

〈原著〉

生化学自動分析装置を用いた インドシアニングリーン測定法の検討

佐藤 有華¹⁾、清宮 正徳²⁾*、吉田 俊彦¹⁾、澤部 祐司¹⁾、
外園 栄作³⁾、大澤 進²⁾、松下一之¹⁾

Examination of indocyanine green measurement method using an automated biochemical analyzer

Yuka Sato¹⁾, Masanori Seimiya²⁾*, Toshihiko Yoshida¹⁾, Yuji Sawabe¹⁾,
Eisaku Hokazono³⁾, Susumu Osawa²⁾ and Kazuyuki Matsushita¹⁾

Summary In recent years, two ICG methods were developed that do not require blood sampling before intravenous ICG injections and is applicable to an automated biochemical analyzer. In the long wavelength blank method, the ICG concentration was measured at a dominant wavelength of 805 nm and complementary wavelength of 884 nm. In the ICG decolorization method, sodium periodate was used for decolorization.

In two automatic methods, the CVs of the reproducibilities were 1% or lower, and dilution linearity was noted up to 12.9 μ mol/L (1 mg/dL) ICG. Hemoglobin, bilirubin, and chyle had no interference on the results obtained. The correlation coefficient between the standard method and long wavelength blank method or ICG decolorization method were $r = 0.994$, and 0.989 , respectively; however, slight divergence was noted in turbid samples. Two automatic ICG method may be highly practical because blood sampling before ICG loading is unnecessary and measurements are simple.

Key words: ICG, complementary wavelength, decolorization, sodium periodate

¹⁾千葉大学医学部附属病院 検査部

〒260-8677 千葉県千葉市中央区亥鼻1丁目8-1

²⁾国際医療福祉大学大学院 保健医療学専攻 臨床検査学分野

〒286-8686 千葉県千葉市成田市公津の杜4丁目3

³⁾九州大学大学院医学研究院 保健学部門 検査技術科学分野

〒812-8582 福岡市東区馬出3-1-1

※Corresponding Author : 清宮正徳

E-mail : mseimiya@iuhw.ac.jp

¹⁾Division of Laboratory Medicine, Chiba University Hospital, 1-8-1 Inohana, Chuo-ku, Chiba City, Chiba, 260-8677

²⁾Division of Medical Technology, Department of Medical Technology and Sciences, Graduate School of Public Health, International University of Health and Welfare, 4-3 Kozunomori, Narita-City, Chiba 286-8686

³⁾Department of Health Sciences, Faculty of Medical Sciences, Kyushu University, 3-1-1 Maidashi, Higashi-ku, Fukuoka City, 812-8582

受付日 : 2019年2月20日

採択日 : 2019年5月23日

I. 緒言

インドシアニングリーン (indocyanine green, ICG) 排泄試験は、肝機能や肝予備能の把握に有用^{1,2)}であり、肝臓外科において切除可能な領域の判断にも用いられている^{3,4)}。

従来より血中ICG測定に用いられてきた標準操作法⁵⁾では、ICGの静注前の血清を対照としてICG静注後の吸光度を測定し、ICGの血中停滞率を算出する。この方法では、少なくともICGの静注前・後2回の採血が必要である。また、負荷前・後で血清の溶血や混濁(乳び)の状況が変化すると、ICGの血中停滞率値が有意な影響を受ける。それに対し、次亜塩素酸等でICG負荷後血清のICGを脱色して対照とする方法^{6,7)}は、ICG負荷前の採血が不要である。さらに近年、過ヨウ素酸によりICGを消去して対照とする、自動分析装置を用いた過ヨウ素酸消去法⁸⁾が開発された。この方法は、ICG負荷後の血清のみで測定が完了し、検査結果の自動登録が容易に可能なことから検体の取り違いや入力ミスの可能性が低減するなど、有用性が高いと考えられる。しかし、この方法は試薬の保存安定性が5日以内と短く、共存物質の影響も受けやすいという欠点も指摘⁹⁾された。

今回我々は、過ヨウ素酸消去法の欠点に対処すべく、試薬の組成および分析条件を変更した過ヨウ素酸消去法変法(以下消去法)を考案した。さらに我々は、ICGの静注前の採血が不要であり、かつ、酸化剤が不要で乳びなどの濁りの影響を受けないICGの測定方法を目的とし、ICG静注後の血清中のICG濃度を805 nmおよび884 nmの2波長で測光する自動分析法(以下、長波長対照法)を開発した⁹⁾。本稿では、長波長対照法および消去法について、性能評価を行ったので報告する。

