

<原 著> 第49回 日本赤十字社医学会総会 優秀演題

自家製プール血清による生化学項目の精度管理－プール血清作製法－

静岡赤十字病院 検査部

宇賀田 章乃 山口 孝一 川口 貴子 赤坂 寿美子 大畑 雅彦

The method of our own conserved serum —For the quality control of biochemical items—

Fumino UGATA, Koichi YAMAGUCHI, Takako KAWAGUCHI,
Sumiko AKASAKA and Masahiko OHATA

Department of Clinical Laboratory, Japanese Red Cross Shizuoka Hospital

要 旨：臨床検査の精度管理における管理試料は、一般的には各メーカーが販売するコントロール血清が繁用されている。当院検査部は、自家製プール血清で精度管理に臨床的許容範囲を用いた運用を施行している。作製当初、特に異常域プールの濃度調整に苦慮していた。廃棄処分検体から、正常域濃度プールは健診者の検体を、また異常域濃度プールは極異常値検体（特にビリルビン陽性検体）を抽出し二濃度の値付けを行った。凍結保存には -80°C フリーザーを使用し、CV値の小さい安定したプール血清の作製を試みた。

Key Words：自家製プール血清、簡便な精度管理、 -80°C 保存

はじめに

当院検査部では、始業時の業務を簡素化する目的で¹⁾、自家製プール血清（以下プール血清）による精度管理に臨床的許容範囲^{2~4)}を用いた運用を行っている。プール血清は、生化学大型分析機器で分析される全項目（正常域と異常域の二濃度）を測定し、始業時の業務効率化に大変有用である。プール血清は古くから精密度（precision）の管理として用いられているが^{5,6,8)}、篠原、澤部らの報告を参考にプール血清の作製を行っていた。特に異常域プールの調整は煩雑であり、またフィブリン析出等によるデータのバラツキが問題であった。プール血清の作製にはパニック値の検体を収集するなど試行錯誤を繰り返し、多くの時間と手間を要していた。過去にはプール血清を作製利用していた検査室も多く^{5~9)}、

それらを参考に作製を行った。前述の問題点を解消する為に、作製の効率化とデータの安定性が課題であった。

今回我々は、プール血清の貯蔵法の工夫と希釈濃度予測調整法を試み、安定したプール血清作製法を考案したので報告をする。

対 象

対象は、当院の測定項目（生化学38項目 免疫9項目）を測定する正常域濃度プール血清（以下ノーマルプール）と異常域濃度プール血清（以下アブノーマルプール）とした。測定機器は日本電子BioMajestyJCA-BM6070（以下BM）を用いた。

方 法

保存条件

当院倫理委員会で承諾を得た廃棄処分患者

検体からプール血清を収集した。但し、溶血、乳び、透析患者、感染症陽性検体は使用不可とした。

ノーマルプールは、測定実施項目においてすべて基準値範囲内の健康診断及び人間ドック受診者の残血清から収集した。アブノーマルプールは全患者の残血清を対象とし、測定実施項目の基準値範囲外検体を用いた。

各保存ボトルと保存目安値の設定は、プール血清作製ワーキンググループ（WG）で決定した。表1に示す様に、蛋白、脂質および各臓器別に保存ボトルを準備した。保存目安値は、特にビリルビンボトルでTB2.0mg/dl以上と極異常値を示す患者検体を収集した（表1）。

