

〈特集：第30回年次学術集会より〉

## 酵素法の素敵な部分と免疫法のチャームポイント

石井 葵

### Advantages of enzymatic and immunological assay methods

Aoi Ishii

**Summary** The enzymatic HbA1c assay, one of a number of HbA1c assay methods, has been developed as a test for use on general-purpose clinical chemistry analyzers and has seen greatly increased use in laboratories in recent years. Sekisui Medical offers “NORUDIA N HbA1c” which uses this enzymatic technology and is:

- ① Suitable for use on open clinical chemistry systems
- ② Analyzer friendly with little contamination of reaction cells
- ③ Of good on-board stability and
- ④ Resistant to the effects of variant hemoglobin.

This last point in particular has become an important issue for the Japanese Diabetes Society, due to the increase in the number of foreign residents in Japan in recent years.

**Key words:** HbA1c, enzymatic method, variant hemoglobin, NORUDIA

#### I. はじめに

糖尿病という疾患は「検査と教育の病気」と言われている。なぜなら、糖尿病の合併症の進展を抑えるためには、糖尿病を早期に発見し、血糖値を正常な状態でコントロールする必要がある、そのための検査は非常に重要である。糖尿病検査において、血糖値は食事や運動等様々な影響を受けるのに対し、過去平均1,2ヵ月の安定した血糖コントロール状態を反映するヘモグロビンA1c (hemoglobin A1c : HbA1c) は診断やコントロール目標に使われている最も重要な検査と言ってよいだろう。

厚生労働省の2017年患者調査によると、国内の糖尿病患者数（入院、通院）は328万9千人に達する。そのため、HbA1cは病院や診療所の診療時や糖尿病の健診（検診）項目として幅広く測定されており、求められる性能も「早く知りたい」から「大量に測りたい」まで様々である。

HbA1cの測定法は大きく分けて高速液体クロマトグラフィ（high performance liquid chromatography : HPLC）法、酵素法、免疫法の3法に分類されるが、各々の利点を生かし、一般診療で早く測定値を知りたい場面ではHPLC法、健診や検査センターにおける大量検体測定には免疫法と酵素法が採用される傾向に

積水メディカル株式会社 事業統括部 検査事業部  
カスタマーサポートセンター 学術企画グループ  
〒532-0003 大阪府大阪市淀川区宮原3-3-31  
E-mail: aoi.ishii@sekisui.com  
TEL: 06-6350-6581

Scientific Services Planning Group, Customer Support  
Center, Diagnostics Division, Business Management  
Unit, SEKISUI MEDICAL CO., LTD.  
3-31, Miyahara 3-Chome, Yodogawa-ku, Osaka  
532-0003 Japan

ある。免疫法に至っては、生化学自動分析用試薬のみならず幅広い製品が生み出されている。

また、近年では在留外国人の増加等により、変異ヘモグロビンを有する糖尿病患者を如何に管理するのかという点が着目されており、各検査メーカー、および各種測定系がこの問題に取り組んでいる。

ここでは、近年シェアを伸ばしてきている酵素法について、その特長・利点について述べていきたい。

## II. 酵素法の特長

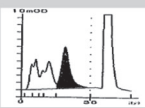

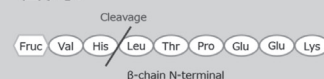
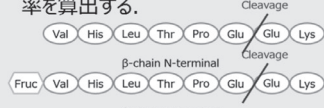
HbA1cの測定には、ヘモグロビン (hemoglobin : Hb) にグルコースが結合することにより、Hbが物理的・化学的に変化を生じることが利用されている。電荷の変化を利用したものが「HPLC法」であり、一方HbA1cに特徴的な構造に着目したのが、ラテックス凝集法や免疫阻害比濁法をはじめとする「免疫法」と「酵素法」である。免疫法と酵素法はどちらも化学量論的にHbA1c

