

〈原著〉

## 試薬性能評価における溶血の影響確認の留意点

小野 美由紀<sup>1)</sup>、木下 美沙<sup>1)</sup>、小原 康博<sup>2)</sup>、堀田 多恵子<sup>1)</sup>、康 東天<sup>1),3)</sup>

### A salient point of interfering substances test by hemolysis hemoglobin

Miyuki Ono<sup>1)</sup>, Misa Kinoshita<sup>1)</sup>, Yasuhiro Kohara<sup>2)</sup>, Taeko Hotta<sup>1)</sup> and Dongchon Kang<sup>1),3)</sup>

**Summary** It's important to evaluate a newly introducing reagent in advance in an own laboratory, but the evaluation method varies among laboratories. In an evaluation of a "LZ test Eiken Matrix Metalloproteinase-3<sup>®</sup>" (MMP-3 activity assay) reagent, we found that hemolysis hemoglobin included in a commercially available "Interfering Check A plus<sup>®</sup>" did not affect the measurement but in-house hemolysis hemoglobin decreased the activity by 18% at 500 mg/dL, which made us investigate a cause for the discrepancy. Among three kinds of in-house hemolysis samples, only a sample prepared by sonication lysis increased the turbidity of the reaction mixture and so decreased the measured activity. The correlation results were not different between patient blood samples with and without hemolysis. Therefore, we conclude that patients' samples with hemolysis do not affect the measurement. We need to be cautious to the possibility that a substance in interfering test reagents do not necessarily behave as that in patient blood.

**Key words:** Interfering substances test, Hemolysis hemoglobin, Patient blood

#### I. はじめに

試薬性能は試薬開発時にメーカーが取得し添付文書に記載されているが、試薬導入時には自施設の分析機を使用し基礎的検討を行うことは

重要である。基礎的検討を行うことによりメーカーが主張する性能を確認するだけでなく、機器の精度および日常の精度管理の指標に有用な情報を得ることができる。性能評価方法についてはCLSIから手引きが公開されており、国内で

<sup>1)</sup>九州大学病院検査部

〒812-8582 福岡市東区馬出3丁目1-1

<sup>2)</sup>栄研化学株式会社 生物化学第一研究所

〒329-0114 栃木県下都賀郡野木町野木143

<sup>3)</sup>九州大学大学院医学研究院臨床検査医学分野

〒812-8582 福岡市東区馬出3丁目1-1

受領日 平成27年2月6日

受理日 平成27年4月23日

<sup>1)</sup>Department of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, Kyushu University Hospital

3-1-1 Maidashi, Higashi-ku, Fukuoka 812-8582, Japan

<sup>2)</sup>Biochemical Research Laboratory- I, Eiken Chemical CO., LTD.

143 Nogi, Nogi-Machi, Shimotsuga-Gun, Tochigi 329-0114, Japan

<sup>3)</sup>Department of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, Kyushu University Graduate School of Medical Sciences

3-1-1 Maidashi, Higashi-ku, Fukuoka 812-8582, Japan

は日本臨床検査自動化学会から「汎用自動分析装置性能マニュアル」が発行されている。

一方、基礎的検討で実施する干渉物質の影響試験は、市販品である干渉チェックAプラスが広く使用されているが、干渉チェックが生体内の干渉物質と同じ挙動を示すかは明らかにされていない。我々は干渉試験を実施する際、溶血の影響に関しては自家製溶血ヘモグロビンを作製し、干渉チェックAプラスと双方で確認をおこなっている。

今回、LZテスト‘栄研’MMP-3試薬の基礎的検討を行った際、干渉チェックAプラスを用いた干渉試験では溶血ヘモグロビンの影響は認められなかったが、自家調整を行った溶血ヘモグロビンを用いた干渉試験で影響を認めた。そのため、溶血液作製方法による検討、溶血の影響を認めた原因追究、さらに患者溶血検体の挙動を確認し、若干の知見を得たので報告する。