表1 アブノーマル保存の目安

各ボトル	項目	保存目安
TP	TP・ALB	TP5.0g/dl ↓ ALB2.0g/dl ↓
BIL	TB・DB	TB2.0mg/dl ↑
肝機能	AST・ALT・LDH・ALP・LAP・γ-GTP・CHE	4項目以上が基準値以上
膵機能	AMY・Lip・P-AMY	基準値以上
腎機能	UN・CRE・UA	透析Pt除 CRE2.0mg/dl ↑
脂質	TC・TG・LDL-c・HDL-c・ZTT・TTT	乳び(-) HDL-c ↓ 他 ↑
CK	CK・CK-MB	500IU/L ↑
FE・UIBC	FE・UIBC	FE40μg/dl ↓
CA・IP・MG	CA・IP・MG	CA ↓ ・IP ↑ ・MG ↑
CRP	CRP	10.0mg/dl ↑
IGA・M・G	IGA・IGM・IGG	基準値以上
IGE	IGE	300IU/ml ↑
RF	RF	20IU/ml ↑
C3・C4	C3-c・C4	基準値以上
Cys-c	Cys-c	1.0mg/dl ↑

結果

1. プール保存方法

1) ノーマルプール (図1)

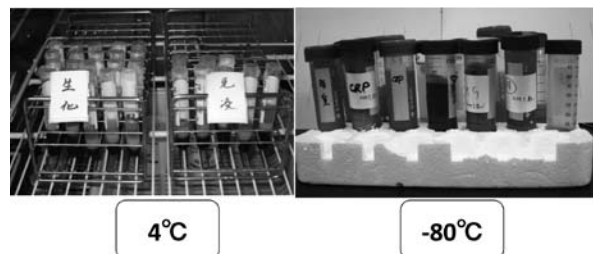
検体試験管のまま4℃（冷蔵庫）に保存し、その後-80℃（ディープフリーザー）で週一回程度空きボトルに追い溜めをした。目安量は約3ヶ月分の必要量である150mlとした。



図1 生化学ノーマルプール作製法

2) アブノーマルプール (図2)

ノーマルプールと同様に4℃で保存後、週一回程度で各異常血清ボトル（ファルコンチューブ等を使用）に-80℃で追い溜めをした。



- ・各ボトルに検体収集し、4℃に保存する。
- ・週一回程度-80℃に保存し、追い溜めをする。
- ・各ボトルが100ml×2に達するまでプールする。

図2 生化学アブノーマルプール作製法

2. 融解から-80℃保存の過程 (図3. 4)

-80℃に保存された残血清ボトルを、速や

かに流水で融解した（濃度調整後はノーマルプール・アブノーマルプール共に同様の処理）。攪拌後遠心操作（3500rpm10min）により沈殿物や浮遊物を取り除き、ガーゼとナイロンメッシュ（孔径30 μm）で濾過後2ml 保存用ピペットチューブに分注し、密封後速やかに－80℃で凍結保存した。

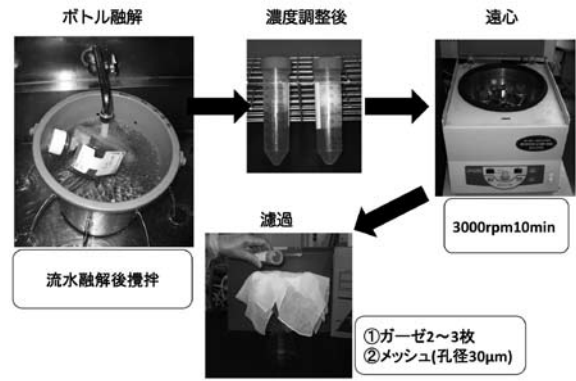


図3 ボトル融解から濾過の過程

3. プール血清濃度調整（図5）

ノーマルプールは特に濃度調整は施行しなかった。アブノーマルプールは、各異常残血清ボトルを融解後ボトルごとに47項目を測定した。測定結果は、図5に示すMicrosoft office Excelで作製した自動表計算可能なオリジナルシートに入力し行った。このオリジナルシートは各異常域ボトルの測定値を項目別に平均値を算出し、更に希釈係数を入力すると作製される予測濃度を自動計算できる様にプログラムした。特に今回、我々はビリルビン及び腓機能ボトルを中心に希釈係数を入力した。濃度決定後、ノーマルプール同様に150mlの必要量を調整混和した。