II. 材料と方法

1) 試料

当院検査部に提出されたICG停滞率試験を実施した150症例(インフォームドコンセント取得済み)のICG静注前・後の血液から得た血清を用いた(千葉大学倫理委員会承認番号685, 2015年)。検量線作成用の標準溶液は、プール

血清を加えたICG 12.9 $\mu\text{mol/L}$ (1 mg/dL) 溶液(ジアグノグリーン注射用25 mg (第一三共株式会社)を用いて作成、ICG残存率で100%に相当)を用いた。共存物質の影響は、干渉チェックAプラス(シスメックス株式会社)を用いた。

2) 試薬および分析装置

(1) 標準操作法: ICG静注前・後の血清各1 mLに生理食塩水を2 mL加えて混和後、7010型分光光度計(株式会社日立ハイテクノロジーズ)を用いて805 nmで吸光度を測定した。静注前・後の吸光度の差からICG濃度を求めた。

(2) 長波長対照法: 生理食塩水に0.1% Brij 35 (HLB: 16.9; 気泡発生防止のため) および0.1% 安息香酸ナトリウム(腐敗防止のため)となるよう添加した溶液を測定用試薬とした。本試薬をBM2250型生化学自動分析装置(日本電子株式会社; 以下BM2250)に設置した。ICG静注後血清20 μL と試薬40 μL を混合して2分後の吸光度を主波長805 nm, 副波長884 nmで測定した。

(3) 消去法: 埤田らの方法⁸⁾を参考にして、以下の通り試薬を作成し、分析パラメータを設定した。生理食塩水に0.1% Brij 35および0.1% 安息香酸ナトリウムを添加した物を第1試薬とし、さらに3%になるように過ヨウ素酸ナトリウム溶液を添加し第2試薬(ICG消去試薬)とした。本試薬をBM2250型生化学自動分析装置(日本電子株式会社)に設置した。ICG静注後血清20 μL と第1試薬40 μL を混合して2分後の吸光度を805 nmの単波長で測定後、第2試薬20 μL を添加して5分後の吸光度を測定した。ICG消去前・後の吸光度の差からICG濃度を求めた。

III. 結果

1) 再現性

(1) 同時再現性

ICG濃度の平均1.8および3.9 $\mu\text{mol/L}$ (それぞれ停滞率で14および30%に相当)の血清における同時再現性($n = 20$)は、手法がCV = 1.6および1.4%であったのに対し、自動分析法の両法ともにCV = 1%以下であった(Table 1)。

(2) 日差再現性

試薬を分析装置に設置し、試薬の蓋を開けたまま測定を行う、オンボード条件下で検討した。ICG濃度平均1.8および3.9 $\mu\text{mol/L}$ の血清を20本小分けして-80℃に保存し、毎日融解して測定した。n = 20 (30日間) で検討した結果、両自動化法ともCV = 0.6%以下であった (Table 2)。

2) 直線性：両自動化法とも12.9 $\mu\text{mol/L}$ (1 mg/dL; 停滞率で100%に相当) までの原点を通る直線性が確認された。

3) 共存物質の検討

ICG濃度3.9 $\mu\text{mol/L}$ の血清9容に干渉チェックAプラスを1容添加して検討した。添加した共存物質の最終濃度は、ヘモグロビン4000 mg/L, 抱合型ビリルビン160 mg/L, 遊離型ビリルビン170 mg/L, 乳び 560ホルマジン濁度である。その結果、標準操作法がヘモグロビンと乳びによる影響を受けたのに対し、両自動分析法への影響は6%以下であった (Table 3)。

4) 相関性

標準操作法 (x) と長波長対照法 (y) の相関性は、 $r = 0.994$, 線形関係式 $y = 1.04x + 0.1$ 、標準操作法 (x) と消去法 (y) の相関性は、 $r = 0.989$, 線形関係式 $y = 1.05x + 0.1$ であった。低濃度領域で若干の乖離例 (Fig. 1: 矢印で示した) を認めたが、これらの検体はすべて混濁していた。一方、消去法 (x) と長波長対照法 (y) の相関性は、 $r = 0.997$, 線形関係式 $y = 0.99x + 0.0$ であった (Fig. 1)。

IV 考察

ICG測定における両自動分析法の分析精度を検討した。その結果、両自動分析法は、いずれもCV1%以下と良好な再現性を示し、12.9 $\mu\text{mol/L}$ (残存率100%相当) までの原点を通る直線性を有し、また共存物質の影響がいずれも妨害率6%以下となるなど、良好な定量特性を示した。

Table 1 Within-run reproducibility (n=20, CV%)

