

# 新生児異常ヘモグロビン症のマス・スクリーニング； 方法の確立とその試行

林 昭

和田 芳直

藤田 富雄

木戸口 公一

(大阪府立母子保健総合医療センター)

異常ヘモグロビン (Hb) 症を広義に解釈すると、Hb を構成するグロビン鎖の一次構造異常をともなう構造変異種と、グロビン鎖合成の遺伝的欠陥に由来するサラセミア症候群に大別される。われわれは、数年来先天異常モニタリング研究の一環としてわが国における新生児異常 Hb 症のモニタリングを計画し、方法論の一部は、すでに昭和55年度研究報告書に報告してきた。われわれの新生児異常 Hb モニタリング計画の概要は図1のごとくで濾紙乾燥血を試料としてマス・スクリーニングで検出された構造変異種およびサラセミアについて種々の角度から研究し、得られた情報を臨床的な立場から十分吟味した上で患者に還元しようというものである。この計画の最も核心となる部分が、新生児異常 Hb のマス・スクリーニングで、本年度は構造変異種について確立された方法の詳細と試行の結果を報告する。

## 試料および方法

### I. 試 料

現在わが国において全国的規模で実施されている先天性代謝異常マス・スクリーニングに用いられる濾紙乾燥血をそのまま試料として用いた。

### II. 方 法

#### (1) Hb 変異症のマス・スクリーニング

1. グロビン鎖の抽出：血清反応用微量滴定板 (micro titration plate) の各ウエルに 8 M 尿素—10% 2-メルカプトエタノール溶液 50  $\mu$ l を入れ、径 3 mm の円板として切抜いた濾紙乾燥血液を浸して1時間溶出する。

2. 平板ゲル (115×230×1 mm) の作製：ゲルの構成は、アクリルアミドおよび N, N'-メチレン-ビス-アクリルアミド (T=6%, C=3.5%) に 8 M 尿素および 3% (v/v) アンホライト (2% pH 5~8 および 1% pH 6.5~9 フェーマライト) を含有し、重合化は、0.015% (w/v) 過硫酸アンモンおよび 0.16% (v/v) N,N,N',N'-TEMED により行われた。

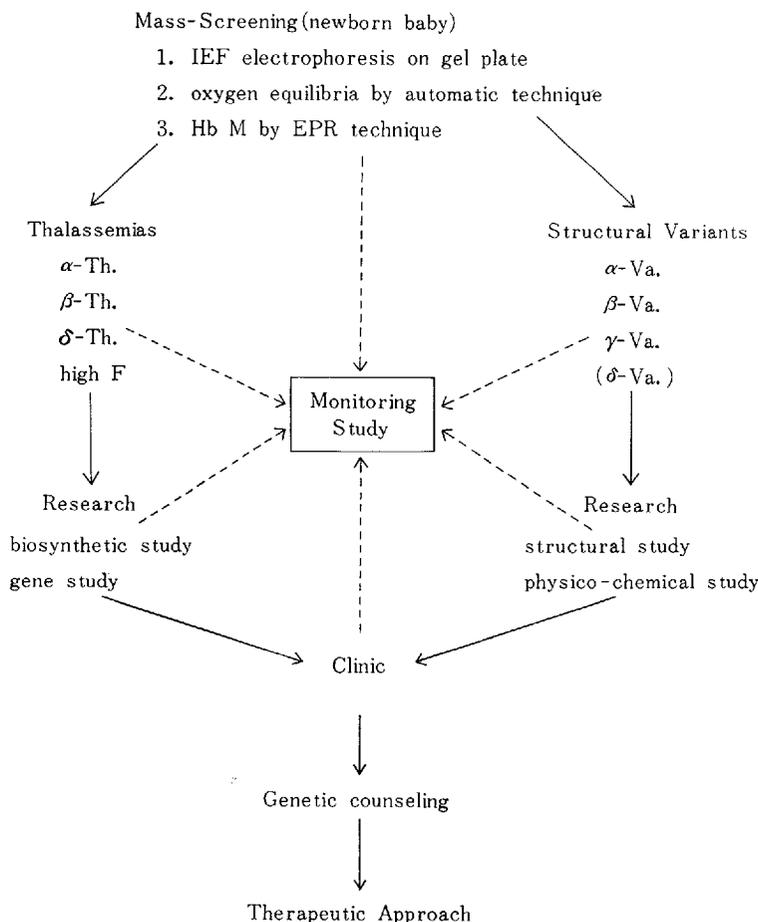


図1 新生児異常ヘモグロビン症のモニタリング計画

3. グロビン鎖の分離：溶出されたグロビン溶液は、新しく切抜いた 3 mm 濾紙円板 (Whatman 3 MM) に浸みこませ、これを調製された平板ゲル上の陽極から 15 mm の位置に 2~3 mm 間隔で約 50~60 検体をならべる。電極液として、それぞれ 6 M 尿素を含有する 1N NaOH を陰極に、1 M リン酸を陽極に用い、4°C に冷却しつつ、30 W, 1 時間泳動する。

