

## 軽度の溶血性貧血を示した Hb Peterborough [ $\beta$ 111 (G13) Val $\rightarrow$ Phe] の症例

末次 慶收

軽度の溶血性貧血と診断された52歳の女性、岡山県出身、の溶血液について等電点電気泳動法で異常 Hb の検索を行った所、Hb F バンド付近に異常分画を検出した。単離した異常 Hb 分画から調製したトリプシン消化ペプチドの逆相 HPLC とアミノ酸組成分析による解析から、 $\beta$  Tp-12a ペプチド ( $\beta$  105-112 : Leu-Leu-Gly-Asn-Val-Leu-Val-Cys) にアミノ酸置換 (Val  $\rightarrow$  Phe) の存在が推測された。DNA の PCR 産物の直接シーケンシングにより、 $\beta$  111 コドン GTC の第1塩基 G の T への置換が明らかになった。これは  $\beta$  111 Val  $\rightarrow$  Phe の変異を示しており、これによる酸素親和性低下と不安定性をもつ Hb 異常症、Hb Peterborough [ $\beta$  111 (G13) Val  $\rightarrow$  Phe] と同定された。一方で、Hb 合成試験は  $\beta/\alpha=0.72-0.79$  と軽度の  $\beta$  鎖グロビンの合成抑制を示し、不安定  $\beta$  鎖グロビン異常 Hb によるためと考えられた。実弟もこの Hb の保因者であり、軽度の溶血と、 $\beta/\alpha$  値の軽度低下を示した。

この異常 Hb の発見は、本邦第2例目であるが、第1例目の大阪の家系との関連は明らかになっていない。

(平成16年6月15日受理)

### A Case Report of a Patient with Hb Peterborough [ $\beta$ 111 (G13) Val $\rightarrow$ Phe] Causing a Mild Hemolytic Anemia

Yoshimasa SUETSUGU

Isoelectric focusing of the hemolysate from a 52-year-old female with a mild hemolytic anemia living in Okayama prefecture, showed an abnormal Hb band around the zone of Hb F, although a DEAE-HPLC of it did not reveal any abnormal Hb peaks. An isopropanol precipitation test of the hemolysate was positive, showing the presence of an unstable Hb. Amino acid analysis of the peptides from the isolated abnormal Hb using of a reversed phase HPLC suggested that there was an amino acid substitution in the  $\beta$  Tp-12a peptide ( $\beta$  105-112 : Leu-Leu-Gly-Asn-Val-Leu-Val-Cys). However, amino acid substitution was not detected by amino acid composition analysis. Direct sequencing of the PCR product showed that the first nucleotide of the triplet codon (GTC) at the 111th position of the b-globin gene had changed from G to T, suggesting an amino acid substitution of Val to Phe, which led us to identify the abnormal Hb as Hb Peterborough [ $\beta$  111 (G13) Val  $\rightarrow$  Phe].

Hb Peterborough has been reported as an unstable abnormal Hb with a low oxygen affinity, and

it is considered to cause a mild hemolytic anemia. In addition, Hb biosynthesis disclosed slightly lower values of  $\beta/a = 0.72-0.79$ , which were considered to be due to the instability of an abnormal Hb with a  $\beta$ -globin chain variant. The patient's younger brother was a carrier of the same Hb, and showed compensated hemolysis and a slightly lower  $\beta/a$  value.

An discovery of this Hb in Japanese is the second instance of its detection following a case in Osaka prefecture. The lineage relationship between these cases has not been determined. (Accepted on June 15, 2004) *Kawasaki Igakkaishi* 30(1): 21-30, 2004

**Key Words** ① Hb Peterborough [ $\beta$  111 (G13) Val  $\rightarrow$  Phe]

② Hemolytic anemia ③ Isoelectric focusing

④ DNA analysis ⑤ Hb biosynthesis

## はじめに

赤血球は、肺胞で酸素と結合し、その酸素を末梢組織に運搬・供給し、組織の生理現象を維持するという重要な働きをしている。この働きの中心的役割を担っているのが赤血球中のヘモグロビン (Hb) である。正常成人の赤血球の大部分を占めるのが Hb A ( $\alpha_2\beta_2$ ) で、 $\alpha$  鎖グロビンと  $\beta$  鎖グロビンペプチドの各々が特異な 3 次元構造を形成し、中央のヘムポケットにヘムを取り込み、 $\alpha$  鎖  $\beta$  鎖それぞれ 2 本ずつからなる 4 量体となって安定な立体構造をとっている。

$\alpha$  鎖グロビンあるいは  $\beta$  鎖グロビンのアミノ酸配列にアミノ酸置換あるいは欠落・延長が生じた異常グロビン鎖には、ヘムを欠落・変性する不安定 Hb 分子となり崩壊するものもある。また異常 Hb には metHb 化し、hemichrome となり、不溶性凝固物を形成して有核赤血球や赤血球内に封入体をつくることもある。これら赤血球の一部は骨髄内で、また、脱核して赤血球になったものは末梢血液中で崩壊する。このような不安定性の高い異常 Hb 症では脾腫や重篤な溶血性貧血が出現する<sup>1)</sup>。

