

〈企業特集：検査機器・試薬・技術の新たな展開〉

## 酵素法HbA1c測定試薬 メタボリード®HbA1cのご紹介

近藤 大

### Introduction of enzymatic HbA1c assay reagent Metabolead® HbA1c for automated biochemistry analyzer

Masaru Kondou

**Summary** As HbA1c reflects average blood glucose in the past 1-2 months, the measurement of HbA1c has become important for long-term glycemic condition such as glycemic control monitoring, diagnosis and screening of DM. According to the definition in IFCC, HbA1c is a glycated product of N terminal of  $\beta$  chain of hemoglobin, and an immunological method and enzymatic method are commonly and widely used for HbA1c testing in Japanese laboratory medicine.

This study reports the good analytical performance of "Metabolead® HbA1c kit," which employs an enzyme-based HbA1c measurement reagent (Kyowa Medex Co., Ltd., Tokyo Japan). Its application to commercially available clinical chemistry analyzers will contribute to daily HbA1c testing in the laboratory and glycemic control.

**Key words:** HbA1c, Enzymatic method, Metabolead® HbA1c, Automated biochemistry analyzer

#### I. はじめに

HbA1cは過去1～2ヶ月間の血糖状態を反映して変動するため、中長期に渡る血糖状態を反映するマーカーとして血糖コントロール状態の把握・糖尿病の診断・健診等様々な分野で測られている糖尿病診療には不可欠な項目である。IFCCはHbA1cをヘモグロビン $\beta$ 鎖N末端Valにグルコースが結合した物質として定義している。

現在、日常のルーチン検査はHPLC法・免疫

法・酵素法の3法が主に使用されている。これら測定法は、それぞれ測定原理が異なる。今回酵素法を用いたHbA1c測定試薬「メタボリード®HbA1c」について紹介する。

#### II. 方法と材料

メタボリード®HbA1cは酵素法を測定原理としたHbA1c測定試薬である。

本試薬は血液中の総Hb中に占めるHbA1cの割

協和メデックス株式会社 営業支援部 学術生化学グループ

〒104-6004 東京都中央区晴海1-8-10 (晴海トリトンスクエアx-4F)

Kyowa Medex Co.,Ltd.

Scientific and Technical Support Dept.

1-8-10 Harumi, Chuo-ku, Tokyo 104-6004, Japan

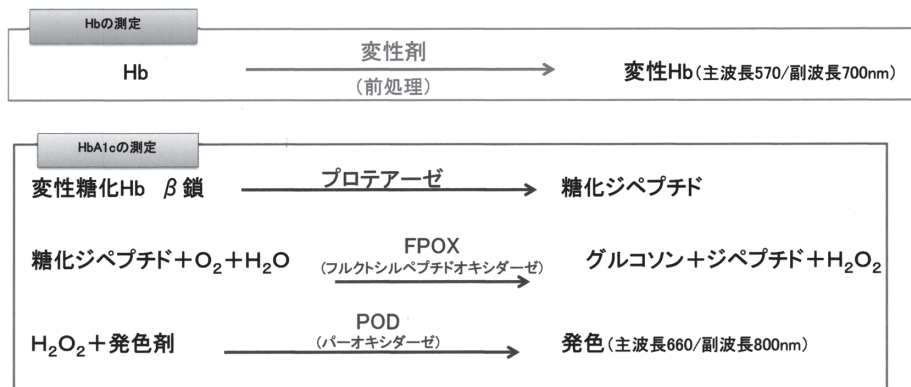


図1 メタボリード® HbA1cの測定原理

表1 JCCRM411-3の測定結果

|         | 認証値±不確かさ   | 測定値  |
|---------|------------|------|
| Level-1 | 5.10±0.13  | 5.11 |
| Level-2 | 5.77±0.14  | 5.73 |
| Level-3 | 7.39±0.19  | 7.36 |
| Level-4 | 9.60±0.23  | 9.58 |
| Level-5 | 11.98±0.28 | 12.3 |

