

HbA1c測定系について

～ 原理と特徴 ～

一般社団法人日本臨床検査薬協会
技術運営委員会副委員長
安部 正義

本日の内容

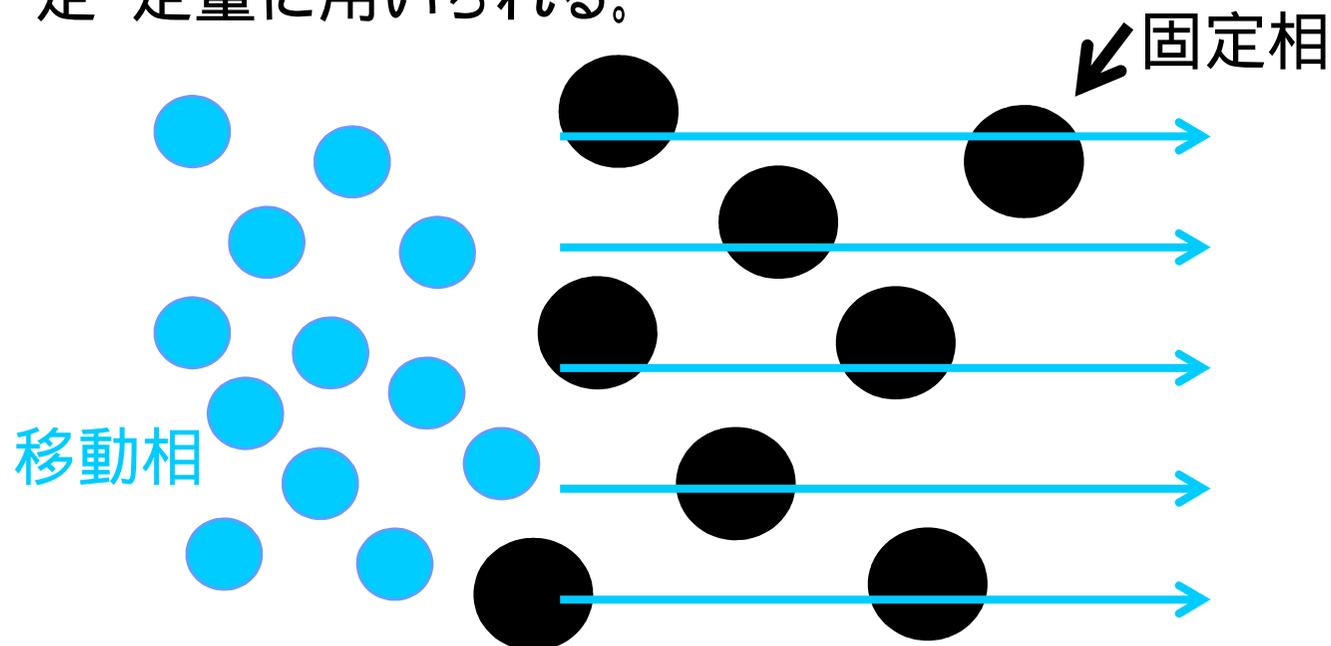
- HbA1c測定方法別原理と特徴
 - HPLC法
 - 免疫法
 - 酵素法
- 原理差による測定値の乖離要因

HPLC法

HPLC法原理

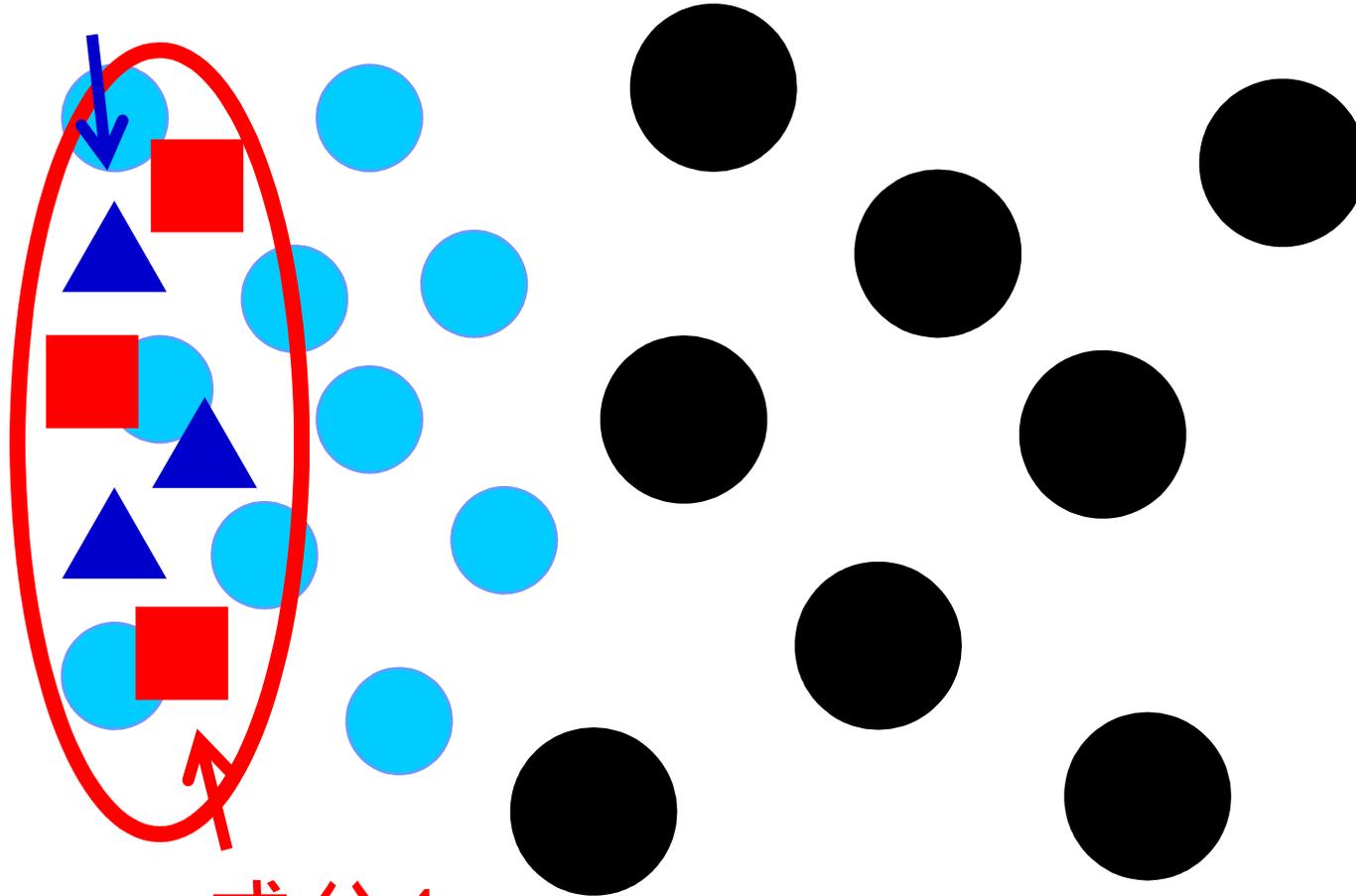
高速液体クロマトグラフィー

混合物の分析法の一つ。固体または液体の固定相(吸着剤)中で、液体または気体の移動相(展開剤)に試料を加えて移動させ、試料混合物の各成分の吸着性や分配係数の差に基づく移動速度の差を利用してそれぞれを分離する方法。精製・同定・定量に用いられる。



液体クロマトグラフィー概要

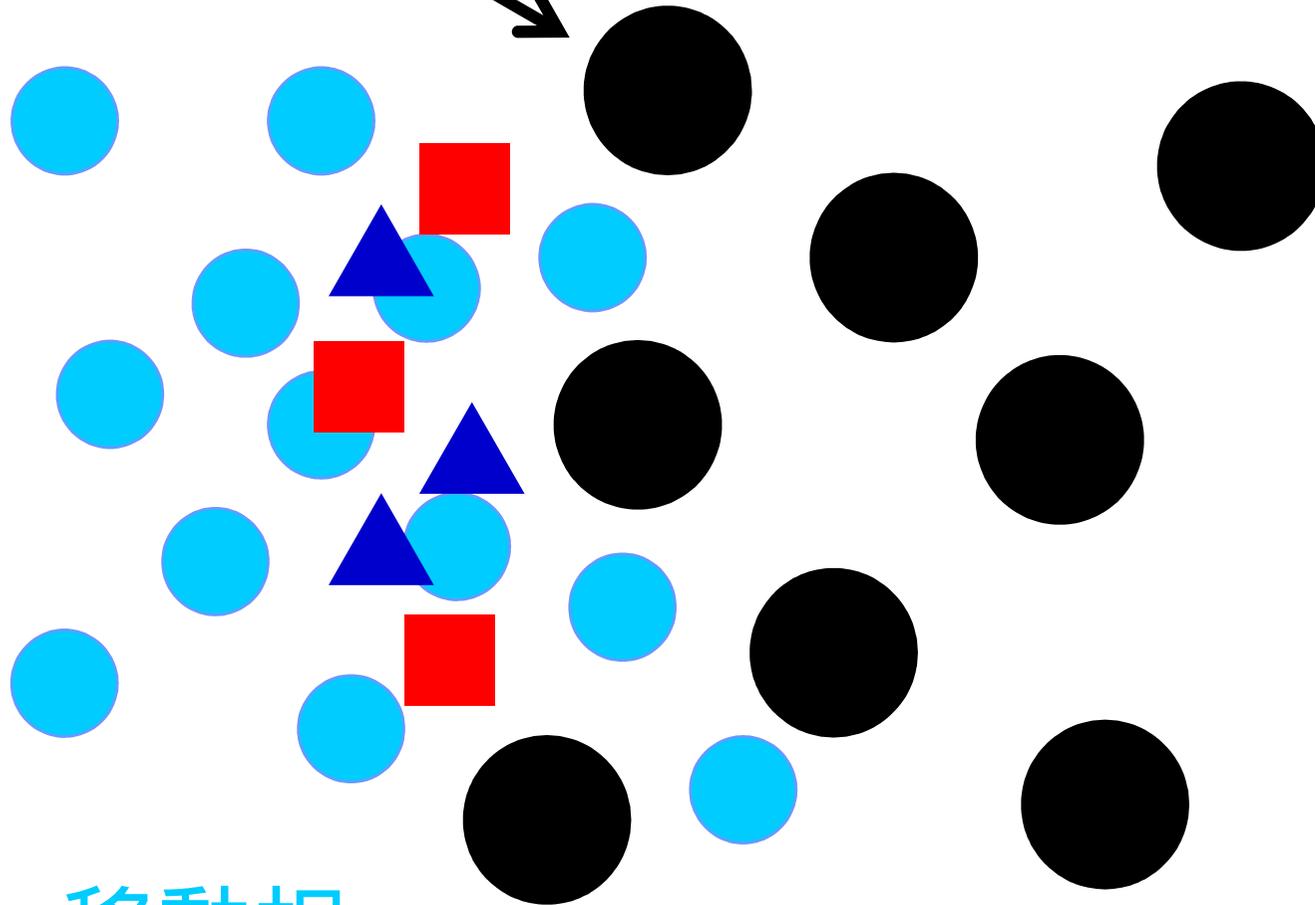
成分2 (固定相との相互作用 強)



成分1 (固定相との相互作用 弱)

