

Clinical Usefulness of Estimation of Serum Fructosamine Concentration in Diabetes Mellitus

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/8041

糖尿病患者における血清フルクトサミン濃度の測定

—その基礎的検討と臨床的意義—

金沢大学医学部内科学第一講座 (主任: 服部 信教授)

真 田 陽

(昭和63年5月10日受付)

生体内において、血清中の蛋白とブドウ糖は非酵素的なaldimine結合により結合し、Amadori転位を経て安定な ketoamine (フルクトサミン) となる。このフルクトサミンはアルカリ性で還元性を示すことが知られている。本研究では血清フルクトサミン濃度の測定について基礎的検討を行い、更にその臨床的意義についても検討を加えた。測定法はアルカリ溶液中でフルクトサミンが nitroblue tetrazolium (NBT) を還元発色させることを利用したものであり、吸光度により血清フルクトサミン濃度を測定した。本測定法の標準物質として、合成 Amadori 化合物である 1-deoxy-1-morpholino-D-fructose (DMF) を用いた。基礎的検討の結果、測定条件は反応温度37°C、反応時間15分、反応 pH は 10.8、比色波長は530nmが至適と考えられた。測定精度については測定内誤差 (CV) は2.5~4.1%、測定間誤差 (CV) は3.4~5.5%であった。健常者 (n=44) の平均血清フルクトサミン濃度は2.4±0.4 (Mean±2SD) mM、糖尿病患者 (n=77) では3.1±1.3mM と糖尿病患者で有意に高値を示した (p<0.001)。血清フルクトサミン濃度は糖化アルブミン (r=0.708, p<0.001) および HbA_{1c} (r=0.751, p<0.001) と有意な相関関係を示し、更に2~4週前の空腹時血糖値と強く相関した (r=0.474~0.737, p<0.01~0.001)。これらの結果より、血清フルクトサミン濃度は比較的短期間 (2~4週間前) の血糖コントロールの指標と考えられた。次に集団検診時の尿糖陽性者42名を75g OGTTの血糖曲線の判定区分により糖尿病型、境界型、正常型の3群に分け、血清フルクトサミン濃度、HbA_{1c}および空腹時血糖を測定した。血清フルクトサミン濃度は糖尿病型、境界型および正常型でそれぞれ3.52±0.28 (mean±S. E. M.)、2.56±0.05および2.31±0.06mM であり、各群間で明らかな差を認めた (p<0.05~0.001)。一方、空腹時血糖及び HbA_{1c} は境界型と正常型との間には有意差を認めなかった。血清フルクトサミン濃度の測定は簡便であり、比較的短期間の血糖コントロールの指標や耐糖能異常のスクリーニングに有用である可能性が示唆された。

Key words fructosamine, glycated albumin, HbA_{1c}, diabetic control

糖尿病治療の重要な目的の1つは、糖尿病性細小血管症の発症・進展を防止することであり、そのためには糖尿病患者を長期にわたり良好な血糖コントロール状態におく必要がある。血糖コントロール状態を把握する手段として、従来の血糖値や尿糖量に加えて、現在では glycated hemoglobin (HbA_{1c}) が広く用いられている。

Hemoglobinはブドウ糖と非酵素的に Schiff 結合し、不安定な pre-HbA_{1c} (aldimine) を形成した後、Amadori 転位により安定した HbA_{1c} (ketoamine) となる¹⁾²⁾が、赤血球の平均寿命が約120日であることから、過去1~3ヶ月の比較的長期の血糖コントロール状態を反映していると考えられている³⁾⁴⁾。しかし、急激に血糖コントロールが悪化した糖尿病患

Abbreviations: CV, coefficient of variation; DMF, deoxy-morpholino-D-fructose; FPG, fasting plasma glucose; HbA_{1c}, hemoglobin A_{1c}; 5-HMF, 5-hydroxy methyl furfural; HPLC, high performance liquid chromatography; HSA, human serum

者や発症後間もないインスリン依存型糖尿病患者では、高血糖状態にあるにもかかわらず、HbA_{1c}値が正常なことがある。また、不安定型糖尿病患者や厳格にコントロールを必要とする糖尿病妊婦において治療効果を早期に判定する際、HbA_{1c}のみでは不十分と思われることもしばしば経験され、より短い期間の血糖コントロール状態を示す指標の必要性が指摘されてきた⁹⁾。このため、hemoglobinよりさらに半減期の短い血清蛋白や血清アルブミンのglycationを測定する方法が報告された¹⁰⁾が、その測定法の多くは手技の複雑なことから臨床的に広く普及するには至っていない。

血清蛋白にグルコースが非酵素的に結合して生じたketoamineは、その糖鎖がフルクトース構造をとるためフルクトサミンとよばれているが、最近フルクトサミンがアルカリ溶液中でテトラゾリウム塩を還元発色させることを利用した簡便な血清糖化蛋白測定法(血清フルクトサミン濃度測定)が報告された⁹⁾。本論文では、この血清フルクトサミン濃度測定法について基礎的検討を行うとともに、糖尿病患者のスクリーニングや血糖コントロールにおける血清フルクトサミン濃度測定法の臨床的意義についても検討を加えた。

材料および方法

I. 血清フルクトサミン濃度測定系の基礎的検討

1. 試薬

フルクトサミン定量の標準物質として用いる合成Amadori転移生成物1-deoxy-1-morpholino-D-fructose (DMF)、発色試薬のnitroblue tetrazolium (NBT: grade III)、DMF溶解に用いるヒト血清アルブミン(HSA); Cohn fraction V、結晶化凍結乾燥ヒトアルブミン(結晶化HSA)はいずれもSigma社製(St. Louis, MO, USA)のものを持ちいた。その他の試薬(特級)は和光純薬工業より入手した。

2. NBT発色の至適pHと比色時の至適吸収波長

ketoamineによるNBT還元発色に及ぼすpHの影響を検討するため、0.25mM NBTをそれぞれ含む0.1Mリン酸緩衝液(pH7, pH8およびpH12)、0.1Mバルビタール緩衝液(pH9)および0.1M炭酸緩衝液(pH10および11)を作成した。これらの溶液

2mlに、①4mM DMF含有生理食塩水、②4%結晶化HSA生理食塩水あるいは③4mM DMF含有4%結晶化HSA生理食塩水を200 μ lずつ加えて37°Cで15分間反応させ、530nmにおける吸光度を測定した。

比色定量に用いる至適吸収波長を決定するため、上記①②③の溶液各200 μ lに0.25mM NBT含有0.1M炭酸緩衝液(pH10.8)を2ml加え、37°Cで15分間反応させ、それぞれの吸収スペクトラムを記録した。

3. DMF溶液に用いるアルブミン製剤の影響

DMF溶液に用いるHSA製剤のNBT発色に及ぼす影響を見るため、①4%HSA(fraction V)含有生理食塩水、②4%結晶化HSA含有生理食塩水、③4mM DMFを溶解した4%HSA(fraction V)含有生理食塩水および④4mM DMFを溶解した4%結晶化HSA含有生理食塩水の各200 μ lに0.25mM NBT含有0.1M緩衝液(pH7から12)を2ml加えて37°Cで15分間反応させ530nmにおける吸光度を測定した。また、これら①②③④の溶液を0.25mM NBT含有0.1M炭酸緩衝液(pH10.8)2ml中で反応させ、吸光度を経時的に測定した。

4. ブドウ糖濃度の影響

NBT発色に及ぼすブドウ糖の影響を見るため、1000mg/dlのブドウ糖を含む4%結晶化HSA生理食塩水200 μ lに0.25mM NBT含有0.1M緩衝液(pH7~12)を2ml加えて37°Cで15分間反応させ、530nmにおける吸光度を測定した。更に、1000mg/dlから62.5mg/dlのブドウ糖を含む4%結晶化HSA生理食塩水200 μ lに0.25mM NBT含有0.1M炭酸緩衝液(pH10.8)を2ml加えて同様に反応させ吸光度を測定した。