今回、我々は軽度の溶血性貧血を認めた 52 歳の女性 (岡山県出身) の異常 Hb を検索し、不安定 Hb の保因者と確定し、グロビンのアミノ酸組成分析、さらに遺伝子解析から不安定性の Hb Peterborough [ $\beta$  111 (G13) Val  $\rightarrow$  Phe] と

同定した<sup>2)</sup>。また、この女性の 48 歳の弟も、特に自覚症状は認めないが合わせて精査したので、その結果について報告する。

## 材料と方法

1. 末梢血液検査: EDTA 添加末梢血の血球計測、および末梢血から分離した血清を用いた生化学検査を行った。

2. Hb 分析: 溶血液を調製し、キャリアアンホライト/ポリアクリルアミドゲルでの等電点電気泳動 (IEF; pH 6-9) 法<sup>3)</sup> および陰イオン交換樹脂高速液体クロマトグラフィー (DEAE-HPLC; DEAE-5PW, 7.5 x 75 mm, Tosoh Co., Tokyo, Japan) で Hb 分析を行い、Hb 組成 (Hb A<sub>2</sub>, Hb A, Hb F および異常 Hb) を検出した<sup>4)</sup>。

3. Hb の不安定性試験 (イソプロパノール沈殿試験): 17% イソプロピルアルコールを含む 0.1 mol/L リン酸緩衝液 (pH 7.4) 1 mL を 37℃ に加温した中に溶血液 100  $\mu$ L を加え、10 分間加温して、沈殿形成の有無を正常コントロールと比較した<sup>5)</sup>。

4. グロビンの構造解析:

1) 異常 Hb の単離: 溶血液の IEF を行い、異常 Hb バンドをゲルから切り取り、水に溶出させ、コロジオンバッグ (ザートリウス) を使用して限外ろ過を行い、濃縮異常 Hb 画分を単離収集した。

2) グロビンの調製: 濃縮異常 Hb 画分を冷

1%塩酸/アセトン処理により脱ヘムし、さらに冷アセトンで洗浄し、減圧下で乾燥した。

3) CMC-カラムクロマトグラフィーによるグロビンの単離：グロビンをCM-セルロース (CM-52, Whatman Paper Co., Kent, UK) カラム (1 x 20 cm) に重層し、8 mol/L 尿素-50 mmol/L メルカプトエタノール-リン酸ナトリウムバッファー、リン酸ナトリウム濃度 7.5 mmol/L から 32.5 mmol/L で作るリニアグラジエント (pH 6.85, 各 150 mL 使用, 溶出速度: 0.7 mL/min, 4 mL/tube) で溶出した。溶出液は 280 nm でモニターした。溶出した  $\beta$  鎖グロビンと  $\alpha$  鎖グロビン画分を集め、凍結乾燥した<sup>6)</sup>。

4) グロビンのトリプシン消化： $\beta$  鎖グロビン画分は、アミノエチル化した後、Sephadex G 25 Fine カラム (溶出液: 0.2 mol/L 酢酸溶液) を通し、凍結乾燥してアミノエチル化  $\beta$  鎖 (AE- $\beta$ ) グロビンを得た<sup>7)</sup>。0.01 mol/L 水酸化ナトリウム溶液 (約 3 mL) に溶かし、基質の約 100 分の 1 量の TPCK-トリプシン (Tp) を約 0.5 mL の 0.01 mol/L HCl に溶解して加えた。37°C, pH 8-9 を保持しつつ、4 時間消化反応を行った。0.1 mol/L HCl で pH を約 2 に調製し、凍結乾燥してグロビンの Tp 消化物とした。

5) 異常ペプチドの検索とアミノ酸組成分析：Tp 消化物を 0.1%-トリフルオロ酢酸 (TFA) (A) に溶解し、逆相 HPLC (TSKgel ODS 18-80 Ts, 4.1 x 250 mm, Tosoh Co., Tokyo, Japan), (A) と 0.1% TFA-50% アセトニトリル (B) のリニアグラジエント (A  $\rightarrow$  B: 100 分, 溶出速度: 0.7 mL/min, 検出: 214 nm) で溶出した<sup>8)</sup>。溶出したペプチドを試験管に集め、凍結乾燥後 6 mol/L HCl を加え、減圧下に封管し、110°C, 20 時間加水分解した。減圧下に乾燥し、アミノ酸自動分析器でアミノ酸組成を求めた。

## 5. Hb 合成試験

1) 合成 Hb の調製：ヘパリン添加下に採血した末梢血液 (400  $\mu$ L) を生理食塩水で洗浄し、血球層をトリチウム標識ロイシン (<sup>3</sup>H-

Leu; 2000 KBq) を含むアミノ酸培地で 37°C, 2 時間インキュベートした。生理食塩水で洗浄後、血球部に 0.1% サボニン溶液 (~1 mL) を加えて溶血させ、合成 Hb 溶血液とした<sup>6)</sup>。

