

α グロビン遺伝子の終止コドンに変異を持つ α サラセミア様異常ヘモグロビン症, Hb Constant Spring の遺伝子解析

原野 恵子

α グロビン遺伝子の終止コドンに変異をもつ Hb Constant Spring 保因者と診断されているタイ人 (10人) から単離された赤血球を α グロビン遺伝子の解析に用いた。

Hb 分析は, 赤血球から調製した溶血液の等電点電気泳動法, 陰イオン交換 BioAssist Q カラムによる HPLC あるいは自動分析器, HLC-723G7, によって行った。キットによる簡易法で DNA の抽出をし, 欠損型の α サラセミア-2変異体や α サラセミア-1変異体の検出は Gap-PCR 法で行い, 非欠損型の α サラセミア変異体の検出は α グロビン遺伝子の PCR-シーケンシング法で行った。

Hb 分析では Hb A₂ 付近に Hb Constant Spring や Hb E と推測される低あるいは高含量の異常 Hb が存在し, また, HbA より陽極に Hb H が存在するものもあった。 α サラセミア-2変異体の 2 種の欠損型 ($-\alpha^{3.7}$ と $-\alpha^{4.2}$) は, 双方とも存在しなかったが, α サラセミア-1変異体の欠損型は --SEA 型が存在した。調べた検体中に検出された終止コドンに変異を持つ非欠損型の α サラセミア様変異体は α -Constant Spring (α^{CS}) のみならず α -Paksé ($\alpha^{Paksé}$) が存在した。このことから, タイで検出される Hb H 症には, --SEA/ α^{CS} や --SEA/ $\alpha^{Paksé}$ の遺伝子型が存在すると考えられた。また, 2 検体は, この地域でよくみられる Hb E 症の保因者でもあった。

この研究は, α^{CS} が Hb H 症の原因となっている東南アジア地域 (タイ, ベトナム, カンボジア, フィリピンなど) から日本に移住している多くの人々のヘモグロビン異常症の解析に有益であると思われる。

(平成16年11月9日受理)

Gene Analysis of α -Thalassemic Abnormal Hemoglobin, Hb Constant Spring, Possessing a Mutation at the Terminal Codon of α -Globin Gene.

Keiko HARANO

The red cells isolated from 10 Thai subjects, who had been diagnosed as carriers of Hb Constant Spring with a mutation at the terminal codon of the α -globin gene, were used for analysis of the α -globin gene.

Hb analysis was performed using the IEF and HPLC (BioAssist Q-HPLC and HLC-723G7) methods of the hemolysates prepared from the red cells. After extraction of DNA by a simple method using a kit, detection of the deletion type of α -thalassemia-2 or α -thalassemia-1 mutation

was performed by the Gap-PCR method and that of the non-deletion type of α -thalassemia mutation was done by PCR-sequencing of the α -globin gene.

Hb analysis revealed subjects with low or high abnormal Hb content close to Hb A₂. These were deduced as Hb Constant Spring and Hb E. Additionally, a few subjects were with Hb H at the anodic site. The deletion type of two kinds of α -thalassemia-2 mutation, $-\alpha^{3.7}$ and $-\alpha^{4.2}$, was not present. That of the α -thalassemia-1 mutation was of only one type, $--SEA$. The non-deletion type α -thalassemia-like mutation possessing a mutation at terminal codon found in the subjects had not only the α -Constant Spring (α^{CS}) gene but also the α -Paksé ($\alpha^{Paksé}$) gene. Therefore, the genotypes of patients diagnosed as having Hb H disease in Thailand might be $--SEA/\alpha^{CS}\alpha$ or $--SEA/\alpha^{Paksé}\alpha$. Two subjects were carriers of Hb E, which is the most common hemoglobin variant in Thailand.

This study may be useful for the analysis of hemoglobinopathies in the many people immigrating from Southeast Asian areas to Japan, especially Thailand, Vietnam, Cambodia, and the Philippines, since the α^{CS} gene is the common α -thalassemia-like mutation causing Hb H disease in these areas. (Accepted on November 9, 2004) *Kawasaki Igakkaishi 30(2):153-161, 2004*

Key Words ① Hb Constant Spring ② α -thalassemia ③ Hb H disease
④ Gene analysis ⑤ Hb Paksé

はじめに

ヘモグロビン (Hb) 異常症のなかで、Hb A ($\alpha_2\beta_2$) を構成する α グロビン鎖と β グロビン鎖間の合成不均衡 (α/β 比 $\neq 1$) によって生ずる病態がサラセミア (thal) である。 α グロビン鎖が β グロビン鎖にくらべて合成抑制が起こっているとき α thal といい、その反対の場合が、 β thal である。一般に、 β thal は重篤な症状を呈する傾向があることから、血液学的にも臨床的にも検出されやすいのに比べ、 α thal は軽症の場合が多く、見逃されている傾向がある。 α thal は、無症状の α thal-2、軽症の α thal-1 から重篤な症状を呈す Hb H 症や死産の Hydrops fetalis の 4 種に大別される。 α thal の多くは第 16 番染色体短腕上に並ぶ 4 個の α グロビン遺伝子 (染色体上での配列: 5'- $\alpha 2$ - $\alpha 1$ -3') のいずれかの欠損あるいは欠陥 (変異) によるもので、 α thal-2 では 4 個の α グロビン遺伝子のうち 1 個が欠損した $-\alpha/\alpha\alpha$ 、 α thal-1 では 2 個が欠損した $--/\alpha\alpha$ あるいは $-\alpha/-\alpha$ 、 Hb H 症では 3 個が欠損 $--/-\alpha$ 、 Hydrops fetalis

