

●東ソー自動グリコヘモグロビン分析計 HLC-723G9の開発

セパレーションメディア製造部 セパレーションセンター

東ソー・ハイテック(株)

技術部

カスタマーサポートセンター

荻野 慎士
村上 卓司
田高良 聡恵
中澤 裕二
松野 隆則
土本健太郎
青柳 雄大
江藤 享
河村 真成
山岸 茂夫
小林 強
丹羽 祐基

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HPLC法を原理とし、糖尿病の臨床検査項目であるHbA_{1c}を測定する専用装置である。同シリーズは1983年の発売開始後、市場のニーズに応え計6回のモデルチェンジを経て市場に浸透し、現在の稼働台数は国内約2000台、海外約（米国・欧州・アジア）2800台に上っている。

特に1995年に上市したGHbV以降は非多孔性陽イオン交換カラムを採用し、従来前処理により除去が必要であった不安定型グリコヘモグロビン（L-A_{1c}）をカラム上で安定型グリコヘモグロビン（s-A_{1c}）との分離を行うことが可能となり、HbA_{1c}（s-A_{1c}）をより再現良く、高速で測定することが可能となっている。現在販売している装置は7世代目のG8であり、1検体当たり1.0分の高速測定、初検体の結果出力2.0分の迅速性が特長である。

一方、糖尿病患者は増加の一途を辿っており、2008年には慢性疾患への早期診断・早期介入の観点から、特定健診・特定保健指導（通称「メタボ健診」）が始まり、血糖検査項目として血糖値とHbA_{1c}が採用された。また2010年7月1日より施行された新しい糖尿病の診断基準にもHbA_{1c}が血糖値と並ぶ検査項目に取り入れられ、HbA_{1c}をより迅速により高精度に測定するという要望は益々高まってきた。

今回我々はこれらの市場の要望に対応するべく、1検体当たり45秒の高速測定、初検体の結果出力90秒の迅速性、連続時の処理能力を80検体/時間とした東ソ

ー自動グリコヘモグロビン分析計HLC-723G9を開発・商品化した。本報告では、このG9の主な仕様及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に示した。

近年では医療用具の取扱易さと誤使用の防止が重視されるようになり、G9では画面をカラー化することで各溶離液の消費量などの情報を読み取りやすくした。特に誤使用を防止するポップアップ画面上のエラー表示のカラー化では、より注意を促す配色とした。

また外部記憶用メディアとしてUSBメモリを接続可能とした。



図1 装置外観

表1 HPLC-723G9の主な仕様

測定項目	HbA _{1c} (s-A _{1c})、HbF、HbA ₁
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	45秒/検体
検出方式	2波長吸光度 (検出波長415nm)
検体使用量	全血3 μ L、希釈溶血液100 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 (4.5 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12~15×75~100mm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 16色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
記憶装置	USBメモリ
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℃)

3. 測定の高速化、及び迅速化

[1] 分析時間の短縮化、及び迅速化

HLC-723シリーズでは、非多孔性陽イオン交換カラムを用いることで、s-A_{1c}のみならず、ヘモグロビンをA_{1a}、A_{1b}、F、L-A_{1c}、s-A_{1c}、A₀に分画することで、精度の高いHbA_{1c}測定を可能にしてきた。G9の開発においても、これまでの分画能を保ったまま、分析時間を短縮することを試みた。

従来機種のカラムには内径 4.6mm×長さ20mmのカラムが使用されてきた。G9では高線速化のため、内径 4.0mm×長さ20mmのカラムの導入について検討を行った。カラム内径を縮小するにあたっては、カラム内のデッドボリューム間差を少なくするために加工精度も向上させ、従来のカラムでは20 μ Lであったデッドボリュームを7 μ Lまで低減させ、カラム固体間差を縮小させた。また、一般にカラム内径を縮小する場合には、同一流速であれば操作圧が上昇し、カラム耐久性が低下する可能性があるため、耐久性対策として充填条件を検討し、耐久性を確保した。この結果、45秒/1検体の高速分析が可能で1500検体以上の使用に耐えうる新規分析カラムを開発することに成功した。

迅速化については、G8から採用した溶離液置換、及びカラム平衡化シーケンスをブラッシュアップした。装置内の減圧脱気機構によって溶離液が濃縮されることを前提に、分析に必要な3種類の溶離液の内、カラムの平衡化に重要な第1液とs-A_{1c}の分離に重要な第2液とをほぼ同等量置換することによって、第1検体

