

〈特集：第30回年次学術集会より〉

HPLC法の素敵な部分と酵素法のチャームポイント

東野 功嗣

Appealing features of HPLC method and enzyme method in HbA1c measurements.

Koji Higashino

Summary In Japan, HbA1c measurement methods can be mainly divided into HPLC methods which use separation analysis, immunoassays and enzyme assays. The HPLC method has advantages such as "high-speed measurement", "high accuracy", and "other information about the sample can be obtained from the chromatogram". On the other hand, the immunoassays and enzyme assay have advantages such as "measurable by an automatic analyzer" and "mass batch processing". Due to the differences in characteristics between the two methods, it is necessary for each facility to select the most suitable measurement method for their own operation.

Key words: HPLC method, Whole Blood analysis, Chromatogram, Enzyme assay

I. はじめに

HbA1c検査は過去1～3ヶ月の平均血糖値をあらわす血糖コントロールの指標として、糖尿病診断から血糖コントロールまでの広範囲な領域で不可欠かつ重要な検査に位置付けられてきた。事実、DCCT (Diabetes Control and Complications Trial) の結果報告¹⁾で、1型糖尿病における合併症の発症・進展予防に厳格な血糖コントロールが有効であり、その指標としてHbA1cが有用であることが示された。また、UKPDS (The U.K. Prospective Diabetes Study) の結果報告²⁾では、2型糖尿病における合併症予防には、可能な限りHbA1c値を正常値に近づけるべきであることが示された。さらに、日本糖尿病学会の糖尿病

診断基準や糖尿病の治療目標値には、血糖値以外にHbA1c値が採用されている^{3,4)}。

HbA1cはHPLC法、免疫法、酵素法など数多くの測定法にて検査が行われているが、その中でもHPLC法は実臨床の現場で最も古くから使用されており、今なお多くの検査室で使用されている。本稿ではHPLC法の利点を述べるとともに、自動分析装置にて測定可能な汎用試薬のひとつとして、酵素法の特長についても述べたい。

II. HbA1c 測定法の歴史

1962年、柴田らは変異ヘモグロビンの検索中に、糖尿病患者の血液中に多く存在するヘモグ

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
〒601-0008 京都市上京区岩栖院町59擁翠園内
Email: higashino@arkray.co.jp
Tel: +81-80-5789-0881

Scientific affairs management team, Research & Development Division, Arkray,inc
Yousuien-nai, 59 Gansuin-cho Kamigyo-ku Kyoto 602-0008, Japan

ロビン成分を電気泳動法にて発見した⁵⁾。1968年にはラーバーらによりこの成分がヘモグロビンA1c（以下HbA1c）と命名され、1971年にはトリベリらが液体クロマトグラフィーによるHbA1cの量的測定法を開発し、糖尿病患者で増加していることを確認した。

1981年には、HPLC法を原理とし、自動サンプラーを備え連続測定を可能とした「AUTO-A1c HA-8110」（京都第一科学/現アークレイ製）が発売され、HbA1c測定が臨床検査の現場に普及する契機となった。HA-8110は操作が簡易であり、研究者や専門家にしか使うことのできなかったHPLC分析装置を臨床検査の現場に適合させた。それまで測定に約1日かかっていたHbA1c検査を、13分/検体に短縮した。以降本法は高速化が進み、2020年現在同社製のHA-8190Vでは24秒/検体と飛躍的に処理能力が向上している。Fig. 1にHA-8110とHA-8190Vの画像を示す。

一方、HPLC法は高速・高精度であるが専用装置が必要であり、設置スペースやイニシャルコストの問題が残っていた。そのような状況から、1990-2000年代には、汎用自動分析装置でも測定可能な免疫学的測定法や、酵素法などが開発された。これらの測定法は大量一括処理が可能であり、検査センターを中心に広まっている。

上記の通り、HbA1c定量法の確立時期にその中心にあったのは電気泳動や液体クロマトグラフィーといった、各種ヘモグロビンの持つイオン強度の差を用いた分離分析法であり、専用HPLCとすることで臨床検査の現場に普及させ

てきた歴史がある。また、HbA1cの臨床的意義を高めた大規模スタディにおいてもHPLC法で測定されたHbA1c値は糖尿病合併症との強い関連性が示された。そのため、HPLC法は免疫法・酵素法の普及した現在においても主要なHbA1c測定法の一つとなっている。

