

健康調査(診査)에 있어서의 Glycosylated Hemoglobin A의 測定法과 臨床的 意義

大韓生命保險株式會社 嶺南總局 附屬醫院

黃 南 喆

Procedures and Clinical Meaning of Glycosylated Hemoglobin A in Medical Examination

Young-Nam Medical Dept., Daehan Life Insurance Co. Ltd.

Whang, Nam Chul, M.D.

表 1. Glycosylated HbA의 種類

머 리 말

糖負荷試驗에서 診斷할 수 있는 것은 糖尿病이 아니라 糖尿病狀態 또는 高血糖의 狀態이다. 血糖値는 正常値에서 異常値까지 量的으로 連續的으로 變化하는 것이므로 正常値와 異常値를 어느 一線에서 劃然히 區別하는 것은 不可能하다.

糖尿病 患者의 血糖値는 飲食物의 攝取, 運動 또는 스트레스 등의 여러 가지 要因에 依하여 隨時로 變動하기 때문에 糖尿病調節의 基準으로서의 信憑性에는 限界가 있다.¹⁾

最近에 Glycosylated Hemoglobin A(GHbA)의 測定法이 普遍化됨에 따라 GHbA値가 糖尿病 患者 血液에서 増量한다는²⁾ 것과, 特히 長期間의 血糖調節의 指標로서의 有用性에서³⁾ 日常臨床에 利用되고 있다.

여기에서는 먼저 GHbA에 關한 概要와 그 測定法 및 臨床的 意義를⁴⁾ 概說코자 한다.

I. GHbA의 概要

1. GHbA의 種類(表 1)

Hb은 protoporphyrin iron인 heme과 globin 이라 불리어지는 蛋白質으로써 構成되어 있다.

Globin은 2個의 subunit로서 構成되어 있어 subunit의 아미노酸 配列의 相違에 따라 胎兒性 Hb(HbF), 成人 Hb(HbA)와 HbA₂, HbA₃ 등의

		HbA Subunit 構造	
Total GHbA	HbA ₁	HbA _{1a1}	$\beta \alpha_2(\beta\text{-N-FDP})_2$
		HbA _{1a2}	$\beta \alpha_2(\beta\text{-N-G6P})_2$
		HbA _{1b}	Deamination of HbA _{1c} ?
		HbA _{1c}	$\beta \alpha_2(\beta\text{-N-G1c})_2$
		HbA ₀	α, β ?

Hb으로 分離되어 있다. HbA의 globin의 subunit는 α 및 β -chain의 2種類的 polypeptide이고 HbA는 이들이 한 쌍씩 重合된 橢圓體狀分子로 $\alpha_2 \beta_2$ 로 表示된다.

HbA를 陽이온交換樹脂로서 弱酸性緩衝液을 使用하여 column chromatography를 施行하면, HbA의 主成分이 溶出되기 前에 微量의 Hb成分이 溶出된다. 이 微量 Hb成分은 糖成分과 結合하고 있는 것 外는 構造가 HbA와 全히 同一하므로 이를 糖化血色素 즉 glycosylated hemoglobin A(GHbA)라 한다.

이들은 column에서 溶出되는 順으로 HbA_{1a}, HbA_{1b}, HbA_{1c}로 命名되었고⁵⁾, HbA_{1a}는 HbA_{1a1}과 HbA_{1a2}로 分類되어 있다.⁶⁾ 이들은 minor Hb 또는 fast Hb이라 불리어졌으나 現在로는 이들의 總稱을 HbA₁이라하며 여기 對해서 HbA의 主成分을 HbA₀라 부르고 있다.

HbA₁ 중에서 HbA_{1c}가 量的으로 가장 많고, 正常人の HbA의 4~6%를 차지하나 다른 HbA₁

表 2. HbA_{1c}의 構造

Glucose	Aldimine	Ketoamine
HC=O	HC=N-H-Valyl	CH ₂ NH-Valyl
HCOH	HCOH	C=O
HCOH	HCOH	HCOH
HCH+H ₂ N-Valyl	↔HCH Amadori	HCH
HCH	HCH→	HCH
CH ₂ OH	CH ₂ OH	CH ₂ OH

은 1~2%에 不過하다.

