

原因不明の修飾ヘモグロビンのために HbA1c が偽高値を示した 1 例

島尻 佳典¹⁾ 與那嶺正人²⁾ 友寄 毅昭²⁾ 益崎 裕章²⁾
三家登喜夫³⁾ 原野 恵子⁴⁾ 和田 芳直⁵⁾ 古賀 正史⁶⁾

要約：修飾ヘモグロビン (Hb) のために HbA1c が偽高値を示した症例を経験したので報告する。症例は 72 歳男性。糖尿病精査を希望にて当院を受診。OGTT にて境界型、グリコアルブミンは 16.4 % であったが、HbA1c (HPLC 法) は 8.1 % と高値を示し、そのクロマトグラムで異常ピークを認めた。一方、免疫法、酵素法で測定した HbA1c は各々 2.8 %、4.0 % といずれも低値であった。高分離 HPLC (KO500) 法にて不安定 HbA1c 近傍および HbA と HbA1c の間に 2 つの異常ピークを認めたが、グロビン遺伝子 (α 鎖および β 鎖) に変異を認めなかった。高分離 HPLC で認めた 2 つの異常ピークを質量分析にて解析した結果、両分画はともに β グロビンに 88 Da の分子修飾を認めた。修飾分子の詳細は不明であるが、分子量から既知の修飾 Hb は該当せず、新規の修飾 Hb であった。HbA1c が偽高値を示す新たな原因の可能性がある。

Key words：HbA1c, 高分離 HPLC 法, 異常ヘモグロビン, 修飾ヘモグロビン, 質量分析
〔糖尿病 58(12)：915~922, 2015〕

緒言

HbA1c は血糖コントロールの指標として広く用いられ、近年では糖尿病の診断基準にも採用されて、増々重要な糖尿病検査となっている¹⁾。現在、HbA1c の測定は高速液体クロマトグラフィ (HPLC) 法を基本としているが、貧血を有する例や異常ヘモグロビン (Hb) では正しく測定できない場合がある²⁾。また、HPLC 法で測定した HbA1c が HPLC 法以外の方法で測定した HbA1c 値と異なる場合もあり、血糖値との関連については日常診療で十分注意を払う必要がある。

今回、HPLC 法で測定した HbA1c 値が血糖値と乖離していたことを契機に精査を行い、質量分析を用いて新規の修飾 Hb が原因と考えられる HbA1c 偽高値

の症例を経験したので報告する。

症例

72 歳、男性。他院で高血圧、狭心症で内服加療中 (カルシウム拮抗薬、アンジオテンシン II 受容体拮抗薬、 β 遮断薬、抗血小板薬、アスピリン製剤、ヒスタミン H2 受容体拮抗薬) であった。これまで貧血や糖尿病の指摘はなかった。2011 年 7 月、体のふらつきが出現し、母方の従兄に糖尿病の家族歴があるために糖尿病の精査を希望し当院を受診した。身長 161 cm、体重 41.5 kg、BMI 17.1 kg/m²、血圧 150/78 mmHg で、その他の身体所見にも異常は認めなかった。一般生化学検査、末梢血検査で明らかな異常を認めず、食後血糖は 122 mg/dl であった (Table 1)。後日、75 g ブドウ糖負

1) 島尻キンザー前クリニック (〒901-2126 沖縄県浦添市宮城 1-29-1)
2) 琉球大学大学院医学研究科内分泌代謝・血液・膠原病内科学講座 (〒903-0215 沖縄県中頭郡西原町字上原 207)
3) 社会医療法人生長会府中病院糖尿病研究所 (〒594-0076 大阪府和泉市肥子町 1-10-17)
4) 川崎医療福祉大学医療技術学部臨床栄養学科 (〒701-0193 岡山県倉敷市松島 288)
5) 大阪府立病院機構大阪府立母子保健総合医療センター (〒594-1101 大阪府和泉市室堂町 840)
6) 市立川西病院糖尿病・内分泌内科 (〒666-0195 兵庫県川西市東畦野 5-21-1)
連絡先：島尻佳典 (〒901-2126 沖縄県浦添市宮城 1-29-1 島尻キンザー前クリニック)