5. 血清フルクトサミン濃度の測定

被検血清は空腹時採血後分離し-40°Cで保存した。標準曲線作成のため、0mM、0.5mM、1mM、2mMおよび4mM濃度のDMFを含む4%結晶化HSA生理食塩水を作り、DMF標準液とした。このDMF標準液あるいは被検血清200 μ lに0.25mM NBT含有0.1M炭酸緩衝液(pH10.8)2mlを加えて37°Cで反応させ、10分および15分後に530nmにおける吸光度(A_{10} および A_{15})を測定した。標準曲線はDMF標準液の10分および15分における吸光度の差($\Delta A = A_{15} - A_{10}$)をDMF濃度に対してプロットすることによ

albumin; IGT, impaired glucose tolerance; MMT, dimethylthiazol-diphenyltetrazolium bromide; NBT, nitroblue tetrazolium; OGTT, oral glucose tolerance test; TBA, thiobarbituric acid.

り作成した。被検血清の血清フルクトサミン濃度は DMF 標準液と同様にして得られた ΔA を標準曲線に当てはめることにより求め、DMF 当量として表現した。

1) 測定内および測定間誤差

血清フルクトサミン濃度が異なる 2 つのプール血清を 1 度の測定で 5 回ずつ測定 (intraassay) し、測定内誤差を求めた。また、濃度の異なる別の 2 つのプール血清を 5 回の異なる機会に測定 (interassay) し、測定間誤差を検討した。

2) 希釈および回収試験

血清フルクトサミン濃度が高値を示した血清を生理食塩水で倍々希釈して、標準曲線との平行性を検討した。また血清フルクトサミン濃度が明らかな 3 つの異なるプール血清に、それぞれ 0.5, 1 および 2mM 濃度の DMF 標準液を添加することにより回収試験を行った。

II. 臨床的検討

1. 糖尿病患者および健常者における血清フルクトサミン濃度

1) 対象

当院第 1 内科へ入院中あるいは外来通院中の糖尿病患者 77 名 (男 35 名, 女 42 名, 平均年齢 58.4 歳) と健常者 44 名 (男 20 名, 女 24 名, 平均年齢 49.2 歳) を対象とした。

2) 方法

健常者および糖尿病患者の空腹時血清を用いて前述の方法に従い血清フルクトサミン濃度を測定した。さらに、血清フルクトサミン濃度測定時より 0 週, 2 週, 4 週および 6 週前の空腹時血糖値との関係を検討した。また、36 検体につき血清フルクトサミン

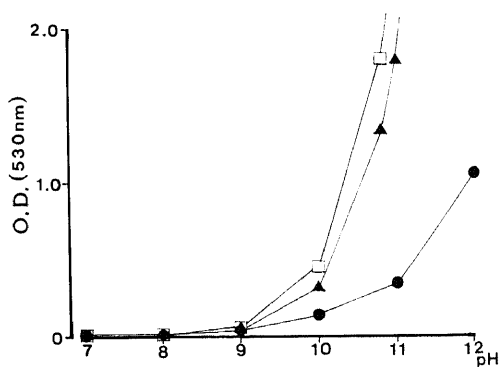


Fig. 1. Effect of pH on reducing activity of DMF and human serum albumin (HSA). □, 4mM DMF; ●, 4% HSA; ▲, 4mM DMF + 4% HSA.

濃度と同時に測定した glycated albumin との相関を、100 検体について血清フルクトサミン濃度と同時に測定した HbA_{1c} との相関を検討した。

2. 糖尿病スクリーニングにおける血清フルクトサミン濃度測定の有用性

1) 対象

837 名の検診受診者に於いて、3 回の受診のうち 2 回以上尿糖を指摘された 42 例 (平均年齢 44.0 ± 8.8 歳) を対象とした。

2) 方法

対象者全例に 75g 経口ブドウ糖負荷試験 (75g-OGTT) を施行し、日本糖尿病学会の血糖曲線の判定区分⁹⁾に基づいて正常型、境界型、糖尿病型の 3 群に分け、各群の空腹時血糖 (FPG), HbA_{1c} および血清フルクトサミン濃度を検討した。

血糖は glucose oxidase 法, HbA_{1c} は HPLC 法 (京都第一科学, Auto A_{1c}TM), glycated albumin は TBA (thiobarbituric acid) 法¹⁰⁾により測定した。

III. 推計学的検定

結果はことわりのない限り平均値 ± 標準誤差で示し、推計学的検討は回帰分析, Student's t-test および分散分析を用い、危険率 5% 以下を推計学的に有意と判定した。

成 績

I. 基礎的検討

1. NBT 発色の至適 pH と比色時の至適吸収波長

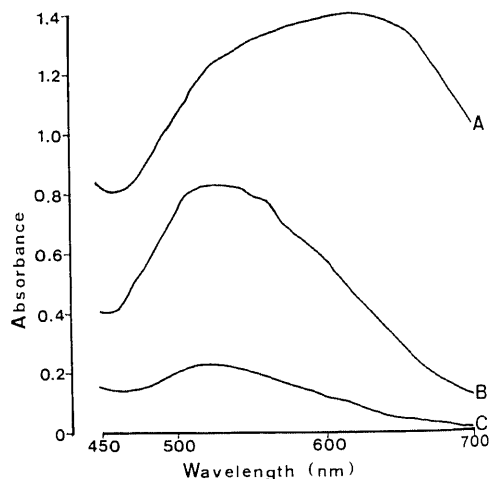


Fig. 2. Effect of albumin on absorption spectrum of reduced NBT. A, 4mM DMF; B, 4mM DMF + 4% HSA; C, 4% HSA.

の決定

生理食塩水に溶解した 4mM DMF による NBT の還元発色は、反応液の pH が 9 以下では認められず、pH10 では青紫色の発色を軽度認めるのみであった。しかし、pH が 10 を越えると発色は急激に増強し、pH11 における吸光度は scale out した。4% 結晶化 HSA 生理食塩水では、pH 10 以上のアルカリ溶液中では DMF と同様に NBT を発色させたが、pH 10 から 11 での発色の程度は軽度であった。DMF を 4% 結晶化 HSA 生理食塩水で溶解した場合、生理食塩水のみで溶解した場合に比し、NBT の発色は抑制された (図 1)。

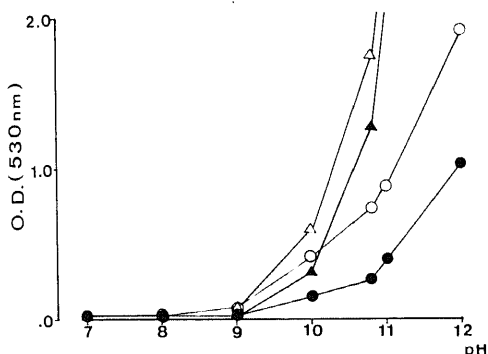


Fig. 3. Effect of two different preparations of human serum albumin (HSA) on the reduction of NBT by DMF. Δ , 4mM DMF+4% HSA (fraction V); \blacktriangle , 4mM DMF+4% HSA (crystallized and lyophilized); \circ , 4% HSA (fraction V); \bullet , 4% HSA (crystallized and lyophilized).

