

# 生体（血液）

大川 龍之介

この度、2020年の入門講座として「分析試料の正しい取り扱いかた」を企画いたしました。

近年、分析機器の高感度化と高機能化、高選択的な分析試薬の開発により、超微量元素の一斉定量や生体関連物質のスクリーニングなど、測定対象物質の種別だけでなくその濃度領域においても幅広い分析が可能となっています。しかしながら、実際にその結果を得るために必要とされる試料の取り扱いについて詳しく学ぶ機会は多くないといえましょう。

そこで本講座では、実試料分析における分析試料の取り扱いについて学ぶことを目的として、血液や飲食物や医薬品から金属や高分子などの工業材料、海水や岩石まで、多岐にわたる分野での実分析に携わっておられる先生方に執筆をお願いいたしました。実試料分析業務に初めて携わる方や改めて試料処理を勉強したい方に向けた具体的な内容となっております。

〔「ぶんせき」編集委員会〕

## 1 はじめに

血液試料は、疾患に対する予防、診断、治療のほか、研究目的などに広く利用されている。そこから多くの有用な情報を得ることができるが、生きた細胞、活性を有する酵素などを含む様々な物質を含む血液試料は、適切な取り扱い方法の下に処理しなければ *in vivo* を反映した真の値を得ることはできない。不適切な処理によって得られたデータは臨床的な判断の誤りや間違った研究成果の報告に繋がる可能性がある。そこで本稿では、主にヒト血液試料の取り扱い方や注意点を用途に応じて解説する。取り扱い方は対象とする試料（血球や血清）や分析方法によって異なるため、理解を深めるために分離方法や分析方法の説明も同様に簡潔に記述するが、本書ではそれらの方法の説明よりも取り扱い方やその影響に焦点を置いて解説する。

## 2 血液の種類と採取方法

血液試料は主に、静脈血、動脈血、毛細管血に大別さ  
Proper Methods for Treatment and Handling of Real Samples—Blood.

れる。臨床検査で行われる血液検査の主要なものは静脈血を用いるが、静脈採血が困難な新生児、乳幼児や、まれに成人において耳朶、指頭、足踵から毛細管血を採取する場合がある。また、糖尿病患者が日に複数回、自ら血糖値を測定して管理するいわゆる Self-monitoring blood glucose の際にも、自分で簡易に採取できる指頭からの毛細管血採取により血糖値を測定する。動脈血は主に生死に直結する血液ガス（酸素分圧、二酸化炭素分圧など）や酸塩基平衡（pH、重炭酸濃度など）を測定するために採取する。ちなみに、人体からの採血は「医師法」（昭和23年法律第201号）に規定する医業に該当し、有資格者でないと行えない。また、研究を目的とする場合、被験者のインフォームドコンセントや倫理委員会への承認など事前に適切な手続きが必要となる。

ヒトからの採血方法の詳細は専門書（標準採血法ガイドライン（GP4-A3））が出版されているのでこちらを参考にさせていただきたい<sup>1)</sup>。ここでは、分析結果に影響を与える部分を中心に述べる。

### 2.1 静脈血採取の注意点

静脈血はヒトにおいては通常、肘静脈より、マウスにおいては、外側足根静脈、外側尾静脈、眼窩静脈叢など様々な部位より採取する。採血に用いる針は、採血針（被験者へ穿刺するための針と真空採血管に刺入する針が両方向についている、真空採血用）、注射針（注射筒に接続する片側みの針、注射器採血用）、翼状針（翼付きの針で注射筒やホルダーに接続するためのチューブがついている、真空採血・注射器採血両用）、などがある。臨床現場においては、分注の手間や安全面から採血針あるいは翼状針を用いた真空採血が主流となっているが、それぞれの性質を知っておく必要がある。採血針は針の太さごとに数値（ゲージ、G）が決められており数値が大きいほど針が細い。通常、臨床検査では21G～24G（内径：約0.5～0.3mm）のものが一般的に使用されるが、可能であれば21Gの太い針で穿刺することが望ましい。細い針による採血は、血球細胞の溶血（赤血球が破壊され内容物が血漿中に漏出すること）、血小板の活性化を起こしやすい。また、採血に時間がかかる

ため血液が凝固しやすい。したがって、血小板の分析を目的とする場合には採血時の刺激を避けるためにより太い針（18 G など）を用いる。ちなみに献血に用いる針は 16 G～18 G（内径：約 1.2～0.8 mm）である。

