薬を含有させることで、尿中にグルコースがあれば、尿が付着した部分が青色に変わる。その結果、尿中のグルコースが検出可能となる。しかしながら、運動、給餌、ストレス等によっても低濃度のグルコースは、尿中に排出される。低濃度の尿中のグルコースは、犬、猫の健康上に問題がないため³⁾、低濃度のグルコースを検出せずに、目視で色の変化が可能となる酵素、発色試薬の検討を行った。直径1.5cmの円形に切り取ったろ紙に酵素、発色試薬を各種割合で混合した溶液を5 μ l滴下し乾燥させ、そのろ紙にグルコースを含んだ尿を5 μ L滴下することで酵素、発色試薬の濃度を決定した。

2-4 尿糖検出用ペットシート、猫砂の試作

尿中グルコース検出用ペットシート、猫砂としては、光硬化性樹脂とし、酵素、発色試薬を固定することによって検討を行った。酵素、発色試薬の固定は、関西ペイント株式会社が行っている微生物・酵素の包括固定化サービス (BEL SERVICE) を利用した。

2-5 尿糖検出用猫砂の性能評価

猫から採取した尿を用いて試作した猫砂の性能評価を行った。評価項目としては、尿中グルコースの検出感度、尿のpHの変化による検出感度、保存安定性を選定した。

3. 結果と考察

3-1 尿中(猫)のグルコース濃度測定

二匹の猫(アビシニアン 雌 6歳、雑種 雄 2歳)から採取した尿中のグルコース濃度を Glucose Assay Kit を用いて測定した結果、アビシニアンが0.08 mg/mL、雑種が0.17 mg/mLであった(表2)。アビシニアンが0.08 mg/mL、雑種が0.17 mg/mLであった(表2)。これらの尿中グルコース濃度は、正常の範囲内^{3,4)}であった。犬、猫の尿中グルコースの検査に

は、人と同じ尿糖試験紙が用いられている。尿糖試験紙では、1 mg/mL のグルコースの検出で少し出ていると判断され、2.5 mg/mL 以上で多めにグルコースが出ている判断される。そこで、本研究では、2匹の猫から得られた尿にグルコース濃度が0から2.5 mg/mL の濃度になるようにグルコースを添加し実験を行った。

表2 本研究で用いた猫の尿中グルコース濃度

	尿糖濃度 (mg/mL)
猫A (アビシニアン、雌、6歳)	0.08
猫B (雑種、雄、2歳)	0.17

3-2 酵素、発色試薬の濃度検討

酵素、発色試薬を各種割合で混合した溶液5 μ lを直径1.5cmの円形に切り取ったろ紙に滴下し乾燥させた後に、0.125~2.5 mg/mL のグルコースを含んだ猫Bの尿を5 μ L滴下し検討を行った。その結果、グルコースオキシダーゼ、ペルオキシダーゼ、TMBZ-PSの濃度が、それぞれ1.5 U/mL、1.0 U/mL、3 mg/mL となるように調製した混合液を乾燥したろ紙では、尿中のグルコースの濃度が、0.25 mg/mL までは発色が目視で確認できず、0.5 mg/mL から薄く青く見え出し、6.0 mg/mL まで青色が濃くなり、8 mg/mL 以上のグルコース濃度では、ほぼ同一の青色となった(図1)。はっきりと目視で青くなっていると判断できるグルコース濃度は、1.0 mg/mL 以上であり尿糖試験紙と同等の結果となった。

