平面型イオンセンサを用いた乳牛の血液中カルシウムイオンの現場における迅速な測定

On-site Quick Measurement of Calcium Ion in Blood of Dairy Cow with Flat Ion Sensor

内海 理伽
Rika UTSUMI

乳牛の血液中のカルシウムイオン(iCa)が低下する低カルシウム血症は，多くの周産期の乳牛が罹患しているといわれている一般的な疾患である。乳牛の健康状態を良好に保ち，牛乳の生産量を維持するためには，iCaの測定と迅速な処置が求められる。しかし，iCa濃度の精確な測定には厳密な嫌気的環境，温度管理が必要であるため，現場で迅速に測定することはできない。本稿では，カスタマイズしたLAQUAtwinカルシウムイオンメータを用いることで，現場で迅速に血液中のiCa濃度を測定できることを紹介する。

Hypocalcemia due to decreases of calcium ions (iCa) in blood of dairy cows is a common disease that affecting many perinatal dairy cows. The iCa measurement and quick treatment are strongly required in order to keep dairy cow healthy and maintain milk production. However, the iCa concentration cannot be measured quickly on site because accurate measurement of iCa requires strict anaerobic environment and temperature control. In this paper, we introduce that the iCa concentration in blood can be measured quickly on site by the use of the LAQUAtwin calcium ion meter.

キーワード
低カルシウム血症　現場測定　カルシウムイオンセンサ　LAQUAtwin
Hypocalcemia　On site measurement　Calcium ion sensor　LAQUAtwin

はじめに

周産期の乳牛では，血液中のカルシウムイオン(iCa)濃度が生理的に低下しやすくなる[1]。iCa濃度が著しく低下した場合，意識低下や産後起立不能といった症状を呈し[1]，その他の周産期疾病の原因にもなり得る[2, 3]。このような一連の症状は低カルシウム血症と呼ばれ，乳牛の主要疾患の一つである[1]。この中でも諸症状を呈しない無症候性の低カルシウム血症は，周産期の乳牛の約50%が罹患している一般的な疾患であるといわれており，牛乳の生産量を維持するための乳牛の健康管理における課題の1つである[4]。

乳牛の健康状態を把握するためには，血液中に含まれている総カルシウム(tCa)の中でも，生理活性を有するiCa濃度の分析が必要である[4, 5]。
tCa濃度の分析には，検体に試薬を添加し反応させ，光学系の検出器で測定する方法などが用いられており，比較的安価かつ簡便に，安定して測定することができる[4]。しかし，光学系を必要とするtCa濃度の分析装置は大型であり屋外で使用することはできず，さらに検体の前処理が必要である場合が多く，迅速に結果を得ることはできない。また，tCa濃度の測定結果からiCa濃度の変動を予測することは難しく，また水分補給状態や乳牛の生理的変化によるアルブミン濃度の変動の影響を受けてしまう[4]。したがって，tCa濃度を現場で迅速に測定することはできず，tCa濃度からiCa濃度を推測し，乳牛の健康状態を適切に把握することもできない。

一方で，iCa濃度の測定においては検体の前処理は不要であり，全血のまま測定することができる。しかし，iCa濃度は検体のpH変動に容易に影響を受け濃度が変動してしまう。これを防ぎ，精確にiCa濃度を測定するためには厳密な嫌気的条件と温度調整が必要である。これらを実現するため，iCa濃度の測定系には一般的に流通型セルが用いられるが，装置は大型で複雑な構造になり，測定コストも高くなってしまう[7]。そのため，現場で迅速にiCa濃度を測定し，乳牛に適切な処置を行うことは難しい。