表2 (a) 溶血試料の再現性

|         | L     | M     | H     |
|---------|-------|-------|-------|
| N       | 20    | 20    | 20    |
| Average | 4.62  | 6.49  | 9.88  |
| SD      | 0.013 | 0.015 | 0.023 |
| CV(%)   | 0.29  | 0.23  | 0.23  |

表2 (b) 機械希釈での再現性

|         | L     | M     | H     |
|---------|-------|-------|-------|
| N       | 20    | 20    | 20    |
| Average | 4.69  | 6.54  | 9.94  |
| SD      | 0.021 | 0.021 | 0.017 |
| CV(%)   | 0.45  | 0.32  | 0.17  |

合を算出する試薬である。第一反応ではメトHb法によりHb濃度 ( $\mu\text{mol/L}$ ) を測定すると同時にプロテアーゼを作用させ糖化ジペプチドを生成する。第二反応では第一反応で生成した糖化ジペプチドに対してFPOX (フルクトシルペプチドオキシダーゼ) を作用させ、生じた過酸化水素がパーオキシダーゼ存在下で発色剤からメチレンブルーを生成させる。この発色吸光度からHbA1c濃度 ( $\mu\text{mol/L}$ ) を求め、Hb濃度およびHbA1c濃度からHbA1c (%) を算出する方法である (図1)。

測定用試料にはEDTA採血管またはNaF採血管を800×5分で遠心して得られた血球を精製水を41倍希釈した試料を用いる。

分析装置は、BM-9130 (日本電子(株)) を用い以下の内容について確認を行った。

1) 正確性はHbA1c測定用一次実試料標準物質JCCRM411-3 (JDS Lot 5) (5濃度) を測定して確認した。

2) 再現性は、遠心後の血球をマニュアルで溶血した試料および、遠心後の血球をBM9130の血

球溶血機能を用い血球希釈測定の精度も合わせて確認した。

3) 直線性は、マニュアル溶血した18%の試料をマニュアル溶血した3%の試料で10段階希釈し確認した。

4) Hb濃度によるHbA1c (%) への影響は、200  $\mu\text{mol/L}$  および100  $\mu\text{mol/L}$  に調製した溶血済試料を精製水で10段階希釈して確認した。

5) 妨害物質の影響は、アスコルビン酸 (50 mg/dL) についてはアスコルビン酸純品 (和光純薬(株)) を用い、抱合型ビリルビン (50 mg/dL)、遊離型ビリルビン (50 mg/dL)、乳ビ (3,000ホルマジン濁度) については干渉チェック (シスメックス(株)) を用い、括弧内の濃度に調整した溶液を5段階希釈しPool血球に添加し所定の遠心を実施し確認した。

