

## 人間ドック入院患者から見つかった異常ヘモグロビン — Hb Senohzaki — の一例

川崎医科大学 生化学<sup>1)</sup>・検査診断学<sup>2)</sup>・公衆衛生学<sup>3)</sup>・内科<sup>4)</sup>

原野 恵子<sup>1)</sup>, 原野 昭雄<sup>1)</sup>

小出 智子<sup>1)</sup>, 上田 智<sup>2)</sup>

岡田 美恵子<sup>2)</sup>, 中島 行正<sup>3)</sup>

林 由子<sup>3)</sup>, 遠藤 昌彦<sup>4)</sup>

柴田 進<sup>4)</sup>

(昭和54年11月1日受付)

### A Case of an Abnormal Hemoglobin Found in the Patient Hospitalized for His Somatoscopy—Hb Senohzaki

Keiko Harano<sup>1)</sup>, Teruo Harano<sup>1)</sup>

Tomoko Koide<sup>1)</sup>, Satoshi Ueda<sup>2)</sup>

Mieko Okada<sup>2)</sup>, Yukimasa Nakashima<sup>3)</sup>

Yoshiko Hayashi<sup>3)</sup>, Masahiko Endoh<sup>4)</sup>

and Susumu Shibata<sup>4)</sup>

Departments of Biochemistry<sup>1)</sup>, Clinical Pathology<sup>2)</sup>,  
Public Health<sup>3)</sup> and Medicine<sup>4)</sup>, Kawasaki Medical  
School, Kurashiki 701-01, Japan

(Accepted on November 1, 1979)

川崎医科大学附属病院の公衆衛生科(人間ドック)に身体検査のため入院していた50歳の男性が等電点分画法によって HbA, HbJ と HbN に相当する位置に移動する3つの明瞭なヘモグロビン帯をもつことが発見された。異常ヘモグロビンの含量はそれぞれ 13.2% および 33.1% であった。

患者から得た溶血液のグロビン鎖分離試験ではただ  $\beta$  鎖異常のみを示した。故に我々はこの異常ヘモグロビンを Hb Senohzaki と呼び、低含量の異常ヘモグロビンを Hb Senohzaki-1, 他方を Hb Senohzaki-2 と命名した。

網赤血中で合成されたヘモグロビンやグロビンの分析結果から, Hb Senohzaki-1 は生体内で何らかの反応(酵素的反応等)によって Hb Senohzaki-2 に変えられ, Hb Providence Asp が生体内で脱アミノ化により Hb Providence Asp に変換するのと同様な現象を示すことが示唆された。

Hb Senohzaki の一次構造解析や酸素親和性の測定が今後大変興味ある。

A 50-year-old man hospitalized for his somatoscopy in the Public Health Department of the Kawasaki Medical School Hospital was discovered to have three distinct isoelectrofocussed hemoglobin bands migrating in the position Hb A, Hb J and Hb N on polyacrylamide gel plate containing ampholine (pH range 6-9). The percentages of these abnormal hemoglobins were 13.2 and 33.1, respectively.

The globin chain separation of the hemolysate from propositus showed only  $\beta$  chain anomaly. Then, we called the abnormal hemoglobin Hb Senohzaki, of which one of minor components was called Hb Senohzaki-1 and another Hb Senohzaki-2.

From the results of the analysis of hemoglobin and globin synthesized in reticulocytes, it is suggested that Hb Senohzaki-1 was transformed to Hb Senohzaki-2 by some reaction (e. g. enzymatic reaction) *in vivo* as if Hb Providence Asp were converted to Hb Providence Asp by deamination *in vivo*.

The primary structural study and the determination of oxygen-equilibrium curve of Hb Senohzaki are very interesting for the future study.

