

## 〔 研究 〕

# 免疫反応を用いた HbA<sub>1c</sub> 測定試薬の比較検討

浜松赤十字病院

吉田 仁 小野 千明  
川越 功

## 【 は じ め に 】

ヘモグロビンA<sub>1c</sub> (HbA<sub>1c</sub>) は、ヘモグロビンβ鎖N末端残基バリンのアミノ基にグルコースのアルデヒド基がシッフ塩基を形成して結合し、さらにアマドリ転移をうけてケトアミンを形成したものである。HbA<sub>1c</sub>は1~2ヶ月前の平均血糖値を反映することから、糖尿病患者の血糖コントロールの指標として臨床的に広く利用されている。

HbA<sub>1c</sub>の測定は高速液体クロマトグラフィー (HPLC) 法が主流を占めているが、専用の分析装置を必要とすること、検体処理数に制限があること、HbA<sub>1c</sub>以外のヘモグロビン (Hb) 分画を加味して測定してしまう場合があるなど幾つかの問題点が指摘されていた。

最近、抗原抗体反応を利用して自動分析装置で測定可能な測定法が各社より発売されている。今回我々は、ラテックス凝集法を用いた測定法「デタミナーHbA<sub>1c</sub>」(協和メディックス、以下A法)と「コバス試薬HbA<sub>1c</sub>」(ロシュ、以下B法)をCOBAS MIRA Plus (ロシュ)を用いて検討を行い若干の知見を得たので報告する。

## 【測定試薬及び測定原理】

A法：デタミナーHbA<sub>1c</sub> (協和メディックス)

R-1：ラテックス試薬

未感作ラテックス

R-2：抗体液

抗固相化HbA<sub>1c</sub>モノクローナル抗体

抗マウスIgGヤギポリクローナル抗体

検体希釈用液

標準液：5濃度 (Std 0~4)

遠心分離 (2000rpm - 2分) により得られた血球層の下層より血球10μlを採取し、検体希釈用液1.0mlを加え溶血させたものを検体として使用した。

溶血液中のHbとHbA<sub>1c</sub>は未感作ラテックス表面に非特異的に吸着する。このときラテックス表面に固相化されるHbとHbA<sub>1c</sub>の割合は検体中に存在するHbとHbA<sub>1c</sub>と同一の割合で吸着する。

固相化ヒトHbA<sub>1c</sub>に特異的なモノクローナル抗体を添加し、ラテックス-HbA<sub>1c</sub>-抗ヒトHbA<sub>1c</sub>マウスモノクローナル抗体複合体を形成させる。この複合体は抗マウスIgGヤギ抗体によって凝集するが、凝集量はラテックス表面に固相化したHbA<sub>1c</sub>量に依存する。

検体中の総Hbに占めるHbA<sub>1c</sub>の比率%は、凝集量の差となって表れるため、これを吸光度の変化量として測定することによりHbA<sub>1c</sub>の比率を測定する。

B法：コバス試薬HbA<sub>1c</sub> (ロシュ)

R-1：Hb試薬

リン酸三カリウム

R-2 : ラテックス試薬

抗HbA<sub>1c</sub>マウスモノクローナル抗体

吸着ラテックス

R-3 : 凝集試薬

合成多価HbA<sub>1c</sub>抗原

HbA<sub>1c</sub>溶血試薬

標準液 : 1濃度

全血検体を溶血させ、ペプシン処理によりHbA<sub>1c</sub>をβ鎖N末端断片に分解する。検体中のHbA<sub>1c</sub>抗HbA<sub>1c</sub>β鎖N末端マウスモノクローナル抗体吸着ラテックスと結合する。これに合成多価HbA<sub>1c</sub>抗原を反応させると、検体中のHbA<sub>1c</sub>と結合したラテックスは凝集試薬との反応は阻害され、ラテックスは凝集しない。凝集を550nmで捉え、検量線よりHbA<sub>1c</sub>濃度を算出する。