III. HbA1cの生成

成人血中の主要なヘモグロビンであるHbAは、α鎖とβ鎖の2種類のペプチド鎖が各々2つずつ会合し、四量体を形成している。β鎖のN末端アミノ酸であるバリンのアミノ基に、グルコースが非酵素的に結合したものがHbA1cと呼ばれている。

グルコースの非酵素的結合は、メイラード反応と呼ばれ、Fig. 2に示す過程を経て生成される。グルコースは血液ではα型、β型、アルデヒド型に相互に変換されているが、このうちアルデヒド型のグルコースが蛋白質のアミノ基と反応し、アルジミンを形成する。この反応は濃度依存のかつ可逆的であるため、短時間の血中グルコース濃度変動に連動して、アルジミンは生成-消失を繰り返す。HbA1cの生成過程に



Fig. 1 HA-8110（左）およびHA-8190V（右）

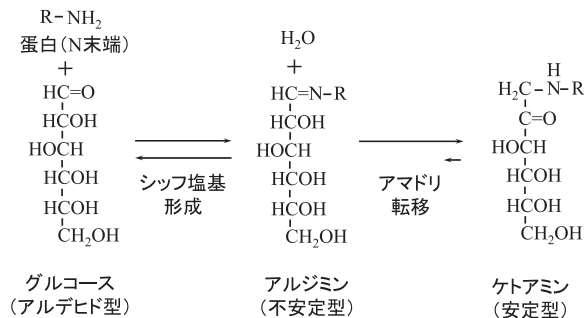


Fig. 2 HbA1cの生成

おいては、これを不安定型HbA1cと呼ぶ。不安定型HbA1cの状態が長時間経過すると、アルジミンはアマドリ転移と呼ばれる分子内転移を起こし、結合部がケトアミン構造となる。アマドリ転移反応は不可逆的であり、ケトアミンからアルジミンに戻ることはほとんどないと言われている。このケトアミンの状態を安定型HbA1cと呼ばれる。

このように、HbA1cの生成反応は濃度依存的であり、安定型生成までに時間がかかり、かつ安定型生成が不可逆的であるため、HbA1cが過去一定期間の平均血糖を反映する指標となっている。生体内での赤血球の寿命は約120日である事から、HbA1cは約2ヶ月間の平均血糖を反映すると言われているが、過去の平均血糖の寄与率では、過去1か月間が50%、その前の1か月間が25%、さらに前の2か月間が50%との報告もある⁶⁾。

IV. HbA1c 測定法の概要

主なHbA1c測定法は以下の通りである。

1) HPLC法（陽イオン交換クロマトグラフィー法）

ヘモグロビンが糖化することによる荷電変化を基に陽イオン交換カラムを用いて分離分析を行う方法である。日本においては本法を使用している施設が最も多い。

2) 免疫法

HbA1cの持つ、糖化β鎖N末端から数個のアミノ酸をエピトープとした抗体を用いてHbA1cを測定する方法である。自動分析装置での測定が可能である一方、カートリッジ化された試薬を用いたPOCT対応型の分析装置も販売されている。

3) 酵素法

ヘモグロビンを特異的プロテアーゼにてペプチド鎖に切断し、生成物中に存在するHbA1c由来のフルクトシルペプチド（グルコース-パリン-ヒスチジン）に対し、これを酸化させるFPOX（フルクトシルペプチドオキシターゼ）を用いて酸化、この際発生した過酸化水素により発色剤を発色させ、HbA1cを定量する方法。免疫法と同じく、自動分析装置での測定が可能である。

4) アフィニティー法

ヘモグロビンに結合したグルコースが持つシス-ジオール基をボロン酸により結合し、検出・測定する方法。日本では、POCT対応型分析装置で使用されているが、世界的にはアフィニティークロマトグラフィーを用いた自動分析装置が使われているケースも多い。測定原理上、β鎖N末端以外の糖化成分も検出する可能性がある。

