

●東ソー自動グリコヘモグロビン分析計 HLC-723[®]GR01 β -サラセミアモードの開発

バイオサイエンス事業部 第二開発部 臨床液クロ G

目黒 友啓
須貝 龍久
荻野 慎士
村上 卓司

1. 緒言

血液中のヘモグロビンの分析は、糖尿病診断のほか、悪性貧血を引き起こす β -サラセミア症に代表されるヘモグロビン異常症の診断に欠かせないものになっている。当社は糖尿病診断のために HPLC 技術を応用した自動グリコヘモグロビン分析計を 1983 年に上市しており、後継モデルの HLC-723GHbV（以下、GHbV）からはヘモグロビン異常症の分析モードを搭載した。今回は GHbV から 4 世代目であり、HLC-723G11（以下、G11）後継機となる最新機種 HLC-723GR01（以下、GR01）に搭載するヘモグロビン異常症分析モードを開発した。

ヘモグロビン異常症には、ヘモグロビンの生産性異常が起こっている場合（e.g. β -サラセミア症）と、ヘモグロビンの一部に変異が発生している場合（e.g. 異常ヘモグロビン HbE, HbD, HbS, HbC）との 2 種類がある。なかでも、 β -サラセミア症の罹患者は世界人口の約 3% と非常に多く、年間約 60,000 人の罹患した新生児が生まれている¹⁾。有病率には地域性があり、地中海地域・中東地域・アジアの一部などで高頻度である。 β -サラセミア症の臨床症状は重度の貧血から無症状まで多様であるが、重症性の β -サラセミア症は輸血依存性である。そのため、高有病率の国では β -サラセミア症の早期診断と蔓延防止を目的とした検査のガイドラインが制定されている^{2,3)}。このとき、 β -サラセミア症のスクリーニング検査で、まず確認されるのがヘモグロビン種の構成比である。

2 種類のサブユニットをそれぞれ 2 つずつ有するグロビン 4 量体であるヘモグロビンは、正常成人において HbA0 ($\alpha 2; \beta 2$) と、HbA2 ($\alpha 2; \delta 2$)、HbF ($\alpha 2; \gamma 2$) の 3 種で構成されており、その存在比はそれぞれ 95 ~ 96%、2 ~ 3%、0.5 ~ 1.5% である。一方、 β 鎖の産生が減少する β -サラセミア症患者では、 β 鎖を構成要素とする HbA0 が減少し相対的に HbA2 と HbF の存在比が上昇するため、 β -サラセミア症の診

断においてこれらを正確に定量できることが重要となる。くわえて、 β -サラセミア症の高罹患率地域では、ヘモグロビンの一部が変異した異常ヘモグロビン HbS（鎌状赤血球）⁴⁾ や HbE⁵⁾ の罹患率が高い傾向がある。 β -サラセミア症と異常ヘモグロビン症とが併発（HbS/ β -thalassemia、HbE/ β -thalassemia）した場合は、臨床症状が重症化するため、HbA2 と HbF だけでなく異常ヘモグロビンも同時に測定できる手法の開発が強く求められている。

今回、我々は β -サラセミア症のスクリーニング検査と、主要な異常ヘモグロビン（HbS, HbC, HbE, HbD）の検出とヘモグロビン異常症の診断補助とを目的とした GR01 β -サラセミアモードを開発した。本報告では、GR01 β -サラセミアモードの主な仕様や基本性能試験結果の一部を紹介する。

本製品開発は全世界に罹患者のいる β -サラセミア症患者に、適切な診断や治療を提供するための一助として医療に貢献することを目指すものである。

2. HLC-723GR01 について

GR01 は大型ディスプレイを採用し、従来機種よりも視認性及び画面上での操作性を向上させたユーザビリティの高い装置である（図 1）。2022 年に上市された、糖尿病の診断マーカーである HbA1c を 30 秒で測定できる Standard Short モードと、主要な異常ヘモグロビンの影響を排除して HbA1c を測定できる Standard Long モードにくわえて、今回新たに β -サラセミアモードを実装した。これらの分析モード間の切り替えをする際には、煩雑な溶離液の置換やカラムの平衡化が全て自動で実行されるため、溶離液とカラムの交換後に、測定モードを選択するだけで測定の準備が完了する。そのほかにも、消耗品交換も容易に実施できるように手順が図示された消耗品交換画面や、精度管理試薬の測定結果をトレンド表示できる管理画面を設けている。