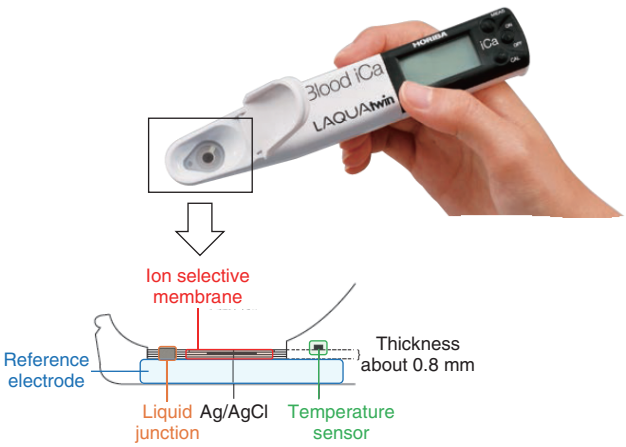

Figure 1　Schematic diagram of the ion flat sensor of LAQUAtwin

LAQUAtwinシリーズは，イオン選択性電極法を採用したコンパクト水質計である。**Figure 1**に，LAQUAtwinシリーズのイオンセンサの模式図を示した。測定部には薄さ約0.8 mmの平面シートを採用しており，比較電極の液絡部と応答膜が同一平面上に存在している。この平面センサにより，測定に必要なサンプル量が0.3 mLという微量測定が可能となる。また，測定部と表示部が一体となっており，片手で持ち運べるサイズであるため，現場で簡易にイオン濃度を測定することができる。

本稿では，既存の測定方法では現場で迅速にiCa濃度を測定できないという課題を，LAQUAtwinカルシウムイオンメータを用いることで解決できることを紹介する。

血液中のカルシウムの存在形態

tCaは血液中で，主に3つの形態で存在している（**Figure 2**）。tCaのうち，50%がアルブミンなどのタンパク質と，5%がクエン酸やリン酸といった有機酸と結合しており，残りの45%がイオン化した状態（iCa）で存在している[5]。iCaは神経筋興奮，血液凝固，酵素反応，ホルモンおよび神経伝達物質の放出反応などに寄与しており，生理活性を有するのはiCaのみである[5, 6, 8]。これが，乳牛の健康状態を把握するために，iCa濃度の分析が必要となる理由である[4]。研究

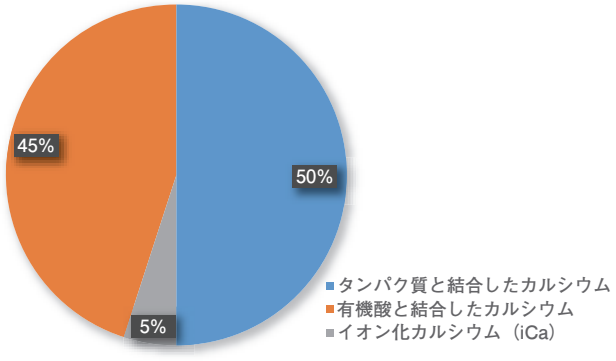

Figure 2　Ratio of forms of calcium in blood

例により多少の違いがあるが，乳牛の血液中のiCa濃度は1.05～1.30 mmol dm^{-3}が正常値であるとされており，0.9 mmol dm^{-3}以下で低カルシウム血症と診断される[5]。

pH変化に伴うiCa濃度の変化

生体の血液中のpHは7.3～7.4に厳密に保たれている[9]。血液中のpHは炭酸水素イオン（重炭酸イオン）の平衡状態によって変動し（**Equation 1**），この重炭酸イオン緩衝系は，生体の恒常性を維持する緩衝系の中で，最も重要な生体システムである[10]。

$$H_2O + CO_2 \Leftrightarrow H^+ + HCO_3^- \quad \cdots\cdots (1)$$

しかし，採血後の検体においては，検体の処理方法や周囲温度，好気的条件下に置かれる時間など様々な要素の影響を受け，容易にpHは変化してしまう[7]。tCaの50%がアルブミンなどのタンパク質と結合しているが，この結合状態は血液のpHによって変動する。血液中のiCaおよびpH，アルブミンの平衡状態の模式図を**Figure 3**に示した。例えば，検体の温度が上昇したとき，二酸化炭素の溶解度は低下するため**Equation 1**の反応は左に進み，H^+が減少するためpHは上昇する。このH^+の減少は，アルブミンと結合しているH^+が解離することで平衡状態が保たれるが，H^+を供給したアルブミンはiCaと結合し，安定状態へと移行する。よって，pHが上昇すると結果としてiCa濃度が低下してしまうのである。上述の通り検体のpHは様々な要因によって変化してしまうため，pHの変化すなわちiCa濃度の変動は容易に起こってしまうのである。

