

ISSN 2186 – 3989

HbA1c 測定における遠心操作の影響 ～その1～

滝野 豊、寺澤 文子、油野 友二、柴田 宏

Influence of Centrifugal Operation on HbA1c Measurement, Part1

Yutaka Takino, Fumiko Terasawa, Tomoji Yunno, Hiroshi Shibata

北 陸 大 学 紀 要
第47号(2019年9月)抜刷

HbA1c 測定における遠心操作の影響 ～その 1～

滝野 豊*、寺澤 文子*、油野 友二*、柴田 宏*

Influence of Centrifugal Operation on HbA1c Measurement, Part1

Yutaka Takino*, Fumiko Terasawa*, Tomoji Yuno* and Hiroshi Shibata*

Received June 24, 2019

Accepted July 8, 2019

Abstract

Hemoglobin A1c(HbA1c) is a glycation of hemoglobin β chain N terminal 6 amino acid valine. HbA1c as a measurement target is defined as β 1-fructosyl hemoglobin. The method of measuring HbA1c was mainly HPLC method. Recently, other methods such as immunoturbidimetric and enzymatic methods have been developed. Other than HPLC method, use a centrifuged blood cell layer as the measurement sample. At that time, it is pointed out that the specific gravity difference of the blood cell layer is generated by the centrifugation operation, and the HbA1c value is different. The authors examined whether it could be reproduced using two reagents of the enzymatic method. Furthermore, it was investigated to what extent hemolysis had an effect.

As a result of the examination, there was no difference in blood cell layer depending on the used reagent. Similarly, there was no effect of hemolysis. These results can not be explained by the conventional theory that it is the influence of the age difference of erythrocytes.

はじめに

ヘモグロビン A1c (Hemoglobin A1c:HbA1c) はヘモグロビン β 鎖の N 末端 6 番アミノ酸バリン(Val)の糖化であり、測定対象としての HbA1c を β 1-fructosyl hemoglobin と定義¹されている (図 1)。

糖尿病患者において、HbA1c 値を治療目標域に保持することが糖尿病性合併症の発症や進展を抑制する指標となることが複数の大規模臨床研究で明らかにされ、HbA1c は今日の糖尿病の診断や治療における指標として重要な臨床検査項目の 1 つである。

HbA1c の市中病院検査室における測定方法は当初アフィニティ法であったが、測定精度が好ましくなく、現在では臨床現場即時検査(POCT)で採用されるのみとなった。アフィニティ法に変わり HPLC 法による専用分析装置を用いるものが主流になったが、近年、技術進歩により免疫比濁法、酵素法による測定も開発された。専用分析装置が無い施設においても汎用生化学自動分析装置で測定できるようになり、HbA1c 測定を実施する施設数は増

*医療保健学部 Faculty of Health and Medical Sciences

加している。汎用生化学自動分析装置においては、全血検体からサンプリングし、希釈を行う機能が追加され、多くの施設が使用している。

HbA1c 測定値については、日本糖尿病学会（JDS）が主導となり標準化が行われ、さらに 2012 年 4 月には JDS 値から国際標準値である NGSP 値への移行も行われ国際的なデータ標準化へと導かれている²。このような標準化が進む一方で、測定機器、試薬の違いが HbA1c 実測値に差異を生じている³との報告がある。

また、標準化で使用される試料や全国規模で実施される精度管理調査において配布される試料は溶血検体であるが、実際に患者検体で検査を行う際は全血検体を用いる。全血試料の取り扱いを適切に行わなければ、標準化されたデータは得られない。溶血管理試料を用いた精度管理調査においては参加施設の変動係数 CV(%)は 1.2~1.4 %⁴であるが、全血試料を用いた場合の CV(%)は 1.6~1.9 %⁵とばらつきが大きい。

