

Glycosylated hemoglobin 測定法

— 日常検査で用いられている諸種方法の比較検討 —

1) 川崎医療短期大学 臨床検査科

2) 川崎医科大学 生化学教室

鎌田文子¹⁾ 原野昭雄²⁾ 上田智¹⁾

(昭和58年9月10日受理)

On the measurement of Glycosylated hemoglobin
Comparison of various methods for Glycosylated
hemoglobin determination in routine use

Fumiko KAMADA, Akio HARANO, Satoshi UEDA

Department of Medical Technology, Kawasaki College of Allied Health Professions

Kurashiki 701-01, Japan

(Received on Sep. 10, 1983)

Key words : glycosylated Hb, HbA₁, HbA_{1c}, 糖尿病

概 要

近年、糖尿病患者に HbA_{1c} 分画の増加が認められて以来、多数の研究者らにより研究がなされ、HbA_{1c} 値が患者の過去数週間から2カ月にわたる血中ブドウ糖レベルモニターとして有用であるとの評価を得てきた。他方、従来の大型カラムによる分析法に加えて、種々の分析法が確立され、キット試薬として現在市販されている。これらの市販キット類について、日常臨床検査として用いる上で考慮すべき事柄について、1. 血液試料について、2. 測定法にまつわる問題点の検討を行った。どの測定法においても一長一短がみられるので、最良な方法を限定することは難しい。よってキットを使用する側で測定法の長所短所を十分に把握するとともに、実情に即した方法で臨床にデータを供する必要がある。

はじめに

成人溶血液を弱酸性陽イオン交換樹脂を充填したカラムクロマトグラフィーに流すと、HbAの主成分より先に溶出して出てくる成分 (Minor components HbA₁) が認められる。これは

溶出順に HbA1a, HbA1b, HbA1c と分けられ、中でも HbA1c がその大部分を占めている。1968年 Rahbar ら¹⁾により、HbA1c 分画が糖尿病患者の血液に増加することが発表されて以来、多くの研究者らにより研究がなされ、HbA1c は、糖尿病患者の長期における血糖値のレベルモニターとして臨床に重要視²⁾³⁾⁴⁾されてきた。しかし従来の大型カラム⁵⁾を用いた方法では、手技が繁雑で長時間を要し日常検査法としては困難であるため、カラムの長さを短くした簡易法⁶⁾⁷⁾を始めとし、様々な測定法が開発⁸⁾⁹⁾¹⁰⁾キット化され、glycosylated hemoglobin (glycosylated Hb) の測定が容易になってきた。

今回、現在市販の測定キット類について、日常臨床検査法として有用な測定法をとの観点より、測定法の追試を試みた。

方法および測定機器・試料

方法は表1に示した市販キット6製品について、添付の説明書の指示に従って検討した。なお、測定機器として、日立200-20分光光度計、グリコヘモグロビン自動分画測定装置(京都第一科学)、電気泳動装置一式(コーニング社)、および ABBOTT-200 自動分析機を用いた。

表-1 実験に用いた市販キット一覧表

測定法	A	B	C	D	E	F
測定原理	陽イオン交換樹脂ミニカラム法	陽イオン交換樹脂ミニカラム簡易法	HPLC法	アフィニティークロマトグラフィー法	電気泳動法	フィチン酸分光光度法
測定機器	分光光度計	分光光度計	自動分画測定装置 Auto A1c TM	分光光度計	電気泳動装置一式	ABBOTT-200 自動分析機

測定試料には、川崎医科大学附属病院における外来および入院患者(糖尿病患者)の、また川崎医療短期大学に在学中の学生および職員(非糖尿病患者)の EDTA-3K 加採血による全血を使用した。

検 討 成 績

1 測定試料について

1) 抗凝固剤について： 各種抗凝固剤を用いて採血し、これを試料として glycosylated Hb の測定を行い、抗凝固剤の影響について検討した。EDTA はどの測定法においても良好であった。ヘパリンや NaF の使用では、フィチン酸分光光度法において高値の結果を得た。