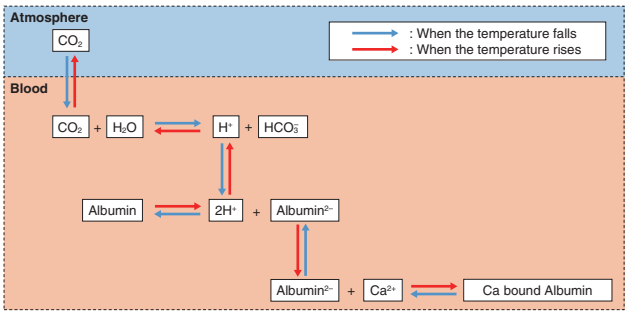

Figure 3　Schematic diagram of the equilibrium state of iCa, pH and albumin in blood with temperature change

平面センサを用いたiCa測定の課題

現在，iCa濃度を測定するためには，検体のpHの変動を抑えるため，流通型セルを用いた測定機器を用いることが一般的である。これらの装置は校正，測定とも嫌気的環境下でかつ一定の温度で実施することが可能であり，測定中の検体の変質を最低限に抑えることができる。これによりiCa濃度を高精度で測定することが可能となり，乳牛に対

してだけでなく，ヒトの臨床現場でも広く用いられている。一方で，高精度の測定を実現するために装置は複雑で取り扱いが難しくなるため，屋外での測定が困難であり，かつ1測定あたりのコストが高額となる。iCa濃度を測定し，それぞれの乳牛への処置を決定する現場での使用には不向きな装置であるといえる。

これに対し，開放系である平面センサを用いると，微量の検体で測定が可能であるため装置を小型化でき，場所を選ばず使用することが可能である。この特徴から，現場で迅速に乳牛の血液中のiCa濃度を測定するには最適の装置であるといえる。しかしながら，この方法では，検体を密閉できないうえに検体が少量であるため，大気中と検体中の二酸化炭素の平衡反応や，外気温の影響による温度変化が必ず起こってしまう。その結果，検体のpHが非常に変化しやすい状況下での測定となる。つまり，開放系の平面センサでは高精度のiCa測定は難しく，低カルシウム血症かどうかを診断することはできない。

iCa濃度は乳牛の健康状態を左右し，最終的には牛乳の生産量に影響を与える。そのため酪農現場では，乳牛の健康状態を判断し，迅速に処置を行うことが強く求められる。既存の分析方法を用いることで高精度のiCa濃度測定は可能であるが，現場で迅速に測定することはできない。そのため，高精度でiCa濃度を測定できない平面センサであっても，現場で迅速にiCa濃度のスクリーニングを行うことができれば，精密検査が必要な乳牛を発見することができ，応急処置や治療にかかる時間とコストを削減することができる。以下に，平面センサを用いて乳牛の血液中のiCa濃度を測定するためにカスタマイズした点と，評価内容を紹介する。

iCa測定専用装置にするためのカスタマイズ

イオン選択性膜を用いたイオンの測定では，イオン選択性膜と比較電極をサンプル中で接触させたときに発生する電圧を測定することでイオン活量を求めている。LAQUAtwinシリーズは多様な水溶液を測定対象としているため，センサの内部液中のiCa濃度を50 mmol dm^{-3}としていた。本稿では，測定の際の検体の温度影響を低減するため，イオン選択性電極の等温交点，すなわちセンサの内部液中のiCa濃度を1 mmol dm^{-3}に調整した。この1 mmol dm^{-3}という濃度は，乳牛の血液中のiCa濃度の平均値から決定した。

検体を測定する前には，必ずイオンセンサを標準液で校正する必要がある。イオンセンサの校正には，測定対象となるイオンが含まれる溶液を用いるのが一般的である。しかし，血液中にはiCa以外にもナトリウムイオンやカリウムイオンが含まれているため，干渉影響を受ける。その影響を低減するため，血液の電解質組成と類似した溶液を用いて校正を行うことにした。

さらに，血液を測定する場合，血液中の固体成分の付着などによるセンサ表面の汚れが懸念される。平面センサは流通型セルと比べ，検体と触れるセンサの面積が広い。そのため表面に汚れが付着しやすく，センサ感度の低下が引き起こされる。タンパク質分解酵素を添加した専用の洗浄液で表面を洗い流すことで，センサ感度の低下を防いだ。

平面センサや標準液，洗浄液をカスタマイズしたLAQUAtwinで乳牛の血液中のiCa濃度を測定し，スクリーニングが可能であることを証明するためには，以下の3点を確認，決定する必要がある。