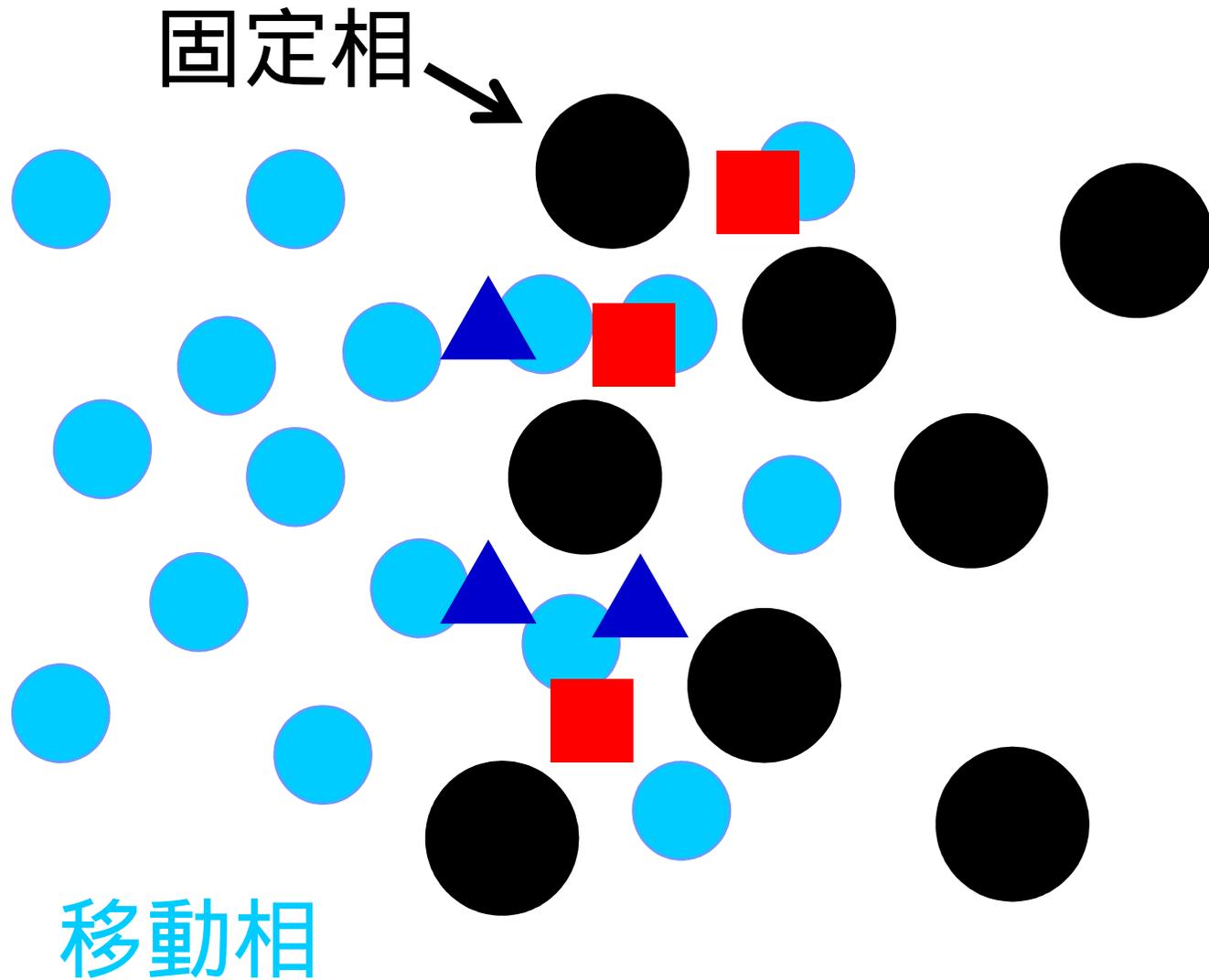
液体クロマトグラフィー概要

固定相

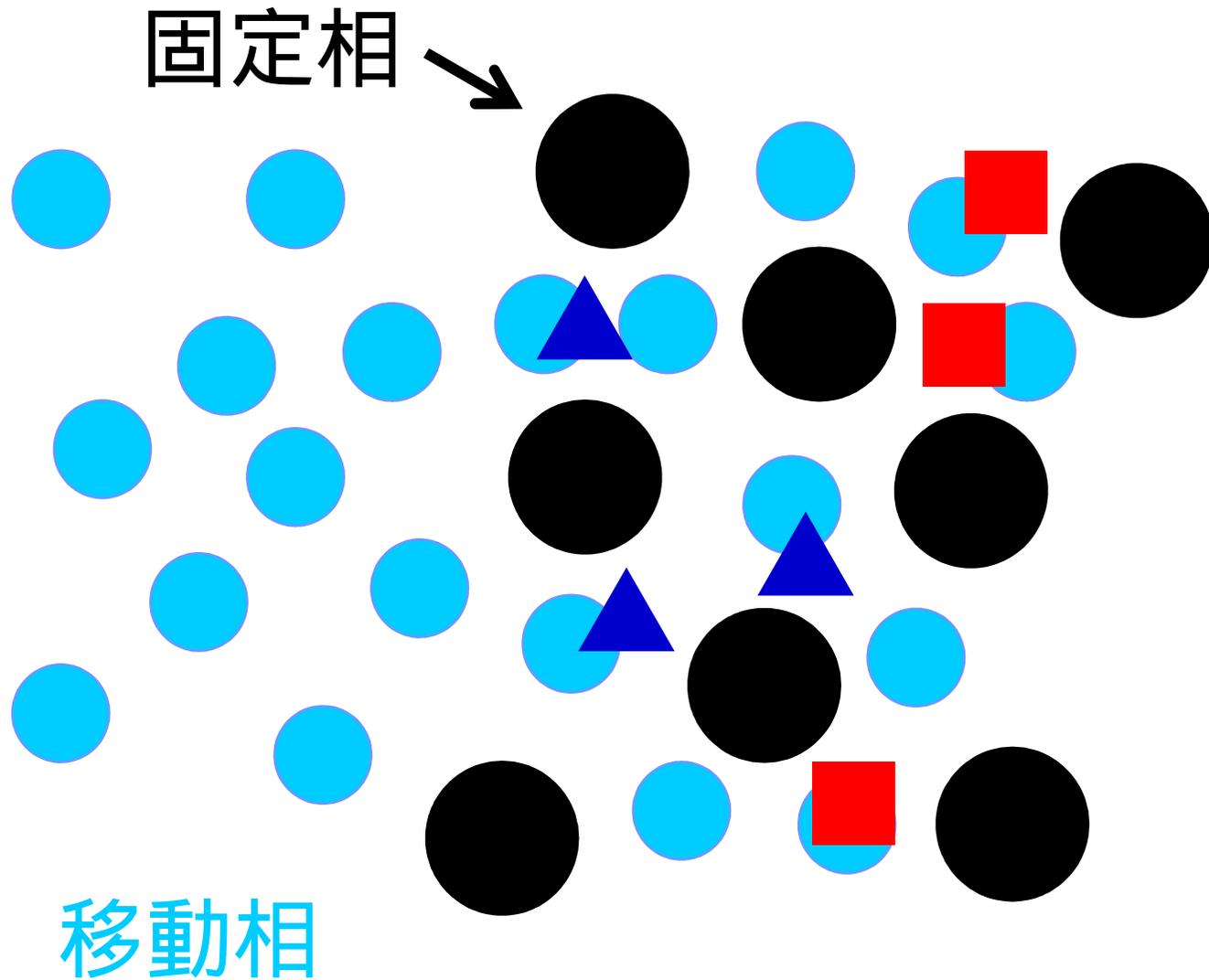


移動相

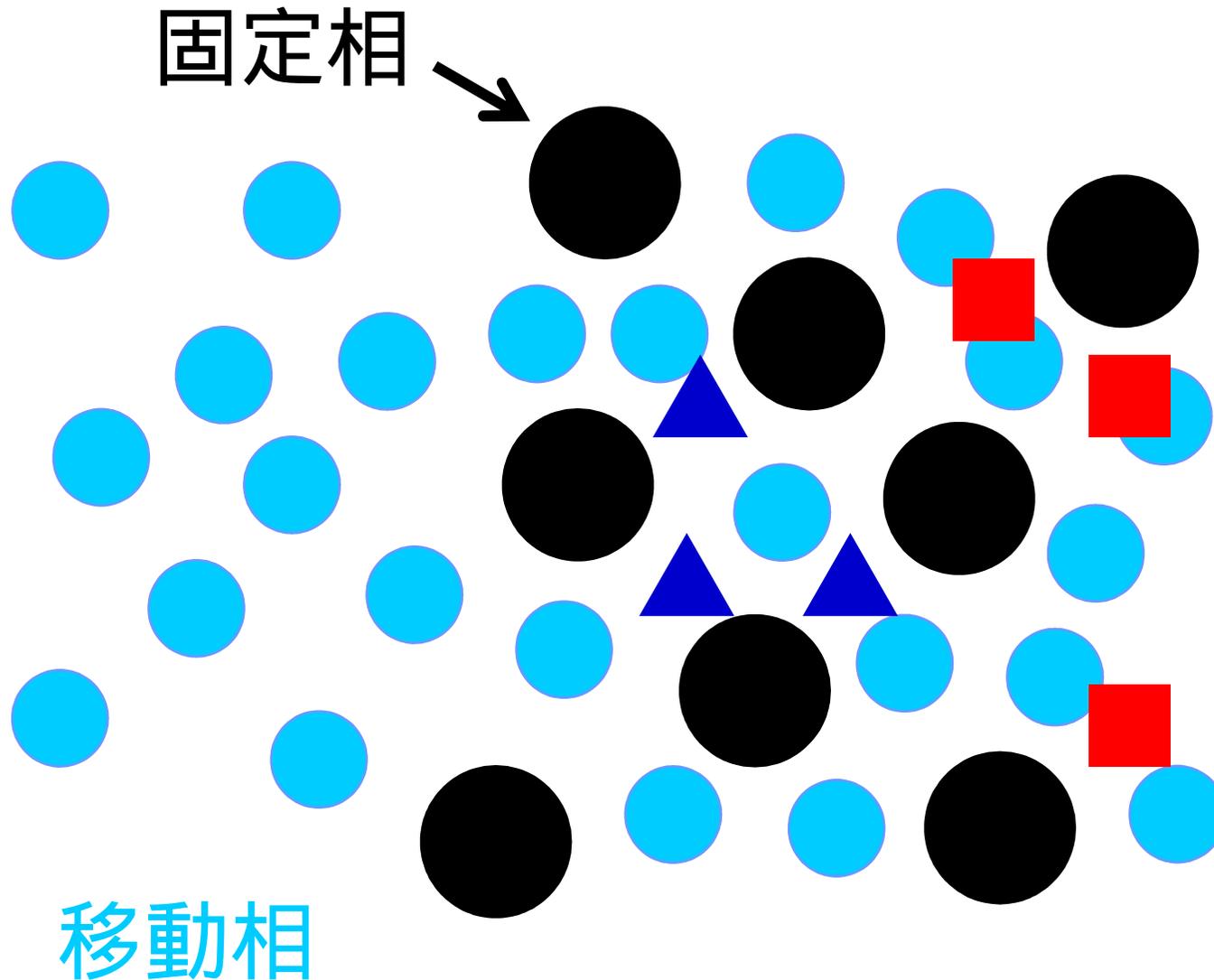
液体クロマトグラフィー概要



液体クロマトグラフィー概要



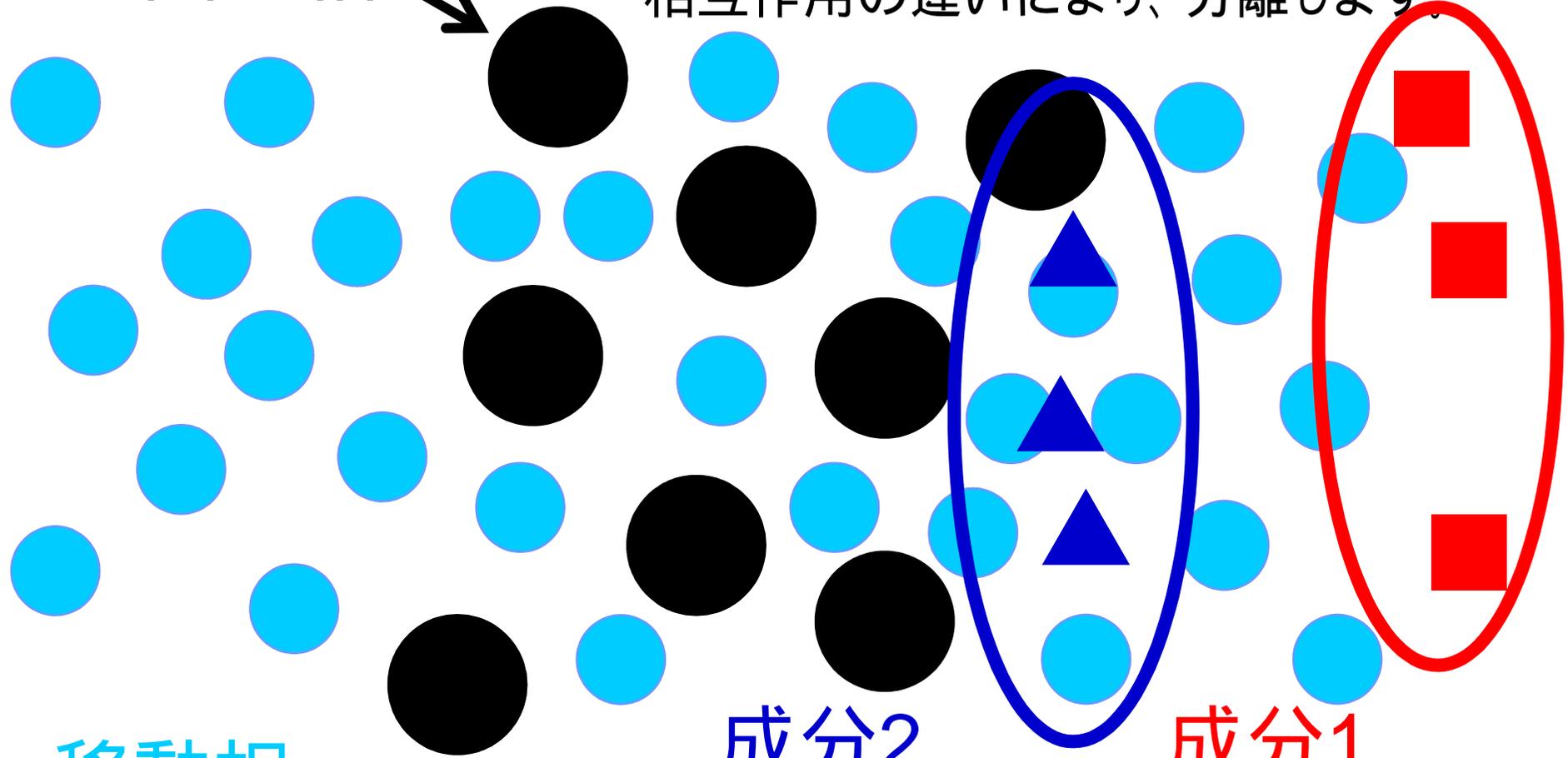
液体クロマトグラフィー概要



液体クロマトグラフィー概要

混合物質中の各成分と固定相との相互作用の違いにより、分離します。

固定相

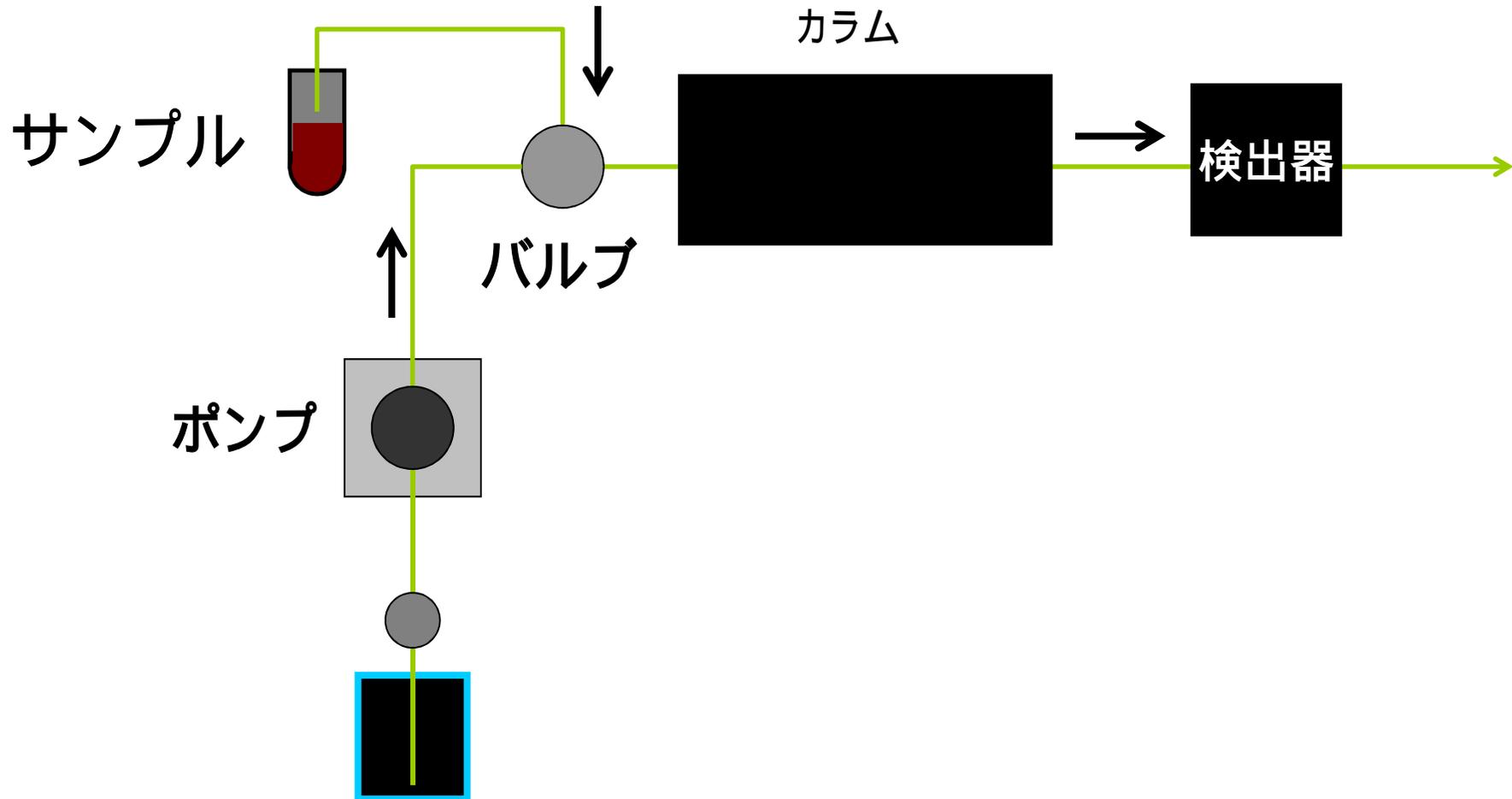


移動相

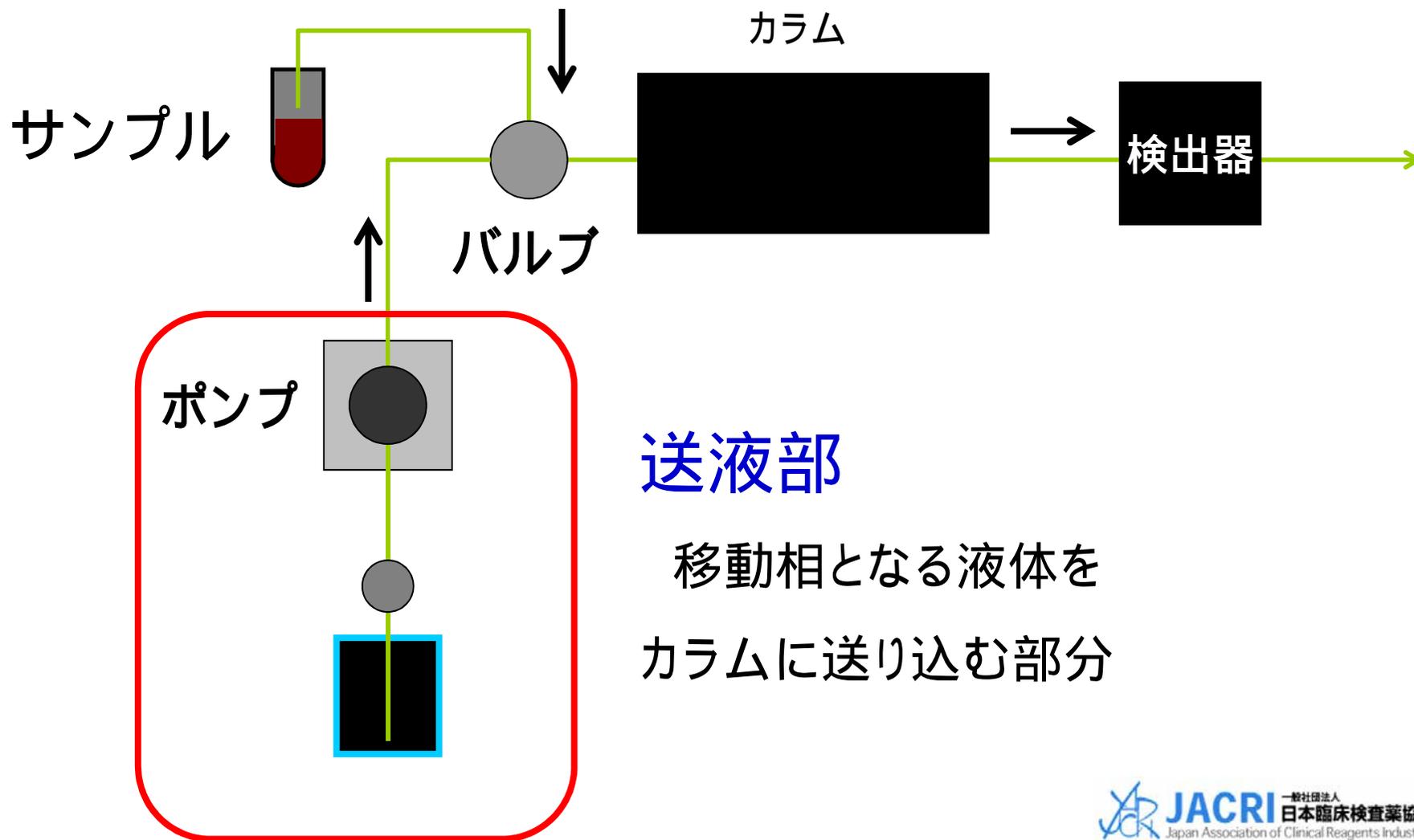
成分2
(相互作用 強)

成分1
(相互作用 弱)