## Ⅱ. 方法

### 1. 測定機器・試薬

測定機器は日立H7700形自動分析装置（日立ハイテクノロジーズ）Pモジュールを使用した。

測定試薬はLZテスト‘栄研’MMP-3（栄研化学：以下LZ試薬）およびパナクリアMMP-3「ラテックス」（積水メディカル：以下パナクリア試薬）を用いた。パラメータはメーカー指定を使用した。

### 2. 溶血の影響確認方法

#### 1) 溶血液作製方法の検討

干渉試験の溶血液として、干渉チェックAプラス（シスメックス）および3種類の自家製溶血ヘモグロビンを用い、血球破碎方法の違いがどのような影響を及ぼすかを検証した。自家製溶血ヘモグロビンはEDTA採血後、遠心分離・血漿除去し、血球を生理食塩水で3回洗浄した。その後、①精製水を添加し浸透圧で溶血させた試料（以下、精製水破壊溶血液）、また、②精製水を添加した自家製溶血ヘモグロビンをさらに-30℃凍結保存後融解した試料（以下、凍結融解破壊溶血液）、③25Hzの超音波で血球破壊した試料（以下、超音波破壊溶血液）を作成した。MMP濃度約200 ng/mLの血清にヘモグロビン濃度が0、100、200、300、400、500 mg/dLとなるように試料を添加し、各々5重測定した。LZ試薬およびパナクリア試薬の測定値および第

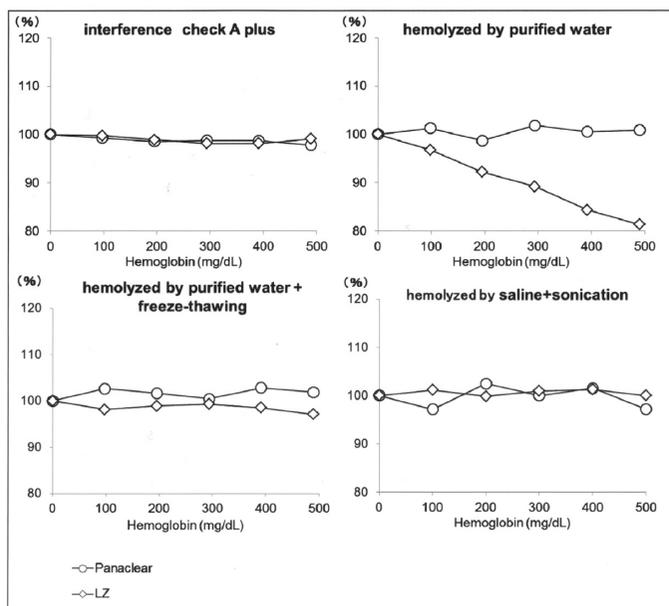


Fig. 1 Effects of interfering substances by hemolysis hemoglobin.

一試薬添加から第二試薬添加までの反応過程を確認した。

2) 界面活性剤の濃度を变化させた試薬を用いての検討

血球破碎方法による溶血の影響の差を、第一試薬に添加されている界面活性剤に着目し検討を行った。LZ試薬のノニオン系界面活性剤の濃度を4段階に調整し第一試薬に添加後攪拌し溶解した試薬、界面活性剤フリーの試薬、異なる界面活性剤を添加した試薬を用い、精製水破壊溶血検体の反応過程を確認した。現行試薬の界面活性剤の濃度は4段階調整試薬の容量2に相当し、容量1、3、4は現行試薬の1/2、1.5倍、3倍の濃度である。

3) 患者検体の相関

患者検体の相関には2013年5月から2013年7月に当院検査部に提出された検体で非溶血検体50例、溶血検体96例を用い、LZ試薬およびパナクリア試薬で測定した。本検討ではインフォームドコンセントを得た患者検体を対象とした。