2) Hb 濃度による影響： 試料中の Hb 濃度変化に伴う測定値の変動について検討した。図1は Hb の段階希釈液における測定値をプロットしたもので、HPLC 法、電気泳動法およびフィチン酸分光光度法で多少の変動をみた。

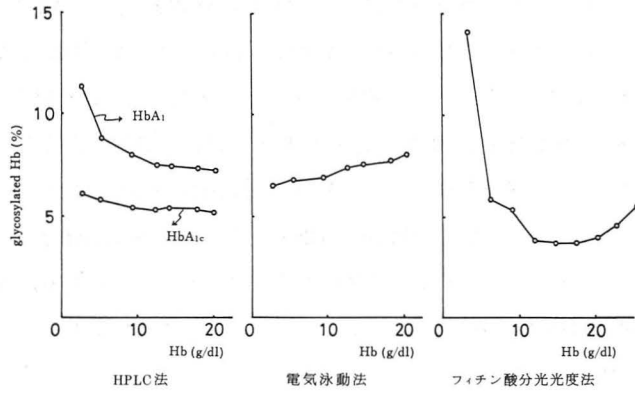


図1 Hb 濃度変化による glycosylated Hb 値の変動

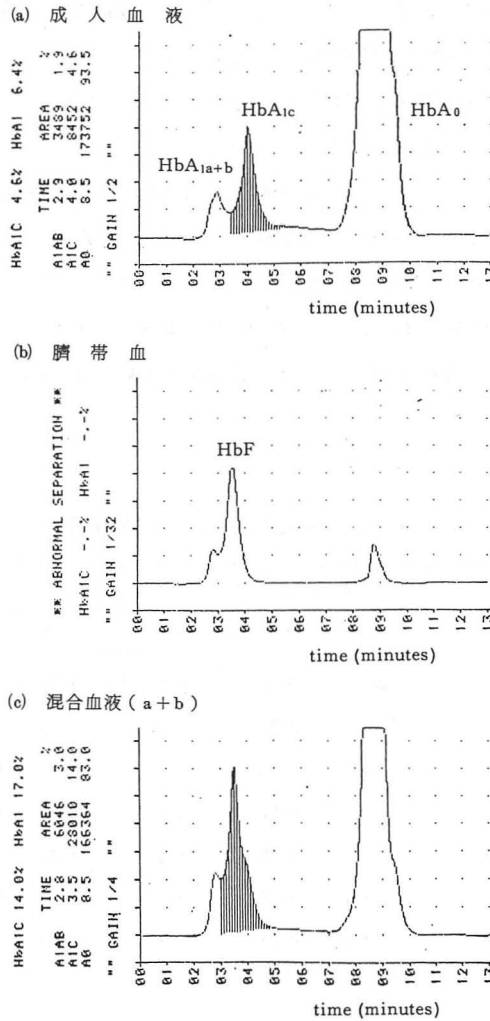


図2 glycosylated Hb 分画図 (HPLC 法)

3) 検体の保存について： 血液を冷蔵庫、 -15°C 冷凍庫および -40°C 冷凍庫に保存して測定値の変動を調べたところ、冷蔵庫保存で1週間は測定値に大きな変動はみられなかった。保存条件としては -40°C 冷凍保存が最も良好で次いで冷蔵庫に保存した場合であった。

4) HbF の影響： 図2は成人血液、臍帯血液および両者の混合血液を試料とし、HPLC法で分画したものである。混合血液においてHbFはHbA_{1c}分画中に算入され、測定値は高値を示した。電気泳動法においてもHbFは、HbA₁と同様の位置に流れた。

ところでアフィニティーゲルを用いて臍帯血液の測定を行ったところ、HbF含量79%の血液のglycosylated Hb値は5.2%となり、アフィニティークロマトグラフィー法においてHbFの影響は認められなかった。

