

日本糖尿病学会糖尿病関連検査の標準化に関する委員会

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

桑 克彦¹⁾ 岡橋美貴子²⁾ 佐藤 麻子³⁾ 難波 光義⁴⁾
前田 士郎⁵⁾ 村上 正巳⁶⁾ 目黒 周⁷⁾ 西尾 善彦⁸⁾

要約：HbA1c の測定を外部の検査機関に委託した場合、測定値が低値になることがある。その理由として、全血の検体を冷蔵で搬送、保存した場合に、老化した赤血球ほど溶血しやすいことが挙げられる。全血の検体を長時間にわたって冷蔵保存した後に採血管を遠心し、その赤血球層を用いて HbA1c を測定する方法 (HPLC 法の一部、免疫法の一部および酵素法の一部) では、溶血の影響を受けにくい EDTA 採血管を使用することが推奨され、血糖検査用の NaF 入り採血管の使用は望ましくない。

Key words：HbA1c, 臨床検査

[糖尿病 64(5)：336～339, 2021]

1. 保存検体を遠心処理後に測定する HbA1c 測定法での採血管の推奨

「フッ化ナトリウム入り採血管で採血した健診検体を外部委託で測定した結果、低値になることがあり、その原因として溶血による影響が推定された。用いた測定法は、全血検体を遠心し、赤血球層からサンプリングする方式によるものである。」との報告があった¹⁾。

冷蔵保存 (搬送中も含む) した全血検体を遠心し、赤血球層からサンプリングする測定法では、検体の著しい溶血 (Hb 0.5 g/dL 以上) がある場合、測定値が低値になることがある。

この問題に対する改善策として、以下の採血管の使

用を推奨する。

1) 採血管の変更

血糖検査用の NaF 入り採血管は用いず、EDTA 採血管を用いる。

なお、遠心条件 (相対遠心力 (g) と遠心時間) は、用いる測定法の操作手順に従う。

2) 確認事項

採血管を遠心処理した後、血漿層を目視などにより、著しい溶血がない (Hb 0.5 g/dL 以下) ことを確認してから測定する。著しい溶血がある (Hb 0.5 g/dL 以上) 検体の場合は参考値とする。

なお、検体の梱包や搬送中に、保冷剤で検体が凍結しないように注意すること。

1) 一般社団法人臨床検査基準測定機構 (〒243-0813 神奈川県厚木市妻田東 2-10-6)

2) 特定非営利活動法人病態解析研究所 (〒243-0813 神奈川県厚木市妻田東 2-10-6)

3) 東京女子医科大学臨床検査科 (〒162-8666 東京都新宿区河田町 8-1)

4) 宝塚市立病院 (〒665-0827 兵庫県宝塚市小浜 4 丁目 5-1)

5) 琉球大学大学院医学研究科先進ゲノム検査医学講座 (〒903-0215 沖縄県中頭郡西原町字上原 207 番地)

6) 群馬大学大学院医学系研究科臨床検査医学 (〒371-8511 群馬県前橋市昭和町三丁目 39-22)

7) 慶應義塾大学腎臓内分泌代謝内科 (〒160-8582 東京都新宿区信濃町 35)

8) 鹿児島大学大学院医歯学総合研究科糖尿病・内分泌内科学 (〒890-8520 鹿児島県鹿児島市桜ヶ丘 8 丁目 35-1)

連絡先：西尾善彦 (〒890-8520 鹿児島県鹿児島市桜ヶ丘 8 丁目 35-1 鹿児島大学大学院医歯学総合研究科糖尿病・内分泌内科学)