5) キャピラリー電気泳動法

ヘモグロビンをその成分毎の荷電量の差に応じて、電気泳動を用いて分離分析する方法である。ヘモグロビンは荷電により発生する電気浸透流と陰性帯電したキャピラリー壁面との間の相互作用により分離される。一般的に用いられるキャピラリーは長く、測定時間も長い。しかし本法の一種として、キャピラリー内を疑似固定相で満たし、より強いイオン交換作用を持たせることで短時間での分離を可能とした「陽イオン交換導電クロマトグラフィー法」が開発されている。

V. HPLC 法の原理

HbA1c測定に使用されるHPLCは、陽イオン交換法を分離原理とする。Fig. 3に陽イオン交換HPLC法のシステム構成を示す。分析装置に吸引された血液検体は、装置内で溶血剤により溶血希釈されたヘモグロビン溶液となる。このヘモグロビン溶液が検体導入バルブを介して陽イオン交換カラムに注入される。カラム内に充填されたゲルの表面には、数多くの陽イオン交換基が結合し、陰性荷電を持っている。カラムに導入されたヘモグロビンは陽性荷電を持っており、陽イオン交換基への吸着-溶離液による解離を繰り返し溶出されていく。

グルコースがアマドリ結合しているHbA1cは、非糖化ヘモグロビンに比べヘモグロビン自体の持つ陽性荷電量は低下し、ゲルへの吸着頻度は減少する。このため、非糖化ヘモグロビンに比べ短時間でカラムから溶出する。

このようにして各ヘモグロビン成分は時間差で溶出されることとなり、これを光学検出器で捉えてクロマトグラムを作成、各ピークの面積比を演算してHbA1c値を測定している。

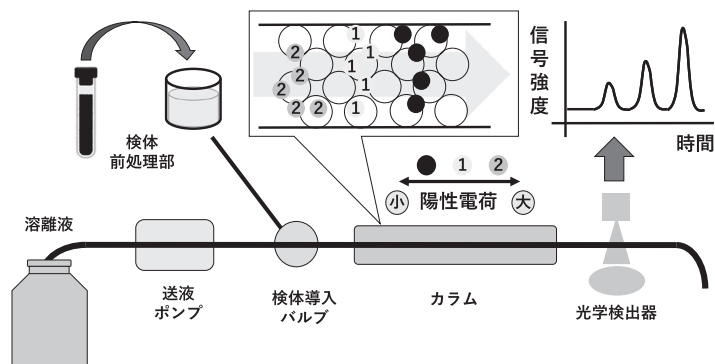


Fig. 3 陽イオン交換HPLC法のシステム構成

VI. HPLC 法の素敵な部分

HPLC法の「素敵な」部分を以下に示す。

1) 高精度測定

HPLC法の特長としてまず挙げられるのが高精度測定である。Table 1, Table 2にHPLC法を測定原理とするHA-8190V（アークレイ）の同時併行精度・室内併行精度⁷⁾を示す。いずれも良好な結果が得られており、HPLC法が施設間差の小さい測定法である事がわかる。このことは、緻密な血糖コントロールが求められる現在の糖尿病療養指導において、重要な要素となっている。また、糖尿病診断においても、的確な診断を行うためには、その施設間差は変動係数CVとして2%程度に収まる事が望ましいと考えられる。上記のレベルの内部・外部精度を維持するためには、HPLC法の高精度測定は有用である。

2) 高速かつ連続測定が可能である。

HPLC法の特長として、高速測定が挙げられる。先に述べた通り、HA-8190Vでは24秒/テスト、150テスト/時間の処理能力であるが、有用なのはファーストレポート（測定開始から最初の検体の結果報告までの時間）が60秒であるという点であろう。「過去約2ヶ月の平均血糖値を反映する」HbA1cについては、高速測定や診療前・即時報告の必要性は疑問視されるが、そうではない。1-2ヶ月に1度、患者が定期的に来院する糖尿病診療では、直近約2ヶ月間の血糖コントロール状況を把握し、薬剤処方や療養指導方針が適正かどうかを判断しなければならない。このためにはその日に採血された試料

Table 1 HA-8190Vの同時併行精度

		HA-8190V Fast			HA-8190V Variant		
		M	H	HH	M	H	HH
全血検体	平均値	4.60	6.80	11.20	4.60	6.87	11.00
	SD	0.02	0.00	0.02	0.02	0.05	0.00
	CV%	0.49	0.00	0.20	0.49	0.71	0.00
溶血検体	平均値	4.60	6.80	11.19	4.60	6.87	11.00
	SD	0.00	0.02	0.04	0.00	0.05	0.00
	CV%	0.00	0.33	0.33	0.00	0.68	0.00