2) 合成グロビン分析：4-2), 3) と同様に、グロビンを調製し、CM セルロースカラムクロマトグラフィー (カラムサイズ: 0.7 x 10 cm, 溶出液: 各 50 mL, 溶出速度: 0.15 mL/min., 分画: 1.5 mL/tube) で  $\beta$  鎖と  $\alpha$  鎖グロビンに分画した。各分画を 280 nm で吸光度を測定し、各チューブから 0.9 mL を計り取り、シンチレーションカクテル (シンチゾール 500, Dojin Chemicals Co., Kumamoto, Japan) 10 mL を加え、液体シンチレーションカウンターで dpm 値を測定した。各グロビン画分の全 dpm 値を求め  $\beta/\alpha$  比を算定した<sup>6)</sup>。

## 6. 遺伝子 (DNA) 解析

1) DNA の抽出：末梢血液から白血球層を集め、溶血処理、プロテアーゼ K, フェノール処理、クロロホルム処理を順次行い、アルコールにより DNA を沈殿させ、TE (10 mmol/L Tris-1 mmol/L EDTA, pH 7.4) に溶解し DNA 溶液とした。濃度は 260 nm での OD = 1.0 を 40  $\mu$ g/mL として求めた<sup>9)</sup>。

2) Polymerase Chain Reaction (PCR)： $\alpha$  鎖グロビンおよび  $\beta$  鎖グロビン遺伝子の全領域をカバーするように設定したプライマーを使用して PCR を行った。PCR 増幅物は 1% アガロースゲル電気泳動 (電気泳動用緩衝液は 1 X TEA を使用) し、目的サイズの DNA 断片をゲルから切り出し、DNA 抽出キットによって回収した<sup>10)</sup>。

3) DNA シーケンシング：PCR 増幅-アガロースゲル電気泳動で精製した DNA をテンプレートに、合成シーケンス用プライマーを用いて Big Dye Terminator 法で 5' 端あるいは 3' 端から順次塩基配列決定を行った<sup>11)</sup>。



Table 1. Hematological findings

	Case 1	Case 2
RBC (×10 <sup>4</sup> /μl)	339	425
Hb (g/dl)	10.3	13.6
Ht (%)	32.0	39.4
retic (%)	4.7	4.2
WBC (/μl)	4500	4400
plt (×10 <sup>4</sup> /μl)	24.5	20.3
T-bil (mg/dl)	1.3	1.4
LDH (I.U./l)	455	418
Haptoglobin (mg/dl)	<5	<5
Coomb's test	negative	negative
Ham test	negative	negative
Sugar Water test	negative	negative
HbA <sub>2</sub> (%)	2.14	2.34
HbF (%)	0.95	1.16
Abn Hb (%)	positive	positive
Instability test	positive	positive
β/α	0.79	0.72

結 果

臨床所見

発端者 (case 1) は岡山県出身の52歳女性. 特に自覚症状はなかったが, 毎年の健康診断で貧血を指摘されていた. 過去に数回精査したが, 原因を解明するには至らなかった. 今回, 近医で左卵巣嚢胞摘出手術施行時に貧血を指摘され, 川崎医科大学血液内科を紹介受診となった. 受診時の身体所見は, 結膜に軽度の貧血症状を認めた以外, 特記すべき所見はなかった. 末梢血液の検査結果 (Table 1, case 1) は, RBC 数, Hb 濃度, Ht 値に軽度の低下が認められ, 網状赤血球数の増加と Haptoglobin の低値から軽度の溶血性貧血と診断された.

発端者の実弟 (Table 1, case 2), 48歳, 大阪在住, は RBC 数, Hb 濃度は正常範囲内であったが, 網状赤血球数の増加と Haptoglobin 低値から同様に溶血性貧血と診断された. 両者の貧血の原因解明のため Hb の精査となった.