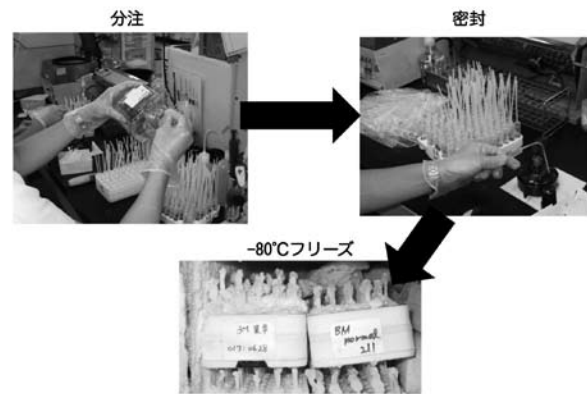


図4 分注から－80℃保存過程

各ボトル		希釈係数														予測濃度
	倍率	TP	ALB	TB	DB	AST	ALT	LD	ALP	LAP	γ-GT	CHE	UN	CRE	UA	
1																
2	TB-DB	25	6.1	2.6	16.21	6.88	166	172	295	1254	194	467	123	40.5	1.09	4
3	Ca	1	6	2.6	0.28	0.04	27	23	290	483	73	87	189	23.4	0.93	
4	CRP	10	6.1	2.4	0.86	0.31	37	44	180	301	62	58	131	26.1	0.87	
5	腓機能	20	6.3	3.4	0.61	0.12	60	36	223	279	60	77	244	21.1	1.25	
6	脂質	20	7.3	4.5	0.88	0.07	34	32	312	291	71	107	387	16.2	0.77	5
7	免疫グロブリン	15	10.2	3.6	0.3	0.04	21	18	150	283	46	24	212	18.3	0.81	5
8	IgE	5	7.6	4.3	0.32	0.04	22	16	188	448	66	36	341	14.6	0.8	5
9	フェリチン	5	6.5	3.6	0.47	0.1	34	34	288	344	82	88	208	25.9	1.09	4
10	RF	8	7	3.6	0.33	0.03	30	22	178	271	65	48	278	19.6	0.73	5
11	Cys-c	5	6.2	3.9	0.83	0.16	64	56	37	229	51	35	189	30.7	1.2	5
12	肝機能	20	6.5	3.1	1.63	0.54	158	128	508	914	139	320	192	22.7	0.93	
13	CK	10	6.1	3.6	0.63	0.14	73	34	272	232	53	66	222	19.6	1.03	5
14	腎機能	10	6.4	3.2	0.67	0.18	45	26	393	421	76	79	170	62	4.78	7
15																
16	合計		89.3	44.4	24.12	8.65	771	641	3314	5750	1038	1492	2886	340.7	16.28	67
17	平均		6.79	3.42	1.86	0.67	59.31	49.31	254.92	442.31	79.85	114.77	222.00	26.21	1.25	5.21
18																
19																
20		倍率	TP	ALB	TB	DB	AST	ALT	LD	ALP	LAP	γ-GT	CHE	UN	CRE	UA
21	合計		1057	521.4	505.77	195.3	11922	10259	43214	82571	14438	25411	34048	4100.2	187.4	80
22	計算値		6.86	3.39	3.284	1.27	77.416	66.62	280.61	536.1753	93.75325	165.006	221.0909	26.625	1.22	5.21
23	n数		154													

TP計算例

・予測濃度の計算

$$(6.1 \times 25 + 6 \times 1 + 6.1 \times 10 + 6.3 \times 20 + 7.3 \times 20 + 10.2 \times 15 + 7.6 \times 5 + 6.5 \times 5 + 7 \times 8 + 6.2 \times 5 + 6.5 \times 20 + 6.1 \times 10 + 6.4 \times 10) / 25 + 1 + 10 + 20 + 20 + 15 + 5 + 5 + 8 + 5 + 20 + 10 + 10 = 1057 / 154 = 6.86$$