採血前に約 80 % のエタノールで穿刺部位を消毒するが、皮膚のエタノールが十分に自然乾燥してから採血を行う。そうでなければ、穿刺時の痛みが強くなったり、消毒効果が不十分であったりする可能性がある。さらに、エタノールによる血液試料の溶血を引き起こし分析結果に影響を与えることがある。

採血前に静脈を怒張させる目的で手の掌握を繰り返すクレンチングは血球や骨格筋からカリウムや乳酸が血漿中に放出し偽高値となる可能性があるので極力控える<sup>2)</sup>。クレンチングだけでなく、手を強く握るだけでもカリウム濃度が時には数 10 % も上昇することが知られている。また、採血時の姿勢も分析結果に影響を与える。<sup>ぎょうが</sup>仰臥位、座位、立位の順に血液中の水分や低分子の物質は重力により組織側に移動し、タンパクなどの大きな分子やカルシウムなど一部タンパクと結合している金属イオン、タンパクとリポタンパクとして大きな粒子を形成している多くの脂質などは組織側に移動しないため、結果として血液中に濃縮されることになり濃度が実際より高くなる。

採血時、分析用途が多岐にわたると様々な種類の採血管（後述）で連続的に採取する必要がある。この際、上記の真空採血を用いた場合、採血管に含まれる添加物が真空採血管側の採血針を介して他の採血管にコンタミネーションし、その後の分析結果に影響を与える場合があるため注意を要する。採取する順番については、専門書〔標準採血法ガイドライン（GP4-A3）〕で参照用として提案されている<sup>1)</sup>。採血筒で採取して各試験管に分注する場合は、コンタミネーションの心配はないが、採血から抗凝固剤との混和までに時間を有するため、血液が凝固してしまう恐れがある。

## 2・2 動脈血・毛細管血採取の注意点

動脈血は、大腿動脈、上腕動脈もしくは橈骨動脈などから採取する。採取時の気泡の混入は、血液ガス、pH、重炭酸などの分析に影響を与えるため避ける。採取後に気泡が認められた場合、注射筒を上に向け、指ではじいて気泡を先端に移動させた後、プランジャを押し進め気泡を速やかに排出する。

毛細管血は、耳朶、指頭、足踵などから採取する。前述した自己血糖測定においては、患者が自ら採血させるためのペンシル型の穿刺器具がある。針の太さは痛みを最小限にとどめるため 30 G（内径：約 0.1 mm）程度のものを使用し、耳朶、指頭などに穿刺、出血させ、専用の電極付きの装置を直接出血させた血液に当て、測定する。新生児、乳幼児用の採血は、穿刺し過ぎないように

設計された安全な穿刺器具が多く発売されており、これにより耳朶、指頭、足踵などから少量の血液を出血させ、分取する。キャピラリーといわれる内径が 1 mm 以下のガラス管を用いて毛細管現象を利用して血液を採取する方法もあり、小型の実験動物からの採血にも利用される。

上記のように用途に応じて、静脈血、動脈血、毛細管血から採取し分析するが、目的の物質によっては、それぞれの濃度が異なる場合があるので注意が必要である。

## 2・3 その他の注意点

採血量が不足していると様々な影響を引き起こす。現在使用されている多くの採血管は真空採血用であり、試験管には一定量血液を採取する分の陰圧がかかっている。したがって、採取する血液が少ないと、血液細胞に過剰な陰圧がかかることになり、赤血球内容物の逸脱や変形を引き起こす。例えば、血清よりも赤血球内に約 200 倍含まれることが知られている酵素である乳酸デヒドロゲナーゼは、採血管への血液の採取量が極端に少ないと血清中の活性が 10 % 以上偽高値を示すことが知られている。小児あるいは小動物など採血管に見合った血液を採取できない場合は、注射器で採血した後、真空採血管の蓋を一度外して陰圧を無くしてから分注することで上記の問題を解決できる。

さらに採血管種（後述）によっても影響の受け方が異なる。抗凝固剤であるエチレンジアミン四酢酸（EDTA）が高濃度に含まれていると赤血球の変形が引き起こされることが知られている。また、液体であるクエン酸ナトリウム入りの採血管は表 1 にあるように、血液と決められた量を混和することを前提に作製されているため、採取量が少ないと希釈率が高くなり偽低値を引き起こす。前述の翼状針タイプの針を使用する場合、翼状針にチューブが付属しているため、そのチューブ内の体積分、陰圧が抜け、規定量よりも採取量が少なくなる。したがって、採取量に大きな影響を受けないものから採取すべきであり、クエン酸ナトリウム入りの採血管は、翼状針による真空採血の 1 番目の採血管として選択すべきではない。

