

# 自動分析装置によるヘモグロビン A1c の測定

井本幸子<sup>1</sup> , 木戸毅<sup>1</sup> , 中西四郎<sup>1</sup> , 山野親逸<sup>1</sup>

## HbA1c assay by auto clinical chemistry analyzer

Sachiko IMOTO , Tsuyoshi KIDO , Shiro NAKANISHI , Chikaitzu YAMANO

**Abstract :** Latex agglutination immunoassay (LAIA), using HbA1c monoclonal antibody, is generally applied to quantify HbA1c by auto clinical chemistry analyzer, which is increasingly used in many laboratories. In the comparison between LAIA and high performance liquid chromatography (HPLC) methods for HbA1c assay, we found that the LAIA showed high reproducibility in a good correlation with HPLC, but its measurement values tended to be lower than those by HPLC method. However, the difference observed between two methods became smaller in 200-fold diluted samples.

**Key Words :** 自動分析装置 auto clinical chemistry analyzer , ヘモグロビン A1c hemoglobin A1c , モノクローナル抗体 monoclonal antibody , ラテックス凝集測定法 latex agglutination immunoassay , 高速液体クロマトグラフィー high performance liquid chromatography

## はじめに

ヘモグロビン A1c (HbA1c) は、検査前 1 ~ 2 ヶ月の平均血糖値を示す指標であり、代謝状態の経過観察に有用である。赤血球の寿命と関係があり、出血、鉄欠乏性貧血の回復期、進行した肝硬変などを含む溶血性疾患で低値をとり、またヘモグロビン異常症でも通常と異なる値になる。このような問題がなく、高血糖で、HbA1c が高値を示す場合は、糖尿病が疑われる。その他の血糖コントロールの指標として、フルクトサミン (FRA) , 1,5アンヒドログルシトール (1,5AG) などがあるが、HbA1c の臨床ニーズが高い。当所では、現在、基本検診生化学13項目の1つとして HbA1c の測定を行っており、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) 法による専用機を使用している。ラテックス凝集測定法 (LAIA) では、他の生化学項目と同様、自動分析装置により測定を行うことが可能で、大量検体処理にも適している。モノクローナル抗体を用いているため特異性が高いこと、また日本糖尿病学会 (JDS) HbA1c 標準物質が免疫法に適用可能となり、使用施設数は増加している。ラテックス凝集試薬を用い自動分析装置による HbA1c の測定を行い、従来法との比較検討を行った。

## 対象及び方法

平成16年 8 月、9 月の基本検診検査測定後の EDTA 採血血液、計85件を使用した。試料のうち67件は、2,000rpm で 2 分遠心後、下層の血球を10 µl 採り、専用希釈液 (協和メデックス) 1 ml で溶血検体として HbA1c を測定し、残りの18検体は、希釈検討用に用いた。自動分析装置 (7150型; 日立) を用い、試薬は自動分析装置用試薬 (協和メデックス) , HbA1c キャリブレーター (5 濃度; 協和メデックス) 及びコントロール (協和メデックス) を使用した。再現性の検討には、コントロール (GHb トロール; 国際試薬) を使用した。分析方法は、2 ポイントエンド法、キャリブレーション方法は非直線法 (タイプ 4) を使用した。セルコンタミ回避プログラムを使用し、測定後のセルを10%洗浄液 (協和メデックス) で常時洗浄を行った。

HPLC 法による HbA1c 測定には、自動グリコヘモグロビン測定装置 (HA8150; アークレイ) を使用した。HbA1c は、総ヘモグロビン (Hb) 中に占める HbA1c の比率 (%) で示した。

## 結果及び考察

### 1. 再現性

表 1 に LAIA による HbA1c 測定値の再現性を示す。同時再現性は、コントロール 2 濃度を15回測定して求め、CV (変動係数) は0.87, 0.42%であった。日差再現性は、4 日間について行い、CV は0.85, 1.91%で、ともに良好な結果が得られた。

<sup>1</sup> 京都市衛生公害研究所 臨床部門

表1 LAIAによるHbA1c測定値の再現性

		コントロール (%)	コントロール (%)
同時 再現性	n	15	15
	Mean	5.91	9.92
	SD	0.05	0.04
	CV	0.87	0.42
日差 再現性	n	4	4
	Mean	5.85	9.80
	SD	0.05	0.19
	CV	0.85	1.91