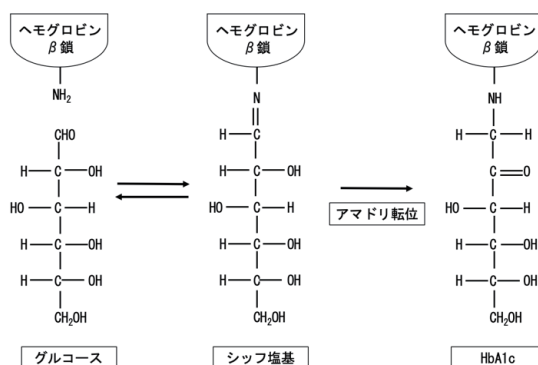


図 1 ヘモグロビンの β 鎖にグルコースが不可逆的に結合し HbA1c となる

筆者らは方法間差の原因を探るために、測定手順において遠心操作を含む方法と含まない方法が存在することに着目した。HPLC 法が主流であった頃、血球層の上部と下部とで比重の差による赤血球日齢が異なり⁶、サンプリング部位により測定値に影響がでることが報告された⁷。当時の HPLC 法は測定時間が長く、測定までの待機時間が長い場合は自然沈降による濃度勾配が生まれ測定値に影響があった。この影響を解消するために測定前に全血を攪拌することで検体を均一化するという対策がとられた。一方で最近、開発された免疫比濁法や酵素法では測定前に遠心し、下層に集められた血球層からサンプリングする手順となっており同様の問題が生じる可能性がある。そこで、遠心条件の違いによる HbA1c の濃度勾配の程度を検討し、さらに濃度勾配が酵素法による測定においてどの程度影響があるのか 2 種類の測定試薬で検討した。

また溶血検体について HPLC 法では影響を受けないものの、測定方法によっては軽視できない程度認められる⁸との報告もあり、それを確認するため採取後数日が経過し溶血が認められた検体を用いて同様の検討をした。

なおこの研究は北陸大学臨床研究倫理審査（受付番号：H30 第 3 号）、浅ノ川総合病院倫理審査（承認番号：第 114 号）により承認を得て行った。

材料と方法

浅ノ川総合病院で HbA1c 検査目的に採取された NaF・EDTA-2Na 加血液の残余 3 本を匿名化処理した後、保冷ボックスに入れて北陸大学へ輸送した。

NaF・EDTA 加血液を毛細ガラス管 (ringcaps[®]、200 μ L 用) に移し、2 種類の条件 (弱遠心：800 G \times 5 分、強遠心：2000 G \times 5 分) で遠心分離し、得られた血球層をアンプルカッターで上層、中層、下層と 3 層に分離した。(図 2)

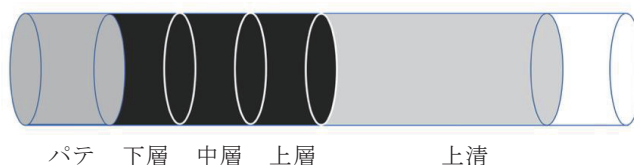


図 2 全血を毛細管に入れ遠心し、血球層を 3 層に分離

得られた 3 層の血球をパラフィルム上に滴下し、試薬メーカーの指定する方法で用手的に希釈し測定検体とし、生化学自動分析装置 BioMajesty[®] JCA-BM6010 (日本電子) を使用し 2 種類の測定試薬で HbA1c を 2 重測定した。さらに採取後 24 時間経過した検体 (溶血検体) を用いて同様に測定した。なお検体の残余は協力病院へ返却した。

使用した 2 種類の HbA1c 測定試薬は、積水メディカル ノルディア[®]N HbA1c、および協和メデックス メタボリード[®] HbA1c を使用した。検体希釈方法はメーカーの使用方法に準じてノルディア[®]N HbA1c は血球 25 μ L を前処理液 500 μ L で希釈、メタボリード[®] HbA1c は血球 10 μ L を精製水 400 μ L で希釈とした。両試薬の測定原理は、変性させたヘモグロビンにプロテアーゼを作用させ、 β 鎖 N 末端由来の糖化ジペプチドを切り出し、切り出した糖化ジペプチドに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、この発色吸光度の変化から HbA1c 濃度を求めるものである。

