

# 免疫比濁阻害法を用いたヘモグロビン A1c 測定試薬キット「エルシステム・HbA1c」の基本性能とグリコヘモグロビン標準化への対応

濱藤 徹郎, 高山 三松, 山田 孫平, 白波瀬 泰史

シスメックス株式会社試薬開発本部：神戸市西区室谷1-2-2（〒651-2241）

## SUMMARY

今回開発した免疫比濁阻害法を用いたHbA1c測定試薬キット「エルシステム・HbA1c」は、日本糖尿病学会標準物質（JDS標準品Lot. 2）を基準としてキャリブレーターを設計し、HbA1cの標準化に対応できることを目的として開発された。本試薬キットとJDS標準品Lot. 2でキャリブレーションしたHPLC法との相関性は、回帰式 $y = 1.012x - 0.108$ 、相関係数： $r = 0.989$ であった。本試薬キットはJDS標準品Lot. 2に対する正確性に優れ、JDS標準品Lot. 2を基準とした実検体試料の測定値の管理が可能であった。これらのことから本試薬キットは、現在の標準化に対応した測定方法であり、IFCC測定体系へのスムーズな移行にとってもより有利であると考えられた。

**Key Words** HbA1c, 免疫比濁阻害法, JDS標準品Lot. 2, 正確性

## 背景

糖尿病病態の主徴である高血糖の持続は、血液中ヘモグロビンの糖化を促進させる<sup>1)</sup>。ヘモグロビンA1c（HbA1c）はヘモグロビン鎖のN末端がグルコースと安定なケトアミンを形成したものであり、総ヘモグロビン量に対するHbA1c量は過去1～2ヶ月間の積分的な血糖値を反映する。HbA1cは現在最も利用されている血糖コントロールマーカーであり、糖尿病患者の経過観察あるいは病態の診断にとって不可欠な情報である。

診断マーカーには、その測定値に基づいた病態の統一的な評価が可能であることが要求される。しかし、HbA1cが血糖コントロールマーカーとして利用され始めた当初はこの要求が満たされていなかった。IFCC（International Federation of Clinical Chemistry）では、標準化（standardization）された測定体系を確立

するため、精製HbA1cとHbA0を混合した1次標準物質とペプチドマッピングによる実用基準法を定めた<sup>2)</sup>。現在1次標準物質の値付け作業が進められており、近い将来に確立されるであろうIFCCの測定体系はわが国を含め世界各国で取り入れられる方針である。わが国においては1993年から1998年の日本糖尿病学会（Japan Diabetes Society: JDS）「グリコヘモグロビンの標準化に関する委員会（委員長：島健二）」の活動<sup>3, 4)</sup>、それを引き継いだ日本糖尿病学会「糖尿病関連検査の標準化に関する委員会（委員長：富永真琴）」<sup>5)</sup>と日本臨床化学会（Japan Society of Clinical Chemistry: JSCC）「糖尿病関連指標専門委員会（委員長：星野忠夫）」<sup>6)</sup>により標準化が進められてきた。これらの委員会ではIFCCの測定体系にスムーズに移行することを視野に入れ、IFCCの規格に準じた標準物質（JDS標準品Lot. 2）を作製した。この標準物質を

基準とした測定値の管理により，HbA1cによる病態の統一評価が可能である。従って，臨床応用されるHbA1c測定法にとってJDS標準品Lot. 2に対する正確性は，標準化に対応するための要求事項である。

JDS標準品Lot. 2の正確な測定値を得るためには，HbA1cに特異性の高い測定が必要である。現在汎用型自動分析機に適用できるHbA1c測定法としては，免疫比濁阻害法とラテックス比濁法が開発されている。しかしながら，ラテックス比濁法は別途，総ヘモグロビン量を求める必要がないという利便性があるものの，血漿成分の影響を受けるという欠点が指摘されている。すなわちラテックス比濁法はHbA1cに特異的な測定には不向きであり，標準化に対応できる測定法ではない。今回我々は，HbA1cに対する特異性の高い免疫比濁阻害法を測定原理として採用し，JDS標準品Lot. 2を基準としてキャリブレーターを設計することにより，標準化に対応したHbA1c測定試薬キット「エルシステム・HbA1c」を開発した。本稿では，本試薬キットの基本性能についてJDS標準品Lot. 2に対する正確性を中心に評価を行った。