Hb濃度はアルカリヘマチン法により測定する。

### 【測定条件】

測定パラメーターは表1の通りである。

A法のメーカー指定の測定条件は最終測光ポイントで測定する条件であったが、図1の各標準液及び図2の採血容器別の反応曲線のようにR-1での反応過程に違いが認められるため、全体の反応の吸光度変化量から第一試薬の吸光度変化量を引いたものを変化量として計算するように設定した。

B法はR-1で総Hb濃度を測定し、R-2とR-3でHbA<sub>1c</sub>濃度を測定する。検体はCOBAS MIRA Plusにより溶血試薬にて51倍に自動希釈して測定する。検体は全血を機器にセットして測定した。

HPLC法は、HLC-723GHbⅢ(東ソー)

を用いて測定した。

図1 各STの反応曲線

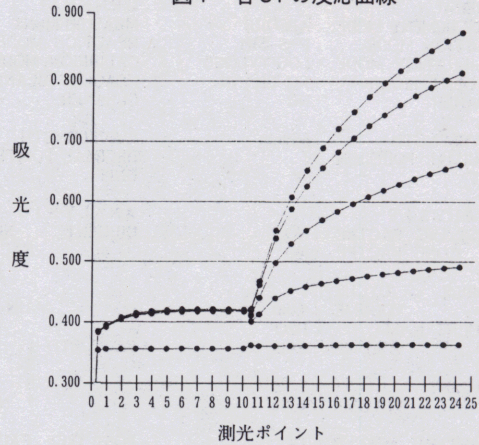
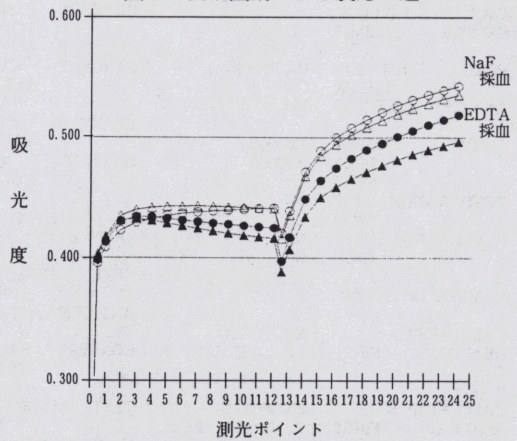


図2 抗凝固剤による反応の違い



### 【検討内容】

A法について以下の1)、2)の検討をまず行い、その後A法とB法について3)~7)の検討を行った。

- 1) 検体溶血操作の条件
- 2) 採血容器による差
- 3) 同時再現性
- 4) 日差再現性
- 5) ヘモグロビン濃度による影響
- 6) 不安定型HbA<sub>1c</sub>の影響
- 7) HPLC法との相関

