

高速液体クロマトグラフィー法による犬と猫の 糖化ヘモグロビン測定

内田英二^{1)†} 秋葉真美¹⁾ 松田憲児¹⁾ 町田竜彦^{1), 2)}
安部聡美¹⁾ 久保拓也³⁾

1) 酪農学園大学獣医学部 (〒069-8501 江別市文京台緑町582)

2) 東京都 開業 (町田家畜病院: 〒178-0063 練馬区東大泉7-25-19)

3) 北海道 開業 (北愛動物病院 北広島市: 〒061-1121 北広島市中央1-5-25)

(2010年3月12日受付・2010年10月12日受理)

要 約

犬猫の糖化ヘモグロビン (HbA1c) を高速液体クロマトグラフィー法により測定した。測定精度は同時および日差再現性と添加回収試験いずれも良好であった。糖尿病群の犬猫のHbA1cは、臨床的に健康な犬猫より有意に高い値を示した。また糖尿病群は、持続的な高血糖状態を示さない種々の疾患群と比較しても有意に高い値を示した。糖尿病に罹患していない犬 (健康群と疾患群) から計算したHbA1cの基準値は、2.2～3.4%であった。同様に猫の基準値は、1.8～2.7%であった。今回使用した自動グリコヘモグロビン分析計によるHbA1c測定は、犬と猫の血糖値変動を観察するには有用な手法と思われる。——キーワード: 犬, 猫, 糖化ヘモグロビン, 高速液体クロマトグラフィー。

----- 日獣会誌 64, 145～149 (2011)

糖尿病と診断された犬や猫は、食餌療法やインスリン療法による血糖値のコントロールが重要である。しかしながら、血糖値は種々の条件で変動し易く、食餌量や運動量により影響を受け、猫では採血時のストレスでも上昇する。この血糖値に代わる血糖コントロールの指標として糖化タンパクが有用とされている [1-9]。獣医療では、糖化タンパクとしてフルクトサミン [3-5] 測定が主流であった。しかしながら近年日本の人医療での血糖コントロール指標が糖化ヘモグロビンA1c (HbA1c) となり、フルクトサミンが測定されなくなった。この影響で獣医療の現場でも次第に血清フルクトサミン測定が困難になってきた [8, 9]。そこで獣医療にとっても犬猫のHbA1cを測定することが有益と考えられる。HbA1cの測定法としては、高速液体クロマトグラフィー (High-Performance Liquid Chromatography: HPLC) 法、免疫比濁法、酵素法があるが、本研究ではHPLC法による犬と猫の糖化ヘモグロビン測定について検討した。

材 料 お よ び 方 法

動物および採血: 供試した動物は、酪農学園大学附属

動物病院と全国4カ所 (北海道, 東京都, 愛知県, 大阪府) の動物病院に来院した犬 (146頭354検体, 年齢1～15歳, 雄87頭, 雌59頭) と猫 (100頭103検体, 年齢1～20歳, 雄46頭, 雌50頭, 不明4頭) である。犬検体を9群 (糖尿病 (治療前) 群, 糖尿病 (治療中) 群, 健康群, 副腎皮質機能亢進症群, 甲状腺機能低下症群, 皮膚疾患群, 消化器疾患群, 循環器疾患群, その他の疾患群) に区分した。また猫検体を7群 (糖尿病 (治療前) 群, 健康群, 腎不全群, 泌尿器疾患群, 消化器疾患群, 腫瘍性疾患群, その他の疾患群) に区分した。

糖尿病の診断は、特徴的な臨床症状の発現, 空腹時血糖の持続的な高値, 尿糖の出現など, 一般的に行われている手順により診断した。糖尿病 (治療前) 犬31頭 (延標本数31検体) は, 年齢1～14歳, 雄11頭, 雌20頭である。糖尿病 (治療前) 猫6頭 (延標本数9検体) は, 年齢5歳以上, 雄6頭である。これら犬猫は, 来院時に糖尿病性ケトアシドーシス症状を認めない症例であった。疾患群は, 糖尿病を併発していないことが確認された症例とした。健康群は, 明らかな臨床的異常を認めず, 血液および血液化学的検査でも異常が認められない

† 連絡責任者: 内田英二 (酪農学園大学獣医学部獣医学科伴侶動物医療教育群)

