

# **Validity for Measuring Blood CO Concentration by Head Space Method**

**Yoshifumi Yasuda, Hayato Takeuchi,  
and Yoshihiro Saito**

## **Abstract**

Carbon monoxide (CO) concentration in the blood is measured by a headspace method with a gas-chromatography (HS-GC) and/or a CO-oximeter. However, the deficiencies of using HS-GC, especially on blood CO analysis, are not well documented. In the present study the effect of these deficiencies and the agreement of the results between the HS-GC and CO-oximeter methods were examined. Results indicated, in the application of HS-GC for blood CO analysis, that the TRllyzer, a simplified gas chromatograph used in this study, showed a high linearity and reproducibility. The use of a surfactant such as Triton enhanced destruction of the plasma membrane of the erythrocytes and thereby increased blood CO values. Furthermore, an alkaline buffer solution provided higher blood CO values compared with those of an acid buffer solution. Correlation analysis between the results obtained by HS-GC and CO-oximeter on four subjects, including smokers and non-smokers, also revealed a significant relationship ( $r= 0.954$ ) between them. However, the correlation coefficient ( $r$ ) between CO concentrations during and after exercise measured by HS-GC and CO-oximeter on each subject showed a negative correlation for three of the four subjects. It is suggested that, in the application of HS-GC, a surfactant and an alkaline buffer solution should be used in the blood CO analysis, but discrepancies still remain between the values obtained by HS-GC and CO-oximeter. Therefore, further studies will be required to obtain clear agreement between the methods.

# ヘッドスペース法を用いた 血中一酸化炭素濃度測定の有効性

安 田 好 文  
竹 内 隼 人  
齊 戸 美 弘

## 1. はじめに

これまで、一酸化窒素 (NO)、一酸化炭素 (CO)、硫化水素 (H<sub>2</sub>S) は、燃焼や火山活動など外因性に生成され、多くの生物にとって毒性の強いガスとして知られている。しかしながら、最近の研究によりこれらのガスが内因性にも生成され、種々の分子カスケードを介して多様な生理・病理作用に関係すること、またそれぞれが相互に連携して作用することが明らかとなり、これらを総称して **bioactive gases**、あるいは **gasotransmitters** と呼び、その動向が注目されている。

一酸化炭素 (CO) については、ヘモグロビンの分解により生体内で生成され、その結果血中の一酸化炭素ヘモグロビン (HbCO) が増大するとともに、それが呼気ガス中にも排出されることが 1960 年代の Coburn ら<sup>1,2)</sup> の先駆的研究により明らかにされている。しかしながら、その生成機序あるいは作用機序が明らかにされ始めたのは、1980 年代後半である<sup>3)</sup>。すなわち、CO の合成酵素であるヘムオキシゲナーゼ-1 (HO-1) が、ラット (1987 年)、およびヒト (1988 年) で同定され、またそのアイソフォームである HO-2 がヒトで 1994 年に同定された。HO-1 は誘導型であり、低酸素、重金属、感染、サイトカイン、酸化ストレスなどの侵害性刺激により賦活化されて多くの体細胞から生成されること、HO-2 は構成型であり、細胞膜の興奮によりその生成が賦活されることが明らかにされている。また生成された CO は、血管平滑筋の弛緩、神経伝達、抗酸化、抗炎症、抗増殖など生体の恒常性の維持や生体防御に広くかかわることが知られている<sup>4,5)</sup>。従って、生体内の CO の動態を明らかにすることは、生体機能を考える上で重要な意味を持つ<sup>6)</sup>。

我々は、自転車を用いた運動中の呼気 CO 量を連続的に測定し、運動強度の増大に伴って、呼気 CO 排出量も増大することを報告した<sup>7)</sup>。しかしながら、このことは運動中の CO の生成が増

大したことを意味しない。すなわち、Coburn<sup>1,2)</sup>が報告したように、血液中にはHbCOの形でおよそ7 mlのCOが含まれており、これが換気の増大に伴って呼気ガス中に排出される可能性も無視できない。従って、運動時のCO生成量を考える上で、血液中のCOの動態を考慮する必要がある。これまで血中のCO量を測定する方法として、Headspace法、およびCO-oximeter法が一般的であるが、特にHeadspace法に関しては、その変動要因も含め、その解析方法が確立しているとは言い難い<sup>8,9,10)</sup>。そこで本研究では、Headspace法による血中CO濃度測定上の各変動要因の影響を評価するとともに、CO-oximeter法による計測結果との比較を行った。