では 4 個すべてが欠損した $--/--$ の遺伝子型が当てられる^{1),2)}。なかには遺伝子の欠損によるものではなく遺伝子内の塩基置換等による非欠損型の α thal 変異体や α thal 様異常ヘモグロビン症 (α^T) も存在する。特に東南アジア地方に高頻度で検出される α グロビン遺伝子の終止コドン変異 ($\alpha 142$ 位 TAA \rightarrow CAA) によって 31 個のアミノ酸残基の延長した異常グロビンをもつ Hb Constant Spring (Hb CS) は α thal 様症状を示す異常 Hb である。 Hb CS の変異は $\alpha 2$ グロビン遺伝子上に起っている。 $\alpha 2$ グロビン遺伝子は $\alpha 1$ グロビン遺伝子にくらべ 2 ~ 3 倍の発現量を示すことから Hb CS 変異体 (α Constant Spring = α^{CS} 遺伝子) の保因者は欠損型変異体の保因者に比べ症状は重篤になるといわれている。例えば、 Hb H 症の場合は、 $--/\alpha^{CS}\alpha$ 型の遺伝子保因者は $--/-\alpha$ 型遺伝子保因者に比べ重篤な臨床症状を示している。また、 α^{CS} グロビンの不安定性から検出される Hb CS の含量は低く (ヘテロ接合型: 0.3 ~ 0.8%) 検出に困難を伴う場合もある^{2)~7)}。

最近の我が国の国際化にともない、日本各地には中国、東南アジア、中東アジア、中近東ア

ジア地域からの移住者をよく見かける。この地域には β thal 変異体の他に α thal 変異体の非欠損型の Hb CS 保因者も多く Hb H 症患者にはしばしば検出される^{3)~6)}。今後 Hb CS 保因者に遭遇する機会も多くなると予想される。今回、我々は Hb CS 保因者と診断された10人(タイ人)の末梢血液から分離した血球部を入手し、溶血液を調製して、等電点電気泳動法 (IEF) による Hb 分析、陰イオン交換樹脂 HPLC や全自動 Hb 分析装置による Hb の定性・定量分析を行い、さらに DNA を抽出し、欠損型の α thal の診断を行うとともに $\alpha 2$ および $\alpha 1$ グロビン遺伝子の塩基配列の解析から α^{CS} 遺伝子やその他の α グロビン遺伝子の終止コドン142 TAA の変異体の存在についても検索を試みた。

材料と方法

1. 検体試料：タイ・チュラロンコン大学医学部内科学教室で Hb CS 保因者と診断された患者の末梢血液から分離された血球部を凍結、空輸されたものを用いた。
2. 溶血液の調製：蒸留水200 μ L の入ったマイクロチューブに血球50 μ L を懸濁させ、四塩化炭素50 μ L を加えて激しく攪拌した後、12000 rpm, 5分間遠心し、上清を溶血液として集めた。
3. 等電点電気泳動法 (IEF) による Hb 分析：IEF はキャリアーアンホライトを含むポリアクリルアミドゲル (16 \times 11 \times 0.1 cm, pH 6~9) を調製し、電極液に0.2mol/L 水酸化ナトリウム (陰極) と0.2 mol/L リン酸溶液 (陽極) を使用した。検体は上記溶血液50 μ L に5% KCN 溶液1 μ L を加えて使用した。10 μ L をゲル板の陰極側から5 mm の位置に塗布し、500ボルト (一定), 15 $^{\circ}$ C, 15時間通電した⁸⁾。
4. 陰イオン交換樹脂高速液体クロマトグラフィー (HPLC) による Hb の定性・定量分析：BioAssist Q カラム (4.6 \times 50 mm, Tosoh Corp, Tokyo, Japan) を用い、溶離液に20 mmol/L トリス-塩酸 (pH 8.25) (A) と0.5 mol/L 塩化ナトリウム-20 mmol/L トリス-塩酸 (pH 8.0) (B) とによるグラジエント溶液 (B% : 0 \rightarrow 30%/20分) によって溶出分離を行った。流速は0.5 mL/分、検出は415 nm で行った。含量は、溶出する Hb ピーク面積比率から求めた。
5. 全自動 Hb 分析装置 (HLC-723G7, Tosoh Corp.) による Hb の定性・定量分析：専用の β サラセミア診断用カラムおよび試薬を用い、 β サラセミアモードマニュアルによって分析した。定性は、溶出する Hb の保持時間をもとに行い、定量は溶出 Hb ピーク面積から算出した⁹⁾。
6. DNA 抽出：Quiagen 社の簡易 DNA 抽出キット (QIAamp DNA blood mini kit, Quiagen, Tokyo, Japan) を用い、血球部100 μ L から抽出を行った。抽出された DNA 濃度は、260 nm における吸光度から $1 \times OD_{260} = 40 \mu\text{g/mL}$ として計算した。
7. 欠損型 α thal の遺伝子解析 (Gap-PCR 法)： α thal-2 変異体の $-\alpha^{3,7}$ と $-\alpha^{4,2}$ 遺伝子型、 α thal-1 変異体の --SEA, --MED, --Thai や --Fil の遺伝子型の検索は、それぞれに対して特異的な PCR プライマーを使用する Gap-PCR 法を応用した。PCR 反応条件は文献にしたがって行い、変異体の検出は1%アガロースゲル電気泳動 (緩衝液：1 \times TAE, 65ボルト, 60分) の後、エチジウムブロミド染色し、紫外線下に写真撮影した。生成した DNA バンドサイズから変異体の存在を解析した¹⁰⁾。
8. α グロビン遺伝子の解析： $\alpha 2$ および $\alpha 1$ グロビン遺伝子の特異的に増幅する PCR プライマーを使用して遺伝子増幅を行った。PCR 増幅物の精製のため1%アガロースゲル電気泳動し、目的サイズの PCR 産物を回収した。精製 PCR 産物と PCR プライマーや合成プライマーを用いサイクルシーケンス (ABI Prism : BigDye Termina-