受付日：2015 年 6 月 18 日 / 採択日：2015 年 10 月 23 日

Table 1 初診時の検査成績

【生化学】		【末梢血】		【糖尿病関連検査】	
AST	15 IU/l	WBC	5,800 / μ l	食後血糖	122 mg/dl
ALT	6 IU/l	RBC	5.12×10^6 / μ l	HbA1c (HPLC 法)	8.1 %
γ -GTP	21 IU/l	Hb	16.4 g/dl	HbA1c (免疫法)	2.8 %
BUN	21.6 mg/dl	Ht	51.3 %	HbA1c (酵素法)	4.0 %
Cr	0.99 mg/dl	MCV	100.2 fl	グリコアルブミン (GA)	16.4 %
T-Chol	206 mg/dl	MCH	32.0 pg		
TG	72 mg/dl	MCHC	32.0 g/dl		
Na	139 mEq/l	PLT	25.0×10^4 / μ l		
K	3.5 mEq/l				
Cl	98 mEq/l				
【75 g OGTT】					
		Time (min)	PG (mg/dl)	IRI (μ U/ml)	
		0	82	1.2	
		30	161	9.7	
		60	168	20.2	
		120	142	18.3	

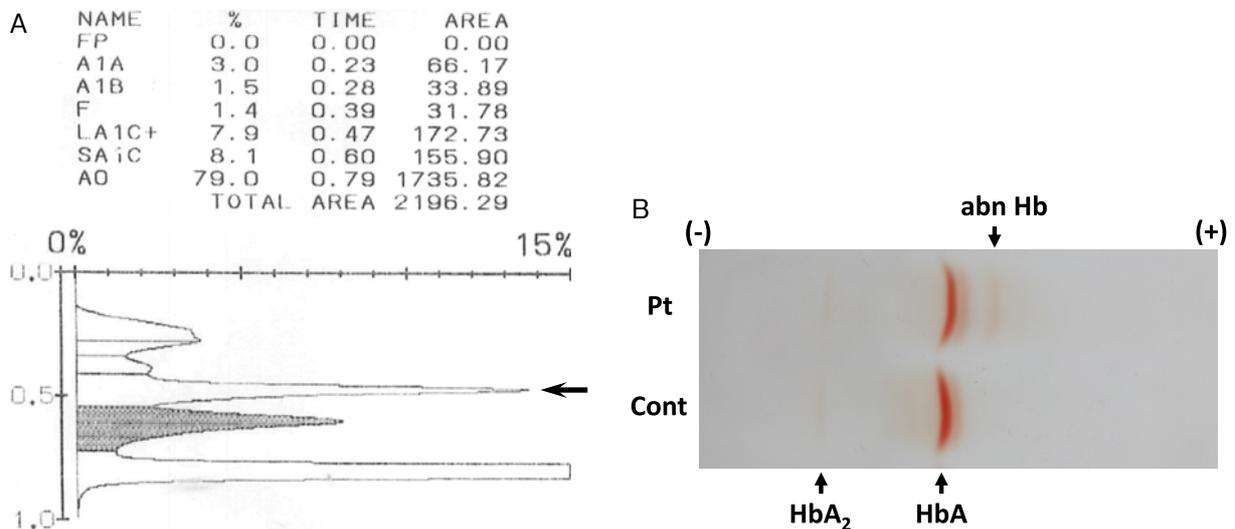


Fig. 1 HPLC 法 (G8, 東ソー社) による HbA1c 測定クロマトグラムと等電点電気泳動による Hb 解析. A) 矢印で示した部位に異常ピークを認めた. B) 患者検体 (Pt) の電気泳動解析で対照 (Cont) と同様に HbA および HbA2 を認めた以外に, HbA の陽極側に異常バンド (abn Hb) を認めた.

荷試験 (OGTT) を施行した結果, 境界型 (空腹時血糖 82 mg/dl, 2 時間血糖値 142 mg/dl) を呈した. この際, グリコアルブミン (GA) 値は 16.4 % (基準値: 11.6–16.4 %) と正常範囲であったが, HbA1c (HPLC 法: G8, 東ソー社, 東京) は 8.1 % と高値を示した. また, クロマトグラムで不安定 HbA1c (LA1c) および修飾 Hb の泳動部位 (LA1c+) に異常ピークを認め, LA1c+ は 7.9 % と著明高値を示した (基準値: 1.5–2.9 %) (Fig. 1A). 一方, 免疫法および酵素法で測定した HbA1c は各々 2.8 %, 4.0 % といずれも低値であり, いずれの方法で測定した HbA1c はともに OGTT の結果と乖離していた.

