

### 3 異常ヘモグロビンの検査

ヒトヘモグロビン (Hb) は、 $\alpha$ 鎖と非 $\alpha$ 鎖 ( $\beta, \gamma, \delta$ ) のグロビンがそれぞれヘムと結合し、会合して四量体を形成した赤色の複合蛋白である。健康人の赤血球中の Hb の組成は、約 90% を占める HbA ( $\alpha_2\beta_2$ )、約 3% の HbA<sub>2</sub> ( $\alpha_2\delta_2$ )、約 1% の HbF ( $\alpha_2\gamma_2$ ) のほかに、HbA が糖と結合した HbA<sub>1c</sub> が数% 存在する。

異常 Hb には、Hb の  $\alpha$ 鎖または非 $\alpha$ 鎖の**アミノ酸配列の異常**によるものと、グロビン鎖の  $\alpha$ 鎖と非 $\alpha$ 鎖の合成不均衡による**サラセミア**がある。Hb のアミノ酸配列異常の約 90% は点突然変異によるものである。異常 Hb 保有者の多くは無症状であり、近年の HPLC による HbA<sub>1c</sub>測定時に発見されることが多いが、アミノ酸配列異常の種類によっては以下のように、Hb 分子の不安定性や酸素運搬機能の障害などによって臨床症状を起こす。

- ① **赤血球内に結晶を生じるもの**：HbS ( $\beta 6\text{Glu}\rightarrow\text{Val}$ )、HbC ( $\beta 6\text{Glu}\rightarrow\text{Lys}$ )、HbC Harlem
- ② **不安定 Hb 症 (→用語解説)**：Hb Köln (Ube-1,  $\beta 98\text{Val}\rightarrow\text{Met}$ )、Hb Hammersmith (Chiba,  $\beta 42\text{Phe}\rightarrow\text{Ser}$ )、Hb Hiroasaki ( $\alpha 43\text{Phe}\rightarrow\text{Leu}$ )、Hb Tochigi
- ③ **チアノーゼを呈する Hb M 症**：M Boston (M Osaka,  $\alpha 58\text{His}\rightarrow\text{Tyr}$ )、M Iwate ( $\alpha 87\text{His}\rightarrow\text{Tyr}$ )、M Sakatoon (M Kurume,  $\beta 63\text{His}\rightarrow\text{Tyr}$ )、M Hyde Park (M Akita,  $\beta 92\text{His}\rightarrow\text{Tyr}$ )、M Milwaukee-1, Hb Kansas
- ④ **多血症を呈するもの**：Hb Chesapeake, Hb Hiroshima, Hb Rainier

これらのほかに、 $\beta$ 鎖または $\gamma$ 鎖が四量体を形成した**HbH** ( $\beta_4$ ) または**Hb Bart's** ( $\gamma_4$ ) などが $\alpha$ サラセミアの血中に出現し、HbA<sub>2</sub>の増加または減少、HbFの増加などが各種のサラセミアでみられ、診断上有用な所見となっている。

国内の異常 Hb は 1960 年からの 40 年間で約 100 種 ( $\alpha 36, \beta 53, \gamma 6$ ) 発見され、その頻度は約 3,000 人に 1 人である。無症候性のものがほとんどであるが、実際に臨床症状(溶血性貧血、チアノーゼなど)を起こすのは約 30% 程度とされ、このうち約 20% が不安定 Hb 症である。

#### 【用語解説】

**不安定 Hb 症**：Hb の分子構造が不安定で容易に変性・沈殿し、ハインツ小体を形成し、赤血球膜に障害を与えることにより、溶血が亢進する異常 Hb 症の総称である。

**異常 Hb 症の検査** 臨床症状や一般の血液検査から異常 Hb 症を疑う所見と確定診断に必要な検査を、表 4-28 に記した。

- ① **異常 Hb の検索**：各種の電気泳動法、HPLC 法
- ② **Hb 分画成分の定量**：HbA<sub>2</sub>、HbF など
- ③ **不安定性の検査**：熱変性試験、イソプロパノール沈殿試験、PCMB (p-chloromercuribenzoate) 沈殿法など
- ④ **吸収スペクトル**
- ⑤ **酸素平衡曲線**
- ⑥ **異常 Hb のアミノ酸置換の検索**、Hb 合成試験 (サラセミア)

