

異常な酸素親和性をもつ変異血色素を 検出するためのマススクリーニング法 開発の基礎的研究(Ⅲ)

— ストップフロー法の応用 —

川崎医科大学 生化学(Ⅲ)教室

日高和夫・井内岩夫

(平成2年9月29日受理)

Some basic studies of mass screening for the detection
of abnormal hemoglobin with varied oxygen affinities

— Application of the stopped flow method —

Kazuo HIDAKA and Iwao IUCHI

Department of Biochemistry, Kawasaki Medical School

Kurashiki, 701-01, Japan

(Received on September 29, 1990)

概 要

異常な酸素親和性のHb変異型を検出するためのストップフロー法の応用についてその可能性を検討した。ストップフロー装置の2個のリザーバーの各々に以下の試薬を満たす。

即ち1) 酵素液として濃度40mg/mlのグルコースオキシダーゼ48 μ l, 90mg/mlのカタラーゼ44 μ l, 0.1Mアスコルビン酸8.6 μ lを0.05Mビスートリス0.1M NaCl緩衝液(pH7.0)1.0mlに混合する。2) 被検血液: 血液10 μ l, 0.2Mグルコース10 μ l, 3%NP-40(中性界面活性剤)5.6 μ lを上記のビスートリス緩衝液(pH7.0)1.0mlに混合し, そのまま, 凍結溶血させたもの。操作は1), 2)液125 μ lずつを瞬間的に混合し, 吸収セルに導き, 576nmでの吸光度の減少を経時的に測定する。正常Hb溶血について50%酸素飽和度までの経過時間は7.5秒であるのに対し, 高酸素親和性のdes Arg Hbのそれは11秒となり, スクリーニング法としての応用が可能であった。

Abstract

A simple and rapid screening method for the detection of abnormal hemoglobin with varied oxygen affinities was studied using the stopped-flow method. Mixing of the two reagents of the apparatus was carried out very rapidly using nitrogen pressure at 7 atm. One mixing reagents was composed of 48 μ l of 40mg/ml glucose oxidase, 44 μ l of 90mg/ml catalase and 8.6 μ l of 0.1M ascorbic acid in 1.0ml of 0.05M bis-tris-0.1M NaCl buffer (pH7.0). The other mixing reagent was composed of 10 μ l of whole blood, 10 μ l of 0.2M glucose and 5.6 μ l of 3% NP-40 in 1.0ml of the same buffer (pH7.0), which was frozen

and dissolved. Each 125 μ l of the two reagents was stopped flowed by pressure, and the absorbance at 576nm was recorded. The elapsed time of des Arg Hb up to 50% deoxygenation was 11seconds, which contrasted significantly with an elapsed time of 7.5seconds for normal Hb.

This method was proven to be satisfactorily applicable for mass-screening tests for detection of abnormal hemoglobin with varied oxygen affinities.

はじめに

血色素 (Hb) の生理的役割は肺から末梢組織への酸素運搬にあるが、異常血色素 (abn. Hb) の中には酸素親和性が異常で、貧血や多血症を個体にもたらし例も存在する^{1,2)}。しかもこの様な酸素親和性異常をしめす abn. Hb は現在160種類も存在し、これまで世界で検出された abn. Hb の38%にもおよんでいる³⁾。これらの酸素親和性異常の abn. Hb はほとんどの例において、本来の酸素親和性とは無縁の電気泳動法により abn. Hb として検出され、その後の検査で酸素親和性異常が判明したもので直接酸素親和性を測定し検出された例はない。そこで私共は酸素親和性の面から電気泳動で検出し得ない abn. Hb を検出する迅速精密なスクリーニング法を確立すべく、幾多の方法の検討を行なった。その結果、従来の私共の還元酵素による酸素解離曲線測定法をストップフロー法に応用すれば微量の全血で迅速確実に酸素親和性異常の abn. Hb を検出しうることが明らかになった⁴⁾。ここにスクリーニング法としての基礎的成績を報告する。