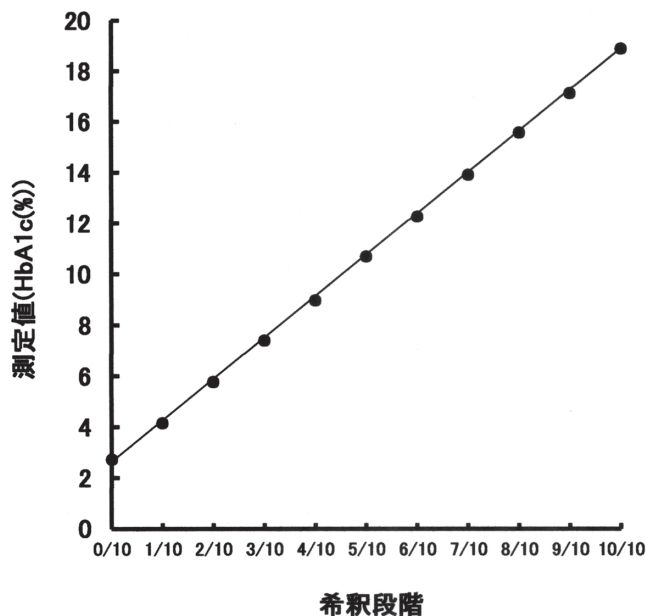


図2 直線性

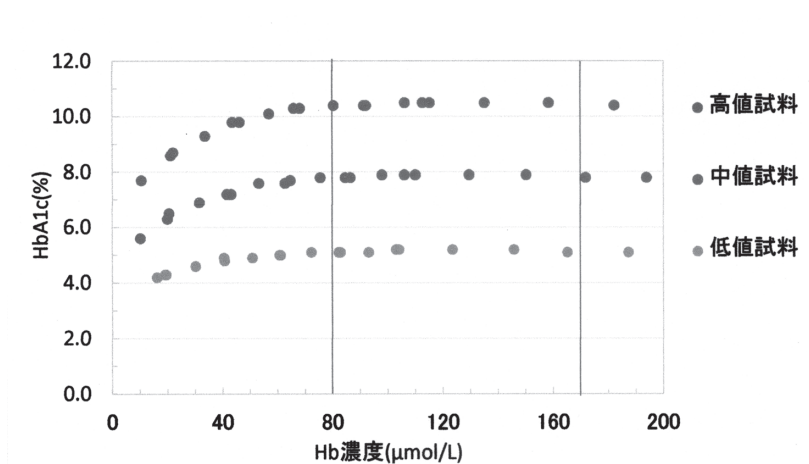


図3 溶血試料のHb濃度によるHbA1c (%) への影響

6) 相関性は、HPLC法 (HLC-723G8: 東ソ(株)) および、ラテックス免疫比濁法 (デタミナー®L HbA1c: 協和メデックス(株)) を対照法として、本試薬との相関性を確認した。

### Ⅲ. 結果

#### 1) 正確性

JCCRM411-3を測定した結果、何れの濃度に

おいても本法での測定結果は認証値の不確かさの範囲であった(表1)。

#### 2) 再現性

HbA1c (%) の再現性は3濃度のマニュアルで溶血した試料ではCV0.23~0.29%、BM9130での機械希釈を行った場合ではCV0.17~0.45%であった(表2(a), (b))。また、溶血試料と機械希釈での測定値に差は無かった。

3) 直線性

3.0～17.1%の範囲で直線性が認められた(図2)。

4) Hb濃度の影響

溶血後のHb濃度が80～170 $\mu$ mol/Lの範囲ではHbA1cの変動は0.2%以内であった(図3)。

5) 妨害物質の影響

各妨害物質の影響は認められなかった(表3)。

6) 相関性

50検体を用いてHPLC法との相関性を確認した結果、 $y=0.997x+0.005$ 、 $r=0.994$ であった(図4a)。また、ラテックス免疫比濁法との相関性を検証した結果は、 $y=1.005x-0.065$ 、 $r=0.998$ であった(図4b)。

IV. 考察

厚生労働省が発表した「平成24年度国民健康・栄養調査」の結果において、糖尿病の可能性を否定できない者(HbA1c:6.0～6.5%未満)は1,100万人、糖尿病が強く疑われる者(HbA1c:6.5%以上)は950万人であった。「平

表3 共存物質の影響

|         | 添加濃度(mg/dL) |      |      |      |      |      |
|---------|-------------|------|------|------|------|------|
|         | HbA1c(%)    |      |      |      |      |      |
| アスコルビン酸 | 0           | 10   | 20   | 30   | 40   | 50   |
|         | 5.25        | 5.29 | 5.25 | 5.25 | 5.31 | 5.28 |
| ビリルビン-F | 0           | 10   | 20   | 30   | 40   | 50   |
|         | 5.25        | 5.23 | 5.21 | 5.20 | 5.20 | 5.21 |
| ビリルビン-C | 0           | 10   | 20   | 30   | 40   | 50   |
|         | 5.20        | 5.24 | 5.22 | 5.19 | 5.18 | 5.18 |
| 乳び※     | 0           | 600  | 1200 | 1800 | 2400 | 3000 |
|         | 5.26        | 5.24 | 5.18 | 5.21 | 5.21 | 5.21 |