を算出するが、その方法としては、免疫法はHbA1cの糖が結合したβ鎖N末端部分を特異的に認識する抗体が利用されており、対して酵素法は、この構造に特異的に作用するプロテアーゼで生成した糖化ペプチドの量を測定する。現在、国際臨床化学連合 (International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine: IFCC) は、糖化Hbを『Hbβ鎖N末端バリンに安定的に糖が結合したもの (β-N-1-deoxy-fructosyl-hemoglobin)』と定義している。酵素法はこのIFCC法と非常に近似した測定体系であるため、高い互換性があるといえる<sup>1,3)</sup> (Table 1)。

## III. ノルディア N HbA<sub>1c</sub> の特長

ここからは、体外診断用医薬品であるグリコヘモグロビンA<sub>1c</sub>キット「ノルディアN HbA<sub>1c</sub>」(製造販売元：積水メディカル株式会社)について述べたい。2007年に国内初めての酵素法試薬が発売されており、2008年に発売されたノルディアN HbA<sub>1c</sub>は酵素法の2試薬目にあたる。本

Table 1 HbA1c検査法の原理と特性<sup>1,3)</sup>

	測定原理	HbA1c (%) の測定法・特性
HPLC法	<ul style="list-style-type: none"> <li>ヘモグロビンを複数の分画に分離し、総和に対するSA1c分画の比率を計算する。</li> </ul> 	<ul style="list-style-type: none"> <li><math>HbA1c(\%) = HbA1c / Hb \times 100</math></li> <li>化学量論的な裏付けがない</li> <li>HbFの検出が可能</li> <li>変異Hbの検出が可能</li> </ul>
免疫法	<ul style="list-style-type: none"> <li>HbA1cを抗体で検出し、総ヘモグロビン量に対する特異反応分のヘモグロビン量の百分率で算出する。</li> </ul> 	<ul style="list-style-type: none"> <li><math>HbA1c(\%) = HbA1c(g/dL) / HbA1c(g/L)</math></li> </ul>
酵素法 (ノルディア)	<ul style="list-style-type: none"> <li>β鎖N末端のジペプチドを切り出し、糖化ジペプチドを定量し、全ヘモグロビンに対する比率を算出する。</li> </ul> 	<ul style="list-style-type: none"> <li><math>HbA1c(\%) = a \times HbA1c(\mu mol/L) / Hb(\mu mol/L) + b</math></li> <li>化学量論的である</li> <li>IFCC法と互換性がある</li> </ul>
酵素法 (IFCC法)	<ul style="list-style-type: none"> <li>β鎖N末端のヘキサペプチドを切り出し、糖化ヘキサペプチドを定量し、全ヘモグロビンに対する比率を算出する。</li> </ul> 	<ul style="list-style-type: none"> <li><math>HbA1c(\%) = \frac{HbA1c(G-Hexpep)}{HbA1c(G-Hexpep) / Hb(G-Hexpep)}</math></li> <li>化学量論的である</li> </ul>

品の反応原理は、HbA1c濃度の算出、Hb濃度の算出、そして演算式によるHbA1c (%)の算出から構成される。まず、赤血球を溶血させメト化する前処理反応から始まる。HbA1cの測定は、続く①第一反応でプロテアーゼの作用によりHb β鎖N末端の糖化ペプチドを切り出し、②第二反応でフルクトシルペプチドオキシダーゼにより生成した過酸化水素がパーオキシダーゼ存在下で発色することでHbA1cの濃度 (μmol/L) を求めている。一方Hbの検出には、HbA1cの①の反応と同時に進行する。第一反応において、アジ化ナトリウムを作用させて吸光度変化を捉えることでHb濃度 (μmol/L) を求めている。最後に、演算式を使用することで、

