

血清重炭酸塩測定試薬「ダイヤカラー・CO₂」の 基礎的性能評価および静脈血ガス分析による 算出値との比較

神岡 良助* 高橋 辰典 西岡 幸満
高橋 諭 西山 記子 西山 政孝

要 旨

重炭酸イオン (HCO₃⁻) は電解質分散およびアニオン不足の有意な指標であり、呼吸-代謝系の酸塩基不均衡の医学的診断に有用である。本邦では血液ガス分析装置による Henderson-Hasselbalch 式を用いた算出法が普及しているが、近年、汎用自動分析装置に搭載可能な酵素法を原理とした「ダイヤカラー・CO₂」が開発された。そこで我々は試薬基礎性能評価および測定値安定性、静脈血ガス分析による算出値との比較検討を行った。その結果、試薬基礎性能は全ての評価項目において良好であったが、安定性では採血量および開栓からの時間経過に依存して測定値が偽低値となることを確認した。この原因は検体からの CO₂ の拡散によるものと推測され、できる限り最大量での採血および開栓後速やかな測定が必須であると考えられた。算出値との比較検討では、線形回帰式 $y(\text{本法}) = 0.88x(\text{算出法}) + 2.58$ 、相関係数 = 0.97、Bland-Altman 分析において Bias = -0.30 mmol/L、95% 許容誤差範囲 (Limit of Agreement; LOA) は -2.47 から 1.86 mmol/L とやや低値傾向を認めた。本法は他の生化学項目と同時検査可能かつ血液ガス分析専用採血管分の採血負担軽減などの利点があり、酸塩基平衡評価の日常検査項目として有用であると考えられるが、測定値の変動要因を常に念頭に置く必要がある。

はじめに

重炭酸イオン (HCO₃⁻) は電解質分散およびアニオン不足の有意な指標であり、呼吸-代謝系の酸塩基不均衡の医学的診断に有用である¹⁾。本邦では血液ガス分析装置による Henderson-Hasselbalch 式を用いた算出法が普及しているが、近年、汎用自動分析装置に搭載可能な酵素法を原理とした「ダイヤカラー・CO₂」が発売された。酵素法による測定では血清中の HCO₃⁻ に加えて溶存 CO₂ も測り込むため、厳密には総 CO₂ (tCO₂) 濃度となるが、tCO₂ に占める溶存 CO₂ の割合は 5% 未満であるため²⁾、HCO₃⁻ とほぼ同義とされる。また、酵素法による tCO₂ 測定時の注意点として、採血量や開栓の有無による偽低値が報告されている^{3)~5)}。今回我々は本法の基礎的性能評価に加え、当院採用の生化学分析用真空採血管における測定値安定性の確認と既存の算出法との比較検討を行ったので報告する。

対象および方法

1. 対象

安定性試験では同意を得た当院検査部職員 10 名 (平均年齢 41.3 歳) の血清検体を対象とした。また相関性試験では、当院検査部に血清中 tCO₂ と静脈

*松山赤十字病院 検査部

血ガス分析が同時に依頼・提出された，血清/血漿（ヘパリンLi入り専用採血管）検体105例（平均年齢60.1歳）を対象とした．なお，相関性試験では真空採血管に5 mL以上採血された検体のみ（除外9例；7.9%）とした．管理用試料には標準液（30 mmol/L）と専用コントロール（東洋紡）の2濃度（Cont-L；20 mmol/L，Cont-H；40 mmol/L）を用いた．

2. 方法

本検討は以下の2法を用いて行った．統計処理にはEZ R ver. 1.41⁶⁾を用いて，測定値安定性の検討における各群比較ではBonferroni多重比較検定，相関性解析においては線形回帰式，Pearsonの積率相関，Bland-Altman分析にて行い，有意水準は5%とした．