表1 COBAS MIRA Plus パラメーター

A 法	B 法 (A <sub>1c</sub> )	B 法 (HGB)
GENERAL	GENERAL	GENERAL
MEASUREMENT MODE : ABSORB	MEASUREMENT : ABSORB	MEASUREMENT MODE : ABSORB
REACTION MODE : R-S-SR1	REACTION MODE : D-R-S-SR1	REACTION MODE : D-R-S
CALIBRATION MODE : LOGIT/LOG5	CALIBRATION MODE : LOGIT/LOG5	CALIBRATION MODE : FACTOR
REAGENT BLANK : NO BLANK	REAGENT BLANK : NO BLANK	REAGENT BLANK : REAG/DIL
CLEANER : NO	CLEANER : NO	CLEANER : NO
WAVELENGTH : 660nm	WAVELENGTH : 550nm	WAVELENGTH : 550nm
DECIMAL POSITION : 1	DECIMAL POSITION : 2	DECIMAL POSITION : 2
UNIT : %	UNIT : umol/l	UNIT : umol/l
ANALYSIS	ANALYSIS	ANALYSIS
POST DIL. FACTOR : NO	DILUENT NAME : HAEM	DILUENT NAME : HAEM
CONC. FACTOR : NO	FACTOR : 51.00	FACTOR : 51.00
SAMPLE CYCLE : 1	TIME : NO	TIME : NO
VOLUME : 4.0ul	STD : MAIN	POST DIL. FACTOR : NO
DILUENT NAMA : H2O	MAIN STD : 25.60umol/l	CONC. FACTOR : NO
VOLUME : 0.0ul	POS : 1	SAMPLE CYCLE : 1
REAGENT : 1	FACT. STD-1 : 1.00 2 : 2.00	VOLUME : 20.0ul
VOLUME : 150ul	3 : 2.00 4 : 2.00	DILUENT NAME : H2O
ATART R1 CYCLE : 13	5 : 2.00 6 : 2.00	VOLUME : 20.0ul
VOLUME : 50.0ul	7 : NO 8 : NO	REAGENT CYCLE : 1
DILUENT NAME : H2O	POST DIL. FACTOR : NO	VOLUME : 100ul
VOLUME : 0.0ul	CONC. FACTOR : NO	CALCULATION
CALCULATION	SAMPLE CYCLE : 1	SAMPLE LIMIT : NO
SAMPLE LIMIT : NO	VOLUME : 4.0ul	REAC. DIRECTOM : INCREASE
REAC. DIRECTION : INCREASE	DILUENT NAME : H2O	CHECK : OFF
CHECK : ON	VOLUME : 8.0ul	CONVERS FACTER : 1.00000
ANTIGEN EXCESS : NO	REAGENT CYCLE : 1	OFFSET : 0.00000
CONVERS FACTER : 1.00000	VOLUME : 160ul	TEST RANGE LOW : 50.00umol/l
OFFSET : 0.00000	START R1 CYCLE : 2	HIGH : 400.00umol/l
TEST RANGE LOW : ON	VOLUME : 32.0ul	NORM. RANGE LOW : NO
HIGH : ON	DILUENT NAME : H2O	HIGH : NO
NORM. RANGE LOW : NO	VOLUME : 8.0ul	NUMBER OF STEPS : 1
HIGH : NO	CALCULATION	CALC. STEP A : ENDPOINT
NUMBER OF STEPS : 2	SAMPLE LIMIT : NO	READINGS FIRS : CB LAST : 20
CALC. STEP A : ENDPOINT	REAC. DIRECTION : INCREASE	CALIBRATION
RBADINGS FIRST : CB LAST : 24	CHECK : OFF	CALIB. ENTEVAL : EACH RUN
CALC. STEP B : ENDPOINT	ANTIGEN EXCESS : NO	BLANK
READINGS FIRST : T1 LAST : T2	CONVERS FACTER : 1.00000	REAG. RANGE LOW : NO
FORMULA : A - B	OFFSET : 0.00000	HIGH : NO
CALIBRATION	TEST RANGE LOW : ON	BLANK RANGE LOW : -0.0050 ΔA
CALIB. INTBRVAL : ON REQUEST	HIGH : ON	HIGH : 0.0050 ΔA
STANDARD POS : 1	NORM. RANGE LOW : NO	FACTOR : 44.70
1 : 0.0 2 : 4.6%	HIGH : NO	CONTROL
3 : 7.9 4 : 11.2%	NUMBER OF STEPS : 1	CSI POS : NO
5 : 14.5 6 : NO %	CALC. STEP A : ENDPOINT	CS2 POS : NO : NO
7 : NO 8 : NO	READINGS FIRST : 1 LAST : 8	CS3 POS : NO : NO
REPLICATE : SINGLE	CALIBRATION	《RATIOS》
DEVIATION : NO	CALIB. INTERVAL : ON REQUEST	TEST A : A1C B : HB
CORRECTION STD : NO	STANDARDS	C : D :
CONTROL	1 : 25.60 2 : 12.80 %	CONST a : 211.000 b : 1.58000
CSI POS : NO	3 : 6.40 4 : 3.20 %	c : 0.00000 d : 0.00000
CS2 POS : NO	5 : 1.60 6 : 0.80 %	FORMULA : a * A/B + b
CS3 POS : NO	7 : NO 8 : NO	DECIMAL POSITION : 2
CONTROL	REPLICATE : SINGLE	UNIT : %
CSI POS : NO	DEVIATION : NO	NORM. RANGE LOW : NO %
CS2 POS : NO	CORRECTION STD : NO	HIGH : NO %
CS3 POS : NO	CONTROL	
	CSI POS : NO	
	CS2 POS : NO	
	CS3 POS : NO	