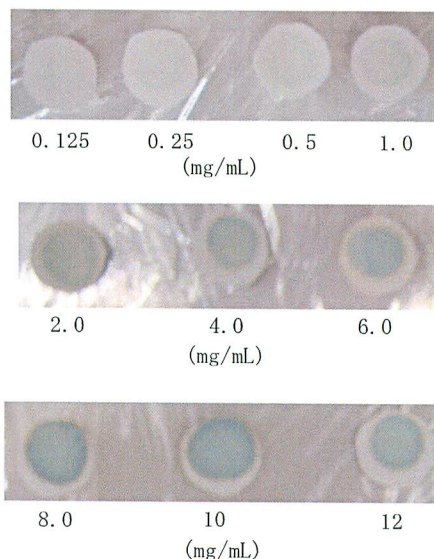


図1 グルコース濃度によるろ紙の色変

グルコースの濃度が、0.25 mg/mL 以下の低濃度では、グルコースによる発色が見られず、0.5 mg/mL 以上の濃度で見られたのは、発色するためのグルコー

スが充分でないことと、滴下したグルコースを含んだ尿が乾燥し、酵素反応が停止するためだと考えられる。

3-3 尿中グルコース検出用ペットシート、猫砂の試作

光硬化性樹脂による酵素、発色試薬の固定は、ろ紙での検討結果を参考にしてグルコースオキシダーゼ、ペルオキシダーゼ、TMBZ-PS の濃度が、それぞれ 1.8 U/mL、12.5 U/mL、3.75 U/mL となるようにして固定を行った。ペットシートの試作は、1 cm × 1 cm のシート状で厚さ 0.2 cm とした。猫砂は、直径 0.3 cm の球状とした (図 2)。

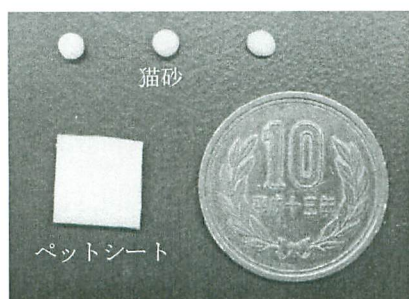


図 2 試作ペットシートと猫砂

試作したペットシートと猫砂は -20℃ で保存し、室温に戻してから以降の実験を行った。

3-4 尿中グルコース検出用猫砂の性能評価

試作した尿中グルコース検出用猫砂の性能評価は、猫 B から得られた尿にグルコースを添加し行った。猫砂に 5 μL の尿を滴下し、色の变化を観察したところ、0.3 mg/mL のグルコース濃度の尿から薄いピンク色に着色し、3.0 mg/mL まで色が濃く紫色になった。5.0 mg/mL 以上のグルコース濃度では、濃い青色となり、グルコース濃度を高くしても色の变化が見られなかった (図 3)。

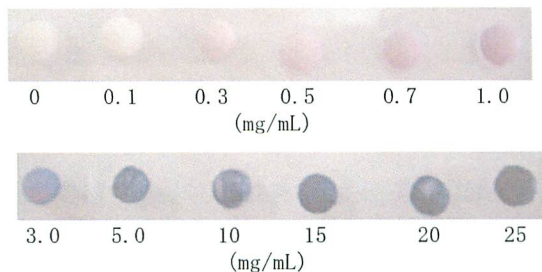


図 3 試作猫砂の尿中グルコースによる変化

これらの結果より、猫の尿糖として多くグルコースが出ていとされる 2.5 mg/mL 以上の尿中グルコースの検出が、色の違いによって可能であることが分かった。

次に尿の pH による試作猫砂のグルコースの検出について評価を行った。犬、猫の尿は、ヒト同様に睡眠後の最初に排泄される尿は pH 7.0 程度の中性であるが、運動後の尿では pH 5 程度の酸性となり、食後には pH 8 程度のアルカリ性に変化する場合がある。採取した猫 B の尿の pH を測定したところ pH 7.0 であり、酸性 pH 5 の尿のモデルとしては、塩酸を加え、アルカリ性 pH 8 のモデルには水酸化ナトリウムを加えて pH を調整した後にグルコースを加え、猫砂に 5 μL を滴下し、尿中のグルコース検出における pH の影響を調べた。その結果、酸性 pH 5 の尿では、1.0 mg/mL のグルコースを含んだ尿から薄く紫色に着色し、1.0 mg/mL まで濃くなっていき、1.5 mg/mL 以上の濃度では、濃い青色となった (図 4)。