1. iCa濃度のスクリーニングをするにあたり，精確さが誤診断を起こさない許容範囲内であること
2. 低カルシウム血症に罹患した乳牛のiCa濃度が，健康な乳牛のiCa濃度より低い値を示すこと
3. 検体の温度変化によるiCa濃度の変化を考慮した，最適な測定温度条件を決定すること

NIST標準物質の測定による精確さの確認

まず，精確さが誤診断を起こさない許容範囲内であるか確認した。NISTの標準物質（STANDARD REFERENCE MATERIAL 956d Electrolytes in Frozen Human Serum）を測定し，値付けされたiCa濃度とLAQUAtwinの測定値を比較した。標準物質のiCa濃度は1.17 mmol dm^{-3}，1.47 mmol dm^{-3}，1.77 mmol dm^{-3}の3種類である。測定結果を**Figure 4**に示した。図中の○はLAQUAtwinの測定値を示しており，標準物質のiCa濃度との誤差の範囲を点線

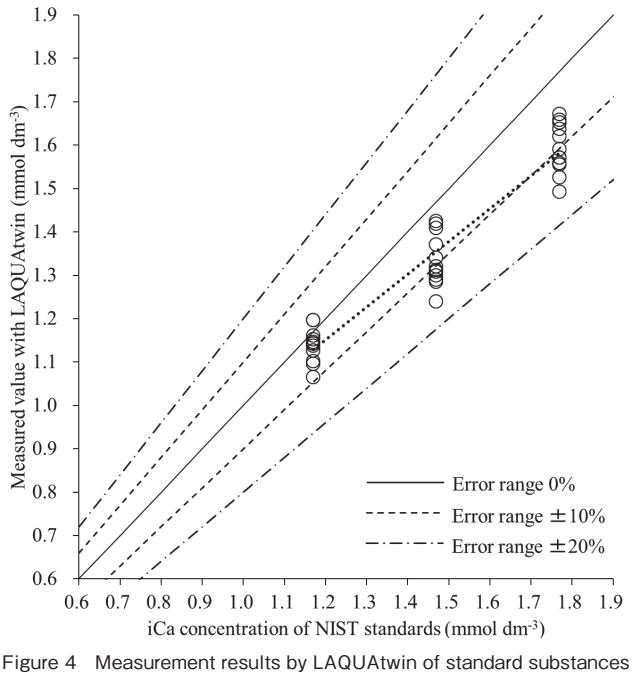

Figure 4　Measurement results by LAQUAtwin of standard substances of NIST

で示した。3種類の全てのiCa濃度の標準物質において，LAQUAtwinの測定値は標準物質のiCa濃度に対して±20%の範囲内であった。標準物質のiCa濃度は流通型セルを用いた測定機器で決定されている。一方でLAQUAtwinは開放系の平面センサで測定を行っている。LAQUAtwinの測定値と標準物質のiCa濃度との差は，この測定原理の違いにより発生する，測定中のサンプルのpH変化が原因であると考えられた。乳牛の血液中のiCa濃度の正常値は約1.2 mmol dm^{-3}程度であり，0.9 mmol dm^{-3}以下になると低カルシウム血症が疑われる。±20%の誤差を有していても誤診断に繋がる可能性は低く，スクリーニング用のチェッカとしては問題ない精確さを有していると考えられる。

低カルシウム血症罹患乳牛の検体測定

実際の測定対象である低カルシウム血症に罹患した乳牛の血液を測定し，iCa濃度変化を示すことができ，スクリーニング用のチェッカとして運用が可能であるか確認を行った。iCa濃度の基準には，血液ガス測定装置ABL 800 FLEX（Radiometer Medical ApS社製，以下ABL）に搭載されているイオン電極で測定した値を用いた。このABLのイオン電極は流通型セルを用い，37℃で校正，測定を行っている。乳牛の血液は尾部から採血し，抗凝固剤としてヘパリンリチウムを添加した。この血液検体をLAQUAtwinとABLの2装置で測定した結果を**Figure 5**に示した。図中では，LAQUAtwinの2個のセンサで3回ずつ測定した平均値を○で示しており，最大値と最小値をエラーバーで示した。ABLの測定値は△で示した。この乳牛は，出産前には1.25 mmol dm^{-3}であったiCa濃度が，出産直後に0.94 mmol dm^{-3}にまで低下した。その結果，低カルシウム血症の症状を呈し，それに起因する疾病にも罹患した。その後，手術，治療を行い，iCa濃度は1.18 mmol dm^{-3}まで回復した。LAQUAtwinの測定値は，ABLの測定値より平均で0.10 mmol dm^{-3}低い値であった。上述の通り，平面センサであるLAQUAtwinとABLでは測定機構や測定温度が異なっている。平面センサで測定を行う場合は，測定中にサンプル中の二酸化炭素濃度が減少してpHが高くなり，その結果iCa濃度が低下する。LAQUAtwinとABLとの差はこの変化が原因と考えられた。その一方で，LAQUAtwinの測定結果は乳牛の健康状態によるiCa濃度の変化を示すことができていた。従来のiCa濃度の分析では，血液を採取した後に装置が設置してある部屋まで戻り，検体の前処理を行った上での測定が必要であった。LAQUAtwinを用いることにより，現場で簡単にiCa濃度をチェックすることができる。診断には用いることができないが，低カルシウム血症のおそれがある乳牛を見つけ出し，精密検査に繋げるためのスクリーニング用チェッカとしては，十分に有用であると判断できた。

