

糖化ヘモグロビン(HbA1c)自動免疫測定試薬の開発

バイオサイエンス事業部 開発部 AIA試薬開発G

津浦 正史
三澤 孝一
新谷 晃司
井上 益男

1. はじめに

糖化ヘモグロビン(HbA1c)はヘモグロビン(Hb)が2ステップのnon-enzymaticな反応により糖化した安定な化合物(安定型HbA1c)である。最初の反応ではヘモグロビンの鎖N末端バリンにグルコースが結合し不安定型HbA1c(Schiff base)を生成する。2段階目の反応では、結合部位がアマドリ転移より変換され安定型HbA1cとなる。最初の反応は可逆的であるが、2段階目の反応は不可逆的であり、2段階の反応を通して生成される安定型HbA1cがHbA1cと定義される。このHbA1cの生体内での寿命は100-120日と言われており、過去1-2ヶ月の平均血糖を反映する¹⁾⁻⁴⁾。

HbA1c濃度(HbA1c / Total Hb, %)は総ヘモグロビン量(Total Hemoglobin)中に占めるHbA1cの割合(%)を測定することで決定される。このHbA1c濃度の増加は、血中グルコースの平均濃度に依存し、血糖値のように食前・食後等の日内変動がなく糖尿病患者の血糖状態を長期的に知る重要なマーカーであり、糖尿病診断及び治療経過観察の指標として必須の項目である⁵⁾⁻¹²⁾。

糖尿病患者は、世界で現在約2億4,600万人いるといわれ、今後さらに増加傾向にある。そのため糖尿病患者の診断・治療・予防は、今後の医療に最も重要な項目の一つである。当社では、すでにHPLC法を用いたHbA1c測定装置(東ソーグリコヘモグロビン分析計HLC-723シリーズ)を上市しており、世界的に広く販売している。

米国での糖尿病患者人口は約2300万人で、総人口の約7.8%を占めるとADA(American Diabetes Association)は公表しており、中小規模施設においても糖尿病診断需要がある。しかしながら、これらの中小施設では糖尿病診断専用装置の導入は経済的でないことからHbA1cを含む多項目が測定できるシステムに対する要望が強い。そこで、HPLC法とは異なる市場での販売が期待される東ソー自動エンザイムイムノアッセイ装置(AIA-360またはAIA-600II)によるHbA1c

測定試薬(ST AIA-PACK HbA1c)を開発したので報告する。

2. 測定原理と材料

糖化ヘモグロビン自動免疫測定試薬は、全血検体を溶血・変性処理するための前処理試薬と、抗原抗体反応の場となる免疫反応試薬からなる。前処理試薬は界面活性剤を含む弱酸性緩衝液からなり、免疫反応試薬はヘモグロビン(HbA1cを含む)を固相化させるための未感作ビーズと酵素標識された抗HbA1c抗体をカップ内に凍結乾燥形態で密封した測定試薬である。本測定原理は、下記に示すようにHbA1cへの酵素標識抗HbA1c抗体の結合と未感作ビーズへのヘモグロビンとHbA1cの競合結合を組み合わせた測定方法である(図1)。

まず、ヘモグロビンは血球内部に存在することと、HbA1cの抗体結合部位(エピトープ)が立体構造内部に折りたたまれていることから、溶血・変性処理(前処理)が必要であり、前処理試薬をもちいて40、20分間、前処理を行う。その後、前処理済み検体を免疫反応試薬カップに分注させることにより、凍結乾燥体は溶解し抗原・抗体反応およびヘモグロビンの未感作ビーズへの結合が開始する。37、10分間の反応後、結合していないヘモグロビン(HbA1cを含む)と酵素標識抗体等をB/F分離により洗浄除去し、酵素基質である4-メチルウンベリフェリルりん酸(4MUP)を分注後、経時的に蛍光強度を測定し単位時間あたりの4-メチルウンベリフェロン(4MU)の生成量を測定する。基質の蛍光強度は固定化された全ヘモグロビンに占めるHbA1cの割合〔HbA1c(%)〕に依存するため、あらかじめヘモグロビンに対して既知の割合〔HbA1c(%)〕でHbA1cを含む標準品を用いその蛍光強度とHbA1c(%)による標準曲線を作成し、検体の蛍光強度より未知のHbA1c(%)を算出する。測定の際、前処理済み検体のカップへの分注、一定時間下での抗原・抗体反応、B/F分離、基質分注、蛍光強度の測定