結果

弱遠心後に 3 つの血球層に分けてから 2 種類の試薬で HbA1c 値を 2 重測定した結果の平均値 \pm 標準誤差を表 1 に、強遠心後に 3 つの血球層に分けてから 2 種類の試薬で HbA1c 値を 2 重測定した結果の平均値 \pm 標準誤差を表 2 にそれぞれ示した。(表 1、表 2)

表 1 メーカー指定の遠心条件で分離した赤血球層別の HbA1c 値(%)

800G \times 5 分	使用測定試薬	上層	中層	下層
Sample No.1	メタボリード [®]	7.05 \pm 0.05	7.00 \pm 0.10	7.15 \pm 0.05
	ノルディア [®] N	7.35 \pm 0.05	7.10 \pm 0.00	7.20 \pm 0.00

表 2 強遠心で分離した赤血球層別の HbA1c 値(%)

2000G×5分	使用測定試薬	上層	中層	下層
Sample No.2	メタボリード®	6.95±0.25	7.10±0.10	7.20±0.00
	ノルディア®N	7.15±0.05	7.25±0.05	7.15±0.05
Sample No.3	メタボリード®	5.95±0.05	6.05±0.05	6.25±0.05
	ノルディア®N	6.30±0.00	6.35±0.05	6.40±0.00

採血後 24 時間経過し溶血した検体について、強遠心によって 3 つの血球層に分けてから 2 種類の試薬で HbA1c 値を 2 重測定した結果の平均値±標準誤差を表に示した (表 3)。

表 3 溶血検体を強遠心で分離した赤血球層別の HbA1c 値(%)

2000G×5分	使用測定試薬	上層	中層	下層
Sample No.3	メタボリード®	5.95±0.05	6.05±0.05	6.10±0.00
採血 24 時間後	ノルディア®N	6.40±0.10	6.35±0.05	6.55±0.05

考察

メーカー指定の弱い遠心で前処理をした場合でも、メタボリード®では従来から指摘されている血球層の上層ほど低値になる傾向を認めたが、ノルディア®N ではその傾向は明らかではなかった。強遠心で前処理した場合、メタボリード®ではその傾向が顕著になったが、ノルディア®N では弱遠心と同様に血球層差に一定の傾向を認めなかった。強く遠心した場合の血球層に赤血球老若の差で比重が変わることで HbA1c 値が均一ではない⁴との指摘は、今回の検討では必ずしも一致しない結果であった。

血球層での差を認めたメタボリード®では検体希釈に精製水を用いており、ノルディア®N では前処理液を用いて希釈することがその理由の一つと思われる。前処理液の作用は赤血球のメト化でありヘモグロビン濃度を測定するための処理であると思われるが、それにより何らかの修飾が解除された可能性が考えられる。この可能性を確認することができれば、測定方法間差を解消する手段が得られることが期待できる。メト化は鉄イオンが二価から三価になる酸化であり、硝酸塩などの薬物によって引き起こされるが、酸化によって非酵素的な糖鎖付加(糖化)が切り離された可能性もある。ただしノルディア®N の前処理液の組成は公表されていないことからこれ以上の議論はできない。原因を特定するためには追加の検討が必要である。

次に、検体に溶血を認めた場合の影響について考察する。HbA1c は HbA が高濃度のグルコースにさらされ糖化したものだが、グルコースが高濃度ほど、また長時間さらされるほど多くの HbA が糖化され HbA1c 値が高値となる。表 2 の Sample No.3 のメタボリード®下層に比べて表 3 のメタボリード®下層のデータが低値になっている。したがって時間経過による溶血の影響は、古い血球層である下層のデータのみが低値になっていることから、古い血球が壊れたことによる HbA1c 値の低下といえる。古い血球ほど HbA1c 値が高く、古い血球ほど壊れやすいために、溶血検体では HbA1c 値が低値になる⁹という報告と