4. ゲルの固定および染色：泳動終了後、ゲルを 15% トリクロル酢酸に 1 時間浸し、次いで 0.01% (w/v) クマシーブルー-R250 で 30 分間染色し、次いで、脱色後判定する。

(2) グロビン鎖の同定

上記マス・スクリーニング法により検出された変異グロビン鎖の同定は、同じ濾紙乾燥血を溶出し、カラムクロマトグラフィーで異常グロビン鎖を分離、さらにトリプシン分解後のペプチド混合物を二次イオン質量分析法 (SIMS) を用いて行った。

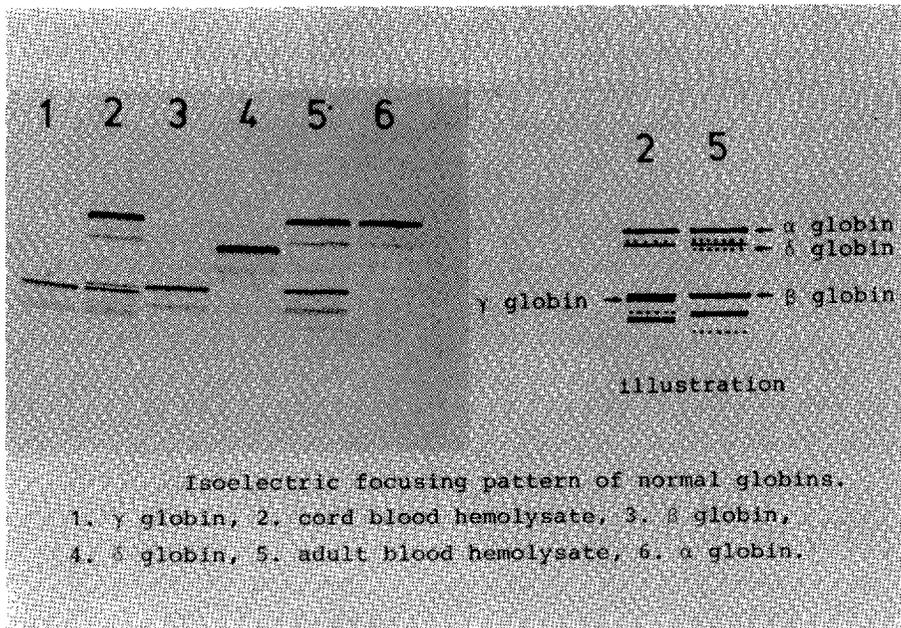


図2 a 正常グロビン

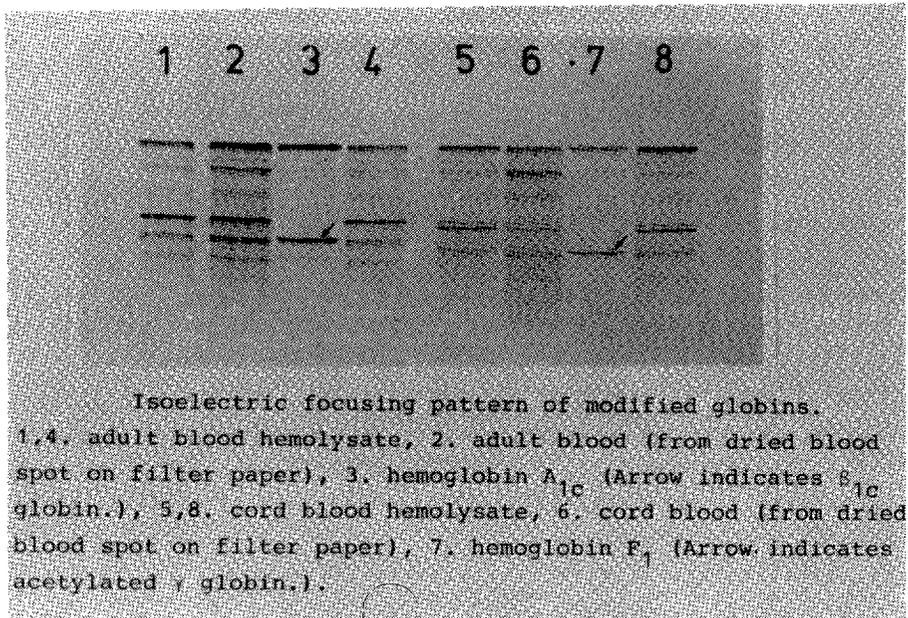


図2 b 修飾グロビン鎖

図2 正常 (a) および修飾 (b) グロビン鎖の等電点電気泳動パターン

## 研究成績

### 1. 正常および修飾グロビン鎖の等電点電気泳動パターン

図2 aに示すごとく、正常  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  各グロビン鎖の分離は良好で、濾紙乾燥血は溶血液を試料とした場合とほとんど変わらない。正常  $\delta$  鎖は一般に  $\alpha$  鎖の下部に出現するが、新生児の場合血中濃度は低く、ほとんど無視できるものであった。

その他図2 bのごとく数多くのバンドが出現するが、これには修飾グロビン鎖および血清蛋白質成分も含まれる。これらバンドのうち、修飾グロビン鎖として同定することのできたものは、Hb A<sub>1c</sub> のグリコシル化 $\beta$  鎖 (3. 矢印) および Hb F のアセチル化 $\gamma$  鎖 (7. 矢印) であった。