ICG concentration	Sample A	Sample B
	1.8 $\mu\text{mol/L}$ (ICG 14%)	3.9 $\mu\text{mol/L}$ (ICG 30%)
Standard procedure	1.6	1.4
Long wavelength blank method	0.5	0.4
ICG decolorization method	0.8	0.5

Table 2 Between-run reproducibility (n=20, CV%)

ICG concentration	Sample A	Sample B
	1.8 $\mu\text{mol/L}$ (ICG 14%)	3.9 $\mu\text{mol/L}$ (ICG 30%)
Long wavelength blank method	0.4	0.4
ICG decolorization method	0.6	0.4

Table 3 Co-existing substances

Final concentrations of the added co-existing substances	The rates of interference (%)			
	Hemoglobin 4000 mg/L	Conjugated Bilirubin, 160 mg/L	Free bilirubin, 170 mg/L	Chyle 560 FTU*
Standard procedure	9.4	1.9	2.3	80.4
Long wavelength blank method	1.8	2.6	2.2	3.4
ICG decolorization method	-5.3	-6.0	-2.3	1.0

※FTU, formazin turbidity units

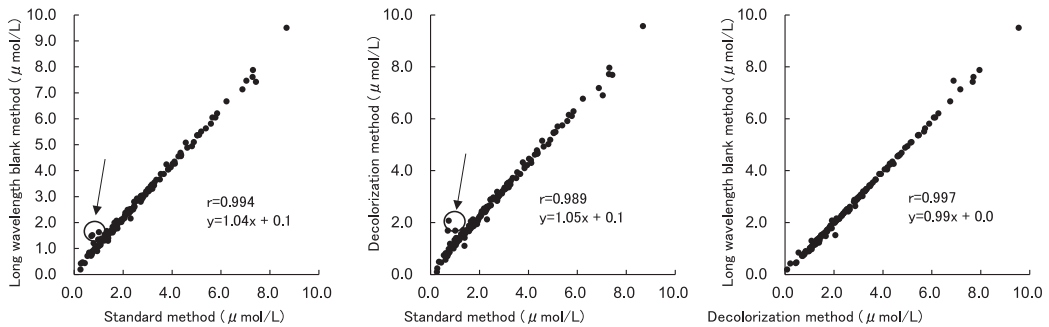


Fig. 1 Correlation between the Standard method and Automatic methods (n=150)
Arrows indicate divergent cases (serum was turbid in all divergent cases).

肝機能検査における肝予備能の評価法としては、Child-Pughスコア¹⁰⁾が最も普及しており、肝硬変の重症度や予後の判定に使用されている。しかし、外科的肝切除の対象となる軽症の肝硬変患者や転移性肝癌患者の多くがChild-PughスコアAに分類され¹¹⁾、Child-Pughスコアでは肝予備能を正確に把握することが困難である。幕内らは、外科的に切除可能な範囲を把握する目的で、腹水の有無、血中ビリルビン濃度、およびICG試験における15分停滞率による評価法(Makuuchi-Criteria)を考案した¹¹⁾。日本では多くの施設で肝切除術前にMakuuchi-Criteriaによる切除可能範囲の判定を実施しており、肝切除術時の死亡率の低下¹²⁾にも貢献していると思われる。このようにICG-15分停滞率の評価は、肝臓の外科的切除術時の肝予備能の評価法として重要である。

ICG-15分停滞率の標準的測定法では、ICGの静注前および静注15分後に採血を行い、805 nmにおける静注後の血清の吸光度から静注前の血清の吸光度を差し引くことで求められてきた。しかし標準操作法では、ICG負荷前後の2回の採血が必要である。また溶血や乳びにより、測定に誤差を生じる。さらに、分光光度計を用いて3倍希釈で測定することから、1 ml以上の血清が必要であった。

我々は当初、日常検査の省力化および検体の少量化を指向し、過ヨウ素酸消去法⁸⁾を検討した。しかし、標準操作法との相関性はほぼ良好であったが、反応セル内の気泡の発生に起因すると考えられる外れ値が出現した(データは示していない)。そこで、溶液中の気泡の発生を

抑える目的で、生理食塩水に界面活性剤としてBrij 35を加えた結果、外れ値が出現しなくなった。また過ヨウ素酸消去法の原法では妨害物質の影響を受け易い⁸⁾ことから、測定波長を805 nmの単波長で測定するようパラメータを変更した。さらに我々はICGが884 nmでは吸収を持たないこと、血清の805 nmと884 nmの吸光度の差が小さいことから、884 nmを副波長とする長波長対照法を確立⁹⁾した。