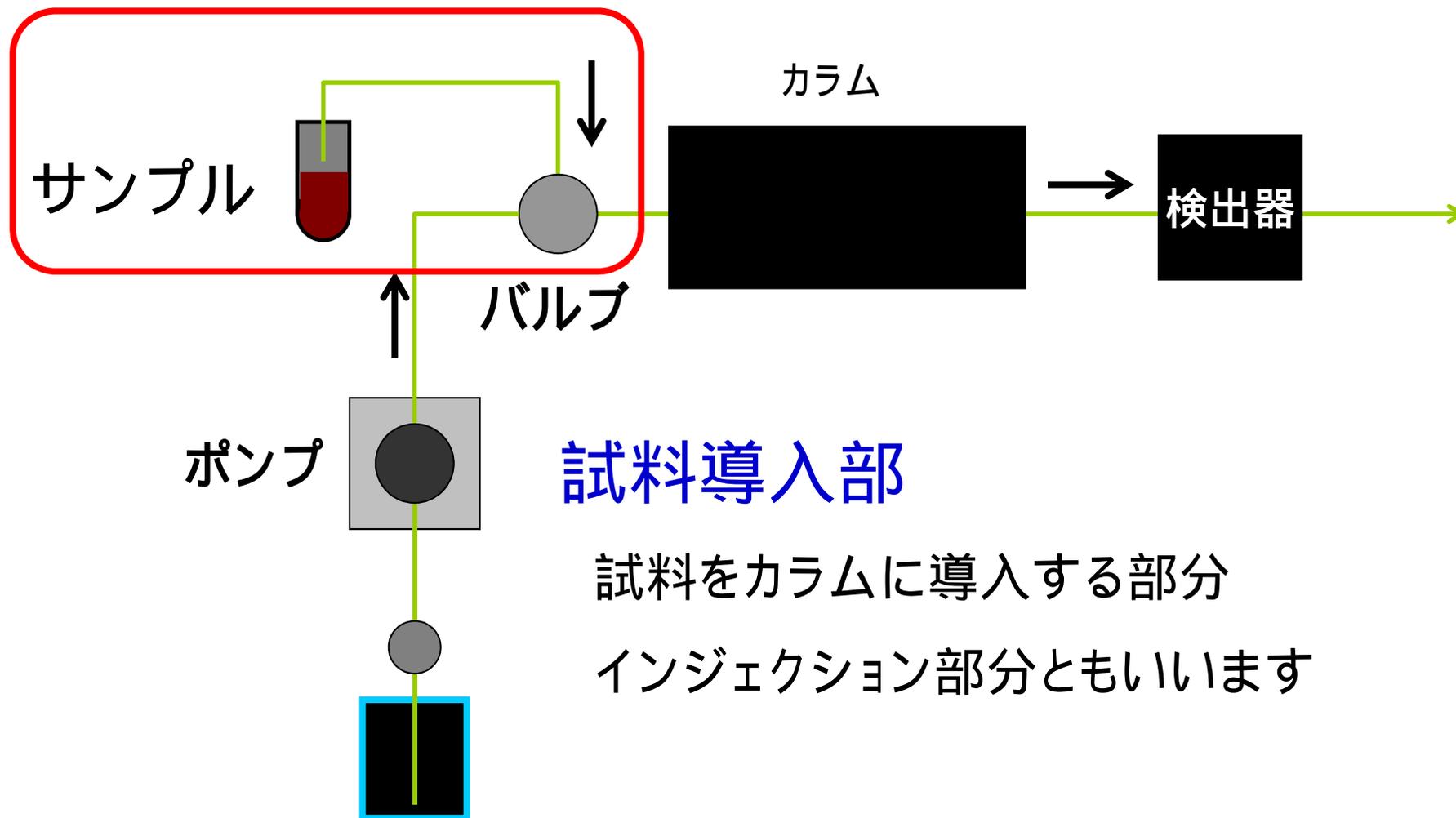
HPLC構成



HPLC構成



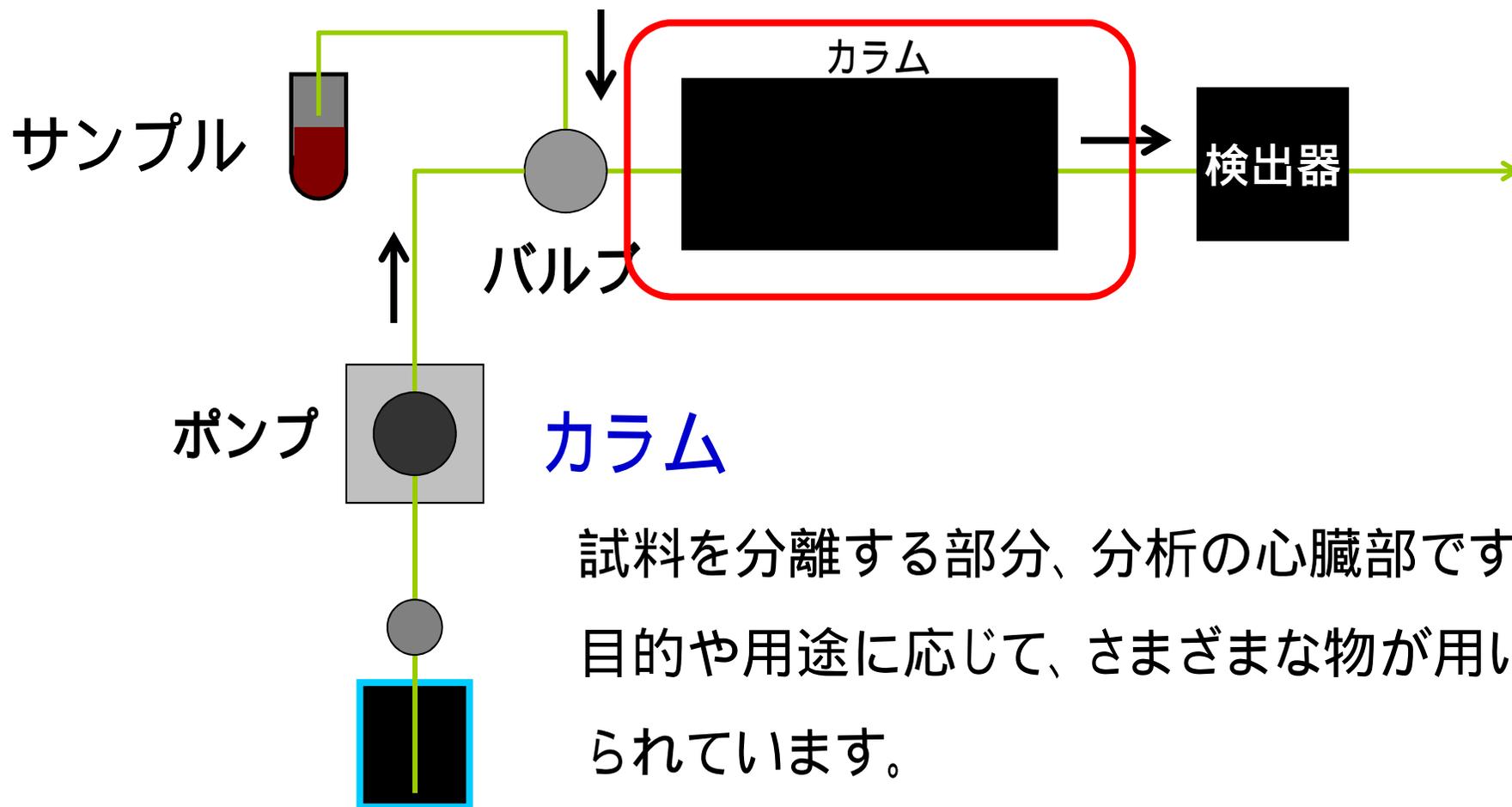
HPLC構成



試料導入部

試料をカラムに導入する部分
インジェクション部分ともいいます

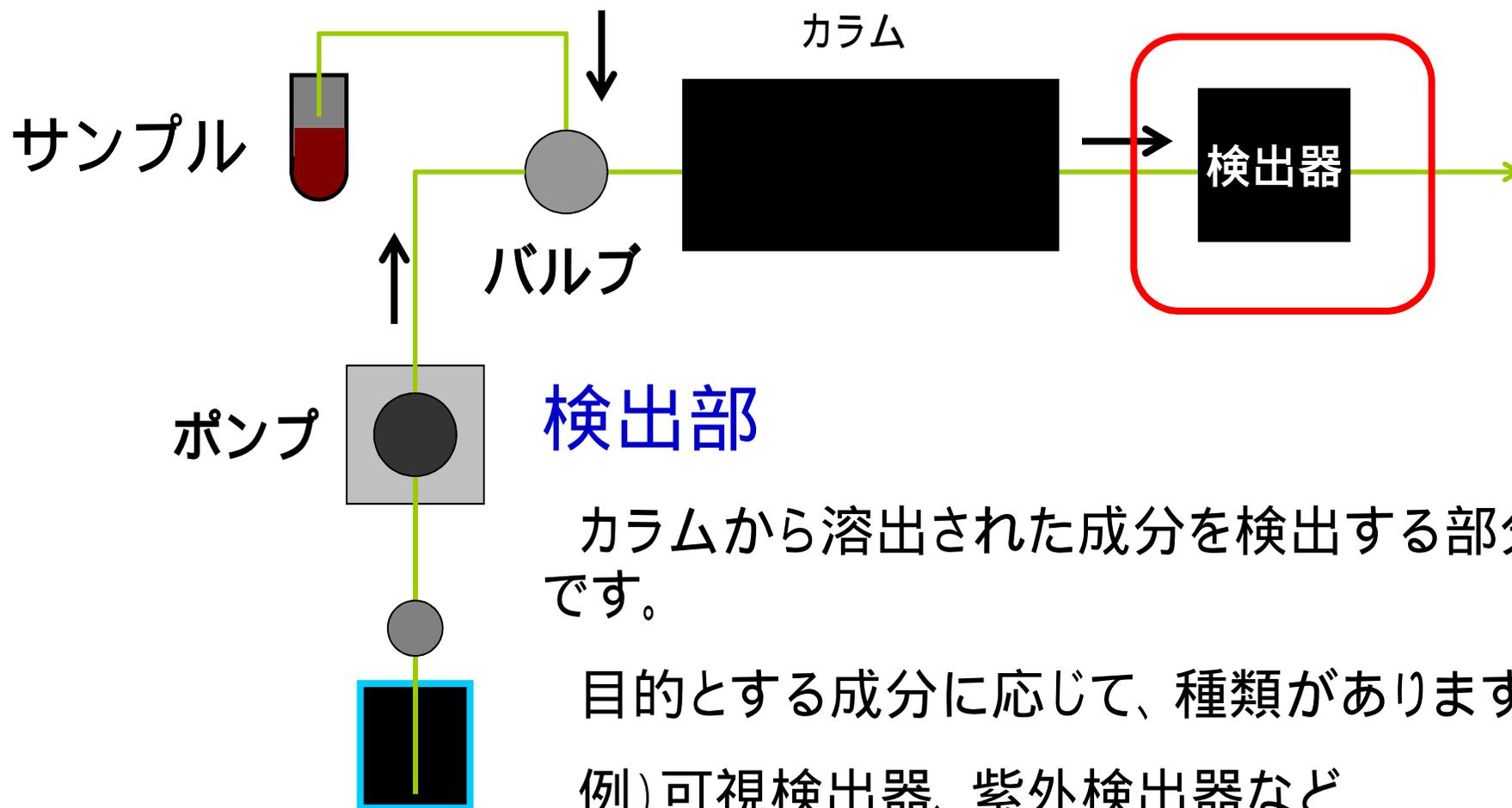
HPLC構成



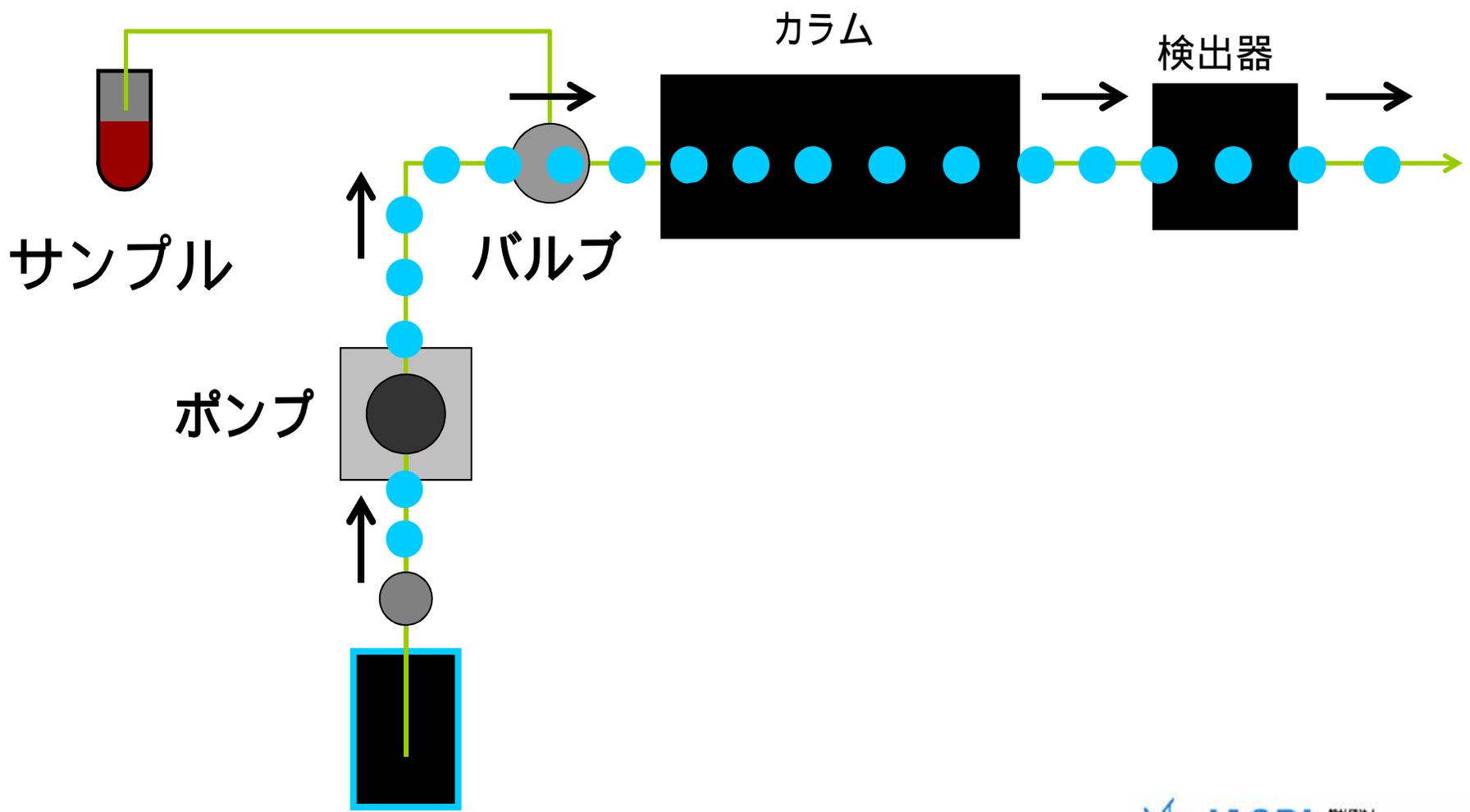
カラム

試料を分離する部分、分析の心臓部です。
目的や用途に応じて、さまざまな物が用いられています。

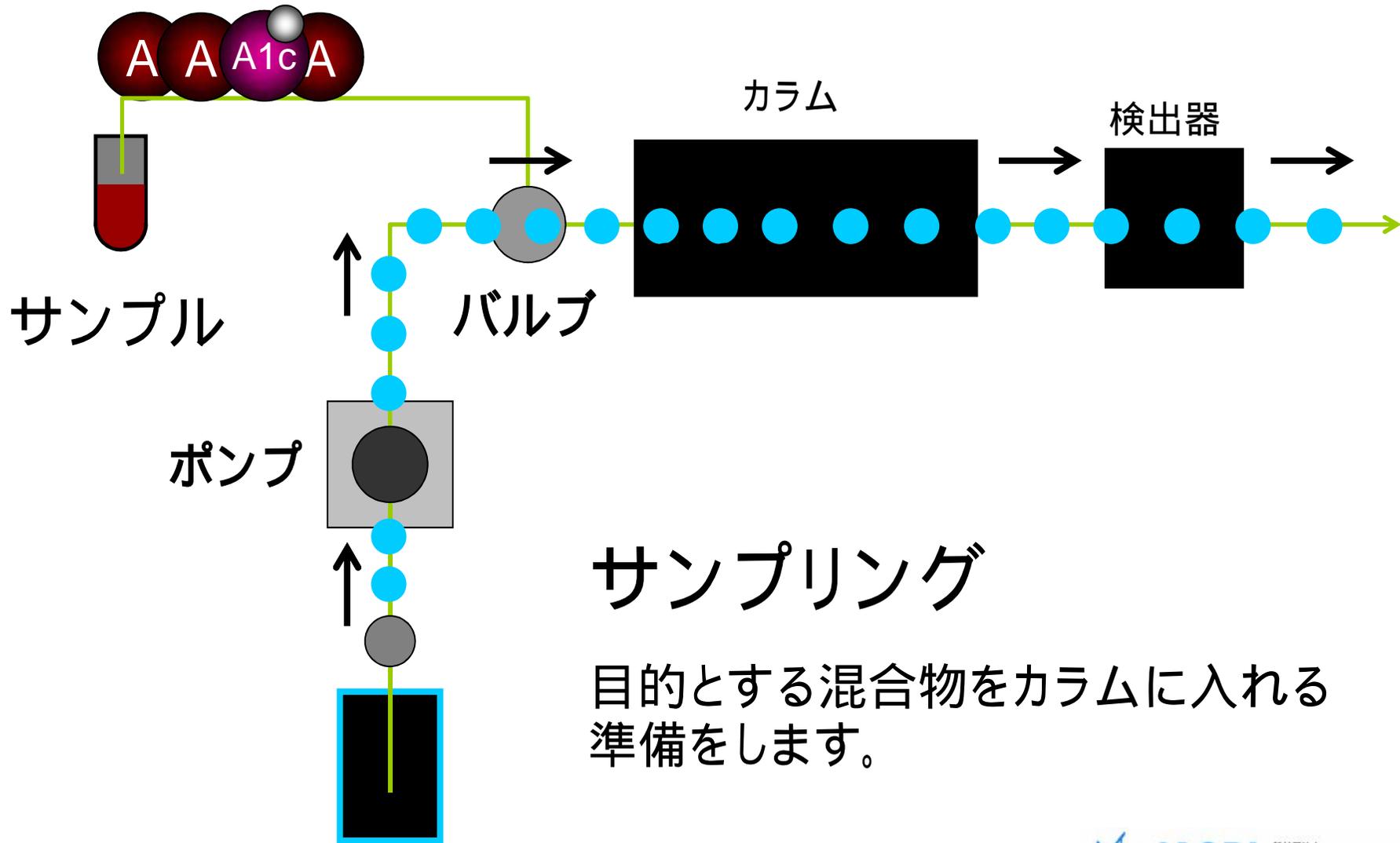
HPLC構成



HPLC模式図



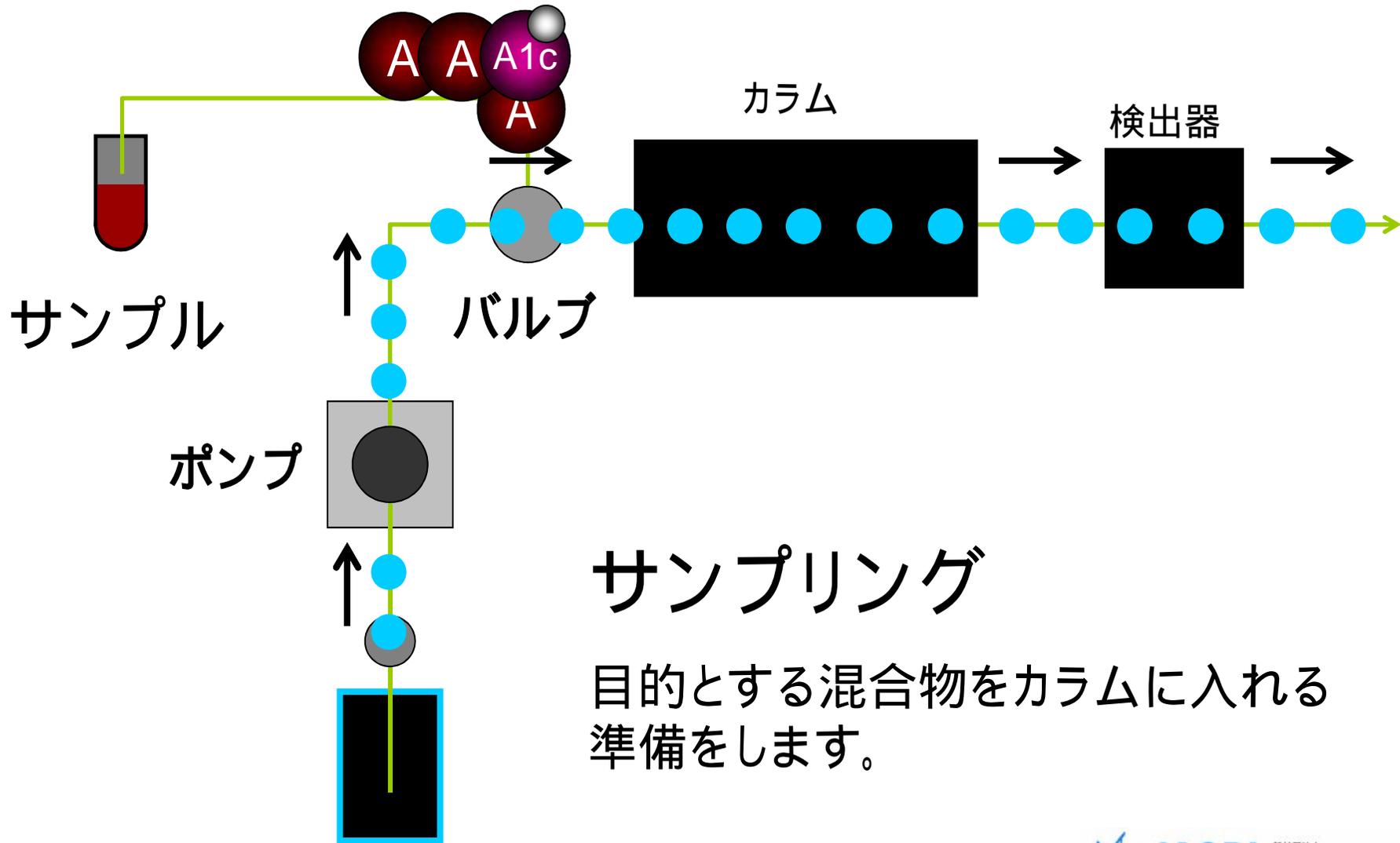