tor Cycle Sequencing Ready Reaction Kits, Japan Applied PE Biosystems, Tokyo, Japan) 反応を行い, その産物を ABI DNA sequence analyzer (Model 3700, Japan Applied PE Biosystems, Tokyo, Japan) で5領域から順次塩基配列を決定した¹¹⁾.

9. β^E グロビン遺伝子の解析: β コドン26位を含むように設定されたPCRプライマーによって得られたPCR増幅物を制限酵素 *Mnl*I によって消化後, ポリアクリルアミドゲル電気泳動-銀染色法を行った. *Mnl*I 解裂反応の有無によって β^E グロビン遺伝子の有無を判定した^{12), 13)}.

結 果

今回検査したタイ・チュラロンコン大学からの10検体 (CS-1~10) はすべて Hb CS の保因者と診断されたものであるが, α thal-2, α thal-1 あるいは Hb H 症については明らかでなかった. 分離血球から調製した溶血液の等電点電気泳動の結果は, (a): Hb A₂, Hb A と aging Hb のバンドを持つ検体 (CS-2, CS-3, CS-5, CS-6 の4検体), (b): Hb A₂ バンドに接近して異常 Hb A₂ (Hb CS) と思われるバンドを持つ検体 (CS-1, CS-7, CS-8, CS-9, CS-10 の5検体) や, (c): Hb A より陽極側に現れる Hb H バンドの存在する Hb H 症が想定される検体 (CS-4?, CS-8, CS-10 の3検体), さらに, (d): Hb A₂ と同じ挙動を示す異常 Hb (Hb E) が存在し, Hb CS の存在の判定が困難な検体 (CS-4, CS-9 の2検体) が存在した (Fig. 1).

(d) は, その含量から, タイを中心とした東南アジア地方で高頻度に検出される Hb E と想定される¹³⁾. これらの結果は, BioAssist Q カラムを使用する陰イオン交換樹脂 HPLC によっても裏付けられたが, その HPLC クロマ

トグラムからの Hb A₂ 含量 (通常正常人では 2.2~3.5%) に対する異常 Hb A₂ 含量は低含量を示し, 不安定な α thal 様症状を示す異常 Hb CS と考えられた. IEF で Hb E の存在の疑われる CS-4 と CS-9 の検体については Hb A₂ 位置に強いバンドが現れ Hb CS の存在は明らかにできなかった (Fig. 2). Hb H ピークの出現を認めた3検体 (CS-4, CS-8, CS-10) には明らかに Hb H 症に認められる異常 Hb バンド (CS-4: Fig. 1 では検出困難) が存在した.

自動分析器 HLC-723G7 の β サラセミアモードによる Hb 分析の一般的パターンは Figure 3-A に示すように, およそ1分付近に Hb F, 3.2分付近に Hb A, 4分付近に Hb A₂ ピークが現れるが, CS-4 と CS-9 を除く検体には特に異常 Hb ピークは検出されず, Hb CS 保因者のクロマトパターンは正常パターンを示すように思われた (Fig. 3-B). しかし, Figure 3-B の Hb A₂ ピークは2峰性を示し, Hb A₂ 含量に比較して低含量であることから Hb CS によるものと推定された. CS-4 と CS-9 には Hb A₂ に相当するピークのすぐ後に溶出する大きなピークは Hb E によるものであり, CS-4 や CS-8 (Fig. 3-C, D) にみられる Hb F より早く溶出されるピーク (0.5分付近) は異常ヘモグロビン Hb H によるものと推測された. これら10検体には Hb CS 保因者でありながら, Hb E 症でもあり, α thal-2, α thal-1 および Hb