(i) 本法

機器：JCA-BM6070（日本電子）

試薬と原理：酵素法（Fig. 1）を用いたダイヤカラ CO₂（東洋紡）

採血管：ベノジェクトII 真空採血管；9 mL（テルモ）

(ii) 算出法

機器：ABL-800 FLEX（ラジオメーター）

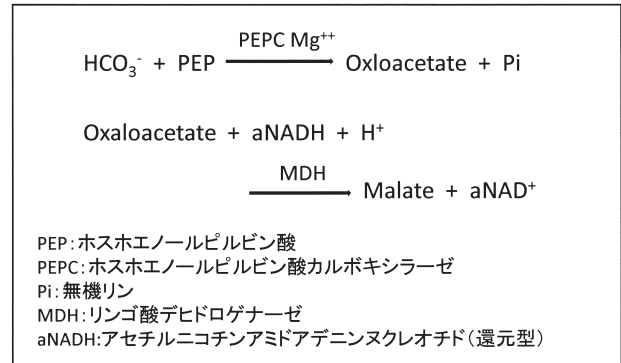


Fig. 1 酵素法原理

$$\text{HCO}_3^- = 0.23 \times p\text{CO}_2 \times 10^{(\text{pH} - \text{pK}_p)}$$

$$\text{pK}_p = 6.125 - \log[1 + 10^{(\text{pH} - 8.7)}]$$

Fig. 2 Henderson-Hasselbalch 式による算出法

試薬と原理：電極法（pH, pCO₂）を用いた，Henderson-Hasselbalch 式による算出（Fig. 2）

採血管：Safe PICO Aspirator；1.5 mL（ラジオメーター）

Table 1 同時再現性 (n=20)

	Mean (mmol/L)	SD	CV (%)	Range (mmol/L)
Cont-L	21.0	0.11	0.5	0.4
Cont-H	39.4	0.38	1.0	1.8
Pool血清	23.1	0.18	0.8	0.6

Table 2 日差再現性 (n=7)

	Mean (mmol/L)	SD	CV (%)	Range (mmol/L)
Cont-L	20.8	0.11	0.6	0.3
Cont-H	39.1	0.20	0.5	0.4
Pool血清	21.2	0.99	4.6	2.3

検討方法と結果

1. 同時再現性

自家製プール血清，管理用試料コントロール2濃度（Cont-L，Cont-H）を各20回測定し，平均値，SD，CV（%），Rangeを算出したところ，CV（%）はそれぞれ0.8，0.5，1.0%であった（Table 1）。

2. 日差再現性

自家製プール血清，管理用試料コントロール2濃度（Cont-L，Cont-H）を7日間連続測定し，平均値，SD，CV（%），Rangeを算出したところ，CV（%）はそれぞれ4.6，0.6，0.5%であった（Table 2）。

3. 希釈直線性

希釈直線性確認用試料（50 mmol/L）を10段階

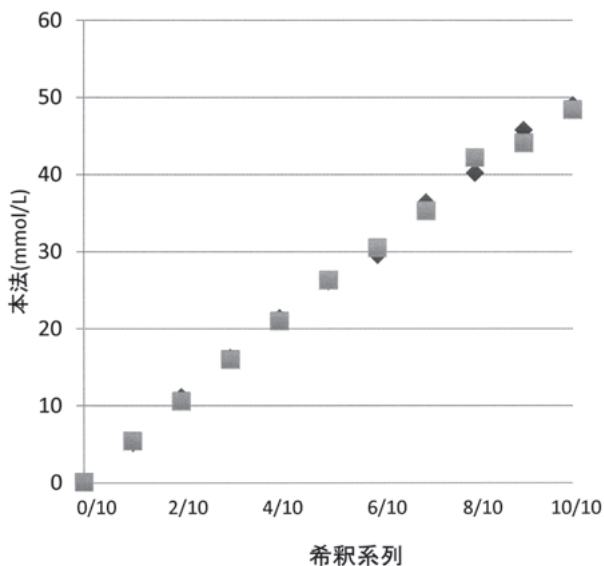


Fig. 3 希釈直線性

希釈し測定を行ったところ，50 mmol/Lまで原点を通る良好な直線性を得られた（Fig. 3）。

4. 検出限界（Limit of Detection；LoD）

希釈直線性確認用試料（50 mmol/L）を生食にて12.5倍希釈（理論値；4 mmol/L）し，さらに10段階希釈を行い，各濃度の10重測定を行ったところ，0濃度キャリブレーター（生食）の+2.6SD上端と重ならない-2.6SD下端をもつ最小濃度は1.6 mmol/Lであった（Fig. 4）。