目と第2検体目で同じ平衡化状態を保つことができることを見出した。この改良シーケンスの採用により、G8では60秒かかっていた予備動作時間を、45秒に短縮し、初検体の結果出力までを90秒まで短縮することができた。

クロマトグラムを図2に示した。既存HLC-723シ

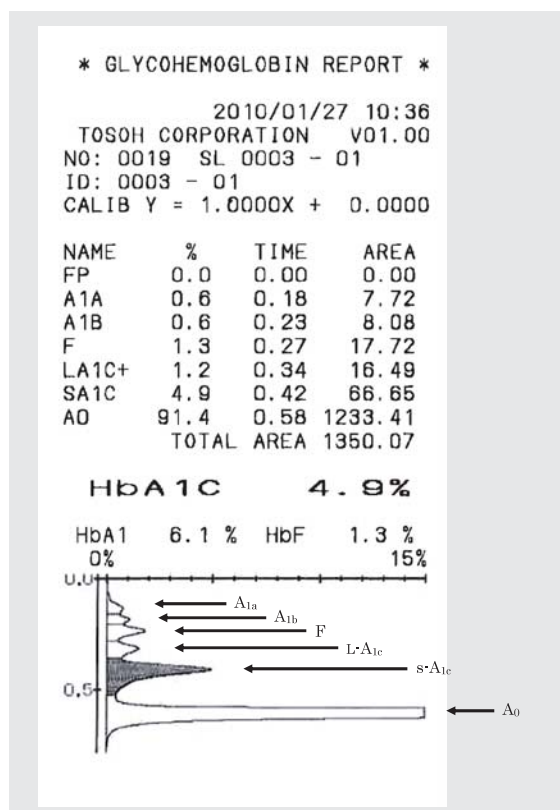


図2 HLC-723G9の測定結果レポートとクロマトグラム

リーズと同様にヘモグロビンを6つに分画しており、高い精度を継承したシステムとなっている。

[2] 前処理工程の高速化

HLC-723シリーズは、採血管から直接全血を自動サンプリングし、装置内で自動希釈する機構を取り入れることにより、ユーザは手動での前処理を行う必要がなく、この簡便さが好評を得ている。通常HPLC分析では、分析終了後に次検体の前処理をおこなうが、HLC-723シリーズでは、HPLCによるヘモグロビンの分離中に、並行して次検体の前処理を行うことにより、分析終了後のタイムロスをなくし、前機種G8では60検体/時間という高い処理能力を持っていた。

G9においても、自動希釈機構を導入するため、サンプリング機構の高速化と前処理工程の最適化を実施した。サンプリング機構の高速化では、摺動部抵抗低減と機構部の補強を行い、発熱量が少なくトルクの大きい新型モータを採用した。前処理機構の見直しでは、次検体へ前検体が持ち越されないように、希釈配管と希釈動作を変更し、泡の発生を抑えて短時間での希釈を可能とした。本検討の結果G9では、全血のサンプリングと前処理をあわせて45秒以内で実施できる自動希釈機構を採用し、80検体/時間と前機種G8を上回る高速処理能力を持たせることができた。

4. 基本性能評価結果

[1] 再現性試験

同時再現性試験は、濃度の異なる3種類の試料を用いて測定した。表2に示したように、HbA_{1c} 5%から10%の3濃度すべてで変動係数 CV% 1.0%以下の良好な再現性を示した。日差再現性試験についても、濃度の異なる2種類の試料を用いて測定した。表3に日差

表2 同時再現性試験結果 (n=10)

	低濃度域	中濃度域	高濃度域
平均値	5.21	7.29	9.27
SD	0.02	0.01	0.02
CV (%)	0.33	0.19	0.21

表3 日差再現性試験結果 (n=10)

	低濃度域	高濃度域
平均値	5.21	9.20
SD	0.04	0.04
CV (%)	0.82	0.39

再現性の試験結果を示した。低濃度域、高濃度域共に、変動係数 CV% 1.0%以下の良好な再現性を示した。

[2] 相関性試験

既存製品G7、G8とG9の相関性について、患者血を用いて試験した。図3に示したように、G9はどちらの装置に対しても相関係数0.999、回帰係数1.01と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を添加し、35℃で1時間インキュベートし修飾ヘモグロビンを増加させた試料を調製した。修飾ヘモグロビン試料と未添加試料との測定値を比較した。図4に結果を示した。

