

酸素親和性異常をもつ異常血色素の マスキリーニングのための基礎的研究 (II)

川崎医科大学 生化学(III)教室

日高和夫・井内岩夫

(昭和63年10月13日受理)

Some basic studies for the device of mass-screening test
of abnormal hemoglobin with varied oxygen affinity [II]

Kazuo HIDAOKA and Iwao IUCHI

Department of Biochemistry Kawasaki Medical School

Kurashiki, 701-01, Japan

(Received on Oct. 13, 1988)

概 要

酸素親和性異常の異常血色素を分光学的に検出する方法を確立するために、低酸素分圧下で全血溶血液中の血色素の吸収スペクトルに影響を与える因子を調べた。その結果、試料の還元に窒素ガスを用いる事により血漿や膜成分の影響を除く事が出来た。測定法は低酸素分圧 ($P_{O_2}=4.5\text{mmHg}$) の混合ガスで平衡化したリン酸緩衝液 (pH 7.4) 3.0mlと窒素ガスを通気した全血溶血液 $15\mu\text{l}$ を混合し、2波長 (546nm, 575nm) での吸光度 (A) を測定し、その吸光度比 (A546/A575) を求めた。正常血色素の値1.10に対し、高酸素親和性の des Arg Hb の値は0.90となり、マスキリーニング法への適応が可能である。

Abstract

With the aim of setting up the spectroscopic equipment for the detection of abnormal hemoglobin with varied oxygen affinity, the factors affecting to the spectral change of Hb at a low definite pO_2 condition were sought and we established the basic method devoid of those effects with use of hemolysate prepared without washing the red cells.

An aliquot of 3.0ml of phosphate buffer (pH=7.4) equilibrated with a gas of low oxygen tention ($pO_2=4.5\text{mmHg}$) and $15\mu\text{l}$ of deoxy form of hemolysate converted by nitrogen gas blowing are mixed together and the optical density (A) of the mixture was measured at wave length of 546nm and 575nm and the ratio of [A546/A575] was calculated. The ratio of des Arg Hb which shows high oxygen affinity was 0.90 contrasting for the normal value of 1.10. This procedure eliminates the effects of plasma and red cell membrane on the absorption spectrum of Hb at a low pO_2 and is applicable for the blood oxygen screener of multiple specimen.

はじめに

血色素 (Hb) の生理的役割は肺から末梢組織へ酸素を運搬することであるが、異常血色素 (abn. Hb) の中には酸素運搬機能に異常をきたし、そのため貧血や多血症を呈する例が多く存在する^{1,2)}。これらの酸素親和性異常の abn. Hb のほとんどは本来酸素親和性とは無縁の電気泳動法により検出された後、その異常が判明したもので、直接酸素親和性が検査されて検出された例は少ない。しかし酸素親和性異常の abn. Hb のなかには正常 Hb と荷電的に差がなく、電気泳動法で検出されない部類に属するものも多く存在する。そこで私共は直接酸素親和性を測定する迅速精密なスクリーニング法確立のため幾多の方法を吟味検討した。その結果、低酸素分圧 ($P_{O_2}=4.5\text{mmHg}$) 下での Hb 溶液の波長 546nm と 575nm の吸光度比をとることにより迅速確実に微量の Hb 溶液で酸素親和性異常の abn. Hb を検出しうることが明らかになったので、そのスクリーニング法としての基礎的成績を報告する。

方 法

1. 装置

①低酸素分圧の混合ガスを通気し平衡化させる緩衝液ボトル、②試料に低酸素分圧の混合ガスあるいは純窒素ガスを通気し、多数のマイクロ試料を平衡化するトレイ、③混合ガスを通気させながら試料液を注入混合できる特殊セルから構成されている (図1)。

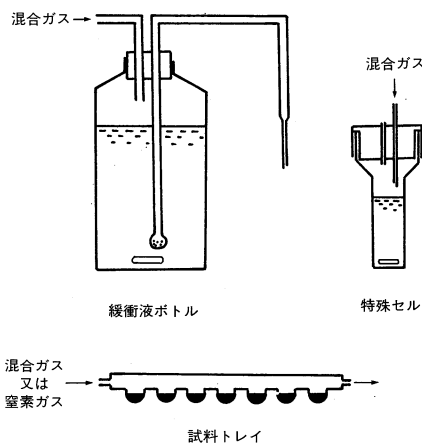


図1 測定用装置の概略図

2. 試料液

溶血液：赤血球を生理食塩水で洗浄した後、蒸留水と四塩化炭素を用いて調整したもの。

Hb 濃度：8g/dl.