2. HbA_{1c}의 構造 및 合成

HbA_{1c}는 globin의 β-chain의 N-terminal(Valine)에 glucose가 結合한 것이다. Glucose와 valine의 結合은 表 2의 表示와 같이 glucose의 케톤基(C=O)와 valine의 아미노基(NH₂)의 Schiff基結合(C=N)이고, aldimine이 生成된다.

이 Schiff基 結合은 不安定하며, amadori變換이 行하여져서 安定한 ketoamine이 生成된다. 그리하여 HbA_{1c}는 극히 安定한 ketoamine의 形으로 赤血環 內에 存在한다. HbA_{1c}의 合成은 그것이 Hb合成의 어느 段階에서 行하여 지는지가 重要하다.

Bunn등⁷⁾에 依하면 HbA가 合成된 後에 HbA와 glucose의 反應에서 HbA_{1c}가 生成되며, 그 過程은 극히 緩慢하게 持續적으로 行하여질 뿐더러 그 反應은 非可逆的이라고 한다. 이것은 赤血球壽命이 짧은 溶血性貧血에서 HbA_{1c}가 低值라는⁷⁾ 것과, 오래된 赤血球에서는 HbA_{1c}의 蓄積에 의해서 새로운 赤血球에서보다 HbA_{1c}의 濃度가 높다는 事實과도 符合되는 것이다. 그리고 HbA_{1c}의 合成이 극히 緩慢하게 進行한다는 것은 이 反應이 非酵素的 反應이라는 것을 示唆하는 것이다.

以上과 같이 赤血球內에 HbA와 glucose의 存在에 있어서 赤血球의 生存期間을 通하여 지극히 緩慢하게 持續적으로 그리고 非酵素적으로 HbA_{1c}가 生成된다.

HbA_{1c}는 ketoamine으로 赤血球內에 蓄積되어 극히 安定하며 그 代謝는 赤血球 壽命에 依存하고 있다고 생각된다. 이러한 HbA_{1c}의 特徵에서

血糖調節의 指標로서의 有用성이 考慮되고 있는 것이다.

3. HbA_{1c}, 以外の GHbA

1) HbA_{1a1}, HbA_{1a2} 및 HbA_{1b}

GHbA에는 HbA_{1c} 以外에 HbA_{1a1}, HbA_{1a2} 및 HbA_{1b}가 있다. HbA_{1a1}은 valine과 fructose-1, 6-diphosphate(FDP), HbA_{1a2}는 valine과 glucose 6-phosphate(G6P)가 ketamine 結合한 것으로 생각되고 있다(表 1.⁶⁾)

HbA_{1b}에 關하여는 HbA_{1c}의 α-chain의 脫아미노反應에 依해서 生成된다고 생각되나 아직 確定的은 아니다. HbA_{1a1}, HbA_{1a2} 및 HbA_{1b}는 HbA_{1c}와 함께 糖尿病에서 增量하나 HbA_{1c}의 增量이 가장 顯著하다.

2) HbA₀의 Glycosylation

最近 HbA₁ 以外에 HbA₀分劃에도 GHbA가 存在하는 것이 밝혀져 있다.⁸⁾ 그러나 이들의 glycosylation은 HbA₁에 比하여 1/10程度로 생각되고 있다.⁸⁾

II. GHbA의 測定法(表 3)

1. Column Chromatography

가장 많이 使用되는 方法은 陽이온交換樹脂에 依한 column chromatography法으로 從前에는 Macrocolumn法이 使用되었으며 여기에서는 HbA_{1a}와 HbA_{1b}의 分類는 困難하나 HbA_{1c}가 分離測定된다. 그러나 測定에는 長時間을 要하므로 日常檢査에 利用할 수가 없었다. 그래서 Column을 小型化한 Microcolumn法이 開發되어 迅速히 그리고 簡單히 測定할 수 있게 되었다. 本法은 HbA_{1c}를 分離할 수 없는 HbA₁測定法이다.