〒069-8501 江別市文京台緑町582 ☎011-388-4784 FAX 011-386-0880 E-mail: e-uchida@rakuno.ac.jp

表1 犬と猫検体の同時再現性

番 号	犬検体					猫検体		
	1	2	3	4	5	6	7	8
平均値(%)	2.9	4.7	5.5	5.9	9.3	2.2	3.2	3.2
標準偏差	0.05	0.11	0.11	0.08	0.09	0.03	0.05	0.05
変動係数	0.02	0.02	0.02	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01
最小値	2.8	4.5	5.4	5.8	9.2	2.2	3.2	3.1
最大値	2.9	4.8	5.7	6.0	9.4	2.3	3.3	3.3
範 囲	0.1	0.3	0.3	0.2	0.2	0.1	0.1	0.2

同時再現性は、濃度の異なる検体を各10回測定した。

表2 犬と猫検体の日差再現性

番 号	犬検体		猫検体	
	A	B	C	D
平均値(%)	2.9	5.8	2.3	3.1
標準偏差	0.05	0.06	0.05	0.05
変動係数	0.02	0.01	0.02	0.01
最小値	2.8	5.7	2.2	3.1
最大値	2.9	5.8	2.3	3.2
範 囲	0.1	0.2	0.1	0.1

検体AとCは、健康な犬猫を7日間連続で測定した。

検体BとDは、糖尿病の犬猫を7日間連続で測定した。

犬猫とした。

血液は、抗凝固剤としてEDTA-2Kを使用し、頸静脈または橈側皮静脈より採血した。

糖化ヘモグロビン測定方法：糖化ヘモグロビン測定は、自動グリコヘモグロビン分析計（HLC-723GHb V, 東ソー(株), 東京）を使用した。操作手順等は、Nagisaら [10] の報告に従って実施した。抗凝固処理した全血5 μ lに専用希釈液1mlを加えた試料を装着するのみで、試料のカラムへの注入、洗浄、溶出等の操作は全自動的に行われる。試料注入後、溶出液A（酢酸アンモニウム緩衝液, pH8.8）にて糖化していないヘモグロビンが最初に溶出され、次に溶出液B（トリス緩衝液, pH8.0）にて糖化されたヘモグロビンが溶出される。このトータルの糖化ヘモグロビンをHbA1cに近似するようにキャリブレーションによる較正が行われ、最終的にHbA1c換算値として表示される。試料注入から溶出に要する時間は約2分である。

今回使用した分析計は、アミノフェニルボロン酸基 [10, 11] を用いたアフィニティーカラムを使用したHPLC装置である。測定原理は、アミノフェニルボロン酸基と糖化ヘモグロビンのシスジオール基との親和力を利用した方法で、多種類の動物の糖化ヘモグロビンを測定することを想定された装置である。

各検体の測定値は、すべての検体で3回測定を行いその平均値を用いた。

測定法の精度：測定装置の精度検定として、同時再現性、日差再現性および添加回収試験を実施した。

表3 添加回収試験 (1)

混合比		犬検体(%)			猫検体(%)		
高値 検体	低値 検体	測定値	理論値	回収率	測定値	理論値	回収率
0	100	3.00			2.30		
1	99	3.13	3.07	102	2.40	2.38	101
2	98	3.17	3.14	101	2.47	2.45	101
3	97	3.27	3.21	102	2.57	2.53	101
4	96	3.33	3.28	102	2.70	2.61	104
5	95	3.40	3.35	101	2.93	2.69	109
100	0	10.0			10.0		

測定値は、3回測定の平均値を小数点第2位まで表記した。犬と猫のそれぞれ異なるHbA1cを示した検体を混合し、混合比から算出される理論値から回収率を計算した。

表4 添加回収試験 (2)

混合比		犬検体(%)			猫検体(%)		
高値 検体	低値 検体	測定値	理論値	回収率	測定値	理論値	回収率
0	10	2.10			2.10		
1	9	3.00	2.91	103	2.63	2.58	102
2	8	3.77	3.69	102	3.07	3.06	100
3	7	4.53	4.47	101	3.57	3.54	101
4	6	5.33	5.25	102	4.07	4.02	101
5	5	6.10	6.03	101	4.43	4.50	99
6	4	6.87	6.81	101	4.97	4.98	100
7	3	7.67	7.59	101	5.43	5.46	100
8	2	8.40	8.37	100	5.90	5.94	99
9	1	9.13	9.15	100	6.40	6.42	100
10	0	9.90			6.90		

