

# 全血試料での測定を可能とするメタボリードHbA1cの基礎的性能評価

## Fundamental Study of “MetaboLead HbA1c” to Enable Measurement of HbA1c in Whole Blood Samples

高橋千由紀<sup>1)</sup>, 増戸梨恵<sup>1)</sup>, 林 達也<sup>2)</sup>, 堀尾匡史<sup>2)</sup>,  
常名政弘<sup>1)</sup>, 小野佳一<sup>1)</sup>, 蔵野 信<sup>1)</sup>

**要旨** NaF管全血試料を用いたメタボリードHbA1cの基礎的性能評価を行った。併行精度, 希釈直線性, 対象機器との相関性は良好であり, 修飾Hbの影響は認められなかった。干渉物質の影響ではビリルビン濃度依存的にHbA1cが低値となる傾向を認めた。これはDM-JACK Ex+の異常反応検知機能と従来通りに遠心分離血球を用いることで影響を回避できると考えられた。以上より本法は全血試料においても十分な性能が確認され, 従来NaF管検体の遠心分離血球を用いる測定法が抱えていた課題を解決できる可能性が示唆された。

**Key words** HbA1c, biochemical autoanalyzer, MetaboLead HbA1c, enzymatic process

### 1. はじめに

ヘモグロビン A1c (HbA1c) は過去1~2ヶ月の平均血糖値を反映するマーカーであり, 糖尿病診療において重要な位置づけとなっている項目である<sup>1)</sup>。日常検査で用いられるHbA1cの測定にはHPLC法や免疫法, 酵素法など様々な測定方法がある。HPLC法は全血検体を用いた測定が可能であるため, 遠心操作が不要というメリットがある。一方, 免疫法と酵素法は遠心後の赤血球層(下層部分)を用いてHbA1cを測定する場合, 血漿(上層部分)を用いて血糖や他の糖尿病関連項目(グリコアルブミンや1,5-AGなど)と同時に測定できるというメリットがある。そのため, 大量検体を同時に測定する検査受託機関や健診センターでは免疫法や酵素法が広く

用いられている。

2021年7月, 日本糖尿病学会・日本臨床検査医学会・日本臨床化学会は, 遠心後の赤血球層を用いる測定法では老化した赤血球が溶血しHbA1cが低値になることがあるため<sup>2),3)</sup>, HbA1cの測定を外部の検査受託機関に委託する場合はフッ化ナトリウム(NaF)入り採血管ではなく, 溶血の影響を受けにくいEDTA採血管の使用を推奨するという共同ステートメントを発表した<sup>4)</sup>。しかしEDTA管には解糖阻止剤が添加されていないため血糖との同時測定には適さず, 推奨通りに採血を実施するとHbA1cはEDTA管, 血糖はNaF管となり, 採血本数が増えることが懸念される。そこでNaF管でも全血試料を用いることで溶血の影響を回避できるという報告があり<sup>4)</sup>, NaF管での全血試料を用いたHbA1c

Received Jul. 26, 2024; Accepted Jan. 6, 2025

Chiyuki TAKAHASHI<sup>1)</sup>, Rie MASUDO<sup>1)</sup>,

Tatsuya HAYASHI<sup>2)</sup>, Masafumi HORIO<sup>2)</sup>

Masahiro JYOUNA<sup>1)</sup>, Yoshikazu ONO<sup>1)</sup>

Makoto KURANO<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup> 東京大学医学部附属病院検査部

Division of Laboratory Medicine, The University of Tokyo Hospital.

〒113-8655 東京都文京区本郷7-3-1

7-3-1, Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo, 113-8655, Japan

<sup>2)</sup> キヤノンメディカルダイアグノスティクス株式会社

(旧ミナリスメディカル株式会社)

Canon Medical Diagnostics Corporation

〒104-6004 東京都中央区晴海1-8-10

1-8-10, Harumi, Chuo-ku, Tokyo, 104-6004, Japan

Corresponding author (連絡責任者): 高橋千由紀

TEL: 03-3815-5411 (内線35046)

