

●東ソー自動グリコヘモグロビン分析計 HLC-723G11[®]の開発

南陽 バイオサイエンス事業部 開発部 セパレーショングループ

東研 バイオサイエンス事業部 開発部 システムグループ
東ソー・ハイテック(株) 福川工場 生産技術課

中澤 裕二
村上 卓司
松野 隆則
河村 真成

1. はじめに

東ソー自動グリコヘモグロビン分析計 HLC-723[®] シリーズは、イオン交換高速液体クロマトグラフィーを用いて糖尿病の臨床検査項目である血液中のグリコヘモグロビン (HbA1c) を測定する専用装置である。同シリーズは 1983 年の発売開始以降、ユーザーのニーズに応えたモデルチェンジを繰り返すとともに、国際標準化への対応のための各種認証を取得し、国内外の市場に浸透している。

糖尿病患者は全世界において年々増加の一途を辿っており、それに伴い HbA1c の検査数もまた増加傾向にある。特に国内では 2008 年の特定健診・特定保健指導において、血糖検査項目として血糖値と HbA1c が採用され、さらに、2010 年 7 月より施行された糖尿病診断基準では、HbA1c は血糖値と並ぶ診断基準として血糖値との同日測定が推奨されるようになった

ことから、HbA1c をより迅速かつ高精度に測定するニーズがますます高まっている。

今回我々はこの市場ニーズに応えるために、1 検体当たり 30 秒の高速測定を実現し、処理能力を毎時 120 検体まで高めた東ソー自動グリコヘモグロビン分析計 HLC-723G11 (以下、G11) を開発・商品化した。本報告では、この G11 の主な仕様および基本性能を報告する。

2. 装置の外観、仕様

装置の外観を図 1 に、主な仕様を表 1 に示す。

3. 既存モデルからの改良点

[1] 分析時間の短縮

HLC-723 シリーズでは、非多孔性陽イオン交換カ

表 1 HLC-723G11 の主な仕様

測定項目	HbA1c、HbF
測定対象検体	全血、希釈溶血液
測定原理	イオン交換高速液体クロマトグラフィー
処理時間	30 秒/検体
検出方式	2 波長吸光 (検出波長 415nm / 500nm)
検体使用量	全血 3 μ L、希釈溶血液 150 μ L
最大検体積載数	90、100、290 検体
注入方式	サンプルループ (5.0 μ L)
希釈方式	希釈槽にて溶血・洗浄液で自動希釈
検体容器形状	外径 12~15× 全長 75mm または 100mm 真空採血管 汎用サンプルカップ (アダプタ使用)
検体 ID 認識	最大 20 桁のバーコード
表示装置	320×240 ドット カラー液晶ディスプレイ
入力装置	圧力感知式タッチパネル/シートキー
出力装置	サーマルプリンター
記憶装置	USB メモリー
送液部	シングルプランジャーポンプ
カラム温調	電子冷却 (25℃)



図1 HLC-723G11 装置外観

ラムを用いて血中のヘモグロビン類をA1a、A1b、F、L-A1c+、s-A1c (HbA1c)、A0の6分画に分離し、精度の高いHbA1c測定を行うことを特徴としている。

前モデルであるG9では分析時間は1検体あたり45秒であった。G11ではさらに分析時間を短縮するため、カラム充填剤の最適化を行うとともに、溶離液の送液速度をG9の1.9 mL/minから2.2 mL/minへ高速化した。また、カラム長さをG9の20 mmから8 mmへと半分以下に短縮した片エンド構造のカラムを新規に設計した。これらの改良により、1検体あたりの分析時間を30秒まで短縮した。図2に従来型カラム(TSKgel® G9 HSi)と新規カラム(TSKgel G11)の外観を示す。