2 測定法について

1) 温度の影響： カラム操作時における温度の影響について検討した。温度変化による測定値の変動はミニカラム法が最も大であり、 23°C における測定値を基準として比較すると、 $\pm 4^{\circ}\text{C}$ の温度変化で測定値の $\pm 15\%$ の変動をみた。これに対しミニカラムの簡易グラジエント方式を採用したB法では $\pm 5\%$ 程度の変動におちついた。また、アフィニティークロマトグラフィー法においても、温度の影響が見られた。

2) 測定精度について： 各測定法の重複測定による同時再現性および日差変動を表2に示した。同時再現性はいずれの測定法も、変動係数CV = 1.3~2.8%と良好であった。また日差変動は自動分析機を用いたHPLC法、用手法のアフィニティークロマト法で、前者はCV = 3.3% (HbA_{1c})、CV = 2.5% (HbA₁)、後者はCV = 3.8%と最も良好であった。フィチン酸分光光度法はCV = 14.3%と変動が著しく、他の3法のはCV = 3.8~6.7%とほぼ満足すべき結果を得た。

表-2 各種測定法における測定精度

測定法	同時再現性		日差変動	
	$\bar{x} \pm \text{SD}$	CV(%)	$\bar{x} \pm \text{SD}$	CV(%)
A 法	6.84 \pm 0.17	2.4	6.19 \pm 0.42	6.7
B 法	7.24 \pm 0.20	2.7	7.19 \pm 0.48	6.7
C法 (HbA _{1c})	5.37 \pm 0.15	2.8	5.39 \pm 0.18	3.3
C法 (HbA ₁)	7.43 \pm 0.17	2.3	7.38 \pm 0.18	2.5
D 法	5.68 \pm 0.08	1.3	5.66 \pm 0.22	3.8
E 法	7.03 \pm 0.16	2.2	7.37 \pm 0.35	4.8
F 法	6.74 \pm 0.18	2.7	5.63 \pm 0.80	14.3

3) 臨床データ： 糖尿病患者および非糖尿病患者のglycosylated Hb値($\bar{x} \pm \text{SD}$)を図3に

示した。各測定法において糖尿病患者の測定値が非糖尿病患者の測定値に比較して有意に高値を示した。

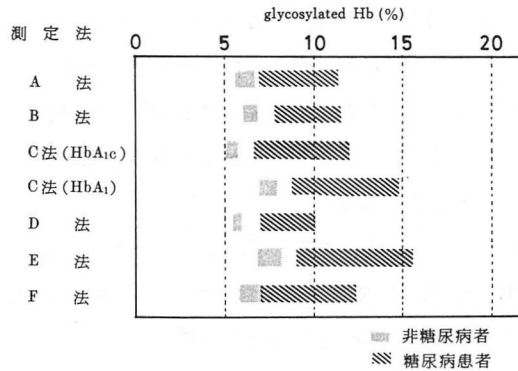


図3 糖尿病患者および非糖尿病患者の glycosylated Hb 値

考 察

glycosylated Hb の最初の発見は柴田ら¹¹⁾で、1962年寒天電気泳動法により異常 Hb 検索中、糖尿病患者の血液に異常ピークが見られた事を報告している。その後多くの研究者ら¹²⁾¹³⁾により研究がおこなわれ、Dr. Bunn¹⁴⁾により Hb の posttranslational modification の解明がなされ、臨床に応用されてきた。測定法においても、Trivelli ら⁵⁾の大型カラムによるカラムクロマトグラフィー法を始めとし、種々の測定法が開発され臨床に供している。現在、市販の測定用キット類もイオン交換樹脂を用いたミニカラム法⁶⁾⁷⁾、アフィニティークロマトグラフィー法¹⁵⁾¹⁶⁾、高速液体クロマトグラフィー法 (HPLC 法)⁸⁾¹⁷⁾、電気泳動法⁹⁾、フィチン酸分光光度法¹⁸⁾等があげられる。これら種々のキット試薬が氾濫するなか、どの方法を用いて測定するかは、大切な問題である。そこで測定に関して重要と思われる点について考察を加えた。