## はじめに

1979年10月、人間ドック入院中の50歳の男性患者の糖尿病検査のため、ヘモグロビン中に含まれる微量成分である HbA<sub>I(a+b+c)</sub> 含量の測定をしていたところ、血清中糖濃度は 128 mg/dl とやや高値を示したとはいえ、HbA<sub>I</sub> 分画が44% (正常範囲: 5~7%) と異常に高い値を示した。このため異常血色素保因者である疑いを高め患者の血液から得た溶血液の等電点分画法によるヘモグロビン分析を行なった。その結果、正常人血液でみられる HbA<sub>1</sub>, HbA<sub>2</sub> のほかに、HbA より陽極側に移動した2本の新しい分画帯を見つけた。これらは HbJ および HbN の位置に相当するものであり、保存血液で観察される aging band によるものではなく、全ヘモグロビン中の約50%含量を占めるものであった。

異常鎖の検索の結果、 $\alpha$  鎖には異常鎖がみられず、 $\beta$  鎖のみに異常のあるヘモグロビンであることがわかった。

この異常ヘモグロビンを患者の居住地に因んで Hb Senohzaki と呼ぶ。

Hb Senohzaki の電気泳動、クロマトグラフィヤヘモグロビン合成およびその分析の結果

から得られた種々の知見について報告する。

## 材料および実験方法

患者からの採血はヘパリン加に行なった。末梢血液検査および化学検査は本学病院中央検査部で行なった。

溶血液の調製は0.9%食塩水で洗い、血球1容に対して蒸留水2容、四塩化炭素0.5容を加え、振盪後、3,000 rpm, 20分間遠心し、その上清を溶血液として用いた。

異常ヘモグロビンのスクリーニングおよびヘモグロビンの等電点分画は ampholine (LKB Produkter AB) を含む polyacrylamide gel plate (pH range: 6-9) を調製し行なった<sup>1), 2)</sup>。

異常ヘモグロビン画分の含量は、等電点分画後、各ヘモグロビン帯を切りとり、0.01% KCN-0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.4) に溶出させ、溶出液を 415 mm で比色定量した<sup>3)</sup>。

セルロースアセテート膜電気泳動法による異常ヘモグロビンの解析には Tris-EDTA-Borate 緩衝液 pH 8.6 と pH 8.1 の2種類のものを用い行なった。

セルロースアセテート膜電気泳動法による異常鎖の検索はつぎのようにして行なった<sup>4)</sup>。100g の尿素を前記 Tris-EDTA-Borate (pH

8.6) 緩衝液に溶解し 300 ml としたものを電極液とし、溶血液 10  $\mu$ l, 8M 尿素溶液 50  $\mu$ l とメルカプトエタノール 10  $\mu$ l を混合し、室温に約1時間放置したものをグロビン溶液とし、冷室(8°C)で90分間電気泳動した。

ヘモグロビンの等電点(pI)の測定は溶血液の等電点分画後、各ヘモグロビン帯(HbA<sub>2</sub>, HbA, 異常Hb)をゲルから切りとり、小試験管に入れ、蒸留水を加えて冷室中に1夜保存したのち、各試験内溶液のpHをpHメーター(Corning, model 125)で測定して求めた。

イソプロパノール沈殿試験<sup>9)</sup>, HbFの定量<sup>6)</sup>, HbA<sub>2</sub>の定量<sup>7)</sup>は常法によって行なった。

HbA<sub>I(a+b+c)</sub>分画の測定はGlycosylated hemoglobin 定量用キット(Helena Laboratory)を用い指示書通りに行なった。

ヘモグロビン合成はLingrel-Borsookのメジウムを用いつぎのように行なった<sup>8)</sup>。生理食塩水で十分洗浄した血球約0.2mlを合成メジウム(ロイシン不含)(1.2ml)に加え、<sup>3</sup>H-ロイシン(0.1ml, 70  $\mu$ Ci: cold-Leu を加え 12.5 nmol/0.1 ml に調製したもの)を加え、37°C. 2時間培養した。その後生理食塩水で十分洗浄し、残留血球の2倍量の0.1%-サポニン溶液を加え、攪拌、溶血させ、ミリポアフィルター(pore size: 1.2  $\mu$ m, ミリポア)で圧縮口過し合成ヘモグロビン溶血液とした。

グロビンの調製はAnson-Mirsky法により冷却下0.1%塩酸-アセトン中で行なった<sup>9)</sup>。

グロビン鎖分離・分析にはCleggらの方法<sup>10)</sup>を改変したマイクロカラムクロマトグラフィー<sup>11)</sup>で行なった。ガラス管(6 mm $\phi$ ×15 cm)にCM-セルロース(CM-52, Whatman Ltd.)を9 cmの高さまでつめたものをカラムとして用いた。グロビン鎖の溶出には8M尿素-リン酸緩衝液(pH 6.8, Na<sup>+</sup> ion gradient 8 mM→35 mM)を用い、溶出液の分析は280 nmの吸光度測定で行なった。