以上の検査結果より異常 Hb が疑われたため, 等電点電気泳動を用いて Hb 解析を行ったところ, HbA より陽極側に異常バンドが検出された (Fig. 1B). しか

し, 直接シーケンス法にて遺伝子解析を施行するもグロビン遺伝子 (α 鎖および β 鎖) に変異を認めず, 異常 Hb は否定された. なお, グロビン遺伝子の解析に際しては患者に解析の意義および方法を十分説明した上, 文書による承諾を得るとともに, 当院の倫理委員会の審査および承認を得た (承認番号 2015-01). 次に, HbA1c の定量可能な高分離 HPLC (KO500) 法³⁾を行ったところ, 対照には認められない LA1c 近傍および HbA (A0) と HbA1c (A1c) の間の 2 ヶ所に異常ピークを認めた (各々を未知ピーク 1, 未知ピーク 2 と称する) (Fig. 2). HbA1c 分画は 3.4 % と低値で, 未知ピーク 1 および未知ピーク 2 の値は各々 7.5 %, 6.7 % であった.

次に, 未知ピークの性状を明らかにする目的で質量分析を行った. 等電点電気泳動で認めた異常バンドを

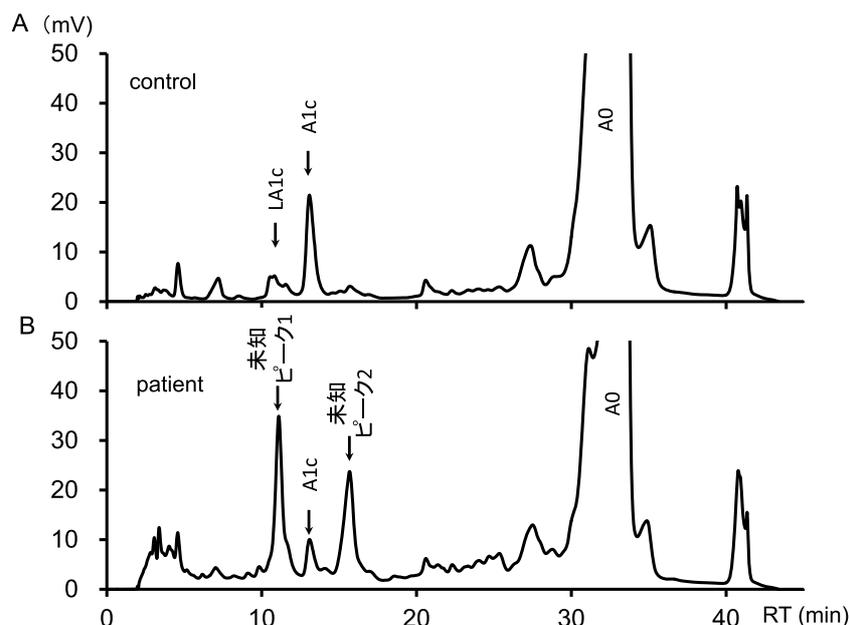


Fig. 2 高分離 HPLC (KO500) のクロマトグラム. 患者検体 (B) では HbA (A0) および HbA1c (A1c) 以外に対照 (A) では見られない 2 つの未知のピーク (未知ピーク 1 および未知ピーク 2) が不安定 HbA1c (LA1c) 近傍および A0 と A1c の間に認められた.

採取し、グロビンを抽出し、還元カルボキサミドメチル化の後、endoproteinase AspN で消化し、マトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間型質量分析 (MALDI-TOF-MS) (Fig. 3A) およびナノエレクトロスプレーイオン化タンデム質量分析 (nanoESI-MS/MS) (Fig. 3B) を行った^{4,5)}。その結果、 β グロビンの 82 番目のリジンに 88 Da の修飾があることが同定された。高分離 HPLC で認めた 2 つの異常ピークについても、高分離 HPLC で得られた未知ピーク 1 および未知ピーク 2 を分画採取し、ナノエレクトロスプレーイオン化飛行時間型質量分析 (nanoESI-TOF-MS) を行ったところ、両分画とも β グロビンに 88 Da の分子修飾があることが同定された (Fig. 4)。

考 察

HbA1c は Hb の安定な糖化産物で中長期の血糖コントロールを反映する。その測定は HPLC 法をゴールドスタンダードにしているが、最近では多くの施設では免疫法や酵素法で HbA1c の測定が行われている。平成 25 年度に 357 医療施設を対象に行った全国衛生団体連合会の調査報告⁶⁾によると、自施設での測定 (157 施設) の場合は 60.1 % が HPLC 法による測定であったが、外部機関委託による測定 (200 施設) では 63.1 % が免疫法であり、HPLC 法による測定は 5.9 % に留まっていた。全医療施設で見ても免疫法が 47.4 %、HPLC 法が 30.3 %、酵素法が 22.4 % であり、既に免疫法が