Table 2 HA-8190Vの室内併行精度

	HA-8190V Fast		HA-8190V Variant	
	レベル 1	レベル 2	レベル 1	レベル 2
平均値	4.90	10.10	5.00	9.97
SD	0.00	0.00	0.00	0.04
CV%	0.00	0.00	0.00	0.41

を患者を待たせずに診療前報告できる体制の構築が不可欠であり、HPLC法の高速度測定が有用となる。高い処理能力という点では、自動分析装置で測定できる酵素法や免疫法は、組み合わせる自動分析装置の性能次第でHPLC法よりも高い処理能力を発揮することができる。しかし、8-10分となる反応時間からファーストレポートは遅くなる傾向にあり、様々な場面で即時報告が可能となるのは、HPLC法の大きな利点だといえる。

3) 全血測定

HPLC法の更なるポイントとして、「全血測定可能」という点が挙げられる。全血のまま測定する事の利点は以下の2点である。まず、遠心血測定の必要が無いため、血球齢による

HbA1c差は発生しない。赤血球の平均寿命は約120日と言われている。当然ながら血液中には幼若なものから寿命の近いものまでが分布しており、幼若な赤血球ほど体積が大きく低比重であり、老化したものは高比重となっている。加えて、HbA1cの生成過程においては、アマドリ転移には非常に長い時間がかかるために、赤血球毎にHbA1c値を比較した場合、幼若なものほどHbA1c値は低く、老化したもののほどHbA1c値は高くなる。この赤血球齢により生じる比重差とHbA1c値差のため、遠心分離された検体ではサンプリングする高さにより、HbA1c値が変動する可能性がある。

また、上記の通りHbA1c高値である老化赤血球は、採血後の溶血が生じやすく、溶血後のヘモグロビンは血漿層に溶解することとなる。このため、HbA1c測定に用いられる血球層の赤血球は、平均的にHbA1c低値となる⁸⁾。上記のような、HbA1c値の濃度勾配を発生させる要素を避けるためには、HbA1cは全血のまま測定機器に導入する必要がある、全血測定が可能なHPLC法はこの点にも対応可能である。

4) クロマトグラムが得られ、HbFや変異ヘモグロビンなどの情報も得られる。

ヘモグロビンの各成分を陽性荷電量の差をもとに分離・定量するHPLC法では、測定結果と共にクロマトグラムが得られ、HbA1cのみならず、HbA1a、HbA1b、HbF、Pre-HbA1c（不安定型HbA1cやカルバミル化ヘモグロビンなどを含むピーク⁷⁾。製造元により表記方法が異なる）などのピーク情報が得られる。クロマトグラムを確認することにより、その分析に供する検体のヘモグロビン濃度が適切であったか、検体が劣化変性していないか、分析機器の状態が適正であるかなど、様々な測定情報を読み取る事ができ、信頼性の高い測定結果を報告できる。

HbFに関しては、新生児で高値を示すのみならず、成人においても家族性高胎児血色素症、サラセミアなどの遺伝性疾患や各種造血器疾患にて高値を示す場合がある事が報告されている。このように、HbFをはじめとする各成分情報が得られることは、その患者がHbA1cで血糖コントロールを行う事が適切であるかどうか判断するだけでなく、糖尿病以外の疾患の可能性を考慮する契機にもなり、非常に有用であると

考える。

加えて、HPLC法では変異ヘモグロビンの検出・分離が可能な機器もある。前述のHA-8190VではFastモード（24秒/検体）とVariantモード（58秒/検体）の2種類の測定モードを搭載しており、VariantモードではHbS、HbCの分離、HbE、HbDの検出が可能となっている（Fig. 4参照）。これら変異ヘモグロビンの存在を確認することで、適切な補正を行う事ができるようになるだけでなく、これらの検体に対し適切な血糖コントロールマーカーの選択を促す契機ともなる。