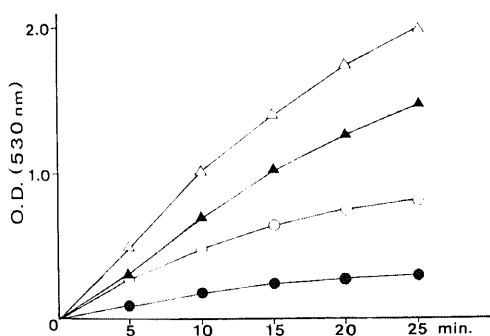


Fig. 4. Effect of two different preparations of human serum albumin (HSA) on time course of NBT reduction by DMF. Δ , 4mM DMF+4% HSA (fraction V); \blacktriangle , 4mM DMF+4% HSA (crystallized and lyophilized); \circ , 4% HSA (fraction V); \bullet , 4% HSA (crystallized and lyophilized).

DMF を pH10.8 で NBT と反応させた時の吸収スペクトラムは、DMF 溶液中の結晶化 HSA の有無によりそのパターンが大きく異なった (図 2)。反応液は結晶化 HSA が存在しない場合に最大の吸光度を示し、波長 610nm 前後でなだらかなピークを示したのに対し、4% 結晶化 HSA 存在下では吸光度は減少し、波長 530nm で比較的明瞭なピークを示した。4% 結晶化 HSA のみでは吸光度の変化はわずかであった。

2. ヒトアルブミン製剤の差

DMF 溶液中に含まれる HSA 製剤の違いによる NBT 発色の差に関する検討では、DMF を crude な

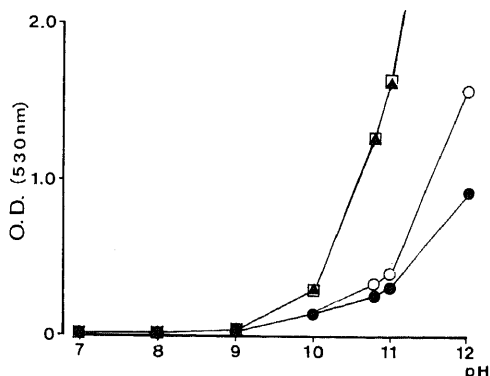


Fig. 5. Effect of glucose (1000 mg/dl) on the reduction of NBT by DMF. \bullet , 4% HSA; \circ , 4% HSA+1000 mg/dl glucose; \blacktriangle , 4mM DMF+4% HSA; \square , 4mM DMF+4% HSA+1000 mg/dl glucose.

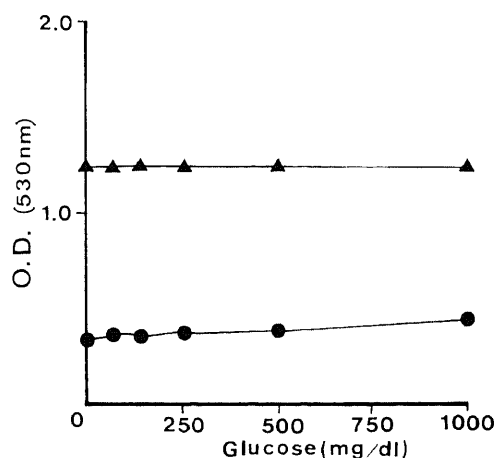


Fig. 6. Effect of various glucose concentrations on the reduction of NBT by DMF. \blacktriangle , 4mM DMF+4% HSA; \bullet , 4% HSA.

HSA (fraction V) 生理食塩水で溶解すると、結晶化 HSA 生理食塩水で溶解した場合に比し、pH 10 以上の吸光度は明らかに増大し、吸光度の差は 2 種の HSA 製剤をそれぞれ単独で反応させた時の吸光度の差にほぼ一致した (図 3)。この点を更に検討するため、pH 10.8 における反応を経時的に見ると、図 4 に示す如く、DMF 溶液の吸光度の差は 2 種の HSA 生理食塩水のみを反応させた時の吸光度の差に一致した。

3. ブドウ糖濃度の影響

4% 結晶化 HSA 生理食塩水に 1000mg/dl ブドウ糖を添加して NBT と反応させた時の吸光度は、pH 11 以上ではブドウ糖非添加時に比し大となったが、pH 10.8 では明らかな差は認めなかった。また、4mM DMF 含有 HSA 生理食塩水に 1000mg/dl ブドウ糖を添加しても、非添加時に比べて、pH 10.8 における吸光度には大きな差を認めなかった (図 5)。添加するブドウ糖濃度を 62.5mg/dl から 1000mg/dl の間で変化させても、同様に吸光度に差を認めなかった (図 6)。

4. 血清フルクトサミン濃度測定

DMF 標準液中の溶媒であるアルブミンの測定に及ぼす影響を補正するため、DMF が 0mM すなわち HSA のみで NBT と反応させた時の $\Delta A (=A_{15} - A_{10})$ を各 DMF 濃度での ΔA から差し引いて標準曲線を作成した。標準曲線は DMF 濃度の増加に比例して

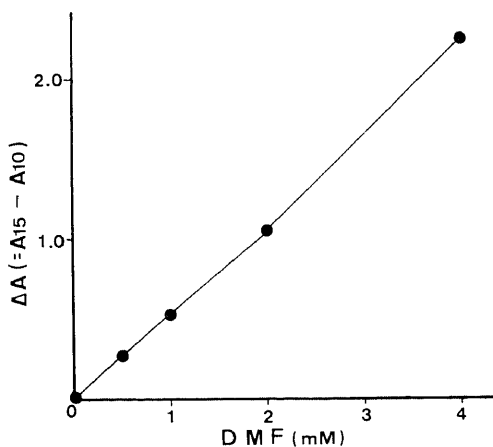


Fig. 7. Standard curve for fructosamine assay. Fructosamine standards were made up by adding indicated amounts of DMF to 4% HSA-containing 0.14M saline. $\Delta A (=A_{15} - A_{10})$ represents the absorbance change over the 5min. period between 10 and 15min. from the start of the reaction.

良好な直線性を示した (図 7)。

1) 測定内および測定間誤差

血清フルクトサミン濃度の異なる 2 つのプール血清を 1 度の測定でそれぞれ 5 回ずつ測定して得た平均濃度は 2.33mM および 4.65mM であり、変動係数 (CV) はそれぞれ 2.57% および 4.14% であった。さらに濃度の異なる別の 2 つのプール血清を 5 回の異なる機会に測定して得た平均濃度は 2.40mM および 4.06mM であり、CV はそれぞれ 3.40% および 5.56% であった (表 1)。

2) 希釈および回収試験

血清フルクトサミン濃度が高値を示した検体血清 (5.04mM) を用いて希釈試験を行った。血清を 8 倍まで希釈して得られた測定値は理論値とよく一致し良好な直線性を示した (図 8)。

血清フルクトサミン濃度 1.07mM (検体 A)、1.24mM (検体 B) および 1.59mM (検体 C) の血清に、それぞれ 0.5、1 および 2mM 濃度の DMF を添加すると、回収率は検体 A では 98%~100%、検体 B では 100%~102%、検体 C では 100%~104% であった (表 2)。

以上の結果より、NBT 反応液の pH を 10.8、吸収波長を 530nm、標準 DMF の溶液として 4% 結晶化

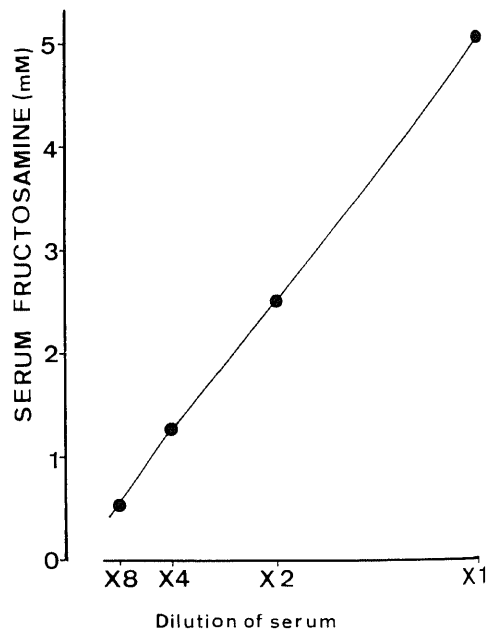


Fig. 8. Dilution curve of one serum sample. Serum, which contains 5.04mM fructosamine, was diluted with 0.14M saline.