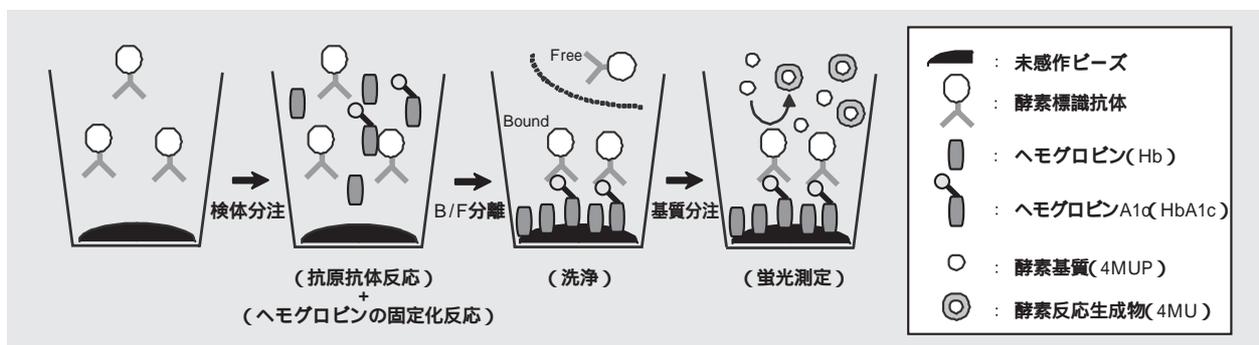


図1 HbA1c測定模式図

は全自動エンザイムイムノアッセイ装置により自動で行われ、測定開始から約18分後に結果が得られる。前処理時間を含めると約50分程度で結果が得られることになる。

3. AIA試薬の開発

本試薬の開発にあたっては、最も重要なことは既に上市されている当社HPLC法（東ソー自動グリコヘモグロビン分析計HLC-723G7 バリエーションモード、以下G7 Variantと略す）と良好な相関性を有する試薬を開発すること、及び米国での販売を考慮して、NGSP (National Glycohemoglobin Standardization Program) に対して適合していることが求められる。

本試薬の特性として、全血検体を用いること、前処理を要すること、及び変性ヘモグロビン（HbA1cを含む）を、固定化抗体を用いずに直接固定化するという既存のAIA試薬とは異なる原理にて測定することが挙げられる。抗原・抗体反応およびヘモグロビン固定化条件の最適化、溶血・変性条件の最適化等を実施し、検体間差の影響の低減に努めた。

また、ヘモグロビンの中には一部のアミノ酸配列が異なる異常ヘモグロビンが存在する場合がある。国内においては、比較的単一な種族から成り立っていることからあまり例はないものの、米国では多種多様な種族から成り立っていることもあり、比較的多く存在することが報告されている。本測定試薬は主に米国での販売を考えており、異常ヘモグロビンも通常ヘモグロビンと同様に測定できることが求められている。主な異常ヘモグロビンとして、異常ヘモグロビンSは 鎖6残基目Glu Val¹³、異常ヘモグロビンCは 鎖6残基目Glu Lys¹⁴、異常ヘモグロビンEは 鎖26残基目Glu Lys¹⁵、異常ヘモグロビンDは 鎖121残基目Glu Gln¹⁶等が挙げられる。本測定系においては、鎖N末端糖化バリンから5残基目までを認識する抗体を