HPLC模式図



サンプリング

目的とする混合物をカラムに入れる準備をします。

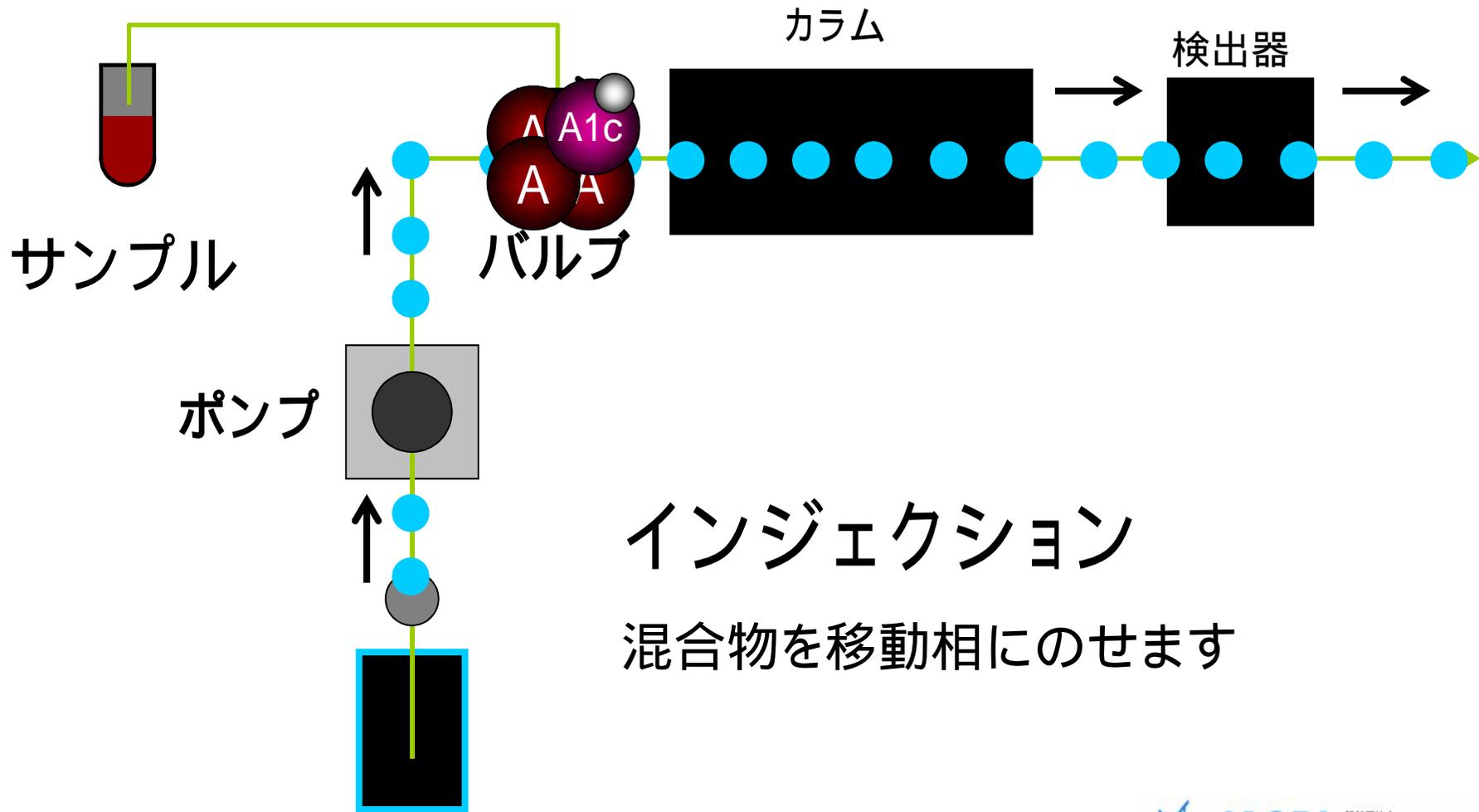
HPLC模式図



サンプリング

目的とする混合物をカラムに入れる準備をします。

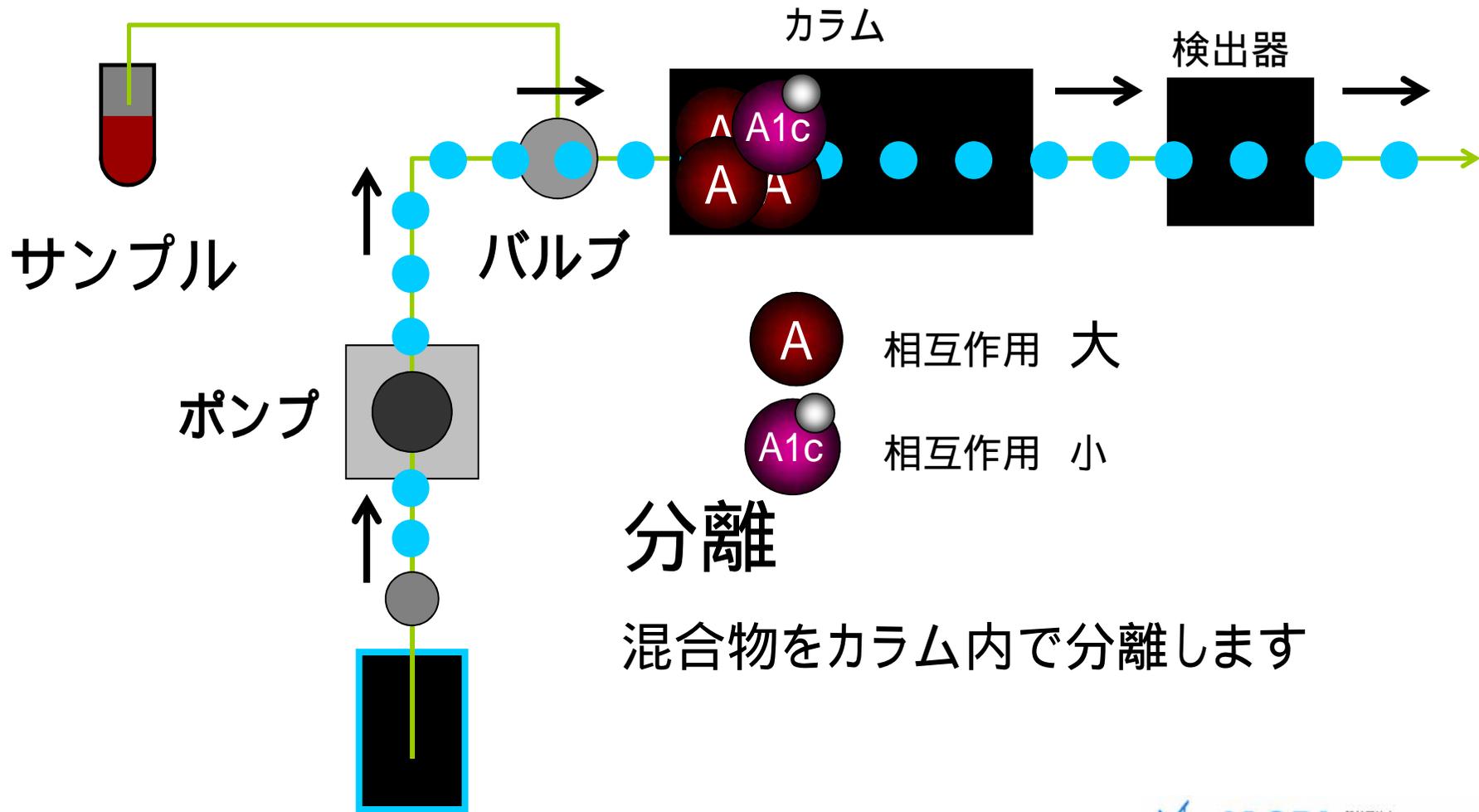
HPLC模式図



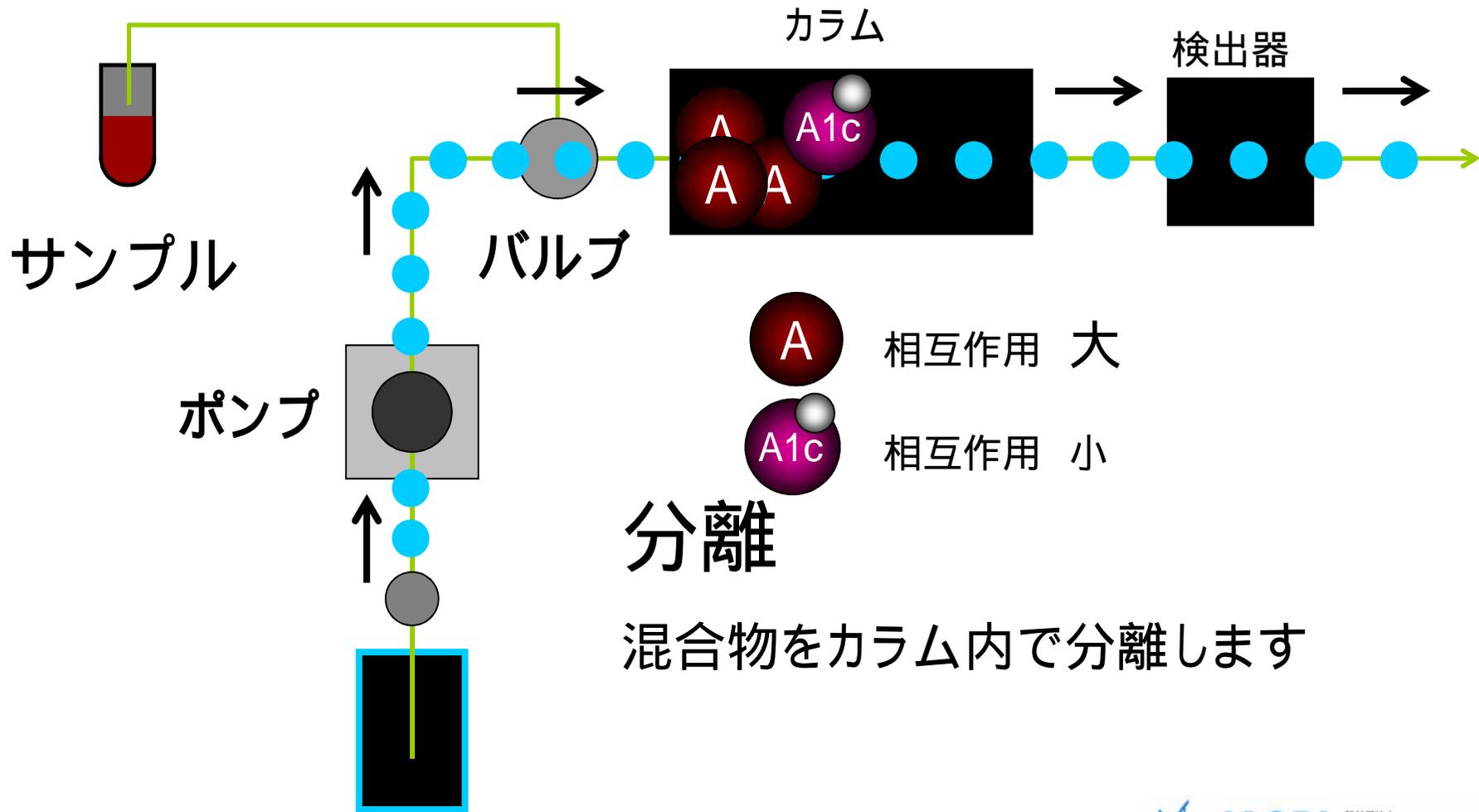
インジェクション

混合物を移動相にのせます

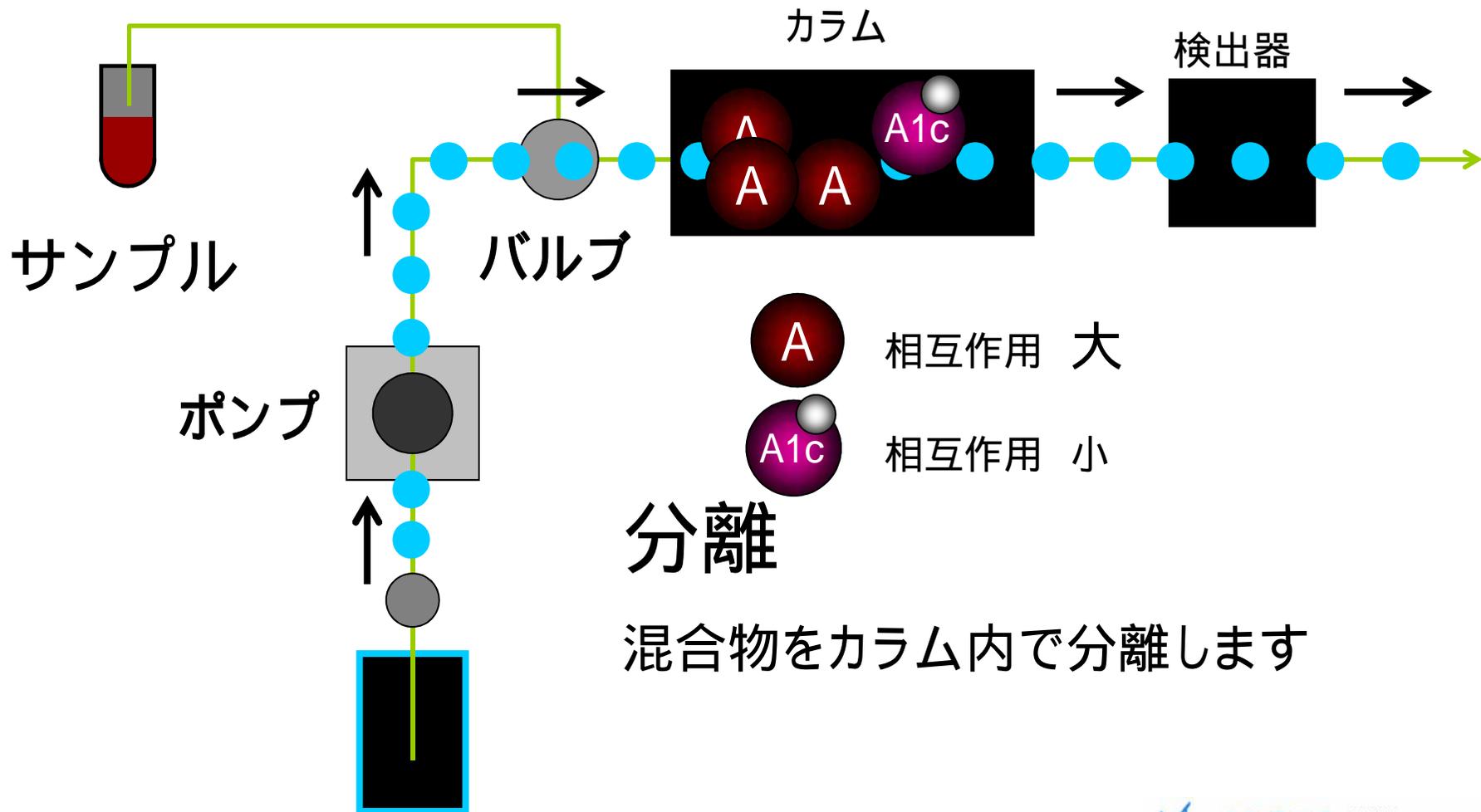
HPLC模式図



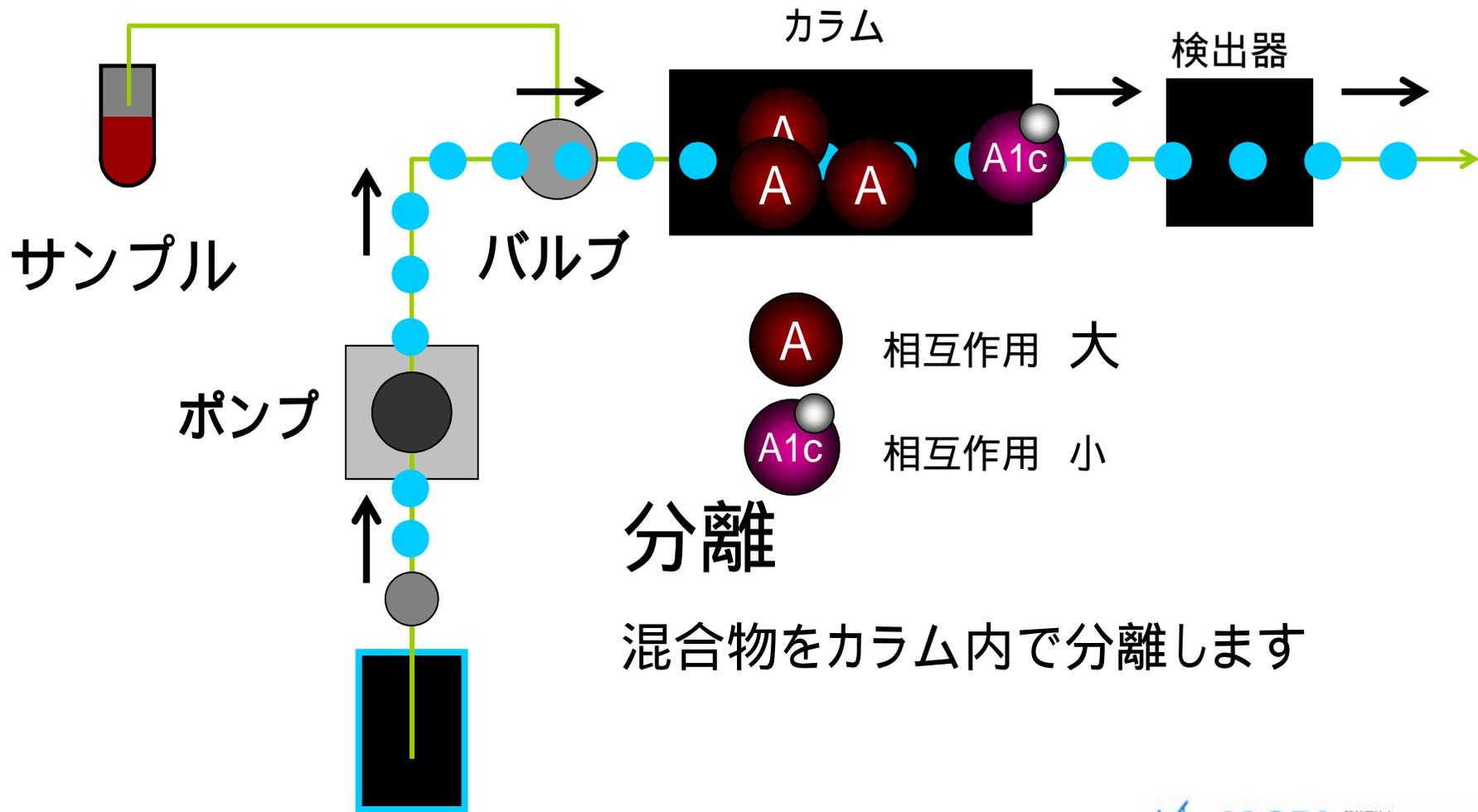
HPLC模式図



