

〈新技術特集〉

キャピラリー電気泳動法技術を応用した 新たなHbA1c分析装置The Lab 001

細谷 幸雄¹⁾、佐本 実奈穂¹⁾、植木 歩夢²⁾、鳥塚 研二²⁾

Unique HbA1c Device by Applying the Capillary Electrophoresis, The Lab 001

Yukio Hosoya¹⁾, Minaho Samoto¹⁾, Ayumu Ueki²⁾ and Kenji Toritsuka²⁾

Summary The Lab 001 is the unique concept HbA1c device equipped based on the separation method, by applying the capillary electrophoresis with cation-exchange electro-kinetic chromatography. 1.5 microliter of whole blood and 90 seconds are required for the test, these features can make it possible to shorten TAT. The reagent, The Lab 001 A1C HD is onetime use, consequently, the storage and maintenance are easy. The result can be shown as an electropherogram of which the interpretation is aligned with the HPLC chromatogram, so the daily use will be able to start smoothly. The increasing requests for accurate HbA1c testing without the interference of interferants including major Variant Hemoglobin due to the ongoing trend of the internationalization, The Lab 001 will contribute to improve the patient QOL for diabetic medicine.

Key words: HbA1c, Capillary electrophoresis, Cation-exchange electro-kinetic chromatography, Less Invasive and Short Turn-Around-Time (TAT), The Lab 001

I. はじめ

国際糖尿病連合 (IDF, International Diabetes Federation) は2019年の世界の糖尿病患者数を463百万人と推定し、2030年には578.4百万人、2045年には700.2百万人に増加すると予想している¹⁾。ヘモグロビンA1c (HbA1c) は、国際

標準化²⁾の成果として、糖尿病の診断・モニタリングの指標として地位を確立し³⁾、本邦においては2010年に決定された診断基準の改定により、現在定着している⁴⁾。

HbA1c日常検査法は、この種々のヘモグロビン (Hb) を分離する分離分析法と抗原抗体反応や酵素反応などによってHbA1cを特異的に捕

¹⁾ アークレイマーケティング株式会社マーケティング本部学術サポートチーム

²⁾ アークレイ株式会社研究開発本部開発一部学術統括チーム

¹⁾ Scientific Activity Support Team, Marketing Division, ARKRAY Marketing, Inc.

²⁾ Scientific Affairs Management Team, Research & Development Unit 1, Research & Development Division, ARKRAY, Inc.,
Yousuien-nai, 59 Gansuin-cho, Kamigyo-ku, Kyoto 602-0008, JAPAN

らえる生物化学法に大別される。分離分析法は高速液体クロマトグラフィー（HPLC, high performance liquid chromatography）法がその代表であり、正確かつ迅速な検査ができるとともに、クロマトグラムでHb成分の溶出結果をパターンで捕らえられる。さらに溶離液の組成や送液の順序、測定時間の工夫により、変異Hbに対する分離・検出能の向上を実現したことにより、しばしばその存在により引き起こされる鎌状赤血球症や高ヘモグロビンF（HbF）症などの血液疾患のスクリーニングにも活用できる。しかし機器の小型化には課題を持ってきた。

生物化学法には酵素法や免疫法があり、大規模医療施設で大型のディスクリート型自動分析装置を用いて毎日大量の検査を行うことや、クリニックのような小規模医療施設でPoint-of-Care-Testing（POCT）機器で検査を行うことを得意とする。得られる情報はHbA1cに特化しているが、同時測定する複数臨床化学の検査項目のひとつとして扱うことができる。

我々は、分離分析法のHPLC法を中心とし1981年にHPLC法を原理としたAUTO A1c HA-8110に端を発し、2018年にはHA-8190Vを発売した。この間測定時間は13分から24秒にまで高速化を図るとともに、通常モードに加えバリエーションモードを装備することで主要変異Hbの影響を受けない正確なHbA1c値を提供できるようになった^{5,6)}。しかし上述したとおり、小型化・軽量化・簡易化には課題を抱えていた。この課題をキャピラリー電気泳動（CE, Capillary Electrophoresis）法を応用したThe Lab 001で解決したので、最近得られた知見とともに紹介する。