### Ⅲ. 結果

#### 1. 干渉物質の影響

①干渉物質が含まれない試料の測定値を100%としてそれぞれの干渉物質の影響を比較した結

果をFig. 1に示した。干渉チェックAプラス溶血液、凍結融解破壊溶血液、および、超音波破壊溶血液ではパナクリア試薬・LZ試薬の2試薬とも溶血の影響は認められなかった。精製水破壊溶血液においてパナクリア試薬では溶血の影響は認められなかったが、LZ試薬のみヘモグロビン添加濃度依存的に測定値の低下がみられ、最大添加濃度500 mg/dLで約18.6%の低下が認められた。

②ヘモグロビン濃度が500 mg/dLの試料を検体とし測定した場合の第一試薬添加から第二試薬添加までの5分間16ポイントの反応過程をFig. 2に示す。LZ試薬・パナクリア試薬ともに精製水破壊溶血液では他の溶血液と比較し、第一試薬添加直後の吸光度が約500×10000 Abs高値であった。さらに、精製水破壊溶血液の反応過程では、パナクリア試薬は吸光度の経時的変化はなかったが、LZ試薬は吸光度の経時的な低下を認めた。

#### 2. 界面活性剤の影響

LZ試薬の精製水破壊溶血液における第一試薬添加後の吸光度の経時的な低下の要因を追究する為、第一試薬の界面活性剤の濃度を4段階に調整した試薬・界面活性剤フリーの試薬・異なる界面活性剤を使用した試薬を用い、精製水破

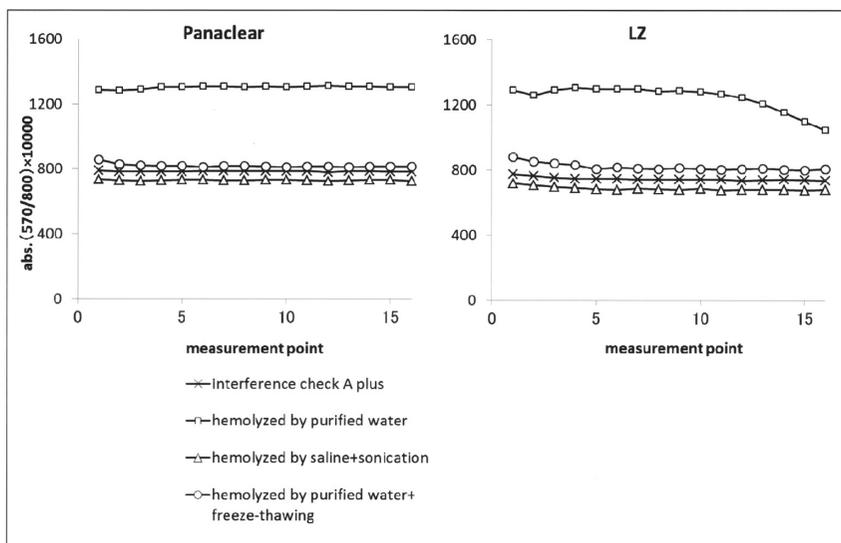


Fig. 2 Change of absorbance after addition of first reagent.

壊溶血液添加後の反応過程の確認を行った。この結果、界面活性剤を除いた試薬と異なる界面活性剤を使用した試薬では経時的な吸光度低下は認めないことが確認された。さらに、界面活性剤の濃度依存的に経時的な吸光度低下が早くなることが確認された (Fig. 3)。第2試薬添加後の反応過程では界面活性剤を添加した試薬と比較して、界面活性剤フリーの試薬・異なる界面活性剤を使用した試薬では測光ポイントの差が大きかった (Fig. 4)。

### 3. 相関試験

実患者検体を用い、LZ試薬およびパナクリア試薬で測定を行った。溶血検体については同時に測定した血清情報をもとにヘモグロビン濃度を推定し評価した。血清情報1はHb濃度50 mg/dLに対応し、血清情報2は100 mg/dL、血清