5. 共存添加試験

干渉チェック・Aプラス（Sysmex）を使用し，抱合型ビリルビン，遊離型ビリルビン，溶血ヘモグロビン，乳び（ホルマジン濁度）を自家製プール血清に加え，測定値に与える影響を検討したところ，それぞれ最終濃度まで共存物質の影響は認められなかった（Fig. 5）。

6. 安定性試験

対象の10名それぞれに対して，ベノジェクトII真空採血管へ1，2.5，5，8 mLの採血を行い，下記の検討を行った。

(1) 室温における開栓後の経時的变化

ベノジェクトII真空採血管へ採血した1，2.5，5，8 mL（それぞれN=10）を開栓し，120分まで値の変動を確認したところ，各採血量の検体全て経時的に測定値が漸減し，その傾きは採血量が少ないほどに顕著であった（Fig. 6）。

(2) 室温における閉栓検体（8 mL）の安定性

ベノジェクトII真空採血管へ採血した8 mL（N=3，計12本）を閉栓したまま180分までの4点

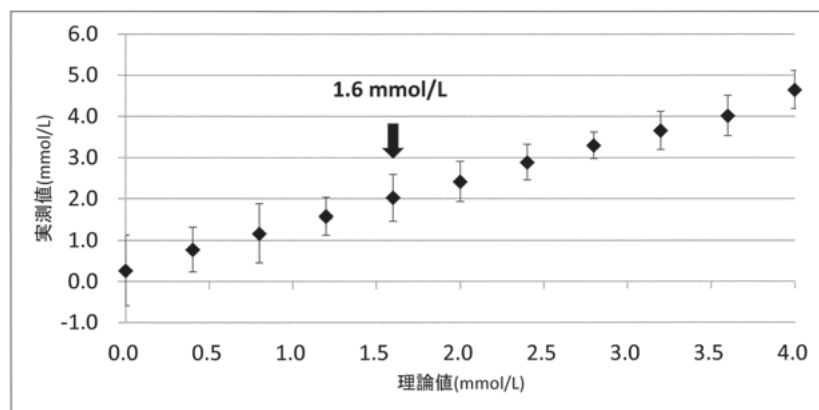


Fig. 4 検出限界（LoD）

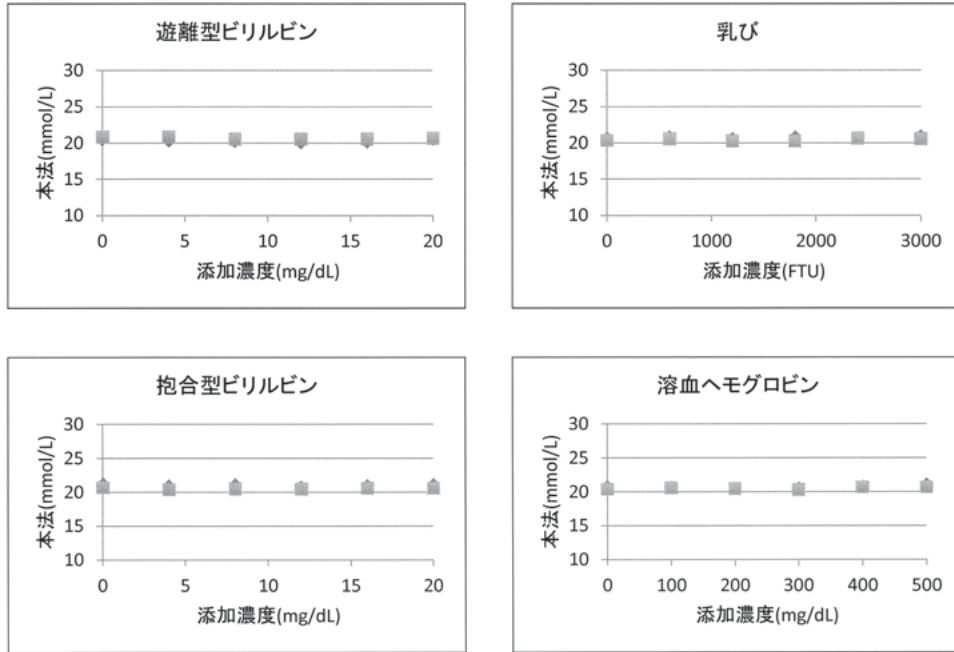


