

## 血液試料の調製

### 血清試料の調製法の一例

採血後氷上に 30～60 分血液を放置し、完全に凝固した後、そっとクロットを管壁から剥がして（先の丸い細いガラス棒などが適しています）から冷却遠心機で分離します。

この際あまり強力に回転させると赤血球が壊れ、溶血しますのでご注意ください。

シバヤギでは通常 4℃、1,200G（回転半径 12cm、回転数 3,000rpm）、15 分で行っています。

### 血漿試料の調製法の一例

採取した血液にヘパリン（最終濃度が 10µg/ml～100µg/ml ; 1.2U/ml～12U/ml）、EDTA-2Na（最終濃度が 1.0～1.5mg/ml）、EDTA-2K（最終濃度が 1.1～1.7mg/ml）、クエン酸 2Na（抗凝固剤として市販されているものを最終濃度が 0.8～1.0%）を加え 1,200G で冷却遠心します。

既にこれらの抗凝固剤でコートされたシリンジや採血管、ヘマトクリット管があります。ヘマトクリット管の場合は専用の分離装置が必要です。採血する血液量が少ない場合はプレコーティングされたヘマトクリット管が便利です。

血漿試料を凍結保存すると、融解した時にフィブリンのモヤモヤが出ますので、攪拌後遠心分離して下さい。ピペットを詰まらせる原因になり正確に定量出来なくなります。遠心分離後フィブリンの塊が沈殿せず液中に浮遊している場合には注射針のマンドリンのような細い針金の先をかぎ状に曲げたものでひっかけ取り出して下さい。

### 注射筒のヘパリン処理の一例

注射筒のヘパリン処理は、注射針を注射筒に装着し、1,000U/ml のヘパリン原液を少量吸い上げ、注射筒内部をコーティングします。余分な液は 2,3 回シリンジを出し入れして最後に空のシリンジを空中で何回かプランジャーを往復させ余分な液体を放出します。

### 血液試料（血清・血漿）の保存

- 検体は数時間の保存であれば 4℃で、それ以上の場合は-35℃以下で冷凍（長期保存には-80℃）することが望ましいです。試料の量に応じた密栓できる、遠心可能な容器を使います。長期間保存すると試料表面から凍結乾燥的に水蒸気が昇華して容器のふたなどに氷となって付着します。そのまま解凍して遠心機に掛け良く攪拌して均質にして下さい。
- 凍結された溶液を解凍すると、上部と下部に溶質の濃度差が生じます。下部が濃厚な状態となっています。これをそのままサンプリングすると大きなバラツキを生じる原因となります。解凍後は Vortex 等で良く攪拌して均質化して下さい。
- 血清を数時間放置すると炭酸ガスを失って pH8 を超す塩基性になります。また、凍結することによって炭酸ガスを失って塩基性になる可能性があります。血漿の場合 pH の変化は用いる抗凝固剤によって様々ではありません。たとえば EDTA-2Na の場合には最初やや酸性（pH6.8）程度ですが、放置して炭酸ガスが失われても 7.2 程度に留まります。クエン酸も最初は弱酸性になります。ヘパリンの場合は濃度の関係で pH には影響ないと思われまので血清と同程度に変化するでしょう。検体を加える前にビオチン標識第二抗体を加えるシステムは別として、

pH8 以上の検体を空のウェルに希釈なしで加えると、抗原抗体反応に影響を及ぼす可能性があります。

○一般的には、室温放置時間が長くなりますと分解酵素系の影響で低下する傾向を示します。測定対象物質の保存条件を検討することが大切です。

○血液中にはペプチド、タンパク分解酵素等が存在し、測定対象によっては採血状態や血清、血漿分離の過程で分解されるケースがあります。検体の劣化が危惧される場合は、採血時にアプロチニン等の酵素系阻害剤の添加をお勧めします。

参考：ホルモン実験ハンドブック I 飼育と手技 日本比較内分泌学会編

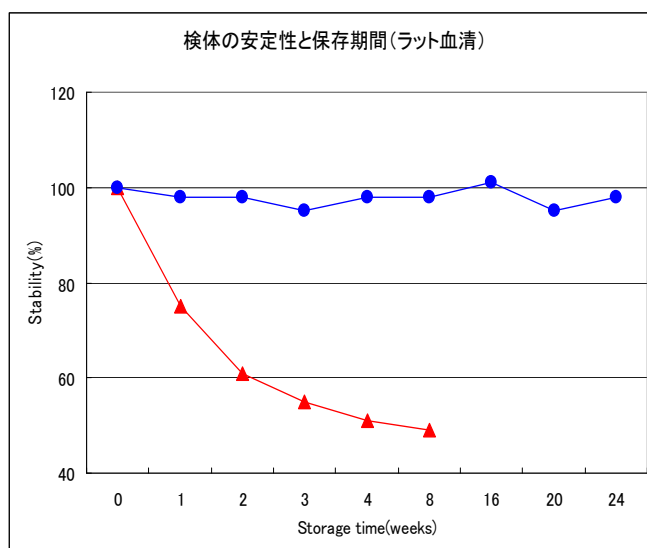
ISBN 4-7622-4661-1 定価 2,400 円（本体 2,330 円）