情報10は500 mg/dLに対応している。患者溶血検体の分布をFig. 5に示す。ヘモグロビン濃度100 mg/dLに対応する溶血2が最も多く43検体であった。また、干渉試験で精製水破壊溶血液を凍結融解すると溶血の影響が解消されたことから、検体保存条件による影響を確認するため、採血直後の測定値と凍結保存後の測定値を比較した。

①溶血検体96例を血清情報により1 (Hb: 50 mg/dL)、2 (Hb: 100 mg/dL)、3 (Hb: 150 mg/dL)、4 (Hb: 200 mg/dL)以上の4段階に分類し、LZ試薬 (y) およびパナクリア試薬 (x) における直線回帰式・相関係数を算出した結果をTable 1に示す。溶血度の差で直線回帰式・相関係数に顕著な差は認めなかった。

②採血直後と凍結保存後のLZ試薬 (y) とパナクリア試薬 (x) の直線回帰式・相関係数を比較したところ、非溶血検体は凍結前:

Table 1 Comparison of regression equation by the degree of hemolysis.

degree of hemolysis	inclination	intercept	correlation coefficient
[1]	0.986	-7.8	0.986
[2]	0.984	-7.8	0.998
[3]	0.930	-5.8	0.983
[4≤]	0.967	-9.4	0.996

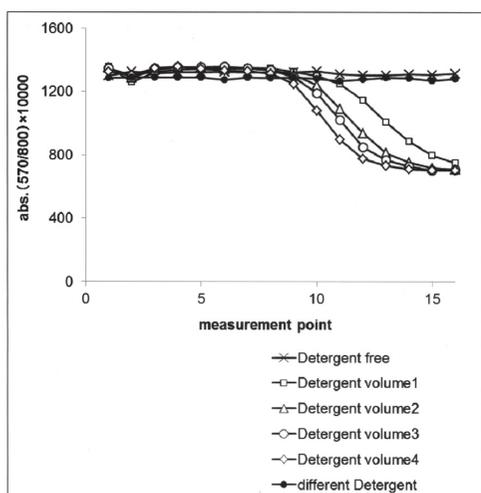


Fig. 3 Change of absorbance after addition of first reagent by detergent free reagent and detergent volume changed reagent and different detergent.

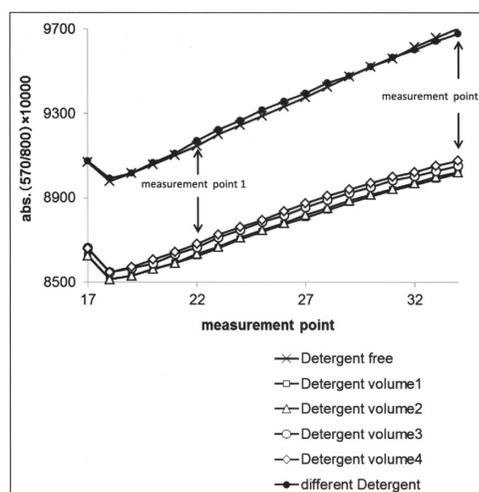


Fig. 4 Change of absorbance after addition of second reagent by detergent free reagent and detergent volume changed reagent and different detergent.

$y=0.963x-6.2$ 、相関係数 $r=0.997$ 、凍結後：  
 $y=0.924x-2.6$ 、相関係数 $r=0.996$ 、溶血検体は凍結前：  
 $y=0.999x-9.4$ 、相関係数 $r=0.995$ 、凍結後：  
 $y=1.009x-7.8$ 、相関係数 $r=0.995$ であり、溶血検体・非溶血検体ともに凍結融解前後で顕著な差は認めなかった (Fig. 6)。