Fig. 5 共存添加試験

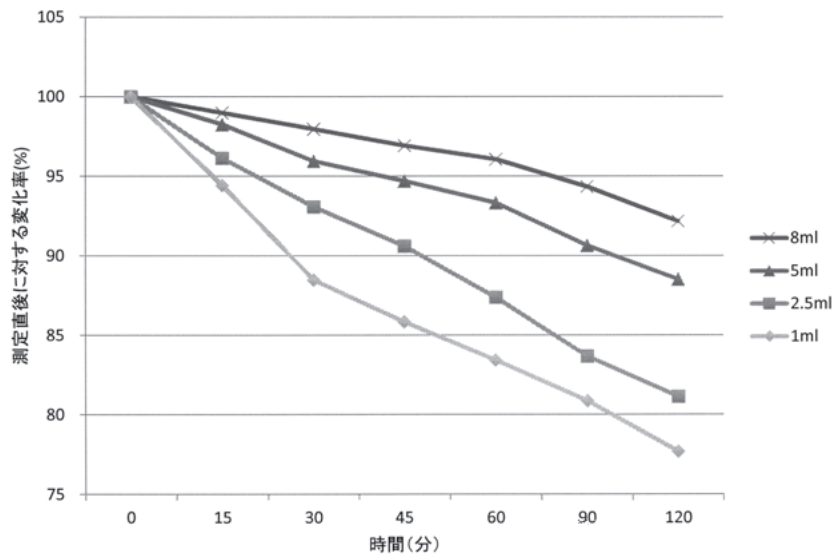


Fig. 6 室温における開栓後の経時的変動

において安定性を確認した. なお, 0分検体を凝固/遠心分離後開栓した時点の本検討の開始点とし, それぞれの採血管は該当時間の直前に遠心を行い, 開栓後速やかに測定を行った. その結果, それぞれの検体において開栓直後に対する変化率は180分まで $\pm 5\%$ 以内の変動であった (Fig. 7).

(3) 採血量別測定値の比較

ベノジェクトII 真空採血管へ採血した1, 2.5, 5, 8mL採血(それぞれN=10)を遠心分

離したのち開栓直後に測定し, 値を比較したところ, 8mLと5mL採血間に有意差は認められなかったが, 2.5mL, 1mL採血では8mL採血と比較し有意に低値であった (Fig. 8).

7. 相関性

当院検査部に血清中 tCO_2 と静脈血ガス分析が同時に依頼・提出された検体105例を対象とし, 本法と血液ガス分析装置による算出法の2方法間における相関性を確認したところ, 線形回帰式 $y=0.88x$