合成ヘモグロビンの分析はAbrahamらの方法<sup>12)</sup>によって行なった。上記ガラス管を用い、充填剤にDEAEセルロース(DE-52, Whatman Ltd.)を、ヘモグロビンの溶出には0.2 M

グリシン-0.01% KCN-NaCl 溶液(pH 7.8, Na<sup>+</sup> ion gradient 10 mM→50 mM)で行なった。ヘモグロビンの溶出分析は415 mmの吸光度を測定することにより行なった。

放射活性値の測定はつぎのようにして行なった。グロビン鎖分析の場合は溶出液そのままを用い、ヘモグロビン分析の場合は、溶出されたヘモグロビンを塩酸-アセトンで処理し<sup>9)</sup>, 遠沈によってグロビンを集め、10%トリトン溶液に溶解したものをDotite Sintisol 500(Wako Pure Chemicals Co.)の入ったバイアルに加え、液体シンチレーションカウンターで測定した。

## 結 果

患者は50歳の男性で、身体検査のため本学病院人間ドックに入院した者であるが、以前から肝臓病を疾い、しばしば市中医師の診察を受けた経験をもつものである。末梢血検査、化学検査の結果からは、血中糖濃度、GOT、GPTがやや高値を示す以外、全ビリルビン値は正常範囲にあり、溶血傾向等はみられない(**Table 1**)。

**Table 1.** The data of hematological and clinical chemical laboratory tests of peripheral blood from the carrier of Hb Senohzaki.

WBC	6.1×10 <sup>3</sup> / $\mu$ l	SP	7.2 g/dl
RBC	5.02×10 <sup>6</sup> / $\mu$ l	BS	128 mg/dl
Hb	16.0 g/dl	A/G	1.04
Ht	43.7 %	Bil (T)	1.0 mg/dl
MCV	88 $\mu$ m <sup>3</sup>	AIP	66 I.U./l
MCH	31.9 pg	Cho	224 mg/dl
MCHC	36.3 %	Alb	4.2 g/dl
Retic	3.7 %	Glb	3.0g/dl
		ChE	369 I.U./dl
		GPT	51 I.U./l
		GOT	27 I.U./l
		BUN	14 mg/dl
		UrA	1.1 mg/dl

患者溶血液中の微量成分であるHbF: 0.3%, HbA<sub>2</sub>: 2.5%と正常範囲にあるのに対し、HbA<sub>I(a+b+c)</sub>: 44%と血中糖濃度からは考えられない値を示した。全溶血液のイソプロパノール沈殿試験は正常範囲を示し、不安定性はみら

れない。

溶血液の等電点分画では正常成人にみられる HbA, HbA<sub>2</sub> の明瞭な分画帯のほかに, HbA よりも陽極側の HbJ と HbN に相当する位置に明瞭な分画帯が観察された。HbJ に相当する分画帯は HbA<sub>1</sub> 分画や aging band に相当する位置であるが, 新鮮な血液から得た溶血液においても同様の結果が得られ 2 種類の異常ヘモグロビンの存在が確認された。

我々は, この 2 種類の異常ヘモグロビンのうち HbJ に相当するものを Hb Senohzaki-1, HbN に相当するものを Hb Senohzaki-2 と呼ぶことにする (Fig. 1)。

異常ヘモグロビンの pI 値はそれぞれ Hb Senohzaki-1: 6.85, Hb Senohzaki-2: 6.80 であった。

等電点分画された異常ヘモグロビンの含量はそれぞれ Hb Senohzaki-1: 13.2%, Hb Senohzaki-2: 33.1% であった。

セルロースアセテート膜電気泳動でのヘモグロビン検査は, pH 8.6 の Tris-EDTA-Borate 緩衝液では 2 種の異常ヘモグロビン帯を観察することはできなかったが, pH 8.1 では明瞭に異常ヘモグロビン帯を