## 3 採血管の種類

血液を採取するための試験管の種類を表 1 に示す。分析目的に応じて適切な採血管を選択することが肝要である。血液は主に固形成分の血球細胞と液性成分の血漿に大別される。採取した血液全体を全血という。通常、血液を採取するとすぐに凝固反応が始まり、血漿中のフィブリノーゲンから形成された高分子のフィブリンと血小板の作用によって血餅が形成される。血餅は遠心分離によって下層に分離され、その上清を血清といい様々な分析に用いられる。上記の凝固反応を阻害した後、遠

表 1 採血管の種類と目的対象物質

添加物	含有量	目的とする主な試料	分析対象	備考
なし		血清	一般生化学項目	
凝固促進剤		血清	一般生化学項目	
EDTA 二カリウム	1.2~2 mg/mL	全血	血球数算定, 細胞形態観察, 細胞表面マーカー検査, 遺伝子検査など	
EDTA 二ナトリウム	1.2~2 mg/mL	血漿	ホルモンなど	
ヘパリンリチウム	12~30 国際単位	全血および血漿	血液ガス, 一般生化学項目	血液ガス, 血液培養, 染色体, 白血球機能検査, 赤血球浸透圧試験
ヘパリンナトリウム	12~30 国際単位	全血および血漿	血中薬物など	
クエン酸ナトリウム	0.1 mol/L~0.136 mol/L (3.2%) の溶液	全血および血漿	凝固・線溶検査, 血小板凝集能検査, 赤血球沈降速度	凝固・線溶検査 (血液 9 容に 1 容), 赤血球沈降速度 (血液 4 容に 1 容)
フッ化ナトリウム	2~4 mg	血漿(作用は血球細胞へ)	血糖検査, グリコヘモグロビン検査	EDTA, ヘパリンと共に用いることが多い

心分離によって得られる上清みを血漿といい、凝固反応を阻害する薬剤を抗凝固剤という。抗凝固剤には様々な種類があり、分析の用途によって適した抗凝固剤を選択する。

### 3.1 血清用採血管

上記のように血清を得るためには凝固反応を終了させる必要があるが、凝固反応完了にはかなりの時間を要するため、通常、シリカゲルの微粒子<sup>けいそう</sup>、珪藻土、トロンビンなど、凝固促進剤が添加されているものが使用される。

### 3.2 ヘパリン

酸素分圧、二酸化炭素分圧など血液中のガスを分析する場合、通常、ヘパリン-リチウム入りの採血管によって採血し、全血を速やかに分析する。ヘパリンはアンチトロンビン III を促進し、トロンビンを不活化することで凝固反応を阻止する。その他の抗凝固剤と異なり、陽イオンの濃度に影響を与えない（ヘパリン-リチウムであればリチウム以外）。

### 3.3 EDTA 塩類

赤血球、白血球、血小板などの血球細胞の数の算出や細胞の形態の観察などは、EDTA-二カリウム塩 (EDTA-2K) 入りの採血管に採取する (米国は EDTA-3K が主流)。EDTA には様々な電荷の陽イオンと錯体を形成する性質を持っているため、血液と混和すると凝固反応に必要な  $Ca^{2+}$  がキレートされ凝固反応が阻害される。また、一部のペプチドホルモンは赤血球由来のプロテアーゼにより分解されるため、EDTA 二ナトリウム入りの採血管で採血し得られた血漿を分析する場合がある。ただし、EDTA によって採取した血漿では陽イオンのキレートにより一部の酵素が失活するため注意が

必要である。

### 3.4 クエン酸ナトリウム

血液凝固・線溶能の測定にはクエン酸ナトリウム入りの採血管で採取する。クエン酸ナトリウムは液体であり、1 容に対して血液を 9 容正確に分注する。クエン酸ナトリウムも  $Ca^{2+}$  をキレートして抗凝固を行うが、EDTA-2K と比較するとキレート反応が弱いため、血漿を分離した後、塩化カルシウムを添加することによって凝固反応を再開させることが可能である。したがって、凝固時間の測定すなわち凝固能の分析を行うことができる。炎症などを調べる赤血球沈降速度の分析には同じクエン酸ナトリウムを用いるが、この際には 1 容に対し、血液を 4 容分取する。