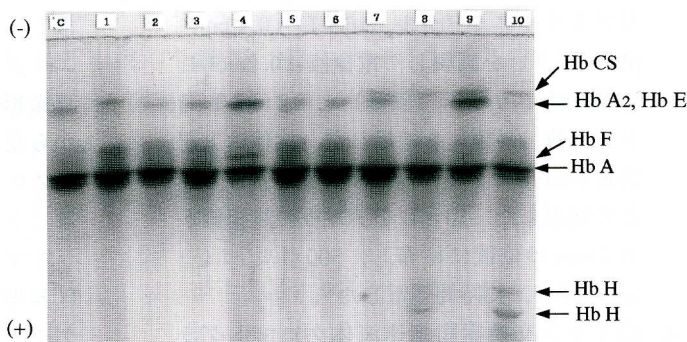


Fig. 1. IEF of the hemolysates (CS-1~10) prepared from red cells of Thai subjects on a polyacrylamide gel containing carrier ampholites (pH range 6-9). After IEF, the gel was stained with Coomassie Brilliant Blue R 250, since the concentration of hemoglobin was low.

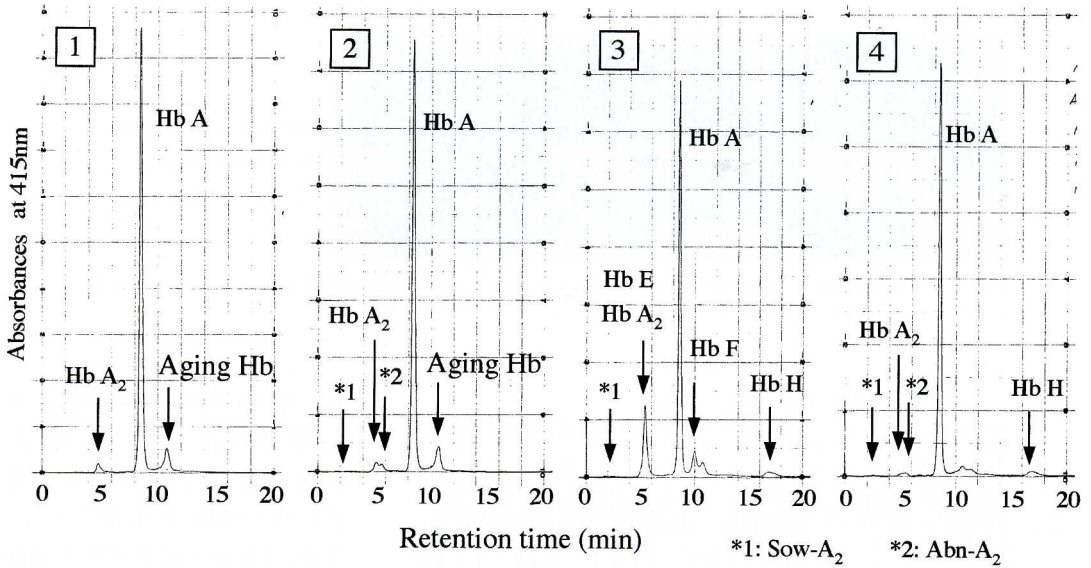


Fig. 2. Anion exchange (BioAssist Q) column HPLC patterns obtained from Thai subjects. 1 : Normal control. 2 : Case (CS-1) with abnormal Hb A₂. 3 : Case (CS-4) with Hb E, Hb F and Hb H. 4 : Case (CS-8) possessing lower content of Hb A₂ and abnormal Hb A₂, and Hb H.

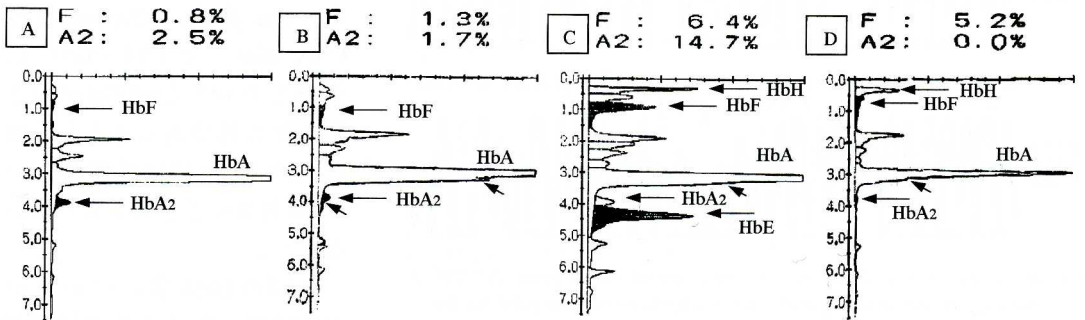


Fig. 3. Chromatograms of hemolysates analyzed by an automated Hb A₂ analyzer, HLC-723G7. A : Normal control. B : Case (CS-6) with a Hb A₂ peak split into two peaks. C : Case (CS-4) with Hb E, Hb F and Hb H. The Hb A₂ peak can be seen in front of the Hb E peak. D : Case (CS-8) with Hb H and lower content of Hb A₂.

