

日本における血色素異常症 (第1報)

— 香川県三豊地区の調査 —

川崎医科大学 生化学

原野 恵子, 原野 昭雄

同 検査診断学

上田 智, 森 博雄

同 公衆衛生学

中島 行正

(昭和58年11月24日受付)

Hemoglobinopathy in Japan (I)

— Survey in Mitoyo, Kagawa Prefecture —

Keiko Harano and Teruo Harano

Department of Biochemistry
Kawasaki Medical School

Satoshi Ueda and Hiroo Mori

Department of Clinical Pathology
Kawasaki Medical School

Yukimasa Nakashima

Department of Public Health
Kawasaki Medical School

(Accepted on Nov. 24, 1983)

1980年に香川県三豊地区における等電点電気泳動法によるヘモグロビンのマススクリーニングをおこなった。7,881名のうち1名の **fast-moving** 異常ヘモグロビン (**Hb Takamatsu**)と1名の β -サラセミア・ヘテロ接合体を発見した。異常ヘモグロビンの保因者は、臨床的には異常を示していなかった。 β -サラセミア・ヘテロ接合体は軽度の貧血であった。そしてこの例は、マススクリーニングで **Hb A₂** の増加に気づき β -サラセミアと診断できた最初の例である。

In 1980, mass screening of hemoglobinopathy in Mitoyo District, Kagawa Prefecture, was carried out using isoelectric focusing. A fast-moving hemoglobin variant (Hb Takamatsu) and a β -thalassemia heterozygote were detected from 7881 patients. The carrier of the abnormal hemoglobin had no clinical signs or symptoms. The β -thalassemia heterozygote had a mild anemia. This was the first case of β -thalassemia encountered in this district by mass screening of Hb A₂ content.

Key Words ① Hemoglobinopathy ② Abnormal hemoglobin ③ β -thalassemia

はじめに

等電点電気泳動を利用したマススクリーニング法により1980年1月から12月まで、香川県西部の三豊総合病院で受診した患者7,881名のヘモグロビン検査を行い、異常ヘモグロビンの保因者1名と β -サラセミア症1名を発見し、ヘモグロビンの構造解析、生合成試験等を行った。異常ヘモグロビンの検出頻度は日本での平均的な値3,000~4,000人に1人の2分の1であった。サラセミアは鉄剤投与に反応してよくならない貧血患者から発見されるのが一般的であるが、今回の異常ヘモグロビン調査において、等電点電気泳動法によるマススクリーニングで、Hb A₂の明瞭な泳動縞に気づいて、それを調べて、 β -サラセミア・ヘテロ接合体であることを知った。

方法

等電点電気泳動によるマススクリーニングはアンホラインを含むポリアクリルアミドゲル(pH 6-9)を作成して行った^{1),2)}、ヘモグロビンの含量測定は、異常ヘモグロビンは、等電点電気泳動による溶出法²⁾、Hb Fはアルカリ変性法³⁾、Hb A₂はセルロースアセテート膜電気泳動法⁴⁾、Hb A₁はマイクロカラム法(NC-ロベット、日本ケミファー社)により行った。2,3-DPGはシグマ社の2,3-DPG測定キットで定量した。ヘモグロビンの不安定性試験はイソプロパノール法⁵⁾により行った。

(1) グロビンの一次構造決定

抗凝固剤(ヘパリン又はEDTA)添加下に採血した血液で溶血液を作成し、等電点電気泳動法で異常分画を単離し、コロジオンバックで濃縮した。AnsonとMirskyの方法⁶⁾で脱ヘムし、異常グロビンを得、それを尿素-CMC-カラムクロマト法⁷⁾により β 鎖と α 鎖に分離した。検出した異常ヘモグロビンの異常鎖が β 鎖であったので、異常 β 鎖をアミノエチル化⁸⁾し、TPCK-トリプシン(Worthington社)で室温、で17時間消化⁹⁾し、消化物300 μ gをと

り、フィンガープリントを作成した¹⁰⁾。ホスホセルロースカラム法で異常ペプチドを単離した¹¹⁾。単離した異常ペプチドをキモトリプシンで消化¹²⁾し、再びフィンガープリントを作成し、フルオレサミンで蛍光発色¹³⁾させて鉛筆でしるしをつけて切りとり、10%酢酸で溶出して凍結乾燥後6NHClで105°C 22時間、加水分解した。そして加水分解物のアミノ酸分析をアミノ酸分析計(Yanaco, LC-7)で行った。