HPCL 法を凌ぎ、酵素法もこれに迫っていた。それぞれの方法は高分離 HPLC (KO500) を用いて精度管理⁹⁾を行っており、通常の患者検体はいずれの方法で測定した HbA1c でも同様の値が得られる。一方、異常 Hb 検体は HPLC 法とその他の方法で測定した HbA1c は乖離が認められる^{7,8)}。これらのことより HbA1c が血糖と乖離が疑われた際には HbA1c の測定方法にも留意する必要がある。特に、他施設からの紹介や健康診断結果を持参する患者の多い医療機関では自施設で測定した HbA1c と他施設で測定された HbA1c との乖離にも注意を払う必要がある。

HPLC 法で HbA1c を測定した場合、正しく血糖コントロール状態を反映しない場合がある反面、溶出パターンから異常 Hb の存在が推測できるという利点がある。近年、無症候性の異常 Hb が多く報告されており^{7,9)}、これについては日常検査用 HPLC 法によるルーチンの HbA1c 測定が大きく寄与していると考えられる。我々の症例において、HPLC 法による HbA1c 値は OGTT の結果 (境界型) と乖離して高値であった。HbA1c を種々の方法で測定するとそれぞれ異なる値を示し、これらの乖離は異常 Hb の存在を示唆するものでもあった⁸⁾。さらに、本例を高分離 HPLC にて解析したところ、対照検体には認められない 2 つの異常ピークを認めるとともに、高分離 HPLC で測定した HbA1c 分画は 3.4 % と低値を示した。高分離 HPLC で HbA1c より泳動の遅い未知ピーク 2 が存在したこ