用い、6残基目以降にアミノ基の置換があっても影響なく測定できる、すなわちこれら異常ヘモグロビンも同様に測定できるよう開発を行った。

これらの検討を行った結果、20分の前処理を必要とするものの、既存のAIAシステムに搭載することのできるHbA1c測定試薬を開発することができたのでその評価結果を以下に報告する。

4. 基本性能評価

(1) 再現性

測定内再現性試験、測定間再現性を濃度の異なる3種のEDTA全血検体を用いて行った。使用した3検体（Low、Middle、High）は1回の測定分を小分け分注し使用まで凍結保存した。20回同時測定による測定内再現性試験の結果、各検体の測定値の変動係数（coefficient of variation ; CV）は、1.8～2.3%の範囲内であった（表1）。20回（>90日間）の測定を各4重測定にて行った測定間再現性試験の結果、各検体の測定値のCVは、2.7～4.3%の範囲内であった（表2）。

表1 測定内再現性

Sample	Mean [HbA1c%]	Pooled SD [%]	Coefficient of Variation [%]
HWB-Low	5.4	0.112	2.1
HWB-Middle	8.2	0.151	1.8
HWB-High	13.1	0.304	2.3

表2 測定間再現性

Sample	Mean [HbA1c%]	Pooled SD [%]	Coefficient of Variation [%]
HWB-Low	5.4	0.201	3.7
HWB-Middle	8.2	0.225	2.7
HWB-High	13.1	0.565	4.3

(2) 検量線と最小検出感度

HbA1c標準品(6濃度)を測定し作成した検量線(検量範囲は2.0~16.0%)を図2に示した。また、最小検出感度(MDC)を標準品Calibrator(1)を20回測定し、蛍光強度の平均値+2×SDに対応する濃度を検量線より濃度換算することにより算出した。本測定試薬6ロットを用いてMDCを求めた結果、0.5%以下となり、本測定試薬の目標とする検量域下限である2.0%を十分に達成する結果を得た(表3)。

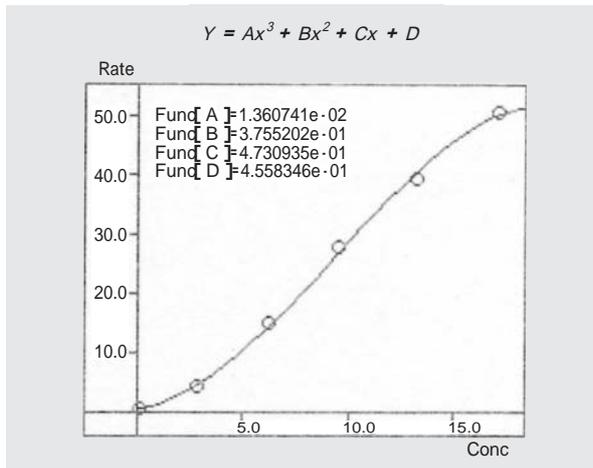


図2 検量線

表3 最小検出感度(MDC)

HbA1c 免疫反応試薬 lot #	MDC [HbA1c%]
GZ15759	0.19
H115760	0.36
H115761	0.46
H115762	0.28
H615764	0.28
H615765	0.27

(3) 希釈直線性試験

Total Hb濃度を14.0 g/dLに調整した低濃度サンプル(HbA1c = 3.4%)と高濃度サンプル(HbA1c = 15.3%)を任意の割合で混合し混合サンプルを用い3重測定を行った。混合サンプル各々の理論値に対して測定値回収率は97.6~104.7%の範囲内であり、HbA1c濃度3.4~15.3%の範囲において良好な直線性能を有していることが認められた(表4)。

(4) 共存物質および修飾ヘモグロビンの影響

検体中に含まれる可能性のある各物質を高濃度でEDTA全血検体へ添加し、測定値への影響を確認した。共存物質としては遊離型ビリルビン、抱合型ビリルビン、脂質、ヒト血清アルブミン、アスコルビン酸を、