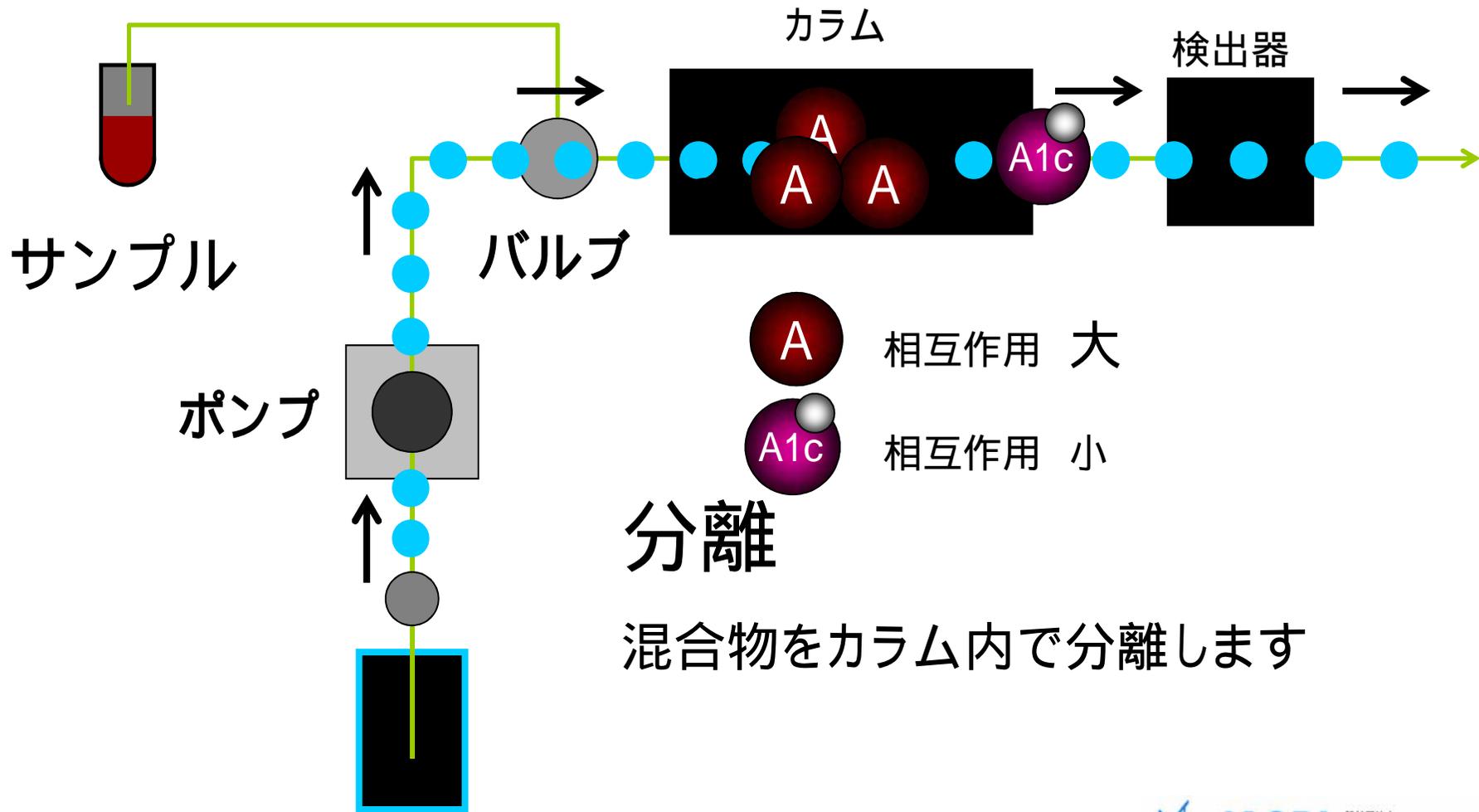
HPLC模式図



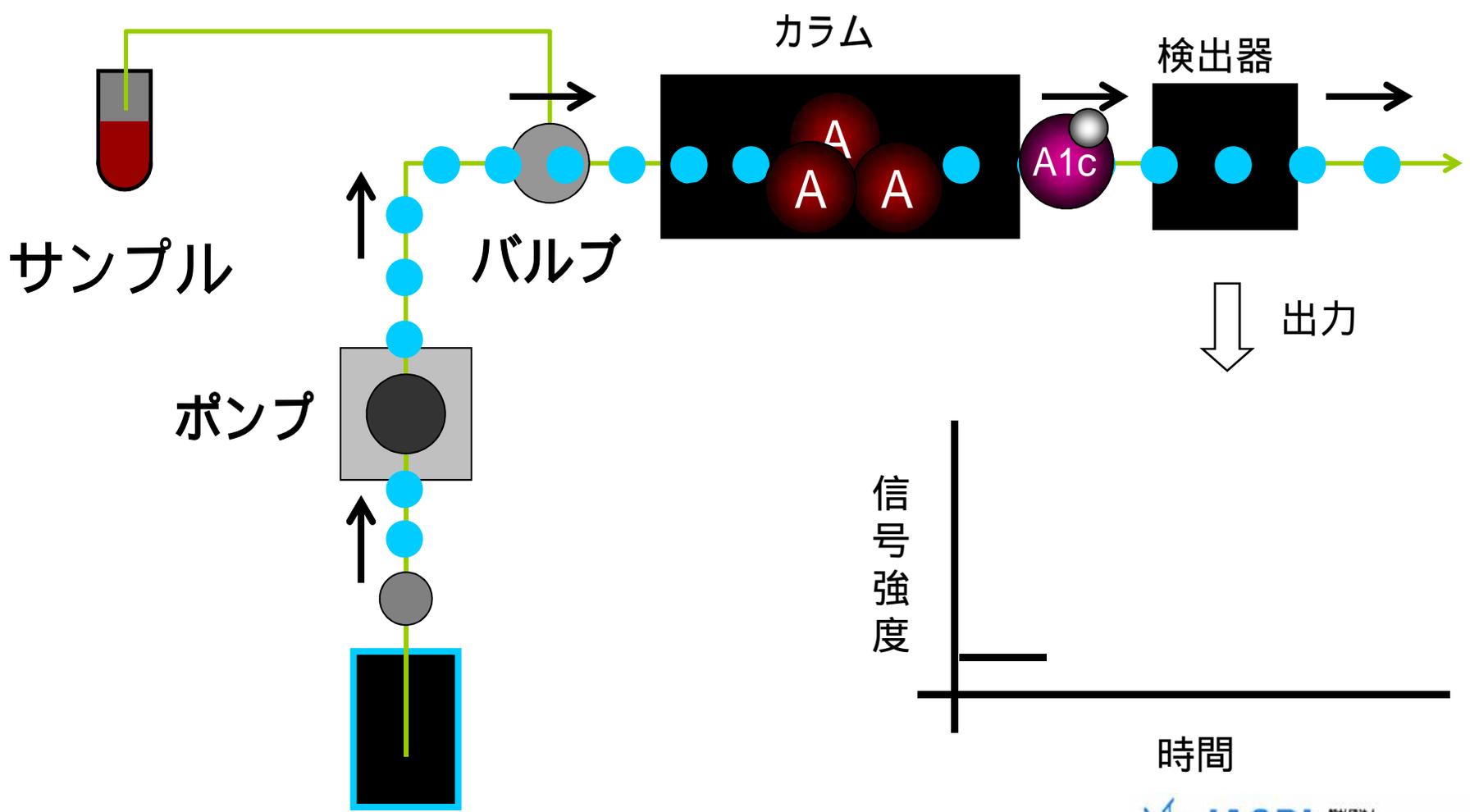
HPLC模式図



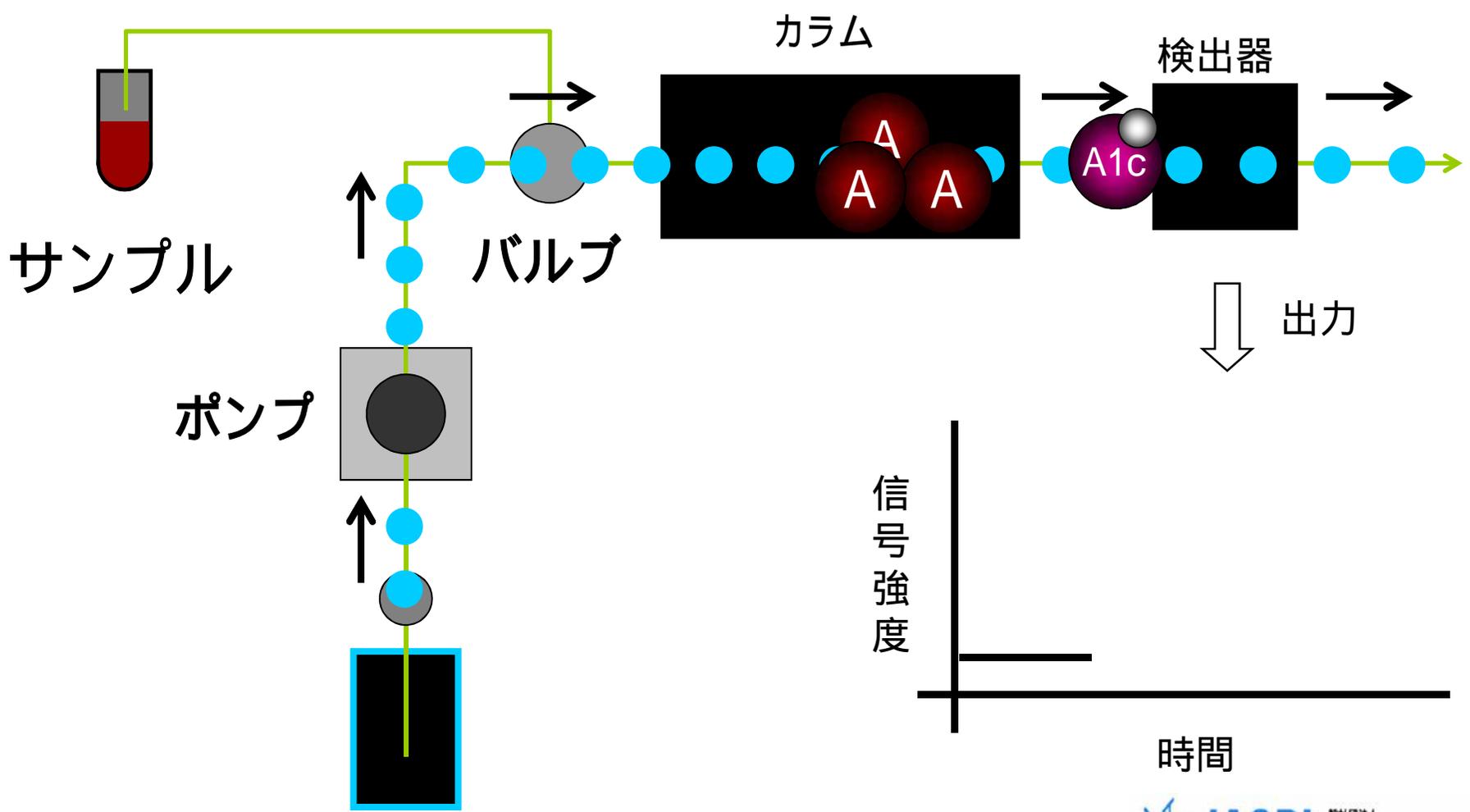
HPLC模式図



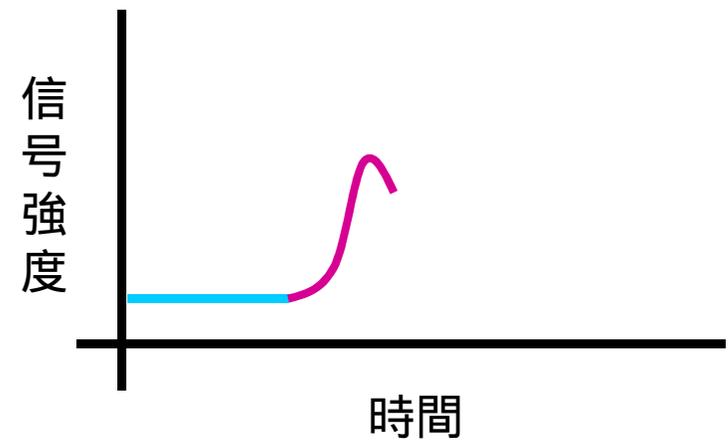
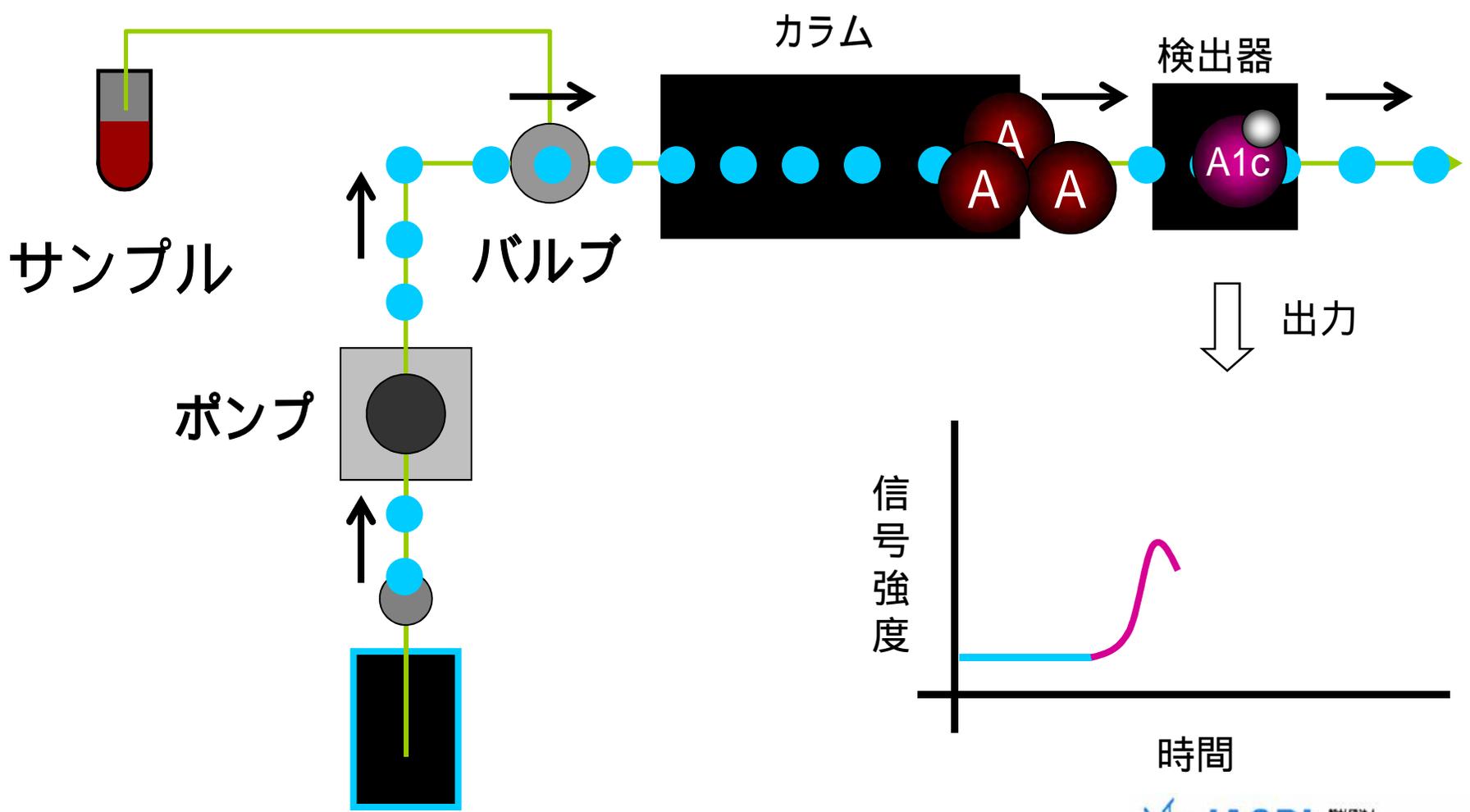
HPLC模式図



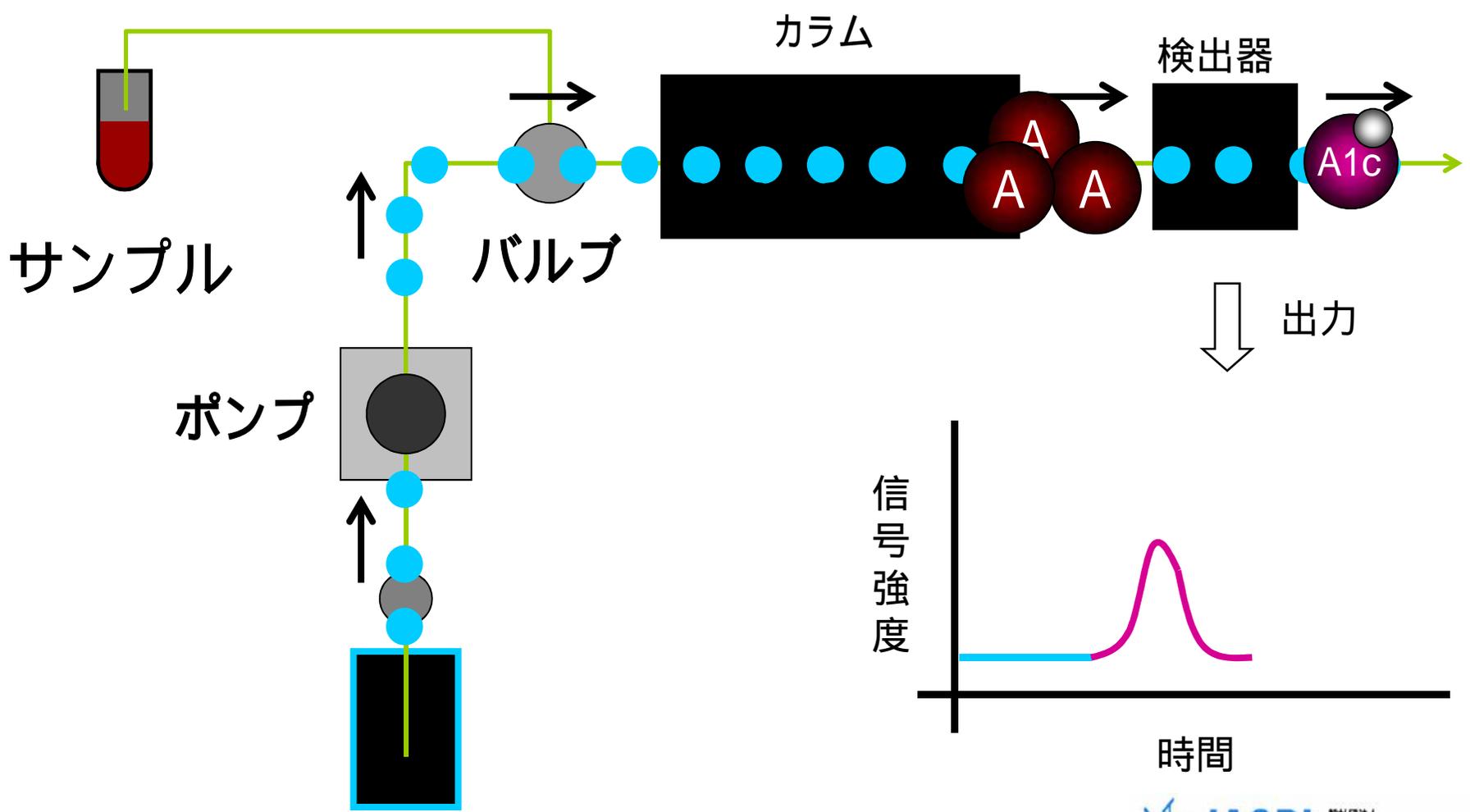
HPLC模式図



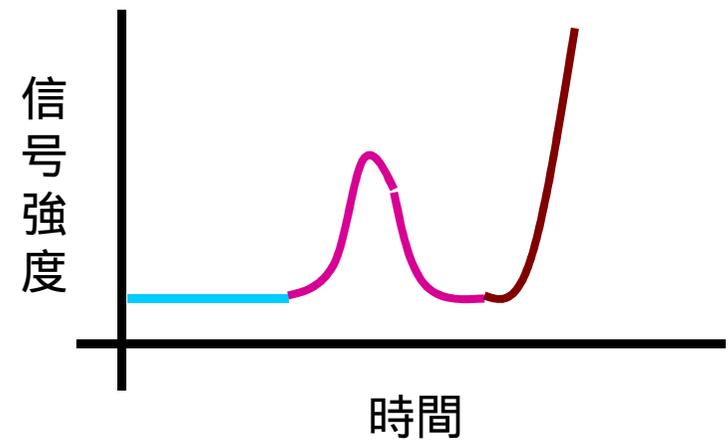
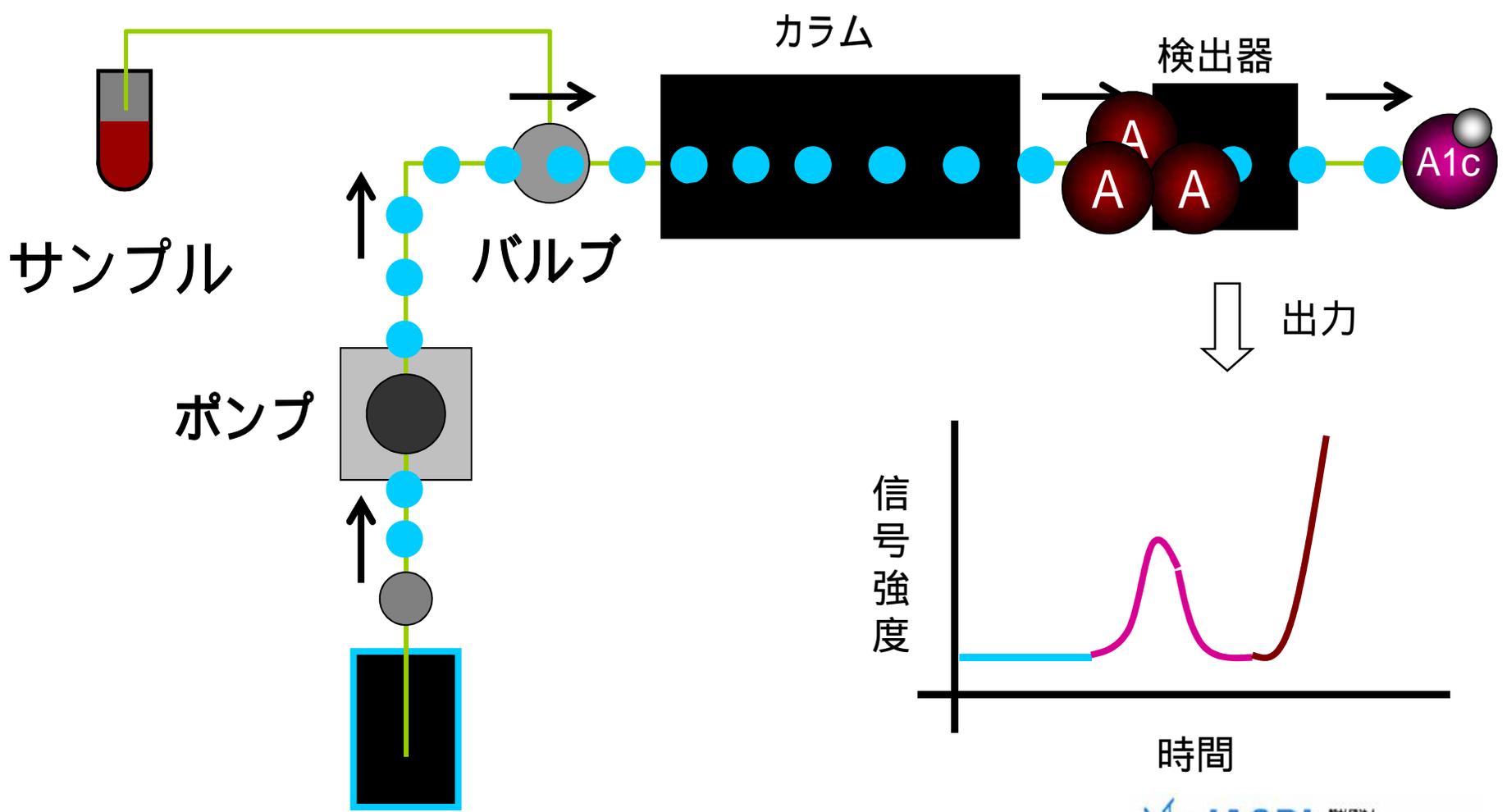
HPLC模式図