## 2. 実験方法およびその結果

### 2-1 Headspace法の検証

通常、Headspace法とは、サンプルをバイアルに密封し、液体中に溶存している気体成分を任意の方法で上部気相中 (headspace) に拡散させ、その気体をシリンジにて採集し、gas chromatographにて分析する方法である。本研究の分析手順を図1に示す。この方法においては、検体の前処理方法やgas chromatographの測定精度が分析結果に影響する<sup>8)</sup>。

### 2-2 Gas chromatographの精度に関する検証実験

本研究ではGas chromatographとして簡易型ガスクロマトグラフィー (TRIllyzer, mBA-3000, タイヨウ) を用いた。この装置は、測定対象成分を水素 (H<sub>2</sub>)、メタン (CH<sub>4</sub>)、及び一酸化炭素 (CO) の3種のガスに絞った簡易型ガスクロマトグラフィーで、検出器には半導体型ガスセンサーを用いている。分離カラムや検出器の温度、カラム内のキャリアガスの流速は一定範囲に保たれており、最適化の必要はない。また、2種類の濃度の3成分混合標準ガスによる校正を行うことで、検量線の作成を行うことなく濃度そのものを測定値として得ることができる。

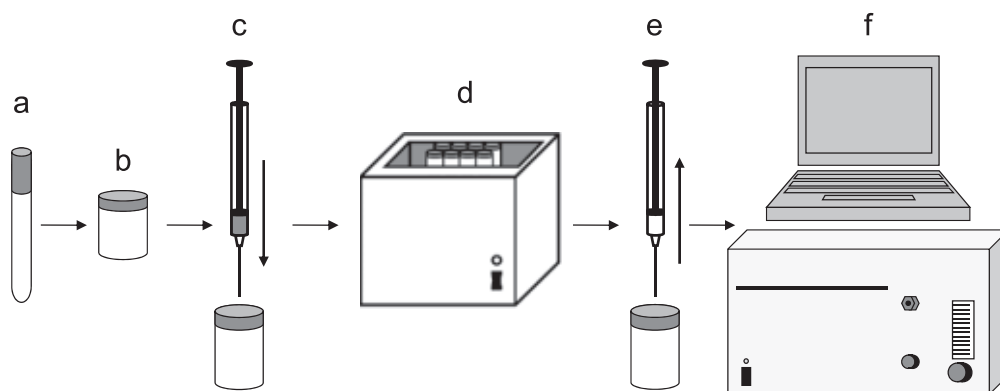


図1. Headspace法による測定手順

a: 真空採血管、b: バイアル、c: 試薬の注入、d: 超音波洗浄機、e: サンプル用シリンジ、  
f: ガスクロマトグラフィー (TRIllyzer, mBA-3000, タイヨウ)

まず、再現性の確認を行うため、既知濃度標準ガスを繰り返し測定し、変動係数（CV）（%）を計算した。結果を以下に示す。いずれの成分においても変動係数は3%以内となり、良好な再現性が確認された。

表 1. 三種類のガスに対する分析精度

成分	標準ガス濃度 (%)	CV (%) (n=5)
H <sub>2</sub>	4.82	1.0
CH <sub>4</sub>	5.08	2.7
CO	5.02	2.0

続いて、応答の直線性およびその誤差の確認を行うため、既知濃度の標準 CO ガスを 5 種類調製し測定した。結果を以下に示す（図 2 および表 2）。応答の直線性は良好（ $Y= 1.012X+0.02$ ,  $R^2=0.9997$ ）で、また測定誤差（いずれも 3%以内）も小さいことが確認された。

表 2. 標準 CO ガス濃度とその測定値および測定誤差

標準ガス濃度 (ppm)	測定値 (ppm)	測定誤差 (%)
5.08	5.1	0.39
10.3	10.1	1.94
20.1	20.7	2.99
30.8	31.5	2.27
51.3	51.7	0.78