それぞれ先述の方法で算出された、HbA1c濃度とHb濃度からHbA1c (%)を算出している (Fig. 1)。

先に述べたように、酵素法の特長としては、IFCC法と近い測定系であるということから、本品においてもIFCC法、さらには日本糖尿病学会 (Japan Diabetes Society : JDS) /日本臨床化学会 (Japan Society of Clinical Chemistry : JSCC) 基準測定法であるKO500法との相関性が高い (Fig. 2)。過去の報告においても、IFCC法と良好な相関性を示しており、若干異なる方法であってもほぼ同じものを測定していることが推察されている<sup>3)</sup>。

また、酵素法の特長であるが、試薬によるセル汚染の影響もないことを確認している。さら

測定原理 (酵素法)

前 処 理 | 全血を遠心分離して得た赤血球を溶血させ、ヘモグロビンをメト化して、メトヘモグロビンとします。

第一 反 応  
(Hb測定)

プロテアーゼの作用によりヘモグロビンβ鎖N末端の糖化ジペプチドを切り出します。一方、メトヘモグロビンをアジ化ナトリウムの作用によりアジ化メトヘモグロビンとして吸光度を測定して、ヘモグロビン濃度を求めます。



第二 反 応  
(HbA1c測定)

糖化ジペプチドに、フルクトシルペプチドオキシダーゼ(FPOX)を作用させ、生成した過酸化水素がパーオキシダーゼ(POD)の存在下で発色剤を発色させます。この吸光度を測定することにより、HbA1c濃度を求めます。



HbA1c値(%)への演算式  
 NSGP値 (%)に換算するために、自動分析装置の項目演算式が必要になります。  
参考文献: Wieland Hoelzel, Cas Weykamp, et al : Clin. Chem. 50 : 166-174, 2004

$$\text{演算式} \quad 91.5 \times \frac{\text{HbA1c} (\mu\text{mol/L})}{\text{Hb} (\mu\text{mol/L})} + 2.15$$

Fig. 1 ノルディアN HbA<sub>1c</sub>の測定原理

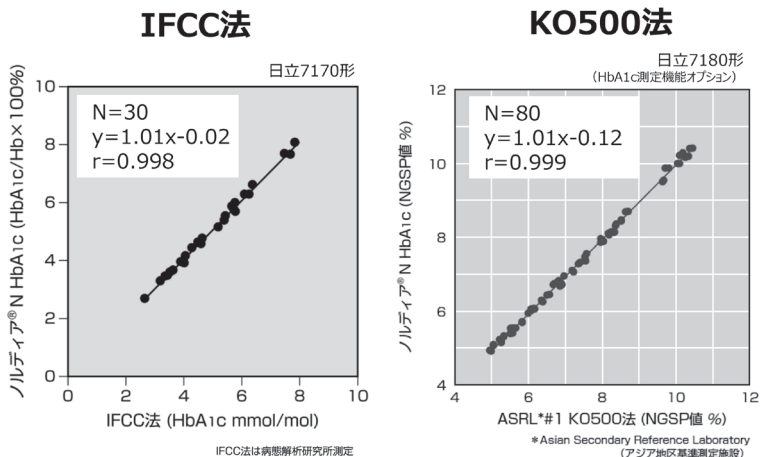


Fig. 2 IFCC法, KO500法との相関図 (社内データより)

に、血球を生化学自動分析装置にて測定するという課題であったサンプリングプローブへの汚染についても、各生化学自動分析装置メーカーの努力により回避され、自動前処理機能付きの生化学自動分析装置も数多く販売されるに至っている。これにより溶血のステップも自動化することで、検体処理能力は更に向上した。

最後に本品の特長は、ノンキャリアレーションの安定性に優れている点である。前述したとおり、HbA1cの測定に際し、赤血球を破壊、およびメト化を行うため前処理液を使用する (Fig. 1)。前処理液により検体中のヘモグロビン類を全てメトヘモグロビンに変化させることにより、良好な安定性を確保している。最大28日間の安定性があるため、ルーチン業務において、検量線作成にかかる手間とコストの削減につながるかと期待できる。