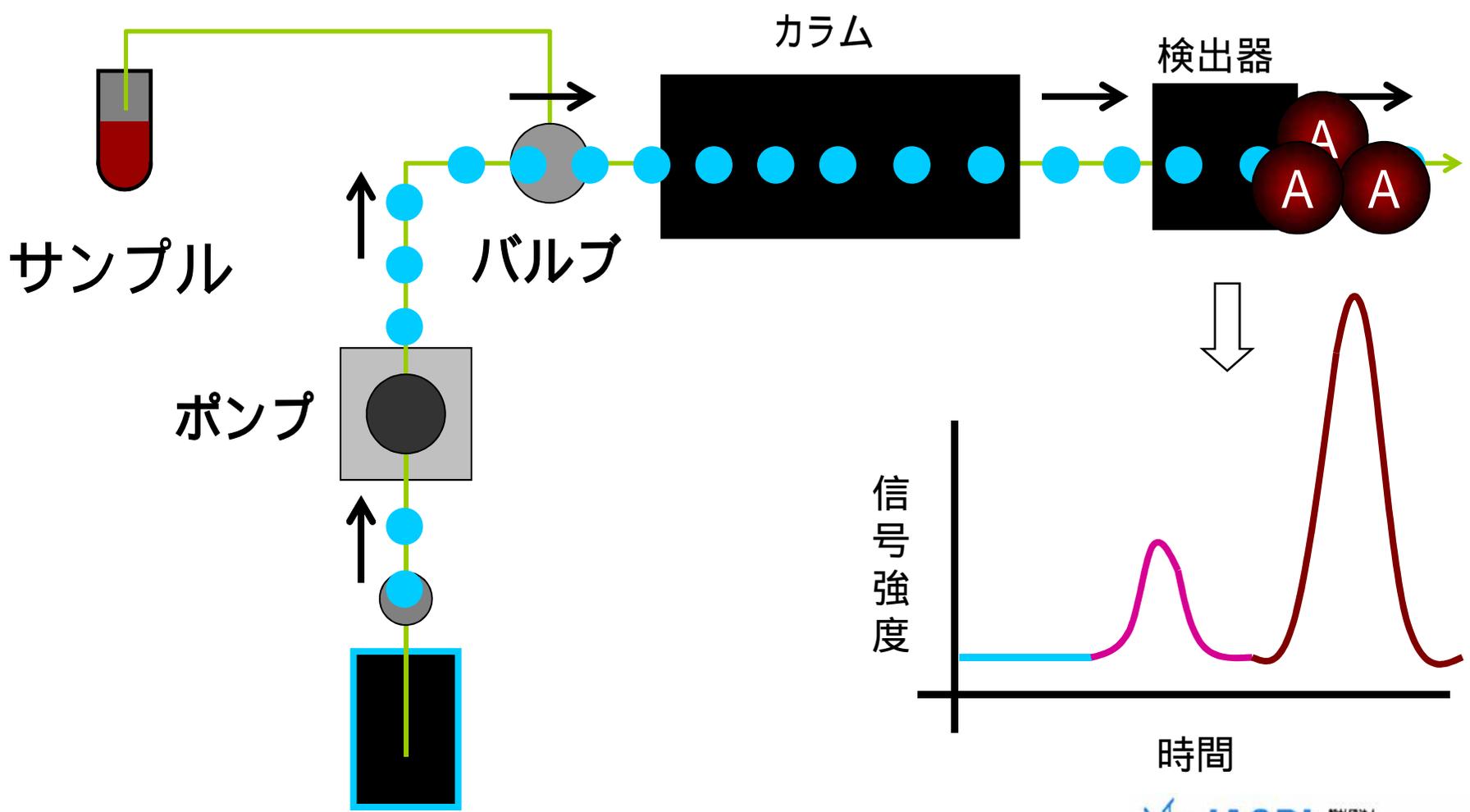
HPLC模式図



HPLC模式図

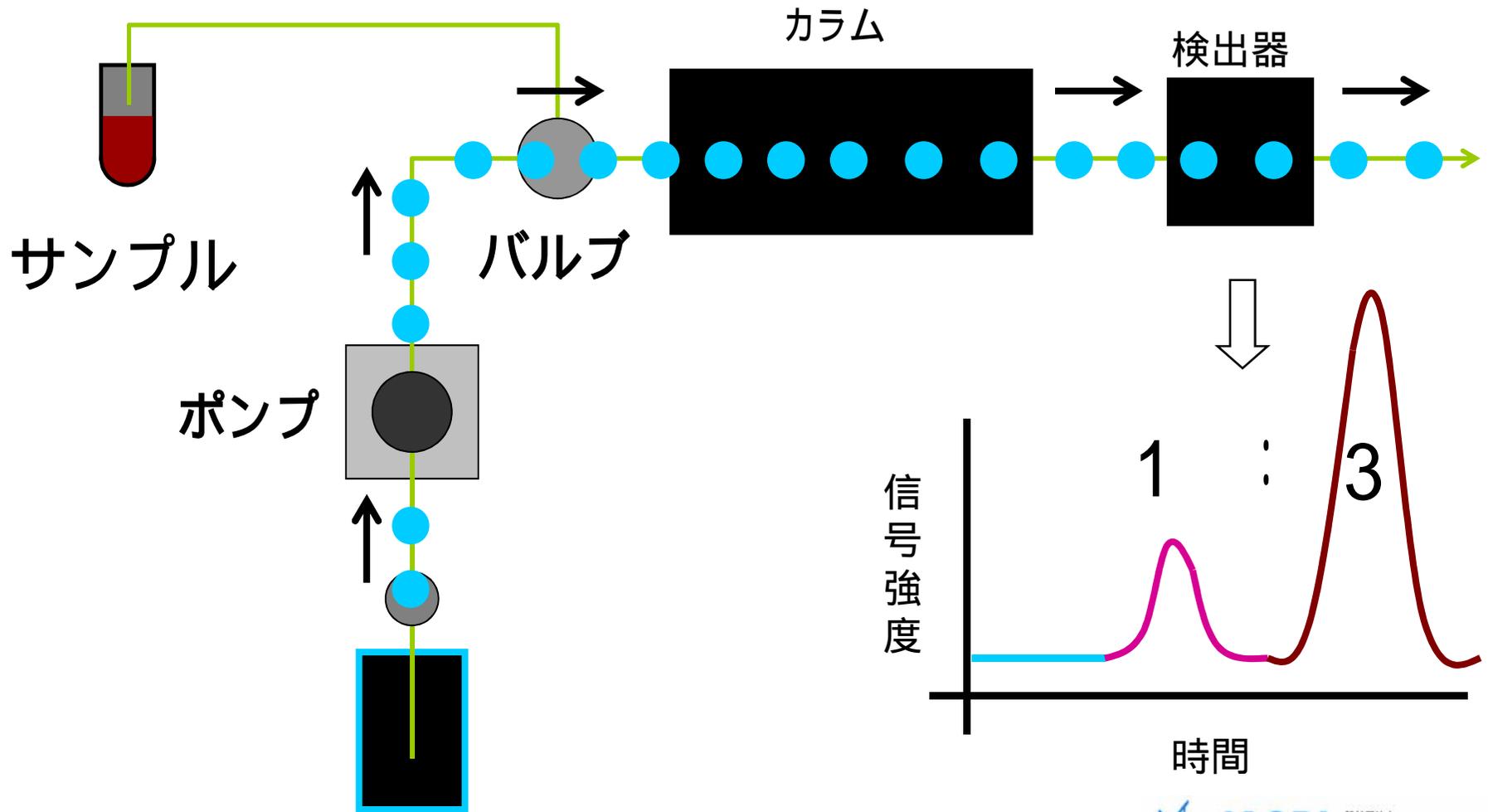


HPLC模式図



HPLC模式図

ピークの面積は物質の量に比例

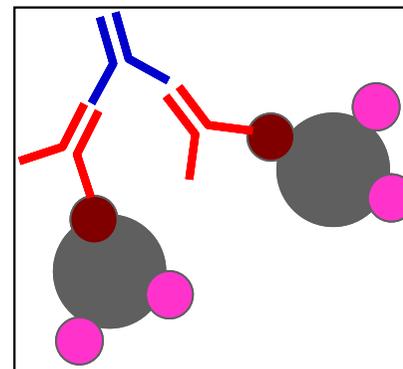


免疫測定法

免疫法

•免疫法

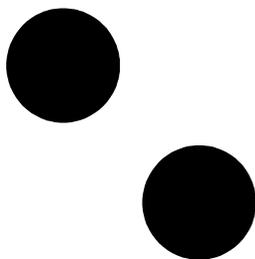
HbA1cに特異的な抗体を用い、
HbA1c量に応じて増減する凝集の
量を測定する。



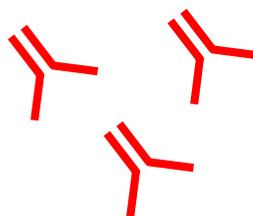
免疫測定法の原理1

ラテックス凝集比濁法(LA)

未感作
ラテックス



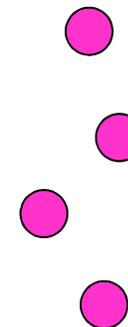
第1抗体



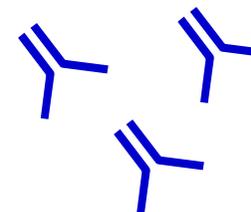
HbA1c



Hb



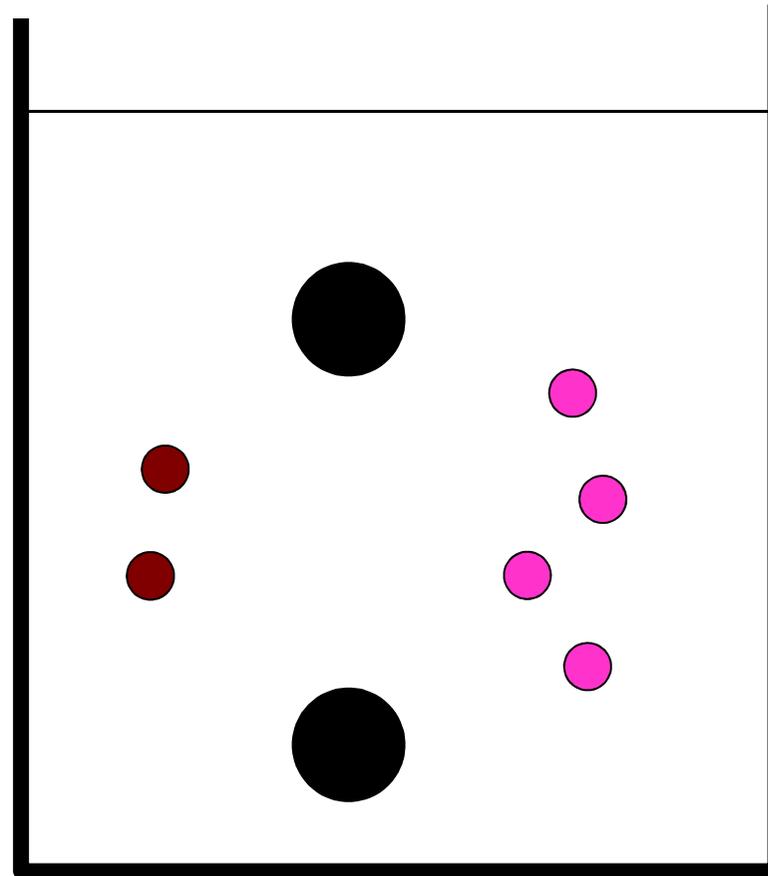
第2抗体



免疫測定法の原理1

ラテックス凝集比濁法（LA）

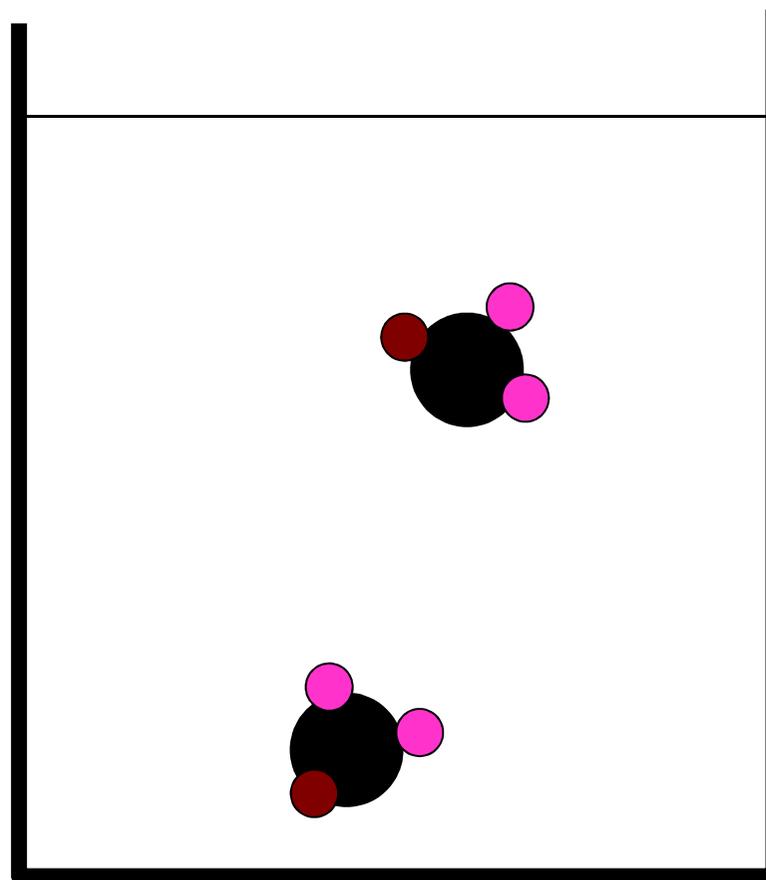
ヘモグロビン溶液に、未感作ラテックスを入れると、ラテックス表面に、ヘモグロビンが吸着される



免疫測定法の原理1

ラテックス凝集比濁法（LA）

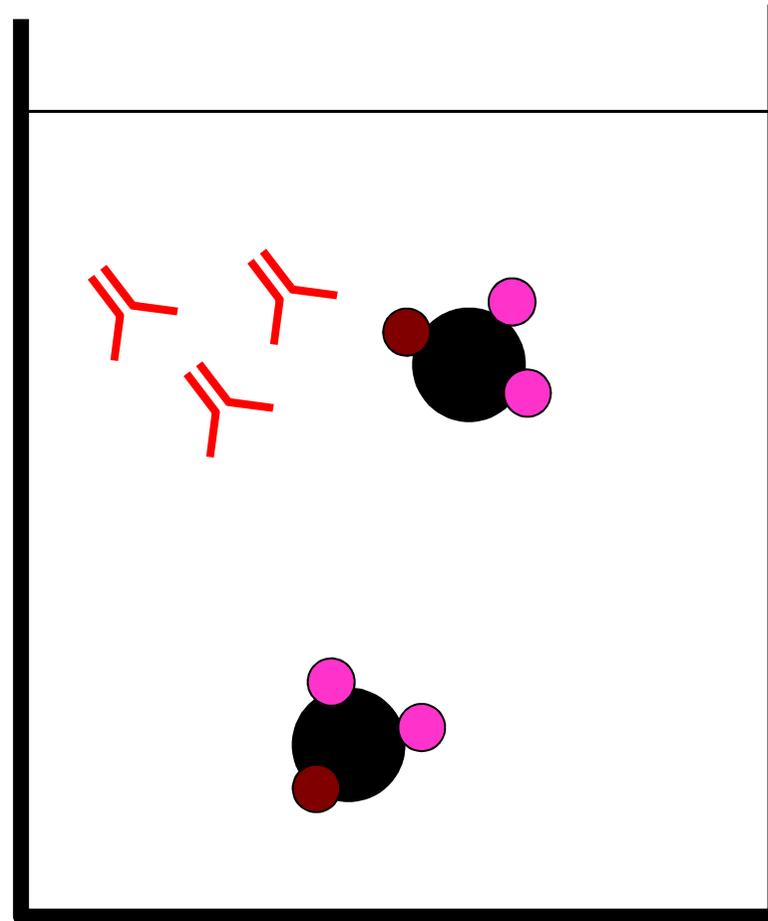
ヘモグロビン溶液に、未感作ラテックスを入れると、ラテックス表面に、ヘモグロビンが吸着される