II. 測定システム

1) 測定原理

CE法は内径20～100 μ mの毛細管（キャピラリー管）内で電気泳動を行なう分析法である。管内壁を正負電荷に修飾することで、電解質溶液を満たし電圧を印加させると電気浸透流（EOF, electroosmotic flow）という流れが発生する。EOFの流れの方向はキャピラリー管をプラスに帯電させるとプラス極に向けた、マイナスに帯電させるとマイナス極に向けた流れとなる。このEOFの力で成分を分離するのであるが、

十分な分離能力を確保するために通常は数十cm長のフューズドシリカキャピラリーが使用され、測定には数分～数十分程度の測定時間を要する。また、キャピラリーは測定毎の洗浄や前処理（コンディショニング）を伴った再利用を前提とする。この点では、HPLCのカラムに類似する。さらに、発生するジュール熱による分離能の低下や再現性の低下を防ぐために、キャピラリー内部の温度制御が必須とされている。結果として、一般的には装置は大型で使用には高度な専門性が要求される。

本法は装置の小型化と測定時間の短縮を実現するため、さらに陽イオン交換導電クロマトグラフィー法を採用している。これは試薬液成分にマイナス電荷を持った擬似固定相（コンドロイチン硫酸C（CS-C, chondroitin sulfate C））をHPLC法の固定相（陽イオン交換カラム）に相当する機能として含んでおり、これが電気泳動時Hbと結合する。この結合力はプラス電荷の大きさに比例するため、擬似固定相がHbに対してちょうど足かせのように働くことで電気泳動移動度の差が効率的に拡大される。この独自の技術によって、キャピラリー長は3 cm、測定時間は約90秒（電気泳動は40秒）での分離・検出を可能とした。また陽イオン交換法を採用しているため、電気泳動結果（エレクトロフェログラム）の解釈はHPLC法のクロマトグラムと、ほぼ同様である（Fig. 1）。

2) 装置と試薬

(1) 装置

The Lab 001（Fig. 2a）の寸法は約220（幅）×326（奥行）×298（高さ）mmでありHPLC法製品のHA-8190Vの約1/2、また重量は10 kgで約1/4と大幅な小型化を図った。電源投入後、セルフチェックが60秒以内に完了し、すぐに検査を開始できる。操作画面には7インチのタッチスクリーン・カラー液晶を採用しており、操作はガイド付きで視覚的にも分かりやすく迷いが無い。装置内部には圧力、温度などのセンサーを搭載し、装置の状態や測定動作の異常を検知する。装置に装着する消耗品はなく、ユーザーによるメンテナンスは不要である。また、精度管理用のQC測定モードを搭載し、測定間隔や許容範囲の設定ができ、条件から外れたときに

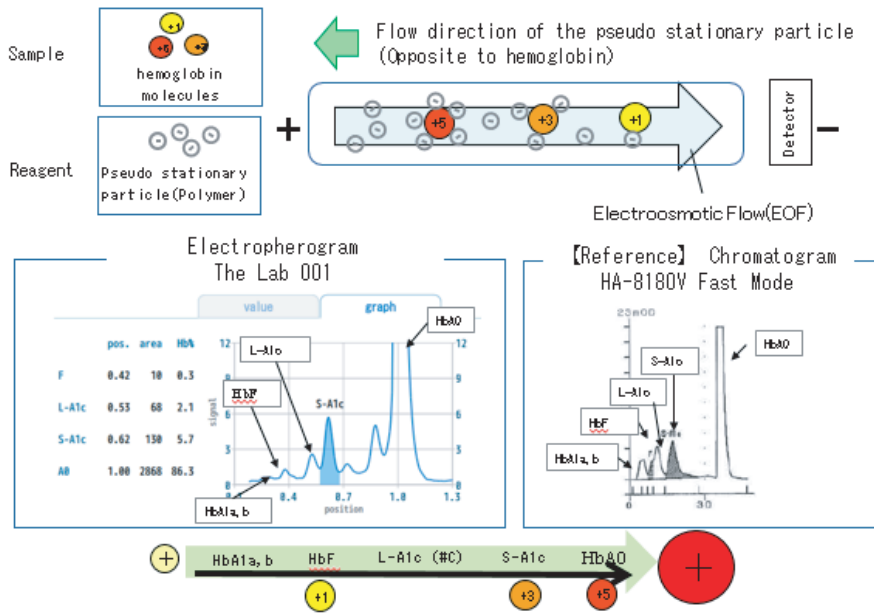


Fig. 1 Principle and Interpretation of Result

[Principle]: The inner side of the capillary is charged negatively in this system, thus the electroosmotic flow (EOF) from positive (+) to negative (-) electrode will start when voltage is applied. Hemoglobin molecules move in the same direction with different speeds in the capillary according to the respective positive charges. In addition, cation exchange electrokinetic chromatography, in which the polymeric pseudo-stationary particle with negative charge binds hemoglobin molecules to suppress the movement of hemoglobin induced by EOF and expand the separation capacity effectively.