Hbの至適濃度が広いことも特長であり、Hb濃度が 90-310  $\mu\text{mol/L}$  (Hbの分子量を64,500とすると、5.8-20.0 g/dL) の範囲であればそのまま測定が可能となるため、Hb濃度の測定範囲逸脱による再検頻度も軽減できる。

一方で、本品は遠心後の血球を検体として用いている。古い赤血球は重く、またHbA1c濃度が高いため、遠心条件が強すぎると、サンプリング位置により濃度勾配による測定値差が生じ

る可能性があるため、ご注意いただきたい<sup>4)</sup>。

#### IV. 変異 Hb

変異Hbとは、Hbに遺伝子変異が生じ、通常とは異なるアミノ酸配列を持つものの総称である (DNA塩基置換が生じる)<sup>5,6)</sup>。遺伝的な要因が多く、遺伝学的には多型となり個人差として扱われる (異常ではない)。多くは無症状であり、健診にて発見されることが多い<sup>6)</sup>。しかし中には、溶血性貧血、酸素結合能異常、Hb合成能異常など治療が必要となる場合もある。全世界には約1,000種の変異Hbが存在しており<sup>6)</sup>、世界では約600人に1人、日本では約3,000人に1人という頻度で発見されている<sup>5)</sup>。変異Hbを持つ患者のHbA1c測定値は、方法によっては糖化速度そのものが変動し、正確な測定値が得られない可能性があるため検査結果の判断には注意が必要となる。

主な変異Hb配列をFig. 3に示す。本品の認識部位は $\beta$ 鎖N末端のジペプチドであり、変異の影響を受けにくいといえる。実際、変異Hb血症例11名の検体を用いた検証において影響が確認されなかった (Fig. 4)。