図1 GR01の装置外観

3. GR01 β -サラセミアモードの特徴

GR01 β -サラセミアモードはヒト全血検体を測定対象とする陽イオン交換液体クロマトグラフィー法 (HPLC 法) である。測定値に対し高い再現性と精密性とを併せ持つ HPLC 法は β -サラセミア症診断で汎用されている。GR01 β -サラセミアモードでは5分間の測定時間で7つの分画に分離し、総ヘモグロビンに対する HbF と HbA2 の比率を算出するとともに主要な異常ヘモグロビンを検出する (表1)。

表1 GR01 β -サラセミアモードの仕様

機種	GR01
測定モード	β -サラセミア
検体の種類	全血
測定時間	5分
主要なヘモグロビン HbF, HbA0, HbA2 の分画	F, A0, A2
HbA2 測定範囲	1.0 ~ 10.7%
HbF 測定範囲	0.5 ~ 82%
主要な異常ヘモグロビン HbE, HbD, HbS, HbC の分画	E+, D+, S+, C+
7分画以外のピーク名称	PXX
検出可能ピーク数	20

GR01 β -サラセミアモードのクロマトグラムは、紙面印刷だけでなく大型 LCD ディスプレイ上にも表示される (図2)。未知ピーク (PXX) として検出される主要7分画以外に溶出したピークは、エリア%の大きい順に画面に表示されるため、主要7分画以外の異常ヘモグロビンが疑われるピーク (エリア%が大きいピーク) の存在を、操作者がより容易に認識できる。

GR01 β -サラセミアモードと前機種である G11 β -サラセミアモードのクロマトグラムを図3に示した。 β -サラセミアモードの測定対象である HbF と HbA2 は微小成分であることから、他の成分と十分に分離で

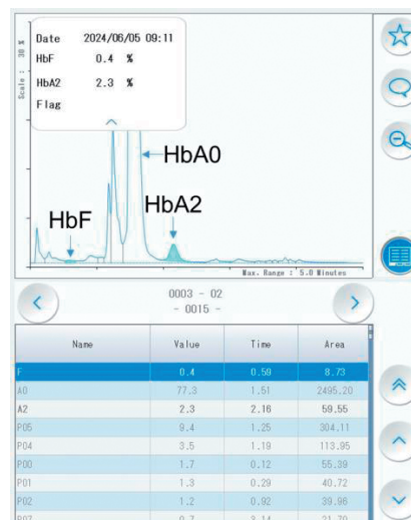
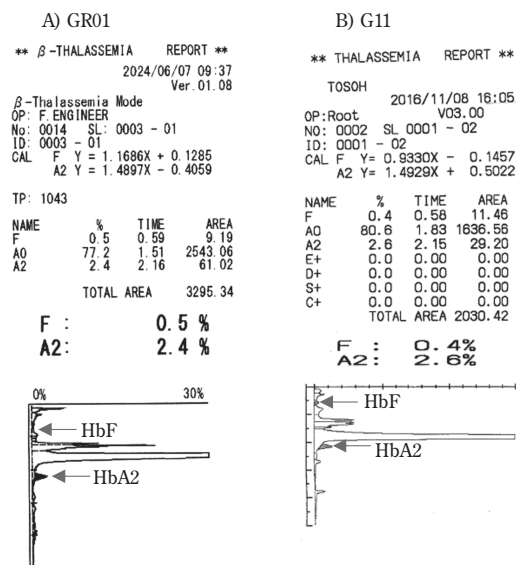


図2 装置上の表示画面

きていることが正確な定量分析のために重要となる。GR01 β -サラセミアモードでは溶離液とカラムの最適化を進めることで、G11 β -サラセミアモードと比べて HbF と HbA2 の分離性能が大幅に向上し、測定値の堅牢性が高くなった。とくに、HbA0 の直後に溶出する HbA2 の分離を大きく改善できたことは特筆すべき点である。