表4 直線性試験結果

	Expected Value [HbA1c %]	Observed Value [HbA1c %]	Recovery [%]
Low : High			
Low Undiluted	3.4	3.4	100.0
9 : 1	4.6	4.5	97.8
8 : 2	5.8	5.8	100.0
7 : 3	7.0	6.9	98.6
6 : 4	8.2	8.0	97.6
5 : 5	9.4	9.5	101.1
4 : 6	10.6	10.8	101.9
3 : 7	11.7	12.1	103.4
2 : 8	12.9	13.5	104.7
1 : 9	14.1	14.5	102.8
High Undiluted	15.3	15.3	100.0

抗凝固剤としてはEDTA、解糖系停止物質としてNaFを各々表2に記載の濃度まで添加し、本測定試薬にて測定した。未添加EDTA全血検体に対して測定値はいずれも±10%以内の変動であり、これら物質による影響は添加量上限まで認められないと判断した(表5)。

また、修飾ヘモグロビンに対する影響を確認した。不安定型A1cの影響はEDTA全血検体にグルコースを1,000 mg/dLまで添加したものの、カルバミル化ヘモグロビンの影響はシアン酸ナトリウムを50 mg/dLまで添加したものの、アセトアルデヒド化ヘモグロビンはアセトアルデヒドを50 mg/dLまで添加したものを、各々37、4時間インキュベートして測定した。未添加EDTA全血検体に対して測定値はいずれも±10%以内の変動であり、これら修飾ヘモグロビンの影響はみとめられないと判断した(表6)。

表5 共存物質および抗凝固剤影響

	添加量
遊離型ビリルビン [mg / dL]	16
抱合型ビリルビン [mg / dL]	18
脂質 [mg / dL]	1,600
ヒト血清アルブミン [mg / mL]	50
アスコルビン酸 [mg / dL]	20
EDTA [mg / mL]	10
フッ化ナトリウム [mg / mL]	10

表6 修飾ヘモグロビンの影響

修飾ヘモグロビン	添加量
グルコース [mg/dL]	1,000
シアン酸ナトリウム [mg/dL]	50
アセトアルデヒド [mg/dL]	50

注：各添加物をEDTA全血サンプルと混合した後、37、4時間インキュベートし、修飾ヘモグロビン検体とした^{(17), (18)}。

(5) 国際標準品の測定

HbA1cの標準化は主に3極化しており、欧州：IFCC (International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine)、日本：JDS (日本糖尿病学会)そして米国：NGSP (National Glycohemoglobin Standardization Program)がある。米国での販売を目的としていることから、NGSPに準拠していることが必要である。しかしながらNGSPの直接的な標準品が存在しないことから、IFCC HbA1c Calibrator SetのLot Melbourne 2007を基準物質 (Reference Material) とすることとした。IFCC (%)とNGSP (%)の相関式は以下のような式で示されることが公表されており、NGSP (%)への変換が可能であることから¹⁹⁾²⁰⁾、IFCC HbA1c Calibrator SetのLot Melbourne 2007を用

いて本測定試薬の1次標準品濃度をNGSPに適応させた。

IFCC (%)とNGSP (%)の相関式

$$\text{NGSP (HbA1c \%)} = 0.915 \times \text{IFCC (HbA1c \%)} + 2.15$$

その結果、HbA1c Calibrator SetのLot Melbourne 2007のNGSP変換値との適合率は97.7~101.5%と良好な結果であり、本測定試薬は米国で用いられるNGSP (%)に適応していることを確認した(表7)。

また、図3に本測定試薬標準品のトレーサビリティフローを示した。

(6) HPLC法との相関

EDTA全血検体117検体を本測定試薬とG7 Variantで測定し、測定値の比較を行った結果、G7 Variant

表7 IFCC HbA1c Calibrator Set測定値

	IFCC表示値 [HbA1c IFCC %]	NGSP換算値 [HbA1c NGSP %]	測定値 [HbA1c NGSP %]	測定値 / NGSP換算値 Recovery [%]
IFCC Cal Level 1	3.1	5.0	4.9	98.0
IFCC Cal Level 2	3.9	5.8	5.7	98.3
IFCC Cal Level 3	5.1	6.8	6.9	101.5
IFCC Cal Level 4	6.5	8.1	8.1	100.0
IFCC Cal Level 5	7.6	9.1	9.0	98.9
IFCC Cal Level 6	8.6	10.1	10.1	100.0
IFCC Cal Level 7	9.1	10.5	10.5	100.0
IFCC Cal Level 8	11.8	12.9	12.6	97.7