・各ボトルの希釈係数の和が必要量(ml)と考えられる

図5 濃度調整法

以上の様に作製するとノーマルプールの各測定項目濃度は、ほぼ基準値範囲内の濃度に作製できた。アブノーマルプールにおいては、

ビリルビン高値ボトルをベースに濃度調整を行った結果 22 項目の基準値外濃度調整に成功した (図 6)。

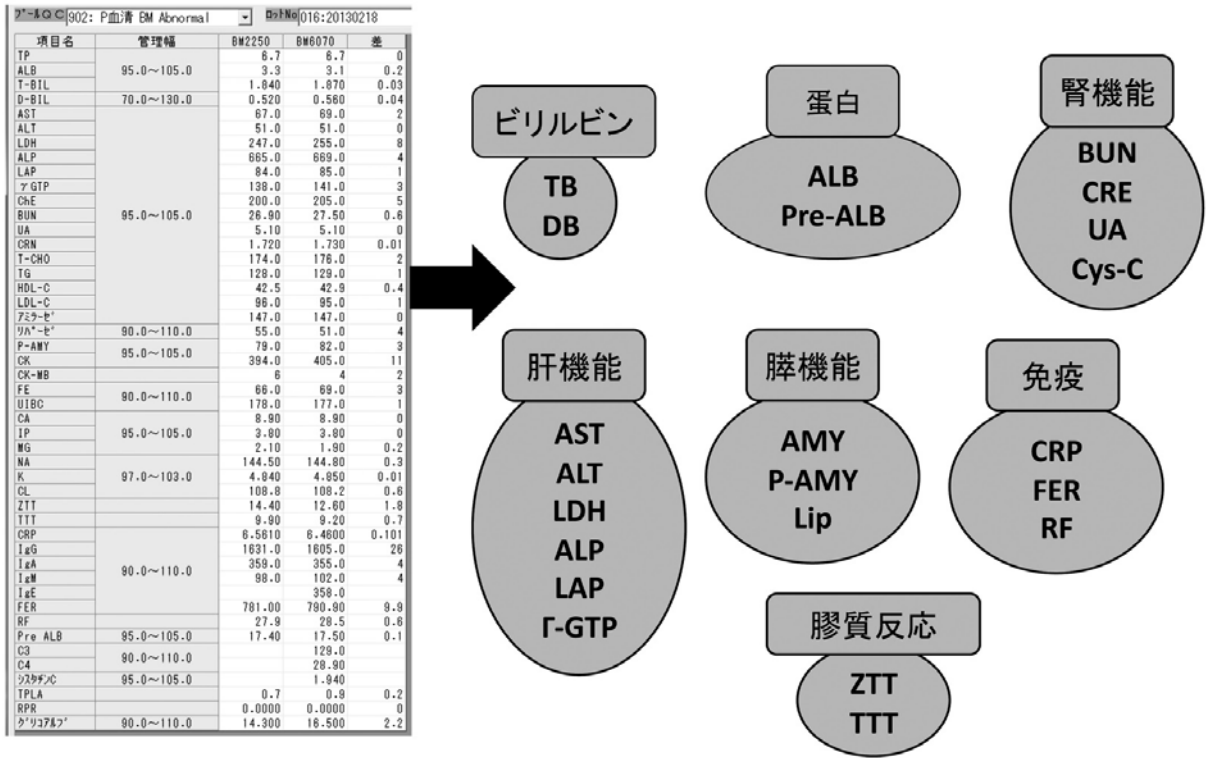


図6 調整後濃度(アブノーマル)