全血溶血液：血漿の分離および赤血球洗浄などの操作をせず、抗凝固剤入り全血 30 μ l に 0.2%NP-40 水溶液 50 μ l を加え、混合し凍結溶血させたもの、Hb 濃度：5~8g/dl.

des Arg Hb：参照文献 3 に準じ、溶血液に carboxy peptidase B を作用させ、 α 鎖 141Arg を除去した Hb 溶液。

3. 試薬

- 1) 0.1M 塩化カリウム入り 0.05M リン酸カリウム緩衝液 (pH7.4)：緩衝液ボトルに 0.1M 塩化カリウム - 0.05M リン酸カリウム緩衝液 1000ml を入れ、攪拌しながら混合ガスを 60 分間通気し、次いで NP-40 1ml を加え、さらに 30 分間通気し平衡化させる。
- 2) 混合ガス：酸素を 0.6% 含む窒素ガス、大気圧下の P_{O_2} は 4.5mmHg である。
- 3) 窒素ガス：純度 99.99% のもの
- 4) 中性界面活性剤：Nonidit P-40

4. 測定方法

試料トレイに 50 μ l の溶血液あるいは全血溶血液を入れ、加湿した混合ガスまたは窒素ガスを通気し平衡化させる。

空気遮断が可能な特殊セルに混合ガスを通気しながら試薬 1) のリン酸緩衝液 3.0ml と試料液 15 μ l を加え、密閉後攪拌用回転子を用いて混合し吸収スペクトルを描き、546nm および 575nm の吸光度 A546, A575 をそれぞれ求める。

成 績

1. 吸収スペクトル：溶血液の可視域での吸収スペクトルを図 2 に示した。a はオキシ型、b はそれと等 Hb 濃度のデオキシ型の吸収スペクトルである。両者で等吸光度を示す 546nm と吸光度の差が最大の 575nm の吸光度比 [A546/A575] を求めると、オキシ型では 0.82、デオキシ型では 1.30 となった。吸収スペクトル C は実際の測定酸素分圧 (P_{O_2} : 4.5mmHg) 下での等 Hb 濃度溶血液のものであり、この時の吸光度比は 1.10 であった。

2. 溶血液と全血溶血液との比較：溶血液と全血溶血液をそれぞれ原液、1.5, 2, 3 倍と生理食塩水で希釈し混合ガスで平衡化して測定した結果を図 3 に示した。溶血液の場合、いずれも吸光度比 1.10 のデオキシ型を示したが、全血溶血液ではいずれも吸光度比 0.90 で依然一部酸素と結合したオキシ型を示した。この原因として全血溶血液での Hb の酸素結合に対する血漿および膜成分の影響が考えられた。

3. 溶血液への血漿および膜成分の影響：溶血液に血漿を 1/2 量、等量、2 倍量加え、混合ガスおよび窒素ガスで平衡化した場合の測定結果を図 4 a に示した (この添加量は全血溶血液中に含まれる血漿量の等量、2 倍量、4 倍量に相当するとする)。混合ガスの場合、血漿が存在するといずれの添加量でも酸素の結合が強クオキシ型を示したが、窒素ガスの場合、いずれも

デオキシ型となった。また溶血液に膜成分を1/2量, 等量, 2倍量 (全血溶血液中に含まれる膜成分量の1/2量, 等量, 2倍量に相当する) 加えた場合の測定結果を図4 bに示した。この場合も血漿の時と同様の結果が得られた。これらの結果から血漿および膜成分の影響を除くには全血溶血液の脱酸素化に窒素ガスを用いれば可能であることがわかった。実際に全血溶血液を窒素ガスで平衡化し測定すると吸光度比は1.10となった。