ST AIA-PACK HbA1c CALIBRATOR SET Traceability Chain

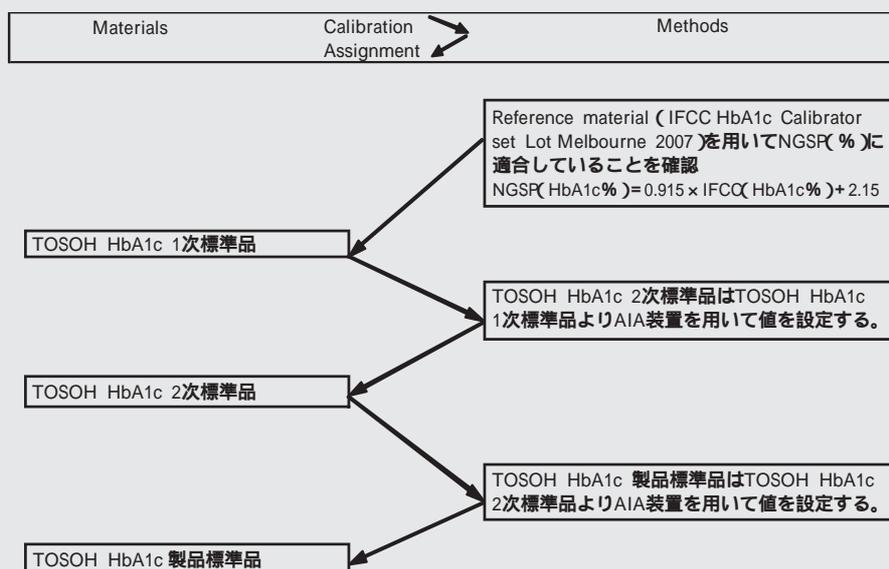


図3 HbA1c標準品トレーサビリティフロー

(x) と本測定試薬 (y) 間の、相関係数 (r) は0.992、回帰係数は1.056、y切片は-0.183と良好な相関性が認められた (図4)。

(7) EDTA全血とフッ化ナトリウム (NaF) 入り EDTA全血

HbA1cの測定はEDTA全血と血糖測定時によく用い

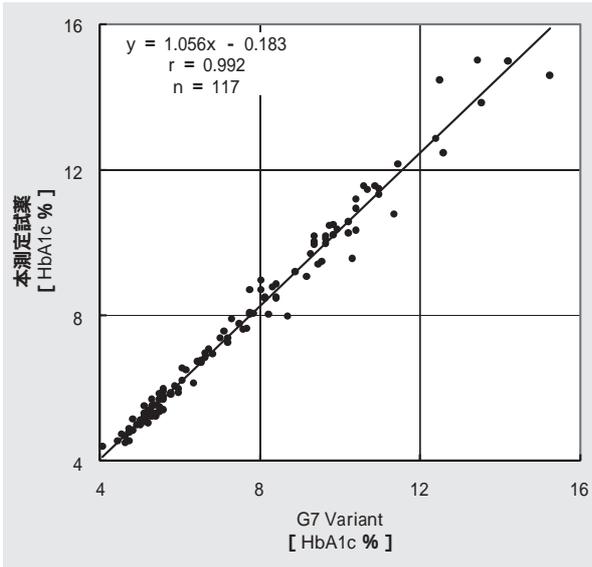


図4 ST AIA-PACK HbA1cとG7 Variantとの相関図

られるフッ化ナトリウム (NaF) 入りEDTA全血の2タイプの採血管が主として用いられる。そこで、本測定試薬においても同時に同一人物から採取したEDTA全血とNaF入りEDTA全血を用いて相関性試験を行った結果 (EDTA全血 (x)、NaF+EDTA全血 (y))、63例での相関係数 (r) は0.992、回帰係数は0.985、y切片は0.070と良好な相関性が認められた (図5)。したがって、本測定試薬はNaF入りEDTA全血を用いてもEDTA全血と同等な測定値を与える試薬であることを確認できた。