### インスリン測定用検体調製

血液中にはインスリナーゼやその他のタンパク分解酵素が含まれています。そこで採血した血清・血漿は出来るだけ速やかに測定して下さい。検体によっては室温で保存することによりインスリン濃度が低下します。検体は数時間の保存であれば 4℃、それ以上の場合は -35℃以下で冷凍（長期保存には -80℃）することが望ましいのです。

右図中、青線は -20℃保管、赤線は 4℃保管。

例えば試料採取後に直ちに測定できず、冷蔵、冷凍保管する場合はインスリン分解酵素阻害剤として、アプロチニンを最終濃度が 100~500KIU/ml となるように加えることをお勧めします。アプロチニンの別単位、TIU は、1TIU = ほぼ 900KIU です。



(KIU : Kallikrein inhibitor unit , TIU : Trypsin inhibitor unit)

抗凝固剤にはヘパリンの使用をお勧めします。

全ての採血が終了するまでに時間がかかる場合は、砕氷を入れたクーラーボックスに、ヘパリン（最終濃度が 10µg/ml~100µg/ml ; 1.2U/ml~12U/ml）、アプロチニン（最終濃度が 100~500KIU/ml）を入れたチューブを準備し必要量の血液を入れ、全ての採血が終了後、遠心分離し血漿を密栓できる凍結保存容器（PP または PE 製）に移し冷凍保存します。

インスリンは凍結融解の影響を受けますので測定するときは凍結融解 1 回となるようにして下さい。凍結融解を繰り返さないように必要量を小分けにして保存することをお勧めします。

## GLP-1 (7-36) amide 測定用検体の調製

GLP-1 (7-36) amide 測定用検体は必ず酵素 (DPP-IV等) による GLP-1 (7-36) amide の分解阻止対策を採血時に実施して下さい。検体調製過程で冷蔵を保つことも重要です。

### 血清検体の調製の一例

採血後氷中においたチューブに入れ、凝固後遠心分離 (4℃) し、血清 1ml に対し DPP-IV inhibitor を 20 $\mu$ l/ml の割合で添加。測定まで-80℃保管 (凍結融解 1 回)。

### 血漿検体の調製の一例

EDTA-2Na とアプロチニンをそれぞれ最終濃度が 1mg/ml、500KIU となるように加えた血液を遠心分離 (4℃) し、血漿 1ml に対し DPP-IV inhibitor を 20 $\mu$ l/ml となるよう添加。測定まで-80℃保管 (凍結融解 1 回)。

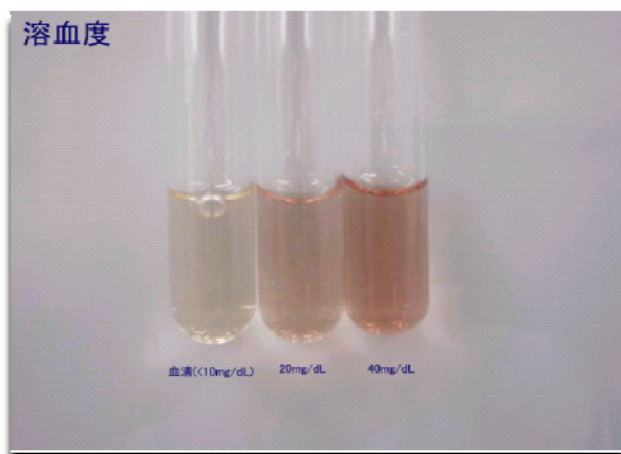
\* EDTA-2Na ; 和光純薬工業(株) (3002E-A101X)

アプロチニン ; 和光純薬工業(株) (595-01285)

DPP-IV inhibitor ; Millipore (Cat.DPP4)

## 溶血にご注意下さい。

溶血は測定値に影響を与える場合があります。検体採取時に溶血させないようにご注意ください。



インスリン測定の場合、ヘモグロビン濃度が 40mg/dl (右側試験管) の溶血では測定値が低下 (71.9~88.9%) します。

マウス検体は特に溶血しやすいので注意して下さい。

他の測定項目においても同様にご注意下さい。

参考資料 :

Insulin measurements in haemolysed serum :  
influence of insulinase inhibitors  
Clinica Chimica Acta 274(1998)111-117

※遠心力(G)=回転半径(cm) $\times$ 角速度<sup>2</sup>/980

角速度=6.28 $\times$ 毎秒の回転数 (註 6.28=2 $\pi$ 、G=980cm/sec<sup>2</sup>)

例) 回転半径 12cm、回転数 3,000rpm の場合 12 $\times$  (6.28 $\times$ 50)<sup>2</sup>/980=1207G

\*紹介の遠心力は目安です。その前後で調節して下さい。