

酸素親和性異常をもつ異常血色素の検出法 (I)

—特にそのマススクリーニング検査法

確立のための基礎的研究—

川崎医科大学 生化学教室 (Ⅲ)

日高和夫・井内岩夫

(昭和60年9月17日受理)

A new method for the detection of
abnormal hemoglobin with varied
oxygen affinity

—With special emphases of its application to mass
screening of blood specimen —

Kazuo HIDAKA and Iwao IUCHI

Department of Biochemistry,

Kawasaki Medical School

Kurasiki 701-01, Japan

(Received on Sept. 17, 1985)

Abstract

In order to detect the abnormal hemoglobin with varied oxygen affinity by oxygen determination method, an equipment was devised in our laboratory.

The apparatus consists of a box (20×39×30cm) with a Clark oxygen electrode, the gloves for handling and two holes for an inlet and an outlet of N₂ gas blowing. An aliquot of 300 μ l of the red cell suspension which was prepared by diluting 50 μ l of packed red cell with 1 ml of the substrate-pigment solution (glucose 250mg, 4 -aminoantipyrine 10mg, 3 -methyl-N-ethyl-N-(2 -hydroxyethyl) aniline 10 μ l in 100ml of 0.1 M phosphate buffer, pH 7.0) was placed in the box and reduced atmospheric pO₂ to 20mmHg, then followed to add 40 μ l of enzyme solution (glucose oxidase 2 mg, peroxidase 2 mg in 10ml of 0.1 M phosphate buffer, pH 7.0). After 30 minutes equilibration under this condition, 40 μ l of inhibitor solution (saturated HgCl₂) was added and 50 μ l of the colored pigment (λ max =550nm) was extracted into 1 ml of 3 % NaCl / 1N- acetic acid. The extract was centrifuged and measured its intensity colorimetrically.

This method was suitable for the mass-screening test for the detection of abnormal hemoglobin with varied oxygen affinity.

はじめに

これまで検出された α 、 β 鎖変異型としての異常血色素 (abn. Hb) は404種類あり、そのうち酸素親和性に異常を有する abn. Hb は149種類 (37%) にもおよぶ¹⁾。そして酸素親和性異常の程度にもよるが、これら abn. Hb が貧血、多血症の一群を形成している。また酸素親和性異常を有する abn. Hb の中には荷電的に正常血色素と差がないため電気泳動的に検出されず、他の貧血症や多血症群に紛れ込んでいるものもある²⁾³⁾⁴⁾。従って、直接、酸素親和性の差を利用してこの種の abn. Hb を簡単に検出する方法、ないしはスクリーニング検査にも利用しうる方法の出現が望まれるが、これらの方法についての報告はこれまでになされていない。そこで私共はこの種の検査法の確立を目指し、今回、その基礎的実験成績が得られたので、それをここに報告したい。

装置 および 試薬

I) 装置

低酸素分圧装置として図1に示す如き透明ガラス製の箱 (20×39×30cm) を自作した。板Aは箱Bの正面に取付けられ装置全体は密閉状態になっている。板Aには箱内での操作が外から出来るように手袋が取付けてあり、中央にはカップやその他の器具が出し入れ出来るように取りはずしが容易な蓋が付いている。

箱Bの上面には Clarke 式 pO_2 電極 (医理化工業) と加湿窒素ガスの入口と出口が取付けてあり、窒素ガスの通気により内部の酸素分圧を一定に出来るようにしてある。箱Bの内部にはカップ振盪機と室内の空気を攪拌するためのファンが組込んである。