Hb の分析

IEF 法による溶血液の Hb 分析では, 陰極側の Hb A<sub>2</sub> と陽極側の Hb A バンドの間の Hb

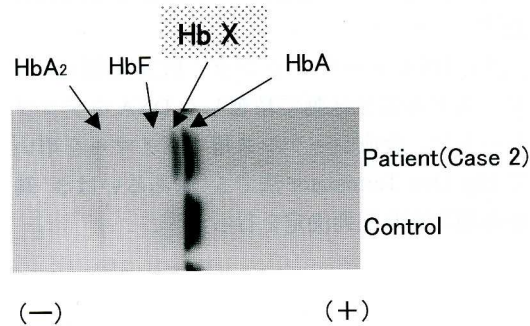


Fig. 1. Isoelectric focusing (pH range ; 6~9) of the hemolysate from case 2

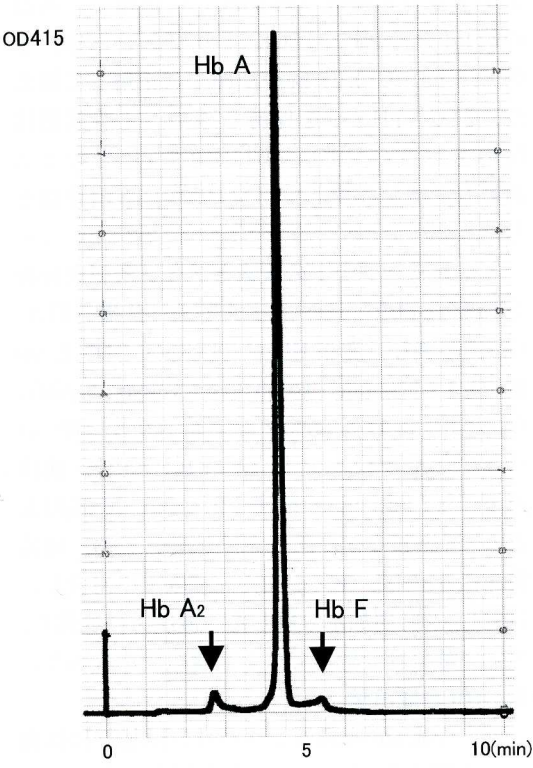


Fig. 2. DEAE-HPLC analysis of the hemolysate from case 1

Fバンドの領域のわずかに陽極側に異常 Hb バンドが観察された (Fig. 1, Hb X; case 2). Case 1 でも同様の結果であった. DEAE-HPLC (Fig. 2) では, Hb A<sub>2</sub> や Hb F 含量はいずれも正常範囲内で, IEF 法で観察された異常 Hb は検出できず, 異常 Hb 含量の算出は行えなかった.

溶血液のイソプロパノール沈殿試験では正常コントロールと比較して明らかに早く沈殿を生成し, 不安定性の異常 Hb の存在が示唆された (Fig. 3).

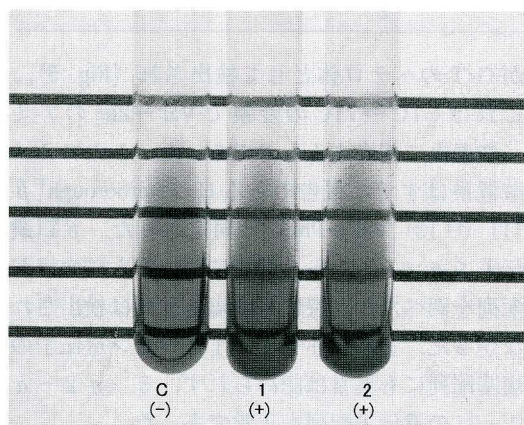


Fig. 3. Isopropanol precipitation of the hemolysate  
C : control, 1 : case 1, 2 : case 2

## Hb 構造解析

全溶血液から調製したグロビンの CM-セロースカラムクロマトグラフィー (CMC) での, 通常法による異常グロビン分離は困難であった (Fig. 6 参照) ので, IEF 上で観察される異常 Hb 画分から調製したグロビンの CMC から  $\beta$  鎖グロビンおよび  $\alpha$  鎖グロビン画分をそれぞれ回収し, 分析を行った. AE- $\beta$  鎖グロビンの Tp 消化物の逆相 HPLC 分析からは明瞭な異常ペプチドピーク ( $\beta$  Tp) の検出はできなかった.  $\beta$  Tp-2ペプチドの前に現れる小

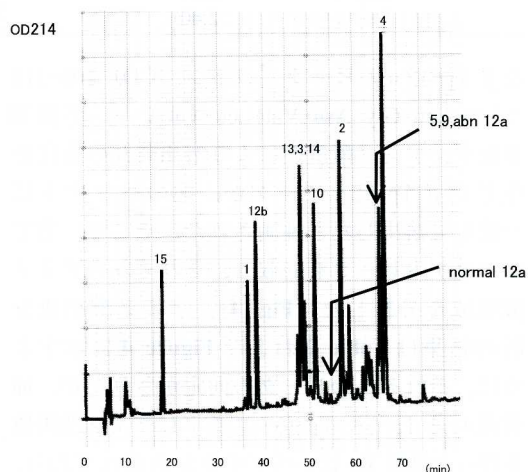


Fig. 4. Separation of the tryptic peptides of AE- $\beta$  Peterborough globin by reversed phase HPLC

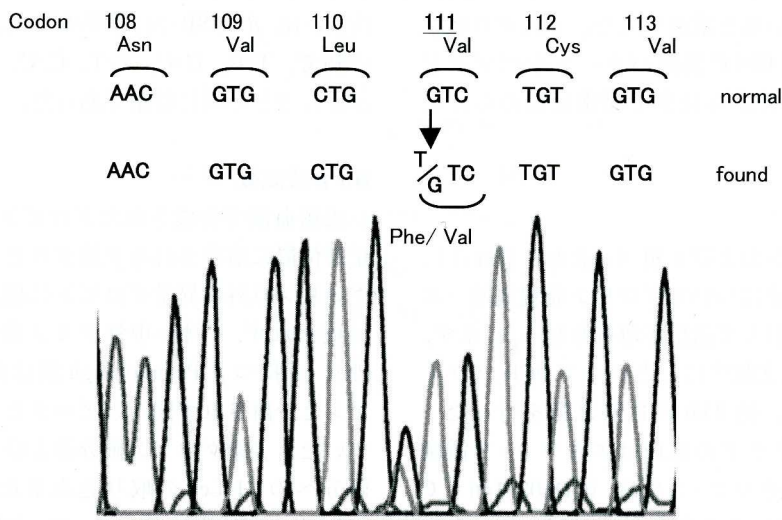


Fig. 5. DNA sequence of the region of  $\beta$  codon 108-113 of the amplified  $\beta$  globin gene