### 2. 異常グロビン鎖の等電点電気泳動パターン

すでに構造の明らかにされている Hb 変異種の分離態度をしらべてみた。まず、図3には  $\alpha$  鎖変異種の Hb Ono ( $\alpha^{64}$  Asp→Asn) および  $\beta$  鎖変異種の Hb SC ( $\beta^6$  Glu→Val,  $\beta^6$  Glu→Lys) および Hb S ( $\beta^6$  Glu→Val) を示しているが、いずれも異常グロビン鎖は予測された位置に分離される。これに対して  $\beta$  鎖変異種の Hb Rainier ( $\beta^{145}$  Tyr→Cys) および Hb Genova ( $\beta^{28}$  Leu→Pro) の異常グロビン鎖は、正常  $\beta$  鎖と分離することができなかった。これら  $\beta$  鎖変異種のアミノ酸置換には電荷差をとまなわないので、理論的にも当然と考えられる。

一方、図4では同じ種類の電荷差をとまなう4種類の  $\beta$  鎖変異種の等電点電気泳動パターンを示しているが、いずれも正常  $\beta$  鎖とは割然と分離されている。しかも、電荷差は全く同

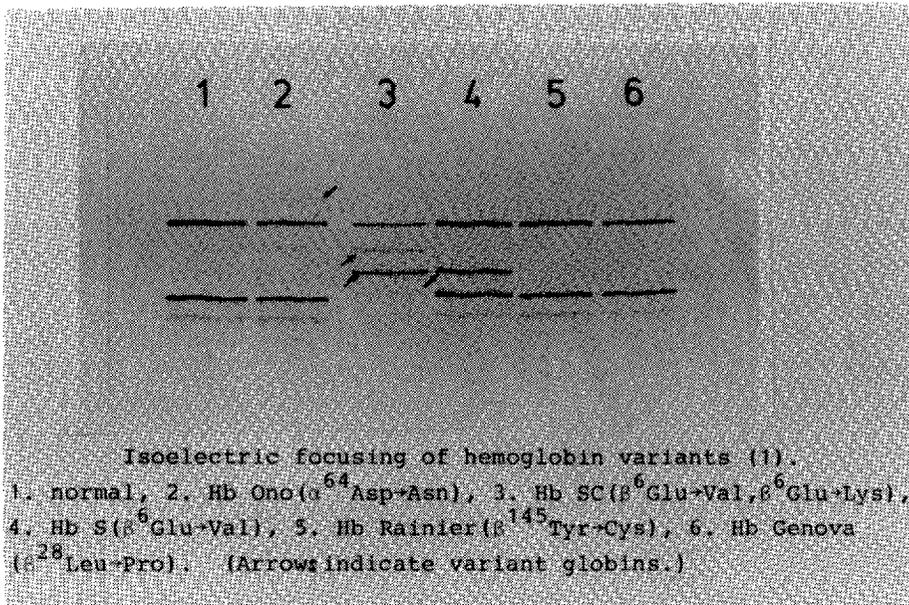


図3 ヘモグロビン構造変異種の等電点電気泳動パターン (1)