(1) 不安定型グリコヘモグロビンの影響

グルコース添加量の増加と共にL-A_{1c}が増加するが、s-A_{1c}値は添加量100mg/dLまでは変化せず、影響のないことを確認した。

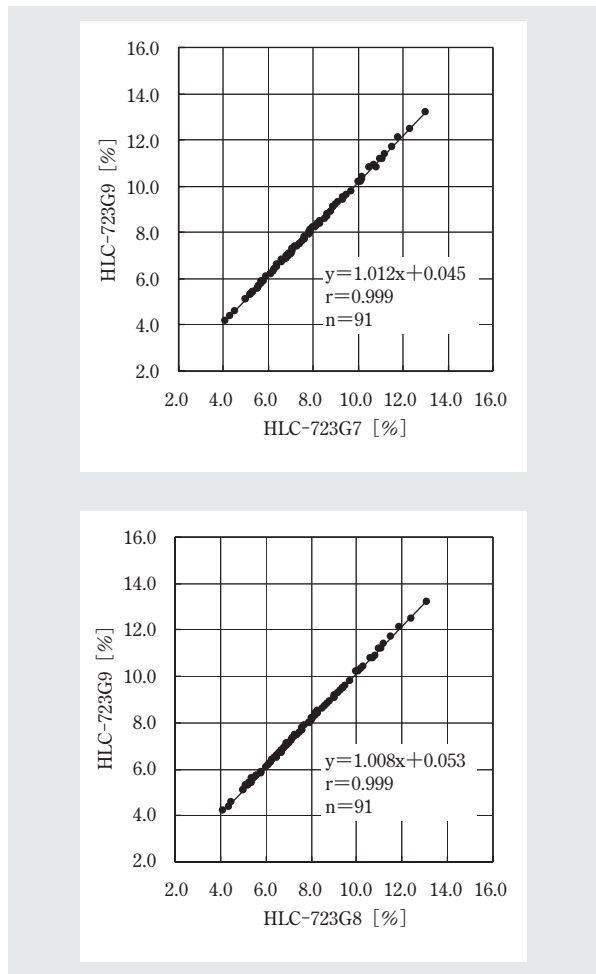


図3 G9と既存モデルG7、G8とのHbA_{1c} (%)の相関性

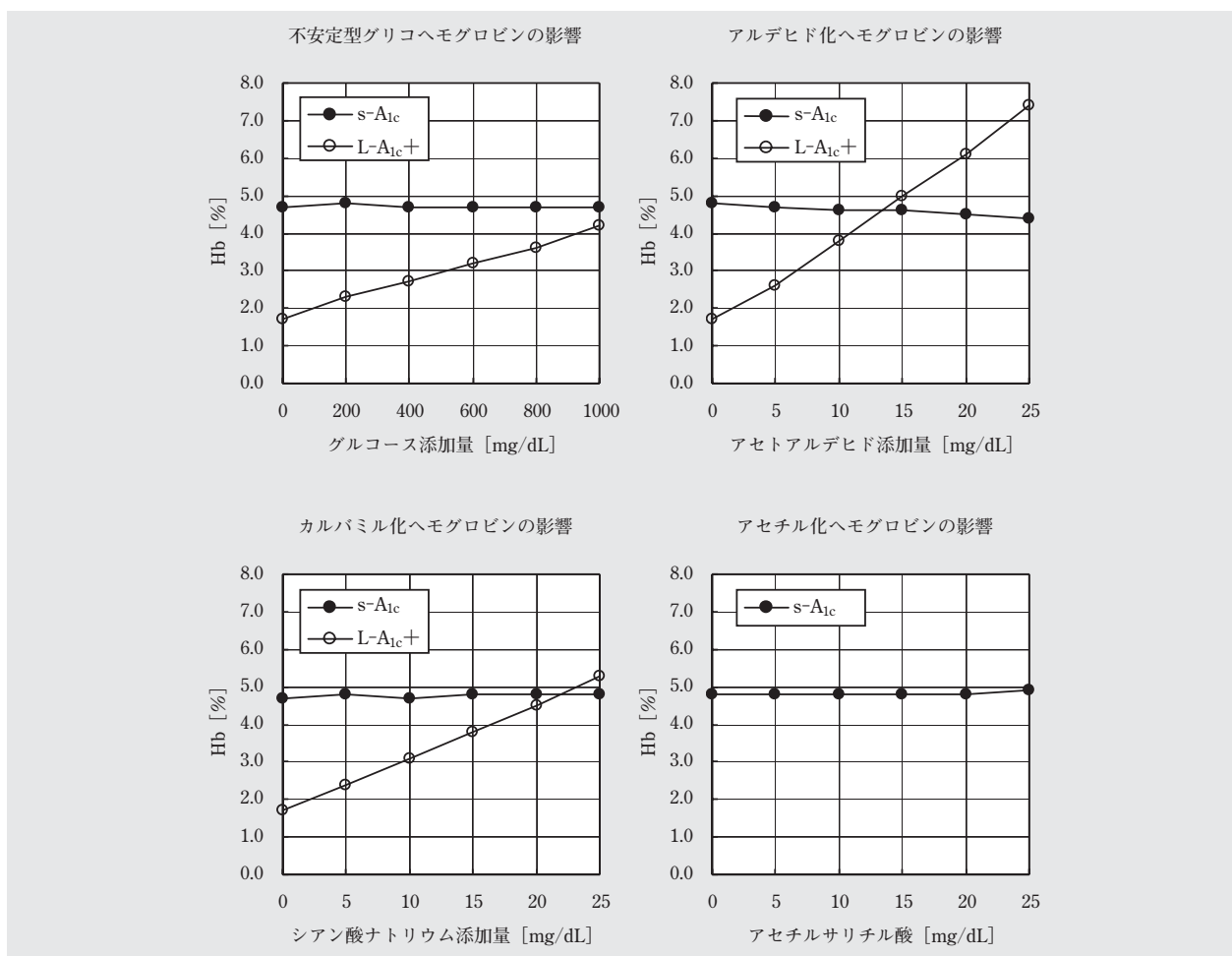


図4 修飾ヘモグロビンがHbA_{1c}値に及ぼす影響

(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は、アルデヒド化ヘモグロビンが増加する。アセトアルデヒド添加量の増加と共にL-A_{1c}値が増加しており、アルデヒド化ヘモグロビンがL-A_{1c}分画に溶出していた。s-A_{1c}値への影響はアセトアルデヒド添加量で25mg/dLまで認められなかった。

(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すると、カルバミル化ヘモグロビンが増加する。カルバミル化ヘモグロビンについても、L-A_{1c}分画に溶出していた。s-A_{1c}値への影響はシアン酸ナトリウム添加量で25mg/dLまで認められなかった。

(4) アセチル化ヘモグロビンの影響

アセチルサリチル酸ナトリウムを添加すると、アセチル化ヘモグロビンが増加する。アセチルサリチル酸の添加量を増加させても、どの分画にも変化はなく、s-A_{1c}値への影響も25mg/dLまで認められなかった。

[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、乳ビの影響を確認した。図5に結果を示した。遊離型ビリルビン、包括型ビリルビンは20mg/dLまで、乳ビは1430ホルマジン濁度まで添加の影響を受けなかった。

[5] 希釈直線性

HbA_{1c}値は、s-A_{1c}濃度を総ヘモグロビン濃度で除した値で示されるので、同一検体であれば、総ヘモグロビン濃度が増加しても、一定の値をとる。しかし、通常4~10%であるs-A_{1c}とヘモグロビン成分のうち約80~95%を占めるヘモグロビンA₀とで濃度が異なるため、HPLC法の装置では両成分を精度良く検出することのできる検出器を搭載する必要がある。G9では検出器セルの構造を見直し、セル内径の拡大、光源部のセル方向以外への遮光追加、検出器基板の見直しによって、希釈直線性を一定にすることに成功した。HbA_{1c}値が約5.0%の検体と約10.0%の検体を用いて、