**Table 2.** Amino acid analysis of abnormal peptide mix collected by reversed phase-HPLC, and the theoretical values  $\beta$  Tp-5,  $\beta$  Tp-9, and  $\beta$  Tp-12a peptide

	Found (mol/mol)	Theoretical values			
		Total	Tp- 5	Tp-9	Tp- 12a
Asp	7.03	7	3	3	1
Thr	1.18	1	1		
Ser	2.98	3	2	1	
Gul	1.23	1	1		
Gly	4.96	5	2	2	1
Ala	2.95	3	1	2	
Val	2.53	4	1	1	2
Met	1.09	1	1		
Leu	7.14	8	1	4	3
Phe	4.88	4	3	1	
Lys/AE-Cys	2.96	3	1	1	1
His	0.91	1		1	
Pro	2.40	2	2		

な  $\beta$  Tp-12 a のピーク [コドン (CD) 105-112 : Leu-Leu-Gly-Asn-Val-Leu-Val-Cys] が観察されず、アミノ酸置換により溶出時間の変化を生じた  $\beta$  Tp-12 a ピークが、他のペプチドに一致して溶出したと推測された。そこで、全てのペプチドピークを回収し、それぞれのアミノ酸組成を分析した (Fig. 4)。アミノ酸組成分析の結果は Table 2 および Figure 4 に示すように、それぞれのピークの同定がされたが、通常現れる Tp-5 や Tp-9 ペプチドにアミノ酸置換を伴った異常 Tp-12 a ペプチドが含まれており、理論値との比較で Tp-12 a は Val の減少と Phe の増加、すなわち Val  $\rightarrow$  Phe のアミノ酸置換を起こしていると推測された。  $\alpha$  鎖グロビン消化物の逆相 HPLC 溶出パターンやペプチドのアミノ酸分析からは全く異常は認められなかった。

DNA 解析

$\beta$  鎖グロビンおよび  $\alpha$  鎖 ( $\alpha$  2 および  $\alpha$  1) グロビン遺伝子についてグロビン発現領域 (エキソン) に注目して遺伝子解析を行った。まず、 $\beta$  鎖遺伝子は文献<sup>11)</sup>にしたがって PCR プライマーを設定し、約 3 kb の PCR 増幅を行った。  
 $\beta$  Tp-12a ペプチドの領域はエキソン-3 領域にあるが、エキソン-3 領域 (CD105-146 = C 末端) の CD 111 の正常なトリプレットコドンは GTC (Val) であるが、このコドンの第 1 塩基

が G/T のヘテロ体として検出され (Fig. 5)、これは GTC  $\rightarrow$  TTC の変換で Val  $\rightarrow$  Phe のアミノ酸置換に相当するものであった。このアミノ酸置換はすでに報告のある Hb Peterborough [ $\beta$  111 (G 13) Val  $\rightarrow$  Phe] と同定された。 $\beta$  鎖遺伝子エキソン-1 や-2 領域についても順次塩基配列を調べたが、特に異常塩基配列は検出されなかった。また、 $\alpha$  2 や  $\alpha$  1 グロビン遺伝子の塩基配列にも異常は認められず、5'- $\alpha$  2 -  $\alpha$  1-3' の遺伝子配列も正常であった。

また、 $\beta$  鎖グロビン遺伝子のフレームワーク (5 箇所) を PCR/直接シーケンシング法によって求めた (Table 3)。それぞれ CD  $\beta$  2,  $\beta$  IVSII-16,  $\beta$  IVSII-74,  $\beta$  IVSII-81,  $\beta$  IVSII-666 の順で、T/C, G/C, T/T, C/C, C/T であり、case 1, 2 と同じ結果であった。

Hb 合成試験

末梢血液で合成されたグロビンの CMC は、正常位置に溶出される  $\beta$  鎖グロビンおよび  $\alpha$  鎖グロビン以外に異常グロビンに相当するピークは現われず、中性-中性アミノ酸置換 (Val  $\rightarrow$  Phe) を持つ  $\beta$  Peterborough 鎖は正常  $\beta$  鎖グロビンと分離されず同一のピークとして溶出されていた。 $\beta$  鎖グロビン画分および  $\alpha$  鎖グロビン画分への <sup>3</sup>H-Leu の取り込み量比 ( $\beta$  /  $\alpha$ ) は 0.79 (case 1) と 0.72 (case 2) と軽度の  $\beta$  鎖グロビン合成抑制傾向を示した (正常範囲  $\beta$  /  $\alpha$