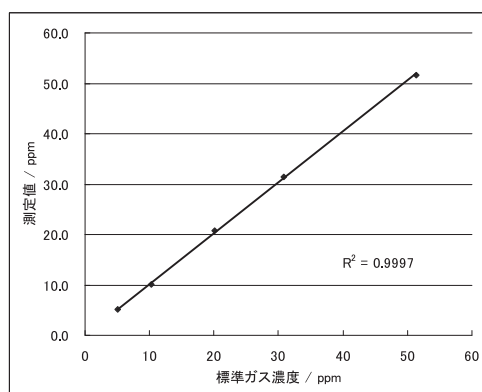


図 2. 標準 CO ガス濃度と測定値との関係

## 2-3 試料の前処理の影響評価

### 2-3-1 赤血球細胞膜の除去

血液中のヘモグロビンと結合している一酸化炭素を放出させるために、フェリシアン化カリウムの飽和溶液を反応させるが、この反応を促進するために赤血球の膜を除去し破壊する必要がある。

る。ここではボルテックスミキサーを使用した振盪による処理と界面活性剤 Triton X-100 による処理の効果を比較した。血液試料 50 $\mu$ L を 2ml のフタ付きガラス容器に入れ以下のようにして処理を行った。

- ① 振盪処理：ボルテックスミキサーを使用して 30 秒間強い振動をかけた。
- ② 界面活性剤処理：Triton X-100 を 1 滴加え、軽く攪拌した。
- ③ 振盪及び界面活性剤による処理：Triton X-100 を 1 滴加えた上でボルテックスミキサーを使用して 30 秒間強い振動をかけた。

実際に処理を行った後に撮影した顕微鏡画像を以下に示す。振盪処理のみでは原型を保ったままの細胞が多数残ったが、界面活性剤処理を施した場合は原型を保つ細胞は確認されなかった。これらの結果から、細胞膜の除去には Triton X-100 を用い、攪拌のために短時間の振盪を行うことが必要と判断した。

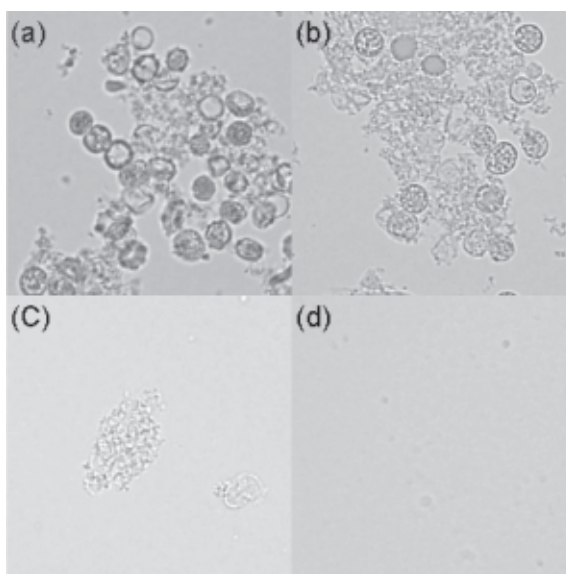


図 3. 各種処理後の血液顕微鏡画像（解像度 100 倍）  
(a)：無処理，(b)：振盪処理，(c)：界面活性剤処理，  
(d)：振盪及び界面活性剤による処理

また、上記方法により得られた血液サンプル（2 名分）の分析結果を表 3 に示す。a, b 法と c, d 法間には顕著な差が認められた。一方、a, b と、c, d 間の違いは小さい。このことは、HS-GC で血液中の CO を計測する場合、界面活性剤 (Triton X-100) の効果が極めて大きいことを示している。

表 3. 赤血球細胞膜の除去方法の違いによる分析結果の比較 (単位: ppm)

	a	b	c	d
喫煙者 (1名)	12.3	12.7	35.9	34.3
非喫煙者 (1名)	6.2	8.1	13.5	13.9

続いて、界面活性剤の濃度による影響を検討し、その結果を表 4 に示す。Triton の濃度依存的に CO 濃度が上昇することが明らかとなった。また、低濃度の場合には、その後の振盪時に泡立ちが顕著であった。これらの結果から本研究では Triton X-100 の濃度として、1% を選択した。

表 4. Triton の濃度が CO 濃度に及ぼす影響 (単位: ppm)