4. 安定性の検討

安定性が悪いとされる ALT におけるノーマ

ルプールの CV 値は 3.5%、アブノーマルプールの CV 値は 2.2%と良好であった (図 7)。

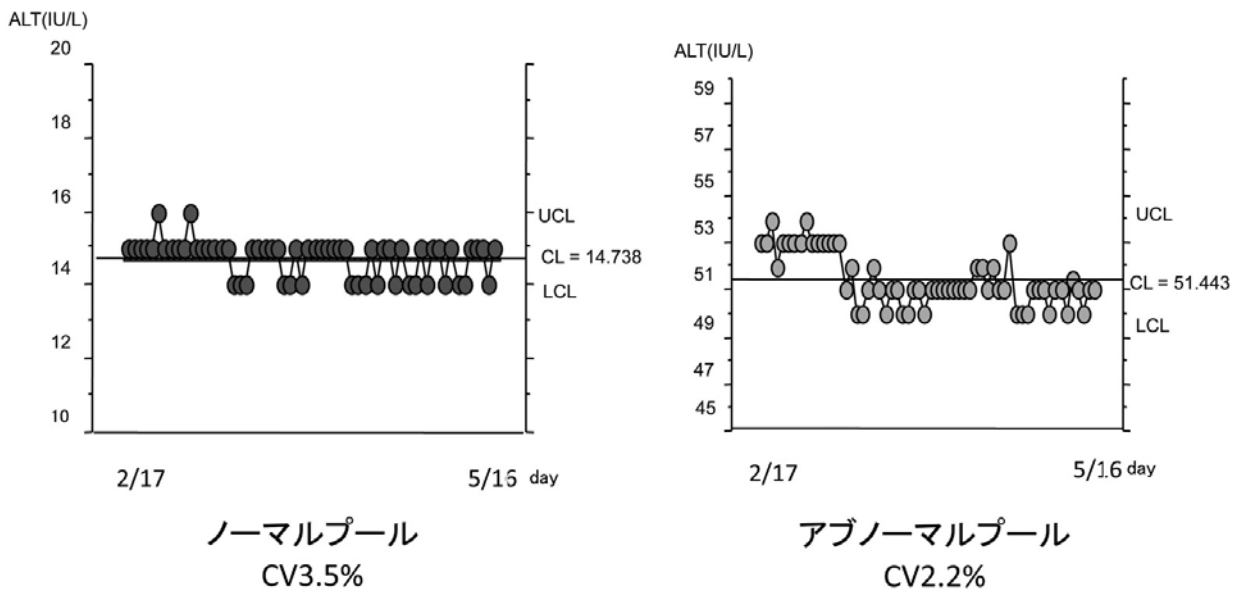


図7 安定性

考 察

プール保存条件とプール保存方法及び融解から－80℃保存の過程は千葉大法⁹⁾を参考とした。溶血と乳び検体はプール保存条件から除外し、またフィブリンに関しては透析患者の血清を除外することにより、使用時のフィブリンによる分析エラーは殆んど確認されなくなった。作製者の安全を計り感染症陽性患者血清もプール保存条件から除外した。

アブノーマルプール作製において、今回我々はビリルビン高値例を中心に検体採取することを心がけた。これは肉眼的ビリルビン強陽性血清で特に直接ビリルビンの高値疾患は、肝・胆道系疾患である。肝機能・膵機能項目が高値となり、表1で示す多くの項目において異常域を網羅できる結果となった。しかしビリルビンは光により分解されるため、直射日光や蛍光灯の真下に長時間放置するとその値が減少する傾向がある。従って主にビリルビン値の安定性を保つ為に濃度調整後の分注・密封・－80℃凍結保存は速やかに施行することが重要と考える。この様な作製手順の工夫が、CV値の低いプール血清作製の成功に繋がったと考える。

当院は健康管理センターを併設しておりノーマルプールの収集は安易であった。健康診断及び人間ドック受診者の依頼項目は、プール対象測定項目(47項目)全てを網羅していない。しかし、実施項目の基準範囲内検体のプールで殆どの項目が基準範囲内であった。これは、Hoffman&Waidにより発表された正常者平均法(average of normals method)¹¹⁾を用いた内部精度管理法が有効であったことを示している。以前、カリウムの濃度が基準値範囲を上回るロットが生じた経験があった。これは生化学用採血管は、分離剤入り採血管を使用しているが、分離不十分やデープフリーズまでの時間を要した場合にカリウム濃度が高値を示したと考えられ、検体保存の際には注意が必要である。