[Interpretation of the result]: The basic order of the hemoglobin detection in electropherogram(left) is the same as chromatogram obtained from HPLC (shown in the Figure-1 on the right), which means the order is followed from weak to strong positive charge based on the cation exchange method.

The peak of HbA1c in the display is illustrated in sky blue color and HbA0 is positioned at 1.0 (x-axis).

検体測定に進ませない機能（ロックアウト）にも設定にて対応できる。測定は装置前面下の試薬トレイに試薬カートリッジをセットし扉を閉じることで自動的に開始される。

(2) 試薬

The Lab 001 A1C HD (Fig. 2b) は、使いきりで室温保存の専用試薬で、チップ、試薬パック、キャップの3つから構成される。チップは検体採取用の流路と、40 μm × 40 μm × 30 mm（幅 × 深さ × 長さ）のキャピラリーからなる。試薬パックは、試薬格納部、検体前処理部と電極部

からなり、キャピラリーチップと互いに嵌合することで、試薬を送液するための流路を形成する構造となっている。試薬格納部には2種類の試薬液が格納されており、CS-Cに加えてpH緩衝剤や界面活性剤などが含まれ、熱の発生やpHの変化、検体変性を抑える特性を持つ。キャップは、輸送時のチップ保護と検体点着後のバイオハザードリスクを回避する機能を担う。検体をチップの検体採取部に点着することで、測定に必要な容量（1.5 μL）が毛細管力により吸引される。キャップを介してチップを試薬パック内に押し込むことで、固く不可逆的にかみ

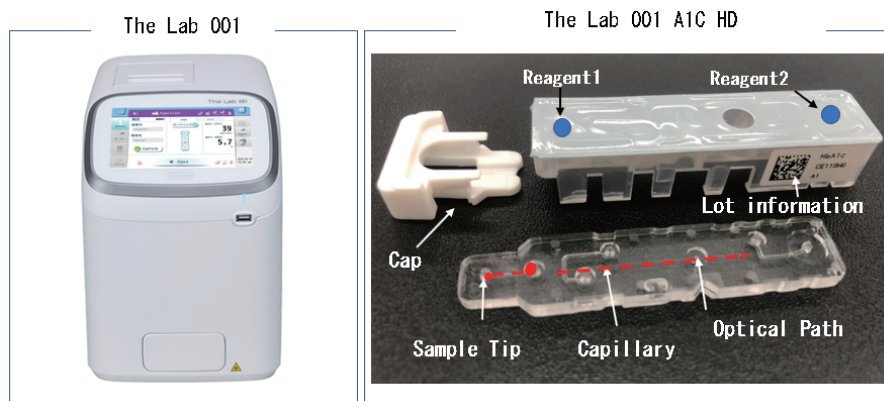


Fig. 2 (a) Device and (b) Reagent

The height and width of the device (The Lab 001) is A4 compact size and ready to run the samples approximately 60 seconds after the power on. Touch screen color GUI with operation guide leads operators smooth testing. The reagent (The Lab 001 A1C HD) is dedicated to the device consists of three parts. Chip (Lower) includes sample tip and capillary. Reagent pack (Upper) includes reagents, electrodes, and sample pretreatment port. Cap (Upper left) protects from breakage or biohazard. Moreover, it equips with the lot and calibration information. The onetime-use and room temperature storage are easy to handle.