## ■ 試薬キットの設計及び評価方法

### 1. 免疫比濁阻害法の測定原理

免疫比濁阻害法によるHbA1cの測定原理を図1に示した。全血を0.9%テトラデシルトリメチルアンモニウムブロマイドを主成分とする検体調製液で希釈することにより，抗原決定基となるHbA1cの鎖N末端部分が露出した溶血検体を調製する。溶血検体中のHbA1cに対して過剰量の抗HbA1cポリクローナル抗体（ヒツジ）を含む第1試薬（R1）を添加した後，HbA1cの抗原決定基を持つポリハプテンを第2試薬（R2）として添加し，未反応の抗体とポリハプテンとの複合物の濁度（340nm）を測定することにより，HbA1c量を定量するものである。

また総ヘモグロビン量は，同じ溶血検体のヘモグロビン由来の吸収（570nm）により比色定量し，HbA1c量と総ヘモグロビン量のそれぞれの測定結果から総ヘモグロビン量に対するHbA1c量，すなわちHbA1c（%）が算出される。

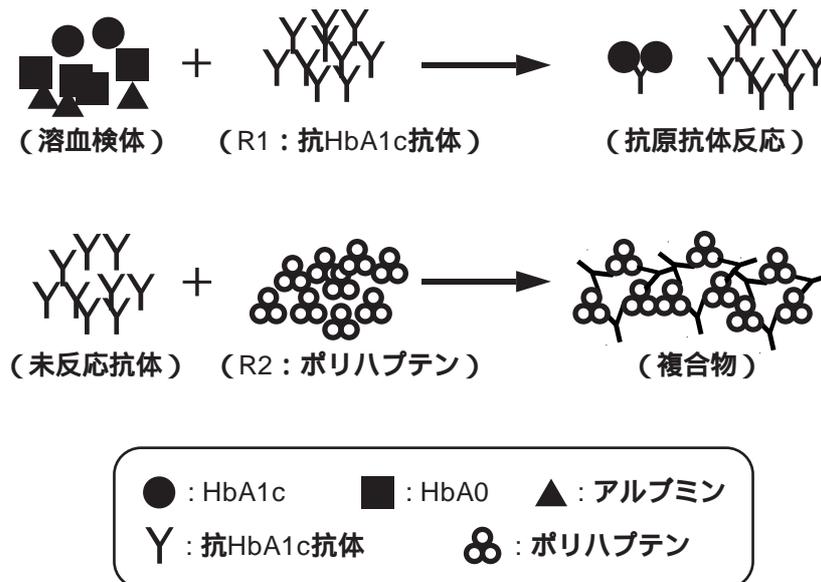


図1. 免疫比濁阻害法によるHbA1cの測定原理

## 2. キットの構成及び操作方法

本キットは検体調製液，HbA1c測定用第1試薬（R1），第2試薬（R2），総ヘモグロビン測定用緩衝液，キャリブレーター（4濃度）から構成される。溶血検体は，全血（EDTA加血あるいはヘパリン加血）1容量を100容量の検体調製液で希釈することにより調製される。キャリブレーター（4濃度）は，それぞれの凍結乾燥バイアルを2 mLの検体調製液で溶解したものをを用いる。HbA1c測定の検量線は，精製水と4濃度のキャリブレーターから得られる多点検量線（ロジットログ4P）であり，総ヘモグロビン測定の検量線は，精製水と任意のキャリブレーターの1点検量（リニア）である。操作方法及び測定のダイアグラムは図2に示した。なお，本試薬キットでは，測定値を標準化に対応した値（JDS標準品を基準とした値）に一致させるために，補正式（ $JDS \text{ 値} = \text{測定値} \times 0.7 + 2.6$ ）を設定した。