## 2. HPLC法とLAIAの比較検討

表2にHPLC法とLAIAのHbA1c, GLU値を示す。計67件について、平均値±SDは、HPLCで5.65±1.00%、LAIAでは5.19±0.98%でGLUは104.5±24.7mg/dlであった。HbA1c6.0%未満の52件について、HPLCで5.22±0.37%、LAIAでは4.84±0.35%となった。GLUは96.6±15.1mg/dlであった。HbA1c6.0%以上の15件については、HPLCで7.13±1.09%、LAIAでは6.64±1.09%で、GLUは131.9±31.8mg/dlであった。HbA1cの高い検体は、GLUも高い傾向が見られた。計67件について、HPLCとGLU値との相関はr=0.801、LAIAではr=0.791となり、差は見られなかった。

図1にHPLC法とLAIAの相関を示す。計67件について、相関式は $y = 0.9636x - 0.2556$  (r=0.981) が得られた。LAIAは、HPLC法より測定値が低い傾向が見られた。HPLC法は、JDSのHbA1c標準化により不安定型HbA1cを除去する測定方法とされているが、その他の修飾ヘモグロビンは相加されることがあり、その影響が考えられたが、クロマトグラム上には検出されていなかった。HbA1c値は血糖コントロールの指標として重視されているため、測定差は軽減されなければならないと思われた。

表3に希釈による測定値への影響を示す。HPLC法による測定値、5.79±0.74%の18件について、50倍希釈では、5.09±0.69%でHPLC法とLAIAとの測定差は0.6~0.9%、相関式は $y = 0.9201x - 0.2322$  (r=0.992)であった。200倍希釈では、5.58±0.73%で、測定差は0~0.4%、相関式は $y = 0.9571x + 0.0372$  (r=0.970)であった。検体の測定条件として、100倍溶血液はヘモグロビン濃度3mg/dl付近となり、ヘモグロビン濃度2~5mg/dlの間でヘモグロビン濃度の影響を受けなかったとの報告があったが、今回の検討では、検体数は少ないが希釈条件により測定値は

表2 HPLC法とLAIAのHbA1c測定値の比較及びGLU値

HbA1c (%)	n	HPLC法 (%)	LAIA (%)	GLU (mg/dl)
6.0未満	52	5.22±0.37 <sup>a)</sup>	4.84±0.35 <sup>a)</sup>	96.6±15.1
6.0以上	15	7.13±1.09	6.64±1.09	131.9±31.8
合計	67	5.65±1.00	5.19±0.98	104.5±24.7

<sup>a)</sup> Mean ± SD

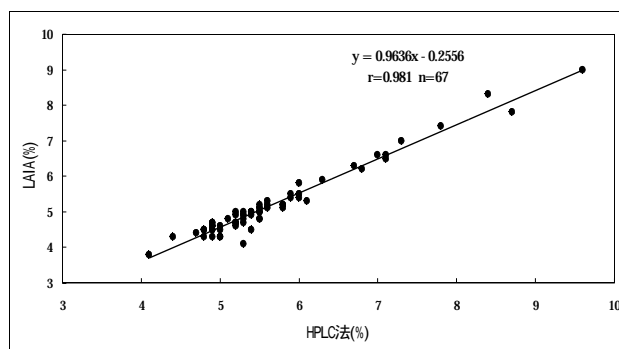


図1 HPLC法とLAIAの相関

表3 LAIAによるHbA1c測定値の希釈の影響

希釈率	n	HbA1c <sup>b)</sup> (%)	測定差 <sup>c)</sup> (%)
×50	18	5.09±0.69 <sup>a)</sup>	0.6~0.9
×200	18	5.58±0.73	0~0.4

<sup>a)</sup> Mean ± SD

<sup>b)</sup> HPLC法 5.79±0.74(n=18)

<sup>c)</sup> HPLC法とLAIAにおける測定値の差を表す

変化した。50倍希釈では測定値は低くなり、200倍希釈では測定差が減少する傾向が見られ、相関式については図1より良好で、相関係数は低下したが、測定に適すると思われた。抗原抗体反応を用いているため、試薬管理、測定条件には注意が必要であったし、溶血操作にも多少手間がかかる場所があったが、自動分析装置の機能も向上しているので、改善可能範囲であると思われた。

## 文献

- 1) 平田稔, 他: 医学と薬学, 34(1), 125 - 136 (1995)
- 2) 畠山郁夫, 他: 医学と薬学, 41(6), 1181 - 1186 (1999)
- 3) 金澤康徳, 他: 糖尿病治療ガイド, 7, 文光堂(2003)