

## レクチンを用いた新規 HbA1c 測定方法の開発

日大生産工(院) ○加畑 真人      日大生産工 刈谷 勇希      日大生産工 白濱 忞成  
J-オイルミルズ 小林 夕香      J-オイルミルズ 上野 泰      日大生産工 吉宗 一晃

### 1 緒言

糖尿病は、血液中のグルコース濃度（血糖値）が高い状態が慢性的に続く病気である。糖尿病患者数の増加は世界的な社会問題となっており、2035年には約5億9,190万人にまで達すると予想されている<sup>1)</sup>。我が国においても糖尿病を含む生活習慣病は問題となっている。2014年3月、薬局での自己採血検査が認められ、糖尿病診断にかかわる社会環境はより身近なものとなっている。それに先立つ2010年7月には日本糖尿病学会による診断基準が改定され、より正確な診断のために血中のヘモグロビン A1c (HbA1c) 濃度の測定を積極的に取り入れることが定められた<sup>2)</sup>。この HbA1c は、赤血球中のヘモグロビン (Hb) に血液中のグルコース 1 分子が非酵素的に結合したもので、検査直前の食生活の影響を受けることなく過去 1~2 か月の平均的な血糖レベルを反映する指標として用いられている。HbA1c 測定は病院をはじめ薬局やドラッグストアのほか、今後は各家庭の個人によって実施されることまで想定されるため、高価な装置を使用せず、簡便な方法で短時間に測定可能な測定方法の開発が求められている。

従来の HbA1c 測定方法として高速液体クロマトグラフィー (HPLC) 法や免疫法、酵素法が知られている。HPLC 法は正確な測定が可能である。しかし、専用の高額な装置を必要としているほか、多検体の処理には適さない。免疫法はラテックス粒子に HbA1c に対する抗体を吸着させ、その凝集速度を測定する方法である。安価な検査用キットが広く販売されているが、ラテックス粒子の粘度が高いため、分析装置のセルが汚染されることで測定値が不正確になる可能性がある。近年開発された酵素法は、HbA1c を含む血中の Hb を限定分解して生成された糖化ペプチドを、フルクトシルペプチドオキシダーゼ<sup>3)</sup>により測定する方法である。これは一度に多検体の測定が可能だが、先に述べた HbA1c の限定分解を行う必要がある。そこで、我々はレクチンに

よる新規 HbA1c 測定方法の開発を試みている。レクチンは動植物などに存在する糖結合性タンパク質の総称で、室温で作用するため温度制御が不要であるほか、結合した糖タンパクを凝集させる作用を持つ。さらに水溶性であるため免疫法で用いられるラテックス粒子のように測定器具の洗浄操作を複雑にする必要がないという利点を持つ。このレクチンによる凝集速度をもとに、血液中の HbA1c 濃度を測定することが目標である。これまでのレクチン ELISA 法によるスクリーニング実験において、ヒドロチャワンタケ由来レクチン AAL が HbA1c と特異的に結合することを見出した<sup>4)</sup>。また、HbA1c 固相化に用いる溶媒を従来法から変更し、この際の固相化時間を改良することで再現性が向上した。

### 2 実験方法

レクチン ELISA 法により AAL と HbA1c の結合を測定した。これはマイクロプレート上に HbA1c を固相化させ、ビオチン標識化レクチンとの結合を HRP 標識ストレプトアビジンにより確認する方法である(図 1)。

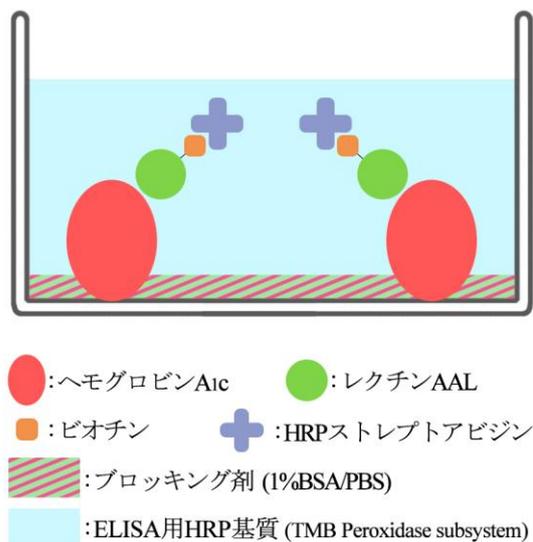


図1: HbA1c測定のためのレクチンELISA

A novel method for measuring hemoglobin A1c using lectin

Masato KABATA, Yuki KARIYA, Issei SHIRAHAMA,  
Yuka KOBAYASHI, Yasushi UENO, and Kazuaki YOSHIMUNE