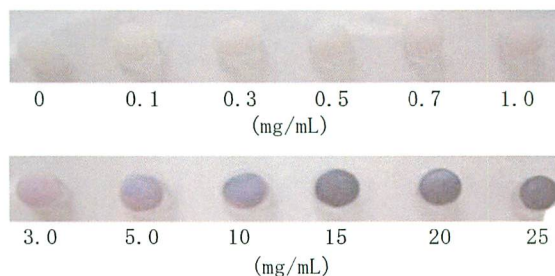


図 4 試作猫砂の尿中グルコースによる変化

アルカリ性 pH 8 の尿の結果も酸性の尿の場合と同様に 1.0 mg/mL のグルコースを含んだ尿から薄く紫色に着色し、5.0 mg/mL までその色は濃くなり、1.0 mg/mL 以上のグルコース濃度では、同一の濃い青色となった (図 5)。

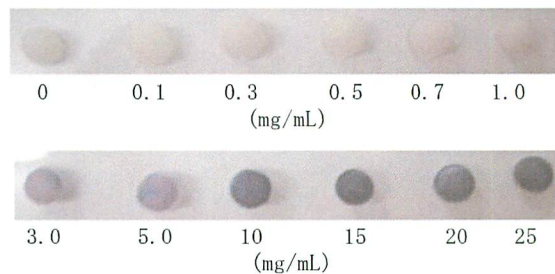


図 5 試作猫砂の尿中グルコースによる変化

グルコースオキシダーゼ、ペルオキシダーゼの至適 pH は、それぞれ pH 5.5⁵⁾、pH 6.5⁶⁾ であり、アルカリ性 pH 8 の尿でのグルコースの検出感度が、最も低くなると考えられたが、酸性 pH 5 の尿では、1.0 mg/mL のグルコース濃度まで紫色に着色し、1.5 mg/mL 以上の濃度が青色となり、酸性 pH 5 の尿の検出感度は低く、最も良い感度は、中性の尿であった。グルコースオキシダーゼの至適 pH が中性付近となる現象は、アクリル酸-アクリルアミド共重合体のカルボキシル基との縮

合反応によりグルコースオキシダーゼをマグネタイト微粒子に固定化した場合に至適 pH が、塩基性側に移動するとして報告されている⁷⁾。カルボキシル基の影響によって固定化酵素近傍が、局所的に酸性となることによると推察されている。同様の現象が、試作した猫砂でも起きている可能性があり、グルコースオキシダーゼの pH が、塩基性側に移動したため、酸性より中性の尿中のグルコースの検出感度が最も良い結果となったと考えられる。

これらの結果より、尿の pH が多少変化しても濃い紫の発色が認められるのは、3.0 mg/mL 以上のグルコースが含まれた尿であり、グルコースを多く含んだ尿を検出することは可能である。

ペットシート、猫砂で尿中のグルコースを検出する場合に最も問題となるのは、酵素の保存安定性である。犬、猫の尿で検出を行う場合には、ヒトと異なり排尿の時間を予測することが困難である。そこで、常温での尿糖検出用猫砂の保存安定性を評価した。試作した猫砂を常温に戻し、1週間室温で放置した後に猫 B の尿にグルコースを添加し、5 μ L を滴下することによって検出感度を調べた。試作した猫砂は、1週間後には、粒径が3mmであったのが2mmと収縮して色も少し黄色くなっていた。これは、光硬化性樹脂中の水分が乾燥した結果だと考えられる。また、冷凍保存した猫砂を室温に戻してすぐに使用した猫砂に比べて1.0 mg/mL のグルコースを含んだ尿でも発色が認められず感度の低下が見られたが、3 mg/mL 以上のグルコースを含んだ尿を滴下することによって青くなることが分かった(図6)。