測定値は、3回測定の平均値を小数点第2位まで表記した。犬と猫のそれぞれ異なるHbA1cを示した検体を混合し、混合比から算出される理論値から回収率を計算した。

同時再現性試験は、HbA1c値の異なる検体を10回測定して、その平均値と標準偏差から変動係数を求めた。濃度の異なる検体は、犬では5検体、猫では3検体を準備した。日差再現性試験は、健康あるいは糖尿病と診断した犬猫をそれぞれ1頭ずつ使用した。1日1回の測定を7日間実施した。検体の保存は、4℃とした。添加回収試験は、犬猫のHbA1c値がそれぞれ高値、低値を示した検体を比率を変えて混合し、混合比から算出される理論値から回収率を算出した。添加回収試験 (1) では、混合比を1対99（高値対低値）から5対95と変化させて実施し、添加回収試験 (2) では、混合比を1対9から9対1と変化させて実施した。高値検体は、Hasegawaら [1, 2] の方法に準じて用意した。犬猫の全血と10%ブドウ糖溶液をそれぞれ等量混合した後、37℃で5時間加温して作成した検体を高値検体とした。低値検体は、できるだけ低い値を示した検体を使用した。

統計処理：スミルノフの棄却検定を行い、正規分布はカイ2乗適合検定を用いた。平均値の差の検定は、

表5 犬における区分別の糖化ヘモグロビン値

区 分	標本数	平均値±標準偏差	有意差検定
糖 尿 病 (治療前)	31	6.3±1.5	
糖 尿 病 (治療中)	133	4.8±1.2	a)
健 康	91	2.8±0.3	a) b)
副腎皮質機能亢進症	13	2.8±0.3	a) b)
甲状腺機能低下症	18	2.9±0.4	a) b)
皮膚疾患	13	2.9±0.4	a) b)
消化器疾患	26	2.8±0.3	a) b)
循環器疾患	11	2.7±0.3	a) b)
その他の疾患	24	2.8±0.3	a) b)

a) 糖尿病 (治療前) の区分と比較して、 $P<0.01$ で有意差が認められた

b) 糖尿病 (治療中) の区分と比較して、 $P<0.01$ で有意差が認められた

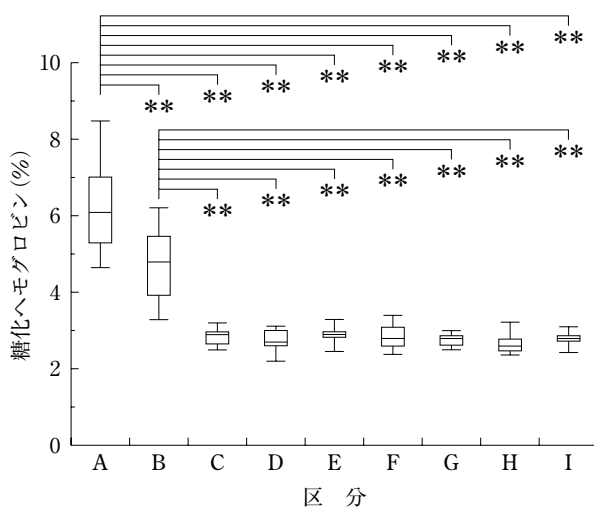


図1 区分別の犬糖化ヘモグロビン値の箱ひげ図

箱を形成する上、中央、下の線は、それぞれ75番目、50番目、25番目の百分位数を示す。箱の上部、下部に延びる線は、90番目から10番目の百分位数を示す。

区分は、A = 糖尿病 (治療前)、B = 糖尿病 (治療中)、C = 健康、D = 副腎皮質機能亢進症、E = 甲状腺機能低下症、F = 皮膚疾患、G = 消化器疾患、H = 循環器疾患、I = その他の疾患