受付日：2020 年 6 月 4 日 / 採択日：2021 年 3 月 10 日

HbA1c 測定での採血管の取扱い

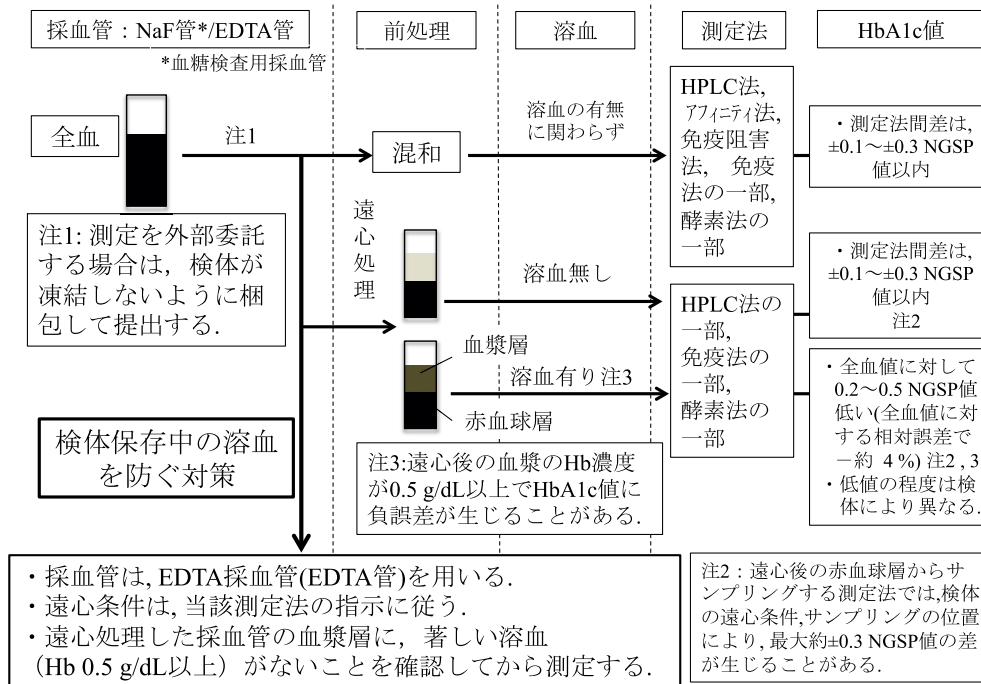


Fig. 健診検体の HbA1c 測定での検体の前処理と測定値の関係
The effects of hemolysis of whole blood samples on the measurement of HbA1c.

健診検体の HbA1c 測定における検体の前処理と測定値の関係を Fig. に示す。

2. 解説

1) 健診で HbA1c の測定に用いる検体の取扱い

健診での HbA1c 測定のための検体の取扱いは、血糖検査用採血管 (NaF 管) あるいは EDTA 入り採血管 (EDTA 管) に採取し、採血後、冷蔵保存 48 時間以内に測定する²⁾。また、検体の搬送中などに、保冷剤などで検体が凍らないようにする³⁾。

2) HbA1c 測定の現状

現在、日常検査法の HbA1c 値は、信頼性の高い測定法の測定値に対して、相対誤差 ±5% 以内 (例えば信頼性の高い測定法で NGSP 値が 6.0% の場合、全ての日常検査法の NGSP 値は 5.7~6.3% の中に入る) が維持されている⁴⁾。

3) 全血試料と HbA1c の測定法の関係

HbA1c の測定法は、全血試料をそのまま用いる測定法 (HPLC 法, アフィニティ法, 免疫阻害法, 免疫法の一部および酵素法の一部) と、一度採血管を遠心し、その赤血球層を用いる測定法 (HPLC 法の一部, 免疫法の一部および酵素法の一部) がある。このうち前者では測定法間の差はほとんどない。後者では、検体の溶血、遠心条件 (回転数 (rpm) と遠心時間) と遠心後の採血管からサンプリングする位置 (管底からの高さ) の影響をそれぞれ受ける⁵⁻⁸⁾。