生化学自動分析装置を用いた測定法やアフィニティー法においては、変異ヘモグロビンの存在下でもヘモグロビンの糖化度を測定することは可能であるが、変異ヘモグロビンの存在を示唆することはできない。分離分析法であるHPLC法であるからこそ、測定結果から変異ヘモグロビンの存在を示唆できることは、HbA1cがその患者の血糖コントロールに適切な指標であるかどうかを判断する指標ともなり得ると考える。

VII. 酵素法の原理

比較的新しい測定原理である酵素法は、増加するHbA1c検査件数に対応するため、無くてはならない測定法と言える。本法の開発には、フルクトシルペプチド酸化酵素の発見が大きく貢献したが、極めて発色強度の高い色原体を使用することで、微量にしか存在しないHbA1cを酸化法で捉える事に成功している。酵素法の測定原理は以下の通りである（Fig. 5参照）。

- ① 溶血前処理を行ったヘモグロビンに対し、中性プロテアーゼを反応させ分解する。
- ② プロテアーゼによるヘモグロビンAの分解産物には、ヘモグロビンβ鎖N末端のジペプチド（バリリン-ヒスチジン）が存在する。この際、HbA1cの分解産物はバリリンが糖化されたフルクトシルバリリン-ヒスチジンのジペプチドとなる。
- ③ 分解産物中にあるフルクトシルバリリン-ヒスチジンをフルクトシルペプチドオキシダーゼにより酸化し、過酸化水素を生成させる。
- ④ 生成した過酸化水素を試薬に含まれるペルオ