方法

I. 装置

ストップフロー装置はリザーバー、
光電比色計およびデータ処理装置から成る。

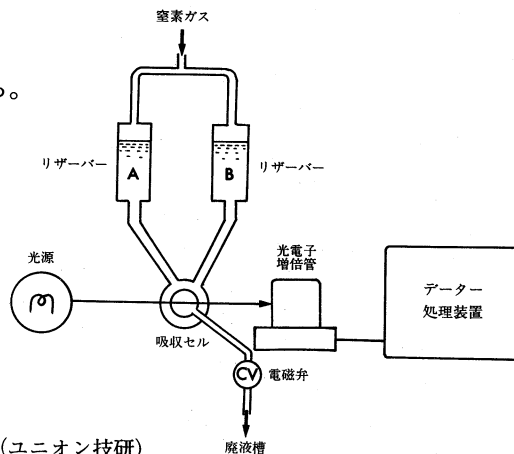


図1 ストップフロー装置の概略図(ユニオン技研)

II. 試薬

- a) 0.05M ビスートリス-0.1M NaCl 緩衝液 pH7.0 ビスートリス 10.5g と NaCl 5.84g を蒸留水に溶かし、塩酸で pH7.0 に調整し全量を 1,000ml とする。

- b) 40mg/ml グルコースオキシダーゼ
グルコースオキシダーゼ粉末 (シグマ) を, 上記濃度になる様に a) の緩衝液に溶解し, 濾過膜 (0.45 μ m) を用いて濾過する。
- c) 90mg/ml カタラーゼ
市販のカタラーゼ溶液 (シグマ) を濾過膜 (0.45 μ m) を用いて濾過する。
- d) 0.1M アスコルビン酸
アスコルビン酸 0.18g を蒸留水に溶かし 10ml とする。
- e) 0.2M グルコース
グルコース 0.36g を蒸留水に溶かし 10ml とする。
- f) 3% NP-40
中性界面活性剤 Nordit P-40 0.3ml を蒸留水に加え 10ml とする。

III. 試料と調製試料液

1. 試料

- a) 溶血液: 赤血球を生理食塩水で洗浄後, 蒸留水と四塩化炭素を用いて溶血させて調製したもの。Hb 濃度: 15g/dl
- b) 全血: 抗凝固剤を加え採血した状態のもの。
- c) des Arg Hb: 参考文献 5 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。

2. 調製試料液

溶血液 (12 μ l) か全血 (10 μ l) のどちらかと 0.1M グルコース 10 μ l, 3% NP-40 5.6 μ l (全血の場合のみ使用) を上記緩衝液 1.0ml と混合したもの。ただし, 全血の場合はこの混合液を凍結溶解し使用する。

3. 使用酵素液

40mg/ml グルコース 48 μ l, 90mg/ml カタラーゼ 44 μ l および 0.1M アスコルビン酸 8.6 μ l を上記緩衝液 1.0ml と混合したもの。

IV. 測定方法

ストップフロー装置の A リザーバーに使用酵素液, B リザーバーに調製試料液を入れ, 加圧した N₂ ガス (7.0atm) を用い, 電磁弁を瞬間的に開閉し, 両溶液 (各 125 μ l) を混合し, 吸収セル内に送りこみ, 波長 576nm での吸光度の減少を経時的に記録する。

成 績

私共がすでに確立して公表している酸素解離曲線測定法 (測定時間 15~20分)⁶⁾ をストップフロー法 (測定時間 20秒) に応用するには酵素量を換えて反応時間を短縮すれば可能であった。すなわち既報のグルコースオキシダーゼ量を 1 とすると, 20秒で反応を終了させるにはグルコースオキシダーゼは 158 倍量, カタラーゼは 24 倍量とする (図 2)。すなわち, ストップ