(1) 溶血による影響

検体を全血のまま冷蔵で保存すると溶血が徐々に進行する。この溶血は、EDTA 管より浸透圧が高くなる NaF 管では起こり易く、さらに老化した赤血球ほど溶血し易くなる^{5,6)}。このとき遠心後の溶血血漿中の Hb 濃度が 0.5 g/dL 以上の場合、溶血血漿中に HbA1c が検出され、このとき赤血球層からサンプリングして得られた HbA1c 値は、糖化が大きい老化赤血球が減少するため、全血値に対して 0.2~0.5 NGSP 値 (相対誤差として平均約 4% 程度) 低値になる⁵⁾。

遠心後の採血管の血漿層が、視覚的に溶血があると判るときの Hb 濃度は、0.05 g/dL (50 mg/dL) 程度であるので、0.5 g/dL (500 mg/dL) 以上を「著しい溶血」とした。

(2) 遠心条件の影響

遠心条件とは、遠心機の回転数 (rpm) と遠心時間のことである。すなわち、相対遠心力 (g) が高い程、また、遠心時間が長い程、採血管内の赤血球は、その比重に応じた層の形成に変化が生じる^{5,6)}。その結果、赤血球層からのサンプリング位置が一定であっても、遠心条件により測定値に差が生じる。したがって、遠心処理は、当該測定法で指定された条件で行う必要がある。

なお、相対遠心力 (g) は、「相対遠心力 (g) = 1118 × R × N² × 10⁻⁸」で与えられる。このとき R は平均回転半径 (cm)、N は 1 分間当たりの回転数 (rpm) である。

相対遠心力 (g) は、通常、遠心機の取扱説明書にノモグラムとして示されているので、平均回転半径 (cm) を測定することで必要な回転数が読み取れる。

(3) 採血管からのサンプリングの位置による影響

遠心により採血管の検体は、赤血球の比重による層を形成し、その結果、赤血球層のサンプリングする位置により、HbA1c 値に差が生じる^{7,8)}。下層部には相対的に老化した赤血球が集積しやすく、とくに下層部からサンプリングして測定した場合は、全血の測定値に比較して、老化した赤血球由来の HbA1c 値を測定することになり、全血値に比較して高値になる^{5,7,8)}。この現象は赤血球の糖化の程度が、赤血球の寿命に関係し、若い赤血球より老化した赤血球の方が糖化が大きくなることに由来する^{9,10)}。

4) EDTA 管の使用と使い方の注意事項

冷蔵保存中の検体の溶血を防ぐには、溶血が起こりやすい EDTA 管を用いる。この時、遠心条件を厳守する必要がある。EDTA 管の検体は浸透圧の影響が少ないために、赤血球の形状が保持されることから、遠心による比重の層形成が明瞭となり、そのため赤血球層からのサンプリング位置による HbA1c 値への影響が大きくなり易いためである。

EDTA 管を用いた検体であっても、著しい溶血 (Hb 濃度が 0.5 g/dL 以上) が確認された場合の HbA1c 値は「参考値」として取扱う。

5) 参考：溶血を防ぐその他の対応策

採血管の種類に関わらず、溶血による測定値への影響を防ぐその他の対応策として、以下の検体提出の前に行う 2 つの処理法がある。

①採血後に所定の遠心条件で採血管を遠心し、採血管の血漿部分を除去してから検体として提出する。

②あらかじめ HbA1c 測定用の赤血球試料を作成するために、採血後に所定の遠心条件で採血管を遠心し、血漿部分を除去した後に当該の測定法で用いる溶血液で所定の希釈を行って溶血試料液を作り提出する。