## 【 検 討 結 果 】

## 1) 検体溶血操作の条件

A法は検体を2000rpm - 2分間遠心して得られた血球層の下層から検体を採取して溶血操作を行うが、全血を溶血操作した場合の値をHPLC法と比較した。10検体を用いて血糖測定用のNaF添加の採血管とEDTA採血との比較を行った。HPLC法はEDTA採血とした。

表2のようにHPLC法と比較して全血ではやや高めの測定値、2000rpm - 2分の測定値はHPLC法とほぼ一致した。EDTA採血とNaF採血の測定値の差は認められなかった。

表2 検体採取条件

	HPLC	全 血		2000rpm-2min	
		EDTA	NaF	EDTA	NaF
1	6.1	6.2	6.4	6.5	6.1
2	9.5	9.8	9.6	9.7	9.5
3	9.1	9.1	9.3	9.1	9.1
4	5.3	5.7	5.8	5.4	5.5
5	5.8	6.4	6.1	6.4	6.1
6	5.7	6.0	5.9	6.1	5.7
7	7.2	8.2	7.9	7.6	7.5
8	5.4	5.5	5.5	5.4	5.3
9	5.4	5.5	5.6	5.4	5.2
10	9.1	9.0	8.8	9.0	8.9
MEAN	6.86	7.14	7.09	7.06	6.89
MAX	9.5	9.8	9.6	9.7	9.5
MIN	5.3	5.5	5.5	5.4	5.2

## 2) 採血容器による差

血糖測定と同一の採血管でHbA<sub>1c</sub>を測定することを想定してEDTA採血とNaF添加の採血管との比較を20検体で行った。結果を表3に示した。EDTA採血とNaF添加の採血管による測定値の差は認められなかった。

表3 採血容器による相違

	HPLC	EDTA	NaF
1	6.3	6.4	6.5
2	8.6	8.7	8.9
3	5.7	6.0	5.5
4	6.5	6.4	6.7
5	6.3	6.5	6.3
6	7.3	7.4	7.7
7	7.1	7.3	7.2
8	6.8	6.9	6.6
9	9.4	9.5	9.8
10	8.5	8.2	8.7
11	6.1	6.2	6.4
12	9.5	9.8	9.6
13	9.1	9.1	9.3
14	5.3	5.7	5.8
15	6.0	6.4	6.1
16	5.7	6.0	5.9
17	7.8	8.2	7.9
18	5.4	5.5	5.5
19	5.4	5.5	5.6
20	9.1	9.0	8.8
MEAN	7.10	7.24	7.24
MAX	9.5	9.8	9.8
MIN	5.3	5.5	5.5

## 3) 同時再現制

A法は、標準液2濃度、コントロール1濃度、患者検体3濃度を、B法は、ロシュ社コントロールN、Pをそれぞれ10回測定した。結果を表4に示した。A法はCV1.11%~1.82%、B法はCV1.13%~2.06%と良好な再現性であった。

## 4) 日差再現性

A法は、標準液2濃度、コントロール1濃度を、B法は、コントロールN、Pをそれぞれ10日間測定した。結果を表5に示した。A法はCV1.90%~2.13%、B法はCV2.83%~2.94%と良好な日差再現性であった。

表4 同時再現性

A 法 (%)