## 3. キャリブレーターの設計

本試薬キットのキャリブレーターは，4点のヒト血球成分凍結乾燥品として作製した。キャリブレー

ターには，以下のような手法によりJDS標準品Lot. 2を基準とした値付けを行った。

5濃度のJDS標準品Lot. 2（HbA1c表示値 = 4.04%，5.38%，7.32%，9.88%，12.63%）をそれぞれ8段階希釈し，様々な総ヘモグロビン量，HbA1c量を示す40検体の試料を調製した。前述した補正式に代入して求めたHbA1c（%）と比色法（570nm）により測定した総ヘモグロビン量を乗じることにより，各試料のHbA1c量を0.18g/dLから3.06g/dLと算出した。40検体の試料をHbA1c測定用試薬での測定吸光度をBox-Cox変換（ $\lambda = -0.05$ ）し，HbA1c量（x）とBox-Cox変換吸光度（y）のプロットから直線回帰式を求めた。この直線回帰式に，4点のキャリブレーターのBox-Cox変換した測定吸光度を代入することによりHbA1c量を求め，これをキャリブレーターの表示値とした。

## 4. HbA1c に対する特異性

本法試薬キット及び市販されている2社のラテックス比濁法試薬キットについて，実検体試料を測定したときのHbA1cに対する特異性を比較した。特異

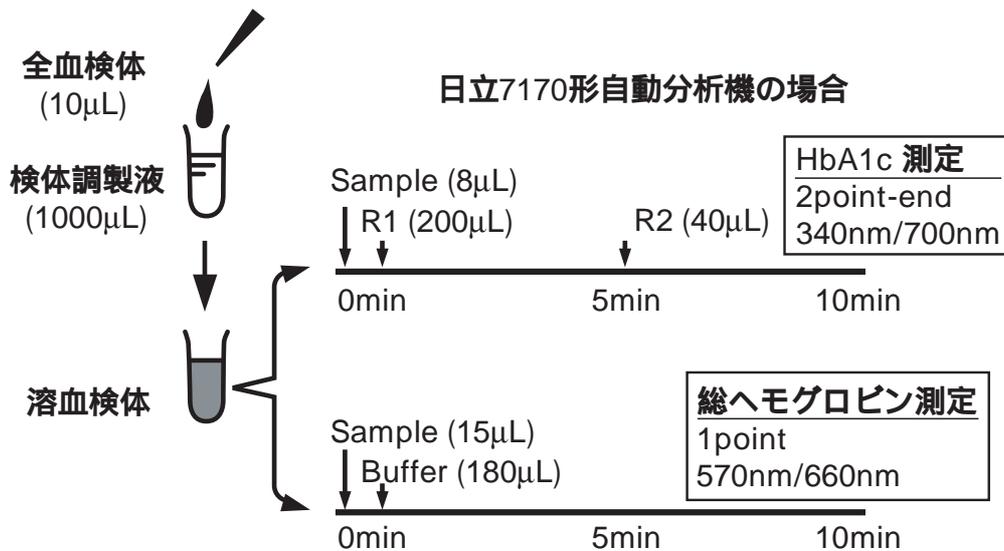


図2. 操作方法及び測定ダイアグラム

HbA1c（%）測定値は，総ヘモグロビン量に対するHbA1c量の百分率から求める。さらに，JDS（日本糖尿病学会）値に一致させるためには，補正式（ $JDS \text{ 値} = \text{測定値} \times 0.7 + 2.6$ ）による演算を行う。

性は、HPLC法（HLC-723GHbV，東ソー）での測定値とのバイアス（〔試薬キット測定値〕−〔HPLC法測定値〕／〔HPLC法測定値〕×100）により評価した。実検体試料としては、HPLC法でのHbA1c（%）測定値が4.6%から9.8%である99例を用いた。

### 5. JDS 値に対する正確性

本試薬キットとJDS標準品 Lot. 2 でキャリブレーションしたHPLC法との相関性を146例の実検体試料について求めた。同時にJDS標準品 Lot. 2 についても測定し、実検体試料の測定挙動と比較した。さらに、JDS標準品 Lot. 2 を5回連続して測定し、その平均測定値の正確性について評価した。

また同時再現性は、高値、低値2例の実検体試料について、10回連続して測定したときのCV（%）により評価した。干渉物質の影響については、21.2mg/dLまでのビリルビンC，18.1mg/dLまでのビリルビンF，2180度までの乳び，100mg/dLまでのアスコルビン酸，10mMまでのシアン酸ナトリウム及びアセチルサリチル酸，1,000mg/dLまでのグルコースをそれぞれ段階的に添加した実検体試料を3回測定し、その平均測定値の変動により評価した。

