

# ヘモリアス用ヘモグロビン標準品の値付け

落合 浩二

シスメックス株式会社試薬開発本部：神戸市西区室谷1-1-2（〒651-2241）

## SUMMARY

便潜血検査は、ヒトヘモグロビンに対する抗体を用いた免疫学的測定法が開発され、定量的な測定が可能となった。さらに、自動分析装置へ適応されることにより、便潜血検査の定量化は普及し、本検査の精度管理及び標準化が重要視されるようになった。今回、我々はシアンメトヘモグロビン法で値付けした血液試料からヘモリアスに用いる社内標準品へヘモグロビン濃度を伝達することにより、ヘモリアスにおけるヘモグロビン濃度の値付け方法を確立したので報告する。

**Key Words** 便潜血検査，便中ヘモグロビン，ヘモリアス，標準化，シアンメトヘモグロビン法

## はじめに

便潜血検査は大腸癌等の下部消化管疾患の重要な指標として、成人病検診等で広く行われている。近年では、高性能な全自動分析装置及びヒトヘモグロビンに対する抗体を用いた定量試薬が開発され、検査の効率化、定量化が広く普及した<sup>1,2)</sup>。一方、免疫学的便中ヘモグロビン測定法の標準化作業はこれまで十分に検討されず、標準物質及び基準測定法は未だ確立していない<sup>3)</sup>。今回、シアンメトヘモグロビン法で値付けした血液試料から便潜血用測定システムヘモリアス(以下ヘモリアス、シスメックス社)に用いる社内標準品へのヘモグロビン値の伝達を検討したので報告する。

## 材料及び方法

### 1. 試料

社内ボランティア27名より得た血液試料(EDTA加血)を用いた。血球成分を生理的食塩水で洗浄し、溶

血させたものをヘモグロビン試料とした。

シアンメトヘモグロビン法の正確性評価用試料として、BCR(Community Bureau of Reference, Brussel, Belgium)より提供されるCRM522を使用した。

### 2. ヘモリアス用社内標準品

ヒト由来のヘモグロビン凍結乾燥品をヘモリアス用社内標準品として使用した。

### 3. シアンメトヘモグロビン測定用試薬作製手順

1/30 moL/Lのリン酸二水素カリウム - リン酸水素二ナトリウム緩衝液、pH7.2 ± 0.2(25℃)にフェリシアン化カリウム 200mgを添加し完全に溶解した。

シアン化カリウム50mgを溶解した。pHが7.0 ~ 7.4にあることを確認した。10%に希釈した非イオン性界面活性剤(TritonX-100)を5 ~ 10mL添加し、1/30moL/Lのリン酸二水素カリウム - リン酸水素二ナトリウム緩衝液、pH7.2 ± 0.2(25℃)で全量1Lとした。

#### 4. シアンメトヘモグロビン測定手順

NCCLS(National Committee for Clinical Laboratory Standards)より勧告されたシアンメトヘモグロビン法に準じて行った<sup>4-6)</sup>。

ヘモグロビン試料及びCRM522をローラーで5分間、回転混和した。100mLメスフラスコにシアンメトヘモグロビン測定用試薬を入れ標線までメスアップした。ヘモグロビン試料及びCRM522をマイクロシリンジで400μL採取した。このとき、シリンジ先端の外壁に付着する試料は完全に拭き取り、分取した試料をメスフラスコ中の試薬に入れ、内容を完全に排出した。マイクロシリンジをメスフラスコ上部の透明な試薬部分で5回吸引排出を繰り返し、シリンジ内壁に残存した試料を完全に洗い流した。メスフラスコに栓をしてよく混和し、5分以上放置した。よく混和した後、内容の一部を0.20μmのメンブレンフィルターでろ過した。試薬を対照に、540nmの吸光度を求めた。ヘモグロビン濃度の算出は次式に従った。

$$\text{ヘモグロビン濃度 (g/L)} = (540\text{nm における吸光度} \times 16114.5 \times 251) / (11.0 \times 1.00 \times 1000)$$

16114.5 : ヘモグロビンの分子量(一量体)

251 : 希釈率

11.0 : シアンメトヘモグロビンのモル吸光係数

( $l \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ )

1000 : mgからg表示への換算

#### 5. ヘモリアス用測定試薬「ヘモサイン」による社内標準品への値付け

シアンメトヘモグロビン法により値付けされたヘモグロビン試料をヘモリアス用便溶解液で正確に希釈し、ヘモリアス用測定試薬ヘモサイン測定のための標準液とし、検量線を作成した。ヘモサインによる測定は添付の取扱説明書に従い、日立7170形自動分析装置を用いて行った。

ヘモリアス用社内標準品3バイアルを各々、所定量のヘモリアス用便溶解液で溶解し被検試料とした。

### 結果 (表1)

試料個体差、実験誤差等を考慮し、20～40代の男女から構成される社内ボランティア27名から得たヘモグロビン試料をシアンメトヘモグロビン法により値付けした。その結果、試料中のヘモグロビン濃度は28.3～58.0g/Lであった。また、同時に確認したCRM522の測定値は0.8025g/Lであり、表示値0.8003g/Lに対し0.3%の正誤差であった。

次いで、シアンメトヘモグロビン法で値付けを行ったヘモグロビン試料27例をそれぞれ標準液とし、ヘモリアス用社内標準品の測定を行った。測定は3バイアル全て行い、その平均を求めた。27通りの検量線により測定されたヘモリアス用社内標準品