(8) 異常ヘモグロビンを含む検体の測定

異常ヘモグロビンの主たるタイプのである異常ヘモグロビンSおよびCが通常タイプのヘモグロビンと同様の反応性を示すこと確認するために異常ヘモグロビンSおよびCを含む検体を本測定試薬とG7 Variantにて測定し測定値を比較した。その結果、G7 Variantに対して±20%以内であった (表8)。

(9) 貧血検体の測定

ヘモグロビン (Total Hb) 濃度は、健常人で12~18 g/dLであるが、貧血検体の場合にTotal Hbは<10 g/dLと低くなることもあり、測定結果への影響が懸念される。そこで本測定試薬におけるTotal Hb濃度の影響を確認した。入手した貧血検体を含む91検体

表8 異常ヘモグロビンSおよびCの測定

Specimen I.D.	G7 Variant [HbA1c %]	本測定試薬 [HbA1c %]	本測定試薬 / G7 Variant Recovery [%]
A/S Variant 001	5.4	6.0	111.1
A/S Variant 002	5.9	6.2	105.1
A/S Variant 003	6.4	6.2	96.9
A/S Variant 004	4.4	5.0	113.6
A/S Variant 005	5.9	6.6	111.9
A/S Variant 006	10.6	10.4	98.1
A/S Variant 007	6.1	7.0	114.8
A/S Variant 008	5.0	5.5	110.0
A/S Variant 009	6.6	6.9	104.5
A/S Variant 010	6.8	7.0	102.9
A/S Variant 011	6.0	6.2	103.3
A/S Variant 012	5.9	6.3	106.8
A/S Variant 013	6.3	6.2	98.4
A/S Variant 014	6.0	6.3	105.0
A/S Variant 015	4.1	4.6	112.2
A/S Variant 016	5.5	5.5	100.0
A/S Variant 017	4.3	5.0	116.3
A/S Variant 018	6.0	6.3	105.0
A/S Variant 019	4.9	5.5	112.2
A/S Variant 020	5.0	5.3	106.0
A/S Variant 021	7.2	7.7	106.9
A/S Variant 022	5.2	5.4	103.8
A/S Variant 023	5.1	5.6	109.8
A/C Variant 001	6.1	6.5	106.6
A/C Variant 002	5.0	5.6	112.0