Table 3. Framework of the  $\beta$  globin gene

Sites	CD $\beta$ 2(Hgi A I)	$\beta$ IVS II-16(Ava II)	$\beta$ IVS II-74	$\beta$ IVS II-81	$\beta$ IVS II-666
Case 1	T/C	G/C	T/T	C/C	C/T
Case 2	T/C	G/C	T/T	C/C	C/T

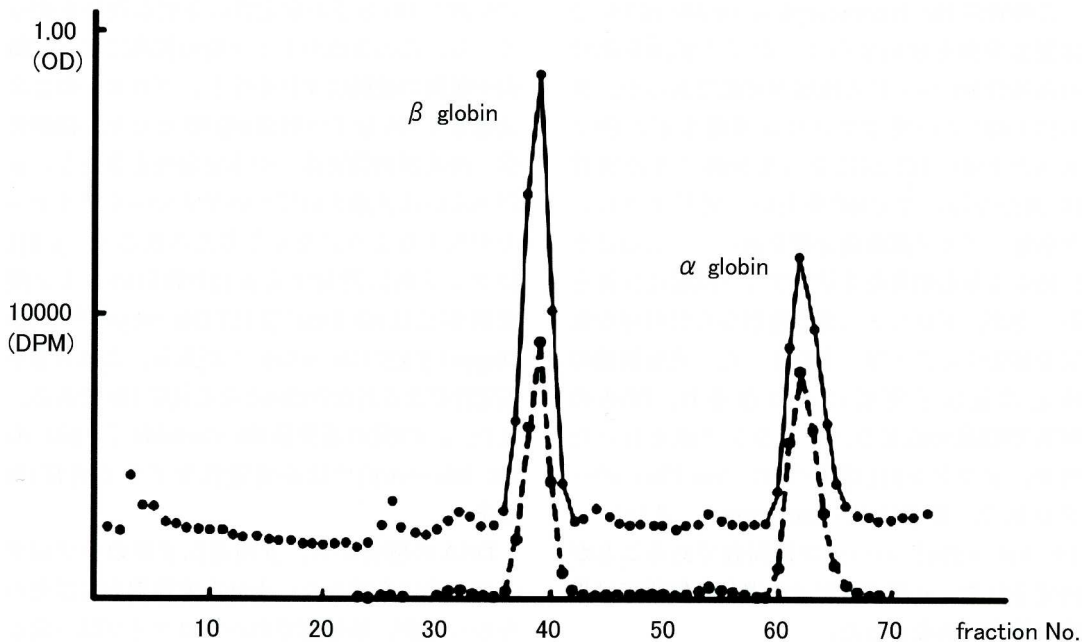


Fig. 6. Separation of the AE  $\beta$  globin on a CMC column chromatography, and the radioactivities (dpm) incorporated into the  $\beta$  and  $\alpha$  globin.

The solid line means OD, and the broken line means dpm.

= 0.9~1.2) (Fig. 6).

## 考 察

Hb Aを構成する  $\alpha$  鎖および  $\beta$  鎖グロビンの、アミノ酸配列に置換・挿入・欠失を伴うような異常 Hb はおよそ 600 種を超え、我が国でも 180 種以上が報告されている。これら異常 Hb のうち、溶血性貧血の原因となる Hb 分子の不安定性や、多血症やチアノーゼの原因となる機能異常を伴う異常 Hb は約 3 分の 1 である。

酸素親和性低下と不安定性のある Hb Peterborough [ $\beta$  111 (G13) Val  $\rightarrow$  Phe] の初例は、1972 年、英国 Peterborough に住むイタ

リア出身の Hb Peterborough の保因者の父親と、Hb Lepore の保因者の母親を両親に持つ重篤な貧血の少年の家系から検出された。少年からの溶血液の電気泳動法により検出された異常グロビンの、Tp 消化物のフィンガープリント法によって構造解析が行われた。少年は父親から Hb Peterborough を、また母親から Hb Lepore を受け継いだ、Hb Peterborough/Hb Lepore の 2 重ヘテロ型であった<sup>2)</sup>。その後、日本人女性からも (1998 年) この異常 Hb が検出され、Mass Spectrometry (MS) 法によってその構造が決定され<sup>12)</sup>、また、初例の英国家族の同胞でイタリア在住の 2 家系から検出された (2000 年)<sup>13)</sup> 異常 Hb は、MS 法による構造推定の後、Amplification Refractory Mutation System

(ARMS)を適用したDNA解析によって構造が明らかにされた。今回の報告は、本邦2例目に当たるHb Peterboroughで、岡山県出身者に発見されたものである。本邦での第1例目(大阪)の症例と今回の症例との家族関係は明瞭にすることはできなかった。