表1. シアンメトヘモグロビン法によるヘモリアス用社内標準品への値付け

ヘモグロビン試料番号	1	6	3	4	5	2	7	8	9	10	11	12	13	14	15
性別	男性	女性	男性	男性	男性	男性	女性	男性	女性	男性	男性	男性	男性	女性	女性
年代	30代	40代	40代	40代	30代	30代	20代	40代	20代	30代	30代	30代	20代	20代	20代
シアンメトヘモグロビン法によるヘモグロビン試料の濃度 (g/L)	44.9	47.2	51.9	54.3	54.0	54.2	51.7	48.8	48.2	50.9	49.4	53.4	49.0	52.3	48.8
各ヘモグロビン試料を標準液とした時のヘモリアス用標準品の測定値 (ng/mL)	604	593	579	626	596	575	580	587	579	570	587	573	559	597	611

ヘモグロビン試料番号	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	平均値	標準偏差	変動係数
性別	女性	男性	男性	女性	女性	男性	女性	男性	男性	男性	男性	男性	(ng/mL)	(ng/mL)	(%)
年代	20代	30代	30代	40代	40代	40代	20代	30代	30代	30代	30代	30代			
シアンメトヘモグロビン法によるヘモグロビン試料の濃度 (g/L)	49.0	50.5	54.7	28.3	30.3	53.8	53.8	58.0	53.1	52.3	55.2	52.2			
各ヘモグロビン試料を標準液とした時のヘモリアス用標準品の測定値 (ng/mL)	607	602	587	581	575	580	582	586	580	589	586	584	587	14.1	2.4

試料	CRM522
表示値 (g/L)	0.8003
シアンメトヘモグロビン法によるヘモグロビン試料の濃度 (g/L)	0.8025
表示値に対する誤差 (%)	0.3

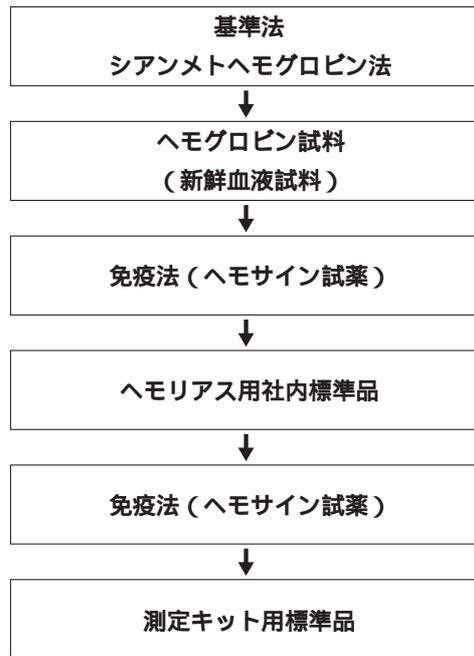


図1 . ヘモリアスにおけるヘモグロビン濃度の値付け

の平均値は587ng/mL，標準偏差は14.1ng/mL，変動係数は2.4%の結果が得られた。

## 考 察

消化器癌，とりわけ大腸癌の罹患率は年々増加傾向を示しており，早期発見・早期治療を目的とした便潜血検査は有用なスクリーニング検査の一つである。近年，便潜血検査は化学法から免疫法に，定性法から定量法へとより精度の高い検査方法へと進歩しているが，検査法の標準化あるいは精度管理手法は十分に整備されていない<sup>3)</sup>。

ヘモリアスにおけるヘモグロビン濃度の値付けの流れを図1に示した。即ち，基準法としてシアンメトヘモグロビン法を位置付け，実際の測定法である免疫法へと伝達するものである。この測定法間の橋渡しをする標準物質としてヘモグロビン試料，さらにヘモリアス用社内標準品を用い，このヘモリアス用社内標準品から測定キット用の標準品の値付けを行っている。しかし，本来シアンメトヘモグロビン法は血中ヘモグロビン濃度を測定するのに適した感度を有しており，便中の微量ヘモグロビンを直接測定するために適した方法ではない。また，各キット

で使用可能な免疫学的測定用のヘモグロビン標準物質も確立していない。今後，各測定キット間の測定値を統一化していくためには，免疫学的便中ヘモグロビン測定の基準方法及び標準物質の確立が望まれる。

## 参考文献

- 1) 南 義弘, 他: 免疫学的便潜血反応の自動分析. 検査と技術, 19: 845 ~ 849, 1991.
- 2) 伊藤機一: 便潜血検査. 外科, 52: 1266 ~ 1272, 1990.
- 3) 岡田茂治: 便潜血反応の問題点と精度管理. 27(5): 445 ~ 450, 1999.
- 4) National Committee for Clinical Laboratory Standards: Reference and Selected Procedures for the Quantitative Determination of Hemoglobin in Blood-Second Ed; Approved Standard. NCCLS (H15-A2): 1994.
- 5) International Committee for Standardization in Haematology. Recommendations for reference method for haemoglobinometry in human blood. Br J Haematol 13: 71 ~ 75, 1967.
- 6) 日本臨床病理学会・標準委員会・血液小委員会: 血液ヘモグロビン濃度基準分析法(案)ver.1.2.臨床病理, 48: 261 ~ 267, 2000.

# A Procedure of Hemoglobin Values Assigned to Reference Materials for Hemo-LIAS

Koji OCHIAI

Product Development, Sysmex Corporation,  
1-1-2 Murotani Nishi-ku, Kobe 651-2241.

---

## SUMMARY

Quantitative fecal occult blood measurement was made possible due to the development of an immunoassay method that utilized anti-human hemoglobin antibody. And the automation of this method contributed to the widespread use of quantitative fecal occult blood measurement, making quality assurance and standardization even more important. We have established a system of hemoglobin assay in Hemo-LIAS by means of transferring hemoglobin value from human blood specimens assayed by cyanmethemoglobin method to internal reference materials.

**Key Words** Fecal Occult Blood Test, Fecal Hemoglobin, Hemo-LIAS, Standardization, Cyanmethemoglobin Method

---