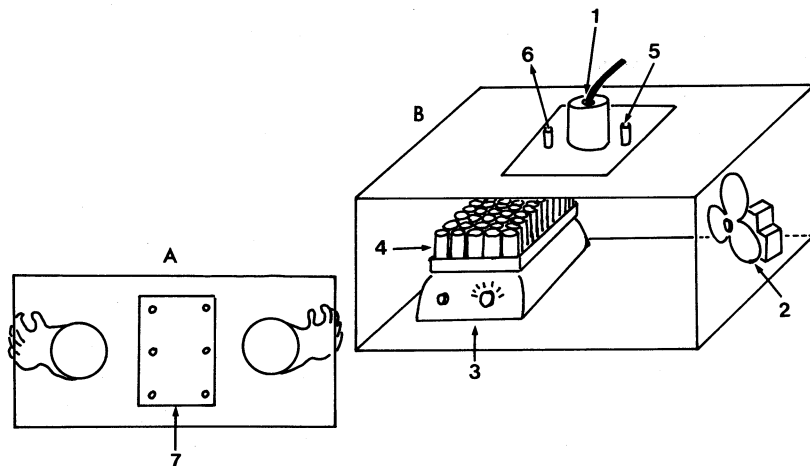


図1. 低酸素分圧装置

- | | | |
|---------------|---------------------|--------|
| 1. 酸素電極, | 2. ファン, | 3. 振盪機 |
| 4. 反応カップ, | 5. N_2 ガス入口 (加湿), | |
| 6. N_2 ガス出口 | 7. カップ等器具の出し入れ口 | |

II) 試薬

- 1) 基質発色試薬：グルコース250mg, 4-アミノアンチピリン10mg, 3-メチル-N-エチル-N-(2-ヒドロキエチル)アニリン 10 μ l を0.1Mリン酸緩衝液 (pH7.0) 100mlに溶解する。
- 2) 酵素試薬：グルコースオキシダーゼ (G. O.), ペルオキシダーゼ (POD) の各 2 mg を 0.1Mリン酸緩衝液 (pH7.0) 10mlに溶解し, 使用直前に窒素ガス置換をしておく。
- 3) 酵素反応停止薬：塩化第二水銀 (Hg Cl₂) の飽和水溶液。使用前に窒素ガス置換をしておく。
- 4) n-ヘプタン：反応溶液と大気との遮断に使用する。
- 5) 抽出溶液 (3% NaCl / 1N-酢酸)：3 g の塩化ナトリウムを1N-酢酸100mlに溶解する。

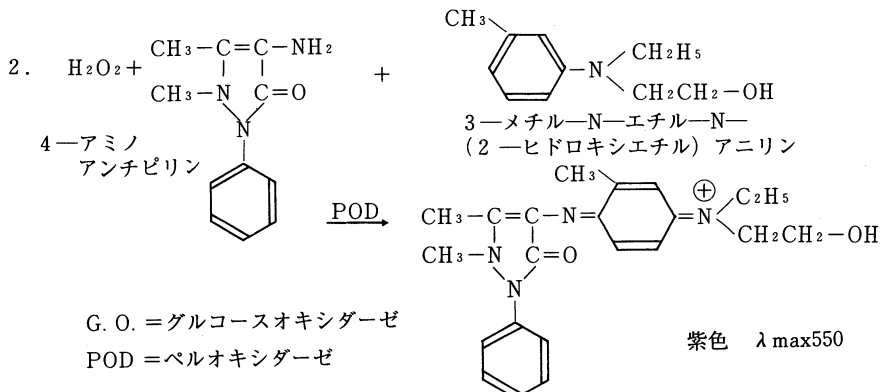
III) 測定方法

一夜静置した抗凝固剤入り血液の底部にピペットをさし込み, 赤血球部分 50 μ l を採取し, これに20倍容量の基質発色試薬 (1 ml) を加えて混合し赤血球浮遊液を作る。この赤血球浮遊液 300 μ l を丸底カップ [10 (I. D.) \times 17mm] に採量し, 装置内の振盪機にセットする。また窒素置換した酵素試薬, 酵素反応停止薬およびn-ヘプタンを同装置内の別の場所に置く。装置全体を密閉後, 赤血球浮遊液を振盪しながら装置内に窒素ガスを送り, 20~30分間かけて酸素分圧を20mmHgにさげ, 15分間この分圧を保持する。その後, n-ヘプタン400 μ l を赤血球浮遊液に重層し, 次いで酵素試薬 40 μ l を加え30分間室温でインキュベートする。時間が来たら酵素反応停止薬 40 μ l を加える。密閉装置からカップを装置外に取出し, 反応液から 50 μ l を採量し, 抽出液 (3% NaCl / 1N-酢酸) 1 ml 中に入れ攪拌する。赤血球の蛋白質部分が沈殿して析出したら, 3500rpm で5分間遠沈し, その上清 (紫色) の吸光度を波長550mmで測定する。