現在、在留外国人数は増加の一途をたどっており、様々な施設において変異Hbと遭遇する

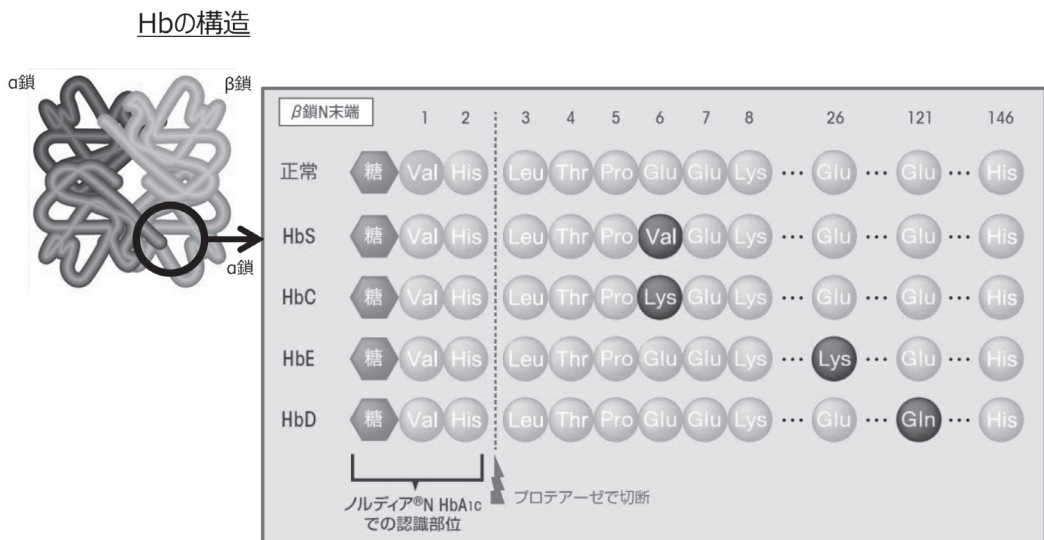


Fig. 3 主な変異Hb

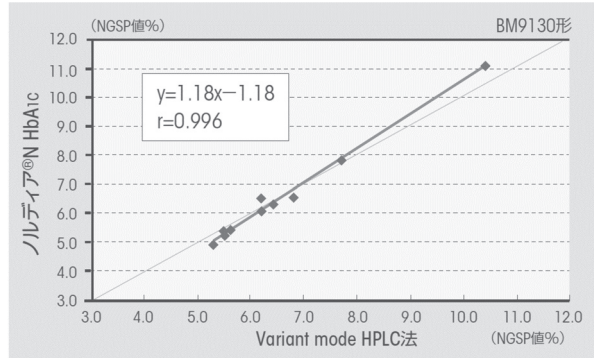


Fig. 4 変異Hb例における相関性（社内データより）  
 対象：変異Hb血症11例（HbS：5例、HbC：4例、HbE：2例）  
 検討：酵素法（ノルディアN HbA<sub>1c</sub>）とVariant mode HPLC法との相関性の評価  
 結果：酵素法は変異Hbを分離し、より正確なHbA<sub>1c</sub>値が得られるとされているVariant mode HPLC法と良好な相関性が得られた

可能性があるため、如何にデータの信頼性を確保していくかは重要な課題となっている。

## V. 終わりに

HPLC法が一般的であったHbA<sub>1c</sub>測定系において、その認識を覆し、生化学自動分析装置に搭載できるという新境地を創り出した「免疫法」の功績は大きい。そこに登場した酵素法は、さらに使いやすいものに進化したといえる。HbA<sub>1c</sub>の測定は今後も時代に応じた進化を遂げていこう。ノルディアシリーズを通して、No Diabetes = NORUDIAの製品名に込めた思いとともに今後も糖尿病という国民病と闘う患者様へ貢献していくメーカーであり続けたい。

「ノルディア」および「NORUDIA」は積水メディカル株式会社の日本における登録商標です。

本論文内容に関連する著者の利益相反：なし

## 文献

- 1) 宮本博康、染谷 茜、吉澤辰一、中田瞳美、鈴木晴美、池田勇一、大西明弘、久保敬信：HPLC法によるHbA<sub>1c</sub>測定におけるHbF補正の注意点や補正域と有用性に関する検討. 医学検査, 62: 3-9, 2013.
- 2) 小林基章、雨宮 伸、石原俊秀、小林浩司、沢登恵美、東田耕輔、中澤真平、岡橋美貴子、星野忠夫：HbA<sub>1c</sub>標準化における測定機種間の誤差とその問題点. 糖尿病, 38: 679-687, 1995.
- 3) 植山 実、磯貝好美、湯川万里子、西尾朋久、中西一夫、金田幸枝、三家登喜夫：酵素法によるHbA<sub>1c</sub>測定の有用性 - HbA<sub>1c</sub>測定の国際標準化にむけて -. 糖尿病, 53: 385-389, 2010.
- 4) 宮下徹夫、永瀬昌史、亀井喜恵子、山館周恒、関口光夫、矢内 充、熊坂一成：ヘモグロビンA<sub>1c</sub>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 -. JJCLA, 29: 181-189, 2004.
- 5) 保坂利男、永瀬 惟、澤井 梓、石飛実紀、石本麻衣、近藤 健、小沼裕寿、住谷由計、田中利明、西田 進、近藤琢磨、石田 均：血糖コントロールの高値に対する相対的なHbA<sub>1c</sub>低値から診断に至った異常ヘモグロビンD症の1例. 糖尿病, 59: 401-406, 2016.
- 6) 古家美幸、古賀正史、石橋みどり、豊田充宏、辻井 悟：免疫法で測定したHbA<sub>1c</sub>が偽高値を示し抗糖尿病薬を投与された非糖尿病の異常ヘモグロビンHbC症の1例. 糖尿病, 59: 463-468, 2016.