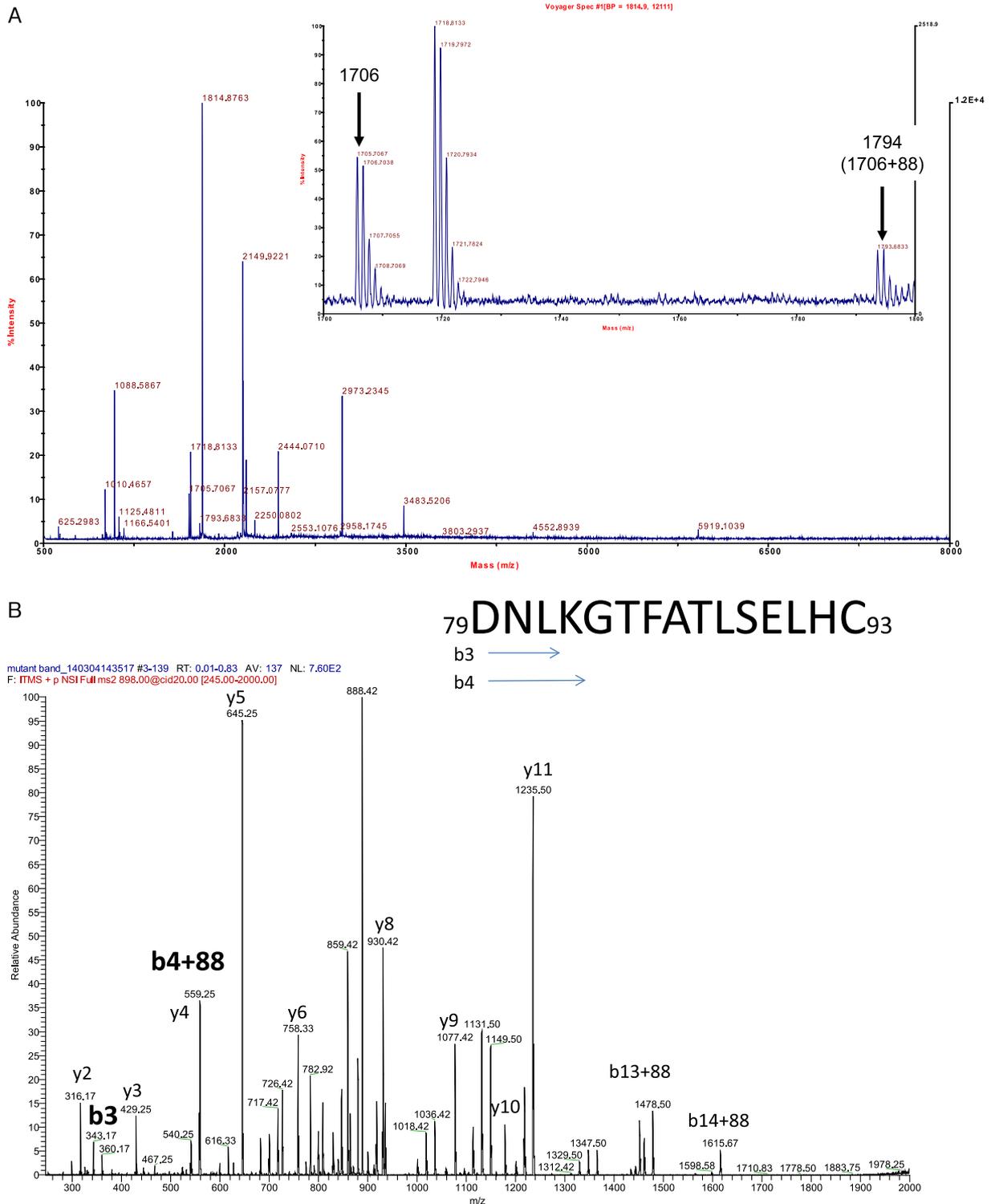


Fig. 3 等電点電気泳動法で認められた異常ピークの質量分析. A) マトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間型質量分析法 (Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry ; MALDI-TOF MS) で m/z 1794 に m/z 1706 のペプチド (β 79-93) より 88 Da 大きいシグナルが認められた. B) m/z 1794 の 2 価イオンをプリカーサーとしてナノエレクトロスプレーイオン化質量分析法 (nanoESI-MS/MS 分析) を行い, β 82 リジンに 88 Da の分子修飾があることを同定した.

とより, HbA1c 測定用 HPLC (G8) で測定した HbA1c が 8.1 % と高値を示したのは, このピークの一部が HbA1c として測定されたものと思われた. また, 等電