成績

私共が使用した残存酸素測定の方法は次の如くである⁵⁾。

1. グルコース + 残存酸素 G.O. \rightarrow グルコンラクトン + H₂O₂



従って本法が確立する条件は溶液内の残存酸素がG. O. により確実に H_2O_2 に還元される事および生成 H_2O_2 による発色が安定し、定量性がある事である。この点を考慮して種々の反応条件の吟味を行なった。

1. 吸収スペクトル： 酵素反応生成物は紫色を呈し、550nmに吸収極大をもつ（図2）。

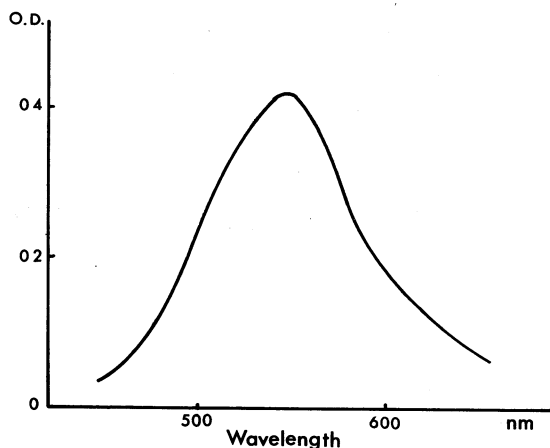


図2. 酵素反応生成物の吸収スペクトル

2. 発色の安定性： 基質発色試薬のみに酵素試薬を大気中で測定方法に従って反応させ、得られた呈色の吸光度は2時間で2%しか減少せず安定であった。

3. 赤血球の基質発色試薬による希釈倍数： 赤血球一容に対し、基質発色試薬を2, 5, 10, 20および50倍容を加えた場合について20mmHgの酸素分圧において測定し図3の結果を得た。赤血球の希釈に対応した吸光度を示したが、反応溶液の粘性等を考慮して20倍希釈を測定法に採用した。

4. 各種の酸素分圧下における酵素反応時間： 1, 5, 10および20mmHgの酸素分圧下での赤血球浮遊液に酵素試薬を加え、呈色が一定のプラトウに達する時間を測定した(図4)。

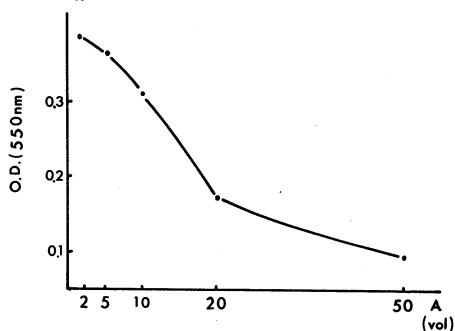


図3. 赤血球の希釈倍数とその吸光度
A: 赤血球に対する基質発色試薬の希釈倍数

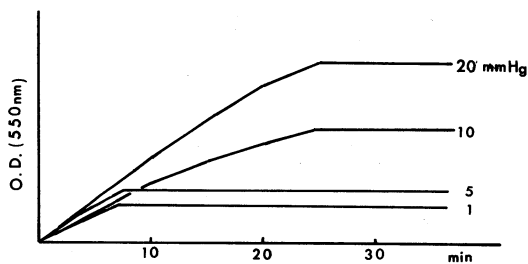


図4. 酸素分圧1,5,10および20mmHgにおける酵素反応時間

1 および 5 mmHg の酸素分圧では10分以内, 10および20mmHg では25分以内に吸光度は一定となった。従って測定法では酵素反応時間は30分を採用した。

5. 酵素試薬と酵素反応停止薬の添加量比: 10mmHgの酸素分圧下, 赤血球浮遊液 (300 μ l) に酵素試薬40 μ l を添加し, その10分後, 酵素反応停止薬を10, 20, 40, 80および120 μ l をそれぞれに加え, 経時的に阻害効果を測定した (図5)。