E-mail: takahashic-lab@h.u-tokyo.ac.jp

の測定が望まれている。今回我々は、NaF管全血試料を用いたメタボリードHbA1cの基礎的性能を評価したため報告する。

## 2. 対象および方法

### 1) 対象

2022年4月に東京大学医学部附属病院でHbA1c測定依頼があった検体の日常検査終了後の252検体を対象とした。

研究の実施に際しては、東京大学大学院医学系研究科医学部倫理委員会の承認を得た（承認番号2019300NI-16）。なお、研究対象者（被検者）の保護に関しては、オプトアウト文書にて、研究対象者に対して研究への参加拒否の機会を与えた。

### 2) 測定試薬および機器

測定試薬はメタボリードHbA1c（ミナリスメディカル、以下ML-HbA1c）、測定機器は糖尿病検査項目自動分析装置DM-JACK Ex+（ミナリスメディカル）を使用した。

ML-HbA1cは酵素法を測定原理とし、総ヘモグロビン（Hb）中に占めるHbA1cの割合（%）を算出する。第1反応では変性剤によって変性したHbの色調からHb濃度（ $\mu\text{mol/L}$ ）を求めるとともに、プロテアーゼによってHbA1cより糖化ジペプチドを生成させる。第2反応では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ペル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る。この発色吸光度を測定し、HbA1c濃度（ $\mu\text{mol/L}$ ）を求め、求めたHb濃度、HbA1c濃度からHbA1c（%）を算出する<sup>5)</sup>。

対照測定法として、当院で採用している自動グリコヘモグロビン分析計HLC-723 G11（東ソー、以下G11）：HPLC法を使用した。

### 3) 検討方法

#### (1) 併行精度

NaF管の遠心分離血球層（以下、遠心血）および全血試料において3濃度（L, M, H）を連続20回測定した。

#### (2) 希釈直線性

直線性試料を10段階希釈し、2重測定した。

#### (3) 相関性

NaF管の全血試料におけるML-HbA1cとG11の相関を確認した。また、NaF管での採血により得られる、遠心血および全血試料をML-HbA1cで測定し、相関を確認した。

#### (4) 干渉物質の影響

EDTA管の遠心分離後血漿に、乳び、抱合型ビリルビン、遊離型ビリルビン（干渉チェックAプラス、シスメックス）及びアスコルビン酸を添加した。干渉物質を添加した血漿に血球を混合した試料を作製後、遠心血および全血試料を測定した。干渉物質無添加条件の測定値を100%とし、変動率5%以上の差を認めた場合に影響ありとした。

#### (5) 修飾Hbの影響

EDTA管の遠心分離後血漿に、グルコース溶液（1000 mg/dL）、アセチルサリチル酸溶液（100 mg/dL）、シアン酸ナトリウム溶液（10 mg/dL）を添加した。各種溶液を添加した血漿に血球を混合後、37℃で3時間反応させ、不安定型Hb、アセチル化Hb、カルバミル化Hbを作製後、遠心血および全血試料を測定した。修飾物質無添加条件の測定値を100%とし、変動率5%以上の差を認めた場合に影響ありとした。

## 3. 結果

#### (1) 併行精度

併行精度をTable 1に示した。CV(%)は遠心血では0.21~0.72、全血では0.31~0.45であった。

#### (2) 希釈直線性

希釈直線性をFig. 1に示した。HbA1c 3.3%~18.6%の間で希釈直線性が認められた。

#### (3) 相関性

NaF管の全血試料におけるG11とML-HbA1cとの相関をFig. 2に示した。回帰式は $y = 1.021x - 0.212$ 、相関係数は0.994であった。またNaF管での採血により得られる、遠心血および全血試料をML-

Table 1 Within-Run reproducibility

		Centrifuged blood	Whole blood
		HbA1c(%)	HbA1c(%)
Low	Mean	5.13	5.27
	SD	0.037	0.024
	CV(%)	0.72	0.45
Middle	Mean	6.71	6.97
	SD	0.019	0.021
	CV(%)	0.28	0.31
High	Mean	10.13	9.99
	SD	0.022	0.032
	CV(%)	0.21	0.32