点電気泳動で異常バンドが検出され, 異常ヘモグロビンが強く疑われたため遺伝子解析を施行した. しかしながら, グロビン遺伝子異常は見出せず, アミノ酸置

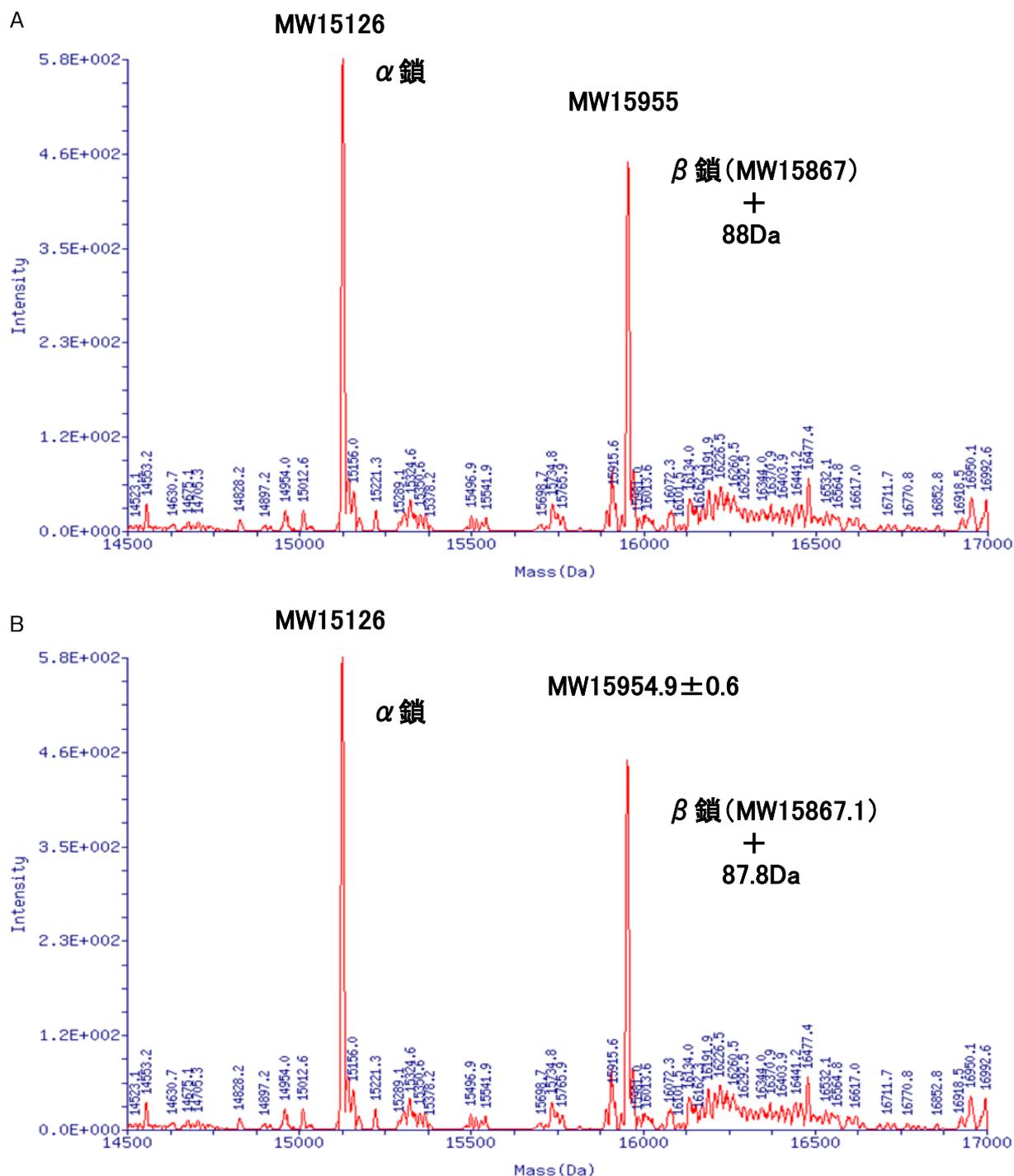


Fig. 4 未知ピークのナノエレクトロスプレーイオン化飛行時間型質量分析法 (nanoESI-TOF-MS 分析). 高分離 HPLC 法にて得られた未知ピークを nanoESI-TOF-MS 分析により解析した. 未知ピーク 1 (A) および未知ピーク 2 (B) ともに正常 β 鎖の分子量 (15,867) より 88 Da 分子量の大きい修飾 Hb (分子量: 15,955) を認めた.

換を伴った異常 Hb の可能性は否定された.

このため質量分析にて Hb の解析を行ったところ, 未知の修飾 Hb の存在が明らかとなった. ともに β 鎖より 88 Da 質量の大きい分子であったため同じ構造物である可能性が示唆された. 既知の修飾 Hb であるアセチル化 Hb, アセトアルデヒド化 Hb, カルバミル

化 Hb は不安定 HbA1c と同様の部位 (LA1c+) に泳動することが知られている. 未知ピーク 1 は HPLC (G8) あるいは高分離 HPLC で既知の修飾 Hb と同様の泳動部位であったが, これらとは分子量が異なるために未知の修飾 Hb と考えられた. 一方, 未知ピーク 2 は既知の修飾 Hb とは分子量も泳動部位も異なって

いた。両者は同じ分子修飾を受けていると思われるが、HPLC 上の移動度が異なっていた。この原因は不明であるが、未知の修飾 Hb における荷電状態の違いによる可能性が示唆された。

本症例の鑑別を進める上で質量分析の役割が大きかった。質量分析は化合物を分子や原子レベルで解析することができる¹⁰⁾。現在、質量分析計は種々開発されており、臨床分野では新生児の先天性代謝異常症のマス・スクリーニング、病原微生物菌の同定、医薬品の治療薬物モニタリングなどに応用されている。また、グルコースの 1 分子の糖化も見逃すことなく計算上測定できるため、HbA1c の測定に関して最も真の値に近い測定が可能なのは質量分析法であるとされている^{3,11)}。異常 Hb についてもその利用が報告されており^{5,11,12)}、Hb の質の異常が原因の HbA1c と血糖値との乖離を説明するツールとして近い将来確定診断に用いられる可能性について期待したい。

グロビン遺伝子に異常を認めず、非糖尿病であるため HbA1c は基準範囲を示すと思われたが、本例の HbA1c を免疫法、酵素法および高分離 HPLC 法で測定した値はいずれも低値を示した。本例の HbA1c が低値を示す原因は不明であるが、本例で認められた修飾 Hb が HbA1c 低値に関与しているのかもしれない。例えばアスピリン服用で生成されるアセチル化 Hb は、HbA1c 及び GA の生成を抑制し、血中の HbA1c や GA が低値を示すことが報告されている^{13,14)}。また、Hb 分子の糖化部位は、 β Val-1 (60%)、 α Val-1 (4%)、 β Lys-17, 20, 66 (合わせて 18%)、 α Lys-7, 16 (合わせて 18%) と言われている。その内、 β 鎖 1 位の Val が最も糖化される頻度が高い部位である。HPLC 法 (KO500 および HbA1c 測定用 HPLC) は β Val-1 が糖化されたものを一つのピークとして溶出している。また、免疫法は β Val-1 が糖化されたものに対する抗体で測定している。酵素法も β Val-1 を含む 2 個のアミノ酸を切り出し、グルコースと 2 個のアミノ酸に対して特異的に反応する酵素で発色させて測定しているため、これも β Val-1 の糖化物を測定している。本例において KO500 法、免疫法、酵素法で測定した HbA1c は各々 3.4%、2.8%、4.0% といずれも低値であったことより、本例では β Val-1 への糖化が修飾 Hb のために阻害されている可能性が考えられる。修飾物質などを明らかにすることにより、Hb の糖化のメカニズム (特に β Val-1) が明らかになる可能性が示唆される。しかし、本例の修飾 Hb の分子性状が不明のため、今後本例の修飾 Hb の詳細を明らかにする必要がある。