※：ホルマジン濁度

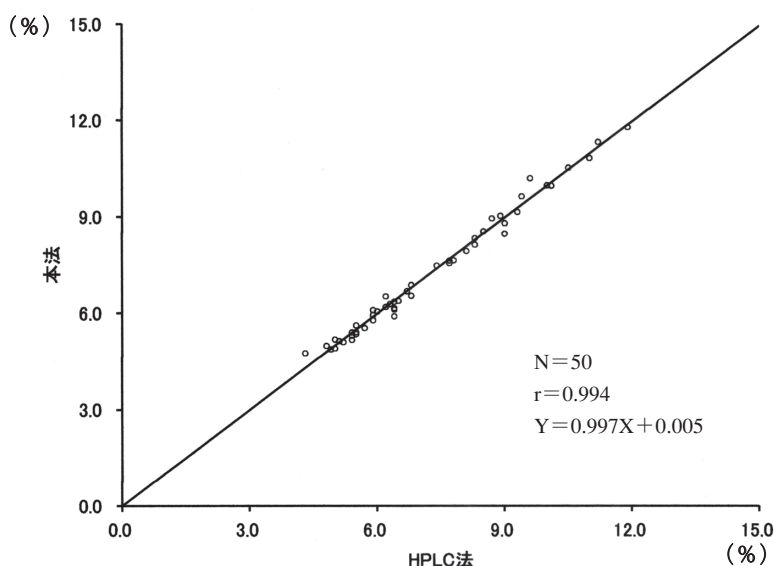


図4a HPLC法との相関

成19年度国民健康・栄養調査」の結果では糖尿病の可能性を否定できない者は1,320万人、糖尿病が強く疑われる者は890万人であった。この5年間で糖尿病の可能性を否定できない者は約220万人減少したものの糖尿病を強く疑われる者は100万人増加したことになり糖尿病の人口が減少しているとは言い難い状況である。

日本糖尿病学会は糖尿病を「インスリン作用不足による慢性の高血糖を主徴とし、種々の特徴的な代謝異常を伴う疾患群」と定義づけ、代謝異常の長期間にわたる持続は特有の合併症を来しやすく動脈硬化をも促進すると位置付けている<sup>1)</sup>。糖尿病の合併症発症・進展抑制の為に血糖コントロールが重要であることが1980年代から実施された種々の大規模臨床試験により証明されている<sup>2), 3), 4)</sup>。2013年日本糖尿病学会は新たな血糖コントロール目標値である熊本宣言を発表し、HbA1cを合併症予防の為に血糖コントロール目標値としてHbA1c 7.0%未満を一つの目標として掲げている<sup>5)</sup>。日本糖尿病学会は2010年より糖尿病の診断項目にHbA1cを盛り込み、血糖とHbA1cの何れも糖尿病型を示す場合には糖尿病として診断するとしている<sup>1)</sup>。また、2008年より開始された特定健診においても血糖関連項目としてHbA1cが測定されている。このようにHbA1cは糖尿病患者の血糖コントロールはもと

より、糖尿病の診断・健診等近年の糖尿病診療においては欠くことの出来ない重要なマーカーとなっている。このような背景を反映してHbA1cの測定機会は年々増えており、より高速で大量検体測定が求められる状況にある。

HbA1cの日常検査法にはHPLC法・免疫法・酵素法が主に用いられている。近年のHPLC法は測定時間が1検体当たり1分未満という機種も多く上市されており、その処理速度は年々速くなっている。一方、従来国内で用いられていたJDS値と2012年より国内運用が開始されたNGSP値との差の原因に代表されるように分離能に起因する特異性もHPLC法の課題の一つと考えられる<sup>6)</sup>。