## 結果及び考察

### 1. 検量線

JDS標準品 Lot. 2 から調製した40検体の試料のHbA1c量（x）とBox-Cox変換した測定吸光度（y）のプロットを図3 Aに示した。プロットから得られた直線回帰式は、 $y = -0.777x - 0.269$ ，相関係数は $r = 0.996$ となり，HbA1c量とBox-Cox変換した測定吸光度は良好な直線性を示した。また，4点のキャリブレーター（Std-1：0.42g/dL，Std-2：1.08g/dL，Std-3：1.81g/dL，Std-4：2.70g/dL）と求められた。

40検体の試料のHbA1c量（x）と測定吸光度（y）のプロットから作成した検量線，及び4点のキャリブレーターから作製した検量線を図3 Bに示した。40検体の試料から得られた検量線は0.2g/dLから1.0g/dL付近までの領域ではほぼ直線的であり，1.0g/dL付近から2.0g/dL付近までは緩やかな曲線を描いた。また2.0g/dL以上ではほとんど吸光度変化が認められなかった。4点のキャリブレーターは，この検量線の変極点付近に位置し，精製水及び4点のキャリブレーターから得られる検量線はJDS標準品 Lot. 2 をもとに作成した検量線とよく一致した。

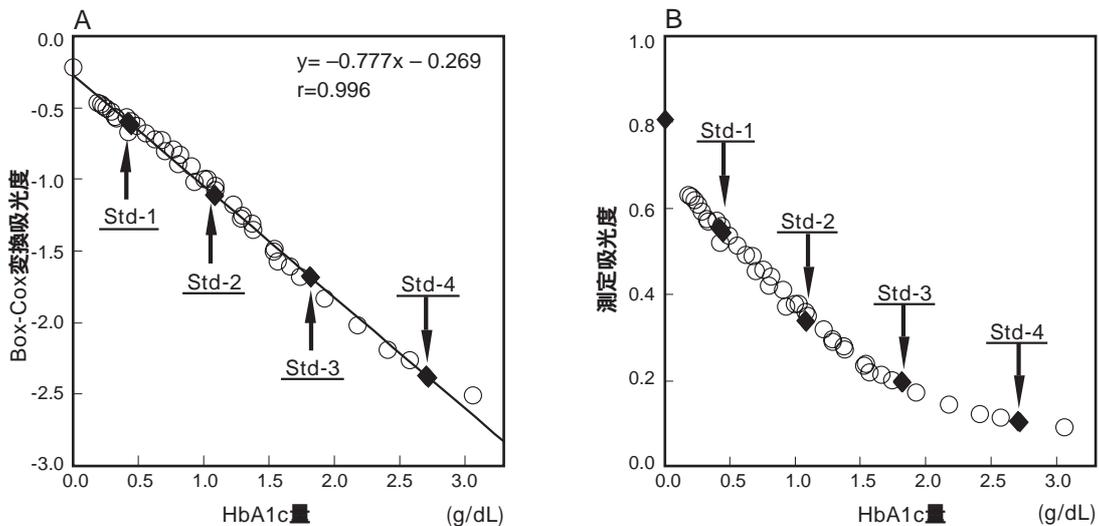


図3. 検量線

A：HbA1c量（x）vs. Box-Cox変換吸光度（y）による検量線，B：HbA1c量（x）vs. 測定吸光度（y）による検量線  
 ( )：JDS標準品 Lot. 2 から調製した試料，( )：標準液

HbA1cの臨床濃度は、およそ0.3g/dL (HbA1c約4.0%程度) から2.0g/dL (HbA1c約12.0%程度) の範囲内である。またHbA1cの基準範囲は4.3% から5.8%であり、糖尿病と診断されるのはHbA1c > 6.5%である<sup>8)</sup>。すなわち、本試薬キットでは診断の上で重要となる6.0%付近で最も測定感度が高くなり、臨床検体の精度よい測定が可能であると考えられた。