合い、測定形態となる。余剰検体はこのときに除かれる。試薬パックにはロット情報ラベルが貼付されており、装置は測定条件や試薬情報、検量線情報等を自動的に読みとるため、ロット毎の測定条件設定やキャリブレーションは不要である。測定完了後は、試薬を廃棄するのみであるため取り扱いが容易である。

3) 測定

(1) 装置動作

測定は、次のステップで行われる。(a) 検体を第一試薬で溶血希釈・攪拌、(b) 第二試薬を電極部とキャピラリー内に充填、(c) 希釈検体をろ過後に電極部に移動、(d) 電圧を印加し電気泳動を開始、(e) 分離した各ヘモグロビン成分を検出部において吸光度測定、(f) エレクトロフェログラムよりHbA1c値を算出。測定時間は90秒、指先全血で検査できるため、TAT (Turn Around Time) の大幅な短縮が期待できる。

(2) データ処理

データ処理は、次のステップで行なわれる。測定時間は相対時間 (Position) として表示され、分析開始時間を0、HbA0のピーク検出時間を

1.0としている。分析開始時間は希釈検体中の電気的中性成分 (第一試薬に含有) が検出された時間であり、各ヘモグロビン成分の検出される相対時間は常に一定である。通常の場合はエレクトロフェログラム上にHbA1a,b、HbF、L-A1c、S-A1c、HbA0の順で検出される。HbA1c値は総面積からHbF面積を除いた総HbA面積とS-A1c面積から算出する。HbA0後にピークが検出された場合は相対保持時間毎に分け、一定の条件を満たした場合に主要変異Hbを検出したと判断し、ピーク情報で知らせるとともに、その影響を除外したHbA1c値を出力する。エレクトロフェログラム上は、HbA1cは水色に、HbFは高値のときにピンク色に、変異Hbは緑色にハイライトされる。通常の相対保持時間は1.3であるが、HbA0後の主要変異Hbを検出した場合は1.7に自動延長される。

Ⅲ. 性能

The Lab 001の基礎性能は三浦らによりなされ、臨床利用する上で十分な性能を有していることが報告されている⁷⁾。本法は指先血での検査だけでなく抗凝固剤入り採血管で静脈採血し

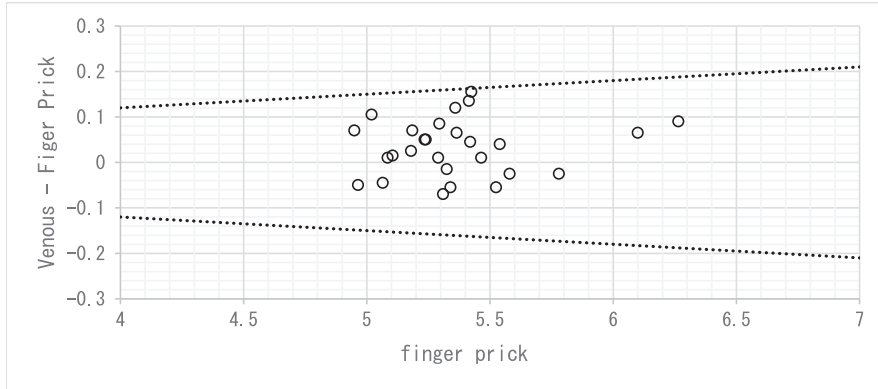


Fig. 3 Compatibility between Finger Prick and Venous Whole Blood
Finger prick blood and venous blood collected with EDTA-2K added test tube from 27 Employee volunteers were used for the confirmation of compatibility. The dotted lines represent +/- 3 relative % difference between the two samples.

Table 1 Precision⁸⁾

	CV (%) IFCC Unit	CV (%) NGSP Unit
EP-5 (Frozen Whole Blood)	1.4 (46.1 mmol/mol)	0.9 (6.37%)
	1.8 (72.0 mmol/mol)	1.5 (8.74%)
EP-15 (Fresh Whole Blood)	1.7 (45.4 mmol/mol)	1.1 (6.30%)
	1.1 (82.4 mmol/mol)	0.8 (9.69%)
Lot A(40 Fresh Whole Blood)	1.8	1.2
Lot B(40 Fresh Whole Blood)	1.6	1.1

To estimate the precision for both IFCC and NGSP units, the following measurements were implemented. Two levels of frozen aliquots were measured duplicate for 20 days for the CLSI EP-5 study and two other levels of fresh were measured quintuple for 5 days for CLSI EP-15. (The figures in brackets are the HbA1c value of used sample.)

40 fresh whole blood samples were measured 8 samples per day for 5 days, duplicate with two lots.