以下に、一般の検査室に適用できる異常 Hb の検査法について記す。なお、特定の専門研究施設に検索を依頼する場合には、抗凝固剤 EDTA で 2 ml、ヘパリンで 10 ml 採血し、凍結しないように氷冷して宅配便で送付する (川崎医大生化学原野昭雄教授ら、山口大保健学科服部幸夫教授ら)。現在では、遺伝子検査によって異常ヘモグロビン・サラセミアの原因と

表 4-28 異常 Hb 症の臨床所見からのアプローチと検査 (大庭)

臨床所見	検査所見	異常 Hb 症 (含サラセミア)	特異的検査
溶血性貧血	<ul style="list-style-type: none"> <li>● 正(大)球形正(低)色素性先天性非球形赤血球症 (重症ほど奇形赤血球多い)</li> <li>● 小球性低色素性貧血 (重症ほど菲薄な奇形赤血球)</li> </ul>	不安定 Hb 症	イソプロパノール沈殿試験 熱変性試験 Heinz 小体染色 (摘脾後)
チアノーゼ	<ul style="list-style-type: none"> <li>● 動脈血 Po<sub>2</sub>正常</li> </ul>	サラセミア	HbA <sub>2</sub> 定量 HbF 定量 Hb H body 染色 吸収スペクトル
赤血球増加 溶血性貧血と疼痛発作 (黒人)	<ul style="list-style-type: none"> <li>● 動脈血 Po<sub>2</sub>正常</li> </ul>	HbM 病 低酸素親和性 Hb  高酸素親和性 Hb HbS 病	吸収スペクトル 酸素平衡曲線 酸素平衡曲線 鎌状化試験 溶解度試験

なる遺伝子異常が検索されている。

**溶血液の調製** ヘパリンまたは EDTA 加静脈血に、0.9% 食塩水を加え、転倒混和し、2,500 rpm で 5 分間遠心し、上清を除き赤血球層を集める。この操作を 2~3 度繰り返す。赤血球層の 1.5 倍容の精製水と 0.5 倍容の四塩化炭素を加え、ミキサーで激しく攪拌したのち、3,000 rpm で 20 分間遠心する。底のほうから四塩化炭素、破壊された膜成分、溶血液層の順に分離されるので、溶血液層を別の試験管に取り分ける。この溶液の Hb 濃度を約 10 g/dl (10%) に調節する。四塩化炭素の代わりにトルエンを用いてもよい。この場合は最下層が溶血液層となる。

#### ■ セルロースアセテート (CA) 膜電気泳動法

CA 膜電気泳動は分離能や微量成分の検出感度に劣るが、蛋白の膜への吸着が少なく、日常検査に応用でき、異常 Hb のスクリーニングや HbA<sub>2</sub>の定量に有用である。

**装置と器具** CA 膜電気泳動槽と定電圧装置、ブリッジ用の東洋濾紙 No.2、マイクロピペット、CA 膜

**試薬** ① **泳動用緩衝液**：トリス 36g、EDTA 1.8g、ホウ酸 9g を精製水に溶かして 3l とする。溶液の pH は 8.6 となる。

② **染色液**：ボンソー R (和光) 0.8g、トリクロロ酢酸 (同) 6g を精製水で溶かし 100 ml とする。

③ **脱色液**：酢酸 10ml を精製水で 1l とする。

**操作** ① **電気泳動**：マイクロピペットで溶血液 1~2  $\mu$ l を細長いバンド状 (~1 cm 幅) に塗布する。健康人の溶血液を対照とする。異常 Hb や HbA<sub>2</sub>などの定量には約 5  $\mu$ l の試料を用いる。150V で 90 分間泳動したのち、膜を泳動槽から取り出して、そのまま観察するか、必要に応じて染色する。