GR01 β -サラセミアモードは主要な異常ヘモグロビンである HbE、HbD、HbS、HbC を個別に分離・検出し、それぞれ E+分画、D+分画、S+分画、C+分画として同定する (図4)。HbF と HbA2 を正確に定量するためには、これらの異常ヘモグロビン成分が HbF と HbA2 との両方から十分に分離されていることが必

図3 GR01 β -サラセミアモードと G11 β -サラセミアモードのクロマトグラムの比較

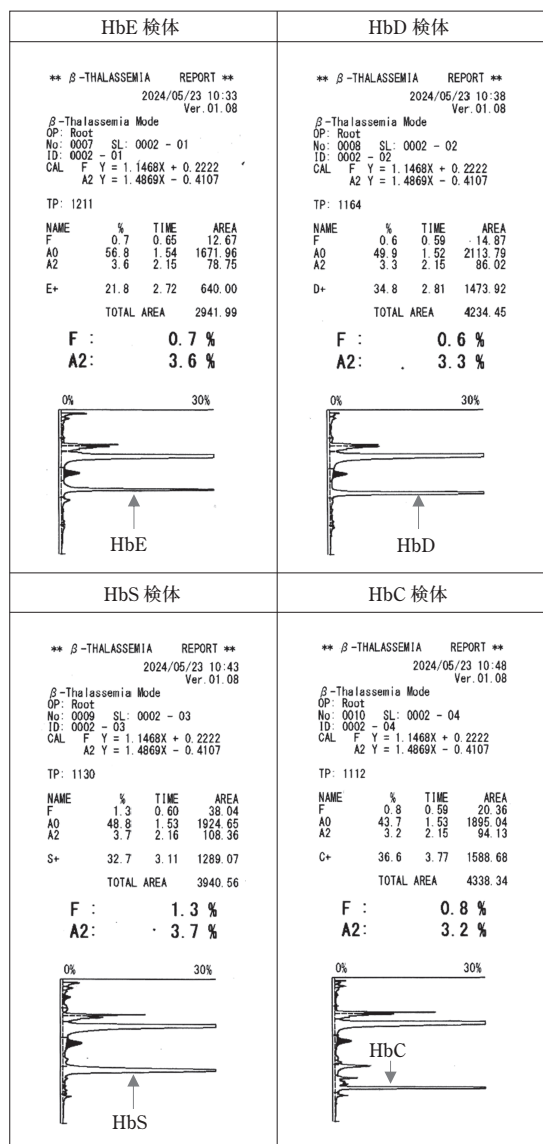


図4 主要な異常ヘモグロビンの測定例

要である。当社の G11 および GR01 β -サラセミアモードでは、他の HPLC 法では達成困難な HbA2 と HbE との分離が可能であることから、HbE/ β -thalassemia 症患者の HbA2 値も測定できることが特徴である。

4. 基本性能評価

[1] 同時再現性試験と日差再現性試験

GR01 β -サラセミアモードは良好な測定再現性を示す(表2と3)。精度管理用サンプルを連続測定 (n = 20) した同時再現性試験において、HbF 値の変動係数 CV は 2% 以下で HbA2 値の変動係数 CV は 1% 以下だった。また、精度管理用サンプルを 1 日 2 回ずつ 20 日間測定した日差再現性試験において、HbF 値と HbA2 値の変動係数 CV はどちらも 2% 以下だった。

表2 HbF の同時再現性と日差再現性

HbF		低HbF サンプル	高HbF サンプル
同時再現性	平均値 (%)	2.01	6.61
	SD (%)	0.02	0.02
	CV (%)	1.12	0.34
日差再現性	平均値 (%)	2.03	6.66
	SD (%)	0.02	0.02
	CV (%)	1.00	0.45

表3 HbA2 の同時再現性と日差再現性

HbA2		低HbA2 サンプル	高HbA2 サンプル
同時再現性	平均値 (%)	3.71	6.70
	SD (%)	0.01	0.02
	CV (%)	0.27	0.33
日差再現性	平均値 (%)	3.75	6.57
	SD (%)	0.04	0.09
	CV (%)	1.02	1.42