免疫法は抗原抗体反応によりHbA1cを測定するため、特異性の高いHbA1c測定が可能ことや生化学自動分析装置への適応が可能で大量検体処理に向いているという特徴がある。しかしながら反応セルの汚れ等が免疫法を生化学自動分析装置に適応させる際の課題の一つとされていた。

酵素法は酵素反応によりHbとHbA1cを測定しHbA1c (%) を求める。この為、酵素法では免疫法で課題とされていた反応セルの汚れが生じにくく生化学自動分析装置へ適応させやすい点の特徴の一つと考えられる。また、酵素法は酵

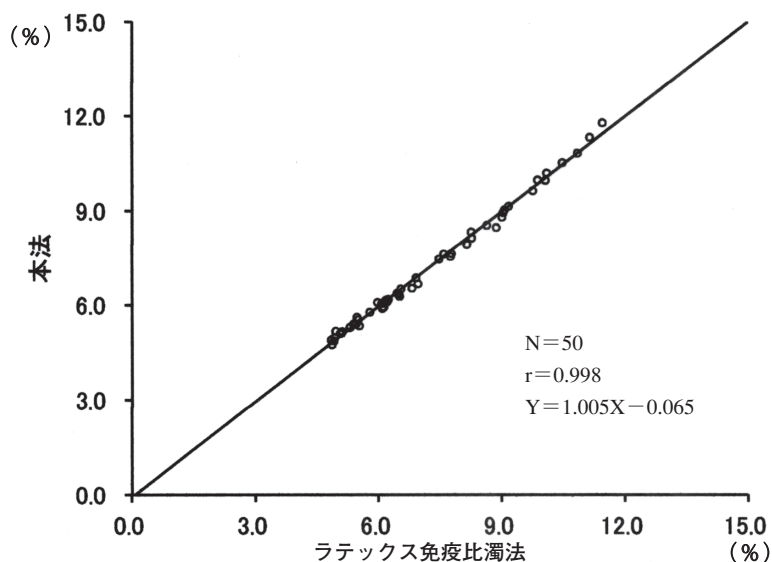


図4b ラテックス免疫比濁法との相関

素反応によりHbA1cを測定するため従来の免疫法と同様に高い特異性が特徴として挙げられる。このような特徴がある測定法において、本試薬は、正確性・再現性・直線性・従来法との相関性等をはじめとする基本性能は良好な結果であり、日常検査に幅広く貢献できるものと考えられる。

HbA1cを測定する際には測定方法を問わず血球の溶血作業が必須である。この為、生化学自動分析装置でHbA1cを測定する場合には溶血操作をマニュアルで行う必要があり、生化学自動分析装置でのHbA1c測定に対する障害の一要因になっていたと推測される。しかし、近年、自動血球溶血機能を有する生化学自動分析装置の機種も増えてきており、血球溶血操作の省力化が可能になっている。このように分析装置面においてもHbA1cを生化学自動分析装置で測定しやすい環境に変化しつつあるものと思われる。

## V. 結語

本試薬の基礎性能は良好であり生化学自動分析装置に搭載可能なことから、日常検査に幅広く貢献できるものと考えられる。

### 参考文献

- 1) 日本糖尿病学会糖尿病の分類と診断基準に関する委員会報告. 糖尿病, 53(6): 450-467, 2010.
- 2) DCCT Trial Research Group: The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus. N Engl J Med, 329: 977-986, 1993.
- 3) Ohkubo Y et al.: Intensive insulin therapy prevents the progression of diabetic microvascular complications in Japanese patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus: a randomized prospective 6-year study. Diabetes Res Clin Pract, 28: 103-117, 1995.
- 4) DCCT/EDIC Study Research Group: Intensive diabetes treatment and cardiovascular disease in patients with type 1 diabetes. N Engl J Med, 353: 2643-2653, 2005.
- 5) 日本糖尿病学会: 糖尿病治療ガイド, 2014-2015, 25
- 6) 島 健二: 0.4%の差異. 糖尿病, 53(10): 723-725, 2010.