	患者検体			R-St	CAL-1	CAL-2
1	4.8	9.2	12.5	9.4	5.5	10.7
2	4.7	9.2	12.4	9.1	5.6	10.4
3	4.8	9.1	12.4	9.1	5.5	10.9
4	4.7	9.3	11.9	9.2	5.7	10.7
5	4.8	9.1	12.3	9.5	5.7	11.0
6	4.7	9.2	11.9	9.1	5.5	10.4
7	4.7	9.1	12.0	9.2	5.5	10.9
8	4.6	9.1	12.2	9.1	5.6	10.7
9	4.7	9.4	11.8	9.4	5.6	10.6
10	4.8	9.1	12.0	9.3	5.6	10.9
MEAN	4.73	9.18	12.14	9.24	5.58	10.72
MAX	4.8	9.4	12.5	9.5	5.7	11.0
MIN	4.6	9.1	11.8	9.1	5.5	10.4
R	0.2	0.3	0.7	0.4	0.2	0.6
SD	0.067	0.103	0.250	0.151	0.079	0.210
CV	1.43	1.13	2.06	1.63	1.14	1.96

B 法

	コントロール N			コントロール P		
	Hb(umol/l)	A <sub>1c</sub> (umol/l)	A <sub>1c</sub> (%)	Hb(umol/l)	A <sub>1c</sub> (umol/l)	A <sub>1c</sub> (%)
1	161.17	2.08	4.3	183.29	7.05	9.7
2	160.03	1.99	4.2	181.92	7.09	9.8
3	157.98	2.04	4.3	185.34	7.13	9.7
4	157.76	1.96	4.2	181.69	6.91	9.6
5	158.21	1.96	4.2	183.97	6.99	9.6
6	158.90	1.90	4.1	182.83	6.86	9.5
7	159.12	1.98	4.2	184.20	6.83	9.4
8	157.98	1.96	4.2	183.29	6.71	9.3
9	158.90	1.97	4.2	183.74	6.72	9.3
10	160.03	1.91	4.1	183.97	6.73	9.3
MEAN	159.008	1.974	4.20	183.424	6.902	9.52
MAX	161.17	2.08	4.3	185.34	7.13	9.8
MIN	157.76	1.90	4.1	181.69	6.71	9.3
R	3.41	0.18	0.2	3.65	0.43	0.5
SD	1.111	0.053	0.067	1.087	0.158	0.187
CV	0.70	2.67	1.59	0.59	2.29	1.97

5) ヘモグロビン濃度による影響

同一検体について希釈率を変え、ヘモグロビン濃度を変えてHbA<sub>1c</sub>を測定した。結

図3 ヘモグロビン濃度による影響

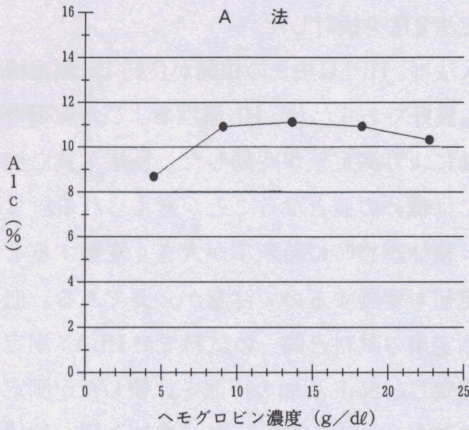


図4 ヘモグロビン濃度による影響

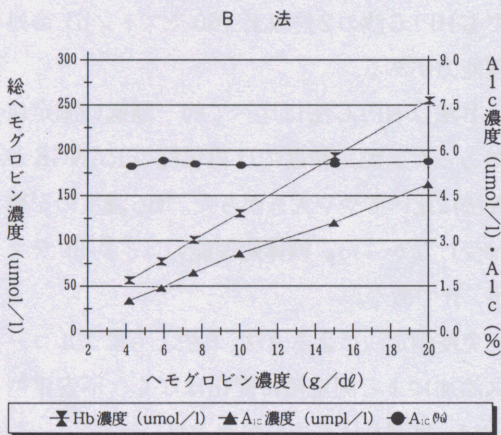
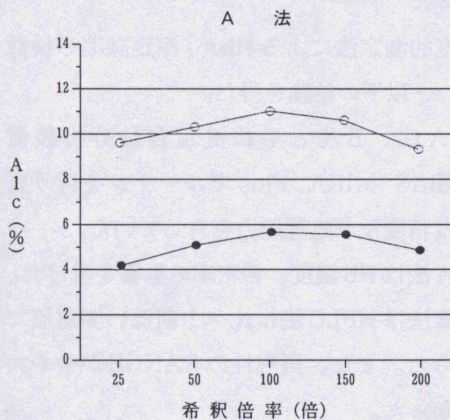


