

日本における血色素異常症 (第2報)

— 兵庫県 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

今井 直美, 森 博 雄, 上 田 智

同 公衆衛生学

中 島 行 正

(昭和60年3月19日受付)

Hemoglobinopathy in Japan (II)

—Survey in Hyogo Prefecture—

Keiko Harano and Teruo Harano

Department of Biochemistry, Kawasaki Medical School

Naomi Imai, Hiroo Mori and Satoshi Ueda

Department of Clinical Pathology, Kawasaki Medical School

Yukimasa Nakashima

Department of Public Health, Kawasaki Medical School

(Accepted on May 19, 1985)

1980年から1981年にかけて兵庫県における集団検診受診者の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行った。12,391名のうち4名の異常ヘモグロビン保因者 (Hb G Waimanalo, Hb Ube-2, Hb J Norfolk, Hb Ankara) と1名の β -サラセミア症を発見した。4名の異常ヘモグロビン保因者は何ら臨床症状を示していなかったが、 β -サラセミア症の例は、軽度の貧血を呈していた。

In 1980 and 1981, a mass screening of hemoglobinopathy in Hyogo Prefecture was carried out using isoelectric focusing. Four abnormal hemoglobins (Hb G Waimanalo, Hb Ube-2, Hb J Norfolk, Hb Ankara) and a β -thalassemia trait were detected among 12,391 persons. The four abnormal hemoglobin carriers showed no clinical symptoms, but the β -thalassemic patient showed mild anemia.

Key Words ① Hemoglobinopathy ② Abnormal hemoglobin
③ β -thalassemia

はじめに

等電点電気泳動によるマスキングによる、1980年6月から1981年3月まで、兵庫県の社会保険神戸中央病院が行った兵庫県下の集団検診の受診者12,391名のヘモグロビン検査を行い、異常ヘモグロビン保因者4名と、 β -サラセミア症1名を発見し、ヘモグロビンの構造と機能解析、生合成試験等を行った。異常ヘモグロビンの検出頻度は3100人に1人の割で、日本での平均的な値であった。発見された異常ヘモグロビンのうち2例は日本人では初めての例であった。

方 法

等電点電気泳動によるマスキングはアンホラインを含むポリアクリルアミドゲル(pH 範囲6-9)を作成して行った。^{1),2)} ヘモグロビンの含量測定は、異常ヘモグロビンについては、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⁵⁾ (NC-ロペット, 日本ケミファ社)で

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⁶⁾ により行った。ヘモグロビンの酸素解離能は今井らの方法⁷⁾ により測定した。グロビンの一次構造は、トリプシン消化ペプチドのセルロース膜を用いたフィンガープリント法⁸⁾ とEdman法⁹⁾ により決定した。ヘモグロビンの in vitro での生合成試験は、静脈血の網状赤血球による³H-ロイシンの取り込みで測定した。¹⁰⁾

結 果

(1) 異常ヘモグロビンの保因者について

今回発見された4例について、血液データをもとに Table 1 に示した。case 1 がやや貧血気味である他は正常な値を示した。異常ヘモグロビンの等電点電気泳動での挙動は case 1 は Hb A よりも陰極側に位置する slow moving, case 2, 3, 4 は Hb A よりも陽極側に位置する fast moving といわれるもので、case 1, 2, 3 は α 鎖異常, case 4 は β 鎖異常であった。異常鎖のアミノ酸置換を知るために一次構造解析を行った。トリプシン消化ペプチドのフィンガー

Table 1. Results of hemoglobin analyses and laboratory data.