2. Glycosylated(fast fraction) Hb Quick Columnar technique⁹⁻¹⁸⁾

1) 原理

陽이온으로 負荷된 分子에 親和力을 가진 陰이온의 carboxymethyl cellulose 樹脂로 된 microcolumn을 使用한다. 選擇된 이온濃度와 pH에서 糖化 Hb은 HbA보다 陽이온으로 負荷되는

것이 적다. 그러므로 糖化 Hb의 成分은 HbA보다 陰이온으로 負荷된 樹脂에 덜 堅固히 結合된다. 1次現像緩衝液 1st developing Buffer의 fast fraction을 使用하면 糖化 Hb은 溶離되고 다른 Hb成分은 남게 된다. 이 fast fraction을 total fraction과 比較하고 2次現像緩衝液 2nd developing Buffer의 slow fraction을 適用하여 大部分 HbA로 構成된 남아 있는 Hb을 溶離한다. 이 後에 各 fraction의 吸收를 spectrophotometer를 使用하여 數値를 읽고 糖化 Hb의 percentage를 測定할 수 있게 된다.

2) 方法

이것은 total fraction method와 fast fraction method를 같이 測定하는 것이 가장 좋은 效果를 얻게 되고 이 測定은 室溫(21°~24°C)에서 行해져야 하며 모든 Column과 試藥도 室溫에서 保管되어야 한다.

(1) Total fraction method(T.F.)

이 方法은 fast fraction을 溶離한 後 Total Hb fraction과 比較해 보는 것이다.

이 公式은

$$\frac{\text{O.D. of F.F. tube}}{5(\text{O.D. of T.F. tube})} \times 100 = \text{Glycosylated Hb\%}$$

이고 F.F. tube의 O.D.는 415nanometer의 波長에서의 fast fraction을 모은 collection tube의 內容物의 optical density(光濃度)를 나타내며, T.F. tube의 O.D.는 같은 條件에서의 total fraction을 모은 tube의 光濃度를 나타낸다. 5의 數値는 稀釋倍數로서 total tube가 15ml이고 fast tube가 3ml의 크기이므로 그 比率에 依한 것이다.

(2) Fast fraction method(F.F.)

이 公式은

$$\frac{\text{O.D. of F.F. tube}}{\text{O.D. of F.F. tube} + 5(\text{O.D. of S.F. tube})} \times 100 = \text{Glycosylated Hb\%}$$

이고 앞의 1st developing buffer와 2nd developing buffer를 모두 使用한 方法이다. S.F. tube의 O.D.는 2nd developing buffer를 使用한 後의 같은 條件에서의 slow fraction을 모은 tube의 光吸收濃度를 나타낸 것이다.

3) 結果

正常의 fast Hb(HbA_{1a+b+c})는 6.9±1.7%(of

表 3. Glycosylated HbA의 測定法

測定法	測定이 가능한 Glycosylated HbA
大型 Column法	HbA _{1a} +HbA _{1b} , HbA _{1c}
小型 Column法	HbA ₁
電氣泳動法	HbA ₁
比色法	HbA ₁ , HbA ₀ 分割의 GHbA
高速液體 Chromatography	HbA _{1a} , HbA _{1b} , HbA _{1c}

total Hb)로써 그 範圍는 6~8.6%이다. 糖尿病患者에서는 fast Hb値가 8~14%로 增加한다.

2. 電氣泳動法

上記의 Column法에서 測定時溫度가 測定値에 미치는 影響과 cyanide를 含有하는 緩衝液을 使用하는 것 등의 問題點을 解決하는 것이 電氣泳動法이다. 이것은 澱粉 Gel-film上에 少量의 溶血液을 apply하여 電氣泳動에 의하여 HbA₀와 HbA₁의 比率를 求하는 것이다. 本法도 HbA₁測定法이며 Microcolumn法에 의한 測定法과 一致한다.