フロー法に使用する酵素溶液および溶血液溶液は方法の欄の試料の項目の如く調製した。

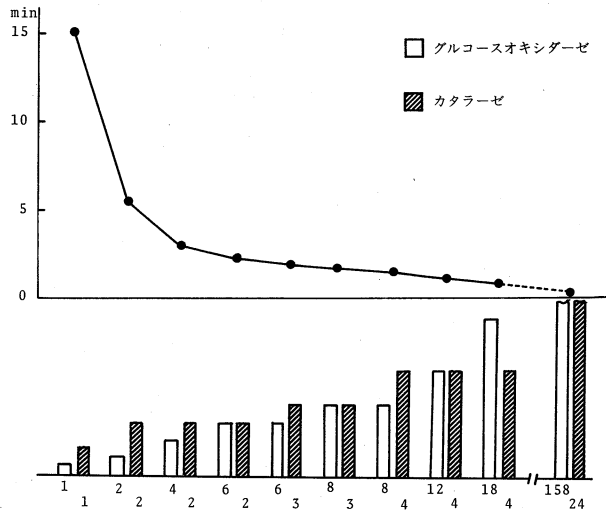


図2 酵素量による血色素の測定時間の変化

des Arg Hb の測定：正常 HbA ($\log P_{50} = 0.80, \text{pH}7.4$) に対し、高酸素親和性を有する des Arg Hb ($\log P_{50} = -0.25, \text{pH}7.4$) をストップフロー法で測定すると50%酸素飽和度までの経過時間は HbA の7.5秒に対して、des Arg Hb は11秒と高酸素親和性を示唆する結果が得られた(図3 a)。また HbA に des Arg Hb を 0, 25, 50, 75, 100% の割合で混合した溶血液の測定結果を図3 b に示したが HbA に比べ、いずれも des Arg Hb の混合割合に比例して測定時間が増加した。

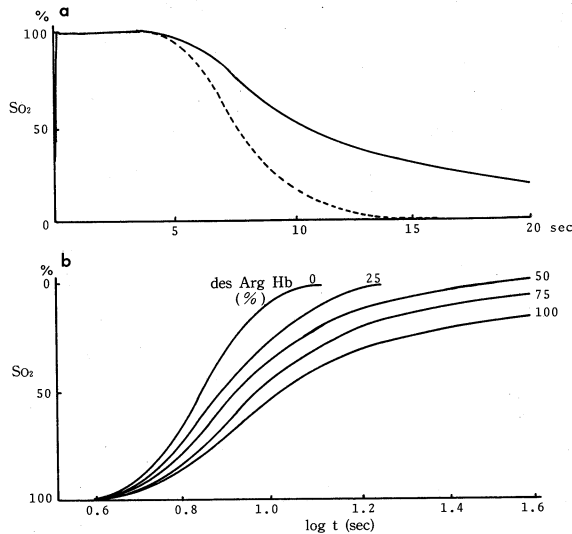


図3 a：正常 HbA と des Arg Hb のストップフロー法による測定曲線
 —：des Arg Hb, - - -：HbA
 b：HbA と des Arg Hb の混合物の測定曲線

溶血液と全血調製液との比較：通常の酸素解離曲線測定法を用いて、全血に等容量の蒸留水、1% NP-40、3% NP-40、および5% NP-40を加え、それぞれの混合溶液を凍結溶解して全血由来の溶血液として測定した。その結果、蒸留水と1% NP-40の例は濁りを生じ測定不可能であったが、3% NP-40および5% NP-40使用例はいずれも通常法により調製したコントロールの溶血液と同じ測定結果を示した(図4)。従って全血を使用する場合、次の様に調製し、これを-70℃で凍結溶解後ストップフロー法試料とした。

全血由来の調製試料液

0.05M ビストリス-0.1M NaCl (pH7.0)	1.0ml
0.2M グルコース	10 μ l
3% NP-40	5.6 μ l
全 血	10 μ l

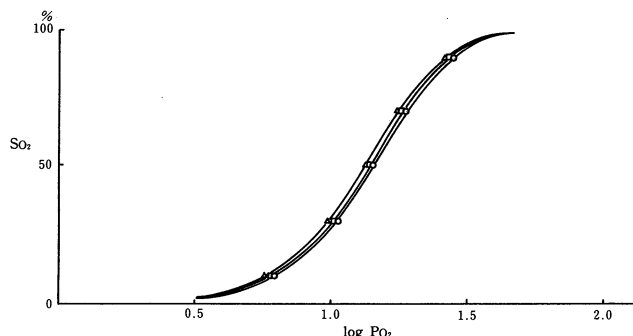


図4 全血調製溶血液の酸素解離曲線
○ 全血+5% NP-40, □ 溶血液, △ 全血+3% NP-40

被検血中の met Hb の本法への影響：15g/dl Hb 濃度の全血に同じ Hb 濃度の met Hb 血球溶液を 0, 5, 10, 20%の割合を混合し、ストップフロー法測定を行なった。いずれの場合もコントロールの全血のみの時とほとんど同じパターンを描き(結果は省略), met Hb 含有率20%までは測定に影響を与えない事を示唆した。