(2) ヘモグロビンの生合成試験

ヘパリンを加えて採血した血液5mlを生理食塩水で3回洗浄後、網状赤血球に富む幼若赤血球を集めて、³H-ロイシンを含む合成培地で37°C 2時間加温してヘモグロビンを生合成した¹⁴⁾。合成ヘモグロビンの分析はマイクロカラム法¹⁵⁾により行った。

結果

(1) 異常ヘモグロビンの保因者について

患者は33歳の主婦で胃の不調をうったえて来院したが、検査の結果異常は認められなかった。血液検査は、RBC 401 $\times 10^4/\mu$ l, Hb 12.3 g/dl, Ht 35.8%, MCV 89 μ m³, MCH 30.6 pgと正常であった。溶血液を等電点電気泳動するとHb Aよりも更に陽極側に濃いバンドが認められた(Fig. 1)。溶出法による異常ヘモグロ

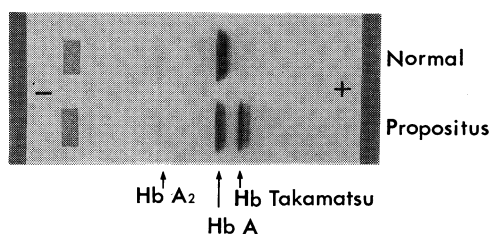


Fig. 1. Isoelectric focusing of abnormal hemoglobin on an ampholine-polyacrylamide gel plate (pH range 6-9).

ビンの含量は40.5%であった。微量成分であるHb FとHb A₂の含量はそれぞれ0.12%, 2.71%で正常範囲内であった。溶血液のイソプロパノール試験は陰性であった。

異常 β 鎖の一次構造を確定するために、アミノエチル化 β 鎖のトリプシン消化物のフィ

ンガープリントを作成すると **Fig. 2** に示すように、 β T-12b と β T-13 が消失し、新たに、 β T-10 と β T-8-9 の間に異常ペプチド (β T-abn) が1つ存在した。このことより β T-12b のC末端の Lys が他の アミノ酸へ置換してい

ることが推察できた。異常ペプチドへの他のペプチドの混入をふせぐためにアミノ酸分析用のペプチドの採取はホスホセルロースカラム法をとり入れた。カラム法により得られた β T-abn は更にキモトリプシンで消化し再びフィンガープリントを作成した (**Fig. 3**)。各ペプチドのアミノ酸分析の結果を **Table 1** に示す。ペプ

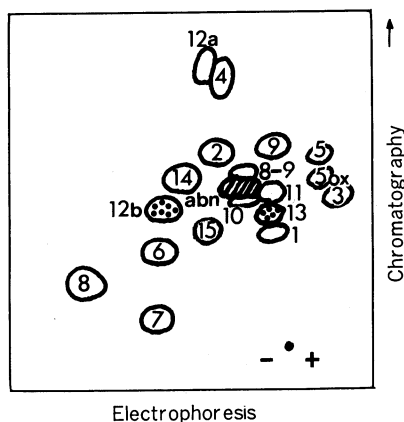


Fig. 2. Fingerprint map of tryptic peptides of aminoethylated β^{abn} globin. Electrophoresis (PH6.4) was followed by chromatography. missing spot abnormal spot

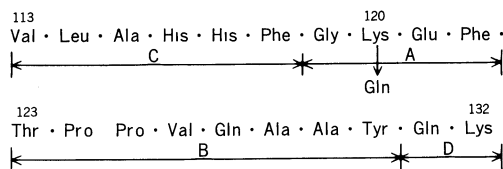
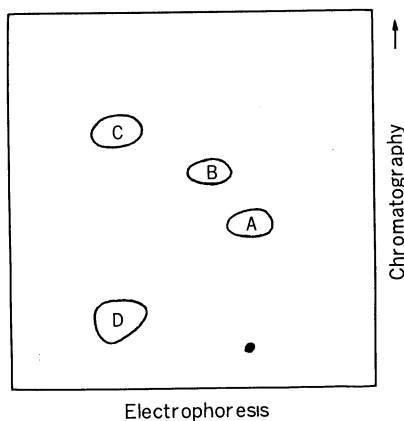


Fig. 3. Fingerprint map of chymotryptic peptides of β T 12b—13 (β 113—132).

Table 1. Amino acid analysis of chymotryptic peptides. Analytic values indicated in terms of molar ratio.

() refers to theoretical values.

