

川崎医科大学

上田 智

柴田 進

ま え が き

血色素分子を構成するサブユニットすなわち α , β , γ , δ - polypeptide鎖上においてアミノ酸置換 (Amino acid substitution) を生じたものを異常血色素症という。これは血色素構造遺伝子のRNA codon中の塩基の取り違えの結果特定アミノ酸を他のアミノ酸に取り違えることになったものである。核酸塩基取り違えが唯一個のcodonについて、またそのcodonを構成している3個の塩基のうち僅か一個が変換されるためであり、これをone point mutationとよぶが、このような突然変異は人の一世代に 1.5×10^{-5} 回という低い出現頻度で起こるとされている。¹⁾

異常血色素症には、この他にm-RNAの欠陥により特定polypeptide鎖合成の量的不均衡のため貧血を生じるもの (Thalassaemia 症) および Operator geneの欠陥により胎児血色素から成人血色素へとpolypeptide鎖の変換が円滑に行なわれず胎児血色素を生産合成しつづけている hereditary persistence of HbF 症がある。

一方臨床的立場から異常血色素症をみると血色素の一次構造の異常は分子病の典型とされている鎌状赤血球貧血やHbM 症をのぞけばほとんどが臨床症状を呈しないものである。しかし最近血色素の構造異常と臨床症状発現の関連について注目されてきたのが不安定血色素症である。

安定した血色素を維持するためには α 鎖, non α - 鎖およびヘムの三要素が正しく組み合わされて $\alpha_2\beta_2 + 4$ hemeの四量体を形成し、さらに血色素分子はその立体構造の外表面に極性アミノ酸を配し、特有の荷電を帯びさせるとともに水にとけやすい状態にしており、分子内部は非極性アミノ酸を擁して分子内に水の浸入を防ぎ、立体構造の崩壊を防いでいる。特にヘムを保持するヘムポケットの部では疎水性アミノ酸により保護された隙間にヘムを入れ、ヘム鉄

による酸素の可逆的結合解離を可能にしている。血色素分子はヘムを保持することにより安定性を保っている。ヘムを失なえば容易に赤血球内で変性、沈澱を生じ、Heinz 小体をつくる。すなわち血色素分子はヘムと polypeptide 鎖の相互関係およびサブユニット同士の接触面において立体構造保持上の重要部分のアミノ酸配列はきびしい制約をうけており、この部分のアミノ酸置換は血色素の著しい機能障害または安定性を失なわしめる結果となる。このように血色素の安定性を失い容易に変性、Heinz 小体生成亢進を来したものを特に不安定血色素症とよぶ。

岡山地区において昭和50年1ケ年間異常血色素サーベイを行ない3種類の異常血色素症を見出した。このうち2例は不安定血色素症である。

研究 方 法

(1) 検体の収集

岡山地区の3総合病院（本院、倉敷中央病院、岡山済生会病院）よりアンチクロット加血液を得た。

(2) 溶血液の調整

凝固を阻止した患者血液を生理的食塩水で十分洗滌して、赤血球層のみ集め赤血球の容積の1.5倍のH₂Oと0.5倍のCCl₄を加えて、ミニシキサーにかけ、遠心沈澱（3000RPM）し2上清（溶血液、血色素濃度40g/dl）を分離する。

(3) 寒天ゲル電気泳動法⁴⁾（pH8.6, pH7.2）

(4) セルロースアセテート膜電気泳動法⁵⁾（pH8.4）

(5) HbA₂ 定量法⁵⁾

セルロースアセテート膜電気泳動法（pH8.4）によりHbA₂とHbAおよび異常血色素分画を分離し、これら泳動縞をふくむセルロースアセテート膜片を切りぬき、それぞれDrabkin液に溶出して、Soret帯（405nm）で吸光度を測り、次の式により計算した。

$$\text{HbA}_2 = \frac{\text{HbA}_2 \text{ の吸光度}}{(\text{HbA}_2 + \text{HbA} + \text{異常血色素分画}) \text{ の吸光度}} \times 100\%$$

(6) 異常血色素分画定量

セルロースアセテート膜電気泳動法により HbA₂ 分画定量と同様に異常血色素分画を分離、溶出して吸光度を測定し、以下の式により計算した。

$$\text{異常血色素分画} = \frac{\text{異常血色素分画の吸光度}}{(\text{HbA}_2 + \text{HbA} + \text{異常血色素分画}) \text{の吸光度}} \times 100\%$$

(7) Heinz 小体生成試験⁶⁾

(a) 試 薬

- ① リン酸緩衝液 (0.066 M, pH 7.6)
- ② Acetyl phenylhydrazine 溶液 (APH)
1-acetyl-2-phenylhydrazine 100 mg
glucose 200 mg を加え、上記リン酸緩衝液で 100 ml とする。
- ③ Crystal violet 染色液
crystal violet 2.0 g を生理的食塩水 100 ml にとかす。