IV. 考察

試薬性能評価時に行う干渉物質の影響試験法については干渉チェックAプラスを用いる方法と実試料を用いる方法があるが、実試料の調整

方法は精製水を加える方法または $-80^{\circ}\text{C}$ に凍結させる方法が示されている<sup>1),2),3)</sup>。

今回の我々がLZ試薬導入時に行った基礎的検討で、干渉チェックAプラス添加時の溶血ヘモグロビンの影響は認められておらず、他施設の検討でも溶血の影響はないと報告されている<sup>4),5)</sup>。しかし、精製水破碎自家製溶血ヘモグロビンを用いた干渉試験で負誤差を認めたため、パナクリア試薬とLZ試薬を用いてその原因追究を行った。

精製水破碎した溶血液を添加するとパナクリア試薬では影響は認められなかったが、LZ試薬

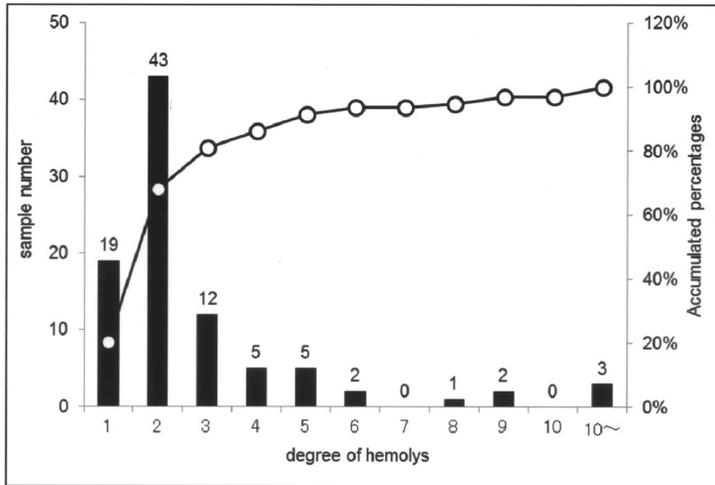


Fig. 5 Distribution on degree of hemolysis for hemolysis sample.

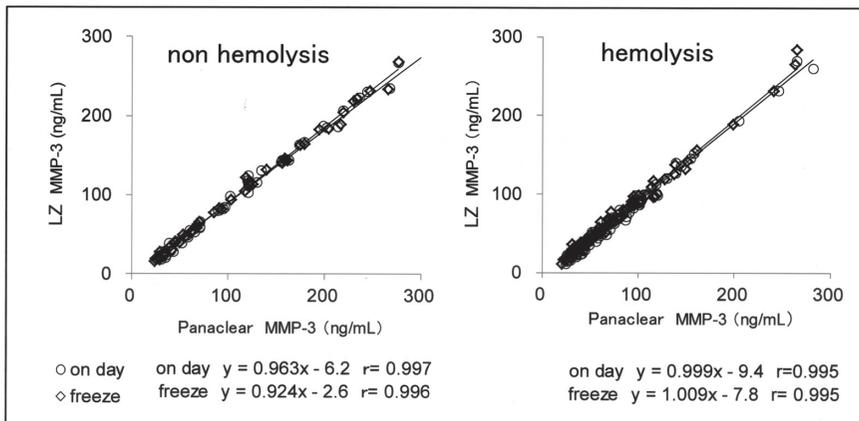


Fig. 6 Correlation between LZ and Panaclear by non hemolysis and hemolysis.

では測定値に負誤差が生じた。その反応過程を観察するとLZ試薬・パナクリア試薬共に第一試薬添加直後の吸光度が高値であり、濁りが生じていることが確認された。さらに、LZ試薬のみ経時的に吸光度の低下を認めた。一方で、凍結融解溶血液および超音波破碎溶血液では溶血の影響による測定値の負誤差を認められておらず、第一試薬添加後の吸光度は干渉チェックAプラスと同程度であった。精製水破碎溶血液を添加した溶血液を3,000 rpm、5分間遠心しても、この影響は回避できなかったが、精製水破碎溶血液を80,000rpm、30分間遠心することで負誤差は解消された。