図3にG11の測定結果レポートを示す。A1a、A1b、F、L-A1c+、s-A1c、A0の6成分を30秒で良好に分離できていることがわかる。

[2] カラム耐久性の向上

高速液体クロマトグラフィー法において高流速化はカラムの寿命を短くするため、耐久性の高いカラムの開発も課題の1つであった。種々の検討の結果、カラ



図2 TSKgel G9HSi(上)とTSKgel G11(下)のカラム外観

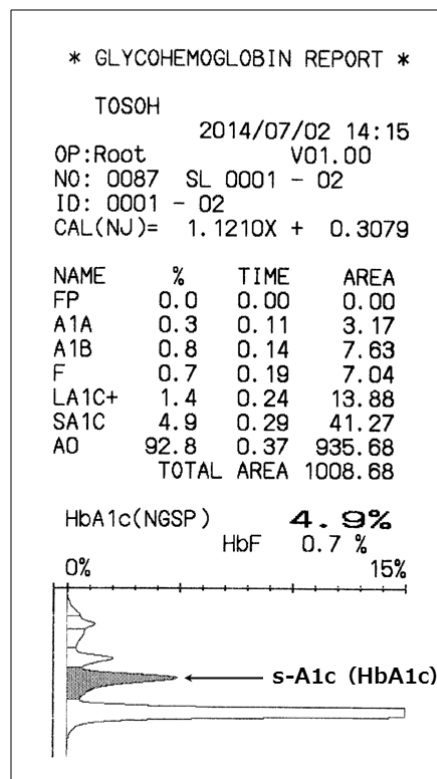


図3 HLC-723G11の測定結果レポート

ムの入口側フィルターの形状を見直し、フィルター装着時に充填剤を加圧封止できるような形状に改良することで、カラムの耐久性が向上することが分かった。また、フィルター部での拡散による分離性能の低下を抑えるため、フィルター厚を可能な限り薄くした。これにより高分離を維持しつつ、3,000テストの測定が可能なカラムの開発に成功した。図4に入口側のフィルター形状改良前のカラムと改良後のカラムで耐久性を比較した一例を示す。前者は1,500回測定を越える

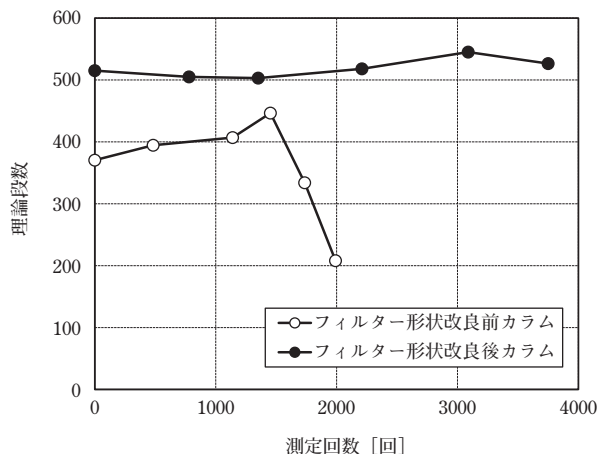


図4 入口側フィルター形状改良前後のカラム耐久性比較例

と理論段数が低下しているが、後者は3,000回以上測定後も使用開始時の理論段数を維持していることが分かる。

[3] 装置駆動部の高速化

HLC-723シリーズはキャップピアッシングによる採血管から血液のサンプリング、サンプリングした血液の溶血・希釈そして測定までを全自動で行う。連続測定を行うためには測定前の検体移動・サンプリング・溶血希釈・検体注入・系内洗浄を前検体の測定中に完了する必要がある。G11では30秒以内にこれらの処理を完了させなければならないが、そのためにはサンプルローダーを含めた各動作の高速化が課題となった。

検体移動については、高速下でも確実に検体の位置決めが可能となるようにサンプルローダーの検体保持部を全面改良した。サンプリング以降の高速化については、まずニードルとバルブの口径を拡大して通液抵抗を低減するとともに、シリンジを含めた各駆動部に直動ベアリングを採用して動作抵抗を低減させた。その上でモーターにクリーンダンパーを追加して高速回転時の振動を抑制、トルクアップすることで高速動作を可能とした。また、これまで単独に実施していた洗浄液吸引動作を検体へのニードル降下時に同時に実施するなど、動作シーケンスの効率化を図った。