HbA1c が偽性低値を示す疾患は多数存在するが、偽高値を示す疾患はそれほど多くはない。その中で、pure red cell aplasia¹⁵⁾、鉄欠乏状態^{16,17)}、異常 Hb^{18,19)}な

どが知られている。今回の例のように未知の修飾 Hb のために HbA1c が高値を示す例は初めての報告と考えられる。糖尿病の診断を HbA1c のみで行うとこれらの疾患を有する例に対して糖尿病と誤診する恐れがある²⁰⁾。糖尿病と診断するには必ず血糖が高値であることを確認する必要がある²¹⁾。また、HbA1c が偽高値を示す糖尿病患者において、HbA1c で血糖コントロールを判断すると、過剰な糖尿病治療によって低血糖をきたす恐れがある。HbA1c を過信せずに、常に HbA1c が正しく血糖コントロールを反映しているかを考えなければならない。もし、HbA1c と血糖との乖離が疑われれば、他の血糖コントロール指標である GA や、1,5-AG などの測定を行う必要がある。

今回、我々は未知の修飾 Hb のために HbA1c が偽高値を呈した 1 例を経験した。我々が調べた限りこれまで同様の報告はなく、初めての報告と考えられる。

著者の COI (conflicts of interest) 開示：特になし

文 献

- 1) The International Expert Committee (2009) International Expert Committee Report on the role of the A1C Assay in the diagnosis of diabetes. *Diabetes Care* 32: 1327-1334
- 2) Koga M (2014) 1,5-anhydroglucitol and glycosylated albumin in glycemia. *Adv Clin Chem* 64: 269-301
- 3) 武井 泉, 岡林美貴子, 桑 克彦, 菱沼義寛, 星野忠夫, 谷 渉, 梅本雅夫, 宮下徹夫, 石橋みどり, 富永真琴, 中山年正, 三家登喜夫, 五十嵐雅彦, 高加国夫, 渥美義仁, 雨宮 伸, 須郷秋恵, 永峰康孝 (2009) HbA1c 測定のための JSCC/JDS 基準操作手順書 (Ver.2.6 : 2009-03-06). *臨床化学* 38 : 163-176
- 4) Nakano T, Wada Y (2000) Hemoglobin Tokyo II [α 89 (FG1) His \rightarrow Asn]: A new hemoglobin variant characterized by endoproteinase Asp-N digestion and collision-induced dissociation. *J Mass Spectrom Soc Jpn* 48: 341-345
- 5) Wada Y (2002) Advanced analytical methods for hemoglobin variants. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 781: 291-301
- 6) 公益社団法人全国労働衛生団体連合会総合精度管理委員会臨床検査専門委員会 (2014) 平成 25 年度 (第 22 回) 臨床検査精度管理調査結果報告書
- 7) Miyazaki A, Kohzuma T, Kasayama S, Koga M (2012) Classification of variant forms of haemoglobin according to the ratio of glycosylated haemoglobin to glycosylated albumin. *Ann Clin Biochem* 49: 441-444
- 8) 古賀正史, 村井 潤, 曾我純子, 斉藤 博 (2013) 人間