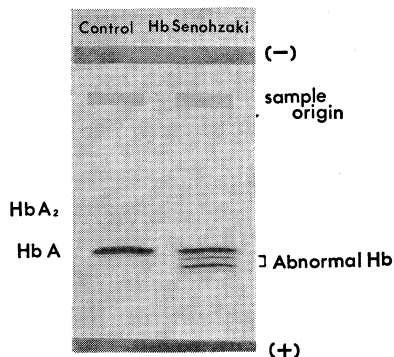


Fig. 1. Isoelectric focusing (pH range 6-9) of hemolysate.  
Right: Hb Senohzaki.  
Left: Normal Control.

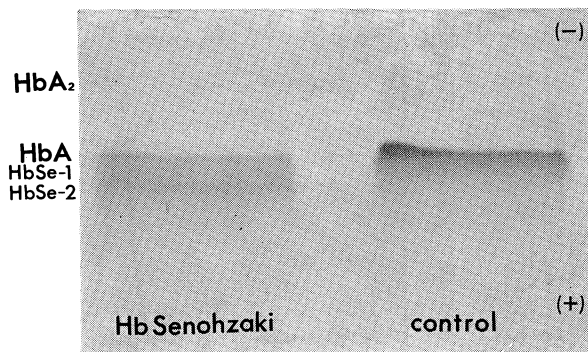


Fig. 2. Cellulose acetate membrane electrophoresis in Tris-EDTA-Borate Buffer (pH 8.1). Right: Normal control. Left: Hb Senohzaki.

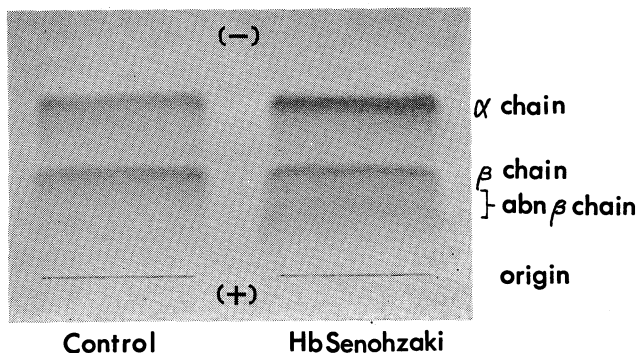
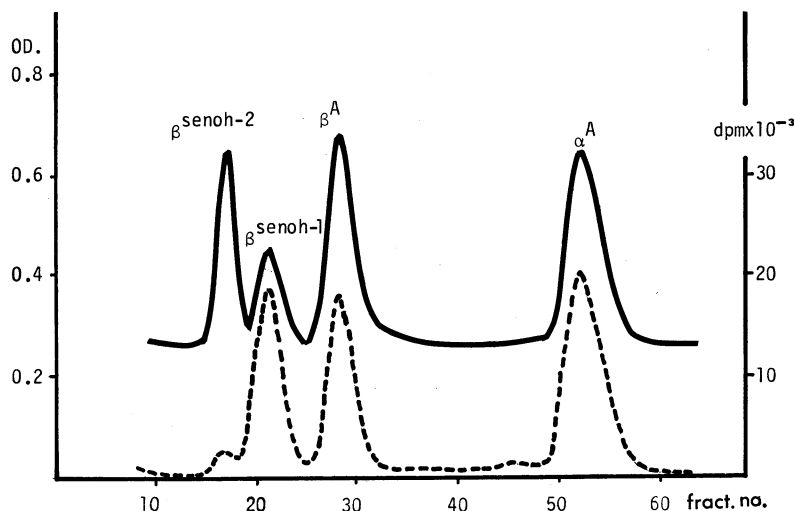


Fig. 3. Electrophoretic globin chain separation on cellulose acetate membrane in urea-Tris-EDTA-Borate buffer.