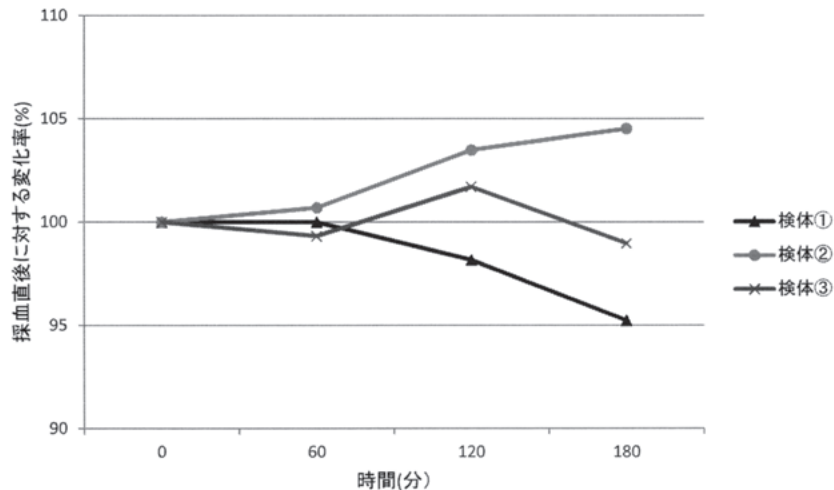


Fig. 7 室温における閉栓検体(8 mL)の安定性 (n = 3)

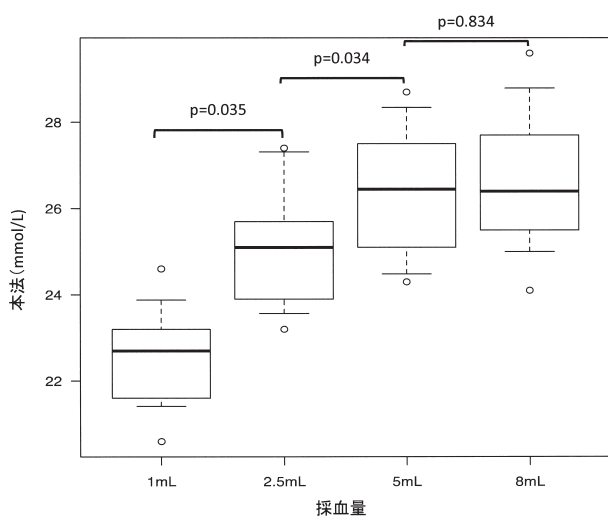


Fig. 8 採血量別 tCO₂ 値の比較

+2.58, $r=0.97$, $p<0.001$, Bias = -0.30 mmol/L (SD ; 1.11 mmol/L), 95%許容誤差範囲 (Limit of Agreement ; LOA) は -2.47 から 1.86 mmol/L であった (Fig. 9).

考 察

HCO₃⁻は主に腎臓で産生され、生体内で最大の緩衝系である炭酸・重炭酸塩緩衝系を形成することで、水素イオン H⁺の変動を一定に保つ重要な因子の1つである。現在、本邦における HCO₃⁻濃度測定は血液ガス分析装置による算出法が一般的であるが、血液ガス分析には専用採血管・専用機器が必要なことや一度に大量の検体を処理することが困難で

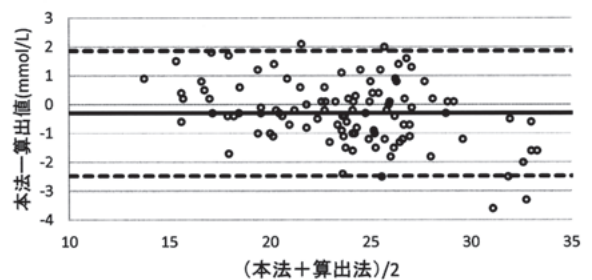
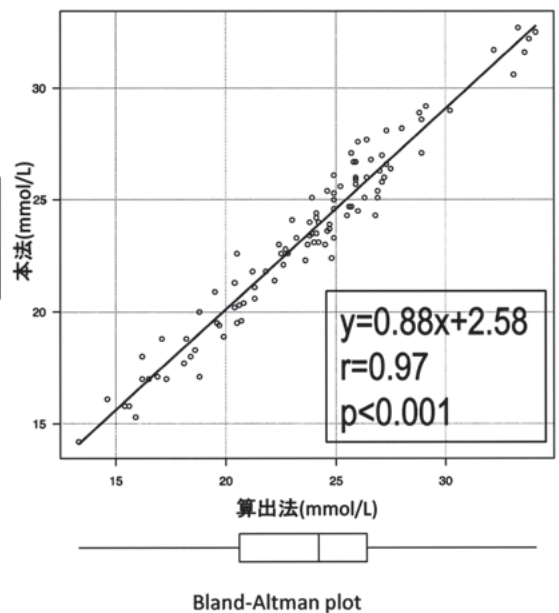


