

異常血色素に関する研究 V :  
 DEAE セルロースマイクロカラムクロマトグ  
 ラフィーによるHbA<sub>2</sub>定量法の問題点ならび  
 にその改良法の確立

川崎医科大学 生化学教室

島崎俊一・井内岩夫・日高和夫・柴田 進

(昭和55年9月13日受理)

Studies on the abnormal hemoglobin V:  
 Some problems in the method of Hb A<sub>2</sub> determination  
 by means of DEAE cellulose micro-column chromatography  
 and an establishment of its improved method

**Shunichi SHIMASAKI, Iwao IUCHI, Kazuo HIDAHA, Susumu SHIBATA.**

*Department of Biochemistry, Kawasaki Medical School,  
 Kurashiki 701-01, Japan.*

*(Received on Sept. 13, 1980)*

要 旨

我々は HbA<sub>2</sub> 定量の為の標準法確立を意図する 国際標準化委員会に参加し, Helena 社および Isolab 社から市販の準備がされている HbA<sub>2</sub> 定量カラムクロマトキットの吟味, 検討を行なったが, いずれも満足すべきものでなかった。

そこで我々独自の改良法を確立した。先ず, DEAE-セルロース (DE-52, Whatman) を展開液 I (0.2M グリシン, 0.01% KCN, pH 7.0) で平衡化した後, 市販のパスツールピペット (内径 0.5cm) をカラムの代りにし, 高さ 5cm に充填する。溶血液(Hb: 6~15mg)を添加し, 展開液 I で HbA<sub>2</sub> を溶出させ, 続いて展開液 II (0.2M グリシン, 0.01% KCN, 0.2M NaCl) で残りの Hb を溶出させる。溶出量はいずれも 15ml とし, 比色定量 (415nm) により HbA<sub>2</sub> 含量を算出する。そして本法と両キット法の比較成績を示し, 本法が正確で高い精度を有し (実測値と理論値との喰い違い: 0.1%以下, 再現性: CV=1.47%), 推奨に値する方法であることを知った。

**Abstract**

A method for the determination of Hb A<sub>2</sub> with use of the two Hb A<sub>2</sub> determination column kits which were ready to prepare in commerce by Helena Lab. and Isolab. Inc. was examined as a collaborative study with International Committee for Standardization in Hematology (ICSH). The results of Hb A<sub>2</sub> determination by these column kits were, however, unsatisfactory. In order to improve the defects a new modified method was established by us as follows.

An amount of DEAE-Cellulose (DE-52, Whatman) which was preliminarily equilibrated with Developer I (0.2M Glicine, 0.01% KCN, pH 7.0) was packed into a column (0.5×15 cm) in 5 cm height. After the hemoglobin solution (Hb: 6-15 mg) was applied on the top of the column, Hb A<sub>2</sub> was eluted with Developer I and collected in the first 15 ml eluate. The other hemoglobins are eluted with Developer II (0.2 M Glicine, 0.01% KCN, 0.2 M NaCl) and collected in the same volume as Hb A<sub>2</sub> eluate. Hb A<sub>2</sub> content was then calculated by colorimetry.

After the detailed comparison of our method with those of the kits, it became evident that our method is recommendable for the Hb A<sub>2</sub> determination because of its high accuracy and precision (discrepancy of the Hb A<sub>2</sub> volumes between the theoretical and the observed was below 0.1%, Coefficient of variation was 1.47%).

## 緒 言

β-サラセミア症は、Hb A<sub>2</sub> 含量が正常値に比べ増加することが明らかにされており、Hb A<sub>2</sub> の定量は本症の大切な診断法である<sup>1,2)</sup>。Hb A<sub>2</sub> 定量法は今日まで電気泳動法によるものが主体で、支持体としてセルロースアセテート膜<sup>3)</sup>、ポリアクリルアミドゲル<sup>4)</sup>、でんぷんブロック等が実施されているが、スクリーニングプログラムに編入するには一度に多くの検体を測定できないこと、測定時間がかかり過ぎること、そして、分離した画分の切り取り方が測定者の判断に大きく依存すること等の欠点があった。1974年、Efremov 等<sup>6)</sup>は、DEAE セルロースを用いたマイクロカラム法を発表し、続いて Huisman 等<sup>7)</sup>はさらに改良を加えた。この改良法は、従来の方法に比べより迅速で簡単な方法として高く評価され、キット化されるに至った。一つは Helena 社の「Hb A<sub>2</sub> Quik Column」、他の一つは Isolab 社の「Quik-SEP」の名称として市販の準備がなされた。

我々は、HbA<sub>2</sub> 定量法確立の為の国際標準化委員会に参加し、これ等2社から市販準備中の HbA<sub>2</sub> 定量カラムキットおよび Hb A<sub>2</sub> 溶液の供与をうけ、従来から使用されてきたセルロースアセテート膜電気泳動法とともに検討してきたが、いずれも満足しうる定量値が得られなかった。そこで改めてマイクロカラム法原法を吟味、検討し、いくつかの改良を加え、再現性、正確度ともに満足のゆく定量法を確立することが出来た。ここに我々の確立した方法ならびに、いくつかの吟味成績を報告する。