### 3.5 その他

血液中のグルコース濃度は採血後も血球細胞による解糖作用で減少する。したがって、正確な血糖値を得るために解糖阻止剤としてフッ化ナトリウム (エノラーゼを阻害) 入りの採血管で採血する。その他の解糖阻止剤として D-マンノース (ヘキソキナーゼを阻害) などが知られている。

血小板活性化因子の分析など、採血時の血小板への刺激を極めて抑制する必要がある場合に、CTAD 液 (クエン酸, テオフィリン, アデノシン, ジピリダモールの混合) が使用される。その他の血小板阻害剤として ACD 液 (クエン酸, クエン酸ナトリウム, ブドウ糖) または CPD 液 (ACD 液+リン酸水素ナトリウム) などが知られている。これ以外に、アプロチニン (セリンプロテアーゼ阻害剤) などのプロテアーゼ阻害剤やエステラーゼ阻害剤, ジペプチジルペプチダーゼ IV 阻害剤 (グルカゴン様ペプチド 1 分析用) など、分析用途に応

じた様々な採血管を採用することが必要である。

#### 4 血清（血漿）の分離

血清や血漿を分離するためには遠心分離操作が必要である。ただし、血清を分離する際は、遠心分離操作の前のステップとして十分に凝固反応をさせる必要がある（10～30分）。凝固反応が不十分であると、血清分離後に血清中にフィブリンが析出し、その後の血清サンプリング操作の際、析出したフィブリンが邪魔をして適切な量を分取できないことがあり、測定の精確性に影響を及ぼす。特にワーファリンなどを服用している患者の血清を取り扱う場合、凝固反応が終了するまでに時間を要するため注意が必要である。また、採血管の管壁に凝固促進剤が塗布されている試験管では採血後によく混和する必要がある。血液を採取後に採血管を立てずに横に寝かせるように置くと、細長い血餅が形成され、綺麗に遠心分離ができない。また、採血管を乱暴に混和するあるいは落下させると、気泡を含んだ血餅が形成され、遠心時に浮力が働き、一部の血餅が上層に移動するため適切に血餅を沈殿させることができない。

血清を分離する場合の遠心条件（重力加速度、時間など）は採血管によって異なるため、採血管の添付文書を参考にすべきであるが、概ね<sup>おおむ</sup>1000～1500 G、10分である。この際、凝固反応が終了していないと、血清中にフィブリンが析出し、正確な血清の分取が困難になる。血漿を分離する場合は、上記の遠心時間だと完全に血小板が下層に移動せず、かなりの数の血小板が血漿に残存するため、30分以上の遠心が必要である。また、不安定な物質を対象とする場合、冷却遠心機による分離が必要になる。

#### 5 試料のサンプリング操作の注意点

血液試料を一定量分取する場合、注意が必要である。なぜなら、水溶液と異なり血清や特に血球は粘性が非常に高いため、実際の量よりも分取量が少なくなる。マイクロピペットなどにより分取する場合、数秒かけてゆっくりと試料を引き上げる必要がある。また、吐出後、試料がチップの内壁に付着するとそのぶん試料を失うことになる。マイクロピペットで採取前に試料のサンプリング動作を複数回繰り返すプレウェッティングが粘性の高い試料のサンプリングに有用である。標準物質との対照分析を行う場合、その標準物質が水溶液であると血液試料と粘性が異なるため、誤差を生む。したがって、標準物質は試料と同様の材料（血球試料、血清試料など）であることが望ましい。血液試料をマイクロピペットでサンプリングする場合、チップの内壁に血液が付着するのを抑えた低吸着チップが精確なサンプリングのために有効である。また、全血試料、脂質やタンパク濃度が非常に高い血清（血漿）のサンプリングの際、一定の体積当

りの水分量が少なくなるため濃度の定量に負の誤差を与える（容積置換）。特に、少量の試料を希釈して測定する場合、その後の希釈倍率補正によって誤差が大きくなるため、結果の解釈に注意が必要である。