	A	B	C	D
Lys	— (1)			1.06(1)
His			2.12(2)	
Thr		0.99(1)		
Glu	2.10(1)	1.19(1)		0.94(1)
Pro		1.89(2)		
Gly	1.10(1)			
Ala		2.15(2)	1.16(1)	
Val		1.22(1)	1.11(1)	
Leu			1.05(1)	
Tyr		0.65(1)		
Phe	0.80(1)		0.55(1)	

チドAに正常で存在する Lys が認められずかわりに Glx が1分子余分に存在した。電気泳動の動きから Glx は、Lys と一荷電差の Gln と考えられた。従って β 120 番目の Lys が Gln に置換していることが確認された。この異常ヘモグロビンはすでに香川県高松地区で数多く発見されている Hb Takamatsu [β 120(GH3) Lys→Gln]¹⁶⁾ と同一であった。

(2) β -サラセミア症について

発端者は80歳の日本人男性で貧血および慢性気管支炎で三豊総合病院に入院中であった。等電点電気泳動によるマスキングで他のものより Hb A₂ 含量が高いことを発見した。血液検査は RBC 589 × 10⁴/ μ l, Hb 13.5 g/dl, Ht 46%, MCV 78 μ m³, MCH 22.9 pg と赤血球数の増加と小球性低色素性を示していた。Hb A₂ 5.37%, Hb F 0.8% と Hb A₂ のみの増加であった。更に CPC テスト¹⁷⁾ で低張側偏位サ

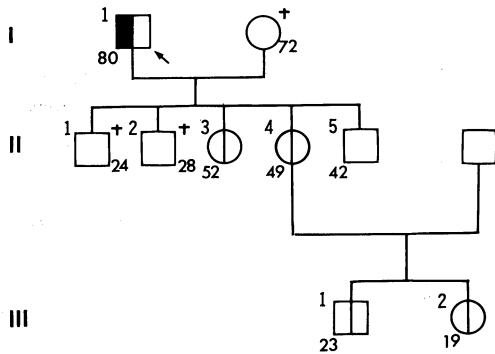


Fig. 4. Family tree of the β -thalassemia patient.

↖: propositus +: died
number (under): age

ポニンテスト¹⁸⁾でサポニン溶血抵抗性を示しており、 β -サラセミアを疑わせた。5名の子供 (Fig. 4) のうち2名の男子を結核と胆のう炎でなくしていた。2名の女子とその子供については同時に検査できた。その結果は Table 2 にまとめた通りである。すなわちこの家系の I-1 のみがヘモグロビンの合成比 $\beta/\alpha=0.64$ と β 鎖の抑制を示す β -サラセミアであることが確認された。II-3 は糖尿病を有し、Hb A₁ の高値を呈した。

考 察

上に述べた通り、三豊地区で発見された、異常ヘモグロビンはこれまでに香川県高松地区でしばしば遭遇する Hb Takamatsu であることがわかった。Hb Takamatsu はそのアミノ酸の置換を β 鎖 120 番目 (GH3) に有しており、その位置がヘモグロビン分子の三次構造¹⁹⁾ では、外側の部分に属し、他のアミノ酸との相互作用が少ないので、分子構造も安定で、酸素運搬能にも、異常が認められない。三豊地区の Hb Takamatsu 家系と高松地区の Hb Takamatsu 家系との血族関係を明確につきとめることはできなかった。

三豊で発見された β -サラセミア症は発端者のみに認められた β -サラセミア・ヘテロ接合体で格別に顕著な臨床症状を呈しなかった。等電点電気泳動法によるマスキング中に、Hb A₂ が明らかに増加している例に気づき、それを詳しく検査して β -サラセミアと診断できたところの我々にとっては最初の例であった。

謝 辞

本研究に御協力下さいました三豊総合病院、今井正信院長に深謝いたします。

本論文の一部は第43回日本血液学会総会 (昭和56年4月) において報告した。

Table 2. Family study of the β -thalassemia detected.

		I-1	II-3	II-4	III-1	III-2	正 常 域
年 齢 (性)		80 (M)	52 (F)	49 (F)	23 (M)	19 (F)	
Hb F	%	0.80	0.84	0.52	0.44	1.13	0.1-1.2
Hb A ₂	%	5.37	3.00	2.32	3.00	2.58	2.2-3.2
Hb A ₁	%	7.3	11.2	6.0	6.3	6.9	5.0-7.0
RBC	$\times 10^4/\mu\text{l}$	589	460	403	503	380	
Hb	g/dl	13.5	14.4	12.0	15.0	11.3	
Ht	%	46.0	41.0	33.1	43.3	32.3	
MCV	μm^3	78	89	82	86	84	
MCH	pg	22.9	31.4	29.8	29.8	29.9	
2,3-DPG	$\mu\text{mol/ml}$ 全血	2.56	2.27	1.89	2.19	1.77	1.6-2.6
	$\mu\text{mol/gHb}$	19.0	15.8	15.8	14.6	15.7	{M 10.5-15.1 F 11.0-16.2
	$\mu\text{mol/ml}$ 血球	5.57	5.54	5.71	5.06	5.48	{M 4.5-5.1 F 4.9-5.7
ヘモグロビン合成比 β/α		0.64	0.88	1.10	1.01	1.09	0.9-1.2