## 2. HbA1cに対する特異性

表1には、本試薬キット及び市販されている2社のラテックス比濁法試薬キットについて、HbA1cに対する特異性として、実検体試料測定値のHPLC法測定値に対するバイアスの比較を示した。その結果、本試薬キット(免疫比濁阻害法)での測定値のHPLC法測定値に対する平均バイアスは $-4.14 \pm 3.44\%$ 、ラテックス比濁法での平均バイアスは $-9.59 \pm 5.35\%$ 、及び $-12.63 \pm 5.55\%$ となり、ラテックス比濁法では免疫比濁阻害法と比べて測定値が収束しない傾向が認められた。これは、溶血検体中に夾雑するアルブミンなどの血漿成分がHbA1cのラテックス粒子への吸着を阻害し、しかもこの血漿成分の影響は検体ごとに異なることに起因する。従って、ラテックス比濁法は測定原理としてHbA1cに特

異的なものではない。一方、免疫比濁阻害法は抗原抗体反応の特異性を十分活用した方法であり、HbA1cに特異性の高い測定が可能である。また、血漿成分の影響を受けないため全血からの検体調製を可能とする利便性も備えている。

## 3. JDS値に対する正確性

図4には、146例の実検体試料とJDS標準品Lot. 2を同時に測定したときの本試薬キットとJDS標準品でキャリブレーションしたHPLC法との相関性を示した。本試薬キットの測定値(y)とJDS値(x)は、回帰式 $y = 1.012x - 0.108$ 、相関係数 $r = 0.989$ と良好な相関性を示した。また、JDS標準品Lot. 2は実検体試料とほぼ同じ回帰式上に位置し、JDS標準品Lot. 2を基準とした実検体試料の測定値の管理が可能であることが示された。またこのことは、IFCCの測定体系においても1次標準品へのトレーサビリティを確保できることを示唆するものである。

表2には、JDS標準品Lot. 2の平均測定値(n = 5)とそれぞれの表示値に対する相対比を示した。最低濃度(HbA1c = 4.04%)と最高濃度(HbA1c = 12.63%)の標準品では若干高値を示したが、臨床検体が集中するその他の濃度の標準品ではいずれも相

表1. HbA1cに対する特異性の比較

評価には、HbA1cが4.6%から9.8%までの99例の検体を用いた。各検体の測定値についてHPLC法測定値に対するバイアスを求め、その平均±標準偏差(SD)を求めた。

測定法	平均バイアス±SD (%)	最小バイアス (%)	最大バイアス (%)
本試薬キット (免疫比濁阻害法)	$-4.14 \pm 3.44$	-16.90	4.60
A社試薬キット (ラテックス比濁法)	$-12.63 \pm 5.55$	-32.10	0.00
B社試薬キット (ラテックス比濁法)	$-9.59 \pm 5.35$	-28.60	1.60

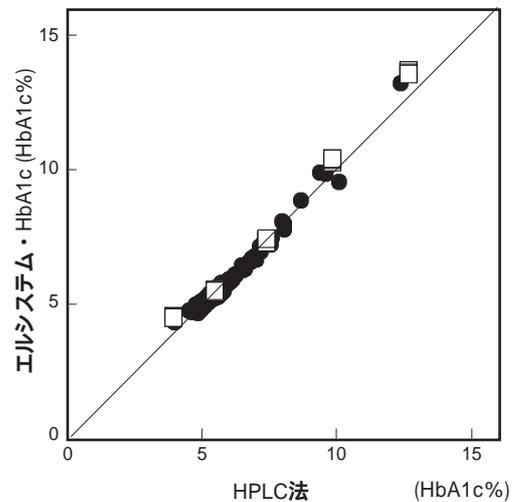


図4. HPLC法との相関性

(●): 実検体試料 (n = 146)  
(□): JDS標準品 Lot. 2

表2. JDS標準品Lot.2に対する正確性  
測定は5回測定とし、平均測定値と標準偏差（SD）を求めた。

検体 JDS標準品Lot.2	既知濃度 HbA1c (%)	平均測定値 ± SD HbA1c (%)	相対比 (%)
レベル1	4.04	4.56 ± 0.03	113%
レベル2	5.38	5.53 ± 0.03	103%
レベル3	7.32	7.40 ± 0.05	101%
レベル4	9.88	10.40 ± 0.06	105%
レベル5	12.63	13.67 ± 0.06	108%