HSAを用い、血清フルクトサミン濃度の測定を行った。

II. 臨床的検討

1. 糖尿病患者および健常者における血清フルクトサミン濃度

血清フルクトサミン濃度は健常者で平均 $2.36 \pm 0.42\text{mM}$ (Mean \pm 2SD), 糖尿病患者では $3.14 \pm 1.31\text{mM}$ と、糖尿病患者で有意に高値であった ($p < 0.001$) (図9). 血清フルクトサミン濃度の測定前0, 2, 4および6週の空腹時血糖値 (FPG) との間にはいずれも有意な正の相関関係が認められた ($p < 0.05 \sim 0.001$) が、特に測定前2~4週のFPGとの間に強い正の相関関係を示した (図10).

血清フルクトサミン濃度と glycated albumin との間には1次回帰式 $Y = 5.12X - 0.36$, 相関係数 $r = 0.708$ ($p < 0.001$) (図11), また、血清フルクトサミン濃度と HbA_{1c} の関係は1次回帰式 $Y = 0.23X + 1.52$, 相関係数 $r = 0.751$ ($p < 0.001$) (図12) と、それぞれ有意な正の相関関係が認められた。

2. 臨床例

症例1: 50歳男性, 単身赴任の会社員. 全身倦怠感および体重減少を主訴として来院し, 糖尿病を初めて指摘され入院した. 入院時, FPGは 214mg/dl , HbA_{1c} は 10.1% , 血清フルクトサミン濃度は 3.47mM と、いずれも高値であった. 厳格な食事療法および運動療法により FPG は急速に改善した. FPG 正常化後22日目には血清フルクトサミン濃度は 2.71mM と正常化し, その後更に低下した. 一方, HbA_{1c} は FPG 正常化後約2ヶ月経て 6% となり正常化した (図13左).

症例2: 44歳男性, 会社員, 日常生活の乱れにより血糖コントロール不良となり入院した. 入院時, FPG 218mg/dl , HbA_{1c} 9.1% , 血清フルクトサミン濃度 3.65mM であったが, 食事療法の徹底により入院後10日目には FPG 130mg/dl となり, 入院後20日目には血清フルクトサミン濃度が 2.70mM と正常化した. 一方, HbA_{1c} は入院後45日目に 6.2% となり, 以後さらに低下した (図13右).

Table 1. Reproducibility of fructosamine assay

No.	a) intraassay variation		b) interassay variation	
	I	II	I	II
1	2.34	4.81	2.41	4.91
2	2.38	4.54	2.49	4.48
3	2.32	4.87	2.41	4.84
4	2.37	4.40	2.27	4.50
5	2.23	4.65	2.44	4.30
Mean (mM)	2.328	4.654	2.404	4.604
SD (mM)	0.060	0.193	0.256	0.256
CV (%)	2.566	4.140	3.399	5.558

- a) Each pooled serum was assayed five times in the same batch.
 - b) Each pooled serum was assayed in duplicate in five different batches.
- CV; coefficient of variation.

Table 2. Recovery test of fructosamine assay

Added DMF (mM)	Sample A		Sample B		Sample C	
	assay value (mM)	recovery (%)	assay value (mM)	recovery (%)	assay value (mM)	recovery (%)
0	1.07		1.24		1.59	
1	1.57	100	1.77	102	2.10	100
2	2.02	98	2.25	100	2.69	104
3	3.07	100	3.27	101	3.70	103
Mean		99		101		102

Known concentrations of DMF were added to three serum samples.

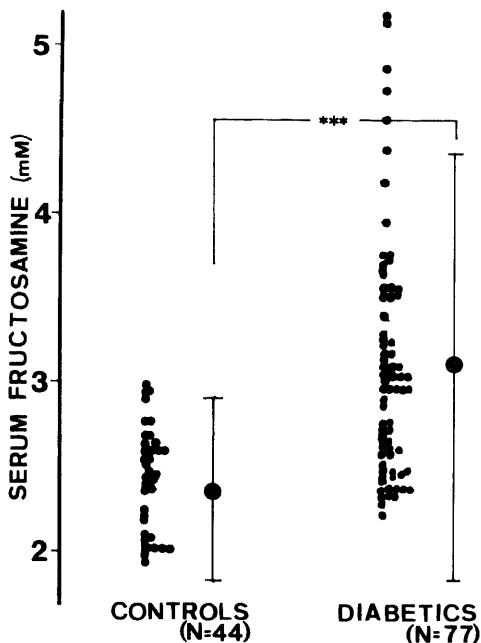


Fig. 9. Serum fructosamine concentrations of control and diabetic sera. Vertical bars represent mean \pm 2SD. *******, $p < 0.001$ by Student's *t* test.

3) 糖尿病スクリーニングにおける血清フルクトサミン濃度測定の有用性

集団検診における尿糖陽性者42例の75 g OGTTの血糖曲線は糖尿病型10例 (23.6%), 境界型20例 (47.6%), 正常型12例 (28.6%)であった. 平均FPGは糖尿病型 158.1 ± 13.7 mg/dl, 境界型 $99.5 \pm$

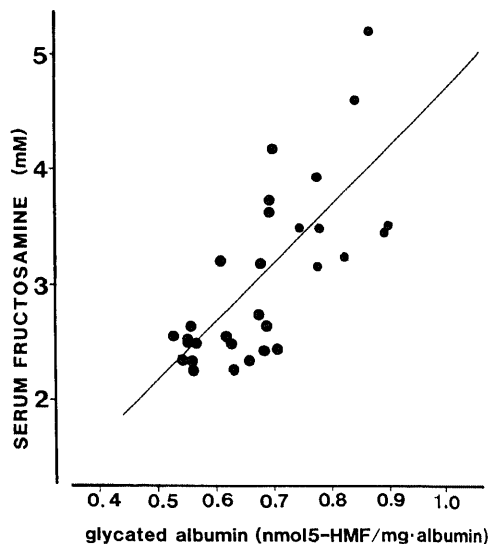


Fig. 11. Correlation between serum fructosamine and glycated albumin concentrations. $N = 36$, $Y = 5.12X - 0.36$, $r = 0.708$, $p < 0.001$

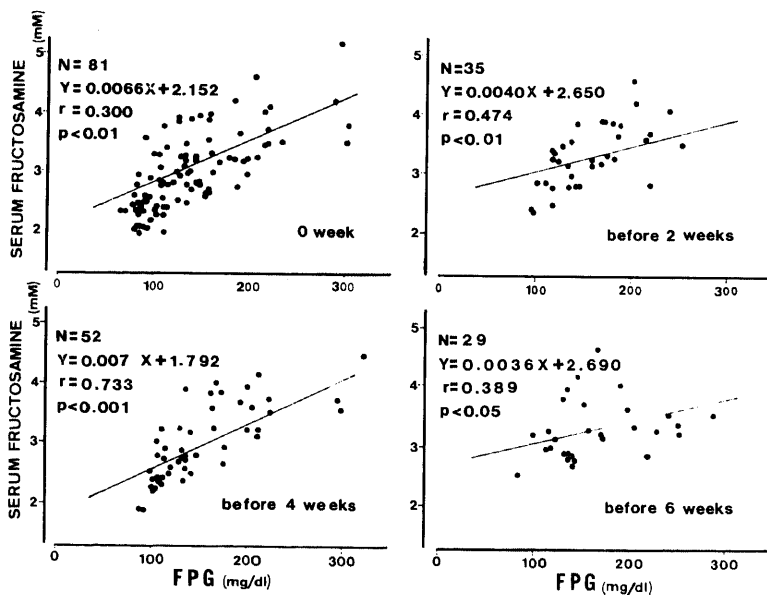


Fig. 10. Correlation between serum fructosamine and fasting plasma glucose (FPG) concentrations.