文 献

- 1) Harano, T., Iuchi, I. and Shibata, S.: A simple Isoelectric Focusing Procedure for Screening Human Hemoglobin Components on Polyacrylamide Gel. *Kawasaki Med. J.* 4: 53—56, 1978
- 2) 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
- 3) Betke, K., Marti, H. R. and Schlicht, I.: Estimation of small percentages of foetal haemoglobin. *Nature (London)* 184: 1877—1878, 1959
- 4) Ueda, S., Shibata, S., Miyaji, T. and Ohba, Y.: Routine Hb A₂ estimation by cellulose acetate membrane electrophoresis. *Kawasaki Med. J.* 1: 113—120, 1975
- 5) Carrell, R. W. and Kay, R.: A simple method for detection of unstable haemoglobins. *Br. J. Haematol.* 23: 615—619, 1972
- 6) Anson, M. L. and Mirsky, A. E.: Protein coagulation and its reversal. The separation of insoluble globin, soluble globin and heme. *J. Gen. Physiol.* 13: 469—476, 1930
- 7) Clegg, J. B., Naughton, M. A. and Weatherall, J. D.: Abnormal human haemoglobins, separation and characterization of the α and β chains by Chromatography, and determination of two new variants, Hb Chesapeake and Hb J Bangkok. *J. Mol. Biol.* 19: 91—108, 1966
- 8) Jones, R. T.: Structural studies of aminoethylated hemoglobins by automatic peptide chromatography. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, Vol XXIX, 297—308, 1964
- 9) Ingram, V. M.: Abnormal human hemoglobins. 1. The comparison of normal human and sickle cell hemoglobins by "Fingerprint." *Biochim. Biophys. Acta* 28: 529—545, 1958
- 10) Harano, K., Harano, T., Ueda, S. and Shibata, S.: Mapping and Amino Acid Analysis of Tryptic Peptides of Glolin by Use of Cellulose Thin Layer. *Kawasaki Med. J.* 4: 323—326, 1978
- 11) 日高和夫, 井内岩夫, 島崎俊一: 異常血色素に関する研究Ⅶ: 異常血色素の異常鎖のトリプシン消化物のホスホセルロースカラムクロマト法による分離について. *川崎医学会誌* 7: 1—5, 1981
- 12) Carrell, R. W. and Irvine, D.: Characterization of the α chain core of human haemoglobin variants. *Biochim. Biophys. Acta* 154: 78—83, 1968
- 13) Mendez, E. and Lai, C. Y.: Reaction of peptides with fluorescamine of paper after chromatography or electrophoresis. *Anal. Biochem* 65: 281—292, 1975
- 14) Lingrel, J. B. and Borsook, H.: A comparison of amino acid incorporation into the hemoglobin and ribosomes of marrow erythroid cells and circulating reticulocytes of several anemic rabbits. *Biochemistry* 2: 309—314, 1963.
- 15) 原野昭雄, 小出智子, 上田 智, 柴田 進: ヘモグロビン生成に関する研究 II. ヘモグロビンの CM セルロースカラムクロマトグラフ分析: ミクロカラムクロマト分析法の開発. *川崎医学会誌* 5: 97—101, 1979
- 16) Iuchi, I., Hidaka, K., Harano, T., Ueda, S., Shibata, S., Shimasaki, S., Mizushima, J., Kubo, N., Miyake, T. and Uchida, T.: Hemoglobin Takamatsu (β 120(CH3) Lys→Gln): A new abnormal hemoglobin detected in three unrelated families in the Takamatsu area of Shikoku. *Hemoglobin* 4: 165—176, 1980
- 17) 柴田 進, 小林勝昌, 世羅洋子: コイルプラネット型遠心分離器の血液学への応用—血液浸透圧抵抗および自家溶血試験. *医科器械学雑誌* 40: 619—629, 1969
- 18) Ueda, S., Harano, K., Takemoto, Y., Harano, T. and Susumu, S.: Continuous measurement

of the change in erythrocyte volume after addition of Saponin (Saponin Test). *Kawasaki Med. J.* 7:127—135, 1981

- 19) Sack, J. S., Andrews, L. C., Magnus, K. A., Hanson, J. C., Rubin, J. and Love, W. E.: Location of amino acid residues in human deoxy hemoglobin. *Hemoglobin* 2:153—169, 1978