** : $P<0.01$ で有意差を認めた

Welch's t -testやStudent's t -test, Mann-Whitney検定を適宜用いた。すべての検定は $P<0.05$ で有意と判定した。これら統計処理は、統計ソフト (StatMate IV, (株)アトムス, 東京およびStatcel QC, (有)オーエムエス出版, 東京) を用いた。

成 績

測定法の精度：同時再現性試験結果は、変動係数が犬では0.01～0.02%であり、猫では0.01%であった (表1)。日差再現性試験結果は、変動係数が犬猫ともに0.01～0.02%であった (表2)。添加回収試験 (1) と (2)

表6 猫における区分別の糖化ヘモグロビン値

区 分	標本数	平均値±標準偏差	有意差検定
糖尿病 (治療前)	9	3.1±0.4	
健 康	26	2.3±0.2	a)
腎不全	17	2.2±0.3	a)
泌尿器疾患	8	2.3±0.2	a)
消化器疾患	10	2.3±0.3	a)
腫瘍性疾患	5	2.2±0.2	a)
その他の疾患	28	2.2±0.2	a)

a) 糖尿病 (治療前) の区分と比較して、 $P<0.01$ で有意差が認められた

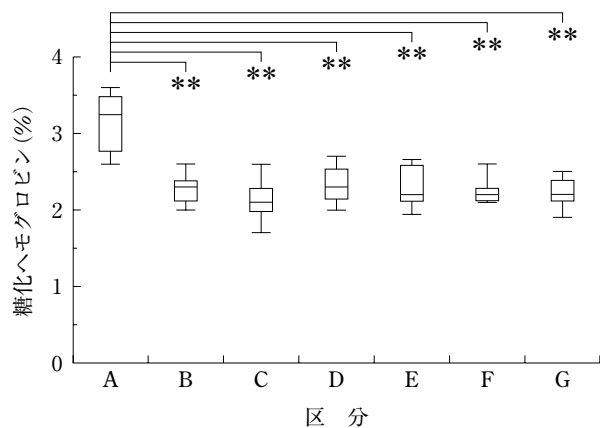


図2 区分別の猫糖化ヘモグロビン値の箱ひげ図

箱ひげ図の説明は図1による。

区分は、A = 糖尿病、B = 健康、C = 腎不全、D = 泌尿器疾患、E = 消化器疾患、F = 腫瘍性疾患、G = その他の疾患

** : $P<0.01$ で有意差を認めた

の結果は、回収率が犬猫ともに99～109%であった (表3, 4)。

犬における区分別のHbA1c：健康群91頭から得たHbA1cは、平均値2.8%、標準偏差0.3%、中央値2.9%であり、正規分布型を示し、平均値±2SDから求めた健康群の基準値は2.3～3.3%であった。未治療の糖尿病群の測定値は $6.3 \pm 1.5\%$ 、治療中の糖尿病群では $4.8 \pm 1.2\%$ であった。糖尿病を併発していない6つの疾患群の平均値は、2.7～2.9%であった。統計学的には、未治療の糖尿病群は他の8群と比較して有意に高い値を示した。また、治療中の糖尿病群も健康群、各疾患群と比較して有意に高い値を示した。いっぽう健康群と糖尿病を併発していない疾患群とでは、有意差は認めなかった (表5, 図1)。

猫における区分別のHbA1c：健康群26頭から得たHbA1cは、平均値2.3%、標準偏差0.2%、中央値2.3%であり、正規分布型を示し、平均値±2SDから求めた健康群の基準値は1.8～2.7%であった。未治療の糖尿病群の測定値は $3.1 \pm 0.4\%$ であった。糖尿病を併発していない5つの疾患群の平均値は、2.2～2.3%であ

った。統計学的には、未治療の糖尿病群は他の6群と比較して有意に高い値を示した。いっぽう健康群と糖尿病を併発していない疾患群とでは、有意差は認めなかった(表6, 図2)。

考 察

今回、糖化ヘモグロビン測定に用いた自動グリコヘモグロビン分析計の測定精度は、犬猫いずれの検体においても同時および日差再現性と添加回収試験に大変良好な結果を示した。特に4℃に保存した犬猫の正常および糖尿病例ともに7日間の日差再現性は、同時再現性試験とほぼ同程度の成績であり、変性ヘモグロビンの影響を受けにくいことが示された。これは人検体での報告と同じであり[12]、採血後の検体の取扱いを容易にし、日常診療からすると検査機関への依頼について簡便な取扱いができる検査項目と思われる。