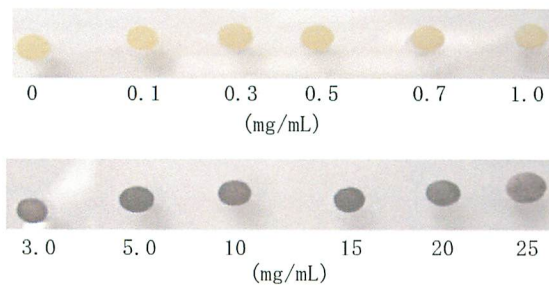


図6 試作猫砂の保存安定性

滴下したグルコースを含んだ尿は、乾燥した猫砂では、すばやく内部まで浸透していく。そのため1.0 mg/mL 以下の低いグルコース濃度では、発色が見られず、3 mg/mL 以上の高い濃度では、発色が見られると考えられる。1週間の室温での放置後でも3 mg/mL 以上の尿中の高いグルコース濃度の検出が可能であることが分かった。

4. おわりに

尿中のグルコースを検出するために試作した光硬化性樹脂で試作した猫砂を用いて、猫の尿を用いて検討を行った結果、尿糖試験紙と同様に尿中のグルコースの検出が可能であった。犬では、尿中のグルコース濃度によって、糖尿病の診断、治療の経過の確認方法が確立している。犬に比べ猫は、血液から尿へグルコースがでる閾値が高く、犬は200 mg/dL、猫は250 mg/dL との報告がある³⁾。そのため猫では、血糖値が高くても尿を用いてグルコースが検出できない場合もあり、猫の尿中グルコースを検出し、猫の状態を判断するのは、避けた方がよいとの報告もある⁵⁾。しかしながら、本研究で試作した尿糖検出用猫砂は、猫が使用しているトイレに配置すれば、飼育者の手を煩わせずに尿中グルコースの検出が可能であり、家庭内での健康管理法として有用である。病院での定期的な健康診断と併用する事で大きな効果が期待できる。

謝辞

本研究で使用したペットシート、猫砂の試作にあたり、多くの助言を頂いた関西ペイント株式会社R&D本部 高寺貴秀様に感謝致します。

参考文献

- 1) <http://www.petfood.or.jp/data/chart2009/01.html>
- 2) <http://www.petfood.or.jp/topics/0701.shtml>
- 3) Rucinsky R., Cook A., Haley S., Nelson R., Zoran D.L., and Poundstone M., J. Am. Anim. Hosp. Assoc., 46, 215-224 (2010)
- 4) Nelson, R.W., Proceedings of the 23rd Waltham-OSU symposium, 64-69 (1999)
- 5) Bright, H.J., and Appleby, M., J. Biol. Chem., 244, 3625-3634 (1969)
- 6) Schomberg, D., Salzmann, M., and Stephan, D., Enzyme Handbook 7, EC 1.11.1.7:1-6 (1993)
- 7) 下村雅人、富樫諒、大島賢治、山内健、宮内真之介、高分子論文集, Vol.61, No.2, pp.133-138 (2004)

Development of a Simple Urine Glucose Detection Method for Domestic Dogs and Cats

Naoki NAGATANI, Daisuke YOKOYAMA and Toshiro MIYAHARA

Department of Applied Chemistry and Biotechnology, Faculty of Engineering,
Okayama University of Science,
1-1 Ridai-cho, Kita-ku, Okayama 700-0005, Japan

We developed a simple urine glucose detection method for domestic dogs and cats. It was applied urine glucose test strip for humans using glucose oxidase peroxidase method. Pet sheet and cat litter were made of light hardening polymer mixed with enzymes and chromogenic substrate. The sensitivity, pH dependence and stability of the cat litter was evaluated using urine glucose detection for cats. As the results, the cat litter discolored from white to blue by dropping urine including glucose. The sensitivity was enough to detect to high urine glucose concentration in spite of acid (pH 5) or alkaline (pH 8) urine. After one week incubation at room temperature, 3 mg/mL glucose in cat urine could be detected by discoloring from white to blue at the cat litter. We are planning to integrate the our method for convenient and quick detection method for urine glucose, for health care by breeders, and for diabetes mellitus and follow-ups.

Keywords: urine glucose; dogs; cats; diabetes mellitus; health care.