Fig. 9 相関図と Bland-Altman 分布図

あるため、汎用自動分析装置に搭載可能なより簡便な測定法が望まれていた。

今回、検討を行った酵素法を原理とした重炭酸塩測定試薬「ダイヤカラー・CO₂」の基礎的性能は全

での評価項目において結果良好であり、日常検査法試薬として十分な性能を有していると考えられた。

測定値安定性の検討では当院採用の9 mL 真空採血管に対して1, 2.5, 5, 8 mLの採血を実施し、開栓からの経時的変動や閉栓状態での安定性、採血量別での測定値を確認した。その結果、開栓状態での $t\text{CO}_2$ 値は時間経過とともに低下し、その減少の傾きは採血量が少ないほど大きいこと、また、開栓の有無に関わらず採血量が少ないほど低値となることが示された。これらの原因は既報^{4),5)}でも考察されているように、採血管内における CO_2 の拡散によるものと推察される。開栓後に測定値の減少の傾きがより大きかった原因も、開栓で血清が大気中に曝露され、血清中の CO_2 の放出が起こったためと考えられた。一方、閉栓状態での安定性は少なくとも180分までは保たれることを確認した。これらの結果から、血清 $t\text{CO}_2$ 測定の際は採血管にできる限り最大量での採血を実施し、かつ、開栓後は速やかに測定に移行することが必須であると考えられた。さらに、採血が困難であり少量採血となった検体では測定値が偽低値となることも念頭に置いて臨床判断を行うことが必要である。

採血手技が煩雑な動脈血ガス分析と比較し1.03 mmol/L (95%CI: 0.56–1.5 mmol/L) 高値⁷⁾とされる静脈血ガス分析は、酸塩基平衡のモニタリングとして十分代替可能であり、従来から日常検査に多く用いられてきた。動脈血ガス分析による算出値と酵素法を原理とした血清 $t\text{CO}_2$ 値における相関性に関する先行研究では良好な相関性とする結果^{8),9)}に対し、相関性に乏しいとする結果^{10),11)}の相反する結論が散見される。しかし、我々が確認し得た限りでは静脈からの同時採血における血液ガス分析と本法の2方法間比較に関する報告はない。本検討は静脈から真空採血管と血液ガス専用採血管に同時採血を行った105例の相関性を後方視的にみたものであるが、線形回帰式にて $y(\text{本法}) = 0.88x(\text{算出法}) + 2.58$ 、Bland-Altman分析でもBiasが -0.30 mmol/L、LOAは -2.47 から 1.86 mmol/Lとなり、本法は算出法と比較してやや低値傾向を認めた。これらの原因は詳しい検証ができず言及できないが、先述した動脈血に対する静脈血の HCO_3^- の差を考慮す

ると、本法は動脈血ガス分析による算出値に近似する可能性がある。ただ、本検討では動脈血ガス分析による算出値との比較は行っておらず、また本法には測定技術的に偽低値となる可能性を完全には排除できないため、代替可能な検査項目となり得るか否かは更なる検討が必要である。

以上より、本法を用いた酸塩基平衡評価では採血・測定時においていくつかの負誤差要因が存在するため、それらを考慮した上での総合的な判断が必要であるものの、他の生化学項目との同時測定が可能であることに加え、採血負担軽減となるため、日常検査において非常に有用であると考えられる。

結 論

酵素法を原理とした本法試薬の基礎的性能は良好であった。一方で、測定安定性にはいくつかの負誤差要因が存在するため、できる限り最大量での採血かつ開栓後は速やかな測定が必須である。静脈血ガス分析との相関性試験では若干の低値傾向が認められたものの、汎用自動分析装置において他の生化学項目と同時検査可能なことや、血液ガス専用採血管分の採血負担が軽減できることによる利点が十分上回るものと考えられ、日常検査に有用であると思われる。