#### 6 全血試料の分析

##### 6・1 血液ガス分析

主に動脈血中の酸素分圧、二酸化炭素分圧などを分析する。したがって、採血後の気泡の混入は禁忌である。そのため、前述の動脈血の採取で述べたように気泡の混入に注意しながら採血し、採血後は、試料を空気に触れさせないようにするためにシリンジに入った血液試料をそのまま分析装置に注入する。注入前に、空気の混入をもう一度確認し、混入が認められれば、採血時と同様の方法で直ちに空気を排出する。また、血液は採取後、血球細胞が沈殿して濃度勾配ができるため、錐揉みのようにシリンジを回転させ、よく混和してから分析する。

##### 6・2 血球数の算定

血液中の血球細胞数の算定には専用の装置あるいは血球計算板を用いる。血球計算板として、Burker-Turk型やNeubauer Improved型などが知られている。それぞれの計算板の使い方は割愛するが、いずれにしても、採血後なるべく速やかに、そして、よく混和してから算定することが肝要である。

##### 6・3 血球細胞の形態観察

細胞を観察するために、スライドガラスに全血試料を載せる必要がある。以下の手順で行う。

1. カバーガラスに血液を付着させる
2. 血液が付着したカバーガラスを付着面を下にしてスライドガラスに乗せ、付着させた血液をカバーガラスの幅に広げる
3. 血液の濃度に差が出ないように、カバーガラスをスライドガラス上で上下に数回動かす（この際、血液を採り過ぎた場合は、一度カバーガラスの血液を拭うなどして、量を減らす）
4. カバーガラスをスライドガラスに対して角度を約30°に保ちながら、スライドガラスにつけたまま一定の速度（約0.5秒）でスライドガラス上を滑らせる。スライドガラスの3分の2くらいの位置でちょうど引き終わるのが理想的で、それに合わせた試料量（5μL程度が目安だが試料（多血・貧血）により異なる）を初めにカバーガラスに付着させる
5. 塗抹した標本をドライヤー（冷風）などで速やかに乾燥させる
6. 必要に応じて、染色などを行う

\*カバーガラスとスライドガラスの角度が大きいまたは塗抹速度が遅いと塗抹が厚くなり、細胞同士の重なり

が多くなる。逆に角度が小さいまたは塗抹速度が速いと塗抹は薄い試料を引き終えず試料が残る。一部の細胞は、引き終わりに集まるため、算定に偏りが生じる。

#### 6・4 血中薬物の分析

一部の薬物は投与後、赤血球へ移行する（例えば、移行率：タクロリムス、約90%、シクロスポリン、約50%）。そういった薬物の分析は、全血試料に除タンパク処理（後述）を行う必要がある。前述した粘性のある試料のサンプリングに相当するため、同じマトリックスの標準物質を使用し、低吸着チップを用いるなど注意が必要である。

## 7 血清（血漿）の分析

血清（血漿）分析は各種タンパク質、含窒素、電解質、ホルモン、腫瘍マーカーなど非常に多くの生体情報を得ることができる。ただし、目的成分の分析には血清分離後、さらに対象物質を含む分画を分離する必要がある。本項では、血清からの目的に応じた分離方法および分析方法をいくつか紹介する。

#### 7・1 除タンパク操作

血清（血漿）中に高濃度に存在するタンパクが低分子物質の分析に妨げになる、あるいは、血清（血漿）中に含まれる酵素などが目的物質と反応して濃度を減少させたり、目的物質を *in vitro* で産生したりするなど、精確な定量に影響を及ぼす場合がある。そういった問題のために、分析の前処理として除タンパク操作がある。使用する除タンパク剤は、陽イオン性の水酸化ナトリウム液または水酸化バリウム液と硫酸亜鉛液または硫酸銅を混和した溶液、陰イオン性の過塩素酸、トリクロロ酢酸、スルホサリチル酸などが知られている。この他に、アセトン、アセトニトリル、エタノール、メタノールなどの有機溶媒でも除タンパクすることができる。

#### 7・2 脂質の抽出

血清中の脂質は、タンパク質あるいは脂質が相互に水素結合・疎水結合・イオン結合など様々な様式で結合しながら粒子として存在する。血清中の中性脂肪やリン脂質に含まれる脂肪酸種などの詳細な分析の際に、しばしばタンパク質や他の水溶性化合物からの脂質の分離、すなわち脂質抽出を必要とする。脂質の抽出法として、クロロホルム：メタノール：水（試料）を8：4：3で混和する Folch 法<sup>3)</sup>や1：2：0.8で混和する Bligh-Dyer 法<sup>4)</sup>がよく用いられる。どちらも脂質をクロロホルム層に移動させた後、クロロホルムを乾固させて回収するが、100%回収することは難しく、その後の定量に誤差を与える可能性がある。目的物質と物性の近い内部標準物質を使用して回収率を補正することにより、そういった