電氣泳動法 및 Column法에 共通된 問題點으로서 異常 Hb의 影響이 있다. 稀少하지만 HbF가 存在하는 경우에는 그것은 電氣泳動法에서나 Column法에서도 HbA₁과 거의 同一한 位置에 移動한다. 따라서 이러한 경우에는 HbA₁測定値가 過剩增加 된다. 특히 高血糖으로 생각될 수 없는 症例에서 HbA₁이 高値를 持續할 때는 HbF의 存在를 念頭に 두고 檢索을 進行하여야 할 것이다.

다음으로 最近 注目되고 있는 不安定型의 GHbA의 問題가 있다.¹⁹⁾ 前述한 바와같이 HbA₁은 극히 安定하며 그 代謝는 赤血球壽命에 依存하지만, 高血糖의 control과 함께 HbA₁의 急激한 下降이 觀察되어 HbA₁에는 不安定한 것이 共存할 可能性이 考慮되었다.

이 不安定型의 GHbA는 表 2에 表示한 Schiff-基結合뿐으로 安定한 ketoamine結合에 到達하지 않는 HbA_{1c}로 推定되고 있다. 이러한 不安定型의 GHbA가 有意的인 存在라면 長期的인 血糖 Control의 指標로서의 HbA_{1c}의 意義는 稀薄해지는 것이다. Svendsen 등은¹⁹⁾ 糖尿病患者의 HbA_{1c}의 15~30%는 不安定이라고 말하고 있다.

3. 比色法(TBA試驗)

不安정한 HbA_{1c}를 除去하는 方法으로서는 TBA試驗이 가장 좋다. 즉 TBA試驗의 原理는 아미노酸과 glucose의 ketoamine結合에 對해서 特異的이기 때문이다. 本法은 HbA₁과 함께 그 以外의 GHbA를 모두 測定할 수 있는 total GHbA 測定法이다. 그러나 本法은 操作上 加熱 脫水에 長時間을 要하므로 實用化되기 까지는 아직 問題點이 있다.

4. 高速液體 Chromatography

本法은 HbA_{1c}의 分離가 좋고 操作時間도 짧으며 HbA_{1c}值를 日常檢査에 利用할 경우에 有用한 方法이다. 그러나 高價의 裝備를 必要하므로 日常 臨床檢査法으로써 Column法에 代身해서 利用될만한 實情에 와 있지 않다.

Ⅲ. HbA₁值의 臨床的 意義

圖 1은 HbA₁과 그 測定時에서 遡及한 3個月 間의 平均血糖值와의 相關을 알아본 成績을 나타낸 것이다. 兩者間에는 相關係數+0.79의 良好한 正相關이 認定되었다.²⁰⁾ 이 事實은 HbA₁은 過去 3個月 동안의 平均血糖值를 反映하고 retrospective로 長期的인 血糖調節의 指標로서의 有用性을 나타내는 것이다.