最適な測定温度条件の決定

温度変化によるiCa濃度の変化を考慮し，測定する上での最適条件を決定するため，検体の温度を任意に調整して測定を行った。ウォーターバスを用いて任意の温度に調整した検体を測定した。各検体温度における測定結果を**Figure 6**に示した。図中の縦軸はLAQUAtwinの測定値からABLの測定値を引いた2装置の測定値の差を示している。エラーバーは最大値と最小値を示した。検体の温度が15℃以下の場合，LAQUAtwinの測定値はABLの測定値よりも約0.3～0.4 mmol dm^{-3}高かった。これは，温度が低下したことにより二酸化炭素の溶解度が上昇してpHが低下し，その結果iCa濃度が高くなったと考えられた。反対に，検体の温度が30℃以上の場合，LAQUAtwinの測定値はABLの測定値よりも約0.1 mmol dm^{-3}低い値であった。先程とは逆に，温度が上昇することにより二酸化炭素の溶解度が低下

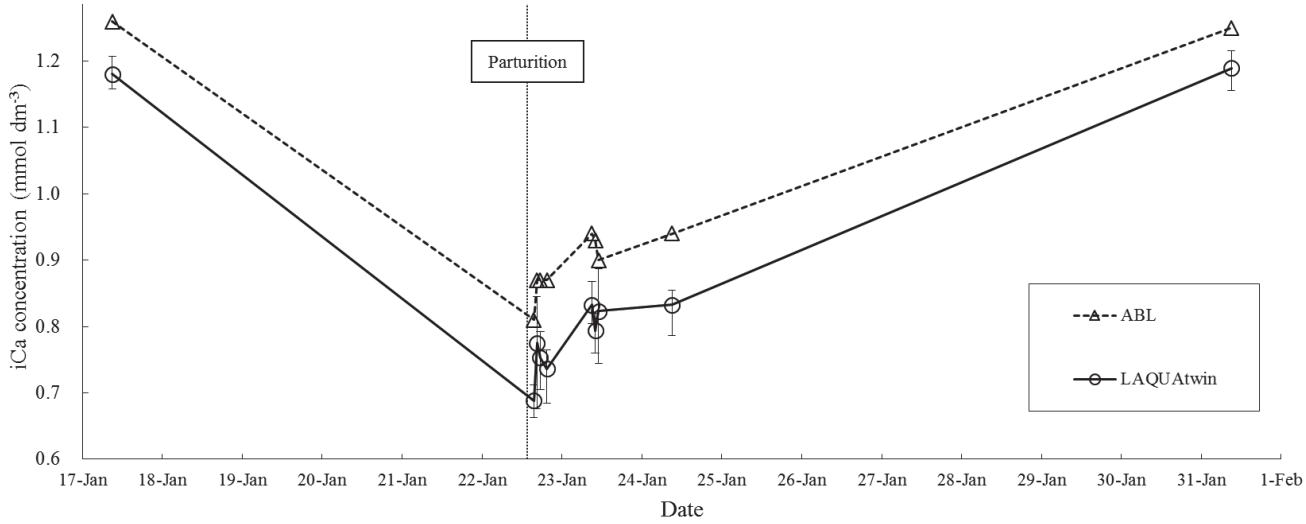

Figure 5　Measurement results by LAQUAtwin and ABL of blood samples of dairy cow suffering from hypocalcemia