ヘモグロビン量が低い犬猫の検体では、試料作成時に200倍希釈ではなく低希釈にして、測定時にカウントされるトータルエリア濃度を調整すると、HbA1cが相対値として測定される原理から、ヘモグロビン濃度が測定値に与える影響は少ないと思われる。

犬でのHbA1c測定結果から、糖尿病罹患犬は治療前群 $6.3 \pm 1.5\%$ (平均血糖値約460mg/dl)、治療後群 $4.8 \pm 1.2\%$ (平均血糖値約316mg/dl)であり、箱ひげ図でも確認できるように健康群や疾患群と比較して有意に高値を示した。糖尿病に罹患していない犬190例(健康群+疾患群、平均血糖値約104mg/dl)から計算したHbA1cの平均値 $\pm$ SDは $2.8 \pm 0.6\%$ であり、基準値としては2.2~3.4%であることが示された。

猫でのHbA1c測定結果から、糖尿病罹患猫は治療前群 $3.1 \pm 0.4\%$ (平均血糖値約445mg/dl)であり、箱ひげ図でも確認できるように健康群や疾患群と比較して有意に高値を示した。糖尿病に罹患していない猫93例(健康群+疾患群、平均血糖値約135mg/dl)から計算したHbA1cの平均値 $\pm$ SDは $2.2 \pm 0.5\%$ であり、基準値としては1.8~2.7%であることが示された。これらの基準値は、陽イオン交換クロマトグラフィーによるHPLC測定報告(犬: $2.60 \pm 0.357\%$ [1], 猫: $1.70 \pm 0.676\%$ [2])と比較的近似した数値となった。しかしながらHasegawaら[1, 2]の測定は、犬と猫によって溶出条件や緩衝液成分の変更が必要であり、溶出時間も20分程度要する。したがって利便性では、今回の分析計が優れていると思われる。その他犬基準値として3.7~5.6% [6] や $1.39 \pm 0.70\%$ [7] が、猫では0.8~2.1% [5] が報告されており、今回の基準値と違いが認められた。糖化ヘモグロビンには安定型HbA1cの他、HbA1a, HbA1b, HbF, 不安定型HbA1cなどが含まれる。これらの糖化ヘモグロビンを測定方法により

どのように処理しているかによって測定値に影響がでる。また変性あるいは修飾ヘモグロビンの存在も測定値に影響を与える[12]。さらに犬猫専用のキャリブレーション用の標準品は無く、報告者がそれぞれの国による人用標準品を利用しているので測定値に違いが出ることが予想される。

以上、今回使用した自動グリコヘモグロビン分析計による犬と猫のHbA1c測定は、良好な再現性と回収率を認め、事例における測定値解析結果から、慢性高血糖状態を主徴とする糖尿病でのみ高い数値を示した。HbA1c値は、赤血球の寿命から犬では1~2カ月くらい、また猫では犬よりも短い期間での平均値として血糖コントロール状況を示すと考えられている[4-7]。このことから、今回使用した分析計によるHbA1cの測定は、犬猫の血糖値変動を長期的に観察するには有用な手法であると思われる。今後の課題としては、糖尿病のステージ別基準値や血糖コントロールの成否を判断するHbA1cの基準値作りと糖化アルブミンなど糖化タンパクとの連携を検討することが必要である。