これらの方法で処理した後に提出された試料は、その後、保管、運搬中に凍結が生じたとしても、測定時に試料を混和することで測定値には影響を与えない。

しかし、これらの前処理作業を健診の場で行う、あるいは当該の事業所などに戻ってから行うには手間や

設備の点で困難を伴うことから、委員会としては推奨しないこととした。したがって、これらの前処理による対応策が実施可能であれば、実施しても差し支えない。

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

文 献

- 1) Koga M, Okuda M, Inada S, Ueda S, Nakamura Y, Okumiyama T, Ishibashi M (2019) HbA1c levels measured by enzymatic assay during off-site health check-ups are lower than those measured by on-site HPLC assay. *Diabet Int*. <https://doi.org/10.1007/s13340-019-00407-8>
- 2) 厚生労働省 (2008) 特定健康診査及び特定保健指導の実施について。健発第 0310007 号, 保発 0310001 号
- 3) 渡辺清明 (2008) 特定健診における検査の手順に関するガイドライン。健康診査の精度管理に関する研究。平成 17 年度—平成 19 年度総合研究報告書, p 48-82
- 4) 検査医学標準物質機構 (ReCCS). HbA1c (NGSP) 性能試験結果, <http://www.reccs.or.jp/ngsp/>
- 5) 宮下徹夫, 山館周恒, 中山智祥 (2014) 遠沈後の赤血球層を試料とする HbA1c 測定における溶血の影響。日本臨床検査自動化学会会誌 39: 328-334
- 6) 宮下徹夫 (2014) HbA1c 測定における遠心操作の影響。検査と技術 42: 640-643
- 7) 山田満廣, 南口隆男, 小味潤智雄 (2002) HPLC 法によるヘモグロビン A_{1c} 分析時におけるサンプリングに関する問題点。臨床検査 46: 451-455
- 8) 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 (2004) ヘモグロビン A_{1c} 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。日本臨床検査自動化学会会誌 29: 181-189
- 9) Fitzgibbons JF, Koler RD, Jones RT (1976) Red cell age-related change of hemoglobins A_{1a+b} and A_{1c} in normal and diabetes subjects. *Clin Invest* 58: 820-824
- 10) Nakashima K, Nishizaki O, Andoh Y, Takei H, Itai A, Yoshida Y (1989) Glycated hemoglobin in fractionated erythrocytes. *Clin Chem* 35: 958-962

— Abstract —

**Recommendation of the Use of EDTA-containing Tubes for the Measurement of HbA1c
Using a Layer of Erythrocytes Obtained after Centrifugation**

Katsuhiko Kuwa¹⁾, Mikiko Okahashi²⁾, Asako Sato³⁾, Mitsuyoshi Namba⁴⁾, Shiro Maeda⁵⁾,
Masami Murakami⁶⁾, Shu Meguro⁷⁾ and Yoshihiko Nishio⁸⁾

¹⁾Japan Reference Measurement Institute, Kanagawa, Japan

²⁾Institute of Biopathological Medicine, Kanagawa, Japan

³⁾Clinical Laboratory, Tokyo Women's Medical University, Tokyo, Japan

⁴⁾Takarazuka City Hospital, Hyogo, Japan

⁵⁾Department of Advanced Genomic and Laboratory Medicine, Graduate School of Medicine,
University of the Ryukyus, Okinawa, Japan

⁶⁾Department of Clinical Laboratory Medicine, Graduate School of Medicine, Gunma University, Gunma, Japan

⁷⁾Department of Internal Medicine, Division of Endocrinology, Metabolism and Nephrology,
Keio University School of Medicine, Tokyo, Japan

⁸⁾Department of Diabetes and Endocrine Medicine,
Kagoshima University Graduate School of Medical and Dental Sciences,
Kagoshima, Japan

Transportation of whole blood samples maintained in cold conditions for up to 48 hours out of the laboratory may lead to hemolysis. This consequently results in a lower measured HbA1c value when a layer of erythrocytes obtained by centrifugation of the hemolytic sample is used for an analysis, including analyses by some HPLC-, enzymatic- and immuno-assay systems. The use of NaF-containing tubes that are suitable for the measurement of glucose concentration, makes hemolysis easy. Thus, the committee on Standardization of Laboratory Testing Related to Diabetes Mellitus of the Japan Diabetes Society recommends the use of EDTA-containing tubes for the measurement of HbA1c using a layer of erythrocytes harvested by centrifugation.

J. Japan Diab. Soc. 64(5): 336-339, 2021