各方法間の相関性は良好であったが、低濃度領域で若干の乖離例(Figure中の矢印で示した)が認められた。いずれの乖離例も標準操作法よりも両自動分析法が高めに測定されていた。これらの検体の性状を確認した結果、いずれも乳びに由来すると思われる濁りが認められた。ICG静注前の採血を行ってからICGの静注の実施まで時間がかかると、患者血液中の乳びが変化する可能性がある。今回乖離した症例については、ICG静注前の血清の吸光度が乳びの影響により高くなり、ICG注射後の血清では乳びが減少したことにより、標準操作法に負誤差が発生したことが原因と考えられた(両自動分析法における乳びの影響は妨害率5%以下であった)。また同様に標準操作法は溶血の影響を受けるため、ICGの静注前の血液が溶血すると負の、静注後の血液が溶血すると正の誤差が発生する可能性がある。両自動分析法は溶血や乳びの影響が軽微なことから、このような誤差は発生しないと考えられる。

消去法では、埴田らは若干の共存物質の影響を指摘⁸⁾しているが、本検討では影響は軽微であった。埴田らの方法⁸⁾が600 nmと800 nmの2

波長測光であるのに対し、本法では805 nmでの単波長で測光したため、酸化剤による生体色素の色調の変化の影響を受けなかったと考えられた。試薬の保存安定性については、埴田らは5日間⁸⁾としているが、我々の検討では1ヶ月以上安定であった。これは、検討に用いた試料のICG濃度や保存条件、試薬の装置内の状況の違いなどが可能性として考えられた。したがって消去法を使用するにあたっては、試薬の安定性を施設毎に確認するとともに、定期的に試薬を調製する必要がある。

以上より、長波長対照法および消去法は、いずれも良好な性能を持つと考えられた。特に長波長対照法は、消去法に比べて試薬の作成が容易であること、試薬のpHが中性であり試薬が劣化し難いこと、ほかの試薬に影響を与える可能性が小さいことから、より有用性が高いと考えられた。一方、現在国内で流通している生化学自動分析装置には、測定波長の上限が800 nm付近のものも多い。これらの装置では消去法を用いることにより、患者の負担の軽減および日常検査の省力化に貢献できると考えられた。

V. 結語

ICG測定における長波長対照法および消去法の基本性能はいずれも良好であった。これらの方法はICG静注前の採血も不要なことから、患者の負担の軽減、および日常検査の省力化に有用と考えられた。

「COI 報告書に記載したとおり、本論文内容に関連する著者（ら）の利益相反：なし」

文献

- 1) 針原重義, 仲島信也, 岡博子ほか. 肝予備能の評価. 臨と研 1986; 63: 1805-1810.
- 2) 山中若樹, 岡本英三, 加藤年啓ほか. 移植肝機能評価としてのICG検査の意義. 今日の移植 2: 405-410, 1989.
- 3) 前田敦行, 上坂克彦, 松永和哉ほか. 予定残肝ICG消失率(ICG krem)による肝門部胆管癌術前肝予備能評価. 胆道 22: 500-506, 2008.
- 4) Seyama Y, Kokudo N. Assessment of liver function for safe hepatic resection. Hepatol Res 39: 107-116, 2009.
- 5) 日本消化器病学会肝機能研究班報告. インドシアニングリーン (ICG) 試験標準操作法. 日誌誌 66: 573-574, 1969.
- 6) 臼井敏明, 河本裕子. 血中indocyanine green(ICG)の新測定法について, 血中ICGの脱色剤の開発. 臨病理 18: 882-884, 1970.
- 7) 清水隆作, 市村真智子, 野田由美子ほか. 次亜塩素酸ナトリウムの脱色作用を利用する血中indocyanine greenの簡易測定法について. 臨病理 20(12): 879-882, 1972.
- 8) 埴田直美, 外園栄作, 篠原克幸ほか. 過ヨウ素酸ナトリウムを用いた血中ICG検査法の自動分析への試み. 日臨検自動化会誌 41: 270-277, 2016.
- 9) Sato Y, Seimiya M, Yoshida T, et al. Development of a simple indocyanine green measurement method using an automated biochemical analyser. Ann Clin Biochem 55(4) 491-495, 2017.
- 10) Pugh RN, Murray-Lyon IM, Dawson JL, et al. Transection of the oesophagus for bleeding oesophageal varices. Br J Surg 60: 646-649, 1973.
- 11) Imamura H, Sano K, Sugawara Y, et al. Assessment of hepatic reserve for indication of hepatic resection: Decision tree incorporating indocyanine green test. J Hepatobiliary Pancreat Surg 12: 16-22, 2005.
- 12) Imamura H, Seyama Y, Kokudo N, et al. One thousand fifty-six hepatectomies without mortality in 8 years. Arch Surg 138: 1198-1206, 2003.