文 献

- 1) 東洋紡株式会社：重炭酸塩キット ダイヤカラー・ CO_2 第2版, 2016.
- 2) Burtis CA. *et al.*: Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics, Missouri, Elsevier Saunders, 4th ed., 983-1018, 2006.
- 3) Robert DH., Terry S.: Serum Bicarbonate Declines with Sample Size in Vacutainer Tubes. *Am J Clin Pathol.*, **97**: 213-216, 1992.
- 4) 古川聡子ほか：新たに開発された重炭酸塩測定キットの基礎的性能評価と変動要因の解析. *医学検査* **64**: 445-452, 2015.
- 5) 茂呂麻里子ほか：生化学自動分析装置 JCA-BM6070 を用いた重炭酸塩測定試薬の検討. *埼臨技会誌* **64**: 117-123, 2017.
- 6) Kanda Y.: Investigation of the freely available easy-to-use software 'EZR' for medical statistics, *Bone Marrow Transplant.*, **48**: 452-458, 2013.
- 7) Benjamin MB. *et al.*: The role of venous blood gas in

- the emergency department: a systematic review and meta-analysis. *Eur J Emerg Med.*, **21**: 81-88, 2014.
- 8) Kumar V. *et al.*: Comparison of measured and calculated bicarbonate values. *Clin Chem.*, **54**: 1586-1587, 2008.
- 9) Chittamma A. *et al.*: Comparative study of calculated and measured total carbon dioxide. *Clin Chem Lab Med.*, **46**: 15-17, 2008.
- 10) Story DA. *et al.*: Comparison of three methods to estimate plasma bicarbonate in critically ill patients: Henderson-Hasselbalch, enzymatic and strong-ion-gap. *Anaesth Intensive Care.*, **29**: 585-590, 2001.
- 11) Lolekha PH. *et al.*: Comparative study of values calculated bicarbonate and measured total carbon dioxide content. *Point of Care.*, **2**: 135-143, 2003.

**Basic performance evaluation
of enzymatic measured bicarbonate reagent kit “Diacolor CO₂”
and comparative study with values calculated
by venous blood gas analysis**

Ryosuke JINOKA*, Tatsunori TAKAHASHI, Yukimitsu NISHIOKA, Satoshi TAKAHASHI,
Noriko NISHIYAMA and Masataka NISHIYAMA

*Department of Clinical Laboratory, Matsuyama Red Cross Hospital

Bicarbonate (HCO_3^-) is a significant parameter of electrolyte dispersion and anion deficiency, and is useful for the medical diagnosis of acid-base disequilibrium in the respiratory-metabolic system. In Japan, the calculation method using the Henderson-Hasselbalch equation with a blood gas analyzer has become widespread, but in recent years, “Diacolor CO₂” based on an enzymatic assay that can be measured in automated biochemical analyzers has been developed. We investigated its basic performance, the stability of measured values, and compared these measured values with values calculated by venous blood gas analysis. As a result, the basic reagent performance was good in all evaluation items, but it was confirmed that the measured values were falsely low in stability depending on the blood collection volume and the time elapsed after opening. These low values were due to the diffusion of CO₂ from the sample. Therefore, it is essential to collect the maximum amount of blood possible and promptly measure it after opening. In comparison with calculated values, the linear regression equation was y (measured) = 0.88x (calculated) + 2.58, $r=0.97$, in Bland-Altman analysis, bias was -0.30 mmol/L, and the limits of agreement were -2.47 to 1.86 mmol/L. This showed that measured values were slightly lower than calculated values. This method has the advantages of enabling simultaneous measurement with other biochemical items and reducing the blood collection burden of the blood collection tube dedicated to blood gas analysis, and is considered to be useful as a daily test item for acid-base equilibrium evaluation. It is necessary to keep these variable factors in mind.