(b) 操 作

試験管 (7.5 × 10 mm) に全血 (抗凝固剤としてアンチクロットまたはヘパリン) 0.1 ml をとり、これに APH 溶液 2.0 ml を加えてよく混和し、この中に空気をふき込んで十分曝気させる。これを 37°C 2 時間加温し、再び曝気させる。さらに 37°C 2 時間加温する。試験管をとり出し、試料 1 容に crystal violet 染色液 2 容の割合に混和し 5 ~ 10 分後にその 1 滴をスライドグラス上にとり、カバーグラスで封じて鏡検する。

(c) 判定 (スコア)

スコア 0 : 赤血球内に全く Heinz 小体を認めないもの。スコア 1 : 赤血球内に Heinz 小体 1 個を認めるもの。スコア 2 : Heinz 小体 2 ~ 4 個を認めるもの。スコア 3 : Heinz 小体 5 個以上認めるが、Heinz 小体の分布が均一でないもの。スコア 4 : Heinz 小体が 5 個以上で均一に分布しているもの。スコア 5 : 粗大な Heinz 小体が散在し赤血球の変形の認められるもの。

(8) Carrell 法⁷⁾

(a) 試 薬

- ① Tris・HCl 緩衝液 (0.1 M, pH 7.4)
- ② 17% イソプロパノール・Tris HCl 緩衝液

(b) 操作および判定

溶血液 (10 g/dl) 0.2 ml にイソプロパノール Tris HCl 緩衝液 20 ml を加え、37°C に加温する。判定は不安定血色素の場合、加温後 5 分以内で混濁を生じる。20 分間加温で紫状沈澱がみられる。正常の場合は 40 分間加温しても透明である。

- (9) 熱変性試験⁹⁾
- (10) Hb F 定量⁹⁾
- (11) Fingerprinting 法^{3, 10)}

研究成果および考察

昭和 50 年 2 月より昭和 51 年 1 月までの 1 ケ年間に岡山地区在住の患者血液約 7500 例について寒天ゲル電気泳動法によりスクリーニング検査を行ない 3 種類の異常血色素症を見出した。これら異常血色素症は発端者の居住地名をとり Hb Kurashiki, Hb Asabara および Hb Okayama と命名した。

(1) Hb Kurashiki

患者は昭和 50 年 2 月本院呼吸器内科を訪れ、慢性気管支炎と診断され治療を受けていた。64 才の男性で、理学的検査で著変を認めず、血液化学検査は Hb 15.5 g/dl, 黄疸指数 6, cholinesterase 358 Iu/dl, Alkalinephosphatase 40 Iu/L, BUN 16 mg/dl, GPT 20 Iu/L で異常所見を認めず、末梢血検査も Ht 46.1%, WBC 6400 でいずれも正常範囲にあった。家族調査で発端者の長男 (35 才) より同一の泳動度を示す異常血色素が見出された。

異常血色素検査

セルロースアセテート膜電気泳動法 (pH 8.4) によれば Hb Kurashiki 分画は Hb A よりおそく、Hb A₂ と Hb A の間で Hb A に接して泳動された。異常血色素分画含量は 15.5%, Hb A₂ 2.5%, Hb F 1.5% および Hb A₂ Kurashiki 1.1% を認めた。50°C 60 分加温の熱変性試験は 1.4% で

正常であったが、Carrell 法で混濁を生じた。Heinz 小体生成試験では 5.1.3% (対照 2.4%) と亢進しており Heinz 小体の生成度を Score で表現すると、Score 4: 2.7%, Score 5: 2.5% と明らかに対照群に比して Heinz 小体生成が亢進している。本症は Carrell 法で混濁を示し、Heinz 小体生成亢進を示すので不安定血色素症 (Unstable hemoglobin) の範疇に入る異常血色素症である。熱変性試験正常および臨床症状を認めないので mild type の不安定血色素症に分類すべき症例と考える。将来何らかの原因殊に薬剤服用により溶血性貧血等の臨床症状を呈するであろうことは容易に想像される。今後検索を進め患者の生活指導を行ない臨床症状発現を未然に防がねばならない。本症のグロビン一次構造の検索では α Tp-9 (ASP→Ala) が判明した。このアミノ酸置換部位は α 4 に近接しており、よって血色素分子の立体構造にひずみをもたらす不安定血色素となったと考える。

(2) Hb Asabara

患者は昭和 50 年 7 月倉敷中央病院内科を訪れ、十二指腸潰瘍の診断のもと外科に転科、胃十二指腸切除術をうけた。45 才の男性で理学的検査で著変を認めず、血液化学検査および末梢血検査で軽度貧血以外に異常所見を認めなかった。家族調査により長女 (22 才) より同一泳動度を示す異常血色素が見出された。