② **染色と脱色**：膜を染色液に 1 分間浸したのち、脱色液で十分に洗浄し、乾燥させる。

**判定** **異常 Hb の泳動パターン**：健康人の溶液では陰極側から HbA<sub>2</sub>および HbA (HbF と HbA<sub>1c</sub>を含む) が分離される。異常 Hb のうちアミノ酸置換による荷電状態によって HbA より陰極側に泳動されるものを **slow moving**、HbA より陽極側に泳動されるものを **fast moving** という。CA 膜の染色を行うと、HbA<sub>2</sub>より陰極側に炭酸脱水素酵素 (carbonic anhy-

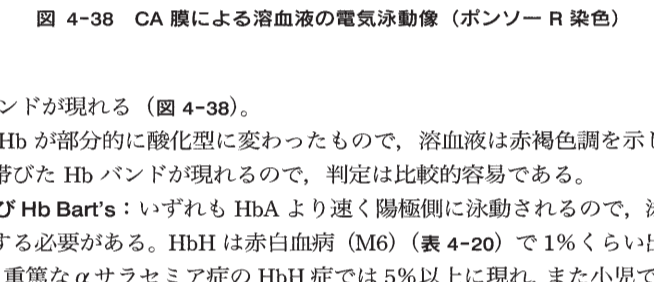


図 4-38 CA 膜による溶血液の電気泳動像 (ボンソー R 染色)

drase) のバンドが現れる (図 4-38)。

**HbM 症**：Hb が部分的に酸化型に変わったもので、溶血液は赤褐色調を示し、電気泳動では褐色を帯びた Hb バンドが現れるので、判定は比較的容易である。

**HbH および Hb Bart's**：いずれも HbA より速く陽極側に泳動されるので、泳動時間を短縮して観察する必要がある。HbH は赤白血病 (M6) (表 4-20) で 1% くらい出現することがあるほか、重篤な  $\alpha$ サラセミア症の HbH 症では 5% 以上に現れ、また小児では Hb Bart's も混在する。

**その他の異常 Hb**：CA 膜電気泳動は分離能が低いので、低含量の異常 Hb や HbA との泳動度差が小さい異常 Hb では、その存在を確かめることが難しい。染色操作はこのような Hb の検出の助けになることはあるが、このような異常 Hb の存在が疑われるときは、分離能の優れた等電点電気泳動を行ってみるほうがよい。

**HbA<sub>2</sub>、異常 Hb の定量** CA 膜への Hb の吸着は弱いので、電気泳動後、各 Hb 分画の定量が可能である。

① **Hb 分画の溶出と吸光度の測定**：泳動された CA 膜上の各 Hb 分画を切り取り、それぞれ試験管に入れ、HbA<sub>2</sub>分画部には 2 ml、ほかの Hb 分画部には 5 ml の精製水を入れて攪拌し、室温に 30 分間放置する。上清を取り分け、精製水を対象に 415 nm で、それぞれの吸光度を測定する。

② **Hb 分画の定量** ( [ ] : 吸光度)

$$\text{HbA}_2 (\%) = \frac{[\text{HbA}_2]}{2.5 \times ([\text{HbA}] + [\text{異常 Hb}] + [\text{HbA}_2])} \times 100$$

**基準範囲** HbA<sub>2</sub>：2~3.5%

**異常値** HbA<sub>2</sub>： $\beta$ サラセミアで増加し、 $\beta$ 鎖異常による不安定 Hb 症、悪性貧血の一部で増加、 $\alpha$ サラセミア、 $\delta$ サラセミア、 $\delta\beta$ サラセミアで減少、鉄芽球形貧血、鉄欠乏性貧血で減少傾向。

