

●東ソー自動グリコヘモグロビン分析計 HLC-723G11 バリエーションモード/サラセミアモードの開発

南陽 バイオサイエンス事業部 第二開発部 臨床液クログループ

荻野 慎士

東研 バイオサイエンス事業部 第二開発部 遺伝子グループ
東ソー・ハイテック(株) 福川工場 技術課 技術管理グループ

村上 卓司

東田 悟

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血液中のグリコヘモグロビン (HbA1c) を測定する装置である。HbA1c はヘモグロビンと糖 (グルコース) が不可逆的に結合したもので、過去 1~2 ヶ月の血糖値の平均をあらわす指標とされ糖尿病の診断・治療で重要な検査項目となっている。同シリーズは 1983 年の発売開始以降、分析時間の短縮及び機能向上を目標としたモデルチェンジをおこなっており、2014 年には国内向けに分析時間 30 秒/テストの HLC-723G11 を製品化した。

今回、HLC-723G11 に海外市場に適した HbA1c 測定モード (Variant 分析モード) と遺伝性の貧血疾患である β -サラセミア症のスクリーニングが可能な β -Thalassemia 分析モードを開発したので報告する。

2. HLC-723G11 について

HLC-723G11 の外観を図 1 に、主な仕様を表 1 に示す。HLC-723G11 では使用目的に合わせて分析モードを選択することが可能である。分析モードの切り替えは溶離液・カラムを交換した後、操作パネル (図 2)



図 1 HLC-723G11 装置外観

で測定モードを選択するだけである。煩雑な溶離液の置換やカラムの平衡化は、装置が自動で実行し測定準備が完了する。

3. Variant 分析モード

[1] 海外における HbA1c 測定

糖尿病患者数は食生活の変化などにより先進国だけでなく新興国でも増加の一途を辿っており、2015 年の世界糖尿病連合の調査では、糖尿病患者およびその予備軍は全世界で 4 億 1500 万人と推定されている。それに伴い HbA1c の検査数も増加しており、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。

しかし、海外には異常ヘモグロビンを保有する患者が多く存在する。異常ヘモグロビンはヘモグロビンを構成するグロビン鎖にアミノ酸配列異常を呈するヘモグロビンの総称であり、異常ヘモグロビンは HbA1c 測定に干渉することが知られている。出現頻度の高い異常ヘモグロビン種はヘモグロビン S (HbS)、ヘモグロビン E (HbE)、ヘモグロビン C (HbC)、ヘモグロビン D (HbD) であり、海外ではこれら 4 種類の異常ヘモグロビンの影響を回避した HbA1c 測定方法が求められる。

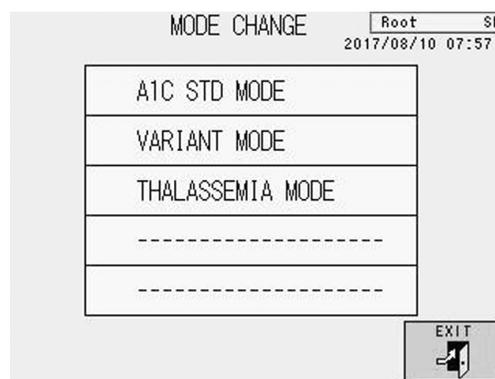


図 2 分析モード切替画面

表1 HLC-723G11の主な仕様

測定項目	HbA1c (Standard / Variant 分析モード) HbF、HbA2 (Thalassemia 分析モード)
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 (Standard 分析モード) 1.0分/検体 (Variant 分析モード) 5.0分/検体 (Thalassemia 分析モード)
検出方式	2波長吸光 (検出波長 415 nm / 500 nm)
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、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 \times 全長 75 mm または 100 mm 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 \times 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	電子加熱冷却 (25 $^{\circ}$ C)

[2] 測定原理

Variant 分析モードは非多孔性陽イオン交換カラムを用いてヘモグロビン類を分離する。図3にクロマトグラムのモデル図を示す。非異常ヘモグロビン症検体では A1a、A1b、F、L-A1c+、s-A1c (HbA1c)、A0 の6分画に分離する (図中黒線)。異常ヘモグロビン症検体では異常ヘモグロビンを A0 分画からさらに分離して影響を排除する (図中点線)。G11 は HbA1c への異常ヘモグロビンの影響を排除できるように HbS、HbC、HbD を A0 分画から分離し、これら異常ヘモグロビン3種を1分画 (H-VAR 分画) にまとめて溶出させることで1分/テストと言う短時間での分析を可能とした。