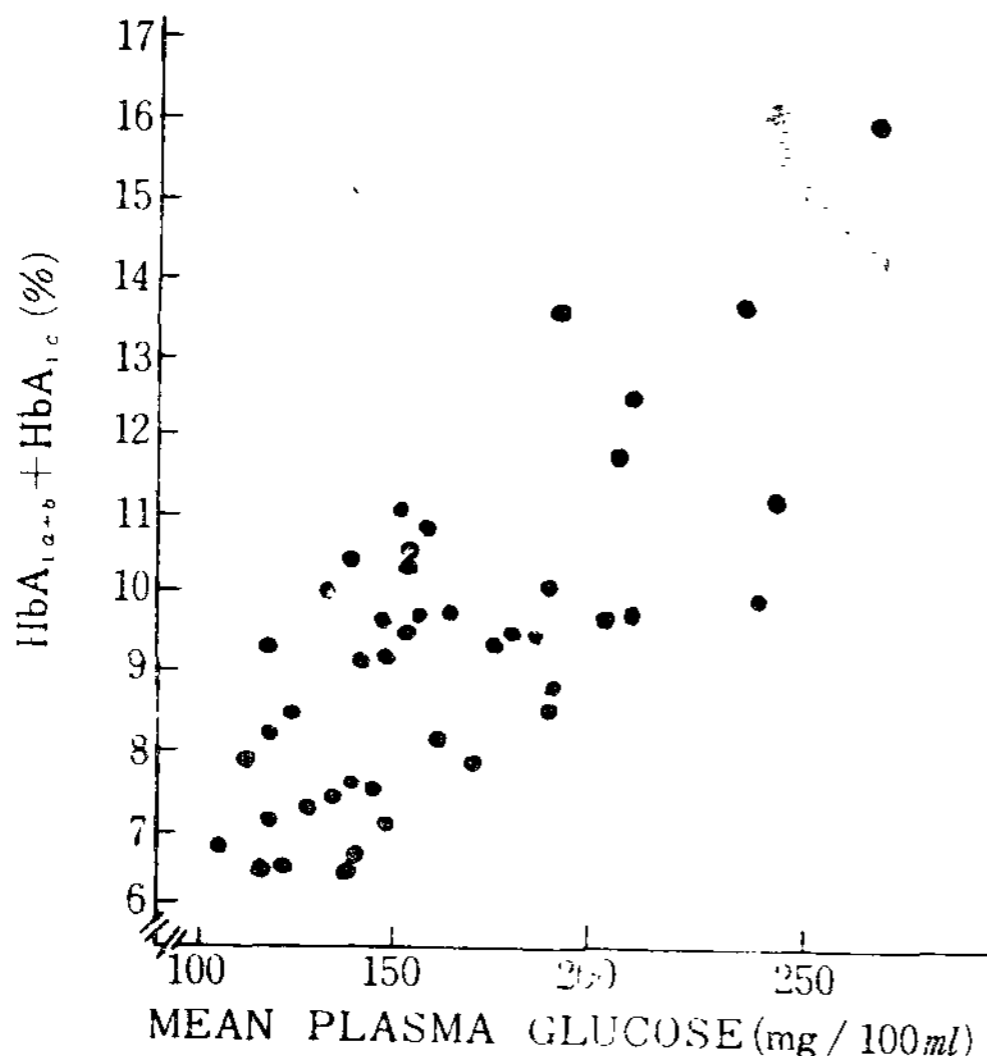


圖 1. HbA₁值와 過去 3個月 間의 平均血糖值와의 關係

表 4. 血糖과 HbA₁의 關係

空腹時 血糖	食後 血糖	HbA ₁	判 定
↑	↑	↑	Control 不良한 糖尿病
—	—or ↑	↑	過去 3個月 間內의 持續的 高血糖
—	—or ↗	—	Control 良好한 糖尿病
—or ↑	—or ↑	↑	長期的 不安定型 糖尿病
—	↑	—or ↑	Chemical diabetes
↑	↑	—	一時的 高血糖, 溶血
—	—	↑	HbF 其他

이것은 前述의 HbA₁의 安定性, 合成 및 代謝를 考慮하면 當然히 豫想될 수 있는 것이다. 따라서 HbA₁의 正常化는 血糖의 그것보다도 1個이 모두 높은 數值이면 control 不良의 糖尿病이며, 血糖值가 正常이라도 HbA₁이 如前히 높은 數值이면 過去 3個月 以內에 持續的 高血糖狀態가 있었음을 나타내는 것이 된다.

血糖值와 함께 HbA₁이 正常이면 control이 良好한 糖尿病이라 할 수 있기 때문에 定期的으로 HbA₁을 測定하여 恒常 HbA₁值가 正常化되는 것이 血糖調節의 目標로 될수 있는 것이다.