た全血での検査も想定される。このため臨床研究における倫理指針に基づき、事前同意を得た27名の社員血を用いて両試料での同等性を比較した結果をFig. 3に示した。なお抗凝固剤にはEDTA-2Kを用いた。測定値差は±0.2 NGSP%未満(相対3%未満)であり同等性を確認した。

The Lab 001は2019年に発売して2年あまりが経つが、性能について最近の知見を幾つか触れる。一つ目はLentersらがThe Lab 001を含めた合計6種類のPOCT機器の総合評価を行なっている⁸⁾。Table 1は精密度を評価した結果で、上から2濃度の凍結試料を2回/日×20日間測定で得たCV (EP5)、2濃度の新鮮試料を5回/日×5

日測定で得たCV (EP15)、40件の新鮮試料を8検体/日、2回/日で5日、2ロット(A,B)の試薬測定で得たCVである。許容範囲はCV3% (SI・IFCC単位)、CV2% (NGSP単位)⁹⁾であるが、全てクリアできていた。

Fig. 4は、HbA1c値が主要変異HbであるHbC, D, E, S (各20例)、高HbFと高HbA2 (各15例)の影響を受けないかを、これらの影響を受けないことが既知の基準法との間で比較評価した結果である。実線は40件の影響因子を持たない検体(HbAA)との間の相関分析から得られた回帰直線、点線は回帰直線±10%の許容幅でほぼ範囲内にあった。基準法との間で得られたHbA1c

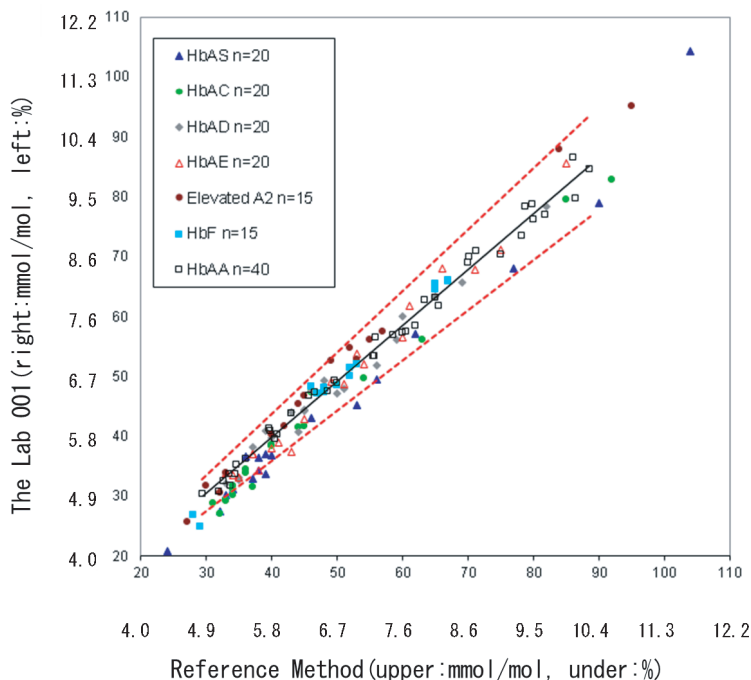


Fig. 4 Interference Avoidance against Major Variant Hemoglobin and Elevated HbF & A2⁸⁾

To evaluate the interference avoidance against Major Variant Hemoglobin and Elevated HbF & A2, the following samples were measured with The Lab 001 and reference methods (Affinity HPLC or cation-exchange HPLC) which have already known no interference against them. 20 samples for each major variant hemoglobin (HbAS, AC, AD, AE) and 15 samples for elevated HbF and HbA2 were used. 40 nonvariant samples (HbAA) were also measured to find the degree of interference for each sample except HbAA. Solid-line is the regression line derived from these 40 samples and the dotted lines are +/- 10% (IFCC units) which represent allowance range.

Plots: HbAA (white square), HbAS (blue triangle), HbAC (light green circle), HbAD (grey diamond), HbAE (red triangle), elevated HbA2 (brown circle), HbF (light blue square)

値差の平均は、いずれも評価基準の10%⁹⁻¹⁰⁾をクリアできていた。その他、IFCC2次基準測定法 (SRMPs Secondary Reference Measurement Procedures) との相関性、直線性も良好で、共存物質やヘマトクリットの影響も受けず、さらにSUS (System Usability Scale) 法¹¹⁾によるユーザビリティ評価でも最高評価の91点であった。