**異常 Hb**：異常 Hb 量は患者がヘテロ接合体であるかホモ接合体であるかにより大きく異なる。

**生理的変動** HbA<sub>2</sub>は新生児では検出されず、生後 6 カ月で成人値になる。

#### ■ 等電点電気泳動 (ポリアクリルアミドゲル平板法)

溶血液を 0.06% の KCN を含む 5% ポリアクリルアミド薄層ゲル (pH5.0~9.0 : KLB のアンホライン pH6~8 と pH7~9 を等量混合する) に塗布し、**陽極**：1 mol/l リン酸、**陰極**：1 mol/l NaOH で、15 mA で 3 時間泳動し、12% トリクロロ酢酸で固定する。健康人溶血液では陽極側から、HbA<sub>1</sub>、HbA、HbF、HbA<sub>2</sub>の順に分離される。HbA を 100、HbA<sub>2</sub>を 0 とした時の異常 Hb の相対移動度を求めることにより、その種類を推定することが可能である。

薄層ポリアクリルアミド等電点電気泳動による異常 Hb の分離の模式図は文献参照のこと (原野昭雄：血液病学、第 2 版、pp1610-1621、文光堂、1995)。

#### ■ HPLC 法

HbA<sub>1c</sub>測定専用機では、陽イオン交換樹脂を担体としてイオン強度の変化により、短時間に HbA<sub>1</sub>、HbF、HbA、HbA<sub>2</sub>の分画定量をしているが、異常 Hb の種類によっては HbA<sub>1c</sub>の異常増加あるいは異常低下、ピークの異常や二峰性、HbF、HbA<sub>1</sub>または HbA<sub>1b</sub>の異常増加などとして観察される (520 頁)。さらに溶解条件を変えて精密に Hb 成分を分析することによって多数の異常 Hb の分離測定が行われている。詳細は文献参照 (原野昭雄：血液病学第 2 版、pp1610-1621、文光堂、1995)。また HPLC 法は、HbA<sub>2</sub>や HbF の定量に利用される。

#### ■ ヘモグロビン F 定量

HbF (胎児ヘモグロビン) 増加の検出法には、電気泳動・HPLC による分離法、アルカリ抵抗の増大をみる方法、HbF 含有赤血球の酸溶出に対する抵抗性をみる方法 (Kleihauer) などがある。最近では、抗ヒト HbF モノクローナル抗体を用いた FCM により **HbF 含有赤血球**を検出し、しかも胎児型と成人型の鑑別が可能となっている。以下に、**アルカリ変性試験**による定量法 (Bette K et al : Nature 12 : 1877, 1959) を記した。

**原理** HbF がアルカリにより変性しにくい性質を利用した方法で、溶血液にフェリシアン化カリウムとシアン化カリウムを加え、すべての Hb をシアンメトヘモグロビンに変化させてから、アルカリ変性試験を行い、未変性ヘモグロビン F の比率を求める。

**試薬** ① **フェリシアン化カリウム・シアン化カリウム溶液**：フェリシアン化カリウム 0.2g、シアン化カリウム 0.2g を精製水に溶解し 1l にする。

② **飽和硫酸アンモニウム液**：硫酸アンモニウム約 85g に精製水 100ml を加え、加熱しながら溶解し (煮沸しない)、数日間放置後、ろ過する。

③ **1.2N 水酸化ナトリウム液**

**方法** ① **0.5g/dl シアンメトヘモグロビン液の調製**：10% 溶血液 0.25 ml に試薬①液 4.75 ml を加え、15 分間放置する。

② **アルカリ変性試験**：①の溶液 2.8 ml に 1.2N 水酸化ナトリウム液 0.2 ml を加え、ストップウォッチを押して混和する。正確に 2 分後、飽和硫酸アンモニウム液 2.0 ml を加える。5 分後、ろ過 (同じろ紙で 2 回) または 3,000 rpm 5 分間で 2 回遠心する。