| | case 1 | case 2 | case 3 | case 4 |
|-----------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|------------------------------------|-----------------------------------|
| 発 見 年 月 | 1980. 7. | 1980.10. | 1980.11. | 1981. 3. |
| 発端者, 年齢(姓) | K. U. 40 (F) | A. A. 46 (F) | T. K. 52 (F) | K. N. 32 (F) |
| 居 住 地 | 小 野 市 | 朝 来 郡 | 氷上郡 柏原町 | 洲 本 市 |
| 電 気 泳 動 | slow α 鎖 | fast α 鎖 | fast α 鎖 | fast β 鎖 |
| ヘモグロビン名 | Hb G Waimanalo | Hb Ube-2 | Hb J Norfolk | Hb Ankara |
| アミノ酸置換 | $\alpha 64(E13)Asp \rightarrow Asn$ | $\alpha 68(E17)Asn \rightarrow Asp$ | $\alpha 57(E6)Gly \rightarrow Asp$ | $\beta 10(A7)Ala \rightarrow Asp$ |
| abn Hb (%) | 24.1 | 20.9 | 28.4 | 41.4 |
| Hb F (%) | 0.26 | 0.39 | 0.35 | 0.40 |
| Hb A ₂ (%) | 2.63 | 2.00 | 2.30 | 2.70 |
| Hb A ₁ (%) | 5.5 | 7.7 | — | 7.8 |
| RBC ($\times 10^4/\mu l$) | 412 | 473 | 437 | 480 |
| Hb (g/dl) | 11.6 | 14.2 | 13.2 | 13.8 |
| Ht (%) | 33.0 | 42.5 | 38.9 | 40.8 |
| MCV (μm^3) | 80 | 90 | 88 | 86 |
| retic (%) | 0.9 | 0.6 | 0.4 | — |

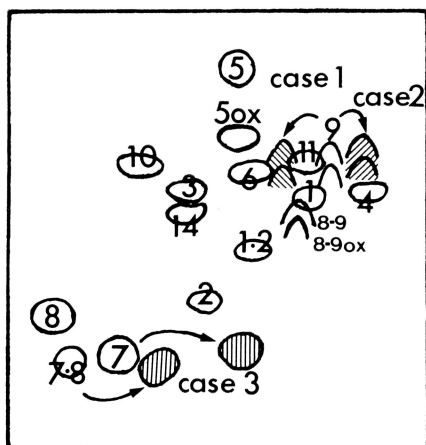


Fig. 1 (a) Fingerprint map of the soluble fraction of the tryptic digests of α^{abn} chains (case 1, 2, 3)

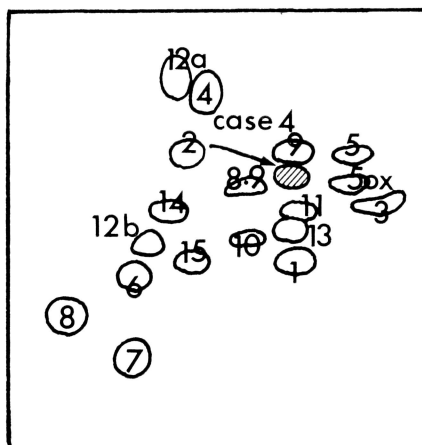


Fig. 1 (b) Fingerprint map of the tryptic digests of AE- β^{Ankara} chain (case 4)

プリントの模式図を **Figure. 1 (a) (b)** に示す。正常なグロビンに認められるペプチドが、それぞれ矢印の位置へ移動していた。異常ペプチドのアミノ酸分析の結果 case 1: $\alpha T-9$ (Asp→Asn), case 2: $\alpha T-9$ (Asn→Asp), case 3: $\alpha T-7$ (Gly→Asp), case 4: $\beta T-2$ (Ala→Asp) の置換であることがわかった。case 1において、 $\alpha T-9$ ($\alpha 62-90$) には Asp が64番, 74番, 75番, 85番の4カ所存在する。 $\alpha T-9$ のEdman分解法により $\alpha 64$ の Asp が Asn に置換していることが決定された。¹¹⁾ case 2において $\alpha T-9$ の Asn は68番, 78番の2カ所である。 $\alpha T-9$ のサーモライシン消化ペプチドの分析により $\alpha 68$ の Asn が Asp に置換していることを決定した (**Fig. 2**)。case 3において $\alpha T-7$ ($\alpha 57-60$) には Gly が57番と59番に存在する。Edman分解法により $\alpha 57$ の Gly が Asp に置換していることを決定した。¹²⁾ case 4に

おいて $\beta T-2$ ($\beta 9-17$) のうち Ala は10番と13番に存在する。この位置決定もEdman分解法により $\beta 10$ であることが示された。¹³⁾ これらはそれぞれ世界においてはすでに報告、登録されている、Hb G Waimanalo¹⁴⁾ (case 1), Hb Ube-2¹⁵⁾ (case 2), Hb J Norfolk¹⁶⁾ (case 3), Hb Ankara¹⁷⁾ (case 4) と一致した。