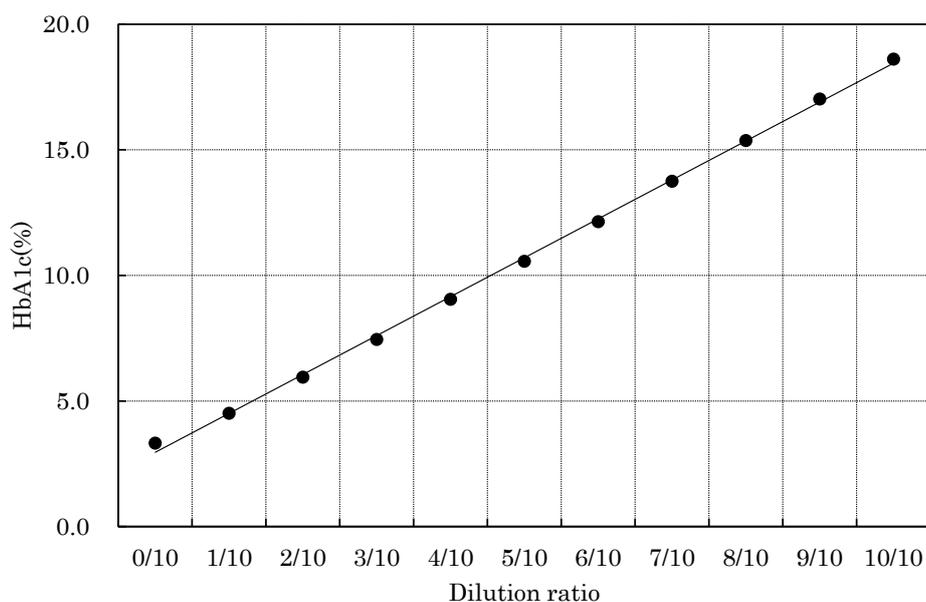


Fig. 1 Linearity test in the measurement of HbA1c by MetaboLead HbA1c

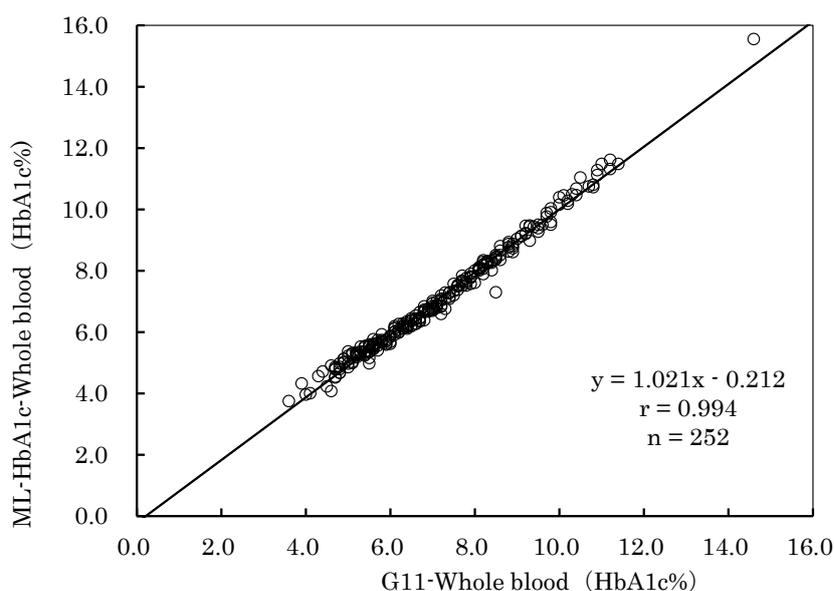


Fig. 2 Correlation between G11 (NaF, Whole blood) and ML-HbA1c (NaF, Whole blood)

HbA1cで測定した相関をFig. 3に示した。回帰式は $y = 1.008x - 0.014$ ，相関係数は0.997であった。

#### (4) 干渉物質の影響

遠心血および全血試料において，乳びは3000ホルマジン濁度，アスコルビン酸は50 mg/dLまで変動率 $\pm 5\%$ 以内であり，影響は認めなかった。抱合型ビリルビンおよび遊離型ビリルビンは遠心血試料

では影響は認めなかったが，全血試料において添加したビリルビン濃度依存的にHbA1c(%)が低値となる傾向を認めた。(Fig. 4)

#### (5) 修飾Hbの影響

遠心血および全血試料において，グルコース溶液1000 mg/dL，アセチルサリチル酸溶液100 mg/dL，シアン酸ナトリウム溶液10 mg/dLまで変動率 $\pm 5$