[4] その他の新機能

G11では既存モデルにはなかった機能として、ユーザー認証機能やカラム・試薬の使用期限を管理する機能等を追加した。ユーザー認証機能は、あらかじめユーザー登録をしておき、そのユーザーでログオンすることで、測定結果ごとの測定実施者名の記録やユーザーの権限に応じた操作が可能となる機能である。カラム・試薬の使用期限管理機能では、カラム・試薬の交換時にカラムや試薬のバーコードを読み込むことでロット番号とともに使用期限が装置に記録され、期限を過ぎるとアラームや画面に警告表示が出て誤使用を防ぐことが可能となった(図5)。また、ハンディバーコードスキャナーによるキャリブレーション情報の入力を可能にするなど、ユーザーインターフェースの向上も行った。

4. 基本性能評価結果

[1] 再現性試験

同時再現性の試験結果を表2に、日差再現性の試験

液試薬・カラム情報			
P.01	Root	SP	2014/07/10 12:07
試薬名	ロット	開始日	使用期限
カラム	WA0001A	2014/07/10	2016/04/30
1液	A1-101W	2014/07/10	*2014/10/08
2液	A1-201W	2014/07/10	*2014/10/08
3液	1-301W	2014/07/10	*2014/10/08
洗浄液	HW-01W	2014/07/10	*2014/10/08

図5 液試薬・カラム情報の管理画面

結果を表3に示す。HbA1c(%)が異なる3種類の試料を用いて試験をした結果、同時および日差再現性において、すべての試料で変動係数CVは1.0%以下の良好な再現性を示した。

[2] 相関性試験

HbA1c(%)に関して、既存モデルであるG8およびG9との相関性試験結果を図6に示す。試験では実検体(109検体)を測定した。G8との相関を示す回帰式は $Y = 1.02X - 0.16$ 、相関係数は1.00、G9との相関を示す回帰式は $Y = 1.01X - 0.03$ 、相関係数は1.00であり、いずれも良好な相関性を示した。

[3] 修飾ヘモグロビンの影響

健常人血に所定量のグルコース、アセトアルデヒド、シアン酸ナトリウム、アセチルサリチル酸をそれぞれ添加後、37℃で1時間インキュベートして各添加物由来の修飾ヘモグロビンを増加させたサンプルを調製し

表2 測定値の同時再現性試験結果 (n=20)

	低濃度域	中濃度域	高濃度域
平均値	4.99	7.33	9.89
SD	0.03	0.05	0.03
CV [%]	0.63	0.66	0.32

表3 測定値の日差再現性試験結果 (n=20)

	低濃度域	中濃度域	高濃度域
平均値	5.01	7.32	9.89
SD	0.03	0.05	0.03
CV [%]	0.61	0.56	0.23

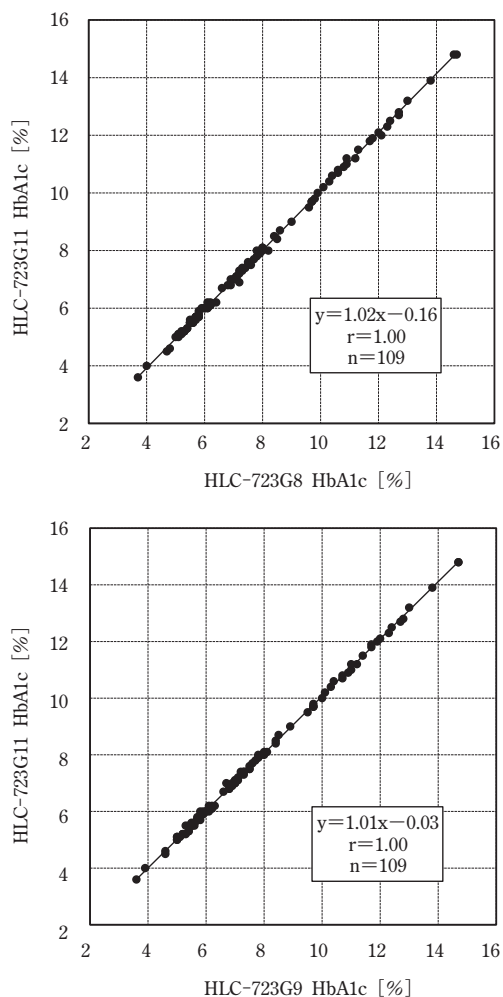


図6 G11と既存モデル（G8、G9）とのHbA1c値の相関性

た。調製後、各サンプルを測定し、修飾ヘモグロビンのHbA1c値への影響を調べた。結果を図6に示す。

(1) 不安定型グリコヘモグロビン（L-A1c）の影響

グルコース添加量の増加と共にL-A1c量が増加するが、添加量1000 mg/dLまではHbA1c値はほとんど変化せず、影響がないことを確認した。

(2) アルデヒド化ヘモグロビンの影響

アセトアルデヒドを添加した試料ではアルデヒド化ヘモグロビンが生成されるが、これはL-A1c+分画に溶出するため、アセトアルデヒド添加量の増加とともにL-A1c値が増加する。しかし、添加量25 mg/dLまではHbA1c値はほとんど変化せず影響がないことを確認した。