稿を終えるにあたり検体提供をいただいた、愛知県ハシモト動物病院 橋本絢子先生に深謝する。

引 用 文 献

- [1] Hasegawa S, Sako T, Takemura N, Koyama H, Motoyoshi S: Glycated hemoglobin fractions in normal and diabetic dogs measured by high performance liquid chromatography, J Vet Med Sci, 53, 65-68 (1991)
- [2] Hasegawa S, Sako T, Takemura N, Koyama H, Motoyoshi S: Glycated hemoglobin fractions in normal and diabetic cats measured by high performance liquid chromatography, J Vet Med Sci, 54, 789-790 (1992)
- [3] Reusch CE, Liehs MR, Hoyer M, Vochezer R: Fructosamine. A new parameter for diagnosis and metabolic control in diabetic dogs and cats, J Vet Intern Med, 7, 177-182 (1993)
- [4] Bennett N: Monitoring techniques for diabetes mellitus in the dog and the cat, Clin Tech Small Anim Pract, 17, 65-69 (2002)
- [5] Elliott DA, Nelson RW, Reusch CE, Feldman EC, Neal LA: Comparison of serum fructosamine and blood glycosylated hemoglobin concentrations for assessment of glycemic control in cats with diabetes mellitus, J Am Vet Med Assoc, 214, 1794-1798 (1999)
- [6] Catchpole B, Mountford S, Barabas S, Scaramuzzi RJ: Evaluation of a disposable device for the measurement of haemoglobin A1c in dogs, Vet Rec, 162, 47-49 (2008)
- [7] Marca MC, Loste A: Glycosylated haemoglobin assay of canine blood samples, J Small Anim Pract, 41, 189-192 (2000)
- [8] Sako T, Mori A, Lee P, Takahashi T, Izawa T, Kara-

- sawa S, Furuuchi M, Azakami D, Mizukoshi M, Mizutani H, Kiyosawa Y, Arai T : Diagnostic significance of serum glycated albumin in diabetic dogs, *J Vet Diagn Invest*, 20, 634-638 (2008)
- [9] Mori A, Lee P, Mizutani H, Takahashi T, Azakami D, Mizukoshi M, Fukuta H, Sakusabe N, Sakusabe A, Kiyosawa Y, Arai T, Sako T : Serum glycated albumin as a glycemic control marker in diabetic cats, *J Vet Diagn Invest*, 21, 112-116 (2009)
- [10] Nagisa Y, Kato K, Watanabe K, Murakoshi H, Odaka H, Yoshikawa K, Sugiyama Y : Changes in glycated haemoglobin levels in diabetic rats measured with an automatic affinity HPLC, *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 10, 752-758 (2003)
- [11] Yue DK, McLennan S, Church DB, Turtle JR : The measurement of glycosylated hemoglobin in man and animals by aminophenylboronic acid affinity chromatography, *Diabetes*, 31, 701-705 (1982)
- [12] 宮下徹夫, 福田嘉明, 田中和雄, 橋本寿美子, 関口光夫, 岩田 進, 河野均也 : 新型HPLCによるヘモグロビンA1c測定の評価—東ソーHLC-723GHb V型について—, *日本臨床検査自動化学会会誌*, 22, 127-134 (1997)

The Measurement of Glycohemoglobin in Dogs and Cats Using High Performance Liquid Chromatography

Eiji UCHIDA^{*†}, Mami AKIBA, Kenji MATSUDA, Tatsuhiko MACHIDA,
Satomi ABE and Takuya KUBO

** Department of Small Animal Clinical Sciences, School of Veterinary Medicine, Rakuno Gakuen University, 582 Bunkyo-dai-Midorimachi, Ebetsu, 069-8501, Japan*

SUMMARY

Glycohemoglobin (HbA1c) levels in dogs and cats were measured using high performance liquid chromatography. The results of intra- and inter-assay variability and the addition recovery test of the measurement system were excellent. HbA1c levels were significantly higher in the dogs and cats in the diabetic group than in those in the clinically healthy group and the group with various diseases without accompanying sustained hyperglycemia. The reference HbA1c value calculated from the data of non-diabetic dogs (in the healthy group and non-hyperglycemic disease group) was in a range between 2.2% and 3.4%. The reference value of the cat HbA1c, similarly calculated, was in a range between 1.8% and 2.7%. The measurement of HbA1c levels using automated HPLC (HLC-723GHb V) in this study is considered to be a useful method of monitoring fluctuations in the blood sugar levels of cats and dogs.

—Key words : cat, dog, glycohemoglobin (HbA1c), high-performance liquid chromatography (HPLC).

† Correspondence to : Eiji UCHIDA (Department of Small Animal Clinical Sciences, School of Veterinary Medicine, Rakuno-Gakuen University)

582 Bunkyo-dai-Midorimachi, Ebetsu, 069-8501, Japan

TEL 011-388-4784 FAX 011-386-0880 E-mail : e-uchida@rakuno.ac.jp

—*J. Jpn. Vet. Med. Assoc.*, 64, 145 ~ 149 (2011)