- ドック受診時に HbA_{1c} の異常低値を契機に発見した異常ヘモグロビン 5 例の解析. 糖尿病 56 : 841-848
- 9) Bry L, Chen PC, Sacks DB (2001) Effects of hemoglobin variants and chemically modified derivatives on assays for glycohemoglobin. *Clin Chem* 47: 153-163
 - 10) 滝埜昌彦 (2013) 臨床検査への質量分析の応用—質量分析計の臨床応用での機器開発の現状. *臨床病理* 61 : 805-815
 - 11) Shimizu A, Nakanishi T, Miyazaki A (2006) Detection and characterization of variant and modified structures of proteins in blood and tissues by mass spectrometry. *Mass Spectrom Rev* 25: 686-712
 - 12) Griffin M, Eyre J, Dack S, Wright J (2015) Mass spectrometric analysis of unknown haemoglobin fractions identified by high-performance liquid chromatography in an antenatal screening programme. *J Clin Pathol* 68: 388-390
 - 13) Nathan DM, Francis TB, Palmer JL (1983) Effect of aspirin on determinations of glycosylated hemoglobin. *Clin Chem* 29: 466-469
 - 14) Rendell M, Nierenberg J, Brannan C, Valentine JL, Stephen PM, Dodds S, Mercer P, Smith PK, Walder J (1986) Inhibition of glycation of albumin and hemoglobin by acetylation in vitro and in vivo. *J Lab Clin Med* 108: 286-293
 - 15) Okawa T, Tsunekawa S, Seino Y, Hamada Y, Oiso Y (2013) Deceptive HbA_{1c} in a patient with pure red cell aplasia. *Lancet* 382: 366
 - 16) Coban E, Ozdogan M, Timuragaoglu A (2004) Effect of iron deficiency anemia on the levels of hemoglobin A_{1c} in nondiabetic patients. *Acta Haematol* 112: 126-128
 - 17) Koga M, Morita S, Saito H, Mukai M, Kasayama S (2007) Association of erythrocyte indices with glycosylated haemoglobin in pre-menopausal women. *Diabetic Med* 24: 843-847
 - 18) Ohba Y, Miyaji T, Murakami M, Kadowaki S, Fujita T, Oimomi M, Hatanaka H, Ishikawa K, Baba S, Hitaka K, Imai K (1986) Hb Himeji or beta 140 (H18) Ala→Asp a slightly unstable hemoglobin with increased beta N-terminal glycation. *Hemoglobin* 10: 109-125
 - 19) Ijima H, Jinnouchi H, Hamaguchi K, Ohguni S, Haga Y, Nagashima M, Miyazaki A, Koga M (2011) Cases with Hb Toranomom show abnormal HbA_{1c} levels measured by upgraded high-performance liquid chromatography models. *Diabetol Int* 2: 202-207
 - 20) 清水彩洋子, 平良暁子, 畑崎聖弘, 馬屋原豊, 平良真人, 古賀正史 (2015) HbA_{1c} が偽性高値を示したために経口血糖降下薬の投与を受けた非糖尿病異常ヘモグロビンの 2 例. 糖尿病 58 : 121-127
 - 21) Committee of the Japan Diabetes Society on the Diagnostic Criteria of Diabetes Mellitus (2010) Report of the committee on the classification and diagnostic criteria of diabetes mellitus. *J Diabetes Invest* 1: 212-228

— Abstract —

A Case With Falsely Elevated HbA1c Concentration Caused by Unknown Modified Hemoglobin

Yoshinori Shimajiri¹⁾, Masato Yonamine²⁾, Takeaki Tomoyose²⁾, Hiroaki Masuzaki²⁾,
Tokio Sanke³⁾, Keiko Harano⁴⁾, Yoshinao Wada⁵⁾ and Masafumi Koga⁶⁾

¹⁾Shimajiri Kinsermae Diabetes Care Clinic

²⁾Division of Endocrinology, Diabetes and Metabolism, Hematology, Rheumatology,
Second Department of Internal Medicine, Graduate School of Medicine, University of the Ryukyus

³⁾Institute for Diabetes, Fuchu Hospital, Seichokai Social Medical Corporation

⁴⁾Department of Clinical Nutrition, Faculty of Medical Health Science and Technology,
Kawasaki University of Medical Welfare

⁵⁾Osaka Medical Center and Research Institute for Maternal and Child Health

⁶⁾Department of Internal Medicine, Kawanishi City Hospital

We herein describe a case with a falsely high HbA1c level due to modified hemoglobin. A 72-year-old man visited our clinic to evaluate his diabetes status. Although an OGTT revealed impaired glucose tolerance and a glycosylated albumin level of 16.4 %, the HbA1c value measured by high-performance liquid chromatography (HPLC) was high (8.1 %) and an abnormal peak on its chromatogram was observed. On the other hand, the HbA1c values measured by an immunoassay and enzyme assay were 2.4 % and 4.0 %, respectively. An analysis by high-resolution HPLC (KO500) showed two abnormal peaks at near labile HbA1c and between HbA and HbA1c. However, an analysis of the globin gene including α -chain and β -chain showed no mutation. The two abnormal peaks observed in KO500 were analyzed using mass spectrometry. Consequently, both were revealed to be β -globin with a modified molecule of 88 Da. Although the nature of this molecule is unknown, it differs from known modified hemoglobin due to its molecular weight. This may be a new condition with a falsely high HbA1c level.

J. Japan Diab. Soc. 58(12): 915–922, 2015