また、精製水破碎溶血液における第一試薬添加後の吸光度高値の原因を、LZ試薬に添加されている界面活性剤ではないかと考え検討を行った。界面活性剤を除いた試薬と異なる界面活性剤を使用した試薬では第一試薬添加後の経時的な吸光度低下は認めなかったが、界面活性剤の濃度を4段階に調整した試薬では濃度依存的に吸光度低下が速くなった。このことから、溶血の影響における負誤差の要因は精製水破碎血球の添加によって生じた濁りを第一試薬中の界面活性剤が消去し、その消去能が第二試薬添加後も続いていたためであった事が推察された。

精製水破碎溶血液を用いた干渉試験で影響が見られなかったパナクリア試薬と影響が見られたLZ試薬を用いて、実際の患者溶血検体で同様の差が見られるかの確認を行った。患者検体で溶血の影響があれば、溶血度が高くなるに伴い、パナクリア試薬とLZ試薬の相関回帰式で差がみられると考え、溶血度で分類し、比較を行ったが溶血度に伴う差は認められなかった。また、干渉試験で精製水破碎溶血液を凍結融解した溶血液を用いると溶血の影響が解消されたことから、検体を凍結保存し、凍結前後で測定値に差が見られるか確認した。しかし、患者溶血検体において凍結前後で顕著な差を認められなかった。したがって患者検体では溶血の影響はないことが示唆される。

今回の精製水破碎溶血液における負誤差の原因は界面活性剤であった。界面活性剤は検査試薬において、脂質その他由来の濁りの除去、非特異的濁り発生抑制、共存物質の影響改善、試

薬分注精度の向上や発泡防止、反応セルへの吸着防止などのために一般的に添加されており<sup>6)</sup>、界面活性剤の組成・濃度はメーカーにより新試薬開発時に十分検討が行われている。しかし、まれに検体中の成分と反応することがあることが知られている<sup>7)</sup>。我々は、今回メーカーと協力し、界面活性剤の組成や濃度を変えて比較検討することにより、その原因が界面活性剤であったことを明らかにすることができた。しかし、界面活性剤と反応した血球成分を明らかにすることはできなかった。患者検体では溶血の影響は確認されなかったことから、浸透圧のみで溶血させた血球成分は患者検体と異なった状態で存在していることが考えられる。

## V. 結語

干渉試験に用いる試料によっては、副次的な成分によって臨床の溶血検体とは異なる挙動を示すことがあるため注意が必要である。

## 参考文献

- 1) 飯塚儀明, 桑克彦: 回収試験法と干渉物質の影響試験法. 検査と技術, 24(4): 356-360, 1996.
- 2) 中 甫, 松永義朗, 曾根中治, 他: 妨害物質の影響試験法(溶血)について. 臨床化学, 13(補): 209-210, 1984.
- 3) マニュアル作成委員会, 基本性能試験: 物質濃度測定系. 日本臨床検査自動化学会会誌, 27(Supp 1): 7-35, 2002.
- 4) 石田秀和, 竹村正男, 他: マトリックスメタロプロテイナーゼ-3測定試薬「LZテスト'栄研'MMP-3」の基礎的検討と臨床の有用性. 日本臨床検査自動化学会会誌, 39(1): 128-134, 2014.
- 5) 小原康博, 渡辺勝紀, 他: マトリックスメタロプロテイナーゼ-3測定キット「LZテスト'栄研'MMP-3」の性能評価と臨床の有用性. 日本臨床検査自動化学会会誌, 37(3): 315-320, 2012.
- 6) 井本真由美:[事例で学ぶ 免疫検査異常値への対応] 事例編 試薬に起因する異常反応 ポリエチレングリコール(PEG)・界面活性剤(解説/特集). Medical Technology, 41(7): 730-736, 2013.
- 7) 松木伸司: 生化学検査基礎講座 試薬調製における緩衝液・界面活性剤・防腐剤の使い方(解説). 医療と検査機器・試薬, 32(6): 760-765, 2009.