異常血色素検査

セルロースアセテート膜電気泳動法 (PH 8.4) で Hb Asabara は Hb A よりおそく泳動され Hb A₂ と Hb A の中間に位する。含量は Hb Asabara 1.44%, Hb A₂ 2.5%, Hb F 0.4%, Hb A₂ Asabara 0.6% を認めた。熱変性試験は 2.4% で正常であったが、Carrell 法で混濁を認めた。Heinz 小体生成試験は 5.3% (対照 2.4%) と生成亢進が認められ、Score をとると Score 3: 3.0%, Score 4: 2.8% と明らかに対照に比して Heinz 小体生成が亢進している。本症も現在臨床症状として何ら見るべきものがなく熱変性試験は正常を示しているので、mild type の不安定血色素症と診断する。今後患者および異常血色素保有者の観察と生活指導を行なっていく必要がある。

(3) Hb Okayama

本症は日本在住韓国人より見出された異常血色素症で、患者は肝硬変症のため

岡山済生会病院内科で治療をうけている。41才の男性で、理学的検査では肝3横指、脾1横指触知し、腹水貯溜を認める。検査所見は、Total bilirubin 2.2 mg/dl, Cholestrol 127 mg/dl, albumin 4.8 g/dl, Globulin 3.6 g/dl, Cholinesterase 72 IU/dl, GPT 32 IU/L, GOT 47 IU/L, Hb 7.2 g/dl, WBC 6100, 血小板 148/100。OIFで肝実質障害、貧血、血小板減少を呈している。家族調査で発端者の母親および3人の娘から同一の異常血色素が見出された。

異常血色素検査

セルゴーステセデート膜電気泳動法 (pH 8.4) で Hb Okayama は Hb A よりおそく Hb A₂ と Hb A の中間に泳動された。含量は Hb Okayama 11.6%, Hb A₂ 2.0%, Hb F 1.1%, Hb A₂ Okayama 0.4% である。熱変性試験は 2.1%, Carrell 法いずれも正常であった。本症は異常血色素症のための特有な臨床症状を認めず、不安定血色素検査はいずれも正常であるので、いわゆる臨床症状を呈しない異常血色素症である。

要 約

岡山地区の異常血色素サーベイにより3種類の異常血色素を見出した。いずれも家族から同一異常血色素が見出されたが、特有の臨床症状は認められなかった。これらはいずれも α 鎖異常であり、slow-moving hemoglobin である。

Hb Kurashiki および Hb Asabara は Heinz 小体生成亢進および Carrell 法陽性であり、mild unstable hemoglobin に属する。現在健康な生活を営んでいるが将来異常血色素に起因する溶血性貧血の可能性が十分考えられるので今後の生活指導が必要である。

Hb Okayama は臨床症状を呈しない異常血色素症である。今後血色素の一次構造検索によりアミノ酸置換を明らかにする。

文献および発表論文

- 1) 柴田進 (1972). 病態生化学-その基礎. 金芳堂, 京都, 東京.
- 2) 柴田進 (1971). 病態生化学-その臨床. 金芳堂, 京都, 東京.
- 3) Lehmann, H. and Huntsman, R.G. (1974). Man's Haemoglobins, North-Holland, Amsterdam.
- 4) Shibata, S. and Tuchi, I. (1961). A simple technique of agar gel electrophoresis for rapid separation of hemoglobins. Acta Haem. Jap. 24, 51-57.
- 5) Ueda, S., Shibata, S., Miyaji, T. and Ohba, Y. (1975). Routine Hb A₂ estimation by cellulose acetate membrane electrophoresis. Kawasaki Med. J. 1, 113-120.
- 6) Beutler, E., Dern, R.J. and Alving, A.S. (1955). The hemolytic effect of primaquine. V. An in vitro test for sensitivity of erythrocytes to primaquine. J. Lab. Clin. Med. 45, 40.
- 7) Carrell, R.W. and Kay, R. (1972). A simple method for the detection of unstable haemoglobins. Brit. J. Haemat. 23, 615-619.
- 8) Ueda, S., Matsuoka, M., Miyaji, T., Ueda, N., Aoki, K., Izawa, M. and Shibata, S. (1970). Heat denaturation test for unstable hemoglobin,

with a note on its application to hemoglobin survey in Japan. *Acta Haem. Jap.* 33, 281-290.

9) Betke, K., Marti, H. R. and Schlicht, I. (1959). Estimation of small percentage of foetal hemoglobin. *Nature*, 184, 1877-1878.

10) 三輪史朗 (1972). *臨床検査技術全書 3, 血液検査*. 医学書院, 東京.

↓ 検索用テキスト OCR(光学的文字認識)ソフト使用 ↓
論文の一部ですが、認識率の関係で誤字が含まれる場合があります

まえがき

血色素分子を構成するサブユニットすなわち α , β , γ , δ -polypeptide 鎖上においてアミノ酸置換(Amino acid substitution)を生じたものを異常血色素症という。これは血色素構造遺伝子の RNAeodon 中の塩基の取り違えの結果特定アミノ酸を他のアミノ酸に取り違えることになったものである。核酸塩基取り違えが唯一個の codon について、またその codon を構成している 3 個の塩基のうち僅か一個が変換されるためであり、これを one point mutation とよぶが、このような突然変異は人の一世代に 1.5×10^{-5} 回という低い出現頻度で起こるとされている。1)