酵素試薬に対して酵素反応停止薬を等容量以上加えれば阻害が完全である事が示された。従って測定法では酵素反応停止薬は40 μ l を採用した。

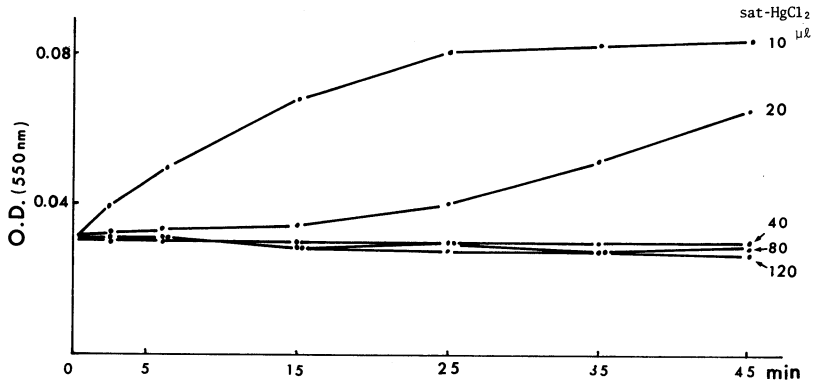


図5. 酵素試薬40 μ lに対する酵素反応停止薬の阻害効果

6. ブランク試験: 赤血球を加えない基質発色試薬のみ 300 μ l を用いて, 1, 3, 5, 10, 20および30mmHgの酸素分圧下, 酵素試薬を加え, 測定法に従って吸光度を測定した結果, それぞれの酸素分圧の順に吸光度は0.001, 0.009, 0.016, 0.028, 0.041および0.053であり, 溶液中の残存酸素量は酸素分圧にほぼ比例して増加していた。

7. 採取赤血球量の差異: 一夜静置した12種の全血からそれぞれピペットで赤血球を50 μ l 採取し, 基質発色試薬300 μ l を加え, ヘマトクリット法で赤血球容積をしらべると, その試料間の変動は6%以下であり, スクリーニング法のための採量方法として充分とみなし得た。

8. 血漿の吸光度への影響: 血漿のみを50 μ l 採取し, 基質発色試薬 1 mlを加え, 測定法に従って10mmHgの酸素分圧下で反応を行なった結果, その吸光度は0.030でブランク試験のそれと同じ値を示し, 血漿の影響は無視しうるものであった。

9. 正常人赤血球の測定：以上の吟味結果に従い、確立した測定条件により、正常人赤血球12例について1, 3, 5, 10, 20, および30mmHgの酸素分圧下で測定した結果を図6に示す。各分圧に対応して吸光度が増加しており, abn. Hbの酸素親和性をうかがう簡便法として条件を満たしていると思われた。

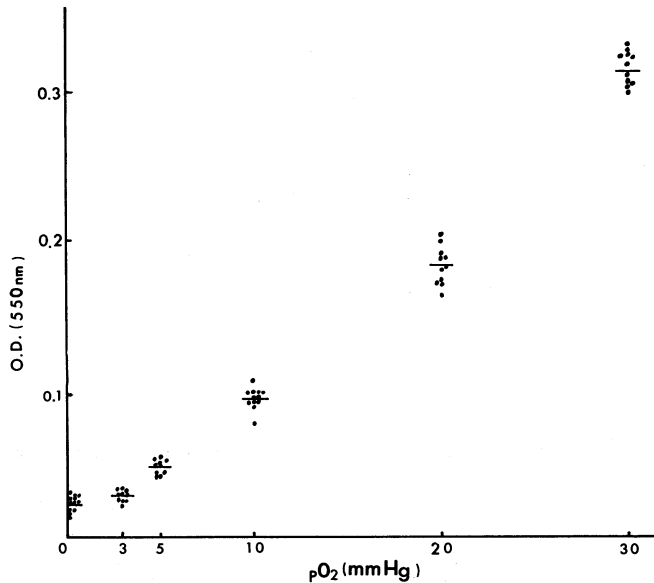


図6. 正常人赤血球12例の各酸素分圧における酵素反応生成物の吸光度

考 察

私共はG. O. を用いる血色素の酸素親和性の精密測定法はすでに公表しているが⁶⁾, 簡単にしかも多数の血液試料を同時にこなすには精密法は不向きであり, 本法の如き残存酸素の比色定量法が最も便利と考え研究を進めた。