二つ目はIFCC認証について触れる。Fig. 5は2020年のIFCC認証の評価結果である。24件の凍結試料をIFCCネットワークラボでIFCC基準

法 (IFCC-RMP IFCC Reference Measurement Procedure) で値付けされた認証値との比較で行なわれ、50 mmol/mol (NGSP値で6.7%に相当)の精密度 (Imprecision;I) と正確度 (Bias;|B|) からTotal Error (TE =|B|+2I) を算出した結果を基にGold、Silver、Bronze、Standard、Fail (それぞれTEが1.1 mmol/mol未満、2.2 mmol/mol未満、3.3 mmol/mol未満、5 mmol/mol未満、5 mmol/mol以上) の5段階で評価される¹²⁻¹³⁾。左がThe Lab 001の評価結果であるが、2019年度TE=1.5 mmol/molで昨年同様Silver Gradeを獲得

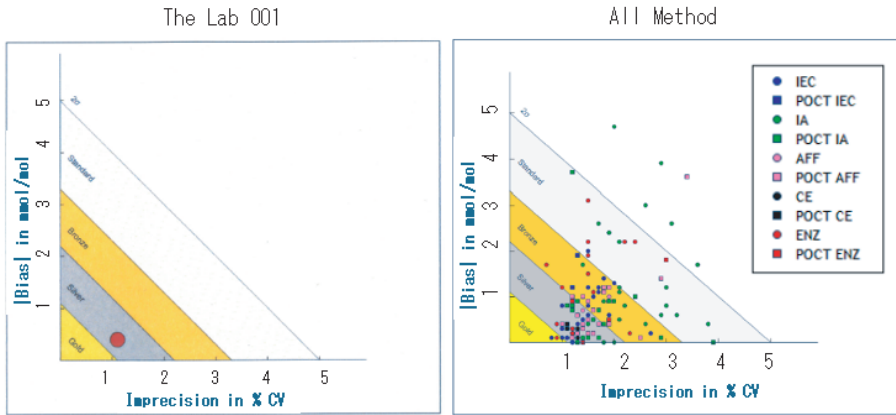


Fig. 5 Grades of IFCC certification¹²⁻¹³⁾ in 2020 (Valid for 2021). The left is The Lab 001 and the right is the distribution of all methods.

IFCC certification is graded by comparing the 24 frozen whole bloods by comparing the results obtained from IFCC reference method procedures (RPMs). The dot (s) in the Graphs represent Total Error (TE), the sum of imprecision (CV%) (x-axis) and Bias at 50mmol/mol from linear regression with RPMs (y-axis). The certification awarded grades; the best grade is Gold (nearest from origin), the second is Silver, the third is Bronze, the fourth is Standard, TE 5mmol/mol or more at 2σ is failed.

Plots: IEC (Ion Exchange Chromatography), IA (Immunoassay), AFF (Affinity Assay), CE (Capillary Electrophoresis), ENZ (Enzymatic Assay)

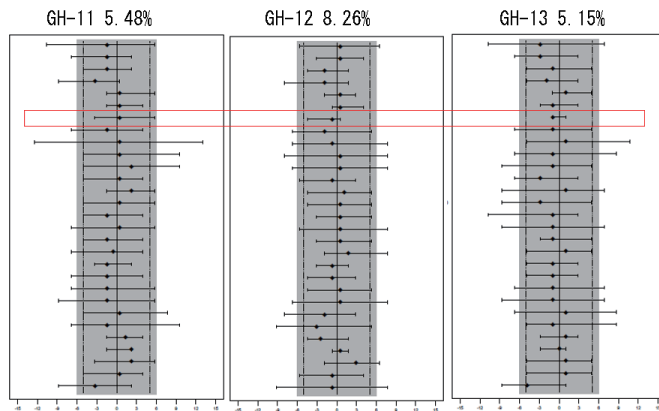


Fig. 6 Distribution of The Lab 001 Population in CAP GH2-B 2020¹⁴⁾

The above three box-and-whisker plots show the distribution of each method for GH-11, GH-12, and GH-13. Gray square represents the acceptable line, ± 6 relative% bias from NGSP SRMs certified value and the dotted line is ± 5 relative% as educational purpose. The black plots mean the average of each method and the lines extend from the minimum to the maximum. The Lab 001 distribution is the seventh from the top (within the red square)

している。右は認証プログラムに参加した全測定法の評価分布であるが、The Lab 001は大規模医療機関で使用される高精度の機器も含めた中で高い性能を保持していることがわかる。