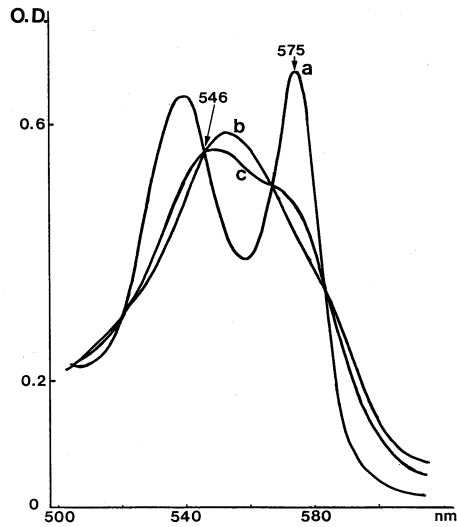


図2 血色素の可視域吸収スペクトル
a. オキシ型, b. デオキシ型, c. 低酸素分圧 ($P_{O_2}=4.5\text{mmHg}$) 下での吸収スペクトル。曲線 a, b, c, はいずれも等濃度Hb溶液である。

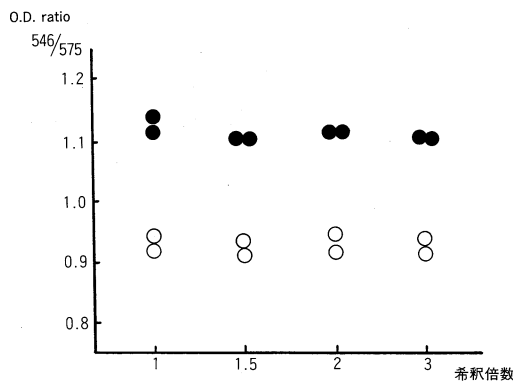


図3 混合ガスで平衡化したHb溶液の濃度と吸光度比の関係
●: 溶血液 ○: 全血溶血液

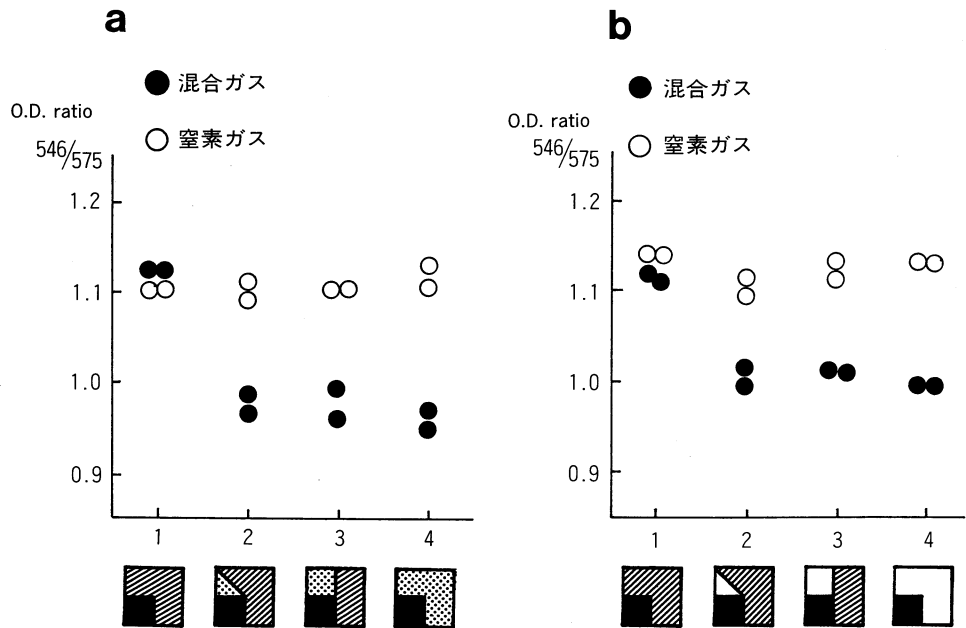


図4 a: 混合ガスおよび窒素ガス下での溶血液に対する血漿の影響
b: 同条件下での溶血液に対する膜成分の影響
■: 溶血液 ▨: 生理食塩水 ▩: 血漿 □: 膜成分