まず変性剤としてpH5.0-酢酸緩衝液で処理(30min)したHbA1cをpH10-炭酸ナトリウム緩衝液で希釈し、プレート上に固相化させた(90min)。つづいて非特異反応を抑制するために1%BSA/PBSでブロッッキング(90min)を行った後、ビオチン化レクチンAALを吸着させた(60min)。次にHigh Sensitivity Streptavidin-HRPを加えビオチン化レクチンと結合させ(30min)、TMB Peroxidase substrate systemにより基質を発色させた(3min)。最後に2M-硫酸を加え発色を停止し、吸光度(450nm測定値と600nm測定値の差)を測定した。

### 3 実験結果および考察

HbA1c固相化の際に用いる溶媒を従来のpH7-リン酸緩衝生理食塩水(PBS)からpH10-炭酸ナトリウム緩衝液に変更し、さらに固相化時間をこれまでの60分から30分延長したところ、AALとHbA1cの結合の再現性高い測定が可能となった(図2-B)。アルカリ性溶媒によってHbA1cが変性したことで、内部の疎水性部分が出し、プレートとの吸着効率が向上したと考えられる。

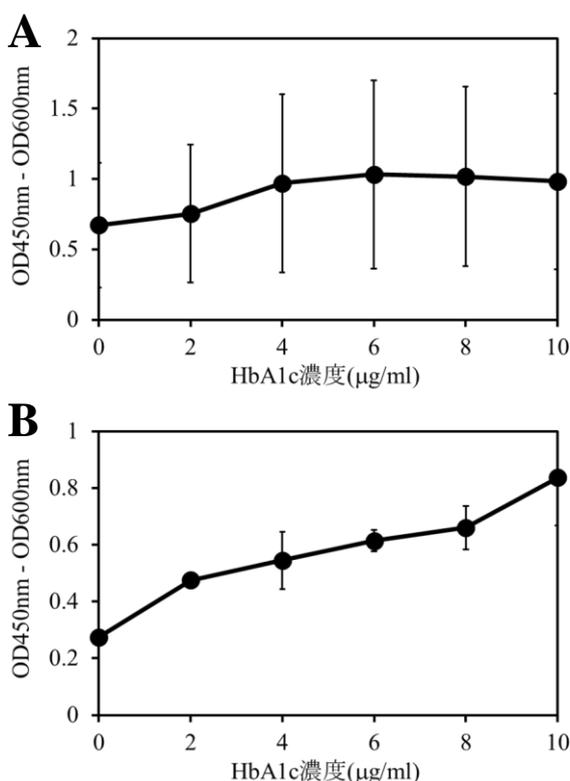


図2: 従来法と新規法による測定値の比較(縦軸は吸光度であり、AALとHbA1cの結合を表す。横軸はHbA1cの各濃度0~10μg/mLを表す。従来法[A]よりも新規法[B]において標準偏差値の改善が見られる。)

また、この結合を阻害する物質をスクリーニングしたところ、HbA1cに10mMリン酸カリウム緩衝液(KPB)を添加したとき、その結合が阻害された。その一方で、リン酸ナトリウム緩衝液(NaPB)はこの結合に影響を与えなかったことから、カリウムイオンが結合を阻害する要因となることが示唆された。また、HbA1cのグルコース結合部位とのみ結合する抗HbA1cモノクローナル抗体を添加したところ、結合に対する阻害が見られた。このことから、AALは抗HbA1c抗体の認識部位と同様の領域に結合していることが示唆された。一般的に、AALと多糖との結合はL-フコースによって阻害され、D-フコースには阻害されないことが知られるが<sup>5)</sup>、AALとHbA1cの結合は100mM L-フコースだけでなく100mM D-フコースによっても阻害されたため、これが特異な結合様式を持つことが示唆された。

### 4 まとめ

糖尿病診断の指標となる血液中のHbA1c濃度を、糖結合性タンパク質であるレクチンAALと結合させて測定することを目指とした。測定の際、HbA1cの溶媒を従来から変更し、固相化の時間を改良したことで再現性を向上した。また、HbA1c抗体を用いた実験の結果から、AALとHbA1cの結合領域を推測した。さらに、D-フコースやL-フコースを用いた実験から、AALとHbA1cの結合様式が既知のものとは異なることが確認され、実用化の可能性が示唆された。

### 5 参考文献

- 1) International Diabetes Federation, *DIABETES ATLAS Sixth edition*, (2014) p.11-12
- 2) 清野裕ら, 糖尿病の分類と診断基準に関する委員会報告, 糖尿病 Vol.53, No.6 (2010) p.450-467
- 3) 五味恵子ら, 新規フルクトシルペプチドオキシダーゼの開発とそれを用いた糖尿病診断法の構築, 生物工学会誌 Vol.92, No.2 (2014) p.62-68.
- 4) 木村晃太, ヘモグロビンA1cと結合するレクチンのスクリーニング(日本大学生産工学部応用分子化学科 卒業論文), (2014) p.24
- 5) H.B. Mortensen and C. Christophersen "Glycosylation of human Hemoglobin A kinetics and mechanisms studied by Isoelectric Focusing", *Biochimica et Biophysica Acta*, 707 (1982) p.154-163