三つ目は2020年の米国臨床病理学会 (CAP, College of American Pathologist) 技能試験に触れる。マトリクスの影響を極力防ぐため正常か糖尿病の提供者から集めた冷蔵全血を使用し、NGSP2次基準施設 (SRL Secondary Reference Laboratory) 9ヶ所の平均値との比較で評価され、評価基準は平均値±6相対%である。Fig. 6が評価結果である¹⁴⁾。上から7番目がThe Lab 001の結果であるが、報告値の収束状況は良好であることがわかる。

IV. まとめ

CE法を応用して小型化を図った分離分析法に基づくThe Lab 001について紹介した。本法は陽イオン交換法を用いておりHPLCと解釈が同等であること、かつ装置操作が簡易で画面表示が分かりやすくメンテナンスフリーなこと、試薬カートリッジのザラボ 001 A1C HDは室温保存であるためハンドリングしやすいことなどが特長である。基本性能も良好で、主要変異Hbを分離・検出し、これらやHbF、HbA2の影響を受けない正確なHbA1c値を提供できる。本製品は指先血で検査できるため、侵襲性が低く、小規模医療施設における診療前即時検査の大幅なTAT (Turn Around Time) 短縮が期待できる。また、大規模施設において検体由来の異常発生時の一次精査用としても活用できる。我々は、このThe Lab 001で新しい糖尿病診療に貢献する。

本論文内容に関連する著者の利益相反：なし

文献

- 1) P Saecedi, I Petersohn, P Salpea, et al.: Global and regional diabetes prevalence estimates for 2019 and projections for 2030 and 2045: Results from the International Diabetes Federation Diabetes Atlas. *Diabetes Research and Clinical Practice*, 157: Article 107843, 2019
- 2) Hoelzel W, Weykamp C, Jeppsson J, et al.: IFCC Reference System for Measurement of Hemoglobin A1c in Human Blood and the National Standardization Schemes in the United States, Japan, and Sweden: A Method-Comparison Study. *Clinical Chemistry*, 50: 166-174, 2004
- 3) WHO : Use of Glycated Haemoglobin (HbA1c) in the Diagnosis of Diabetes Mellitus, 2011
- 4) 清野 裕, 南條輝志男, 田嶋尚子, et al.: 糖尿病の分類と診断基準に関する委員会報告 (国際標準化対応版). *糖尿病*, 55: 485-504, 2012
- 5) 森口奈美子, 児玉真由美, 奈須正人, et.al.: グリコヘモグロビン分析装置 ADAMS A1c HA-8190V の基礎性能評価と利点. *医療と検査機器・試薬*, 41(5): 521-530, 2018
- 6) van der Hagen E.A., Leppink S, Bokkers K, et.al.: Evaluation of the ARKRAY HA-8190V instrument for HbA1c. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 59(5): 965-970, 2020
- 7) 三浦辰郎, 小森法子, 金丸青空, et.al. :グリコヘモグロビン分析装置「The Lab 001」の基本性能評価. *医療と検査機器・試薬*, 42(6): 472-477, 2019
- 8) Lenters-Westra E, English E.: Are hemoglobin A1c point-of-care analyzers fit for purpose? The story continues. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 59(4): 765-774, 2020
- 9) Weykamp C, Mosca A, Gillery P, et.al.: The analytical goals for hemoglobin A1c measurement in IFCC units and National Glycohemoglobin Standardization Program Units are different. *Clinical Chemistry*, 57: 1204-1206, 2011
- 10) Rohlfing C, Hanson S, Weykamp C, et.al.: Effects of hemoglobin C, D, E and S traits on measurements of hemoglobin A1c by twelve methods. *Clinica Chimica Acta*, 455: 80-83, 2016
- 11) Brooke J: SUS A quick and dirty usability scale <https://www.researchgate.net/publication/228593520> (2021年5月20日参照)
- 12) IFCC Network for Standardization of HbA1c, IFCC HbA1c Certificate <https://www.ifccba1c.org/UserData/Files/210101%20Certificate%20information.pdf> (2021年5月20日参照)
- 13) Weykamp C, John G, Gillery P, et.al.: Investigation of 2 Models to Set and Evaluate Quality Targets for HbA1c: Biological Variation and Sigma-Metrics. *Clinical Chemistry*, 61: 752-759, 2015
- 14) College of American Pathologist: Hemoglobin A1c, 5 Challenge GH5-C 2020 Participant Summary, 2020