誤差を軽減することができる。

#### 7・3 超遠心分離

血清に含まれるそれぞれの脂質成分の総量は上記の脂質抽出操作後の解析で可能である。しかし、血清中の脂質は主にリポタンパクという数種類の分画（カイロミクロン（CM）、超低比重リポタンパク（VLDL）、中間比重リポタンパク（IDL）、低比重リポタンパク（LDL）、高比重リポタンパク（HDL））にそれぞれ存在し、さらに各リポタンパク分画に含まれる脂質の量はそれぞれ異なっている。したがって、血清から抽出した脂質成分の分析はそれぞれのリポタンパク分画の総量であり、それぞれの各リポタンパク分画に含まれる脂質成分の量はわからない。また、それぞれのリポタンパクは生体内における役割が異なっており、そこに含まれる脂質の臨床検査医学的意義もまったく異なっている。例えば、LDLに含まれるコレステロール量は粥状動脈硬化の進展と正の相関を示すが、抗粥状動脈硬化作用を有するHDLに含まれるコレステロール量は逆に粥状動脈硬化の進展の負の相関を示す。したがって、それぞれのリポタンパク分画の脂質成分を解析するためには血清からリポタンパク分画を分離する必要がある。リポタンパク分画の分離の標準操作は超遠心であり、それ以外にゲル透過クロマトグラフィー、電気泳動法などが知られている。超遠心法は、塩化ナトリウムや臭化カリウム溶液を用いた血清の比重の変更、100000 Gによる超遠心、上層の回収を段階的に繰り返し、比重の軽いリポタンパク分画から分離していく Havel らの方法がよく知られている<sup>5)</sup>。上層の回収時、チューブスライサーがあると綺麗に分離できるが、ピペットを用いた回収ではコンタミネーションの可能性があるので、その都度、試験管壁を拭うなど工夫が必要である。なお現在は、HDLおよびLDL中のコレステロール濃度は超遠心で分離せずともそれぞれの分画と直接反応してコレステロール濃度を測定する試薬が販売されている。

#### 7・4 分光光度計を用いた比色分析

比色分析法は、血清に試薬を反応させた後、反応液の吸光度を測定するだけで非常に多くの目的物質を特異的かつ定量的に分析することが可能な方法である。ただし、簡便なため、出力される数値のみを真実とすると誤ったデータを得る場合がある。したがって、本項では比色分析の注意点を解説する。便宜上、簡単に測定の方法を説明するが、その詳細は他の文献を参考にしたい。確立された臨床検査試薬を臨床検査専用の装置で測定すれば、その多くを回避できる。ただし、購入した試薬をプレートリーダーを用いて用手法で測定する場合、その知識がないと正しい結果は得られないことがある。

#### 7・4・1 様々な比色分析法

目的の物質を吸光度変化としてとらえるために、対象物質と反応する様々な試薬を用いる。目的物質と結合あるいはキレート反応し発色させる、あるいは対象物質を酵素を用いて連続的に反応させ、比色定量可能な指示物質（NADH やキノン系色素など）を産生させる方法などが利用される。対象物質が酵素の場合、その酵素の基質を添加し、酵素反応を導いた後、生成される物質を定量し酵素活性を測定する場合もある。いずれにしても最終産物の吸光度を測定するため、元の血清に含まれる他の物質の干渉を受ける。血清に含まれる干渉物質の主なものにはヘモグロビン、ビリルビン、乳びである。また、血清中に含まれる対象外の物質が試薬中の物質と反応し、期待する反応を阻害する場合もある。

#### 7・4・2 干渉する色素とその回避法

ヘモグロビン、ビリルビン、乳びがそれぞれ高濃度に含まれる血清試料の吸収スペクトルを図1に示す。ヘモグロビンは410、540、570 nm 付近に、ビリルビンは450 nm 付近に吸収があることが知られているため、溶血検体、高ビリルビン血症検体では図1のような吸収スペクトルを得る。乳びは試料の濁りの原因であり、光を散乱させて透過光を減少させるため、吸光度として測られる。光の波長が短い方が光の散乱が多いため、図1のような右下がりのスペクトルとなる。