観察できた (Fig. 2)。

尿素-セルロースアセテート膜電気泳動法によるグロビン鎖分離試験では,  $\alpha$  鎖には全く異常がみられず,  $\beta$  鎖は 3 本に分裂した分離帯を示し, このうち 1 本の分離帯は正常人の  $\beta$  鎖と一致した移動度を示した (Fig. 3)。正常  $\beta$  鎖グロビンを有すとともに, 2 種類の異った異常  $\beta$  鎖グロビンを有する異常ヘモグロビンであることがつぎの実験からも明確になった。

合成されたヘモグロビンの塩酸-アセトン処理によって得たグロビンの尿素-CM セルロースクロマト分析を行なうと, 正常  $\beta$  鎖の前に異常  $\beta$  鎖由来と考えられる 2 本のピークが現われた。このピークの移動は電気泳動の挙動からも予想されるものである。各ピークの同定は, 等電点分画法によって単離された<sup>18)</sup> Hb Senoh



**Fig. 4.** Globin chain separation of Hb Senohzaki on a column of CM-cellulose using 8M urea-phosphate buffer. The milligrams of globin was used. 1.2 ml of eluate was fractionated in every tubes. Solid line: Absorbances at 280 nm against water. Broken line: Radioactivities (dpm).

zaki から得たグロビンの同様なクロマトグラフィーによって **Fig. 4** 中に示すようになった。また、それぞれのピーク（グロビン）に取り込まれた放射活性値（dpm）を測定すると **Table 2** に示すようになった。 $\alpha$ 鎖グロビン部

**Table 2.** Total activities (dpm) of each globin chain from the synthesized Hb Senohzaki.

$\alpha^A$	$\beta^A$	$\beta^{\text{Senoh-1}}$	$\beta^{\text{Senoh-2}}$
80742	57465	59175	6748

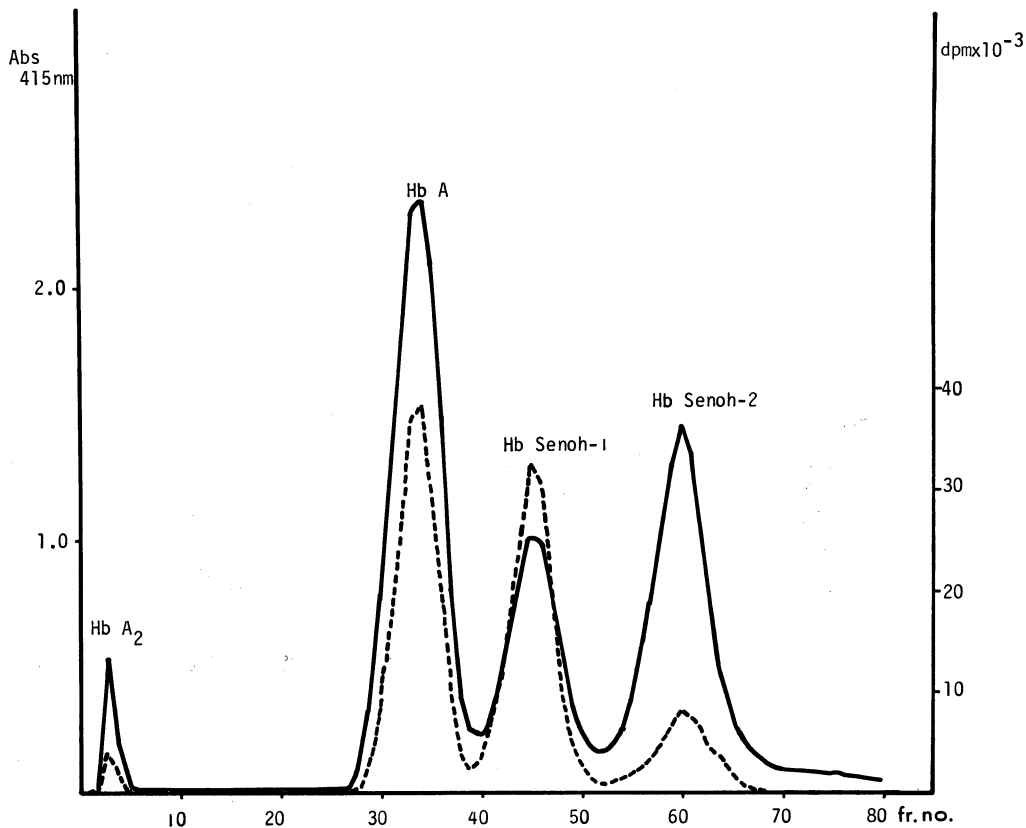
の全 dpm に対し、 $\beta$ 鎖（non  $\alpha$ 鎖）グロビン部の全 dpm の比は約 1.5 で  $\beta$ 鎖（non  $\alpha$ 鎖）へのとりこみが高値を示した。しかし、Hb Senohzaki-1 に由来する  $\beta^{\text{Senohzaki-1}}$  への放射性物質の取り込みは蛋白量の割合には高いものであり、 $\beta^{\text{Senohzaki-2}}$  へはこれと反対の現象がみられる。正常  $\beta$ 鎖（ $\beta^A$ ）と  $\beta^{\text{Senohzaki-1}}$  +  $\beta^{\text{Senohzaki-2}}$  の全 dpm の比はほとんど 1.0 であった。