この異常Hb PeterboroughはDEAE-HPLCでは異常分画を検出することができず、IEF法でのみ異常Hbバンドの観察が可能であった。さらにCMCでの異常グロビン単離も不可能であったため、IEF法によって分離できた異常Hb画分を用いてCMCを行い、異常グロビンを単離、アミノ酸組成分析を行った。このように通常よりも煩雑な手法でアミノ酸組成分析を行ったが、グロビンの構造解析からは明確な変異を確定することはできなかった。異常構造の確定は遺伝子解析によりなされ、DNAのPCR増幅後の直接シーケンシング法を行った結果、 $\beta$ コドン111 GTC/TTC (Val/Phe)のヘテロ体で、患者はHb Peterborough [ $\beta$  111 (G 13) Val  $\rightarrow$  Phe]のヘテロ保因者であることが決定された。 $\alpha$ 鎖グロビンの遺伝子解析では異常は検出されなかった。

一般に、このような中性アミノ酸から中性アミノ酸間へと置換した異常Hbでは、その分離や正確な含量測定は困難である上、構造解析も困難である。しかし、IEF法は、574個のアミノ酸から構成されるHb分子( $\beta$ 鎖:146個、 $\alpha$ 鎖:141個)の中で、 $\beta$ 鎖グロビンの僅か1個のアミノ酸が置換することによる等電点の差を分別するには有効な方法である。今回のHb PeterboroughはIEF法でのみ異常Hbの分離が可能であった。陽イオン交換樹脂HPLCやDEAE-Sephadexクロマトグラフィーによる異常Hb画分の分離・分析法も可能のようであるが<sup>2)</sup>、今回はこれらによる分析では異常Hb画分の分離は困難であった。

$\beta$  111 Valにアミノ酸置換を持つ異常HbはValのイソプロピル基よりもかさ高い側鎖フェニル基に置換したHb Peterborough( $\rightarrow$  Phe)とかさの小さいメチル基に置換したHb Stanmore

( $\rightarrow$ Ala)<sup>14)</sup>とがあり、いずれも中性-中性アミノ酸間の置換である。いずれも不安定性と酸素親和性低下を示す異常Hbと報告されている。 $\beta$  111位アミノ酸はHb分子4量体の分子内部に位置し、 $\alpha$ 鎖グロビンサブユニットと $\beta$ 鎖グロビンサブユニットの接触領域( $\alpha$  1  $\beta$  1 interface)に位置しHb分子の安定性に重要な役割を担っている。この領域のアミノ酸の置換によって鎖内や鎖間の接触にずれが生じ、グロビンの3次元構造やHb分子の形成が困難となり、機能異常(酸素親和性異常)や不安定性をきたし、 $\alpha$ 鎖あるいは $\beta$ 鎖グロビンのモノマーやダイマーを形成するようになると考えられる<sup>15)</sup>。 $\beta$  111位アミノ酸に近接する $\beta$  127 (H 5)のアミノ酸変異体にはHb Brest( $\beta$  127 Gln  $\rightarrow$  Lys)<sup>16)</sup>やHb Dieppe( $\beta$  127 Gln  $\rightarrow$  Arg)<sup>17)</sup>があり、これらも不安定性による貧血の原因となる異常Hbである。また、 $\alpha$  103位の変異体Hb Contaldo [ $\alpha$  103 (G 10) His  $\rightarrow$  Arg]<sup>18)</sup>は不安定性を呈する異常Hbである。

DNAの解析から、 $\beta$ 鎖遺伝子群のハプロタイプの決定を試みた。十分な家族調査には至らなかったが、姉弟間でのハプロタイプは一致しており、 $\beta$ 鎖遺伝子のフレームワークはType-2 (C C T C T)とType-3 A (T G T C C)のヘテロ型であることが明らかとなった<sup>19)</sup>。

今回の症例についてのHb合成試験の結果は、いずれも $\beta/\alpha$ 比は0.79(症例1)、0.72(症例2)と正常値(0.9-1.2)よりやや低下しており、 $\beta$ 鎖グロビンの合成抑制を示唆する値であった。今回の例では異常Hbの含量を正確に測定できなかったが、英国の初例では33.4%<sup>2)</sup>、イタリアの例では29.8-30.2%<sup>13)</sup>と報告されている。通常の $\beta$ 鎖グロビン異常Hbでは、異常Hb含量はおおよそ45-50%を占めると考えられるのに対してやや低値を示しており、不安定Hbの存在によるHb合成異常による影響と推測された。



## 謝 辞

本研究を遂行するにあたり、終始ご指導いただきました川崎医科大学学生化学 原野昭雄助教授、川崎医療福祉大学医療技術学部臨床栄養学科 原野恵子助教授に深く感謝いたします。また、貴重な症例をご提供し

ていただいた川崎医科大学血液内科 杉原尚教授に深く感謝いたします。

本研究は文部科学省科学研究費補助金 (12672259) および川崎医科大学プロジェクト研究費 (12-105, 13-104) で行った。また、本研究は、第43回日本臨床血液学会総会 (神戸) で発表した。