(3) カルバミル化ヘモグロビンの影響

シアン酸ナトリウムを添加した試料ではカルバミル化ヘモグロビンが生成されるが、これもL-A1c+分画に溶出するため、シアン酸ナトリウム添加量の増加とともにL-A1c値が増加する。しかし、添加量25 mg/dLまではHbA1c値はほとんど変化せず、影響がないことを確認した。

[4] 干渉物質の影響

干渉物質として、遊離型ビリルビン、包括型ビリルビン、乳び、アスコルビン酸を添加した健常人血を測定し、HbA1c値への影響を調べた。その結果を図7に示す。遊離型ビリルビン、包括型ビリルビンは20

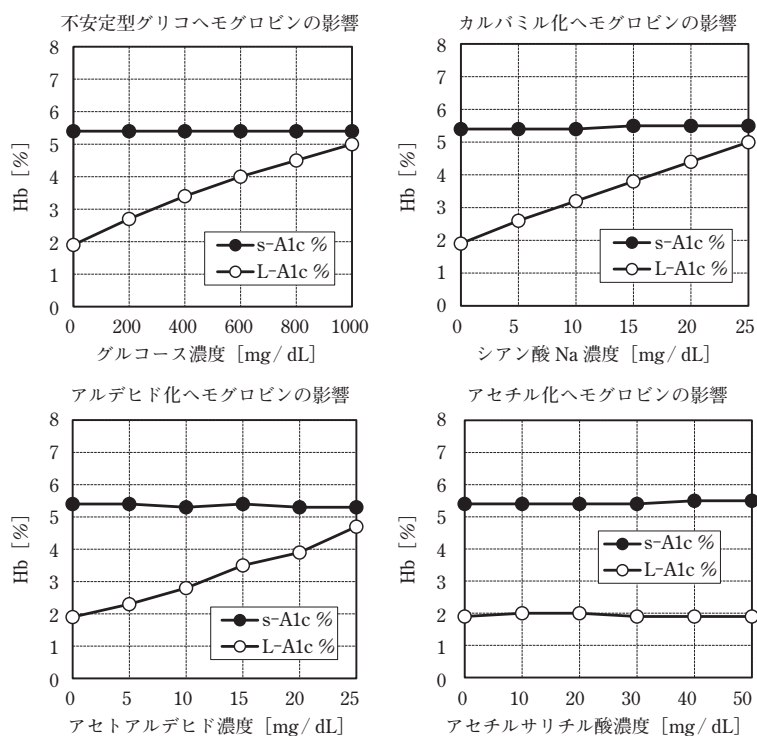


図7 装飾ヘモグロビンがHbA1c値に及ぼす影響

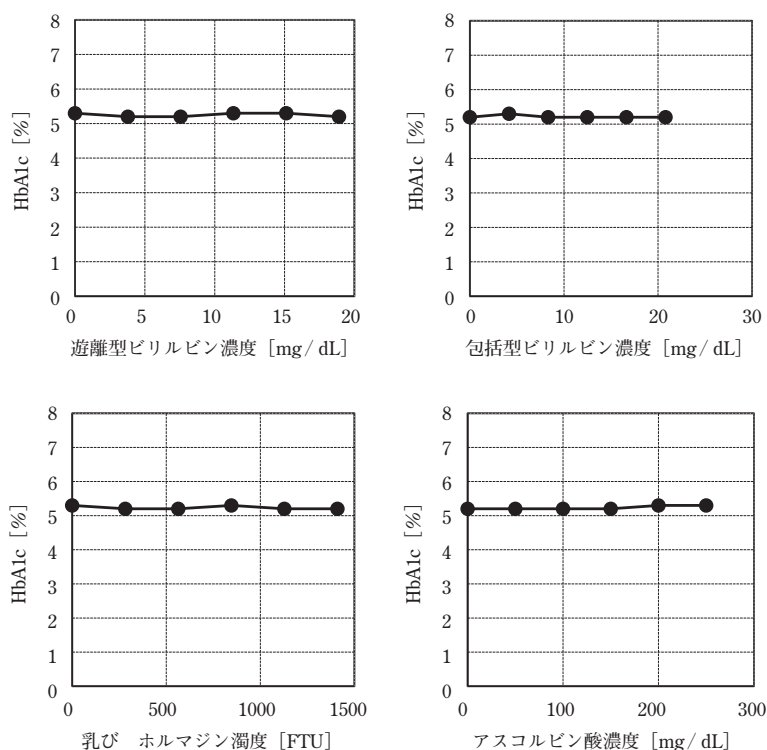


図8 干渉物質がHbA1c値に及ぼす影響

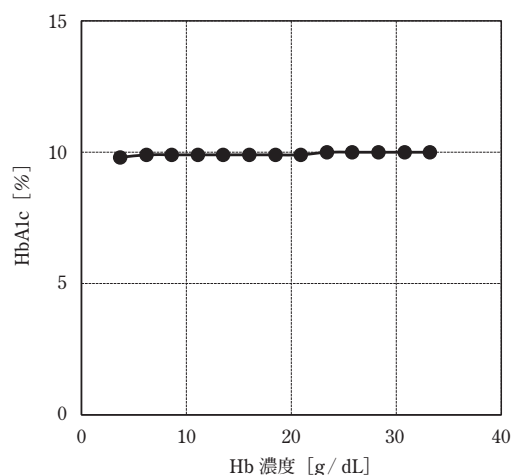


図9 総ヘモグロビン量がHbA1c値に及ぼす影響

mg/dLまで、乳びは1400ホルマジン濁度まで、アスコルビン酸は250 mg/dLまで添加したがHbA1c値はほとんど変化せず、影響がないことを確認した。

[5] ヘモグロビン負荷量の影響

自動グリコヘモグロビン分析計では、ヘモグロビンが可視光を吸収することを応用してカラム分離後の検出、定量を行っている。吸光度に基づいた定量分析においては測定する試料の負荷量（総ヘモグロビン量）は一定であることが望ましい。しかし、血中のヘモグロビン濃度は個人差が大きく、また血液は時間経過に