空腹時 血糖이 正常에서 高值로 變動하는 不安定型 糖尿病에 있어서도 不安정한 血糖狀態가 1年 以上 持續된 例에서는 HbA₁은 高值로 나타났다.

HbA₁의 上昇에는 持續的인 高血糖狀態가 必要하나 不安정한 血糖狀態가 長期間 繼續되면 역시 HbA₁은 上昇하는 것으로 보아 不安定型 糖尿病에 있어서도 HbA₁의 測定은 매우 有用하다고 할수 있다.

耐糖試驗을 施行하여 비로소 異常이 認知되는 chemical diabetes의 경우에 HbA₁에 의하여 어느程度 screening될 수 있는가가 實際上 重要한 問題이나 이러한 例에서는 空腹時 血糖이 正常이라도 食後 血糖이 高值이나 그 狀態가 長期間 繼續되면 역시 HbA₁值가 上昇한다.²¹⁾ 그러나 短期的인 變化의 screening에는 耐糖試驗의 代用이 될수 없는 것이다.

끝으로 血糖值와 HbA₁이 平行하지 않는 다음과 같은 경우에는 注意를 要한다. 즉 血糖值가 高值이고 HbA₁이 正常值이면 一時的인 高血糖이거나 아니면 溶血의 同伴을 考慮하여야 한다.

逆으로 血糖値가 正常임에도 不拘하고 HbA₁이 恒常 高値인 경우에는 HbF의 存在를 생각하여 Column法 또는 電氣泳動法 以外의 方法으로 測月 또는 그 以上 늦게 나타나며, 表 4⁴⁾에 表示된 것과 같이 空腹時 血糖, 食後 血糖 및 HbA₁ 定해 보거나 또는 積極적으로 HbF의 存在를 證明하는 것이 必要할 것이다.

IV. 結 論

1. 糖化血色素의 測定法은 高價이며, 特殊한 裝備가 所要되는 HbA_{1c}의 測定法보다는 HbA₁測定法이 現在로서는 合理的이고 보다 商業的이다.

2. HbA₁은 다른 特別한 生理的 機能은 아직 밝혀지지 아니하였으나 糖尿病 患者에서 2~3倍의 높은 値를 나타내는 特異性을 認定할 수 있다.

3. 治療 또는 檢査에 依한 靜脈內 糖液注入과 같은 一時的인 血糖增加에는 HbA₁値는 變動이 없고, 運動이나 糖攝取와 같은 條件에서도 數値가 變하지 않는 優秀한 再現性이 있다.

4. 最少 數週間 持續되는 高血糖狀態에서 만이 높은 値를 나타냄으로 糖尿病의 確實한 診斷에 利用될 수 있다.

5. HbA₁値는 過去 3個月 間의 平均血糖値를 反映하므로 長期的인 血糖調節의 指標으로써 有用하다.

6. HbA₁을 血糖値와 同時에 測定할 경우, 糖負荷試驗이 갖는 缺陷인 非特異性 및 非再現性에 對한 補完的 價値가 있고 一般外來의 routine method로서 血糖値를 위한 採血時間의 適正을 期한다면 單 1회의 採血으로써 血糖値와 HbA₁値와의 同時比較가 可能하여 매우 效果的이다.

따라서 이 方式은 特히 被檢者의 非再來性이 問題가 되고 糖負荷試驗 實施에 難點이 있는 保險加入者 健康調査에 있어서 매우 適合한 糖尿病 診斷法으로 指摘된다.

參 考 文 獻

- 1) 許甲範：糖尿病調節의 基準, 大韓醫學協會誌, 24 : 5, 378~382, 1981.
- 2) 柴田 進, 宮地隆興, 上田 智, 他：糖尿病患者의 血液に見出される 異常血色素樣成分について,

日本血液學會雜誌, 25 : 327, 1962.