2.2mg/dl, 正常型 94.1 ± 1.7 mg/dl であり, 糖尿病型では境界型, 正常型に比し有意に高値であった ($p < 0.001$) が, 境界型と正常型との間には有意差を認めなかった. また, 平均 HbA_{1c} は糖尿病型 $6.91 \pm 0.63\%$, 境界型 $4.75 \pm 0.09\%$, 正常型 $4.50 \pm 0.08\%$ であり, FPG と同様に糖尿病型では他の 2 群に比し有意

に高値であった ($p < 0.001$) が, 境界型と正常型の間には有意差を認めなかった (図14). これに対し, 血糖フルクトサミン濃度は糖尿病型 3.52 ± 0.28 mM, 境

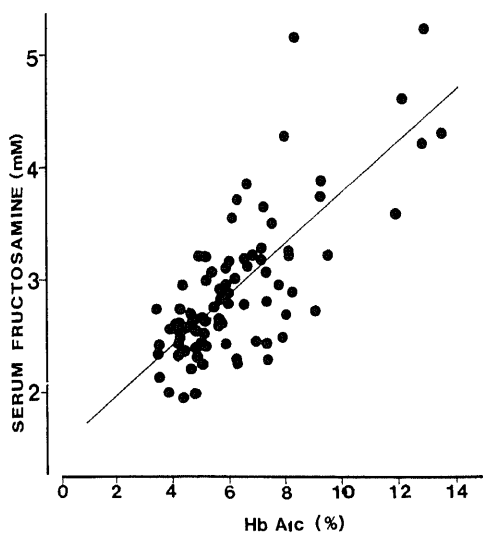


Fig. 12. Correlation between serum fructosamine and glycated hemoglobin (HbA_{1c}) concentrations. $N=100$, $Y=0.23X+1.52$, $r=0.751$, $P<0.001$

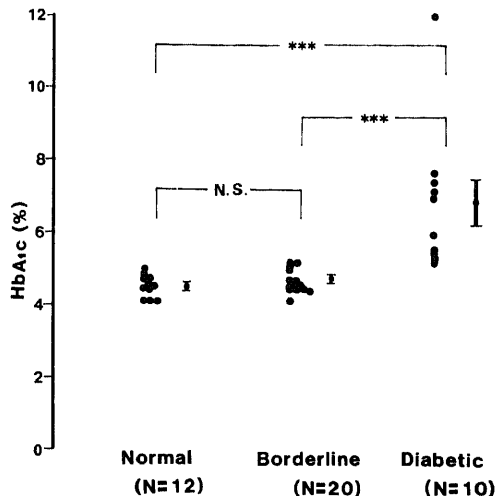


Fig. 14. Distribution of values of glycated hemoglobin (HbA_{1c}) according to the results of 75g oral glucose tolerance test (OGTT). The results of the 75g OGTT were classified according to the diagnostic criteria of the Japan Diabetic Society. Vertical bars represent mean \pm S.E.M.. N.S., not significant; ***, $p < 0.001$.

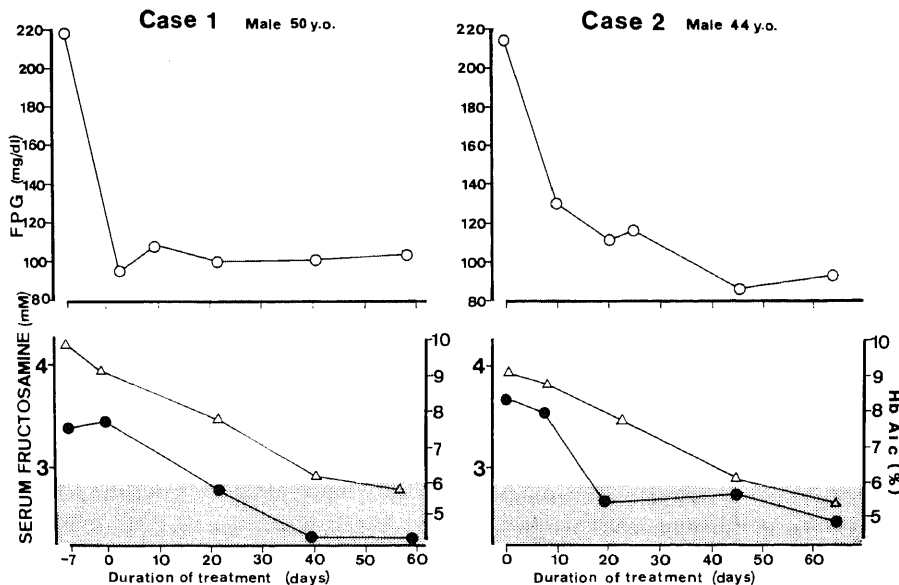


Fig. 13. Temporal relation between serum fructosamine and glycated hemoglobin (HbA_{1c}) concentrations after treatment in two diabetic patients. ●, serum fructosamine concentration; \triangle , HbA_{1c} .

界型 $2.56 \pm 0.05 \text{ mM}$ 、正常型 $2.31 \pm 0.06 \text{ mM}$ であり、糖尿病型では境界型や正常型に比し有意に高値 ($p < 0.001$) であるのみならず、境界型と正常型との間にも有意な差を認めた ($p < 0.05$) (図15)。

考 察

生体内ではブドウ糖と蛋白の非酵素的な結合 (glycation) により Amadori 化合物であるケトアミンが生ずる。その代表例として HbA_{1c} がよく知られ、臨床的に長期の血糖コントロール状態を示す指標として、広く利用されている^{9,10}。血清蛋白や血清アルブミンの glycation についても主に TBA 法により検討がなされ^{9,10}、 HbA_{1c} とは異なった比較的短期間の血糖コントロール状態を反映するものと考えられている。しかし、従来の TBA 法を中心とした測定法は測定系へのブドウ糖の干渉を除去するため、血清を透析したり⁹、酸を加えて蛋白を沈澱させる¹⁰などの前処理が必要であり、更に測定法の繁雑さも加わり、 HbA_{1c} ほど臨床的に普及するには至っていない。今回、著者は血清蛋白の glycation より生じた ketoamine (フルクトサミン) がテトラゾリウム塩を還元発色させることを利用した糖化蛋白 (血清フルクトサミン濃度) の測定法⁹について基礎的および臨