Hb 濃度の測定への影響：5, 10, 15, 20, 25g/dl の Hb 濃度の全血溶液を調製し、これらを調製試料液としてストップフロー法測定を行なった(結果は省略)。いずれも50%酸素飽和度での経過時間に差はなく、Hb 濃度の違いによる影響は認められなかった。

考 察

私共はこれまで還元酵素系(グルコースオキシダーゼ, カタラーゼ)を用いた Hb の酸素親和性の精密測定法⁶⁾およびスクリーニング法への基礎実験として還元酵素系を用いた比色定量法による迅速測定法⁷⁾, 低酸素分圧 (PO₂ = 4.5mm Hg) での Hb の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⁸⁾を公表してきたが、スクリーニング法としては改良すべき点が

いくつか残っており充分満足できる方法ではなかった。そこで今回、ストップフロー法⁴⁾を用いて微量の全血でしかも迅速簡単に測定できる方法の開発をすすめた。最初に試料として溶血液を用いて検討を行なった。通常Hbの酸素解離曲線測定(測定時間15~20分)を45倍以上短縮して20秒以内におさめるためにグルコースオキシダーゼ量を158倍、カタラーゼ量を24倍に増加させる事により目的を達成する事が出来た。しかしながら、20秒という非常に短い時間でHbを還元する事は正常Hbと酸素親和性異常のHbとの間に違いが認められるか疑問であったが、これはdes Arg Hbの50%酸素飽和度までの経過時間 $t = 11$ 秒(コントロールHbA $t = 7.5$ 秒)から充分区別が可能であった。また全血を試料として用いる場合、3% NP-40を全血試料に加えて凍結溶解することにより血球膜やその他の溶性成分が可溶化し、溶血液の場合と同じ測定結果が得られた。この事は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ことを意味している。またmet Hbを添加した実験で測定結果に影響がみられなかった事は採血後長期に保存している血液でも測定が可能であることを示唆するものであった。またHb濃度が5g/dlから25g/dlの5段階の全血溶液を使用した場合も測定結果に差が認められなかった事から貧血例や多血例でも影響をうける事なく測定時間、20秒で測定出来ることを意味した。

結 論

血色素の酸素親和性を還元酵素系を用いてストップフロー法により1検体当たり20秒で測定出来た。さらに試料として全血を直接用いる事により前処理操作の簡略化をはかった。すなわち全血試料に3% NP-40を加えて血球を可溶させ、測定を可能とした。正常Hbの50%酸素飽和度の測定時間は7.5秒、高酸素親和性を有するdes Arg Hbの測定時間は11秒であった。また含有met HbやHb濃度差による影響もうける事なく、スクリーニング法として適用可能である事を示唆した。

References

1. Moo-Penn, W. F., McPhedran, P., Bobrow, S., Johnson, M. H., Jue, D. L. and Olsen, K. W.: Hemoglobin Connecticut ($\beta 21$ (B3) Asp→Gly): A hemoglobin variant with low oxygen affinity. *Amr. J. Hemat.*, 11 : 137-145, 1981.
2. Jensen, M., Oski, F. A., Nathan, D. G. and Bunn, H. F.: Hemoglobin Syracuse ($\alpha 2 \beta 2$ 143 (H21) His→Pro), a new high-affinity variant detected by special electrophoretic methods. *J. Clin. Invest.*, 55 : 469-477, 1975.
3. Huisman, T. H. J.: International Hemoglobin Information Center Variant List. *Hemoglobin*, 14 (3) : 249-325, 1990.
4. Gibson, Q. H. and Antonini, E.: Observations on Rapidly Reacting Hemoglobin. *J. Biol. Chem.*, 242 : 4678-4681, 1967.
5. 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.

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.
7. 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出法確立のための基礎的研究—
Kawasaki Med. J. Liberal Arts & Sci. Course 11 : 55-62, 1985.
8. 日高和夫, 井内岩夫: 酸素親和性異常をもつ異常血色素のマススクリーニングのための基礎的研究
Kawasaki Med. J. Liberal Arts & Sci. Course 14 : 45-50, 1988.