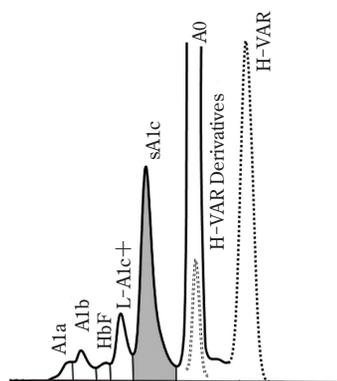


図3 A0中に含まれる異常ヘモグロビン由来の成分

A0分画に共溶出していると考えられる異常ヘモグロビン由来成分 (図中二重点線) を H-VAR 分画の面積%から算出し、HbA1c 値を補正することでより正確な測定を可能とした。

東南アジアで高頻度に出現する異常ヘモグロビンである HbE は、s-A1c と A0 間に出現する糖化 HbE 成分を分離・検出した後、HbA1c 値を補正することでその影響を排除する。

図4に健常人、HbAS 患者、HbAE 患者のクロマトグラム例を示す。健常人ではヘモグロビンは A1a、A1b、F、L-A1c+、s-A1c、A0 の6分画へ分離されており、その他のピークは出現しない。一方、HbS を有する HbAS 検体では、A0 分画から HbS が H-VAR 分画として分離されている。HbE を有する HbAE 検体では、s-A1c と A0 の間に HbE の糖化体が出現する。

[3] 基本性能

同時再現性の試験結果を表2に、日差再現性の試験結果を表3に示す。精度管理用のサンプルと血液サンプルを $n = 10$ 測定した結果、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% 以下の良好な再現性を示した。

HbA1c (%) に関して、既存モデルである G8 との相関性試験結果を図5に示す。試験では実検体 (122 検体) を測定した。G8 との相関を示す回帰式は $Y =$

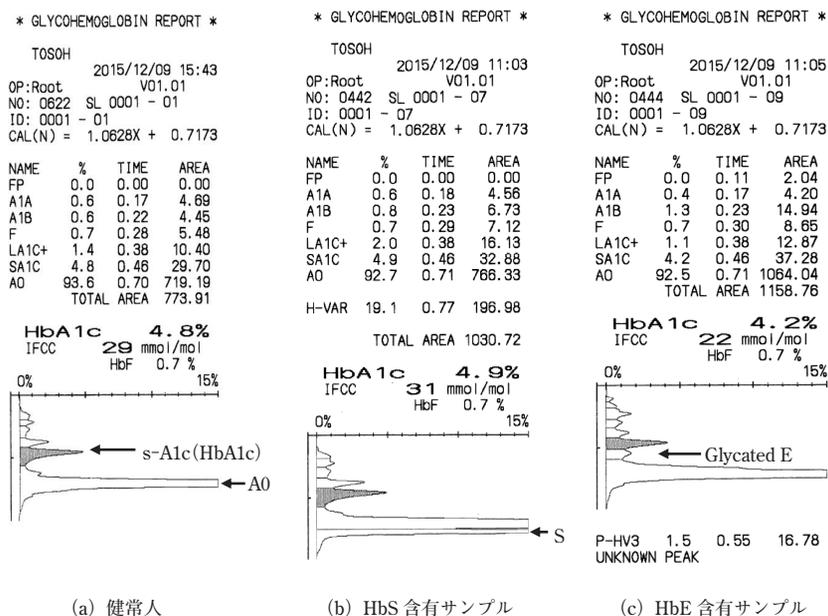


図4 HLC-723G11 Variant 分析モードの測定結果レポート

表2 測定値の同時再現性試験結果 (n=10)

サンプル	平均値 (%)	SD (%)	CV (%)
精度管理サンプル低濃度	4.99	0.03	0.60
精度管理サンプル高濃度	9.80	0.00	0.00
血液サンプル 低濃度	4.60	0.05	1.09
血液サンプル 高濃度	13.80	0.00	0.00

表3 測定値の日差再現性試験結果 (n=10)