床的面から検討した。

本測定法では、ketoamine (フルクトサミン) の還元能を検出するため被還元物質としてテトラゾリウム塩の1つである NBT を用いた。NBT は還元されることにより、青紫色のホルマザンになることが知られており¹¹、この生成したホルマザンを比色定量することにより血清フルクトサミン濃度を求めるものである。標準物質には合成 Amadori 転移生成物である DMF (Sigma 社製) を用いた。図1に示す如く、反応液の pH が10以上になると NBT は発色し、アルカリ性溶液中での ketoamine の還元作用¹¹を確認した。アルブミン自体にも DMF と同様な NBT の還元発色作用を認めたが、DMF 溶液中にアルブミンが同時に存在する条件下では、DMF 単独の場合に比し、吸光度はむしろ低下する傾向にあった (図1)。また、吸収スペクトラムにおいても、アルブミンが同時に存在した場合、DMF 単独の場合に比し、全般的に低い吸光度を示した (図2)。この原因については、以下2つの可能性が考えられる。第1はアルブミン添加によりホルマザンの溶解度が変化する可能性である。NBT 還元により生じたホルマザンは凝集して析出し易く難溶性となる¹²ため、遠心すると黒色の沈澱が生じたが、DMF 溶液中にアルブミンを加えて反応させた場合、このような沈澱を認めず、アルブミン非存在下では凝集析出したホルマザンにより光が散乱する結果、吸光度が高くなることが考えられる。他の1つの可能性として、NBT とアルブミンの相互作用が考えられる。すなわち、同時に存在するアルブミンが NBT と結合し、NBT の還元されるべき部位がマスクされることにより反応が阻害される可能性⁹である。Johnson ら⁹は、DMF と NBT を反応させた後にアルブミンを添加しても吸光度スペクトラムのパターンに変化がないことから、後者の可能性を考えている。以上の如く、アルブミン非添加時のホルマザンの難溶性や吸光度スペクトラムのパターンなどから DMF 溶解液中にアルブミンを添加することが必要であり、測定時の吸収波長は 530nm が至適と考えられた。

DMF 溶解液に添加するヒト血清アルブミン (HSA) 製剤の違いが NBT の還元発色に及ぼす影響を検討した著者の成績では、結晶化 HSA に比し、crude な HSA (fraction V) を用いた場合の吸収度が高値を示した。しかし、この吸光度の差は、両アルブミン製剤をそれぞれ単独で NBT と反応させたときの吸光度の差にほぼ一致したことから、アルブミン製剤中に含まれる還元物質の量的あるいは質的差に

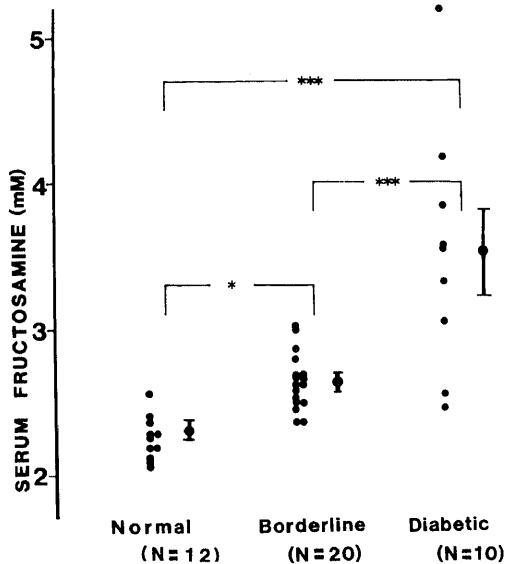


Fig. 15. Distribution of values of serum fructosamine concentration according to the results of 75-g OGTT.

Vertical bars represent mean \pm S.E.M.

*, $P < 0.05$; ***, $p < 0.001$. by ANOVA followed by multiple comparisons.

よる可能性が大きいと考えられた。Lloyd¹³⁾も今回の成績と同様に、液状のアルブミン製剤を使用した場合と凍結乾燥アルブミン製剤を使用した場合とではDMF標準液の吸光度に差があることを報告している。この点に関し、Cainesら¹⁴⁾は市販のアルブミン製剤をboronate affinity columnに通して、糖化アルブミンを除去した後に使用すると、吸光度に差がなくなることを明らかにし、アルブミン製剤中に混在する糖化アルブミン量の差が大きく関係することを指摘した。

血清中に含まれるブドウ糖の測定系への影響を見るため、結晶化HSA含有DMF溶液中に1000mg/dlのブドウ糖を添加してNBTと反応させたが、少なくともpH11以下では非添加時の吸光度と明らかな差を認めなかった。しかし、pH11を越えるとブドウ糖のNBTに対する還元発色作用が出現するため(図5)、反応液のpHは11以下が望ましいと考えられた。

以上の基礎的検討データをもとに、血清フルクトサミン濃度の測定条件を反応液のpHは10.8、吸収波長は530nm、反応温度は37°Cに設定した。反応時間を15分として、反応後10分と15分の吸光度の差を用いた理由は、血中に存在する他の還元物質による干渉作用が反応開始後10分位までの比較的初期に大きく、それ以降では減ずることが知られている¹⁵⁾ためである。

検量線の作成に際し、上述したアルブミン製剤の違いによる影響を除去するため、0mM濃度のDMFすなわちHSAのみで反応させた場合の $\Delta A (= A_{15} - A_{10})$ を0として各濃度における ΔA を補正¹⁶⁾した。検量線はDMF濃度が0mMから4mMまで良好な直線性を示し、簡便のためにはDMF濃度が0mMと4mMの2点のみを測定することでも支障ないものと思われた。測定系の測定内誤差および測定間誤差の変動係数(CV)、回収試験、希釈試験の成績はいずれもほぼ満足できるものであり、実用に足る信頼性の高いものと考えられた。

今回の測定では、Johnsonの原法⁹⁾に準じて標準物質として合成Amadori転移生成物であるDMFを用いたが、最近彼らはDMFのNBTに対する反応が測定条件のわずかな違いにより鋭敏に左右されることから、標準物質としてDMFに代わって糖化アルブミンを使用している¹⁵⁾。しかし、今回の著者の成績では測定間誤差も比較的小さく、糖化アルブミン作成の手数や作成した糖化アルブミンの含量を再びDMFを用いて較正することなどの繁雑さを考慮すると、測定条件を吟味すれば、原法でも十分に実用に値す

と考えられた。また、Cainesら¹⁴⁾は糖化アルブミンを標準物質とし、還元発色剤としてNBTの代わりにdimethylthiazol-diphenyltetrazolium bromide(MMT)を用いる糖化アルブミン測定法を報告したが、あらかじめ血清検体のアルブミンをaffinity chromatographyで分離する操作を必要とし、大量検体の処理には不適と思われた。

臨床的検討において、糖尿病患者の血清フルクトサミン濃度は対照群に比し有意に高値であり、過去2週から4週前のFPGとの間に強い正の相関関係が認められた(図10)。また、臨床例(図13)から明らかかなように、血糖が急激に改善した症例では、HbA_{1c}の低下に先立ち血清フルクトサミン濃度の低下が認められ、Bakerら¹⁶⁾も同様な成績を報告している。一般にHbA_{1c}は過去1~3ヶ月の血糖コントロール状態を反映すると考えられている¹⁷⁾が、これらの成績は、HbA_{1c}と比較して、血清フルクトサミン濃度がより短期間の血糖コントロール状態を反映していることを示し、従来のTBA法を用いて測定した糖化蛋白や糖化アルブミンの動態¹⁷⁾とほぼ一致するものである。実際に、TBA法によって測定した糖化アルブミンと血清フルクトサミン濃度との間には $r=0.708$ と良好な相関関係が認められた(図11)ことからこの考えが支持されよう。Lloydら¹³⁾も、aminophenylboronic acid affinity chromatography法を用いて糖化蛋白や糖化アルブミンを測定し、今回と同様に測定した血清フルクトサミン濃度との相関を検討したところ、いずれも $r=0.91$ と極めて良好な相関関係が認められたと報告している。