よる自然沈降で血漿と血球に分かれて濃度差を生じるため負荷量を一定とすることは難しい。したがって、自動グリコヘモグロビン分析計では高感度（高S/N比）かつダイナミックレンジの広い光度計が必要となる。

G11では検出器セルの構造を見直し、セル光路長を従来モデルよりも短くすることで、幅広いダイナミックレンジの光度計を作製した。また、電気回路の抵抗を最適化しベースラインノイズを低減することによってS/N比を向上させた。これらの結果、図9に示すように負荷量の影響を受けずに一定のHbA1c値が得られることに成功した。

5. まとめ

自動グリコヘモグロビン分析計 HLC-723G11は、1検体あたりの測定時間が30秒、毎時120検体の処理が可能であり、HbA1c値の同時再現性および日差再現性はCV1.0%以下と、高速かつ高精度なHbA1c測定が可能な装置である。また、前モデルのG8、G9とも高い相関性を保持しており、修飾ヘモグロビンや総ヘモグロビン量の影響を受けず、正確なHbA1c値が得られる。したがって、高い信頼性と多検体処理が必要な検査室において幅広く利用されるものと期待される。

6. 開発担当者

HLC-723G11の開発は以下の9名で実施した。

村上卓司（開発責任者）、荻野慎士、中澤裕二（以上、開発部セパレーショングループ）、印藤大昭（セパレーションメディア製造部分離剤課）、松野隆則（開発部システムグループ）、田丸彰悟、河村真成、小田純一、谷川秀幸（以上、東ソー・ハイテック(株)福川工場生産技術課）。

HLC-723[®]、TSKgel[®]は日本及びその他の国における東ソー株式会社の登録商標です。

HLC-723G11[®]、G11[®]は日本における東ソー株式会社の登録商標です。