Triton 濃度	1 回目	2 回目	平均 ± SD
1%	12.0	13.0	12.5 ± 0.71
0.10%	11.2	11.5	11.35 ± 0.21
0.01%	10.8	10.2	10.5 ± 0.42

### 2-3-2 試料の pH の影響

既報特許資料により、フェリシアン化カリウムとヘモグロビン-酸化炭素 (Hb-CO) の反応は pH の影響を受け、弱アルカリ領域で最も効率がよくなることが報告されている<sup>8)</sup>。そこでフタル酸を加え pH を 4.01 にした緩衝液と、リン酸二水素ナトリウムを加え pH を 8.9 にした緩衝液を用いてその比較を行った。この緩衝液には 1% の Triton X-100 を混合させていることは同様である。

表 5. 緩衝液の pH の違いが CO 濃度に及ぼす影響 (単位: ppm)

試料番号	pH=4.01 の緩衝液	pH=8.9 の緩衝液
1	6.5	11.3
2	7.9	11.6
3	9.5	12.0
平均 (± SD)	7.96 (± 1.50)	11.63 (± 0.35)

### 2-3-4 実験方法に関するまとめ

以上の結果から、本研究では HS-GC 法において以下の手順で実試料の分析を行うこととした。

- 1) pH=8.9 のリン酸塩緩衝液を調製し、これにより Triton X-100 を 100 倍に希釈する。
- 2) 採血した血液から 50 $\mu$ L を試料として分取し、2mL のセプタム付きガラス容器へ移し、蓋をする。
- 3) 血液試料に Triton X-100 を含む緩衝液 1mL とフェリシアン化カリウム飽和溶液を 0.5mL、シリンジを用いてセプタム越しに加え、ボルテックスミキサーによって 10 秒間攪拌する。
- 4) ガラス容器ごと超音波洗浄機に入れ、20 分間攪拌処理する。

- 5) ガスタイトシリンジを用いて、セプタム越しにヘッドスペースガスを 1mL 採取し、TRIllyzer により CO 濃度を測定する。

## 2-4 HS-GC 法と CO-oximeter 法の比較

### 2-4-1 実験方法

健康な男子大学生を 4 名被験者（喫煙者 2 名 + 非喫煙者 2 名）として、安静時、運動中および運動後において、正肘静脈より採血し、HS-GC 法および CO-oximeter (Rapidpoint 500, Siemens) 法を用いて血中 CO 濃度および一酸化炭素ヘモグロビン飽和度 (%) を求めた。この CO-oximeter は、分光光度測定法を採用している。運動に関しては、自転車エルゴメータを用い、ランプ負荷法により 10 分間の運動を行ったが、運動終了時には毎分心拍数がおよそ 170 拍 / 分になるように負荷の勾配を調整した。採血の間隔は、ランプ負荷開始から 2 分間隔で行い、運動終了後も同様であった。HS-GC 法による試料の前処理、分析に関しては前述の通りとした。また CO-oximeter の取り扱いに関しては、操作マニュアル (Operator guide, Siemens) に従って実施した。

### 2-4-2 実験結果

実験結果を図 4 に示す。全体として、HS-GC 法による CO 濃度 (ppm) と、CO-oximetry による COHb (%) の間には有意の相関関係 ( $r = 0.954$ ) が認められた。しかしながら、個々の被験者については、HS-GC による CO 濃度 (ppm) は、運動中、運動後やや増大するか、あるいはあまり変化しない。一方、CO-oximeter による CO 飽和度 (%) は、運動後半、あるいは運動後に低下する傾向が認められた。そのため、4 名中 3 名の被験者では、両者の間に負の相関関係が認められた。