H 症が疑われた。さらに、いずれの検体にも Hb A のピークにはショルダーやインフレクションが認められるのには興味がある (Fig. 3)。文献に見られる Hb CS の電気泳動やクロマトグラフィーでの挙動は、Hb A₂ より slow-moving として検出されている。

DNA 解析では、 α thal 変異体の検出と Hb E を産生する β^E グロビン遺伝子の検索を行った。 β^E グロビン遺伝子は PCR-制限酵素 (*Mnl* I) 法によって検索し、CS-4 と CS-9 では *Mnl* I

作用部位の欠損から β^E グロビン遺伝子の存在が認められた^{12), 13)}。Gap-PCR 法による α thal 変異体の検索では、 α thal-2 変異体の $-\alpha^{3.7}$ と $-\alpha^{4.2}$ 変異体の双方の存在は認められなかった。 α thal-1 変異体の --SEA が CS-4, CS-8 と CS-10 に認められたが、その他の --MED, --Thai, --Fil 変異体は検出されなかった (Fig. 4)¹⁰⁾。Hb CS の変異遺伝子 (α^{CS}) の検出は、それぞれ特異的に $\alpha 2$ および $\alpha 1$ グロビン遺伝子を PCR 増幅し、サイクルシーケンシング法に

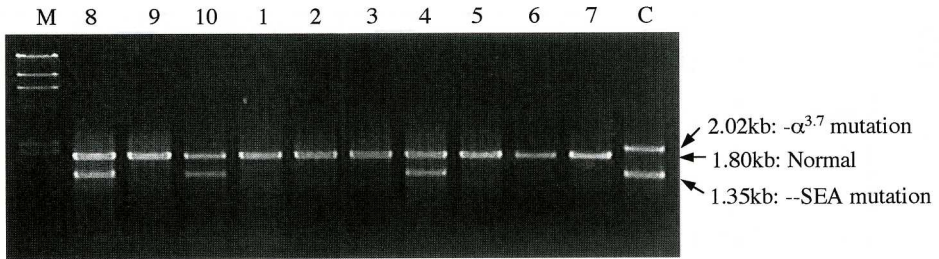


Fig. 4. Screening the deletion type of α -thalassemia mutation with the Gap-PCR method. Detection of the α -thalassemia-1 mutation having genotype : --SEA.

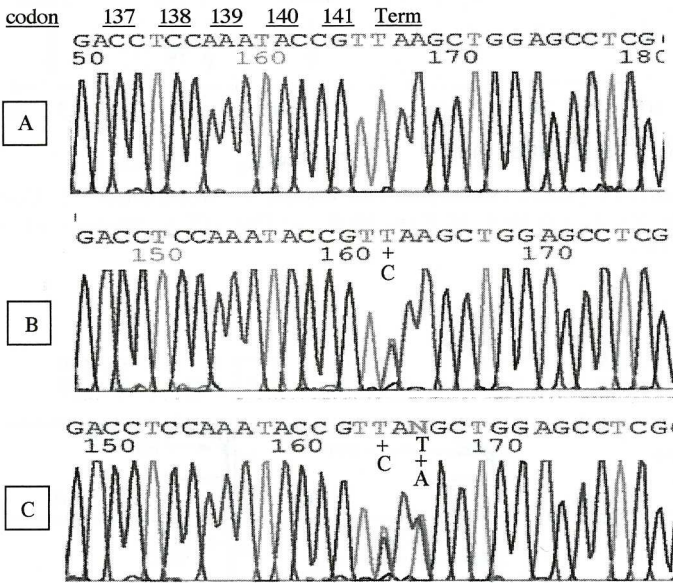


Fig. 5. Sequencing of the terminal region of the α 2 globin gene. A : The sequence appeared in the case of normal subjects or heterozygotes for the α -thalassemia-1 mutation of --SEA. B : The sequence appeared in the case of heterozygotes for the α^{CS} gene. C : The sequence appeared in the case of double heterozygote for α^{CS} and $\alpha^{Paksé}$ genes.