さらに、合成されたヘモグロビンの DE-52 カラムクロマトグラフィーによるヘモグロビン分析では HbA<sub>2</sub>、HbA のほかに 2 本の強いヘモグロビンのピークが観察された (**Fig. 5**)。

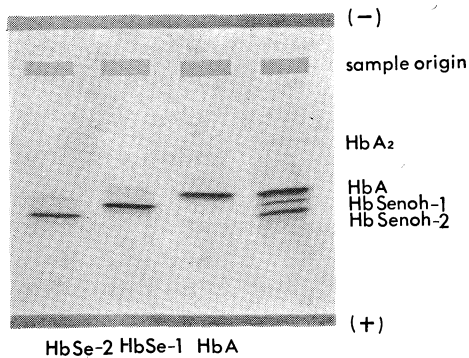
各ピークのヘモグロビンを等電点分画法によって同定するとそれらピークは Hb Senohzaki-1 と Hb Senohzaki-2 と一致した (**Fig. 6**)。このクロマトグラムから算出した各ヘモグロビンの含量 (%) は HbA : Hb Senohzaki-1 : Hb Senohzaki-2 = 44.2 : 21.3 : 31.8 であり、等電点分画-溶出法によって求めた値とは多少異っていた。Hb Senohzaki-1 の値が高いのは HbA<sub>1c</sub> 分画が混入したことが考えられる。また、ヘモグロビンの各分画を塩酸-アセトンで処理後、放射活性値 (dpm) を測定すると **Fig. 5** 中に示すようになり、Hb Senohzaki-2 への放射性物質の取り込みは非常に悪いのに反し、Hb Senohzaki-1 への取り込みは高く、合成ヘモグロビンのグロビン鎖分析と同様の結果が得られた。

#### 考 察

異常ヘモグロビン、Hb Senohzaki は、正常 HbA のほかに 2 種類の異った  $\beta$ 鎖異常を示すヘテロ接合体であり、安定な異常ヘモグロビンである。網赤血球中で新しく合成されたヘモグロビンの DE 52 カラムクロマト分析、グロビンの CM 52 カラムクロマト分析の結果は、低



**Fig. 5.** Elution pattern obtained in chromatographic separation of Hb Senohzaki -1 and -2 from Hb A and Hb A<sub>2</sub> on a column of DEAE-cellulose (DE 52) using Glycine-KCN-NaCl developer. 60  $\mu$ l of hemolysate was used. 1.2 ml of eluate was fractionated in every tubes. Solid line: Absorbances at 415 nm against water. Broken line: Radioactivities (dpm).



**Fig. 6.** Identification of hemoglobins isolated by column chromatography on DEAE-cellulose (DE 52) by means of isoelectric focusing (pH range 6-9).

含量成分である Hb Senohzaki-1 が Hb Senohzaki-2 よりも放射活性物質の高い取り込みを示した。このことから、Hb Senohzaki-2 は血球内酵素作用等により二次的に Hb Senohzaki-1 から産生されたものであろうということを示唆している。

Hb Senohzaki と類似した現象を示す異常ヘモグロビンの報告例に Hb Providence [Hb Providence Asn ( $\beta$  82 Lys $\rightarrow$ Asn) と Hb Providence Asp ( $\beta$  82 Lys $\rightarrow$ Asp)]<sup>14,15)</sup> があり、この場合には、Hb Providence Asn が生体内で脱アミノ化されることにより二次的産物として Hb Providence Asp が生成するといわれている<sup>16)</sup>。