これら異常ヘモグロビンの酸素運搬能を検査したがどれも正常な Hb A と差を認めなかった (**Table 2**)。不安定性試験はどれも正常であった。

(2) β -サラセミア症について

Hb A₂ 含量が多いことにより見出された検体は35歳の女性で、血液検査は RBC $525 \times 10^4/\mu\text{l}$, Hb 10.5 g/dl, Ht 32.5%, MCV 62 fl, retic 0.9% と赤血球数の増加と小球性低色素性の軽度の貧血を呈していた (**Table 3**)。微量ヘモグロビン含量は Hb A₂ 6.32%, Hb F 0.76

Table 2. Oxygenation properties

| | case 1 Hb G Waimanalo | case 2 Hb Ube-2 | case 3 Hb J Norfolk | case 4 Hb Ankara |
|-------------------------------|--------------------------|--------------------|------------------------|---------------------|
| P ₅₀ (pH 7.4) mmHg | 5.91(6.43) | 6.3 | 6.29(6.67) | 5.9 (5.9) |
| Hill's n (pH 7.4) | 2.59(2.73) | normal | 2.55(2.72) | 2.58(2.63) |
| Bohr effect | -0.40(-0.42) | normal | -0.45(-0.45) | -0.65(-0.64) |

() : the value of Hb A

Table 3. Hematologic data of β -thalassemia

| | | |
|---------------------------------|--------------|---------------------------------------|
| 発 見 年 月 | 1981. 3. | |
| 発端者・年齢(姓) | E. I. 35 (F) | |
| 居 住 地 | 淡 路 島 | |
| Hb F (%) | 0.76 | RBC ($\times 10^4/\mu\text{l}$) 525 |
| Hb A ₂ (%) | 6.32 | Hb (g/dl) 10.5 |
| Hb A ₁ (%) | 6.3 | Ht (%) 32.5 |
| 2,3-DPG($\mu\text{mol/ml}$ 全血) | 2.72 | MCV (μm^3) 62 |
| " ($\mu\text{mol/gHb}$) | 25.9 | retic (%) 0.9 |
| " ($\mu\text{mol/ml}$ 血球) | 8.38 | |
| ヘモグロビン合成比 β/α | 0.36 | |

%、Hb I A6.3% と Hb A₂ のみの増加を認めた。網状赤血球を用いたヘモグロビンの生合成試験で β/α のグロビン合成比は 0.36 と β 鎖の合成抑制を示しており、 β -サラセミアであることが確認された。2, 3-DPG は $2.72 \mu\text{mol/ml}$ 全血であり、ヘモグロビン当りに換算すると $25.9 \mu\text{mol/g Hb}$ と増加していた。

考 察

兵庫県下で発見された異常ヘモグロビン 4 種は、日本人には、初めての Hb G Waimanalo と Hb Ankara, そして、各地の日本人に検出される Hb Ube-2, 鹿児島, 山口で 4 例報告されている Hb J Norfolk であった。

Hb Ube-2 は今までに日本では、これを含めて山口 (1 例), 岡山 (1 例), 香川 (6 例),

兵庫 (5 例) 大阪 (2 例), 愛知 (1 例), 合計 16 例発見されている日本人にはポピュラーな変異体である。

世界での報告は最近までなかったが、1984 年にトルコ人に Hb Ube-2 が発見された。¹⁸⁾ 兵庫県で発見された Hb Ankara は最初の発見がトルコ人の鉄欠乏性貧血の婦人であることを考慮すると、人類の遺伝子の流れにおいてトルコ人と日本人の関係は興味あるところである。Hb Ube-2 は酸素運搬能、ヘモグロビン分子の安定性共に、正常なヘモグロビンと差を認めないヘモグロビンの例である。Hb G Waimanalo は最初フィリピン人に見い出され、 β -サラセミア症との合併が示されていたが、我々の例では、ヘモグロビンの合成比 (β/α) は正常であった。しかし鉄欠乏 (血清鉄 $30 \mu\text{g/dl}$) に由来する軽度の貧血により、やや小球性低色素性の貧血を認めた。

兵庫県の Hb J Norfolk は α 鎖異常ヘモグロビンとしては、含量がやや多目の 28.4% であった。九州の例¹⁹⁾ では 20% であるが、イタリアで発見された例²⁰⁾ では 33~45%, 35~37% で α 鎖遺伝子の配列異常の可能性が示されている。DNA 解析の必要があろう。