赤血球浮遊液を振盪することによる溶血の吸光度への影響として, ヘム化合物および他の色素によるものが考慮されたが, 赤血球のみによるブランク試験において溶血はほとんどなく, 吸光度も0.002前後であった。これは図6の酸素分圧3 mmHg以下(吸光度0.02~0.03)では吸光度に数%の誤差を与えるが, それ以上の酸素分圧にはほとんど影響はない。しかも10, 20および30mmHgにおいて明確な吸光度差および目視による差がみられ, 20mmHg前後の酸素分圧ならば充分親和性の差を認めることが出来た。各酸素分圧下における残存酸素の酵素反応時間は図3から30分あれば充分であった。また酵素反応停止薬としてHg²⁺以外にCN⁻, F⁻, N₃⁻等も吟味したが, いずれも阻害が完全でなく, Hg²⁺が最もすぐれていた。酵素反応停止後の溶

液の抽出液としての3% NaCl / 1N-酢酸の使用は等張液よりも濃い3% NaCl を用いる事により赤血球の溶血を防止出来、また酢酸酸性 (pH 2.1) は発色の安定化のため採用した。

このように基礎的実験としての方法は確立したが、これを実際にマスキリングに応用する場合、このままではそれぞれの試薬の使用量も多く、また操作もやや繁雑である。そこで第1に使用量を1/10に縮小する事が考えられる。即ち、採取赤血球量を5 μ l とし、基質発色試薬 100 μ l, n-ヘプタン 40 μ l, 酵素試薬および酵素反応停止薬各10 μ l とする。発色した全容量 125 μ l に3% NaCl / 1N-酢酸 1mlを混合すると、理論的に吸光度が2.5倍に増加した抽出溶液が得られる。第2に操作法であるが、少なくとも一度に100~200検体は処理しうることが必要で、これには1ml容量の100~200検体用トレイを用い、また試薬は少なくとも一度に10検体分は加えうるピペットを必要とする。最後に1mlの3% NaCl / 1N-酢酸を加え、トレイのまま遠沈を行ない、抽出液の吸光度を測定する。第3は最後の3% NaCl / 1N-酢酸を加えずに原発色液を直接濾紙にスポットして、その色の濃淡を比較する。その外にも操作法は種々の工夫が考えられるが、それらの成果は次の続編としたい。

結 論

異常血色素血球の酸素親和性を正常血色素血球のそれと比較するため、残存酸素測定装置を自作し、その装置と測定成績について報告した。装置は酸素電極、操作用手袋を有し、窒素ガスの吹き込み、吹き出し口がついており、内部には振盪機とファンが組み込まれている。

基質発色液で20倍希釈した赤血球浮遊液 300 μ l に一定酸素分圧下 ($pO_2 = 20$ mmHg), 酵素試薬 40 μ l を加え、反応終了後、阻害剤として飽和塩化第二水銀液 40 μ l を加えた。この反応溶液のうち 50 μ l を抽出液 3% NaCl / 1N-酢酸 1ml中に加え、遠沈後、上清の呈色を波長 550nmで測定した。これより多数の Hb 試料の酸素親和性の異常を容易に判断しうる。

References

1. Ruth, N. Wrightstone, et al, International Hemoglobin Information Center Variant List. Hemoglobin 9(3) : 229-298, 1985.
2. Bratu, V., Lorkin, P. A., Lehman, H. and Predescu, C., Hemoglobin Bucuresti $\beta 42$ (CD1) Phe \rightarrow Leu, a case of unstable hemoglobin hemolytic anemia. Biochim. Biophys. Acta, 251 : 1-6, 1971.
3. Lokich, J. J., Mahoney, C. W., Bun, H. F., Bruckheimer, S. M. and Ranney, H. M., Hemoglobin Brigham ($\alpha^2 \beta^2$ 100Pro \rightarrow Leu). Hemoglobin variant associated with familial erythrocytosis. J. Clin. Invest., 52: 2060-2067, 1973.
4. White, J. M., Szur, L., Gillies, I. D. S., Lorkin, P. A. and Lehman, H., Familial polycythaemia caused by a new hemoglobin variant. Hb Heathrow $\beta 103$ (G 5) Phe \rightarrow Leu. Br. Med. J., 3 : 665-667, 1973.
5. 高阪 彰 : H_2O_2 の酵素的測定法, 共役色素と妨害反応をめぐって. 検査と技術, 9 : 867-871, 1981
6. 井内岩夫, 日高和夫, 島崎俊一 : 人血色素の酸素平衡曲線測定法の改良, 特にグルコースオキシダーゼを用いた新しい脱酸素酵素系の導入について. Kawasaki Med. J. Liberal Arts & Sci. Course, 10 : 43-48 1984.