4. des Arg Hb の測定: 高酸素親和性を有する des Arg Hb を窒素ガスで平衡化し測定すると、強い酸素結合によるオキシ型 (吸光度比0.90) となった。また des Arg Hb に血漿および膜成分を添加しても両者の影響はみられず、いずれの場合も吸光度比は0.90であった。

また全血を溶血させる際に用いた NP-40 は、溶血液への NP-40 の添加実験の結果、酸素親和性への影響はみられなかった。

考 察

私共は Glucose Oxidase (G. O.) を用いた血色素の酸素親和性の精密測定法⁴⁾および G. O. を用いた比色定量法⁵⁾によるスクリーニング法についてすでに公表しているが、スクリーニング法としてまだ改良すべき点が残されていた。そこで今回、新たに吸収スペクトルから吸光度比を求める迅速簡便な測定法の開発を進めた。

最初に試料として溶血液を用いて検討を行い、次いで実際のスクリーニングの試料としては試料の作製を簡略化するため血球洗浄等の操作を省略した全血溶血液を用いて検討した。溶血液を試料とした場合、混合ガスで平衡化すると予想通り低酸素分圧下での吸収スペクトルが得られ、吸光度比1.10を示した。しかし全血溶血液の場合、混合ガスの使用では吸光度比0.90の依然として酸素を強く結合したオキシ型を示した。この原因として溶血液に血漿および膜成分を添加した実験結果から Hb と酸素との結合に両者が強く関与している事が示唆されたが、全

血溶血液の平衡化に窒素ガスを使用することによりこの問題は解決した。des Arg Hb は高酸素親和性を有し、酸素平衡曲線測定では $P_{O_2}=4.5\text{mmHg}$ の低酸素分圧下では約90%の酸素飽和度 (SO_2) を示した (正常 Hb : SO_2 10%)。そのため des Arg Hb を窒素ガスで平衡化し測定してもその吸光度比は0.90で依然としてオキシ型であり、血漿および膜成分を添加しても吸光度比は変わらなかった。この事はこの測定法において酸素親和性異常の abn. Hb の検出が可能であることを示唆した。全血溶血液を用いる事によりマススクリーニング法開発にあたって最も重要な点である試料の前処理操作の簡略化が達成された。

結 論

酸素親和性異常の異常血色素を分光学的方法によって検出するために低酸素分圧下での Hb のスペクトル変化を測定した。また試料として赤血球を洗浄せず全血を直接溶血させ、前処理操作の簡略化をはかった。操作は低酸素分圧 ($P_{O_2}=4.5\text{mmHg}$) で平衡化したリン酸緩衝液3.0ml と窒素ガスで平衡化した全血溶血液 $15\mu\text{l}$ を混合し、低酸素分圧下で 546nm と 575nm の二波長での吸光度 (A) を求め、その吸光度比 $[A_{546}/A_{575}]$ を計算した。正常 Hb の値は1.10、高酸素親和性を有する des Arg Hb の値は0.90であった。この測定方法は低酸素分圧下での吸収スペクトルにおいて全血溶血液中の血漿や膜成分の影響を除くことができ、マススクリーニング法として適用可能であることを示唆した。

References

1. Bratu, V., Lorkin, P.A., Lehmann, 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.
2. White, J. M., Szur, L., Gillies, I.D.S., Lorkin, P.A. and Lehmann, H., Familial polycythaemia caused by a new hemoglobin variant. Hb Heathrow $\beta 103$ (G5) Phe \rightarrow Leu. *Br. Med. J.*, 3 : 665-667, 1973.
3. Kilmartin, J.V., Hewitt, J.A. and Wootton, J.F., Alteration of functional properties associated with the change in quaternary structure in unliganded haemoglobin. *J. Mol. Biol.*, 93 : 203-218, 1975.
4. 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*. No.10 : 43-48, 1984.
5. 日高和夫, 井内岩夫, 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 —. *Kawasaki Med. J. Liberal Arts & Sci. Course*. No.11 : 55-62, 1985.