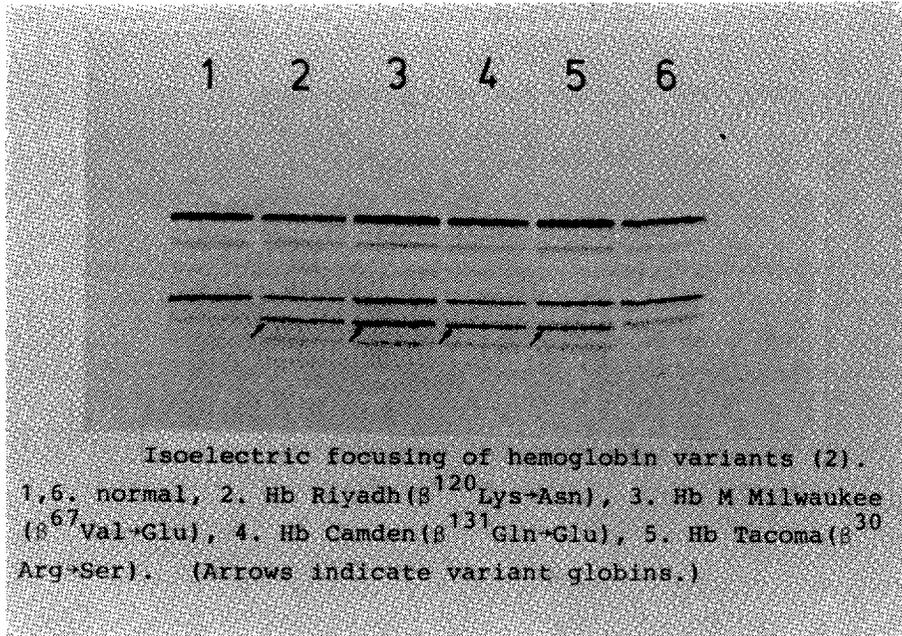


図4 ヘモグロビン構造変異種の等電点電気泳動パターン(2)

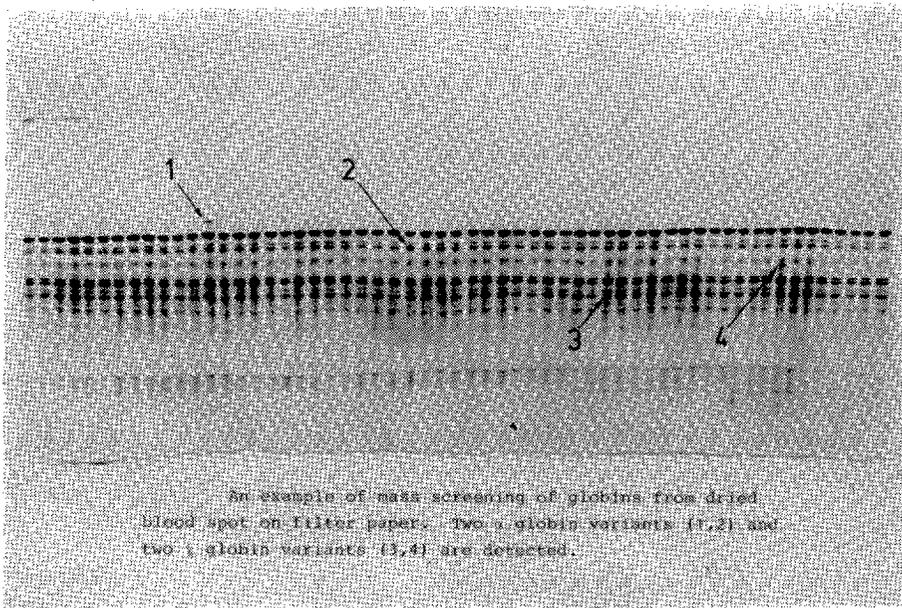


図5 沓紙乾燥血を試料とする新生児ヘモグロビン構造変異種のマス・スクリーニング

じであるが、置換した各アミノ酸残基の微妙な等電点のちがいを反映して分離した位置には一致しない。

### 3. 新生児 Hb 変異種のマス・スクリーニングの試行

図5は、実施した新生児 Hb 変異種のマス・スクリーニングに用いた平板ゲルの一枚で、

ここでは約60人の濾紙乾燥血が分析された。矢印で示すように、この平板上では4種類の Hb 変異種が検出され、1, 2が $\alpha$ 鎖、3, 4がいずれも $\gamma$ 鎖変異種であった。

昭和57年5月から6月にかけて大阪府で生れた新生児1万人の乾燥血を調べた結果、 $\alpha$ 鎖変異種を5例、 $\gamma$ 鎖変異種を11例見出すことができた。しかも、構造解析の結果、 $\gamma$ 鎖変異種の一つは、Hb F Izumi ( $A\gamma^6$  Glu $\rightarrow$ Gly)と名付けられ、世界最初の変異種であった。