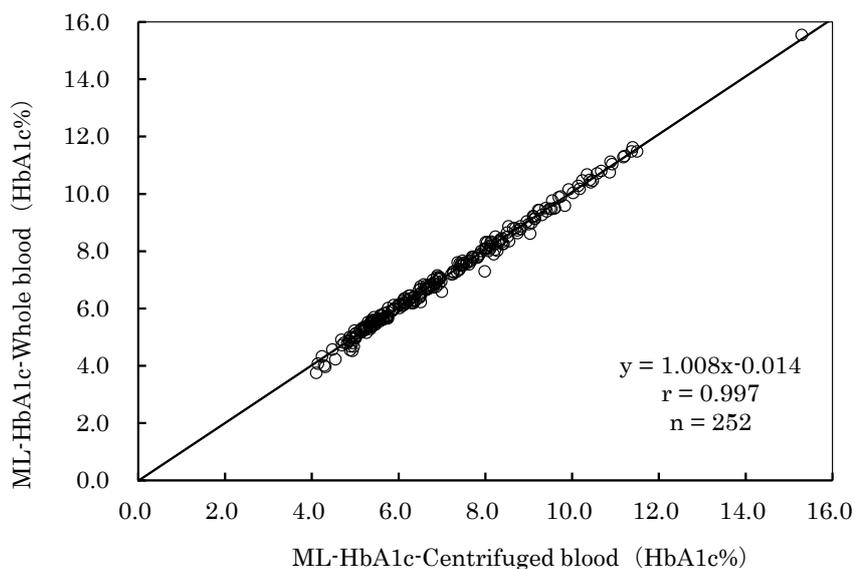


Fig. 3 Correlation between ML-HbA1c (NaF, Centrifuged blood) and ML-HbA1c (NaF, Whole blood)