サンプル	平均値 (%)	SD (%)	CV (%)
精度管理サンプル低濃度	4.90	0.05	1.02
精度管理サンプル高濃度	9.83	0.05	0.51
血液サンプル 低濃度	5.05	0.05	0.99
血液サンプル 中濃度 1	6.64	0.05	0.75
血液サンプル 中濃度 2	7.62	0.04	0.52
血液サンプル 高濃度	10.51	0.09	0.86

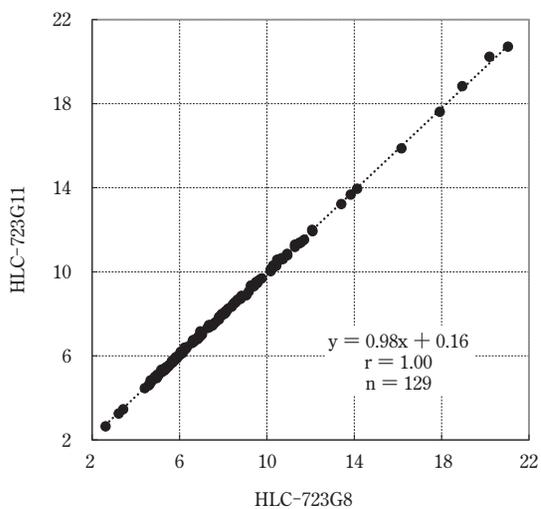


図5 G11と既存モデルとのHbA1c値の相関性

0.98X + 0.16、相関係数は1.00であり良好な相関性を示した。

4. β-Thalassemia 分析モード

[1] β-サラセミア症

ヒトヘモグロビンにはα鎖とβ鎖からなるHbA0とα鎖とγ鎖からなるHbF、α鎖とδ鎖からHbA2があり、成人のヘモグロビン組成はそれぞれ95～96%、0.5～1.5%、2～3%である。β-サラセミア症はβ鎖の合成異常に起因する遺伝性の貧血症であり、その発見にはヘモグロビンF(HbF)とヘモグロビンA2(HbA2)の測定によるスクリーニング検査が有効である。

またβ-サラセミア症患者にはHbSおよびHbEを有する異常ヘモグロビン症患者(HbS/β-サラセミア、HbE/β-サラセミア)が多いため、異常ヘモグロビンの影響を受けないHbFとHbA2の測定方法が求められる。

[2] 測定原理

β -Thalassemia 分析モードは非多孔性陽イオン交換カラムを用いてヘモグロビンを F、A0、A2、E+、D+、S+、C+ の 7 分画に分離・同定が可能である。前モデルの HLC-723G8 では HbE が HbA2 と共溶出するため、HbE を有する患者検体の HbA2 を測定することができなかった。しかし、HLC-723G11 では HbE と HbA2 を分離することで HbE/ β -サラセミア症患者の検出が可能となった。

図 6 に β -Thalassemia 分析モードのクロマトグラムを示す。微量成分である HbF、HbA2 を A0 から分離し両成分を同時測定可能である。さらに、主要な異常ヘモグロビンである HbD、HbS、HbC に加え、HbE を HbA0、HbA2 から分離することができ、それらの異常ヘモグロビンを有する検体においても HbA2 の測定が可能である。

[3] 基本性能

同時再現性の試験結果を表 4 に、日差再現性の試験結果を表 5 に示す。精度管理用のサンプルを $n = 20$ 測定した結果、同時再現性の変動係数 CV は HbF、HbA2 とも 1% 以下、日差再現性の変動係数 CV は HbF、HbA2 とも 2% 以下であり、再現性良く微量成分である HbF、HbA2 を測定可能である。

表 6 に添加回収試験の結果を示す。HbF については、0.3% と 50.0% の検体、HbA2 については、1.8% と 9.9% の検体を種々の比率で混合し、添加回収率を確認し

表 4 測定値の同時再現性試験結果 (n=20)

HbF			
サンプル	平均値 (%)	SD (%)	CV (%)
低濃度	1.50	0.00	0.00
高濃度	5.12	0.04	0.78
HbA2			
サンプル	平均値 (%)	SD (%)	CV (%)
低濃度	3.19	0.03	0.94
高濃度	6.48	0.04	0.62

表 5 測定値の日差再現性試験結果 (n=20)