対比は5%以内であり、高い正確性を示した。

低値検体を10回連続して測定したときの平均測定値 ± 標準偏差は4.90% ± 0.05, CV = 0.98%, 高値検体では9.66% ± 0.09, CV = 0.95%となり良好な同時再現性を示した。また, 21.2mg/dLのビリルビンCを添加した試料の測定値は, 無添加の試料の測定値に対して104.1%, 18.1mg/dLのビリルビンFの添加では100.8%, ホルマジン濁度2180度では100.6%, 100mg/dLのアスコルビン酸の添加では98.0%の相対比となり, その影響はほとんど認められなかった。また, 10mMのシアン酸ナトリウムの添加では, 無添加の試料の測定値に対する相対比は100.2%, 10mMのアセチルサリチル酸の添加では100.5%, 1000mg/dLのグルコースの添加では93.2%となり, それぞれカルバミル化ヘモグロビン, アセチル化ヘモグロビン, 不安定型HbA1cの影響はないものと考えられた。

## 結 論

本稿では, 免疫比濁阻害法を用いたHbA1c測定試薬キット「エルシステム・HbA1c」の基本性能について, 標準化への対応という観点から評価を行った。HbA1cの特異性に優れた免疫比濁阻害法とJDS標準品Lot. 2を基準として設計したキャリブレーターによる検量は, JDS標準品Lot. 2に対する正確性に優れた測定値を与えるものであった。このことから本試薬キットは, JDS標準品Lot. 2を基準とした標準化に

対応できる測定法として臨床応用できる性能を有しており, IFCCの測定体系へのスムーズな移行にとってもより有利であることが示された。

## 参考文献

- 1) Bunn HF: Evaluation of glycosylated hemoglobin diabetic patients. *Diabetes*, 30: 613 ~ 617, 1981.
- 2) Kobold U, et al.: IFCC Working Group on HbA1c Standardization: Development of a Candidate Reference Method for the International Standardization of HbA1c. Poster XVI International Congress of Clinical Chemistry, London, 1996.
- 3) 島 健二, 他: グリコヘモグロビンの標準化に関する委員会報告. *糖尿病*, 37: 855 ~ 863, 1994.
- 4) 島 健二, 他: グリコヘモグロビンの標準化に関する委員会報告 (V). *糖尿病*, 41: 485 ~ 487, 1998.
- 5) 富永真琴, 他: 第6回グリコヘモグロビン精度管理調査について. *糖尿病*, 44: 283 ~ 286, 2001.
- 6) 星野忠夫: HbA1c測定の標準化. *臨床検査*, 44: 269 ~ 274, 2000.
- 7) 日本糖尿病学会ホームページ 2001年4月上旬更新記録: 糖尿病関連検査の標準化に関する委員会からのお知らせ. <http://www.jds.or.jp/>
- 8) 葛谷 健, 他: 糖尿病の分類と診断基準に関する委員会報告. *糖尿病*, 42: 385 ~ 404, 1999.

# Application of HbA1c Assay Kit “L system · HbA1c” Based on Turbidimetric Inhibition Immunoassay Method

Tetsuro HAMAFUJI, Mimatsu TAKAYAMA, Magohei YAMADA, and Yasushi SHIRAHASE

Product Development, Sysmex Corporation,  
1-1-2 Murotani Nishi-ku, Kobe 651-2241.

---

## SUMMARY

We have developed a HbA1c assay kit “L system HbA1c” based on turbidimetric inhibition immunoassay. The calibrator of this kit was based on the standard material, distributed from Japan Diabetes Society (JDS); JDS-Lot. 2. The correlation between this assay kit (y) and standardized HPLC method (x) was  $y=1.012x-0.108$ ,  $r=0.989$ . This kit is applicable to the HbA1c standardization using JDS-Lot. 2, and is a good candidate of the IFCC mass-metric standardization.

**Key Words** HbA1c, Turbidimetric Inhibition Immunoassay, JDS Standard Material Lot. 2, Accuracy

---