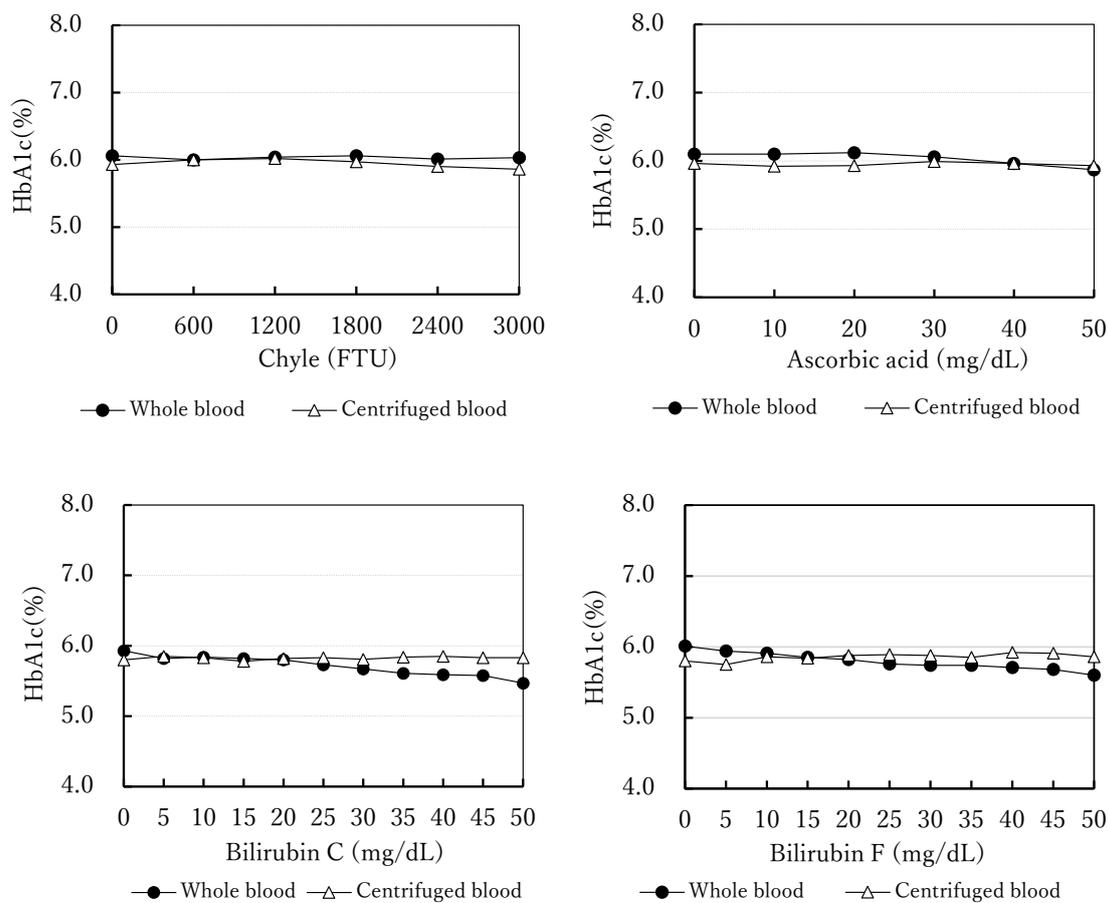


Fig. 4 Effects of interfering substances

%以内であり、不安定型ヘモグロビン、アセチル化ヘモグロビン、カルバミル化ヘモグロビンによる影響は認めなかった。(Fig. 5)

#### 4. 考察

ML-HbA1cにおける併行精度は、低中高の3濃度において、いずれもCVが1.0%以下と良好であった。希釈直線性は、HbA1c 3.3%~18.6%の間で直線性が認められ、添付文書に記載されている測定範囲3.3%~16.5%と相違なかった。相関性試験では、対照としたG11 (NaF管, 全血)とML-HbA1c (NaF管, 全血)の相関性は相関係数0.994であり、良好であった。またML-HbA1cにおいて、NaF管の遠心血と全血を試料として用いた場合の相関係数は0.997であり、こちらも良好であった。共存物質の影響は、遠心血, 全血試料ともに乳びは3000ホルマジン濁度, アスコルビン酸は50 mg/dL, 不安定型ヘモグロビ

ンは1000 mg/dL, アセチル化ヘモグロビンは100 mg/dL, カルバミル化ヘモグロビンは10 mg/dLまで影響は認めなかった。抱合型ビリルビンおよび遊離型ビリルビンでは全血試料において添加したビリルビン濃度依存的にHbA1c(%)が低値となる傾向を認めた。この原因として、ML-HbA1cは過酸化水素-ペルオキシダーゼ系の発色反応を利用した酵素法を原理とする測定法であり、全血試料は遠心血よりも試料中のビリルビンの量が多くなることから、還元剤であるビリルビンが過酸化水素および発色剤と競合的に反応し、HbA1c(%)が低くなると考えられた。日常検査においてはDM-JACK Ex+の反応タイムコースのチェック機能を用いることで、ビリルビン高値検体における異常反応を検知することが可能である。そのため、ビリルビンが高値の場合には従来通りに遠心血を試料として用いることで影響を最小限にできると考えられた。併行精度の結果が