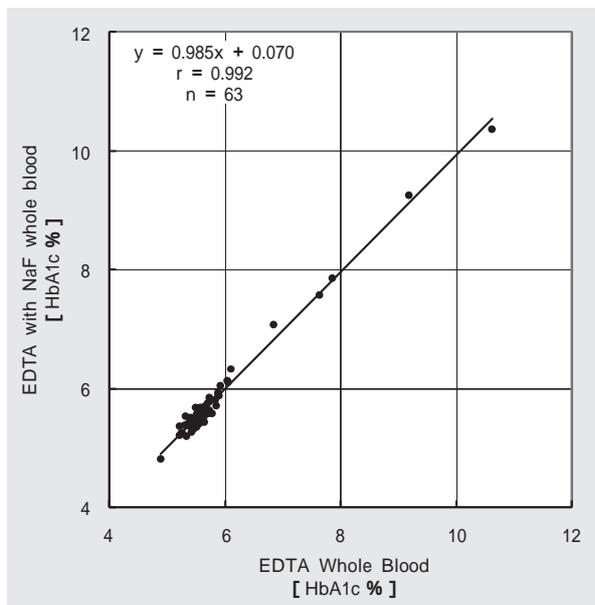


図5 EDTA全血とフッ化ナトリウム (NaF) 入り EDTA全血の相関図

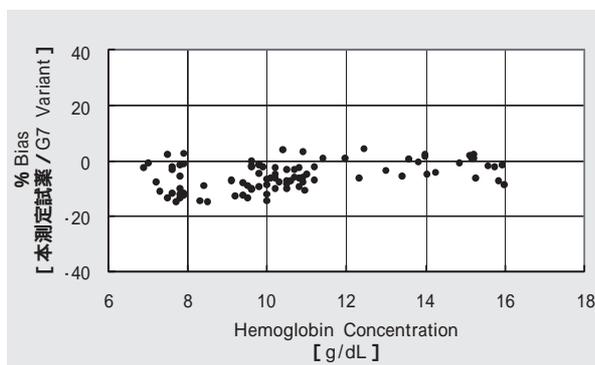


図6 Total Hbの影響

(Total Hb濃度：6.9～16.0 g/dL) を用いて、G7 Variantと本測定試薬にて測定した。その結果、すべての本測定試薬の測定値はG7 Variantと比較して±20%以内であった(図6)。

5. まとめ

今回開発したHbA1c測定試薬について基本性能は、測定内再現性は、2.3%以内、測定間再現性は4.3%以内と良好であり、最小検出感度は0.5%以下、検量線の直線性は3.4～15.3%の範囲で良好な直線性を示した。検体中の共存物質や抗凝固剤の影響がないこと、EDTA全血とフッ化ナトリウム (NaF) 入りEDTA全血の両検体を同等に測定可能なことが確認され、また修飾ヘモグロビンの影響もないことが確認された。

また、本測定試薬はNGSP (%) に適合するように

標準品濃度を設定しており、また、G7 Variantとの相関性試験も良好な結果を示した。異常ヘモグロビン(タイプsおよびC)、貧血検体の測定結果においてもG7 Variantに対して±20%以内であった。

本測定試薬は、スクリーニング・治療・経過観察における診断薬として十分な性能を有しており、AIAシステムの利便性を考えると中小規模施設での運用に大いに活躍することが期待できる。

文 献

- 1) Mayer TK., et al, Clin. Chem. Acta.,127, 147 (1983)
- 2) Bunn H. F., et al, Biochem. Biophys. Res. Commun., 19, 103 (1975)
- 3) Bunn H. F., et al, J. Clin. Invest., 57, 1652 (1976)
- 4) Baynes J. W., et al, Diabetes Care, 7, 602 (1984)
- 5) Rochman H., et al, Ann. Clin. Lab. Sci.,10, 111 (1980)
- 6) Diabetes Control and Complications Trial Research Group, N. Engl. J. Med., 329, 977 (1993)
- 7) Larsen ML., et al, N. Engl. J. Med., 323, 1062 (1990)
- 8) Koenig R. J., et al, Diabetes., 25, 230 (1976).
- 9) Nathan D. M., et al, N. Eng. J. Med., 310, 341 (1984)
- 10) DCCT Reseach Group., N. Eng. J. Med., 329, 977 (1993)
- 11) Larsen M. L., et al, N. Eng. J. Med., 323, 1021 (1990)
- 12) Nathan D. M., et al, N. Eng. J. Med., 323, 1062 (1990)
- 13) Ingram V. M., et al, Biochem. Biophys. Acta., 36, 402 (1959)
- 14) Hunt J. A., et al, Biochem. Biophys. Acta., 42, 409 (1960)
- 15) Hunt J. A., et al, Biochem. Biophys. Acta., 49, 520 (1961)
- 16) Harano T., et al, Hemoglobin, 11, 177 (1987)
- 17) Tetsuo M., et al, JJCLA., 23, 691 (1998)
- 18) 田端介富、機器・試薬、20、274 (1997)
- 19) Gas W., et al, Clin. Chem., 54, 240 (2008)
- 20) Andrea G., et al, Clin. Chem., 54, 1379 (2008)