

原 著

ラテックス凝集反応を利用したグリコヘモグロビンの測定法 (ラピディアオート HbA1c) の使用経験

加 藤 正 人*

糖尿病患者の血糖コントロールの指標として、グリコヘモグロビン(GHb)は多くの施設で使われている。近年になって検診項目でも糖負荷試験に代わってGHbを採用し糖尿病の判断指標として使われる傾向がみられる。今回、老健法に基づく基本検診でGHbを採用し、GHb測定を大量処理する必要となった。そこで、汎用測定器を用いて高速処理できるラテックス凝集法を使用経験することが出来たのでその結果を報告する。HPLC法との精密性はランダムイズ2回測定法(Syx)によって比較したが、HPLC法の方がよい結果となった。相関については $r=0.935$ と良好な相関を得ることが出来た。貧血検体における影響をゲモグロビン量で比較検討し、ラテックス法でゲモグロビン量が少なくなるほどAlc値が大きくなる傾向がみられた。確認試験で洗浄赤血球を用いて比較した結果、血漿中成分による影響が大きいことが分かった。検体の採取法、機器のメンテナンスを十分行えば高速に検体処理できる測定法と考える。

キーワード：グリコヘモロビン測定法、ラテックス凝集法、HPLC法

【測定方法と原理】

溶血検体中でHbとGHbはラテックスに競合的に吸着し、ラテックス表面のGHb濃度は血中GHbと比例する。さらにマウスの抗GHb抗体との複合物と反応させ、ラテックス凝集を濁度とし660nmで測定し、既知の検量カーブよりGHb濃度を算出する。

測定法は、検体を前処理として3000rpm 5分間遠心した赤血球管底部分より5 μ lをマイクロピペットで採取し検体希釈液500 μ l中に加えて溶血液を作成し試料とした。測定機器は日立7050を使用する。なお比較に用いるHPLC法は京都第一科学のHi-AUTO A1c HA8131で測定した。

【対 象】

ラテックス法は栃尾市地区で行った基本検診受診者検体を使用し、栃尾郷病院で測定した結果を使用する。対象としてHPLC法は長岡中央総合病院で測定した結果を使用する。検体は血糖用採血管(EDTA+NaF)で採血した検体を用いる。

【結 果】

1. 精密性について

一般検体50検体を2重測定しラテックス法とHPLC

法のSyxを比較した。

ラテックス法では検体採取誤差を加えた精密性と採取誤差を加えないSyxを算出した。HPLC法ではSyx=0.098であり2重測定の差もほぼ0.2以内に収まっている。ラテックス法は同一溶血検体でSyx=0.228で2重測定の差は0.5以内に収まっている。ラテックス法で採取誤差を含めた場合Syx=0.258で2重測定の差は0.6以内に収まっている。

2. HPLC法との相関

標本数n=30検体でHPLC法との相関性を調べた。 $y=1.003 X+0.182$ ($r=0.935$)と良好な成績が得られた。

3. 血中ヘモグロビン(Hb)濃度による影響

基本検診受診者3190名を対象として、随時血糖140以上の検体を除いた2991名の検体を用いた。血中Hb濃度とGHbAlcの関係を図1に示す。

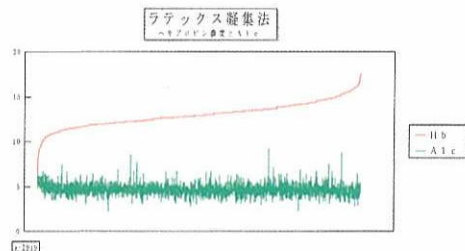


図1 血中Hb濃度とラテックス図法のGHbAlc

*〒940-8653 新潟県長岡市福住2丁目1番5号
長岡中央総合病院検査科

比較対照として長岡中央総合病院でHPLC法で測定したドック受診者3250名の血中Hb濃度とGHbAlcの関係を図2に示す。

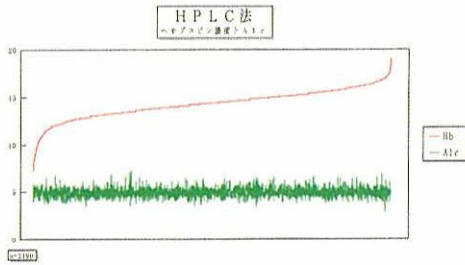


図2 血中Hb濃度とHPLC法GHbAlc

母集団の違いはあるがラテックス法はHPLC法に比べHb濃度11g/dl以下から徐々に上昇傾向がみられる。Hb濃度を1.0g/dl毎に平均GHbAlc値をまとめた表を図3に示します。