図5 希釈倍率の影響

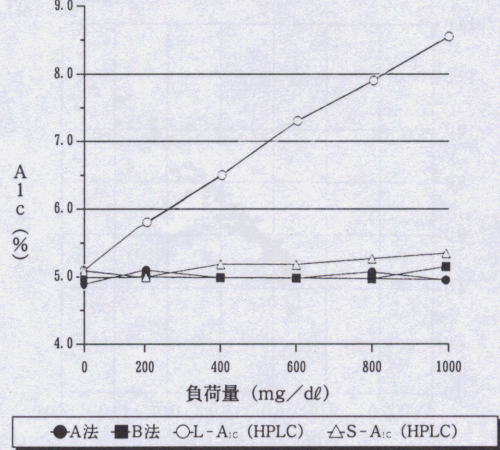


果を図3と図4に示した。A法はHb濃度9~18g/dLでほぼ同じ測定値を示したが、この範囲を外れると低い測定値が得られた。極端な貧血の場合、低値となる可能性がある。また、2検体について標準的な検体希釈倍率100倍を中心に25倍から200倍まで変更して測定値を比較した。結果を図5に示した。100倍希釈の測定値が一番高い値となり、希釈倍率が小さい場合も大きい場合もHbA<sub>1c</sub>測定値はやや低い値であった。検体希釈時に希釈率が大きく変わらないよう注意する必要がある。B法はHb濃度2~20g/dLでほぼ同じ測定値を示した。Hb濃度による変動は認められなかった。

6) 不安定型HbA<sub>1c</sub>の影響

検体にグルコースを200~1000mg/dL添加して37℃で4時間反応させ、不安定型HbA<sub>1c</sub>を作成し、HPLC法(不安定型HbA<sub>1c</sub>を測り込むモードと安定型HbA<sub>1c</sub>のみ測定するモード)とA法およびB法の影響を検討した。結果を図6に示した。不安定型HbA<sub>1c</sub>を測り込むHPLC法はグルコース添加量に応じてHbA<sub>1c</sub>測定値が増加した。免疫法であるA法とB法はグルコース添加によるHbA<sub>1c</sub>測定値の変動は認められなかった。

図6 不安定型の影響



7) HPLC法との相関

ルーチン検体120例についてHPLC法とA法およびB法の測定値を比較した。HPLC法(JDS標準)をXとしたときの2法との相関を図7と図8に示した。A法の回帰式は $Y = -0.03 + 1.02X$ 、相関係数 $r = 0.979$ と良好な相関であった。B法の回帰式は $Y = 0.00 + 0.89X$ 、相関係数 $r = 0.967$ とHPLC法に比べて約一割低い測定値であった。