HbF			
サンプル	平均値 (%)	SD (%)	CV (%)
低濃度	1.51	0.02	1.32
高濃度	4.69	0.03	0.64
HbA2			
サンプル	平均値 (%)	SD (%)	CV (%)
低濃度	3.17	0.06	1.89
高濃度	5.78	0.11	1.90

た。HbF については、100 +/- 2%、HbA2 については、100 +/- 5% の回収率が得られ、HbF については 50%、HbA2 については、9.9% まで測定可能であることが確認された。

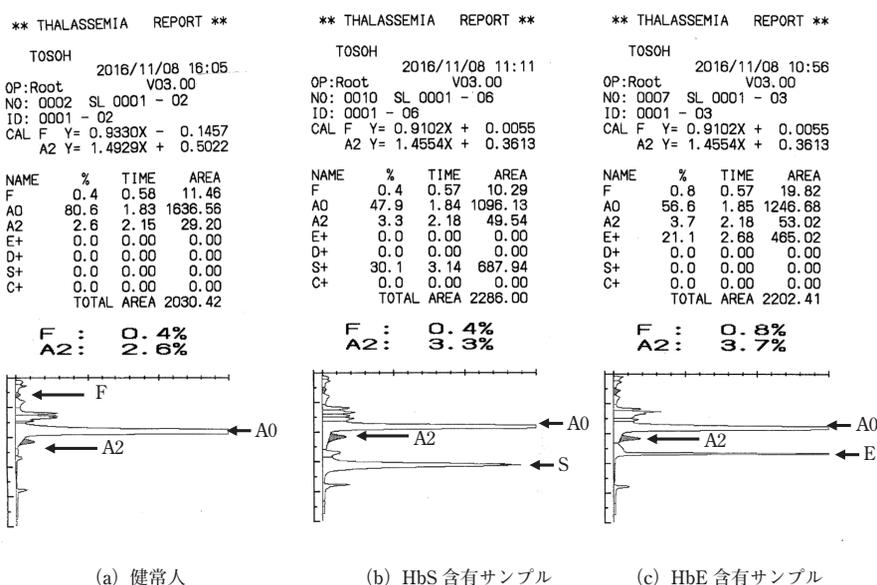


図 6 HLC-723G11 Thalassemia 分析モードの測定結果レポート

表6 HbF、HbA2の回収率

(株)福川工場技術課技術管理グループ)。

HbF				
高濃度検体 (比率)	低濃度検体 (比率)	測定値 HbF (%)	理論値 HbF (%)	回収率 (%)
0	10	0.33	—	—
2	8	10.08	10.26	98
4	6	20.87	20.19	103
6	4	30.33	30.12	101
8	2	41.04	40.05	102
10	0	49.98	—	—
HbA2				
高濃度検体 (比率)	低濃度検体 (比率)	測定値 HbA2 (%)	理論値 HbA2 (%)	回収率 (%)
0	10	1.76	—	—
2	8	3.22	3.38	95
4	6	4.96	5.00	99
6	4	6.54	6.62	99
8	2	8.44	8.24	102
10	0	9.86	—	—

5. まとめ

自動グリコヘモグロビン分析計 HLC-723G11 は、分析モードを切り替えることにより、海外の糖尿病検査および β -サラセミア症のスクリーニング検査に対応可能な装置である。

Variant 分析モードは、出現頻度の高い異常ヘモグロビンの影響を受けず、測定時間が1検体当たり1.0分、毎時60検体の迅速処理が可能であり、HbA1c値の同時再現性、日差再現性はCV 1.0%以下と高精度に分析可能である。

Thalassemia 分析モードでは、HbD、HbS、HbCに加えHbEの分離が可能であり、これらの異常ヘモグロビンの影響を受けずHbF、HbA2値の測定が可能である。

2014年に国内上市した、Standard 分析モードと合わせ、国内外のヘモグロビン検査市場の様々な要求に柔軟に対応できる高精度分析計として、幅広いユーザーに使用いただけるものと期待している。

6. 開発担当者

HLC-723G11 Variant 分析モード、Thalassemia 分析モードの開発は以下の7名で実施した。

村上卓司、荻野慎士、中澤裕二、中山亮、水流裕明(以上、第二開発部臨床液クロG)、東田悟(第二開発部遺伝子グループ)、河村真成(東ソー・ハイテック