試料を試薬と反応させた後、測定する指示物質の極大吸収波長がこれら干渉物質の極大吸収波長に近いと正の影響を受ける。これらの影響を回避するために2ポイント法がある。事前に試料と緩衝液を含む試薬を混和した後に、吸光度を測定し、試料固有の吸光度を測定（検体ブランク）し、その後、反応試薬を添加した後の指示物質の吸光度を測定し、最後に最終吸光度から検体ブランクを差し引くことにより、試料に含まれる干渉物質の影響を除いた対象物質の定量が可能である。

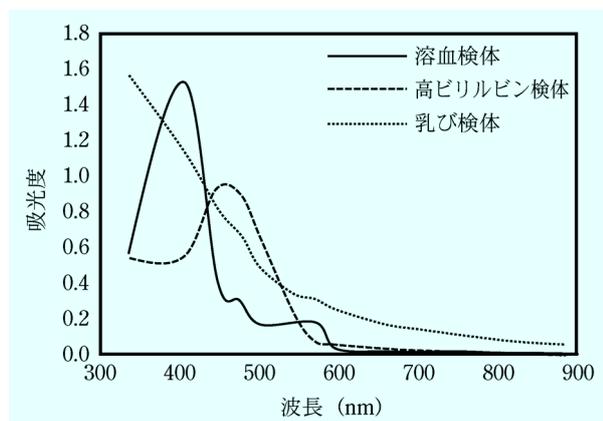


図1 各種干渉物質を含む検体の吸収スペクトル

#### 7・4・3 その他の干渉物質とその回避法

酵素を用いた測定法でよく用いられるのが酸化酵素によって対象物質を酸化し、生じた過酸化水素とペルオキシダーゼの下、4-アミノアンチピリンとトリンダー試薬などの色素をカップリングさせ、産生されるキノン系色素を定量する方法である。サプリメントなどを常時服用している被験者の血中に多量のアスコルビン酸が存在すると、その還元性で生じた過酸化水素を還元するために、負の誤差となる。したがって、市販の試薬の多くにはアスコルビン酸オキシダーゼが防止策として含まれている。試薬に対象物質に反応する抗体を入れ、抗原抗体反応で生じる濁度を吸光度として測定する免疫比濁法の場合、その抗体の動物種に対する抗体を被験者が有していると非特異反応を引き起こし、異常高値となる。この場合、試料を希釈すると非特異反応が大幅に軽減されることがある。さらには、その抗体がヤギ抗体であればヤギ血清と測定したい血清を事前に混和し、非特異抗体を沈殿させて取り除き回避する方法などが知られている。

## 8 試料の保存に関する注意点

病院などにおける診療目的の血液の分析の場合は、その装置は日々厳密かつ適切に精度管理がなされているため、リアルタイムに分析することが可能である。しかし、研究目的の場合、血液を採取後、すぐに分析できないことも多い。また、すぐに分析ができたとしても、アッセイがあまり確立していない特殊な項目で、分析の日差変動を鑑みると、ある程度の数の血液試料を回収して、一度に測定することが望ましい場合がある。あるいは、残余検体を用いて新しい項目を分析する場合においても、血液試料を分析するまで保管しておく必要がある。ただし、血液試料には、生きた血液細胞や酵素などが含まれ、採血後も化学反応が続くため、適切な保管をしなければ、真の値から遠ざかる。試料の測定を把握し、迅速に測定あるいは適切な保管をしなければならない。

表2に試料ごとの保管状態による濃度の変動を示す。ガスを対象とした分析は迅速に分析しないと正しい値は得られない。採血後、装置にセットするまでの距離が長い場合、全血試料は氷冷して運搬することが望ましい。また、血算などの血球細胞を対象とした分析においても、なるべく早く測定するべきである。献血にも使用するMAP液は赤血球の長期保存による溶血を防止するため、ある程度有効である。

血清試料は数時間であれば冷蔵保存で問題ない場合もある。しかし、冷蔵保存でも不安定なもの、あるいは、むしろ冷蔵下で失活する酵素（乳酸デヒドロゲナーゼ4型および5型）などがある。-80℃以下の条件では多くの項目を安定して長期保存できるが、それでも変動す