## 文 献

- 1) Bann HF, Forget BG\* Hemoglobin : Molecular, Genetic and Clinical Aspects. W.B. Sanders Company, Philadelphia, 1986, pp 381-421, pp 565-586.
- 2) King MAR, Wiltshire BG, Lehmann H, Morimoto H : An unstable haemoglobin with reduced oxygen affinity : Haemoglobin Peterborough,  $\beta$  111 (G13) Valine  $\rightarrow$  Phenylalanine, its interaction with normal Haemoglobin and with Haemoglobin Lepore. Brit J Haematol 22 : 125-134, 1972
- 3) 原野昭雄, 原野恵子, 小出智子, 岡田美恵子, 上田 智, 柴田 進 : 等電点分画法による異常血色素の Mass Screening 法. 臨床病理 28 : 149-152, 1980
- 4) Harano T, Harano K, Imai K, Murakami T, Matsubara H : Hb Kurosaki [ $\alpha$  7 (A5) Lys  $\rightarrow$  Glu] a new  $\alpha$  chain variant found in a Japanese woman. Hemoglobin 19 : 197-201, 1995
- 5) Carrell RW, Kay R : A simple method for detection of unstable haemoglobins. Brit J Haematol 23 : 615-619, 1972
- 6) 柴田 進, 原野昭雄 : サラセミアの診断. グロビン鎖生成試験. 検査と技術 8 : 1038-1044, 1980
- 7) Jones RT : Structural studies of aminoethylated hemoglobins by automatic peptide chromatography. Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology. Vol. XXIX, 1964, pp 297-308
- 8) Orisaka M, Tajima T, Harano T, Harano K, Kushida Y, Imai K : A new variant, Hb Hanamaki or  $\alpha$  2139(HC 1) Lys  $\rightarrow$  Glu  $\beta$  2, found in a Japanese family. Hemoglobin 16 : 67-71, 1992
- 9) Poncz M, Solowiejczyk D, Harpel B, Mory Y, Schwartz E, Surrey S : Construction of human gene libraries from small amounts of peripheral blood : Analysis of  $\beta$ -like globin genes. Hemoglobin 6 : 27-36, 1982
- 10) Oribe Y, Hamaguchi K, Kusuda Y, Marano K, Harano T, Iwasaki Y, Kotegawa K, Sakata T : Hb Tsukumi [ $\beta$  117 (G19) His  $\rightarrow$  Tyr] : A new hemoglobin variant found in a Japanese male. Hemoglobin 24 : 117-123, 2000
- 11) Protocol : ABI Prism. BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kits. edited by PE Biosystems, 1999
- 12) Nakanishi T, Miyazaki A, Kishikawa M, Shimizu A, Aoki Y, Kikuchi M : Hb Peterborough [ $\beta$  111 (G13) Val  $\rightarrow$  Phe] in Japan : Rapid identification by ESI/MS using proteolytic digests of oxydized globin. Hemoglobin 22 : 23-35, 1998
- 13) Carbone V, Salzano AM, Pagnini D, Papa G, Libertino R, Pagano L, De Rosa D, Pucci T : The mutation associated with Hb Peterborough [ $\beta$  111 (G13) Val  $\rightarrow$  Phe] originated from Southern Italy. Hemoglobin 24 : 227-237, 2000
- 14) Como PF, Wylie BR, Trent RJ, Bruce D, Volgato R, Wilkinson T, Kronenberg H, Holland RAB, Tibben EA : A new unstable and low oxygen affinity haemoglobin variant : Hb Stanmore [ $\beta$  111 (G13) Val  $\rightarrow$  Ala]. Hemoglobin 15 : 53-65, 1991
- 15) Sack JS, Andrew LC, Magnus KA, Hanson JC, Rubin J, Love WE : Location of amino acid residues in human deoxy hemoglobin. Hemoglobin 2 : 153-169, 1978
- 16) Baudin-Chich V, Wajcman H, Gombaud-Saintouge G, Arous N, Riou J, Briere J, Galacteros F : Hemoglobin Brest [ $\beta$  127(H 5) Gln  $\rightarrow$  Lys] a new unstable human hemoglobin variant located at the  $\alpha$  1  $\beta$  1 interface with specific electrophoretic behavior. Hemoglobin 12 : 179-188, 1988

- 17) Girodon E, Chanem N, Vidaud M, Riou J, Martin J, Galacteros F, Goossens M : Rapid molecular characterization of mutations leading to unstable hemoglobin  $\beta$ -chain variants. *Ann Hematol* 65 : 188-192, 1992
- 18) Sciarratta GW, Ivaldi G, Parodi MI, Sansone G, Malaro GI, Salkie ML, Wilson JB, Reece AL, Huisman THJ : The characterization of Hemoglobin Manitoba or  $\alpha_2$  102 (G6) Ser  $\rightarrow$  Arg  $\beta_2$  and Hemoglobin Contaldo or  $\alpha_2$  103 (G 10) His  $\rightarrow$  Arg  $\beta_2$  by high performance liquid chromatography. *Hemoglobin* 8 : 169-181, 1984
- 19) Orkin SH, Kazazian HH, Jr, Antnarakis SF, Goff SC, Boehem CD, Sexton JP, Waber PG, Giardina PJV : Linkage of  $\beta$ -thalassemia mutations and  $\beta$ -globin gene polymorphism with DNA polymorphisms in human  $\beta$ -globin gene cluster. *Nature* 296 : 627-631, 1982