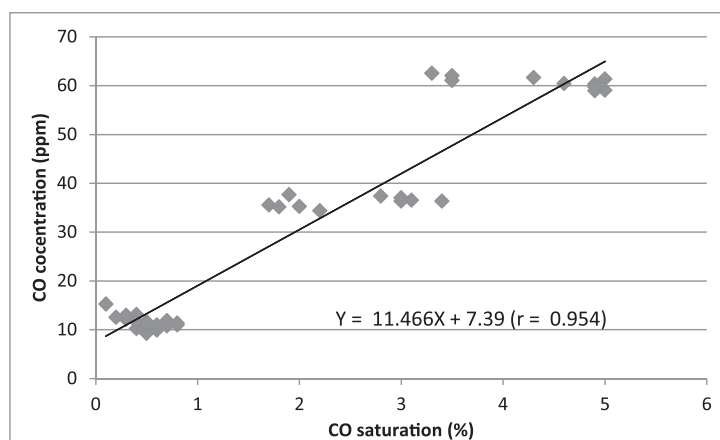


図 4. HS-GC 法と CO-oximetry による血中 CO 測定結果の比較



### 3. 考察

これまで、HS-GC法を用いた血中CO測定に関し、詳細な報告は行われていない<sup>9,10)</sup>。本研究では、主に界面活性剤（Triton X-100）利用による影響、さらには緩衝液の水素イオン濃度の影響を検討した。その結果、界面活性剤の利用により、血中CO濃度値の大幅な増大が認められた。一方、振盪による効果については、顕著な傾向は認められなかった。これより、界面活性剤の利用は、ヘモグロビンとCOの解離を促進する上で不可欠な処理であると考えられるが、その最適な濃度条件に関しては、本研究では特定できなかった。すなわちCO濃度はTriton X-100の混合割合に比例して増大した。1%以上の混合比がどのような効果を有するかは、今後の課題である。さらには、緩衝液の水素イオン濃度が、CO測定に及ぼす影響を検討し、酸性溶液（pH=4.01）に比べ、アルカリ性溶液（pH=8.9）ではCO濃度が高いことが明らかになった。しかしながら、これについても2種類の水素イオン濃度条件下での実験であり、広い水素イオン濃度下での検討が必要であろう。

HS-GC法とCO-oximetryによるCO濃度測定結果では、全体としては有意の相関関係が認められた。しかしながら、被験者個々のデータについては、必ずしも正の相関関係ではなかった。このような一見矛盾するような結果の原因については現時点では不明であり、各分析機器の測定精度も含め、今後さらに詳細な検討が必要と考えられる。

#### [謝辞]

本研究を進めるにあたり、多くの方々からご協力をいただいた。赤血球の顕微鏡写真では、本学体育保健センター佐久間邦弘准教授、またHS-GC法に関しては池田大祐、鈴木登氏（株式会社タイヨウ）、さらにCO-oximeterに関しては、村松重孝氏（シーメンスヘルスケア・ダイアグノスティクス）から貴重なご助言をいただいた。実験に協力いただいた被験者を含め、心からお礼を申し上げます。

#### 参考文献

- 1) Coburn RF, Blakemore WS, Forster RE: Endogenous carbon monoxide production in man. J Clin Invest, 42: 1172-1178, 1963
- 2) Coburn RF: The carbon monoxide body stores. Ann NY Acad Sci 174: 255-260, 1970
- 3) Wu L and Wang R: Carbon monoxide: endogenous production, physiological functions, and pharmacological applications. Pharmacol Rev 57: 585-630, 2115
- 4) Kim HP, Ryter SW, Choi AMK: CO as a cellular signaling molecule. Annu Rev Pharmacol Toxicol 46: 411-449, 2006
- 5) 安田好文：呼気微量ガス，身体運動と呼吸・循環機能，宮村実晴編，真興交易医書出版部，2012，pp. 126-134
- 6) Bilban M, Haschemi A, Wegiel B, Chin BY, Wagner O, Otterbein LE: Heme oxygenase and carbon monoxide



- initiate homeostatic signaling. *J Mol Med* 86: 267-279, 2008
- 7) Yasuda Y, Ito T, Miyamura M, Niwayama M: Effect of ramp bicycle exercise on exhaled carbon monoxide in humans. *J Physiol Sci* 61: 279-286, 2011
  - 8) 赤池孝章、植田秀雄：体液中的一酸化炭素測定方法，特開 2005-337813
  - 9) Zwart A, Buursma A, Oeseburg B, Zijlstra WG: Determination of hemoglobin derivatives with the IL 282 CO-Oximeter as compared with a manual spectrophotometric five-wavelength method. *Clin Chem* 27: 1903-1907, 1981
  - 10) Vreman HJ, Wong RJ, Kadotani T, Stevenson DK: Determination of carbon monoxide (CO) in rodent tissue: effect of heme administration and environmental CO exposure. *Anal Biochem* 341: 280-289, 2005