一致したが、ノルディア®Nの測定結果はむしろ高値に変化しており一致しなかった。

溶血検体が測定結果に与える影響を考察するために、石川県医師会臨床検査精度管理調査結果を測定方法別に表にまとめた(表4)。表4から、全血を用いることで溶血の影響を全く受けないとされるHPLC法に比べ、酵素法であるノルディア®Nが溶血の影響を受け低値に測定されたことが分かる。我々が3層に分けて行なった検討結果とは一致せず、理由も明らかではないが、今後例数を増やして検討する必要がある。一方でノルディア®Nと同様に遠心検体を用いるサンク®HbA1cや免疫比濁法では溶血の影響は少ない。この結果は古い血球が壊れたという説明だけでは説明できない。

ヘモグロビンの糖化、メト化の分子構造変化、あるいは溶血によってこれらの分子構造がどの程度変化するのかを調査する必要がある。検討した検体数が少ないことから、今後例数を増やして検討する必要がある。

表4 測定方法によって溶血の影響は異なる
(石川県医師会臨床検査精度管理調査報告書⁵から算出)

測定方法(試薬、メーカー名)	施設数	試料1 溶血：弱	試料2 溶血：強
酵素法(ノルディア®N)	5	5.82±0.08	7.32±0.13
酵素法(サンク®HbA1c)	1	5.90±0.00	7.60±0.00
免疫比濁法(デタミナ®L)	2	5.90±0.14	7.45±0.21
免疫比濁法(シーメンスHCD)	2	5.85±0.07	7.55±0.07
HPLC法(アークレイ)	17	5.86±0.09	7.74±0.10
HPLC法(東ソー)	16	5.86±0.10	7.66±0.12

おわりに

HbA1c測定における遠心操作による血球層の違いや溶血の影響について、酵素法の2つの試薬を用いてすでに報告されている程度を再現できるか検討した。その結果、使用する試薬によっては血球層の差は生じなかった。同様に溶血による影響も試薬により一定ではなかった。これらの結果は、赤血球の日齢差による影響というこれまでの説では説明できない内容であった。検討した例数が少なく断定することはできなかったことから、今後追加検討が必要である。

引用文献

- 1 Hoelzel W. et al. Development of a reference system for the international standardisation of HbA1c/ glycohemoglobin determinations “Journal of the International Federation of Clinical Chemistry,”8(2), 62-67(1996).
- 2 武井泉「糖尿病診断におけるHbA1c標準化」『歯科学報』, 115(6), 555-564(2015).
- 3 石黒旭代他「ヘモグロビンA1c値の測定方法間差の現状」『医学検査』, 63(6), 767-772(2014).

- 4 一般社団法人 日本臨床衛生検査技師会『平成 30 年度 日臨技臨床検査データ標準化事業 報告書』(2019).
- 5 石川県医師会『平成 30 年度 石川県医師会臨床検査精度管理調査 報告書』(2019).
- 6 Nakashima K. et al. Glycated hemoglobin in fractionated erythrocytes “Clinical Chemistry,” 35(6), 958-962(1989).
- 7 宮下徹夫他「ヘモグロビン A1c 測定に用いる血液試料の検討—遠沈された検体の赤血球層を試料とする場合の問題点について」『日本臨床検査自動化学会会誌』,29(3):181-189(2004).
- 8 中西加代子他「新標準物質 JCCLS CRM-004a (JDS Lot3) に準拠した HPLC 法およびラテックス法における HbA1c 測定値の評価」『日本臨床検査自動化学会会誌』,34(2):233-237(2009).
- 9 宮下徹夫「HbA1c 測定における遠心操作の影響」『検査と技術』,42(7):640-643(2014).