免疫測定法の原理1

ラテックス凝集比濁法（LA）

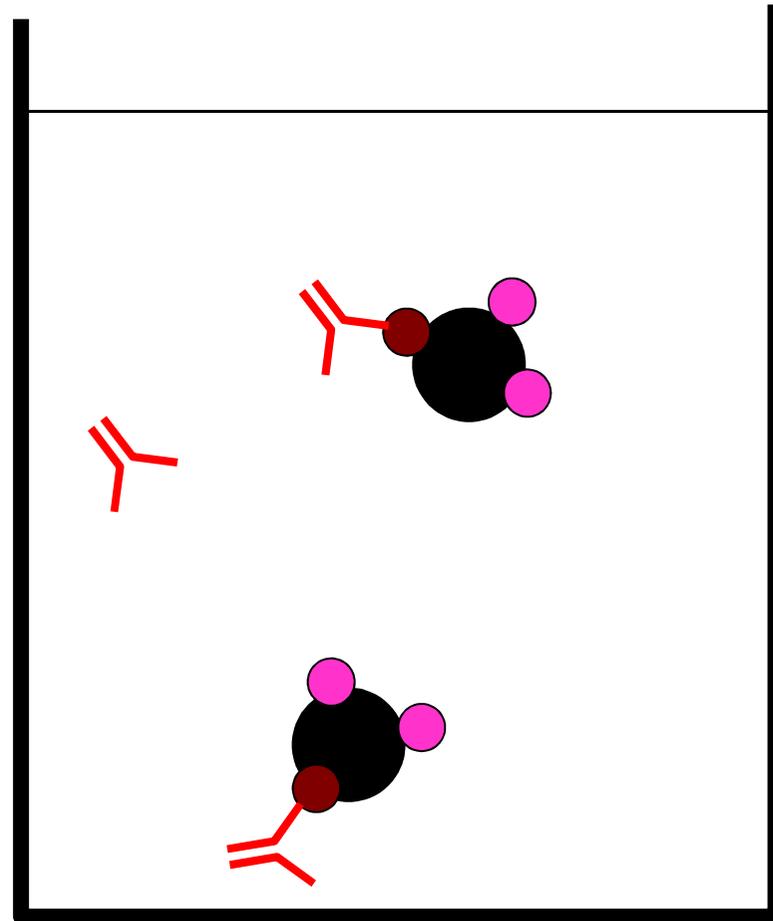
第一抗体（HbA1cに特異的）を加える



免疫測定法の原理1

ラテックス凝集比濁法（LA）

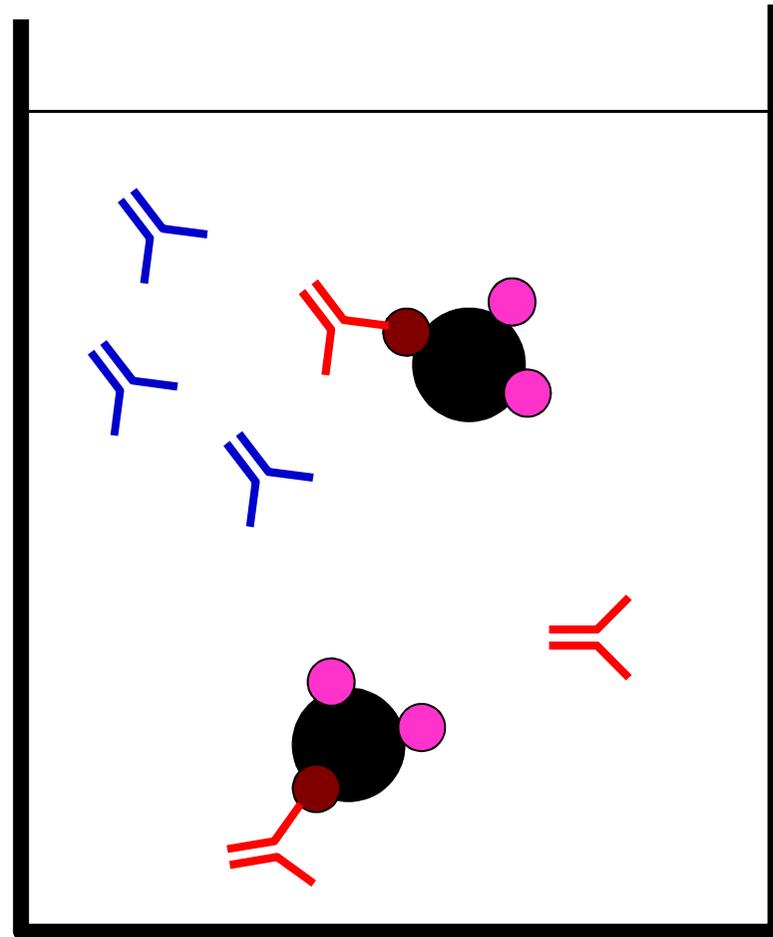
第一抗体がHbA1cを認識して結合する



免疫測定法の原理1

ラテックス凝集比濁法（LA）

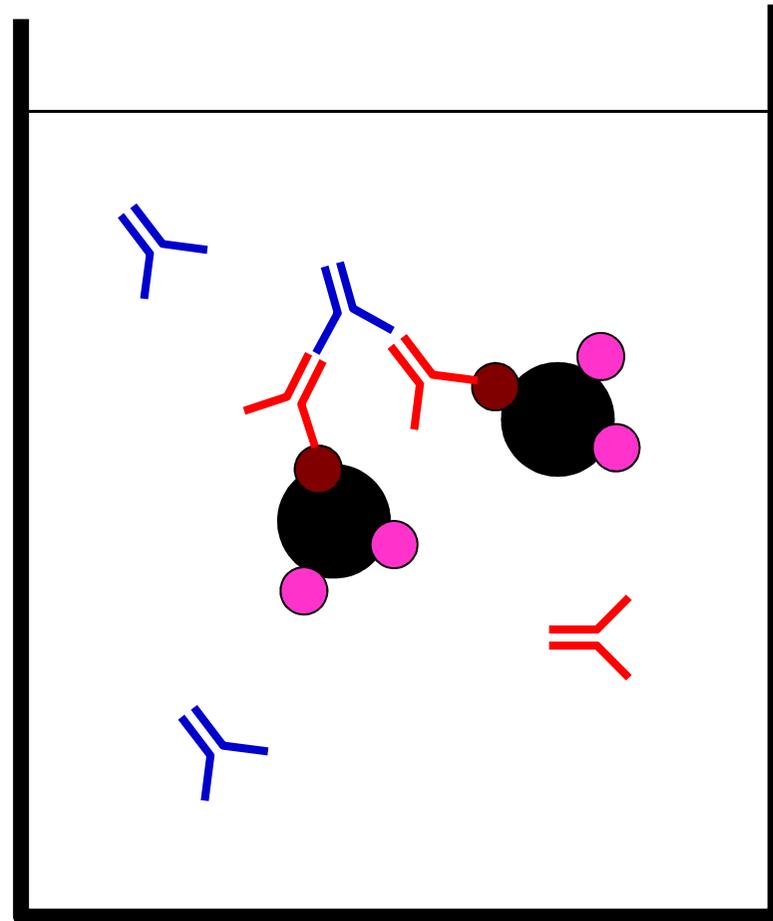
これに、第二抗体（第一抗体に特異的に反応）を加える



免疫測定法の原理1

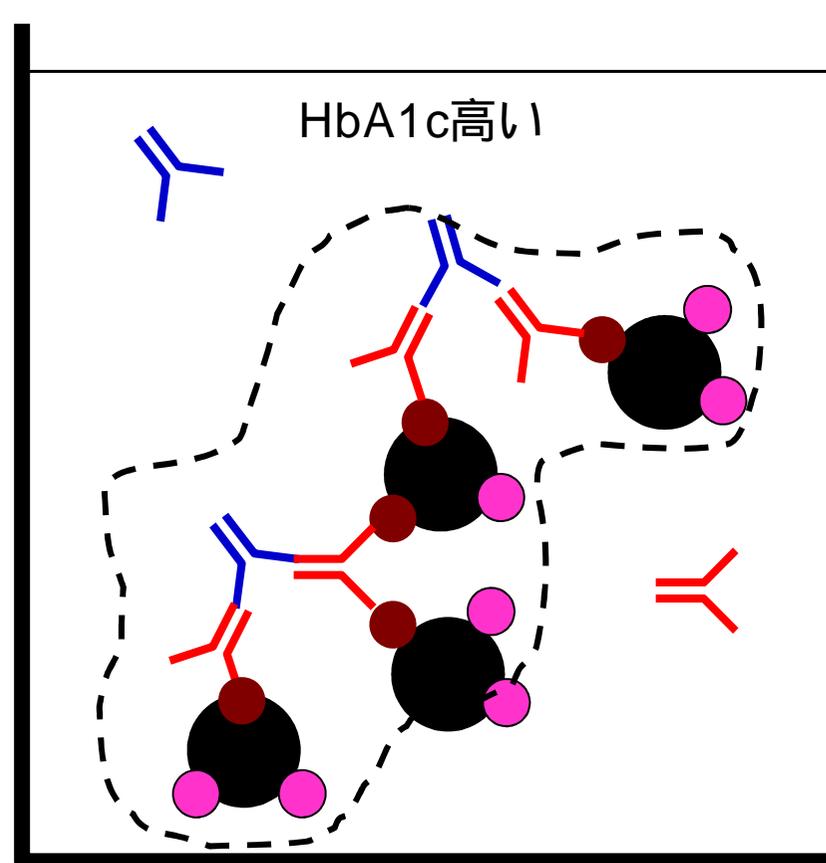
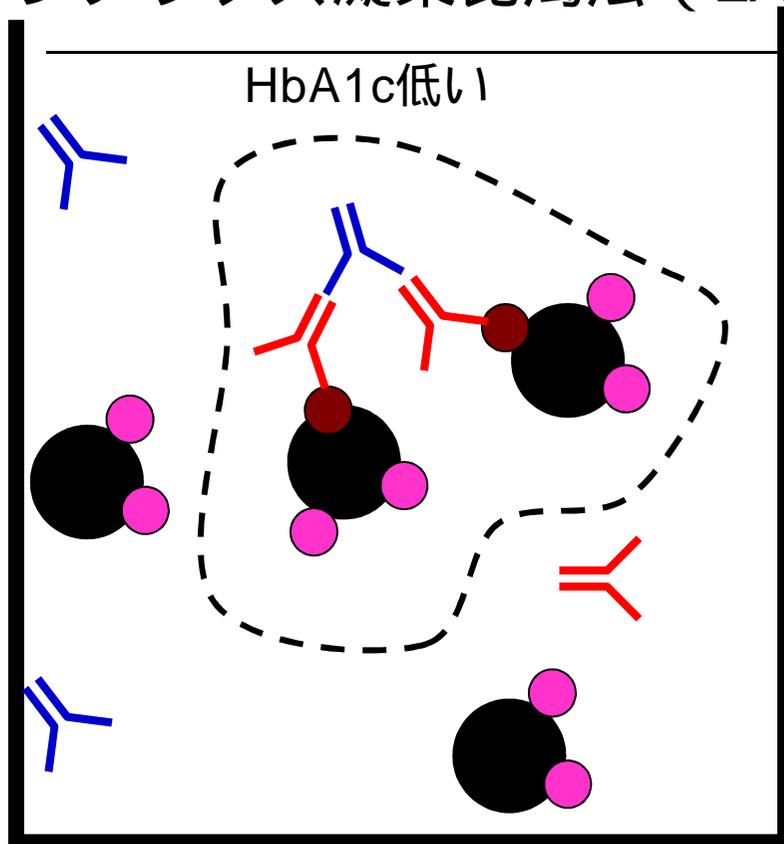
ラテックス凝集比濁法（LA）

HbA1cの量に応じて、ラテックス
の凝集塊が形成される



免疫測定法の原理1

ラテックス凝集比濁法 (LA)



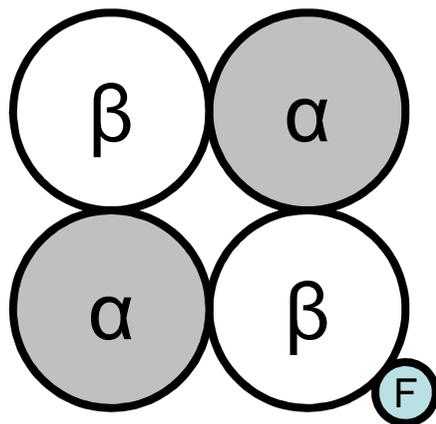
酵素法

酵素法の特長

- HPLC法、免疫法につづく次世代の測定法
- 2種類の酵素により、ヘモグロビンA1cの糖化部分を切り出して測定する。

ヘモグロビンA1c濃度測定

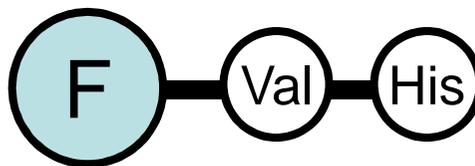
グリコヘモグロビン



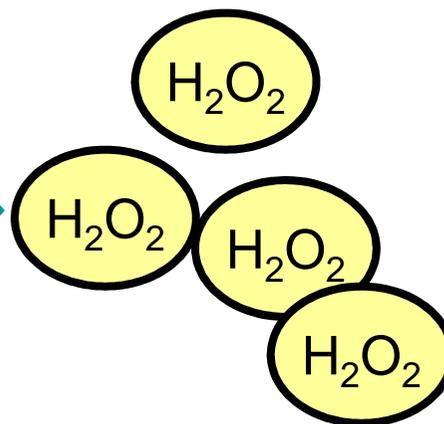
中性プロテアーゼ



糖化ペプチド

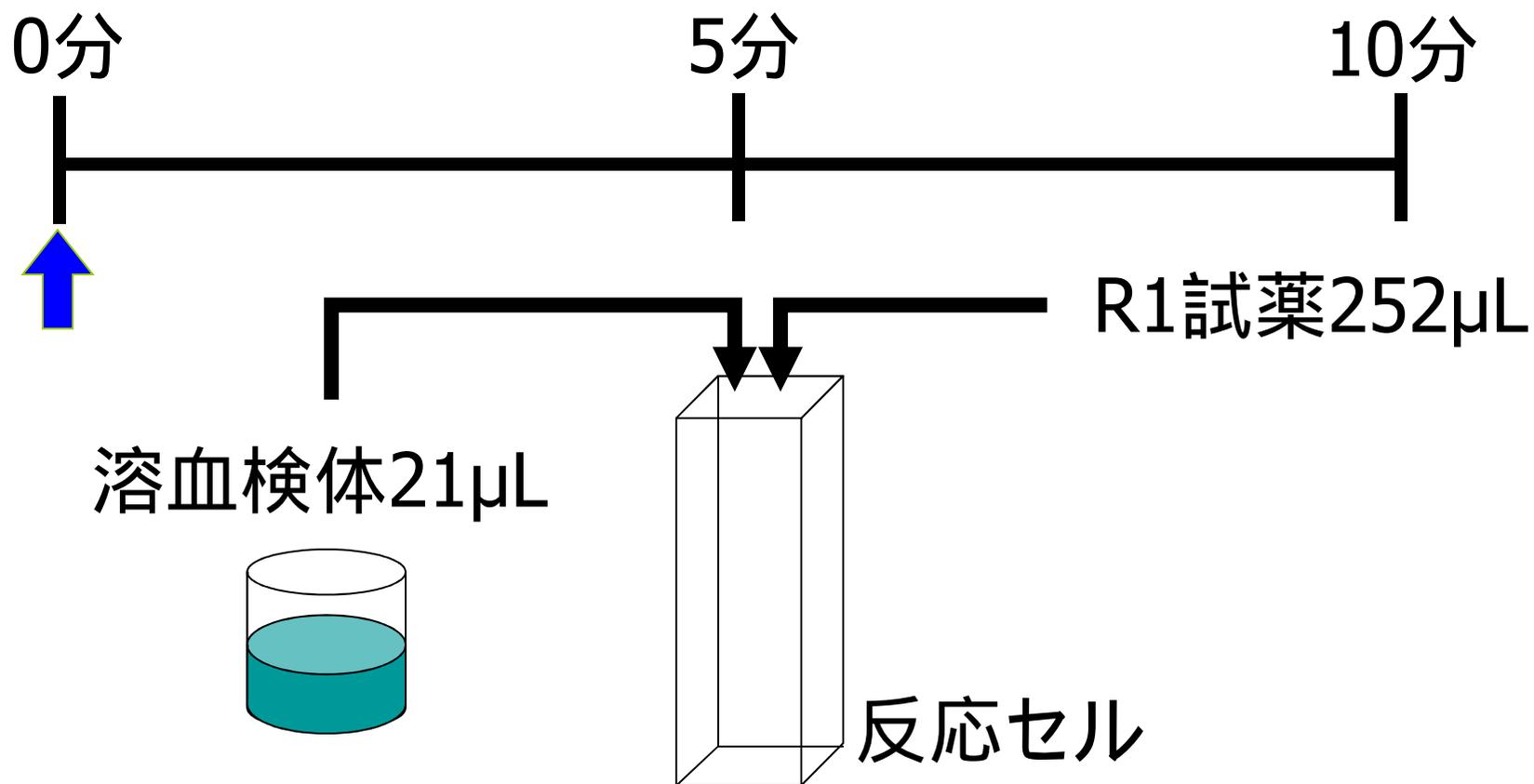


発色

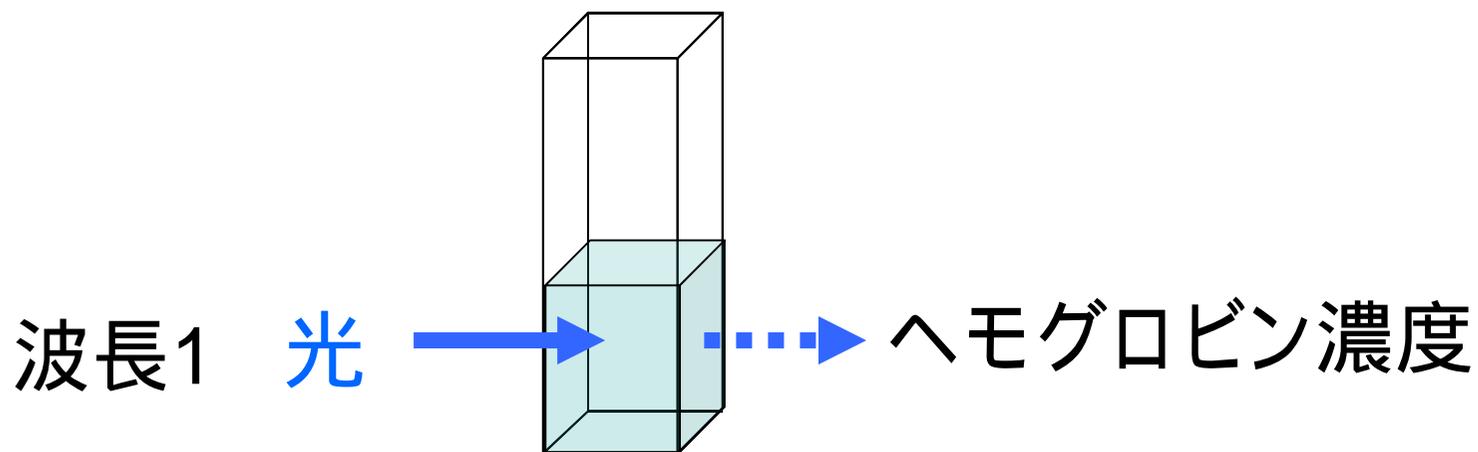
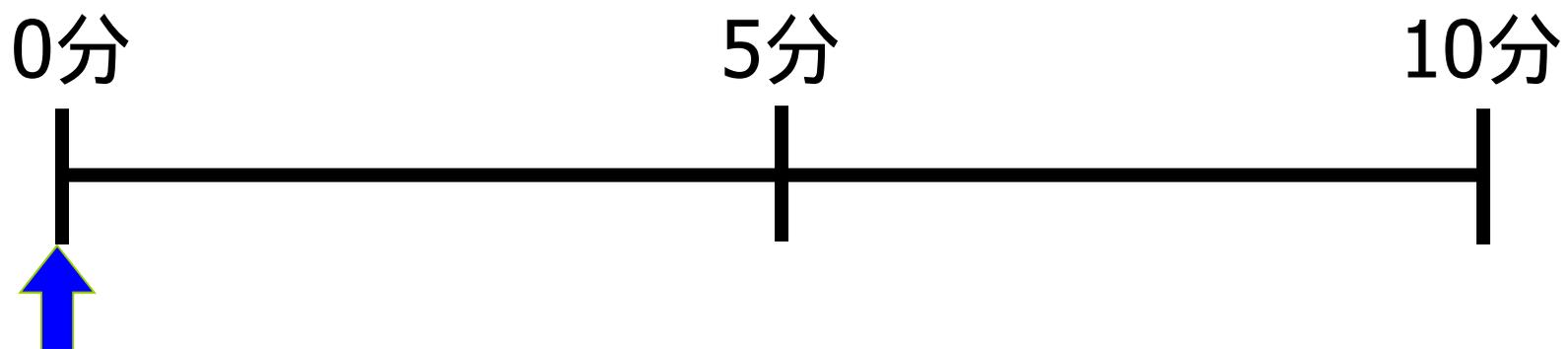


フルクトシル
ペプチドオキシダーゼ

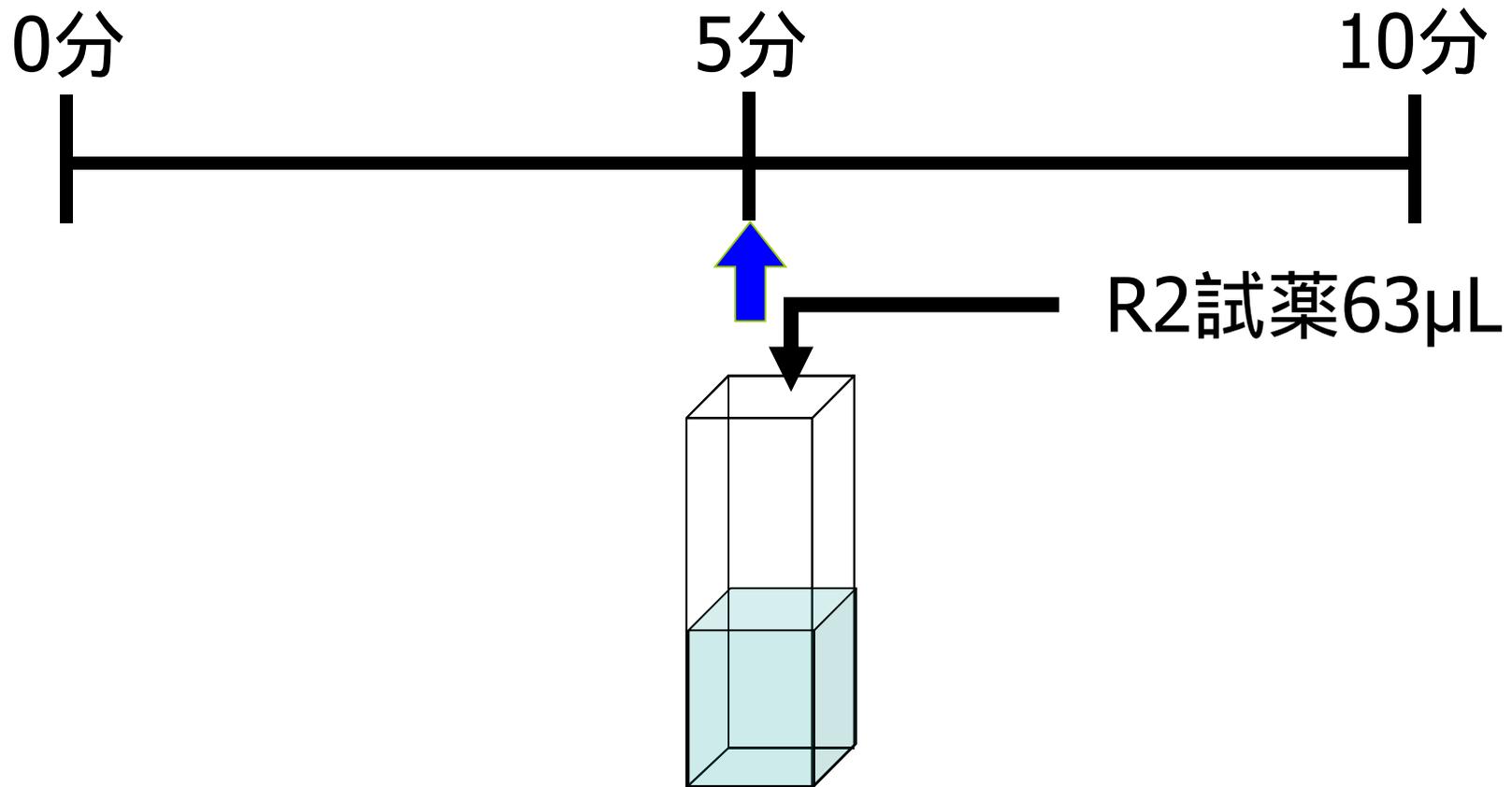
標準操作方法



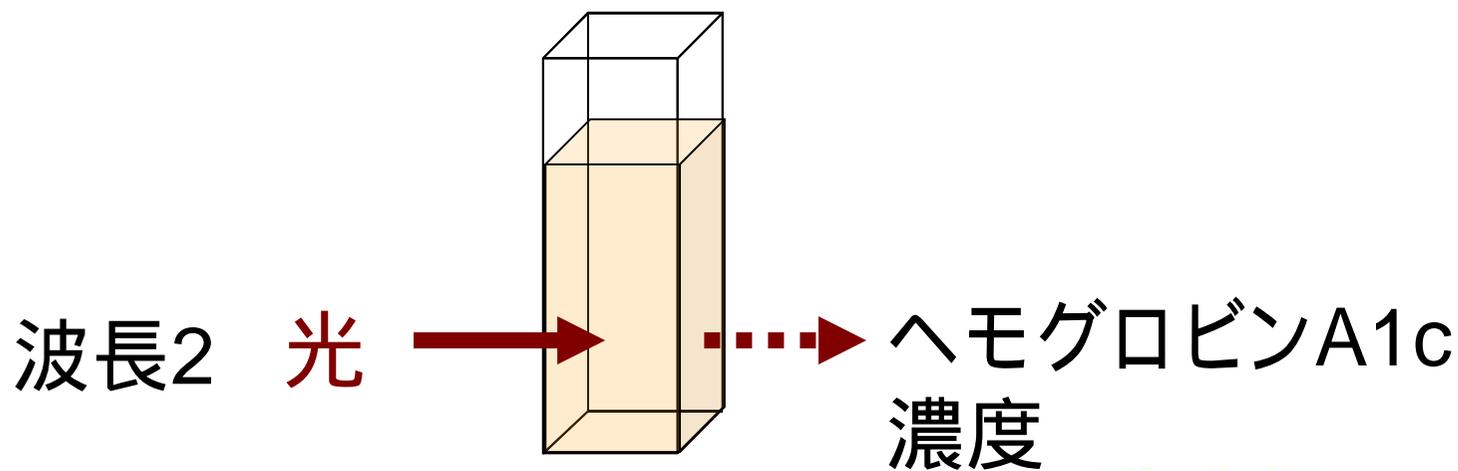
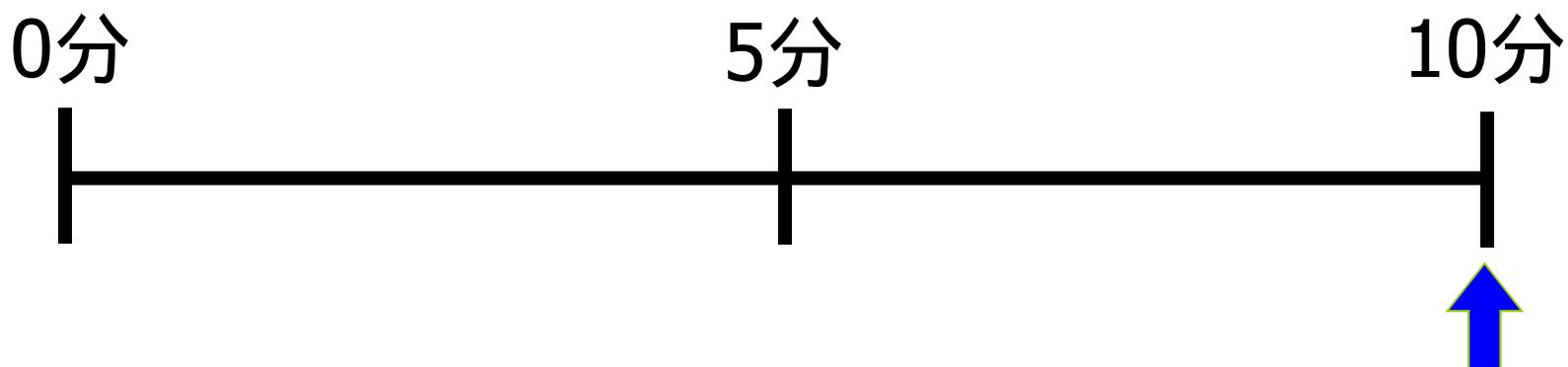
標準操作方法