本研究では、血清フルクトサミン濃度とHbA_{1c}の間にも $r=0.75$ と有意な正の相関関係が認められた。Bakerら¹⁶⁾、Lloydら¹³⁾およびHindleら¹⁸⁾も同様にHbA₁との間に $r=0.70\sim 0.80$ で良好な相関関係を認めている。また、TBA法やboronic acid chromatography法で測定した糖化蛋白とHbA_{1c}の間にも同様な相関関係を認めるとの報告が多い¹⁷⁾。一方、Cainesら¹⁴⁾は、血清中からあらかじめaffinity columnで血清アルブミンを分離した後、その中に含まれる糖化アルブミンを今回と同様にketoamineのテトラゾリウム塩に対する還元作用を利用して測定した結果、TBA法を用いて測定した糖化アルブミン値とは強く相関($r=0.97$)したが、HbA_{1c}との間には弱い相関($r=0.35$)しか認められなかったことを報告している。以上の様に、必ずしも成績は一致しないが、血清フルクトサミン濃度がHbA_{1c}と比較的良好に相関する理由として、以下

のいくつかの可能性が考えられ、第1は、血清フルクトサミン濃度が、血清中に含まれる糖化アルブミンのみならず、アルブミンより半減期の長い血清蛋白成分の glycation をも含めた“total” serum glycated proteinとして、その平均を反映していると考えられることから、血清フルクトサミン濃度と HbA_{1c} との相関関係が糖化アルブミンと HbA_{1c} との相関関係よりも強くなった可能性がある。第2は、対象とした糖尿病患者の差異に起因する可能性である。対象とした糖尿病患者の多くが、比較的長期にわたり安定した血糖コントロール状態にある場合には、血清フルクトサミン濃度と HbA_{1c} とは良好な相関関係を示すと思われる。逆に、対象患者中に臨床例(図13)で示したような血糖が比較的急激に改善された例や急激に悪化した例を多く含んだ場合には、血清フルクトサミン濃度と HbA_{1c} との相関関係が弱まると推測される。従って、余り急激な血糖変動のない安定型糖尿病患者では、血清フルクトサミン濃度が HbA_{1c} の代用として十分に使用し得る可能性を示唆している。

境界型の耐糖能異常を呈する例では、糖尿病へ進展する率の高いことが知られ、Kadowakiら²⁰⁾によれば、日本糖尿病学会の診断基準⁹⁾により境界型を呈した288人の5～10年間の経過観察により、48人(16.7%)が顕性糖尿病へと進展したと報告している。また、75g OGTTのWHOによる診断基準²¹⁾でIGTを呈するものは虚血性心疾患²²⁾やその他の動脈硬化性疾患^{23,24)}の発生頻度が有意に高いことが明らかにされている。このような観点から、軽度耐糖能異常者(境界型やIGT)をスクリーニングすることが重要と考えられるが、スクリーニングを目的に、全例にGTTを行うことは容易ではない。そこで、集団検診時の糖尿病患者あるいは耐糖能異常患者のスクリーニングにおける血清フルクトサミン濃度測定の有用性を検討するため、75g OGTTの血糖の判定区分との関係を見ると、血清フルクトサミン濃度は糖尿病型、境界型のいずれにおいても、正常型に比し、有意に高値を示した。同様の試みはBakerら¹⁰⁾によっても行われているが、今回の成績とは異なりWHOの診断基準⁹⁾によるimpaired glucose tolerance (IGT)群と正常群の間では、血清フルクトサミン濃度に有意な差を認めなかったと報告している。このように成績が異なる理由は明らかではないが、用いた判定区分の違いによるものかも知れない。一方、HbA_{1c}値については、正常型と境界型との間で有意差を認めなかった。Hallら²⁵⁾はHbA_{1c}の

不安定部分(labile HbA_{1c})を除去したstable HbA_{1c}を用いて、75g OGTTの血糖曲線の判定区分との関係を検討した結果、糖尿病、IGTおよび正常型の各群間でstable HbA_{1c}値に有意差を認め、stable HbA_{1c}の測定は糖尿病やIGTのスクリーニングに有用と報告しているが、他の報告の多く^{26)~28)}は、HbA_{1c}を軽度の耐糖能異常(境界型)のスクリーニングとして用いるには不十分と述べている。今回の成績は、GTTの施行に代わって血清フルクトサミン濃度を測定することにより、集団検診時の耐糖能異常者をスクリーニングし得る可能性を示唆しているが、今後更に詳細な検討が必要と思われた。最後に、血清フルクトサミン濃度は治療効果を早期に評価するうえで有用な指標と考えられ、従来のHbA_{1c}や血糖値と組み合わせることにより、より綿密な血糖コントロール状態の把握に役立つものと思われた。また、その測定法は従来のNBT法などによる糖化蛋白の測定法に比し迅速かつ簡便であり、また安価で必要とする検体量も少ないことより、測定の自動化も容易と考えられた。

結 論

血清フルクトサミン濃度測定法の基礎的検討および臨床的有用性に関する検討により、以下の結果を得た。

1) 血清フルクトサミン濃度の測定は簡便であり、測定内および測定間誤差は少なく、希釈試験、回収試験も良好であった。

2) 糖尿病患者における血清フルクトサミン濃度は、健常者に比し有意に高値であった。

3) 血清フルクトサミン濃度と測定前2～4週の空腹時血糖との間に強い正の相関関係が認められた。

4) 血清フルクトサミン濃度と糖化アルブミンおよびHbA_{1c}の間には有意な正の相関関係が認められた。

5) 臨床例では血糖コントロールの改善に伴い、早期に血清フルクトサミン濃度は低下し、これに遅れてHbA_{1c}が低下した。

6) 血清フルクトサミン濃度は、75g OGTTの血糖曲線が正常型を呈する群に比し、糖尿病型や境界型を呈する群で有意に高値であった。

以上より、血清フルクトサミン濃度はHbA_{1c}よりも短い期間の血糖コントロール状態を反映しているものと推測された。血清フルクトサミン濃度の測定は簡便で、自動化も容易と考えられ、HbA_{1c}や血糖値と組み合わせることにより、より綿密な血糖コン

トロール状態の把握が可能になると思われた。また、糖尿病や耐糖能異常（境界型）のスクリーニングにおける有用性も示唆された。

謝 辞

稿を終えるに臨み、御指導、御校閲を賜りました恩師服部信教授に深甚なる謝意を捧げます。また、終始、御指導、御援助を賜りました金沢大学医学部内科学第一講座能登裕講師に深甚なる謝意を捧げます。併せて、本研究に御協力頂きました金沢大学内科学第一講座糖尿病グループの各位に感謝致します。