今回発見された β -サラセミアは Hb A₂ の増加のみを示していた。第 1 報²¹⁾ で報告した例とは異なり軽度の貧血を呈していたが詳しい検査は行えなかった。

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 percentage 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) 原野恵子, 中島行正, 堀野正治, 原野昭雄, 岡村一博, 上田 智: ヘモグロビン A₁ の測定. *検査と技術* 8: 509—513, 1980
- 6) Carrell, R. W. and Kay, R.: A simple method for detection of unstable haemoglobin. *Br. J. Haematol.* 23: 615—619, 1972

- 7) Imai, K., Morimoto, H., Kotani, M., Watari, H., Hirota, W. and Kuroda, M.: Studies on the function of abnormal hemoglobin. I. An improved method for automatic measurement of the oxygen equilibrium curve of hemoglobin. *Biochim. Biophys. Acta* 200: 189—196, 1970
- 8) Harano, K., Harano, T., Ueda, S. and Shibata, S.: Mapping and amino acid analysis of tryptic peptides of globin by use of cellulose thin layer. *Kawasaki Med. J.* 4: 323—326, 1978
- 9) Schroeder, W. A.: Degradation of peptides by the Edman method with direct identification of the phenylthiohydantoin-amino acid. *Meth. Enzymol.* 25: 298—313, 1972
- 10) 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
- 11) Harano, T., Harano, K., Ueda, S., Shibata, S. and Imai, K.: Hemoglobin G Waimanalo [α 64 (E 13) Asp→Asn] in a Japanese. Hematologic, functional and synthesis studies. *Hemoglobin* 5: 591—597, 1981
- 12) Harano, T., Harano, K., Imai, N., Ueda, S., Hayashi, Y., Nakashima, Y. and Shibata, S.: Hb J Norfolk [α 57 (E 6) Gly→Asp], discovered in the people living in Hyogo Prefecture. *Kawasaki Med. J.* 8: 133—138, 1982
- 13) Harano, T., Harano, K., Ueda, S., Shibata, S. and Imai, K.: Hemoglobin Ankara [β 10 (A 7) Ala→Asp] properties and biosynthesis. *Hemoglobin* 5: 737—741, 1981
- 14) Blackwell, R. Q., Jim, R. T. S., Tan, T. G. H., Weng, M. -I., Liu, C. -S. and Wang, C. L.: Hemoglobin G Waimanalo: α 64 Asp→Asn. *Biochim. Biophys. Acta* 322: 27—33, 1973
- 15) Miyaji, T., Iuchi, I., Yamamoto, K., Ohba, Y. and Shibata, S.: Amino acid substitution of Hemoglobin Ube-2 (α 2 68 Asp β 2): An example of successful application of partial hydrolysis of peptide with 5% acetic acid. *Clin. Chim. Acta* 16: 347—352, 1967
- 16) Baglioni, C.: A chemical study of Hemoglobin Norfolk. *J. Biol. Chem.* 237: 69—74, 1962
- 17) Arcasoy, A., Casey, R., Lehmann, H., Cavdar, A. O. and Berki, A.: A new Haemoglobin J from Turkey-Hb Ankara (β 10 (A 7) Ala→Asp). *FEBS Lett.* 42: 121—123, 1974
- 18) Bilginer, A., Lehmann, H. and Arcasoy, A.: Hemoglobin Ube-2 (α 68 Asn→Asp) observed in a Turkish family. *Hemoglobin* 8: 189—191 1984
- 19) Imanura, T.: Hemoglobin Kagoshima: An example of Hemoglobin Norfolk in a Japanese Family. *Am. J. Human Genet.* 18: 584—593, 1966
- 20) Marinucci, M., Mavilio, F., Samoggia, P., Tentori, L., Spadea, G. and Cocone, G.: Occurrence of Haemoglobin Norfolk (α 57 (E6) Gly→Asp β 2) at the Level of 33% in an Italian Family from Calabria. *Acta haemat.* 61: 39—46, 1979
- 21) 原野恵子, 原野昭雄, 上田 智, 森 博雄, 中島行正: 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—。川崎医学会誌 10: 40—45, 1984