まず第一に試料の取り扱いに関してであるが、全血を用いるため、抗凝固剤の選択は大切で、EDTA はどの測定法に用いても支障なく良好であった。試料の Hb 濃度については、カラム法の場合使用血液量が 10 μ l 程度となり問題は少ないが、HPLC 法や電気泳動法の場合使用量が極端に少ないので、高度の貧血患者については、配慮を要する。またフィチン酸分光光度法は全血をサンプルカップに採取するので、試料の血液の Ht を 50% 程度とし、すみやかに機械を作動させる必要がある。検体の保存については、冷蔵庫で 1 週間以内の測定が望ましい。-15°C 前後の冷凍保存は Hb の変性を来しやすく高値を示す傾向が認められた。

通常成人の HbF は 0.5~1% 程度存在し、ミニカラム法、電気泳動法、HPLC 法等々影響を避けることが出来ない成分である。他方、アフィニティークロマト法¹⁵⁾は、セルロースゲルにホウ酸イオンを結合した樹脂で、cis glycol 構造を持つものと反応する。よって前者と原理的に異なるので、HbF の混入を避けることが出来る。また最近では、急激な血糖レベル変

化に伴う labile glycosylated Hb¹⁹⁾の存在も指摘され、測定において考慮すべき事項であろう。

次に測定法についてであるが、まず自動分析法と用手法に分けられる。HPLC法の利点は、温度条件が一定し測定精度が良好、非常に簡単に操作できることである。フィチン酸分光光度法は原理上、全Hb量に対し90%程度を占めるMajor Hbの構造変化に伴う吸光度変化を調べるため、わずかな吸光度差を捕らえてHbA1値に換算する方法である。さらにHb濃度によって測定値の変動がみられることから、試案に対するHbの変動が、日差変動を大きくした原因と思われた。用手法の中では、ミニカラム法が最も温度変化の影響を受けやすく、測定にあたり温度管理を十分に行う必要がある。

これら各測定法の臨床データを検討する上で、どの成分を測定しているかを認識することは重要な問題である。HbA1cについては生成過程や臨床的意義について明らかにされているが、HbA1a、HbA1b等についての意義はいまだ不明²⁰⁾である。ミニカラム法、電気泳動法、フィチン酸分光光度法等がHbA1の測定に対し、ミニカラムの簡易グラジエント方式では展開液でHbA1a+b分画を流出させていることから、測定値はむしろHbA1cに近い値となっている。また、glucoseの修飾はHbのβ鎖N末端のみでなく、β鎖Lysin残基、α鎖等々、他の位置へのposttranslational modification²¹⁾がおこなわれることが知られている。これらについて、今までの測定法では読みとることが出来ない。アフィニティーゲルを用いた場合、先に述べたcis glycol構造を持つ全てが反応するといわれている。またDr. Bunnらの報告²²⁾によると、糖尿病患者においてHbA1cと同様にglycosylated HbA₀の増加も認められており、アフィニティークロマトグラフィー法はglycosylated Hbの測定に関して、特異性に優れた方法といえる。

以上、どれが最良の測定法であるかを限定することは非常に難しい。どの測定法を取っても一長一短がみられる。よって測定法の持つ特徴を十分に理解し、さらに現場の実情に即した測定法を用いることが必要と思われた。

ま と め

glycosylated Hbの測定法に関して、現在市販中のキット類を用いて、試料および測定法に問題を絞って検討した。日常臨床検査に用いる測定法の選択には、各測定法の特徴を十分に把握し、臨床に応用する必要性があると思われた。

謝 辞

終わりに臨み、検討に際し多大の便宜を与えられた川崎医科大学 中央検査部の松田貴美子技師、月岡澄香技師に心から感謝いたします。また、ご援助を賜った小玉株式会社、京都第一科学株式会社、アボット株式会社、および朝日メディコ株式会社に対し、厚く御礼申し上げます。