本論文の要旨の一部は第29回、第30回日本糖尿病学会において発表した。

文 献

- 1) Bunn, H. F., Haney, D. N., Gabbay, K. H. & Gallop, P. M.: Further identification of the nature and linkage of the carbohydrate in hemoglobin A_{1c}. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **67**, 103-109 (1975).
- 2) Fluckiger, R. & Winterhalter, K. H.: In vitro synthesis of hemoglobin A_{1c}. *FEBS Lett.*, **71**, 356-360 (1976).
- 3) Jovanovic, L. & Peterson, C. M.: The clinical utility of glycosylated hemoglobin. *Am. J. Med.*, **70**, 331-338 (1981).
- 4) Gabby, K. H., Hasty, K., Breslow, J. L., Ellison, R. C., Bunn, H. F. & Gallop, P. M.: Glycosylated hemoglobins and long-term blood glucose control in diabetes mellitus. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **44**, 859-864 (1977).
- 5) Dolfofer, R. & Wieland, O. H.: Increased glycosylation of serum albumin in diabetes mellitus. *Diabetes*, **29**, 417-422 (1980).
- 6) Dolfofer, R. & Wieland, O. H.: Improvement of the thiobarbituric acid assay for glycosyl protein determination. *Clin. Chim. Acta*, **112**, 197-204 (1981).
- 7) Dolfofer, R. & Wieland, O. H.: Glycosylation of serum albumin: elevated glycosyl-albumin in diabetic patients. *FEBS Lett.*, **103**, 282-286 (1979).
- 8) Johnson, R. N., Metcalf, P. A. & Baker, J. R.: Fructosamine: a new approach to the estimation of serum glycosyl protein. An index of diabetic control. *Clin. Chim. Acta*, **127**, 87-95 (1982).
- 9) 小坂樹徳, 赤沼安夫, 後藤由夫, 羽倉稜子, 平田幸正, 川手亮三, 葛谷 健, 三村悟郎, 中山秀隆, 坂本信夫, 繁田幸男: 糖尿病の診断に関する委員会報告. *糖尿病*, **25**, 859-862 (1982).
- 10) Ma, A., Naughton, M. A. & Cameron, D. P.: Glycosylated plasma protein: a simple method for the elimination of interference by glucose in its estimation. *Clin. Chim. Acta*, **115**, 111-117 (1981).
- 11) Beauchamp, C. & Eridovich, I.: Superoxide dismutase: Improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Anal. Biochem.*, **44**, 276-287 (1971).
- 12) 今成登志男, 広田元子, 宮崎元一, 早川和一, 田村善藏: Super oxide dismutase 活性測定法の改良. *医学のあゆみ*, **101**, 496-497 (1977).
- 13) Lloyd, D. R., Nott, M. & Marples, J.: Comparison of serum fructosamine with glycosylated serum protein (determined by affinity chromatography) for the assesment of diabetic control. *Diabetic Medicine*, **2**, 474-478 (1985).
- 14) Caines, P. S. M., Thibert, R. J. & Draisay, T. F.: Colorimetric determination of non-enzymatically glycosylated albumin. *Clin. Biochem.*, **19**, 26-30 (1985).
- 15) Baker, J. R., Metcalf, P. A., Johnson, R. N., Newman, D. & Rietz, P.: Use of protein-based standards in automated colorimetric determinations of fructosamine in serum. *Clin. Chem.*, **31**, 1550-1554 (1985).
- 16) Baker, J. R., O'Connor, J. P., Metcalf, P. A. & Johnson R. N.: Clinical usefulness estimation of serum fructosamine concentration as a screening test for diabetes mellitus. *Br. Med. J.*, **287**, 863-867 (1983).
- 17) Kennedy, I., Mehl, T. D., Riley W. J. & Merimee, T. J.: Non-enzymatically glycosylated serum protein in diabetes mellitus: An index of short-term glycaemia. *Diabetologia*, **21**, 94-98 (1981).
- 18) Hindle, E. J., Rostron, G. M., Clark, S. A. & Gatt, J. A.: Serum fructosamine and glycosylated haemoglobin measurements in diabetic control. *Arch. dis. child.*, **61**, 113-117 (1986).
- 19) Yatscoff, R. W., Tevararwerk G. J. M. & Macdonald, J. C.: Quantification of non-enz-

ymatically glycated albumin and total serum protein by affinity chromatography. *Clin. Chem.*, **30**, 4469 (1984).

20) **Kadowaki, T., Miyake, Y., Hagura, R., Akanuma, Y., Kajinuma, H., Kuzuya, N., Takaku, F. & Kosaka, K.**: Risk factors for worsening to diabetes in subjects with impaired glucose tolerance. *Diabetologia*, **26**, 44-49 (1984).

21) **WHO expert committee on diabetes mellitus. Second report.** WHO Tech. Rep. Ser., No. 646, 1-80 (1980).

22) **Fuller, J. H., Shipley, M. J., Rose, J., Jarrett, R. J. & Keen H.**: Coronary-heart-disease risk and impaired glucose tolerance. The whitehall study. *Lancet*, **8183**, 1373-1376 (1980).

23) **National diabetes data group**: Classification and diagnosis of diabetes mellitus and other categories of glucose intolerance. *Diabetes*, **28**, 1039-1059 (1979).

24) **Keen, H., Jarret, R. J. & Alberti, K. G. M. M.**: A new look at diagnostic criteria.

Diabetologia, **16**, 283-285 (1979).

25) **Hall, P. M., Cook, J. G., Sheldon, J., Rutherford, S. M. & Gould, B. J.**: Glycosylated hemoglobins and glycosylated plasma proteins in the diagnosis of diabetes mellitus and impaired glucose tolerance. *Diabetes Care*, **7**, 147-150 (1984).

26) **Kesson, C. M., Young, R. E., Talwar D., Whitelaw, J. W. & Robb, D. A.**: Glycosylated hemoglobin in the diagnosis of non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Diabetes care*, **4**, 395-398 (1982).

27) **Santiago, J. V., Davis, J. E. & Fisher, F.**: Hemoglobin A_{1c} levels in a diabetes detection program. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **47**, 578-580 (1978).

28) **Koenig, R. K., Peterson, C. M., Kilo, C., Cerami, A. & Williamson, J. R.**: Hemoglobin A_{1c} as an indicator of the degree of glucose intolerance in diabetes. *Diabetes*, **25**, 230-232 (1976).

Clinical Usefulness of Estimation of Serum Fructosamine Concentration in Diabetes Mellitus Akira Sanada, Department of Internal Medicine (I), School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920—J. *Juzen Med. Soc.*, **97**, 580—593 (1988)

Key words: fructosamine, glycated albumin, HbA_{1c}, diabetic control

Abstract

In vivo, glucose bound to protein by aldimine linkage undergoes an Amadori rearrangement to the ketoamine (generically termed fructosamine) and fructosamine is known to act as a reducing agent in alkaline solution. The present study was undertaken to investigate the optimal conditions for, and the clinical usefulness of, serum fructosamine assay. The assay was based on the ability of fructosamine to reduce the dye nitroblue tetrazolium (NBT) to its colored formazan with measurement of the subsequent change in optical density. A synthetic fructosamine (1-deoxy-1-morpholino-D-fructose, DMF) was used as the standard, and optimal conditions for the assay were established as follows: the appropriate pH was 10.8, reaction time 15 min., temperature 37°C and optical wavelength 530nm. The coefficients of variation (CV) for within-run and between-run were 2.6~4.1% and 3.4~5.5%, respectively. The serum fructosamine concentration was measured in 77 diabetic and 44 control subjects. The diabetic sera showed significantly higher levels of fructosamine than those of the controls: 3.14 ± 1.3 (mean \pm 2SD) mM vs. 2.36 ± 0.4 mM ($p < 0.001$). Serum fructosamine concentrations were significantly correlated with glycated albumin ($r = 0.708$, $p < 0.001$), glycated haemoglobin (HbA_{1c}) ($r = 0.751$, $p < 0.001$) and fasting plasma glucose levels for the preceding two weeks ($r = 0.474$, $p < 0.01$) and four weeks ($r = 0.737$, $p < 0.001$), which indicated that serum fructosamine concentration was an

index of intermediate term (two to four weeks) blood glucose control. In the 42 subjects who showed positive urine glucose in a physical check-up, 75-g oral glucose tolerance test (OGTT) was performed and HbA_{1c} and serum fructosamine concentration were measured simultaneously. The subjects were divided into three groups (diabetic: D, borderline: B, and normal: N) according to the Japan Diabetic Society diagnostic criteria for 75-g OGTT. Serum fructosamine concentrations of groups D, B, and N were 3.52 ± 0.28 (mean \pm S.E.M.), 2.56 ± 0.05 and 2.31 ± 0.06 mM, respectively, and differed significantly ($p < 0.05 \sim 0.001$) among the three groups. By contrast, neither the fasting plasma glucose nor the HbA_{1c} level was significantly different between groups B and N. The fructosamine assay was simple and cheap, and may provide a useful tool for monitoring blood glucose control and screening for glucose intolerance.