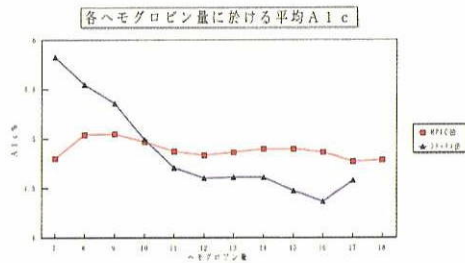


図3 各ヘモグロビン濃度における平均GHbAlc

血中Hb濃度の影響をみるために、各Hb濃度における遠心処理による影響と洗浄赤血球を用いた場合のGHbAlcのデータを表1に示す。

	血漿浮遊	2000rpm 1 min	3000rpm 5 min	洗浄浮遊	洗浄遠心 30005min	HPLC法
平均	5.39	4.88	4.91	5.15	5.11	5.21
標準偏差	0.83	0.77	0.76	0.82	0.81	0.73

表1 各条件におけるGHbAlcの平均値(n=30)

検体を遠心したデータと遠心しないデータではその差が平均で0.48あり、遠心しない検体の方がより高いデータを示す。また、検体を生理食塩水で3回洗浄し

血漿成分を取り除いた検体を用いて同様にGHbAlcを測定した。洗浄赤血球でも遠心前と遠心後の差は0.04であり差が認められたが、その差は小さくなっている。

【考 察】

GHbは過去1～3ヶ月の平均血糖値をよく反映し相関すると考えられてきて、長期的な血糖コントロールの指標として用いられてきた。GHb測定にはHPLC法など専用の機器を必要とし多くの施設で容易に用いられている。しかし、変性ヘモグロビンや修飾ヘモグロビンによる特異性の問題点も指摘されている。また、検診のような大量処理を行う場合、処理時間の短縮化が望まれている。ラビディアオートAlcはβ鎖N末端の糖化されたHbに特異的な抗体を用いてGHbAlcを測定する原理を用いており、HPLC法のみみられるようなカルバミル化、アセチル化ヘモグロビンなどの影響は認められない。また、種々変性ヘモグロビンにも影響が認められないと報告されている。

今回の検診では精密性においてはHPLC法と比較して、やや劣るが日常検査では使用できる範囲と考える。HPLC法との相関においても良好な相関を得ています。

血中のヘモグロビン濃度に関しては若干の問題を有した。検診検体で示すようにHb濃度11g/dl以下では高くなる傾向を認められた。Hbの影響はラテックスに血漿中の蛋白が吸着する原因ではないかといわれているが、どのような蛋白が影響するか報告されていない。ラテックス法では前処理として溶血作業が必要となりますが、血漿の混入を防ぐために遠心し管底より血漿が混入しないように注意しなければならない。血漿の混入によるデータの変動は特に貧血検体で血液比重が低い場合、遠心後放置しておく時間の長さによる影響も考えられるので注意したい。洗浄赤血球を用いて追加試験をおこなったが、有意な差は認められなかった。

ラテックス法は汎用機で十分測定可能は測定法だが、ラテックスの性質上セルへの吸着を注意しなければならない。汎用機器で他の検査項目と同時に測定した場合に影響を受けると考える。

本測定法はヘモグロビンの濃度に影響されやすいが、精密度とHPLC法との相関においてはほぼ良好な成績を示し、HPLCより処理能力を有する測定法と思われる。

Experience with a Method of Measuring Glycohemoglobin Based on the Latex Agglutination Reaction (Rapidia Auto HbA1c)

Masako Kato*

Glycohemoglobin (GHb) is used in many institutions as an indicator of blood glucose control in diabetics. There has also been a tendency in recent years to use GHb instead of glucose tolerance tests as a standard for detecting diabetes in health screening examinations. In the present study we used GHb in a basic screening examination in accordance with the Law of Health and Medical Services for the Aged, and thus it was necessary to process a large number of GHb measurements. We therefore used ordinary measuring instruments, and since we gained experience in using a latex agglutination method that allowed rapid processing, we report our results. The accuracy of this method was compared with the HPLC method by the randomize 2-measurement method (Syx), and showed that the results were better with the HPLC method. However, a good correlation coefficient was obtained ($r=0.935$). The effect of anemic blood specimens was assessed by comparing hemoglobin levels were, the higher the A1c levels tended to become. Comparisons using washed red cells in a confirmation test showed that the plasma components have a considerable effect. We consider this to be a measurement method that enables rapid specimen processing, if the specimen collection method and instrument maintenance are carried out properly.

Key words: glycohemoglobin measurement method, latex agglutination, HPLC method.

*Department of Clinical Laboratory, Nagaoka Chuo General Hospital
Fukuzumi 2-1-5, Nagaoka, Niigata 940-8653