アブノーマルプールは各異常血清ボトルにプールする基準を極異常値に設定したため、調整の際ボトル間での希釈を最小限に抑える

ことと調整濃度の予測が可能となり、作製も簡便となった。

一度に作製するプール量は、ノーマルプール・アブノーマルプール共に濃度調整後の密封からフリーズまでの時間差が出ない程度の量の約150mlを1.5mlに子分注し、密封後速やかに均一に並べデープフリーズし、使用時は流水で融解直後測定することを徹底したことが、ビリルビン高値検体を用いても値付けされた血清濃度の安定に繋がったと考える。

作製に要した物品等、特に新規購入した物は無く、プール血清には、廃棄検体を日本臨床検査医学会の見解2002年を参考⁹⁻¹⁰⁾とし廃棄血清検体を利用、保存には使用済みボトルの再利用、濾過にはフローサイトメトリーで使用するナイロンメッシュを使用した。当検査室に－80℃のデープフリーザーが設置されており利用可能であったことは、安定性に大きく関与した。

結 語

日赤検査第45巻第2号¹⁾で報告の通り、始業時の簡便な精度管理にこのプール血清を使用し、現在ではAM8:00外来採血から外来診療に大きく貢献している。最近では地域サーベイや各種サーベイでプール血清が利用されることも少なく無い⁵⁻⁹⁾。プール血清の作製法は、目的に合わせた作製法であるべきと考える。

作製をさらに簡便化する為にはシステム化が必須である。搬送機におけるストックヤードの極異常値検体ポジションの出力や各ボトル濃度オンライン入力による濃度調整の自動化等が可能であれば、作製者の負担はさらに減少すると期待される。

電解質や脂質項目・免疫項目の濃度調整が今後の課題であるが、プール血清の作製にさらなる創意工夫を加え、煩雑でない作製法がスタッフに根付く様に努力を惜しまず取り組んでいきたい。

謝 辞

データ送信時に極異常値患者のプリントアウト及び検体の収集を行う管理者、始業時前にプール血清を測定する当直者並びに作製メ

ンバーの協力に感謝する。

【文 献】

- 1) 宇賀田章乃：検体系検査室システム更新に伴う検査室の再構築－始業時の効率化を目指したプール血清の運用一。日赤検査 45(2)：32-36、2012。
- 2) 永峰康孝：臨床医からみた測定誤差の許容限界。医学検査 47(2)：145-151、1998。
- 3) (社)千葉県臨床衛生検査技師会 千葉県検査値統一委員会 (臨床化学検査実務委員会)：千葉県臨床検査値統一化マニュアル第1版、第1刷、1999。
- 4) 日本臨床化学会クオリティマネジメント専門委員会：生理的変動に基づいた臨床化学検査 36 項目における測定の許容誤差限界。臨床化学 35(2)：144-1531、2006。
- 5) 古閑十志子：プール血清の作りかたと使いかた。臨床検査 28(12)：1549-1556、1984。
- 6) 山舘周恒：プール血清の簡易的な作製法。検査と技術 19(11)：946-954、1991。
- 7) 篠原克幸：制度保証用プール血清の作製と安全性評価。医学検査 49(9)：1336(68)-1339(71)、2000。
- 8) 角田美鈴、北島勲他：総蛋白・脂質回収率向上をめざした中空糸膜利用プール血清作製方法。医学検査 53(1)：43-46、2004。
- 9) 澤部祐司：精度管理用プール血清の作製法とその倫理的話題。検査と技術 35(10)：917-921、2007。
- 10) 西堀真弘：臨床検査に関する倫理指針と個人情報保護：臨床検査 49(12)：1399-1404、2005。
- 11) Hoffmann, R. G. & Waid, M. E.: Average of normals method of quality control. Am.. Clin. Path. :3 :134-141, 1965.