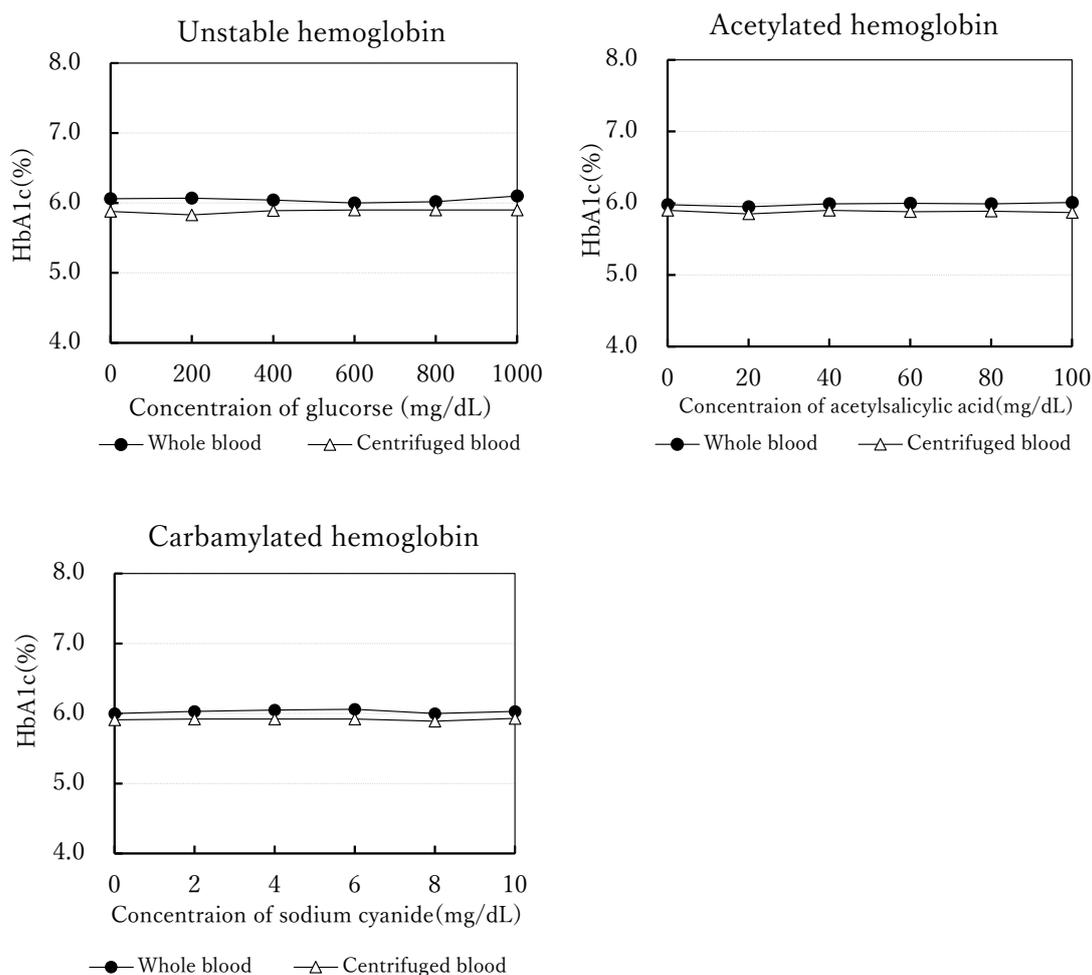


Fig. 5 Effects of modified hemoglobin

ら、検体のビリルビン濃度が10 mg/dL以上であった場合、遠心血を用いた方が望ましいと考えられる。

以上より、ML-HbA1cはNaF管全血試料においても十分な性能が確認された。本試薬の使用により、検体を遠心する必要がないことから、迅速に測定可能となり、日常検査を効率化できると考えられる。

## 5. 結語

ML-HbA1cはNaF管全血試料においても十分な性能が確認された。したがって本試薬を用いることにより、従来は困難であったNaF管全血試料での測定が可能となった結果、採血本数を増やすことなくHbA1cの検査を実施できる可能性が示唆された。

本論文の要旨は日本医療検査科学会第54回大会にて発表した。

なお本研究はキャノンメディカルダイアグノスティックス株式会社(旧ミナリスメディカル株式会社)との共同研究であり、使用した装置および試薬は提供されたものである。

## 文献

- 1) American Diabetes Association. Glycemic Targets: Standards of Care in Diabetes—2023. *Diabetes Care* 2023;46(Suppl 1):S97-110
- 2) Koga M, Okuda M, Inada S, et al. HbA1c levels measured by enzymatic assay during off-site health checkups are lower than those measured by on-site HPLC assay. *Diabetol Int.* 2020, 11:67-71
- 3) 桑克彦, 岡橋美貴子, 佐藤麻子ほか. 遠心処理後に測定するHbA1c測定法での採血管の取扱い(EDTA入り採血管の推奨)について. *糖尿病* 2021;64;336-339
- 4) 日本糖尿病学会, 日本臨床検査医学会, 日本臨床化学会. 遠心処理後に測定するHbA1c測定法での採血管取扱い(EDTA入り採血管推奨)について. 2021.  
[http://www.jds.or.jp/modules/important/index.php?content\\_id=238](http://www.jds.or.jp/modules/important/index.php?content_id=238)
- 5) 近藤大. 酵素法HbA1c測定試薬 メタポリード® HbA1cのご紹介. *生物試料分析* 2015;38;5:287-292