図7 散布図

S - HbA<sub>1c</sub>

N = 120  
 $r = 0.979$   
 $Y = -0.03 + 1.02X$   
 X: MEAN = 6.74  
 SD = 1.861  
 Y: MEAN = 6.91  
 SD = 1.833

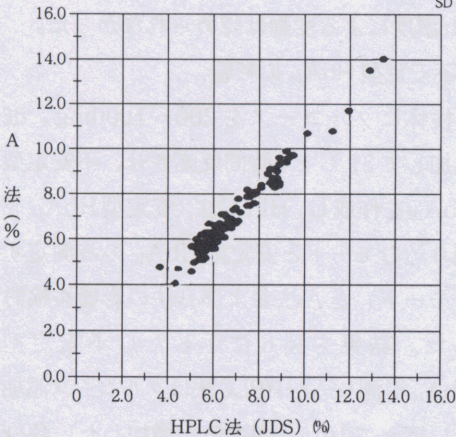
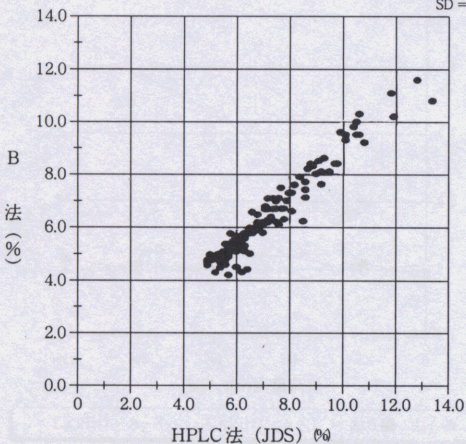


図8 散布図

S - HbA<sub>1c</sub>

N = 120  
 $r = 0.967$   
 $Y = 0.00 + 0.89X$   
 X: MEAN = 7.296  
 SD = 1.795  
 Y: MEAN = 6.509  
 SD = 1.657



【 考 察 】

HbA<sub>1c</sub>の測定法として一般的に使われているHPLC法とラテックス凝集を用いた免疫的測定法2法を検討した。

A法は、HPLC法との相関が良好で、測定精度も良好であったが、Hb濃度および希釈率の変動により測定値が変動した。極端な貧血検体では低めの値となることが考えられる。また、検体調整時に希釈率が大きく変動すると測定値も変動するので注意が必要である。血糖測定用の試料と同一の試料でのHbA<sub>1c</sub>測定を想定し、NaF添加の採血を比較したが測定値に差が認められなかった。血糖と同一検体での測定が可能である。検体処理能力においてもHPLC法の2倍以上(60テスト/h)の処理能力がある。

B法はHPLC法に比べて約一割低い測定値であった。測定精度では再現性のRANGEがA法に比べてやや大きかった。Hb濃度の影響は受けなかった。検体処理能力は、約30テスト/hである。

免疫測定法によるA法、B法ともにグルコース添加による測定値に変化はなく、不安定型HbA<sub>1c</sub>は測り込んでいなかった。

【 結 語 】

免疫的測定法によるHbA<sub>1c</sub>測定試薬の検討を行い、以下の結論を得た。

- 1) A法、B法ともに汎用自動分析装置COBAS MIRA Plusでルーチンを行う十分な精度及び処理能力を有していた。
- 2) A法はHb濃度、希釈率の影響を受けた。
- 3) B法はHPLC法に比べ1割低い測定値であった。また、再現性のRANGEがやや大きかった。

## 【 文 献 】

- 1) Bunn, H. F. et al. : Diabetes, 30, 613, 1981
- 2) Trivelli, L. A. et al. : N, Engl. J. MeD., 284, 353, 1971
- 3) 平田 稔 : 医学と薬学, (34) 125 - 136, 1995
- 4) 河原玲子 : ヘモグロビン A<sub>1c</sub>, 日本臨床 (増刊), 598, 1033 - 1035, 1989
- 5) Rohbar, S : An abnormal hemormal hemoglobin red cells of diabetes. Clin Chim Acta, 22, 296 - 298, 1968
- 6) Little, R. R., Wiedmeyer, H. M., England, J. D., Wilke, A. L., Rohlfing, C. L., Wians, F. H., Jacobson, J. M., Zelimer, V., Goldstein, D. E. : Interlaboratory Standardization of Measurements of Glycohemoglobins, Clin Chem, 38, 2472, 2478, 1992
- 7) Wolf, H. u., Lang, W., Zander, R. : Alkaline haematin D - 575, a new tool in the determination of haemoglobin as an alternative to the cyahaemoglobin method. II. Standardisation of the method using pure chlorohaemin. Clin Chim Acta, 136, 95 - 104, 1984
- 8) Zander, R., Lang, W., Wolf, H. u. : alkaline haematin D 575, anew tool in the determination determination of haemoglobin as an alternative to the cyanhaemoglobin method. I. Description of the method, Chin Chim Acta, 136, 83 - 93, 194