よって塩基配列を求めることによって行った。その結果、すべての検体の α 1グロビン遺伝子の増幅体を得ることはできたが、塩基配列に変異は認められなかった。しかし、 α 2グロビン遺伝子増幅体の codon 142TAA (終止コドン) は CAA (Gln)¹⁴⁾ への変異を持つ α^{CS} グロビン遺伝子が CS-9を除くすべての検体に存在した。CS-1, CS-4, CS-8と CS-10では、 α^{CS} グロビン遺伝子のホモ接合体のようにみられたが、CS-4, CS-8と CS-10には--SEA 変異体が存在

し、IEFやHPLCで観察されたHb Hの存在から--SEA/ $\alpha^{CS}\alpha$ 遺伝子型のHb H症と考えられた (Fig. 5-A, B)^{15)~17)}。また、CS-9の α 2グロビン遺伝子では、codon 142TAAの塩基配列の第1位の塩基はT/Cのヘテロ体であり、第3位の塩基はA/Tのヘテロ体を示した (Fig. 5-C)。 α 2codon142はCAA (Gln) とTAT (Tyr) に置換した α^{CS} と α 2-Pakséの2重ヘテロ体であると考えられた。 α 2-Pakséは比較的珍しい α thal様遺伝子と考えられている^{18), 19)}。

今回の10検体についてのIEF解析、陰イオン交換樹脂HPLC解析、遺伝子のPCR/制限酵素法によるHb E症やGap-PCR法による α thal変異体

解析および α グロビン遺伝子のシーケンシング法による α^{CS} グロビン遺伝子の解析結果をTable 1にまとめた。

考 察

Hb Constant Spring (Hb CS : codon 142TAA \rightarrow CAA) は α 2グロビン遺伝子の終止コドンがCAAのグルタミン (Gln) コドンに変わり、31個のアミノ酸残基の延長した異常Hbである

Table 1. The results of analyses of 10 Thai subjects diagnosed as carriers of Hb Constant Spring (Hb CS) by the high performance liquid chromatography (HPLC, BioAssist Q-HPLC and HLC-723G7) and isoelectric focusing (IEF) methods and by gene analyses (PCR-Gap and PCR-sequencing) .

Name	HPLC				IEF				α -thal mut/Gap.			Genotype/Seq.
	Slow-A ₂	Abn-A ₂	Hb E	Hb H	Abn-A ₂	Hb E	Hb H	- α ^{3,7}	--SEA	genotype	$\alpha 2\alpha 1/\alpha 2\alpha 1$	
CS-1	+	+	-	-	+	-	-	-	-	$\alpha\alpha/\alpha\alpha$	$\alpha^{CS}\alpha/\alpha^{CS}\alpha$	
CS-2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	$\alpha\alpha/\alpha\alpha$	$\alpha^{CS}\alpha/\alpha\alpha$	
CS-3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	$\alpha\alpha/\alpha\alpha$	$\alpha^{CS}\alpha/\alpha\alpha$	
CS-4	+	?	+	+	?	+	+	-	+	--/ $\alpha\alpha$	--SEA/ $\alpha^{CS}\alpha//$ Hb E	
CS-5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	$\alpha\alpha/\alpha\alpha$	$\alpha^{CS}\alpha/\alpha\alpha$	
CS-6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	$\alpha\alpha/\alpha\alpha$	$\alpha^{CS}\alpha/\alpha\alpha$	
CS-7	-	+	-	-	+	-	-	-	-	$\alpha\alpha/\alpha\alpha$	$\alpha^{CS}\alpha/\alpha\alpha$	
CS-8	+	+	-	+	+	-	+	-	+	--/ $\alpha\alpha$	--SEA/ $\alpha^{CS}\alpha$	
CS-9	+	?	+	-	?	+	-	-	-	$\alpha\alpha/\alpha\alpha$	$\alpha^{CS}\alpha/\alpha^{PS}\alpha//$ Hb E	
CS-10	+	+	-	+	+	-	+	-	+	--/ $\alpha\alpha$	--SEA/ $\alpha^{CS}\alpha$	

1. The symbols, +, - or ?, indicate the presence, absence or uncertain.

2. "Slow-A₂" means the presence of peak having shorter retention time than Hb A₂ on HPLC, and "Abn-A₂" does that of Hb peak or band close to Hb A₂ on HPLC and IEF.

3. α^{CS} and α^{PS} indicate the genes of α -Constant Spring and α -Paksé.

が、そのグロビンの不安定性や β グロビンとの4量体の形成不全から不安定Hbを形成しサラセミア様症状を呈し、その産生量も低値を示すといわれている(全ヘモグロビン中の0.3~0.8%)^{3)~6)}。また、 $\alpha 2$ グロビン遺伝子は $\alpha 1$ グロビン遺伝子に比べ2~3倍の高い発現性を示すことから変異 $\alpha 2$ グロビン遺伝子から産生する不安定グロビン(あるいは不安定Hb)によるサラセミア症状は重篤になると考えられている⁷⁾。今回偶然発見されたHb Paksé($\alpha 2$ codon 142TAA→TAT)も $\alpha 2$ グロビン遺伝子のコドン142位がTATチロシン(Try)コドンに変化することによってHb CSと同様に31個のアミノ酸残基の延長した172残基からなる異常 α グロビン鎖を持つ異常Hbであり、142位のアミノ酸の違いを除けば双方の構造や性質は類似している。このため電気泳動やクロマトグラフィでの区別はできず、異常HbもHb A₂よりわずかに違った移動度をもって検出されるか、時にはその低含量のため検出されないことがある²⁰⁾。