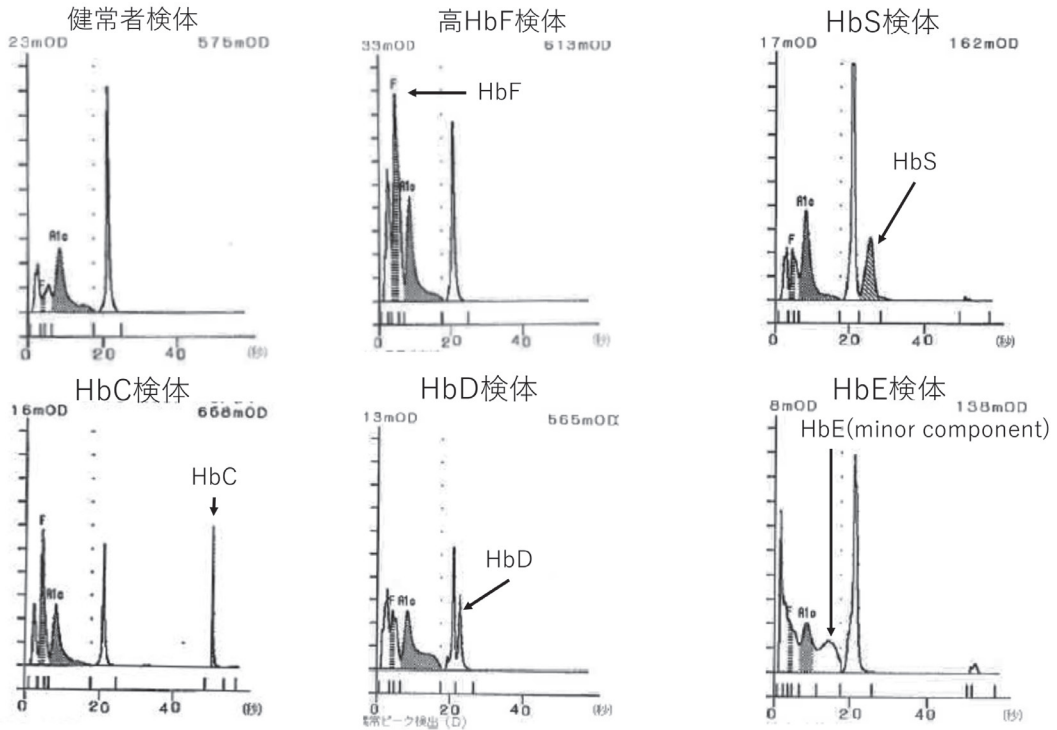


Fig. 4 HA-8190Vのクロマトグラム

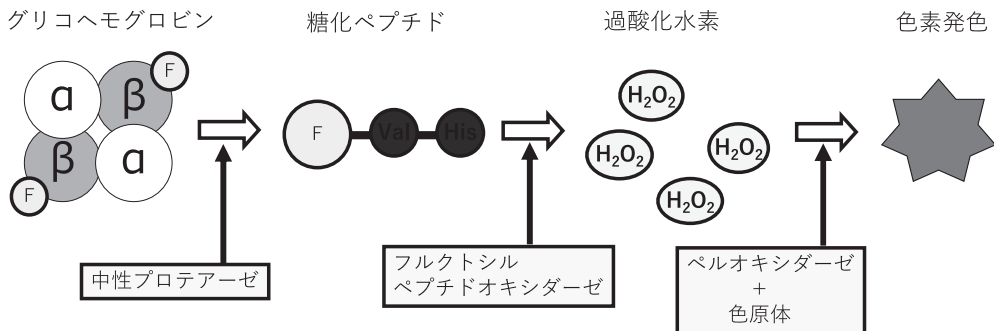


Fig. 5 酵素法の測定原理

キシダーゼにより色原体を発色させ、吸光度変化よりHbA1c濃度を定量する。

- ⑤別途メトヘモグロビン法によりヘモグロビン定量を行い、④で定量したHbA1cとの比を演算することでHbA1c値を算出する。

VIII. 酵素法のチャームポイント

酵素法のチャームポイントを以下に示す。

- 汎用自動分析装置での測定が可能

HPLC法最大のウィークポイントは専用機が必要、という点である。一方、免疫法や酵素法は試薬反応のみであるため、臨床化学自動分析装置での測定が可能である。このため、専用機購入のインシヤルコスト低減や専用機の設置スペースの問題を解決できる。

- 多検体一括処理

臨床化学自動分析装置での測定が可能なた

め、処理能力は自動分析装置の能力に依存するものの多検体の一括測定が可能となっている。このため、処理能力ではHPLC法を大きく上回る性能を有している。健診施設や検査センターなど、大量の検体処理が必要な施設に適した測定法であると言える。

3) セル汚染が少ない

免疫法、酵素法はともに臨床化学自動分析装置での測定が可能であり、大量検体の一括処理に向いているが、ラテックス免疫比濁反応を用いる免疫法に比べ、水溶性の色原体や酵素を用いる酵素法は、セル汚染が少ない事も特長の一つである。自動分析装置のセル交換頻度も減少し、メンテナンス負担が少なくなる。

4) 全血測定

一部の酵素法試薬では、HPLC法と同様全血測定が可能であり、検体溶血や濃度勾配の影響を回避した、正確な測定が可能である。

Ⅸ. まとめ

上記の通り、HPLC法は「高速」「高精度」「分離分析による情報量の多さ」などの利点があり、酵素法は自動分析装置での大量一括処理が可能という利点がある。各施設において、HbA1c検査に求められる精度や時間、検査実施の運用形態などを考慮し、適切な測定法を選択すべきである。一方、糖尿病のスクリーニングから診断、治療、経過観察まで1人の患者は複数の測定法でHbA1cをモニタリングすることとなり、今後より一層測定法間のハーモナイゼーションが求

められることとなる。

文献

- 1) The Diabetes Control and Complications 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.
- 2) UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group: Intensive blood-glucose control with sulphonylureas or insulin compared with conventional treatment and risk of complications in patients with type 2 diabetes (UKPDS 33). *Lancet*, 352: 837-853, 1998.
- 3) 糖尿病診断基準に関する調査検討委員会：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.
- 4) 日本糖尿病学会編：糖尿病治療ガイド2020-2021, 文光堂, 東京(2020)
- 5) 柴田 進、宮地隆興、上田 智、武田 勇：糖尿病患者の血液に見出される異常血色素成分について. *日本血液学会誌*, 25: 579, 1962.
- 6) 田原宏保、島 健二：糖尿病の血糖コントロールとその指標. *最新医学 臨床増刊号*, 50: 646-656, 1995.
- 7) 森口奈美子、児玉真由美、奈須正人、太田直孝、美代有史、新井浩司、古田賢二、宮田茂樹：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. *機器・試薬*, 41: 521-530, 2018.
- 8) 宮下徹夫、山館周恒、中山智祥：遠沈後の赤血球層を試料とするHbA1c測定法における溶血の影響. *日本臨床検査自動化学会誌*, 39: 328-334, 2014.