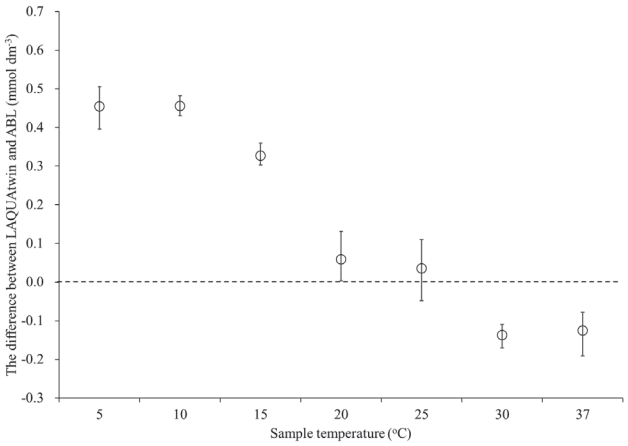

Figure 6　The difference between measured value by LAQUAtwin and ABL of blood samples with each temperature

してpHが上昇し，iCa濃度が低くなったと考えられた。検体の温度が20～25℃の場合，iCa濃度の基準としているABLとの差は0.1 mmol dm^{-3}以下であった。以上より，検体の温度変化はpH変化を引き起こし，iCa濃度が変化することが確認できた。また，LAQUAtwinを用いた測定においては，検体の温度を20～25℃に調整することで，流通型セルを用いて測定を行うABLと高い相関が得られることがわかった。

おわりに

現場で迅速にiCa濃度を測定できないという課題が，平面センサを用いることで解決できることが明らかとなった。開放系である平面センサで血液中のiCa濃度を測定するという方法は，これまでにない新しい発想である。また，血液中のナトリウムイオンやカリウムイオンの測定は乳牛の健康管理上非常に重要であり，iCa以外にも更なるニーズは数多く存在している。今後も，現場で簡単に，迅速に測定することができるLAQUAtwinの利点を生かしたアプリケーション開発を展開し，酪農業界だけでなく，あらゆる業界における多様なニーズに貢献していく。

謝辞

乳牛の血液の測定にあたり，サンプルを提供下さいました京都府農林水産技術センター畜産センターの上村浩一元所長，山岡俊幸元部長，岩崎方子元技師に深く感謝申し上げます。また，本製品の評価にあたり，多大なご協力と助言を賜りましたCornell UniversityのDr. Rafael C. Nevesに心より感謝申し上げます。

＊本内容は特段の記載がない限り、本誌発行年時点での自社調査に基づいて記載しています。

参考文献

[1] 山岸則夫. 乳熱の病態. 日本獣医師会雑誌. 2012, 65, p. 857-863
[2] 高橋史ほか. 分娩直後食欲不振の改善を目的としたグルコン酸カルシウム輸液剤投与方法の検討. 獣医輸液研究会会誌. 2007, 7(1), p. 6-11
[3] 平井洋次. 低カルシウム血症の原因と対策. 日本獣医師会雑誌. 2005, 58, p. 12-19
[4] R. C. Naves. et al. Method comparison and validation of a prototype device for measurement of ionized calcium concentrations cow-side against a point-of-care instrument and a benchtop blood-gas analyzer reference method. J. Dairy Sci. 2017, 101, p. 1334-1343
[5] 加藤敏英. カルシウム輸液剤の投与法を再考する. 獣医輸液研究会会誌. 2004, 4(1), p. 1-4
[6] 桧山尚子. 乳牛におけるイオン化カルシウムの動態. 広島県獣医学会雑誌. 2006, 21, p. 4-7
[7] 岡本輝夫ほか. 好気的条件下におけるpH補正血清Ca^{++}測定についての検討. 日本臨床検査自動化学会会誌. 1983, 8(3), p. 292-297
[8] 鈴木一由. 乳熱の輸液. Fluid Therapy in Large Animal Practice. 2011, 11(1), p. 14-16
[9] 柴垣昌功, 塚本玲三. やさしい 電解質 血液ガス 酸塩基. 中外医学社. 1985
[10] 楠木啓史ほか. 生化学分析装置における血清重炭酸塩(総CO_2)の測定. 医学検査. 2018, 67(1), p. 23-28

内海 理伽
Rika UTSUMI
株式会社 堀場アドバンスドテクノ
開発本部 新製品開発１部
New Product Development Department 1
Research & Development Division
HORIBA Advanced Techno, Co., Ltd.