表2 採血管の種類と目的対象物質

試料	増減	項目	備考
全血	増加	カリウムイオン	特に冷蔵時
		乳酸	解糖
		ピルビン酸	解糖
		アンモニア	アミノ酸の異化など
		二酸化炭素分圧	
	減少	ブドウ糖	解糖
血清	増加	遊離脂肪酸	リポプロテインリパーゼ, ホスホリパーゼの作用
		リゾレシチン	LCATの作用
		コレステロールエステル	LCATの作用
	減少	レシチン	LCATの作用
		遊離コレステロール	LCATの作用
		各種酵素 (特に酸性ホスファターゼ, LD など)	失活による
		ビリルビン	光の存在下
		ビタミン A, B, C, E	光の存在下

LD: 乳酸デヒドロゲナーゼ, LCAT: レシチン-コレステロールアシルトランスフェラーゼ

る物質や、凍結融解の行為により粒子が破壊されるリポタンパクなどもある。また、凍結する場合、なるべく保存容器の蓋や壁に試料がつかないように、ついた場合はスピンドウンしてから保存するなど、丁寧な取り扱いが重要である。また、融解後は、水分が先に融解して上層に移動するため濃度勾配が生じる。また、一部固形成分

が析出することもある。分析前によく混和した後、スピンドウンしてから分析することが望ましい。

## 9 まとめ

多くの情報が得られる血液試料の分析は臨床や基礎研究において非常に有益である。しかしながら、本稿で述べたように、採血から保存に至るすべての段階において、分析結果を真実から遠ざける原因が潜んでいる。やみくもに分析して結果を解釈するのではなく、対象物質の性質、代謝などをよく理解し、注意深く分析すべきである。

## 文 献

- 1) 標準採血法ガイドライン (GP4-A3). 日本臨床検査標準協議会.
- 2) 清宮正徳, 工藤ひろみ, 鈴木芳武, 吉田俊彦, 澤部祐司, 梅村啓史, 野村文夫: 日本臨床検査自動化学会誌, **34**, 839 (2009).
- 3) J. Folch, M. Lees, G. H. Sloane Stanley: *J. Biol. Chem.*, **226**, 497 (1957).
- 4) E. G. Bligh, W. J. Dyer: *Can. J. Biochem. Physiol.*, **37**, 911 (1959).
- 5) R. J. Havel, H. A. Eder, J. H. Bragdon: *J. Clin. Invest.*, **34**, 1345 (1955).



大川龍之介 (Ryunosuke OHKAWA)

東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科先端分析検査学 (〒113-8510 東京都文京区湯島 1-5-45)。東邦大学大学院理学研究科生物分子科学専攻修了。博士(理学)。《現在の研究テーマ》粥状動脈硬化形成メカニズムの解明および新規バイオマーカーの探索。《主な著書》“JAMT 技術教本シリーズ 臨床化学検査 技術教本” (分担執筆) (丸善出版)。《趣味》映画鑑賞。  
E-mail: ohkawa.alc@tmd.ac.jp

## 新刊紹介

### ブラックマン 基礎化学

小島憲道 監訳, 錦織紳一・野口 徹・平岡秀一 訳

本書は、オーストラリアおよびニュージーランドにおける大学教養課程のために Wiley 社から出版された “Chemistry: Core Concepts” (2016) の日本語版である。化学の予備知識を十分持ち合わせていない学生も念頭に、応用化学、健康科学、工学などの各科目に必要な、化学の基礎知識 (core concept) と論理を十分身に付けさせる水準の内容になっていると序文にあるように、約 300 ページの中に化学用語、化学記号、分子構造を含めてすべての化学の基礎事項が網羅され、必

要な定量的取り扱いの習得も可能になっている。各章では、自然界で起こる様々な現象や最先端のトピックスを取り上げ、学習する化学の基本と私たちの身の回りの事象に対する化学の応用、すなわち “化学と社会のつながり” として結びつけているのが特徴的である。丁寧な説明の記述を伴うカラー刷りの豊富な図と写真、各章には解答を含めた例題と練習問題やコラムが設けられ、初学者の容易な理解を助けるであろう。また、訳者によって文中の SI 単位など最新の IUPAC の情報に基づいて加筆修正されているのも大変ありがたい。広範にわたる専門領域を含む現代の応用化学の中に身を置く立場としては、専門外の化学領域の内容を振り返って見直す必要が生じた場合に道標となってくれる一冊の教科書が傍らにあるのは大変都合がよい。そうした意味でも化学初学者のみならずベテランの化学者、技術者にとってもおすすめの一冊と感じられた。

(ISBN 978-4-8079-0966-7・B5 判・305 ページ・2,800 円+税・2019 年刊・東京化学同人)