[2] 測定可能レンジ

GR01 β -サラセミアモードは広範囲の濃度域で測定値の直線性を有していた。低濃度サンプルと高濃度サンプルとを種々の比率で混合したサンプルを測定し、実測値と予測値とから回収率を算出する添加回収試験で測定値の直線性を確認した。表4と5に試験結果を示す。このとき、HbF は 0.5% と 82.0% の検体を、HbA2 は 1.0% と 10.7% の検体を使用した。結果として、HbF は 100 ± 5% の回収率が、HbA2 では 100 ± 3% の回収率が得られた。HbF と HbA2 の測定可能レンジはそれぞれ 82.0% と 10.7% とであることが確認された。

GR01 β -サラセミアモードの定量限界 (LOQ) を HbF 値と HbA2 値が低い 10 検体をそれぞれ用意し、

表4 HbF の直線性

高濃度 サンプル (混合比)	低濃度 サンプル (混合比)	実測値 HbF (%)	予測値 HbF (%)	回収率 (%)
0	10	0.5	0.5	—
1	9	8.3	8.7	95
2	8	16.1	16.8	96
3	7	24.1	25.0	96
4	6	32.4	33.1	98
5	5	41.2	41.3	100
6	4	48.4	49.4	98
7	3	56.6	57.6	98
8	2	64.9	65.7	99
9	1	73.7	73.9	100
10	0	82.0	82.0	—

表5 HbA2の直線性

高濃度 サンプル (混合比)	低濃度 サンプル (混合比)	実測値 HbA2 (%)	予測値 HbA2 (%)	回収率 (%)
0	10	1.0	1.0	—
1	9	2.0	2.0	100
2	8	3.0	2.9	103
3	7	4.0	3.9	103
4	6	4.9	4.9	100
5	5	5.8	5.9	98
6	4	6.8	6.8	100
7	3	7.7	7.8	99
8	2	8.7	8.8	99
9	1	9.5	9.7	98
10	0	10.7	10.7	—

3日間毎日2重測定して算出した。許容誤差限界のCV10%におけるHbFとHbA2のLOQはそれぞれ0.2%と1.0%であり、診断に使用されているカットオフ値(HbF = 5.0%, HbA2 = 2.8%)よりも十分に低かったことから、GR01 β -サラセミアモードが β -サラセミア症診断に十分な感度を有していることが示された。(表6)。

表6 HbFとHbA2のLOQ

許容誤差限界 CV	LOQ (HbF)	LOQ (HbA2)
10%	0.2%	1.0%
5%	0.4%	1.7%

5. 総括

今回開発したGR01 β -サラセミアモードは、前機種G11 β -サラセミアモードと同等の高い再現性と、より優れた分離性能を有する分析計である。HbFおよびHbA2と他のヘモグロビン成分との分離が大きく改善されていることから、 β -サラセミア症と異常ヘモグロビン症の併発患者においてもより正確な測定が期待できることから β -サラセミア症の検査、診断により有益な分析計である。

参考文献

1. R. Kumar, et al., Global distribution of β -thalassemia mutations: An update, *Gene*, **896**, 148022 (2024)
2. Public Health England, NHS Sickle Cell and Thalassemia Screening Programme (2016)
3. Ministry of Health & Family Welfare Government

of India, PREVENTION AND CONTROL OF HEMOGLOBINOPATHIES IN INDIA – THALASSEMIAS, SICKLE CELL DISEASE AND OTHER VARIANT HEMOGLOBINS (2016)

4. Global Burden of Disease Study 2021 (GBD 2021) Sickle Cell Disease Collaborators, Global, regional, and national prevalence and mortality burden of sickle cell disease, 2000–2021: a systematic analysis from the Global Burden of Disease Study 2021, *Lancet Haematol.*, **10** (8), E585 (2023)
5. E. Vichinsky, Hemoglobin E Syndromes, *Hematology Am. Soc. Hematol. Educ. Program*, **2007**(1), 79 (2007)

本報告中にある“HLC-723”は日本およびその他の国における東ソー株式会社の登録商標です。

開発担当者

第二開発部臨床液クロG (南陽)

須貝龍久、目黒友啓、中康博、西玲哉、金好秀馬 (現セパレーションG)

第二開発部システムG

中村竜也