HLC-723G7 β サラセミアモードによる溶血液のHb分析のクロマトグラムは、Hb A₂の定量分析やHb Eの異常ピークを検出・定量する

ことが可能であったことに加え⁹⁾、Hb CS保因者には特異的にHb Aピークに接して僅かに長保持時間側にシオルダーやインフレクションを示すクロマトグラムを示した(Fig. 3)。この異常ピークのグロビン組成に関する有意な知見を得ることはできなかったが、Hb CS保因者に特異的なものであれば検出手段として有意義なものとなろう。

Hb CSは、世界中で最も頻繁に検出される非欠損型の α thal様変異体といわれており、特に東南アジアでは、欠損型の α thal-1変異体(最も一般的な変異体が--SEA)と α^{CS} グロビン遺伝子の双方を継承したHb H症(遺伝子型:--SEA/ $\alpha^{CS}\alpha$)として頻繁に観察されている^{21), 22)}。しかし、 α thal-2に相当する $\alpha^{CS}\alpha/\alpha$ 型遺伝子保因者や α thal-1に相当する $\alpha^{CS}\alpha/\alpha^{CS}\alpha$ や $\alpha^{CS}\alpha/-\alpha$ ^{3,7}遺伝子型保因者の検出は、 α^{CS} グロビンが強い α thal様症状を示すとはいえ、無症状~軽症の患者を検出することは、多くの重篤な β thal患者や重篤な α thalのHb H症患者の存在する地域では困難であろうし、また、見逃されるケースが多くなろう。 α thalのスクリーニングが自動分析器HLC-723G7のサラセミアモードでHb A₂含量測定をする

ことによって、 β thalの他にHb CSあるいは類似の変異体の検出が可能となると考えられる⁹⁾。

今回のHb CSの検索は、すでに保因者が決定されているものについて行った。最近多くなった東南アジアからの移住者の検査依頼があった場合に備え、その検出方法、異常Hb症の診断を検討することを目的に行ったため、Hb CSの α^{CS} グロビン遺伝子の検出はPCR-シーケンシング法を応用したが、今回のように東南アジアにもHb Paksé保因者が多く見られるようであれば別の検出方法も検討されなければならない。このためには特異プライマーを使用したPCR反応によって特異的な塩基配列をもつPCR産物を作製し、制限酵素で容易に検出されるような手技、mismatched polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (mismatched PCR-RFLP)²³⁾をも取り入れることも検討しなければならなくなるだろう。今回の10検体はすべてHb CS保因者と

診断されていたが、同様の挙動をする α グロビン変異体のHb Pakséの存在も明らかとなり、タイ周辺諸国出身者の検体については注意すべき事柄である。この外にHb Icaria (α 142TAA \rightarrow AAA; Lys)²⁴⁾、Hb Koya Dora (α 142TAA \rightarrow TCA; Ser)²⁵⁾ や Hb Seal Rock (α 142TAA \rightarrow GAA; Glu)²⁶⁾が発見されており、これらの α サラセミア様異常Hbの存在についても考慮しつつ異常Hb症のスクリーニングや診断を行えるようにする必要がある。

謝 辞

今回、Hb Constant Springの貴重な検体を恵与くださり、貴重な経験を与えてくださったProf. Dr. Pranee Sutcharichan (Division of Internal Medicine, Department of Medicine, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand)に深謝いたします。

また、本研究は、文部科学省科学研究費補助金(14572193)の援助により行われた。

文 献

- 1) Bunn HF, Forget BG: Hemoglobin: Molecular, genetic and Clinical Aspects. WB Saunders Company, Philadelphia, 1986, pp 299-302
- 2) Higgs DR, Vickers MA, Wilkie AO, Pretorius IM, Jarman AP, Weatherall DJ: A review of the molecular genetics of the human α -globin gene cluster. *Blood* 74: 1089-1104, 1989
- 3) Tanphichitr VS, Pung-amritt P, Puchaiwatananon O, Winichagoon P, Fuchareon S, Suvatte V, Wasi P: Studies of Hemoglobin Bart and deletion of α -globin genes from cord blood in Thailand. *Birth Defects Orig Artic Ser* 23: 15-21, 1987
- 4) Fuchareon S, Winichagoon P: Hemoglobinopathies in Southeast Asia: molecular biology and clinical medicine. *Hemoglobin* 21: 299-319, 1997
- 5) Liu TC, Chiou SS, Lin SF, Chen TP, Tseng WP, Chen PH, Chang JG: Molecular basis and hematological characterization of Hb H disease in Southeast Asia. *Am J Hematol* 45: 293-297, 1994
- 6) Chen FE, Ooi C, Ha SY, Cheung BM, Todd D, Liang R, Chan TK, Chan V: Genetic and clinical features of hemoglobin H disease in Chinese patients. *N Engl J Med* 343: 544-550, 2000
- 7) Liebhaber SA, Kan YW: Differentiation of the mRNA transcripts originating from the α 1 and α 2-globin loci in normals and α -thalassemics. *J Clin Invest* 68: 439-446, 1981
- 8) 原野昭雄, 原野恵子, 小出智子, 岡田恵美子, 上田 智, 柴田 進: 等電点分画法による異常血色素の Mass Screening. *臨床病理* 28: 149-152, 1980
- 9) Harano T, Harano K, Tin YY, Suetsugu Y, Sutcharichan P, Settapiboon R, Tashiro H, Uchida J: An automated Hb A₂ analyzer, HLC-723G7, for diagnosis of thalassemias. *Proceeding of the 22nd World Congress of Pathology and*