文 献

- 1) Rahbar, S. : An abnormal hemoglobin in red cells of diabetics. *Clin. Chem. Acta*, 22 : 296~298, 1968.
- 2) Gonoen, B., et al.: Haemoglobin A₁ : an indicator of the metabolic control of diabetic patients. *Lancet*, ii : 734 ~ 737, 1977.
- 3) Gabbay, K. H., et al. : Glycosylated hemoglobins and long-term blood glucose control in diabetes mellitus. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 44 : 859 ~ 864, 1977.
- 4) Koenig, R. J., et al. : Hemoglobin A_{1c} as an indicator of the degree of glucose intolerance in diabetes. *Diabetes*, 25 : 230 ~ 232, 1976.
- 5) Trivelli, L. A., et al. : Hemoglobin components in patients with diabetes mellitus. *New Engl. J. Med.*, 284 : 353 ~ 357, 1971.
- 6) Welch, S. G., et al. : A rapid micro scale method for the measurement of hemoglobin A₁ (a + b + c). *Diabetologia*, 14 : 209 ~ 211, 1978.
- 7) 原野恵子, 他 : HbA₁ 分画の簡易定量法. *医学のあゆみ*, 108 : 733~735, 1979.
- 8) Davis, J. E., et al. : A high performance liquid chromatography method for hemoglobin A_{1c}. *Diabetes*, 27 : 102 ~ 107, 1978.
- 9) Menard, L., et al. : Quantitative determination of glycosylated hemoglobin A₁ by agar gel electrophoresis. *Clin. Chem.*, 26 : 1598 ~ 1602, 1980.
- 10) Gabbay, K. H., et al. : Glycosylated hemoglobins ; increased glycosylation of hemoglobin A in diabetic patients. *Diabetes*, 28 : 237-340, 1979.
- 11) 柴田進, 他 : 糖尿病患者血液に見出される異常血色素成分について. *日血会誌*, 25 : 327, 1962.
- 12) Holmquist, W. R., et al. : A new N- terminal blocking group involving a Schiff base in hemoglobin A_{1c}. *Biochemistry*, 5 : 2489 ~ 2503, 1966.
- 13) Bookchin, R. M., et al. : Structure of hemoglobin A_{1c}, nature of the N-terminal β -chain blocking group. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 32 : 86 ~ 93, 1968.
- 14) Bunn, H. F. et al. : Further identification of the nature and linkage of the carbohydrate in hemoglobin A_{1c}. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 67 : 103 ~ 109, 1975.
- 15) Mallia, A. K., et al. : Preparation and use of a boronic acid affinity support for separation and quantitation of glycosylated hemoglobins. *Anal. Lett.*, 14 : 649 ~ 661, 1981.
- 16) Bouriotis, V. et al. : Measurement of glycosylated hemoglobins using affinity chromatography *Diabetologia*, 21 : 579 ~ 580, 1981.
- 17) 鎌田文子, 他 : グリコヘモグロビン自動分画測定装置 Auto A1cTM の使用経験. *臨床検査機器*, 試薬, 4 : 773~780, 1982 .
- 18) Moore, E. G., et al. : Automated spectrophotometric Assay for Glycosylated Hemoglobin. *Diabetes*, 29: (Suppl, 2) 70A, 1980.
- 19) Svendsen, P. A., et al. : Rapid changes in chromatographically determined hemoglobin A_{1c} induced by short-term changes in glucose concentration. *Diabetologia*, 19: 130 ~ 136, 1980.
- 20) Bunn, H. F., et al. : The glycosylation of haemoglobin relevance to diabetes mellitus. *Science*, 200 : 21 ~ 27, 1978.
- 21) Bunn, H. F., et al. : Structural heterogeneity of human hemoglobin A due to non enzymatic glycosylation. *J. Boil. Chem.*, 254 : 3892 ~ 3898, 1979.
- 22) Robert, L., et al. : Characterization of glycosylated hemoglobins. *J. Clin. Invest.*, 71:1062~1072, 1983.