## 考 按

現在、わが国で行政レベルによって実施されている先天性代謝異常マス・スクリーニングは、すでにわが国で毎年出生する新生児の98%をカバーするに至り、世界でも稀にみる普及度を誇っている。従って、このマス・スクリーニングに試験として用いられる濾紙乾燥血はきわめて貴重な存在で、その有効な利用法については、わが国のみならず諸外国からも注目され始めている。今回のわれわれの報告はこの貴重な試料をこれまで全く実体の知られていないわが国の新生児異常 Hb 症のマス・スクリーニングに応用しようとするもので、特に試料としての濾紙乾燥血の特殊性に対応できるようにグロビン鎖の形でマス・スクリーニング法の確立に焦点がしぼられた。

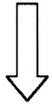
方法論的には、前述のごとく、ほぼ完成に近い状態にある。すなわち、再現性が高く、装置も安価で、一人の技師が1日約500人分の試料を処理することができ、経済性も高く、1検体当たり50円足らずですむというマス・スクリーニングにうってつけの条件を備えている。

新生児期は、われわれの生涯を通じての重要な転換期に当り、呼吸という重要な生命現象をになう Hb 分子も、胎児型の Hb F ( $\alpha_2\gamma_2$ ) から成人型の Hb A ( $\alpha_2\beta_2$ ) に転換する。従ってこの時期には $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ 各グロビン鎖の質的、量的な異常をとらえることができ、情報量にも恵まれている。今回の研究では、特にグロビン鎖の質的な異常、すなわち Hb 変異種のマス・スクリーニングに重点をおき、試行段階ですでに目覚ましい成果が上りつつある。大阪地区で1万人の新生児から $\alpha$ 鎖変異種5種類と $\gamma$ 鎖変異種11種類が見出されたが、この高頻度は予想をはるかに上まわるものであった。特に $\gamma$ 鎖変異種の高頻度については注目されるところで、これまで $\alpha$ および $\beta$ 鎖変異種と比べて異常に報告例の少ない $\gamma$ 鎖変異種が見落されていたということを実証するものである。その理由は、いうまでもなく約6ヵ月後に $\gamma$ 鎖が大部分 $\beta$ 鎖に転換してしまうことによる。従って、理論的にも予測されていたように $\gamma$ 鎖変異種もまた $\alpha$ および $\beta$ 鎖変異種とほぼ同じくらい存在すると考えられる。

これまでの諸外国の成績から、一般にマス・スクリーニングで見出される成人型 Hb 変異種の約30%がなんらかの病的症状を呈し、その約半分は不安定異常 Hb 症といわれている。これまで胎児型 Hb 変異種については、前述のごとく全く情報がなかったが、今回のわれわれの研究成果から予想通り $\alpha$ および $\beta$ 鎖変異種とほぼ同程度存在することが明らかにされたので、胎児期から新生児期にかけての不安定異常 Hb 症が問題となる。不安定異常 Hb 症の臨床的な重症度は、脾機能、すなわち、異常赤血球の捕捉・処理機能によることが多い。従っ

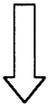
て脾機能の未熟な胎生期には不安定異常 Hb 症としての重症度は比較的軽いが、脾機能の発現される新生児期には特に注目されねばならない。すなわち、重篤な黄疸を呈するはずで、おそらく原因不明の核黄疸から重症心身障害児に移行する新生児の重要な原因の一つを  $\gamma$  鎖変異種に由来する不安定異常 Hb 症が占めるものと思われる。このような新生児を救うためには、早期に異常 Hb 症の有無を診断して、交換輸血を行うしかない。

ここに報告した新生児異常 Hb 症マス・スクリーニング法は、遺伝・疫学面からみても先天異常モニタリングのモデルシステムの一つになると同時に、これによって得られた知見は臨床面でも重要な意義をもつようになるであろう。



## 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



異常ヘモグロビン(Hb)症を広義に解釈すると、Hb を構成するグロビン鎖の一次構造異常をともなう構造変異種と、グロビン鎖合成の遺伝的欠陥に由来するサラセミア症候群に大別される。われわれは、数年来先天異常モニタリング研究の一環としてわが国における新生児異常 Hb 症のモニタリングを計画し、方法論の一部は、すでに昭和 55 年度研究報告書に報告してきた。われわれの新生児異常 Hb モニタリング計画の概要は図 1 のごとくで濾紙乾燥血を試料としてマス・スクリーニングで検出された構造変異種およびサラセミアについて種々の角度から研究し、得られた情報を臨床的な立場から十分吟味した上で患者に還元しようというものである。この計画の最も核心となる部分が、新生児異常 Hb のマス・スクリーニングで、本年度は構造変異種について確立された方法の詳細と試行の結果を報告する。