Hb Senohzaki のクロマトグラフィーや電気泳動的挙動は Hb Providence に大変類似している。Hb Senohzaki-1 や Hb Senohzaki-2 の異常アミノ酸配列の決定、Hb Providence のような  $\beta 82 \text{ Lys} \rightarrow \text{Asx}$  への置換は、 $\beta 82 \text{ Lys}$  が血球内有機リン酸化合物、2,3-DPG (2,3-

Diphosphoglycerate), と結合する部位に当り、酸素親和性、2,3-DPG 効果の測定は HbA とは異ったものになるはずである。これらの研究結果には大変興味もたれる。

本研究は昭和54年度川崎医科大学プロジェクト研究 53~103 および 54~110 で行なった。

## 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) Koepke, J. A., Thoma, J. F. and Schmidt, R. M.: Identification of human hemoglobins by use of isoelectric focusing in gel. *Clin. Chem.* 21: 1953—1955, 1975
- 3) Harano, T., Ueda, S., Iuchi, I. and Shibata, S.: A simple method for the determination of hemoglobin A<sub>2</sub> by means of isoelectric focusing on polyacrylamide gel. *Kawasaki med. J.* 4: 139—142, 1978
- 4) Ueda, S., Shibata, S., Miyaji, T. and Ohba, Y.: The third instance of Hb M Saskatoon disease discovered in Japan. *Kawasaki Med. J.* 2: 185—197, 1976
- 5) Carrell, R. W. and Kay, R.: A simple method for detection of unstable haemoglobins. *Brit. J. Haemat.* 23: 615—619, 1972
- 6) Betke, K., Marti, H. R. and Schlicht, I.: Estimation of small percentages of foetal haemoglobin. *Nature* 184: 1877—1878, 1959
- 7) Ueda, S., Shibata, S., Miyaji, T. and Ohba, Y.: Routine Hb A<sub>2</sub> estimation by cellulose acetate membrane electrophoresis. *Kawasaki med. J.* 1: 113—120, 1975
- 8) 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
- 9) Anson, M. L. and Mirsky, A. E.: Protein coagulation and its reversal. The separation of insoluble globin, soluble globin and heme. *J. gen. Physiol.* 13: 469—476, 1930
- 10) Clegg, J. B., Naughton, M. A. and Weatherall, J. D.: An improved method for the characterization of human hemoglobin mutants. Identification of  $\alpha_2\beta_2^{95Glu}$ , Hemoglobin N (Baltimore). *Nature* 207: 945—947, 1965
- 11) 原野昭雄, 小出智子, 上田 智, 柴田 進: ヘモグロビンの合成に関する研究II, ヘモグロビンの CM-セルロースクロマトグラフ分析—マイクロカラムクロマトグラフ分析法の開発. *川崎医誌* 5: 97—101, 1979
- 12) Abraham, E. C., Reese, A., Stallings, M. and Huisman, T. H. J.: Separation of human hemoglobin by DEAE-cellulose chromatography using glycine-KCN-NaCl developer. *Hemoglobin* 1: 27—44, 1976
- 13) 原野昭雄, 原野恵子, 上田 智: 異常ヘモグロビンの分離, 精製への等電点分画法の応用. *川崎医誌* 5: 1—5, 1979
- 14) McCurdy, P. R., Fox, J. and Moo-Penn, W. F.: Apparent duplication of the  $\beta$ -chain gene in man. *Am. J. hum. Genet.* 27: 62 A, 1975
- 15) Moo-Penn, W. F., Jue, D. L., Bechtel, K. C., Johnson, M. H. and Schmidt, R. M.: Hemoglobin Providence. A human hemoglobin variant occurring in two forms in vivo. *J. biol. Chem.*

251 : 7557—7562, 1976

- 16) Bonaventura, J., Bonaventura, C., Sullivan, B., Ferruzzi, G., McCurdy, P. R., Fox, J. and Moo-Penn, W. F.: Hemoglobin Providence, Functional consequences of two alterations of the 2,3-diphosphoglycerate binding site at position  $\beta$ 82. J. biol. Chem. 251 : 7563—7571, 1976