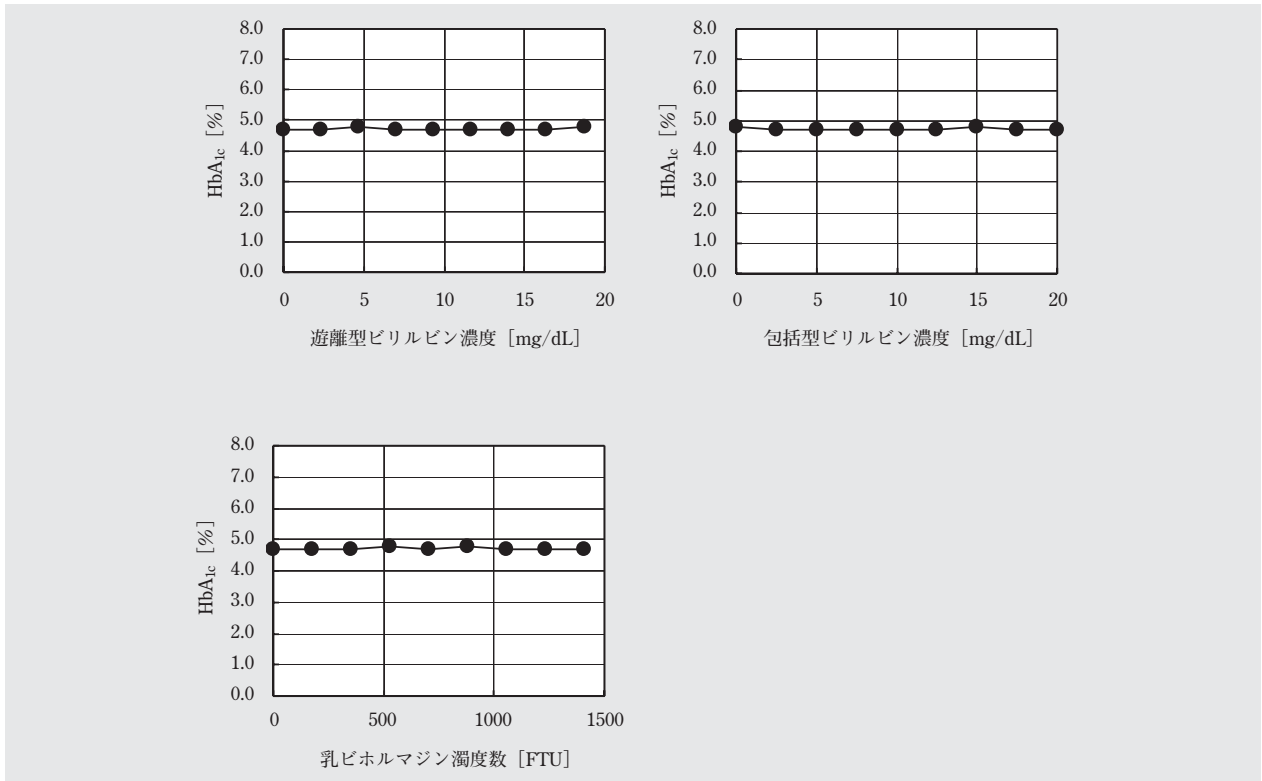


図5 干渉物質がHbA_{1c}値に及ぼす影響

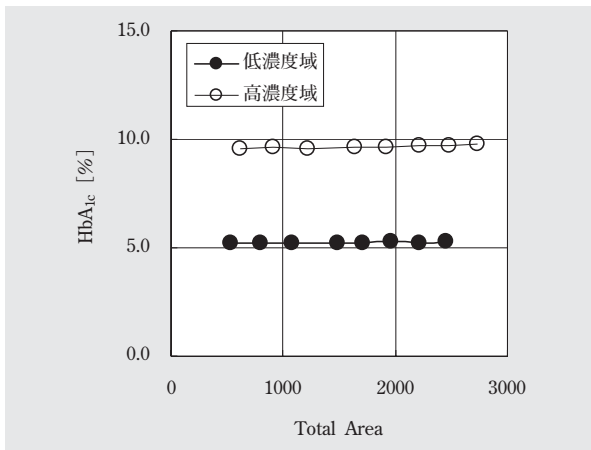


図6 総ヘモグロビン量がHbA_{1c} (%) に与える影響

総ヘモグロビン量を約5～約30g/Lまで変化させた場合のTotal AreaとHbA_{1c}値の関係を図6に示した。総ヘモグロビン濃度の上昇と共にTotal Areaは増加するが、HbA_{1c}値は一定の値を示した。

5. まとめ

G9は初検体の結果出力までが90秒の迅速性と80検体/時間の処理能力を実現した自動グリコヘモグロビン分析計である。本開発品のHbA_{1c}値の同時再現性、日差再現性はCV% 1%以下であり、高精度な測定が可能である。前モデルであるG7、G8とも高い相関性を維持しており、また、修飾ヘモグロビンや総ヘモグロビン濃度の影響を受けず、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。