- 3) Koenig, R.J., C.M. Peterson, R.L. Iones, et al.: Correlation of Glucose Regulation and Hemoglobin A_{1c} in Diabetest Mellitus. N. Eng. J. Med., 295 : 417, 1976.
- 4) 稻田滿夫：Glycosylated Hemoglobinとその臨床應用, 糖尿病の臨床檢査, 83~94, 東京醫學社, 1981.
- 5) Schnek, A.G. and W.A. Schroeder: The Relation Between the Minor Components of Whole Normal Human Adult Hemoglobin as Isolated by Chromatography and Starch Block Electrophoresis. J. Am. Chem. Soc., 83 : 1472, 1961.
- 6) McDonald, M.J., R. Shapiro, M. Bleichman, et al.: Glycosylated Minor Components of Human Adult Hemoglobin. J. Biol. Chem., 253 : 2327, 1978.
- 7) Bunn, H.F., D.N. Haney, S. Kamir: The Biosynthesis of Human Hemoglobin A_{1c}, Slow Glycosylation of Hemoglobin in Vivo. J. Clin. Invest., 57 : 1652, 1976.
- 8) Bunn, H.F., R. Shapiro, M. McManus, et al.: Structure Heterogeneity of Human Hemoglobin A Due to Nonenzymatic Glycosylation. J. Biol. Chem., 254 : 3892, 1979.
- 9) Allen, D.W. et al.: Observation on the Chromatographic Heterogeneity of Normal Adult and Fetal Human Hemoglobin: A Study of the Effects of Crystalization and Chromatography on the Heterogeneity and Isoleucine Content. J. Am. Chem. Soc. 80, 1628~1634, 1958.
- 10) Rahbar, S., An Abnormal Hemoglobin in Red Cells of Diabetes. Clin. Chem. Acta 22, 296~298, 1968.
- 11) Bunn, H.F., et al.: Further Identification of the Nature and Linkage of the Carbohydrate in Hemoglobin A_{1c}. Biochem. Biophys Res Commun 67 : 1, 103~109, 1975.
- 12) Koenig, R.J., et al.: Hemoglobin A_{1c} as an Indicator of the Degree of Glucose Intolerance in Diabetes, Diabetes 25 : 3, 230~232, 1976.
- 13) Trivelli, L.A., et al.: Hemoglobin Componets in Patients with Diabetes Mellitus. New Eng. J. of Med, 284 : 7, 353~357, 1971.
- 14) Hankins, W.D., Manuscript in Preparation,

Whang-Nam Chul: Procedures and Clinical Meaning of Glycosylated Hemoglobin A in Medical Examination

- Vanderbilt Univ.
- 15) Hankins, W.D.: A Temperature Conversion Nomogram for Glycosylated Hemoglobin Analysis. Manuscript in Preparation, Vanderbilt University.
 - 16) Paulsen, E.P.: Hemoglobin A_{1c} in Childhood Diabetes. *Metabolism*, 22 : 2, 269~271, 1973.
 - 17) Paulsen, E.P. and Koury, M.: Hemoglobin A_{1a} and _b in Diabetes mellitus, Abstract-University of Virginia School of Medicine, 1976.
 - 18) Gabby, K.H., et al.: Glycosylated Hemoglobins and Long Term Blood Glucose Control in Diabetes Mellitus. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 44 : 5, 859~864, 1977.
 - 19) Svendsen, P. A., J.S. Christiansen, U. Søgaard, et al.: Rapid Changes in Chromatographically Determined Hemoglobin A_{1c} Induced by Short-term Changes in Glucose Concentration. *Diabetologia*, 19 : 130, 1980.
 - 20) Inada, M., Oishi, M., Nishikawa, M., et al.: Clinical Evaluation of Measuring Glycosylated Hemoglobin Levels for Assessing the Long-term blood Glucose Control in Diabetes. *Endocrinol. Japan.*, 27 : 411, 1980.
 - 21) Bolli, G., P. Compagnucci, M.G. Cartechini, et al.: HbA₁ in Subjects with Abnormal Glucose Tolerance but Normal Fasting Plasma Glucose. *Diabetes*, 29 : 272, 1980.
-