Laboratory Medicine, pp, Busan, Korea, August 30–September 3, 2003, pp 203–206

- 10) Harano T, Ne Win, Harano K : Molecular aspects of α -thalassemia in Myanmar. *Kawasaki Med J* 27 : 33–36, 2001
- 11) Harano T, Harano K, Cho S-I, Ne Win : A case report of diagnosis of α -thalassemia-2. *Kawasaki Med J* 26 : 133–138, 2000
- 12) 半田敦志, 壬生倉徹志, 会田かやの, 高橋 隆, 平嶋邦猛, 井上敏克, 原野恵子, 原野昭雄 : 小球性低色素性赤血球から診断されたヘモグロビンE症 (バングラデシュ人症例). *臨床血液* 39 : 146–149, 1998
- 13) Harano T, Ne Win, Harano K : Prevalence of hemoglobin E among the children taking regular blood transfusion at the day care room, Yangon Children Hospital, Myanmar. *Kawasaki Med J* 26 : 149–154, 2000
- 14) Clegg JB, Weatherall DJ, Milner PF : Haemoglobin Constant Spring- α chain termination mutant? *Nature* 234 : 337–340, 1971
- 15) Kattamis C, Tzotzos S, Kanavakis E, Synodinos J, Metaxotou-Mavrommati A : Correlation of clinical phenotype to genotype in haemoglobin H disease. *Lancet* 27 : 442–444, 1988
- 16) Kanavakis E, Pappasotiriou I, Karagiorga M, Vrettou C, Metaxotou-Mavrommati A, Stamoulakatou A, Kattamis C, Traeger-Synodinos J : Phenotypic and molecular diversity of haemoglobin H disease : a Greek experience. *Br J Haematol* 111 : 915–923, 2000
- 17) Pappasotiriou I, Traeger-Synodinos J, Kanavakis E, Karagiorga M, Stamoulakatou A, Kattamis C : Erythroid marrow activity and hemoglobin H levels in hemoglobin H disease. *J Pediatr Hematol Oncol* 20 : 539–544, 1998
- 18) Waye JS, Eng B, Patterson M, Chui DH, Olivieri NF : Identification of a novel termination codon mutation (TAA \rightarrow TAT, Term \rightarrow Tyr) in the $\alpha 2$ globin gene of a Laotian girl with hemoglobin H disease. *Blood* 83 : 3418–3420, 1994
- 19) Smetanina NS, Leonova JY, Levy N, Huisman THJ : Identification of several α -globin gene variations in a small Laotian family. *Acta Haematol* 94 : 144–147, 1995
- 20) Krishnamurti L, Little JA : Homozygous hemoglobin Constant Spring with normal electrophoresis. A possible cause for under-diagnosis. *Ann NY Acad Sci* 850 : 415–419, 1998
- 21) Laig M, Pape M, Hundrieser J, Flatz G, Sanguansermsri T, Das BM, Deka R, Yongvanit P, Mularlee N : The distribution of the Hb Constant Spring gene in Southeast Asian populations. *Human Genet* 84 : 188–90, 1990
- 22) Qin WB, Ji TL, Yue XL, Yan XL, Qin LY, Zhao JB, Chen CB : Hemoglobin Constant Spring in China. *Hemoglobin* 9 : 69–71, 1985
- 23) Viprakasit V, Tanphaichitr VS, Pung-Amritt P, Petrarat S, Suwaantol L, Fisher C, Higgs DH : Clinical phenotypes and molecular characterization of Hb H-Pakse disease. *Haematologica* 87 : 117–125, 2002
- 24) Kanavakis E, Traeger-Synodinos J, Pappasotiriou I, Vrettou C, Metaxotou-Mavrommati A, Stamoulakatou A, Lagona E, Kattamis C : The interaction of α^0 -thalassaemia with Hb Icaria : three unusual cases of haemoglobinopathy. *Br J Haematol* 92 : 332–335, 1996
- 25) Gupta RB, Tiwary RS, Pande PL, Kutlar F, Oner C, Oner R, Huisman THJ : Hemoglobinopathies among the Gond tribal groups of central India : interaction of α - and β -thalassemia with β -chain variants. *Hemoglobin* 15 : 441–458, 1991
- 26) Merritt D, Jones RT, Head C, Thibodeau SN, Fairbanks VF, Steinberg MH, Coleman MB, Rogers GP : Hb Seal Rock [$(\alpha 2)$ 142 term \rightarrow Glu, codon 142 TAA \rightarrow GAA] an extended α -chain variant associated with anemia, microcytosis, and α -thalassemia-2 (-3.7 kb). *Hemoglobin* 21 : 331–341, 1997