③ ②のろ液および①の 0.5g/dl シアンメトヘモグロビン液 0.4 ml に精製水 6.75 ml を加え、540 nm で各々の吸光度を求める。

④ 計算

$$\text{HbF} (\%) = \frac{\text{ろ液の吸光度}}{\text{溶血液の吸光度} \times 1.78} \times 100$$

**基準範囲** 成人：0.3~1.3%

**異常値**  $\beta$ サラセミアの約半数例、 $\delta\beta$ サラセミア、遺伝性高 HbF 症、若年慢性骨髄性白血病で高値、不安定 Hb 症、先天性溶血性貧血、急性骨髄性白血病、骨髄異形成症候群などで上昇する。また、再生不良性貧血、PNH、骨髄移植後など著しい骨髄再生期に一過性に増加がみられる。

#### ■ 不安定 Hb 検査法

不安定 Hb の検出には熱変性、イソプロパノール処理や PCMB (p-chloromercuribenzoate) 処理 (SH 基のブロック) などによる変性・沈殿を測定する方法がある。これらの実施にあたっては反応条件を厳格に規定し、健常対照と比較判定することが重要である。以下に、前二者の方法を記す。

##### ▶ 熱変性試験 (Dacie の毛細管遠心法)

ヘムのメト化、グロビンからのヘムの遊離、シスチンの不活性化などが起こるとヘモグロビンは熱に対して変性して沈殿を生じる。溶血液を 50°C 1 時間加熱し、不安定ヘモグロビンを沈殿させる。

**試薬** ① **0.1 mol/l リン酸緩衝液**：pH7.4 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2.98 と K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 13.6g に精製水を加え 1l にする。

② **0.01 mol/l 塩化亜鉛**：塩化亜鉛 1.363g に精製水を加え 1l にする。

**方法** ① 10% 溶血液 0.2 ml、リン酸緩衝液 0.2 ml、塩化亜鉛 0.2 ml を試験管に入れ混和する。

② 上記混液をガラス製毛細管 (0.3×12 cm) に 7~8 cm の長さ (a) に吸いとる。

③ 毛細管の一端を封じ、正確に 50°C の恒温槽中に 1 時間放置する。

④ 3,000 rpm 5 分間遠心し、沈殿層の高さ (b) を測定する。

$$\text{沈殿物} (\%) = (b)/(a) \times 100$$

**基準範囲と異常値** 基準範囲：1.0~3.0%

異常値：4.0% 以上 (不安定 Hb 症)

##### ▶ イソプロパノール沈殿試験 (Carrell 法)

Hb を非極性液に加えると Hb 分子の結合力が弱まり、安定性が減少する。溶血液を 17% イソプロパノール液に入れ 37°C にインキュベートすると、正常 Hb では 40 分で沈殿が始めるが、不安定 Hb では 5 分以内に沈殿が開始する。

**試薬** **沈殿試薬**：トリスヒドロキシアミノメタン 6.06g を精製水 400 ml に溶解し、塩酸で pH7.4 に調整し、精製水で 500 ml とする。この溶液 83 ml にイソプロパノール 17 ml を加え混和する (17% イソプロパノール液)。

**操作** 37°C に保温した上記試薬 1.0 ml に溶血液 0.1 ml 加え、同温度で加温を続ける。この際、必ず健康人の溶血液を対照に用いる。

**不安定 Hb の判定** ① 加温中の試料の 5、10、20 分時における Hb の沈殿の生成具合を、対照と比較観察する。不安定 Hb が存在すると、5 分程度の加温で Hb の沈殿を観察することができる。**HbH** は陽性を示す。**HbM** では陰性を示すものもある。また、**HbF** は陽性を示すので高 HbF 症で陽性となる。

② 不安定性が不明瞭なときは、15~25% の間に 1% 間隔でイソプロパノール濃度溶液を作製し、前述の操作と同様にして試料を調製し、37°C で 1 時間加温後、各試料の 660 nm の吸光度 (濁度) を測定し、各イソプロパノール濃度における不安定 Hb の沈殿率を正常と比較判定する。