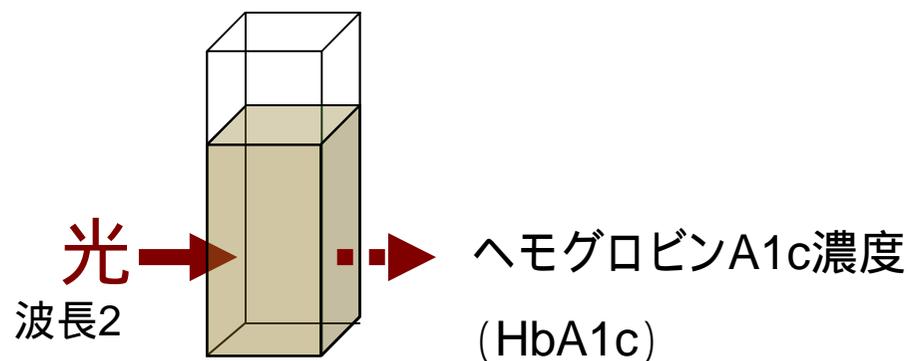
標準操作方法



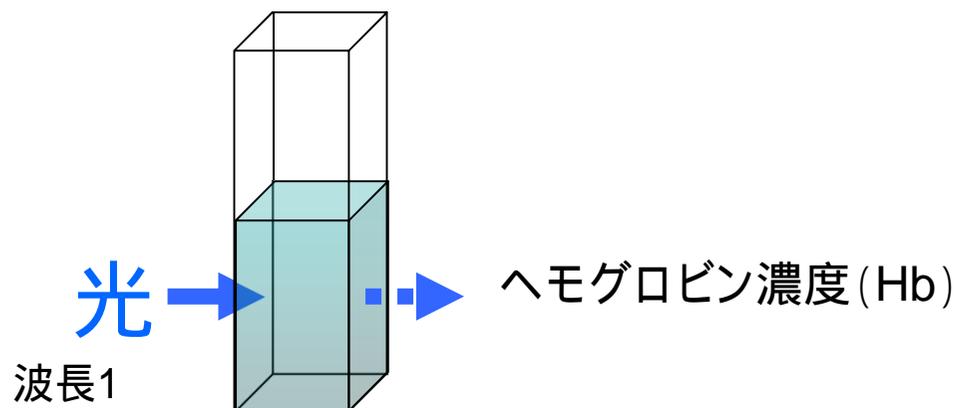
標準操作方法



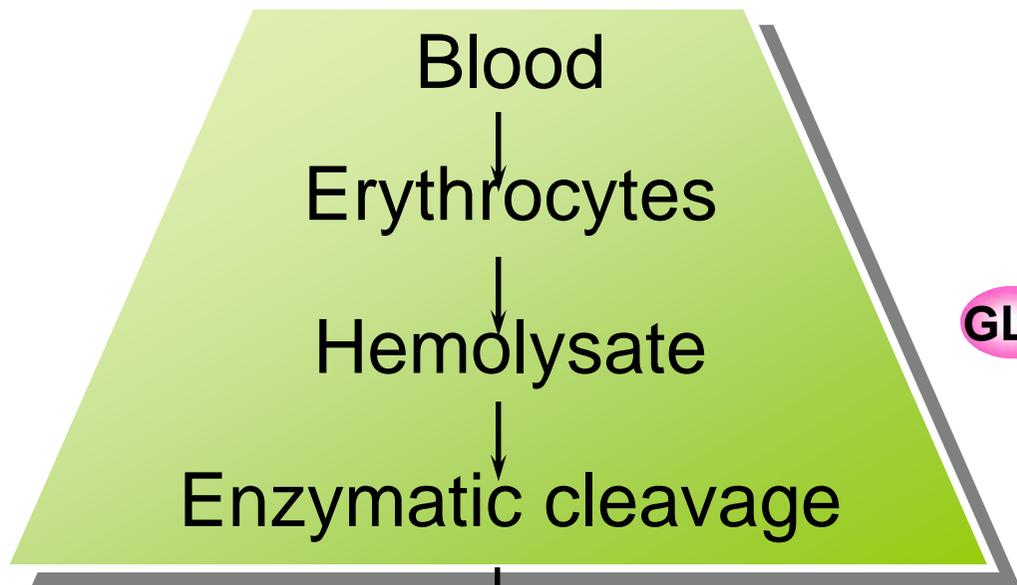
標準操作方法



$$= \text{HbA1c}(\%)$$



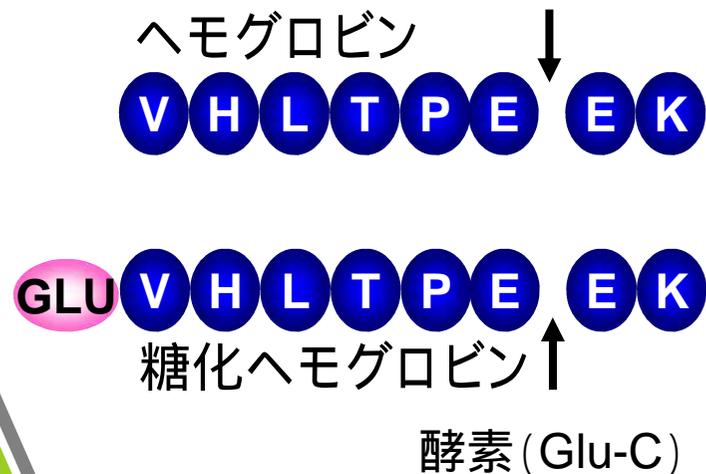
(参考) HbA1c測定(IFCC法) -基準測定法-



Quantify specific peptides

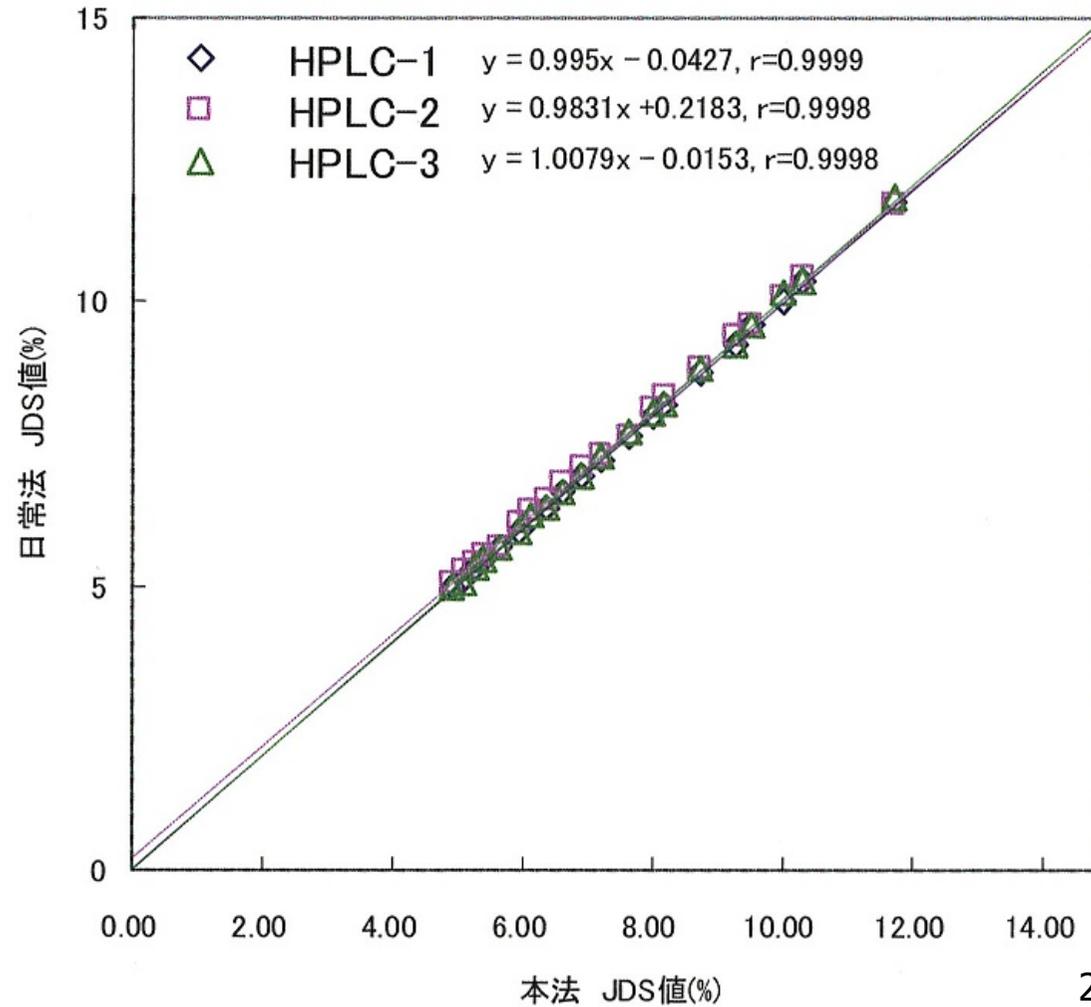
Method A
HPLC-Mass Spectrometry

Method B
HPLC-Capillary Electrophoresis



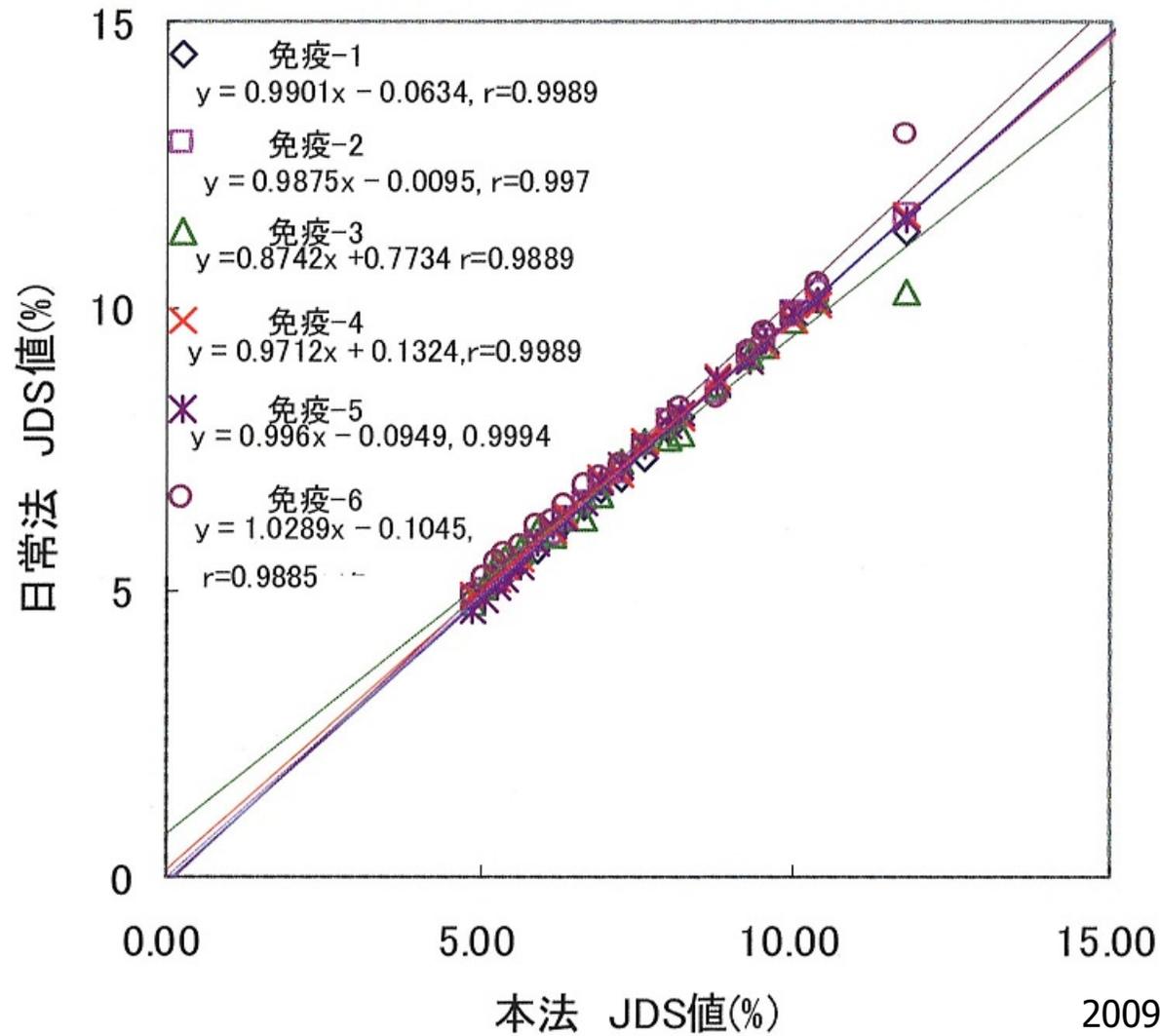
Clin Chem 1997;43:1944-1951

KO500法とHPLC法の相関



2009 筑波臨床化学セミナー

KO500法と免疫法の相関



2009 筑波臨床化学セミナー

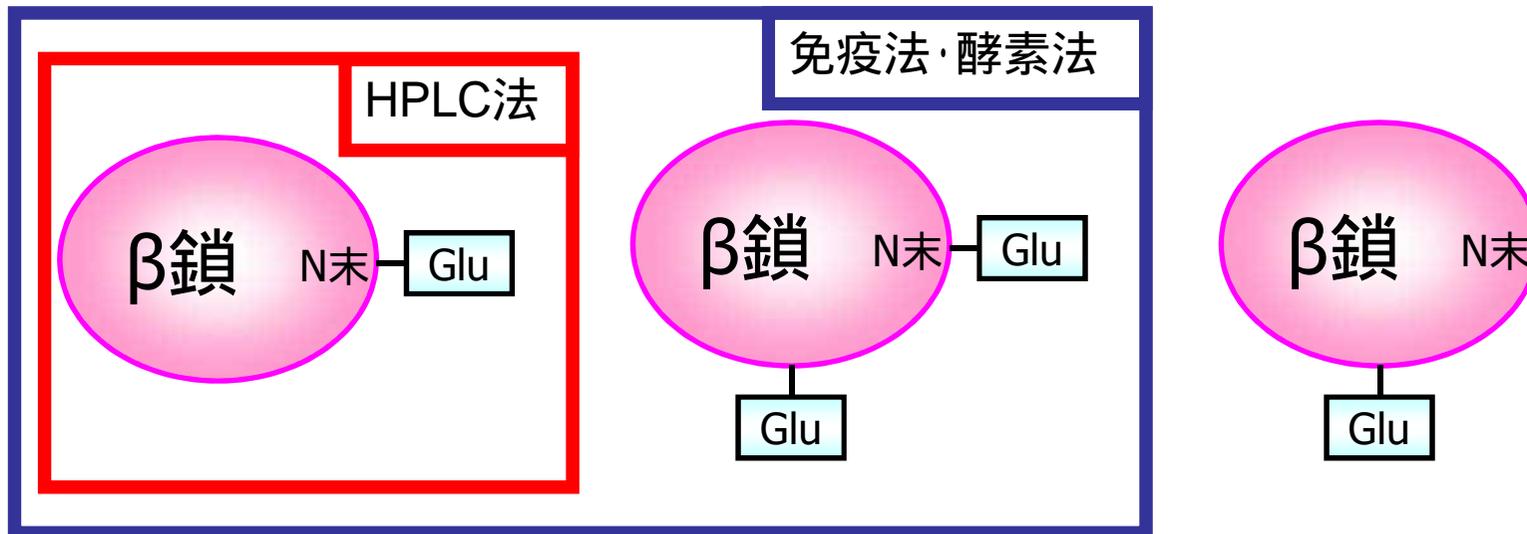
各測定法について

方法 特徴	HPLC法	免疫法	酵素法
	専用機	専用機 / 汎用自動分析装置	汎用自動分析装置
測定試料	全血・遠心後血球	遠心後血球	全血・遠心後血球
検体前処理	不要	試薬によって要	試薬によって要
測定時間	~ 45秒程度	反応時間10分	反応時間10分
処理検体数	~ 75 / hr	400 ~ / hr	400 ~ / hr
キャリブレーション	2点校正	5 ~ 6点校正	3点校正
血漿成分の影響	基本的に無	試薬によって有	試薬によって有
異常Hbの認識	可能	不可能	不可能
主なStudy	DCCT(米)、UKPDS(英)、 Kumamoto Study (日)	なし	なし

原理による測定値の乖離要因

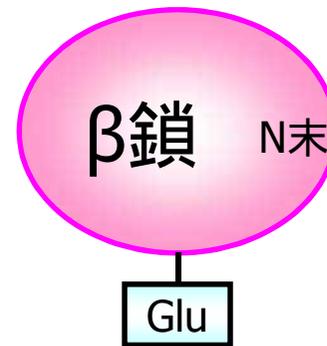
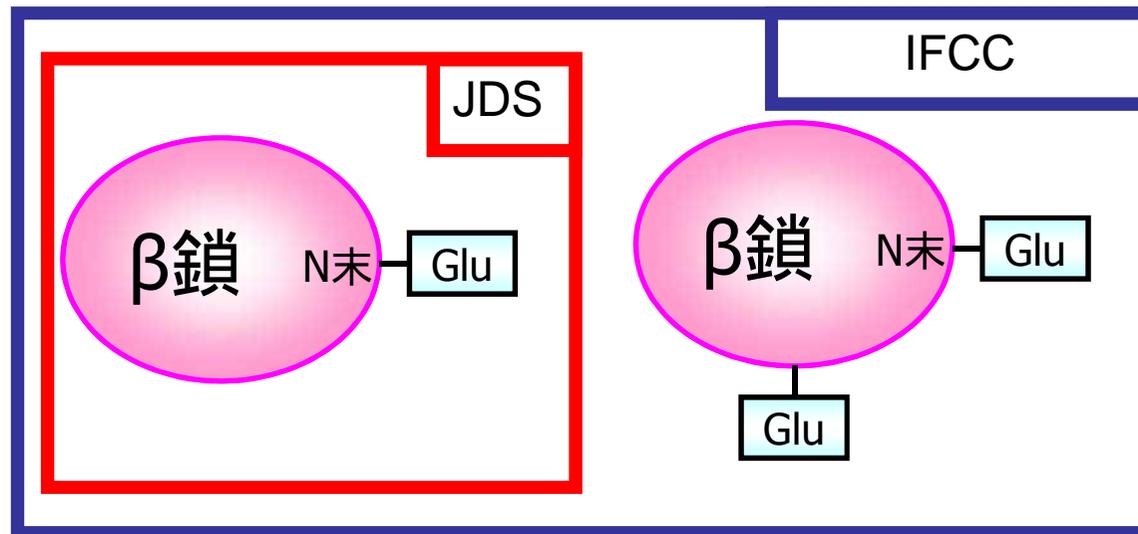
方法間差の原因として考えられる要因

- 標準物質と実検体の物性の違い
- 測定(認識)部位の差・装置の性能 など



標準化体系別のHbA1cの定義

- JDS: β 鎖のN末端バリンのアミノ基にのみグルコースが1個共有結合したヘモグロビン (β 1-mono-fructosyl hemoglobin)。
- IFCC: β 鎖のN末端バリンのアミノ基にグルコースが共有結合した全てのヘモグロビン (β 1- fructosyl hemoglobin)。



糖化HbA2の影響

HbA2は α 鎖と δ 鎖で形成されているが、 β 鎖と同様にN末端は糖化を受けると言われている。

δ 鎖のアミノ酸配列は8位のKまで β 鎖と同等であり、 β 鎖のV H L T P E E Kまでのペプチドを認識するHbA1c測定法ではHbA2量についても考慮する必要が考えられる。

臨床化学 vol.41 supp.1,223 : 2012

血漿成分の影響

それぞれの測定法において、血漿に含まれる成分の影響を受け、測定値が他法と乖離することが一般的に知られている。

HPLC法：カルバミル化等の修飾Hb影響

免疫法：血漿蛋白の影響

酵素法：高カロリー輸液等に含まれる糖化アミノ酸の影響

など。

それぞれの原理においてどのような成分の影響を受けるか把握して測定結果を判断する必要がある。