## 試料と方法

### 〔A〕我々の確立した HbA<sub>2</sub> 定量法

#### (1) 溶血液 (Oxy 型 Hb) の精製

採血液 (Anticlot 入り) は遠心 (3,000 r.p.m., 5min.) により血漿を除去し、血球を 0.9% NaCl 溶液で3回洗浄した後、等量の蒸留水と 0.5 容の四塩化炭素で溶血させた。セルゴーストおよびストローマは遠心 (3,000 r.p.m., 15 min.) し、除去した。得られた溶血液 Hb 濃度は、シアンメトヘモグロビン法<sup>8)</sup>で通常 8~12 g/dl である。

## (2)測定用マイクロカラム

市販パスツールピペット (0.5×15cm, 細管部 5cm) に綿栓を付けカラムとした。

## (3)光電分光光度計

日立ダブルビーム分光光度計100-60型 (有効波長幅 = ±0.5nm) を使用した。

## (4)クロマト用展開液の調製

展開液 I (HbA<sub>2</sub> 溶出用) …… 15g グリシン, 0.01% KCN, pH 7.00 : 15g グリシンおよび 0.1g KCN を約 950ml の水で溶解させ, 2N-HCl で pH 7.00 に合わせた後全量を 1ℓ とする。

展開液 II (その他の Hb 溶出用) …… 15g グリシン, 11.7g NaCl, および 0.1g KCN を水で溶解させ 1ℓ とする。

## (5)陰イオン交換樹脂の調製

50g の DE-52 (湿潤型 微顆粒性 ジエチルアミノ エチルセルロース 陰イオン交換体, Whatman) を 300ml の展開液 I に加え, 回転子を用いて穏やかに攪拌しながら上澄の pH が 7.0 付近になるまで 2N の HCl を添加する。静置後上澄を吸引除去し, 新たに展開液 I を加え, 穏やかに約 10 分攪拌する。この操作を 4 ~ 5 回繰り返すことにより樹脂中の超微粒子が除かれると共に, 樹脂と展開液 I との平衡化が完了する。この後ナスフラスコに移し入れ, 減圧脱気してカラムに充填する。

## (6)操作

i) 市販のパスツールピペットのくびれた部分に綿栓をし, 平衡化した DE-52 を高さ 5cm まで充填する。

ii) 同様のパスツールピペットを用いて溶血液 2 滴と水 6 滴をとり混合し, その全量をカラム上に載せ吸着させる。

iii) 展開液 I を静かにカラムに注ぎ, 次いで展開液 I のタンクとチューブで連結し展開する (落差 20cm)。予め 15ml の検線を目盛った試験管をカラム下に置き, 溶出液を受ける。Hb A<sub>2</sub> の細く鮮明なバンドの主成分は約 2 ~ 3 ml の展開液 I で溶出してしまいが, 肉眼では見えない tailing 成分があるので 15 ml の溶出液が得られるまで続ける。この溶液を F-I とする。

iv) 受器を他の 15 ml の標線入り試験管に置き換え, 展開液 II で展開し, 標線量まで同様に溶出させる。主成分は Hb A であり, この溶液を F-II とする。

v) F-I および F-II を水で正確に 15ml とし, ついで F-II のみ水で 10 倍希釈し dF-II とする。

vi) 2 つの溶液 (F-I, dF-II) の吸光度を波長 415 nm で測定し, 次式を用いて Hb A<sub>2</sub> の含量 (%) を算出する。

$$\text{Hb A}_2(\%) = \frac{\text{O.D.}(F-I) \times 100}{\text{O.D.}(F-I) + 10 \times \text{O.D.}(dF-II)}$$

## 〔B〕標準化委員会より供与された試料及び器具

(1)標準 Hb A<sub>2</sub> 血液

この標準 Hb A<sub>2</sub> 液は CO 型 Hb として供与された。本液はサラセミア患者から得た溶血液を DEAE-Sephadex A-50 カラムクロマトグラフィーにより、一旦 Hb A<sub>2</sub> と Hb A とに分離し、改めて Hb A<sub>2</sub> 含量の異なった 3 種 (Hb A<sub>2</sub>=1.7, 3.3, 4.8%) のヘモグロビン溶液として調整されている。

## (2)定量用カラムと方法

## i) Helena キット

内径 0.5cm 高さ 14.5cm のカラムに 0.2M のグリシン緩衝液 (0.01% KCN 入り) で平衡化した DEAE セルロースが高さ 4cm に充填してある。展開液は Hb A<sub>2</sub> 溶出用に 0.2M のグリシン緩衝液 (0.01% KCN 入り)、残りの Hb 溶出用に 0.2M グリシン, 0.2M NaCl, 0.01% KCN を含む緩衝液を使用する。Hb A<sub>2</sub> 溶出量は 1ml, 残りの Hb 溶出量は 1.5ml であり, 415nm のそれぞれのフラクションの吸光度から Hb A<sub>2</sub> 含量を算出するようになっている。

## ii) Isolab キット

内径 0.7cm 高さ 8.5cm のカラムにグリシン緩衝液 (0.01% KCN, NaN<sub>3</sub> 入り) で平衡化した DEAE-セルロースが高さ 4cm に充填してある。展開液は Hb A<sub>2</sub> 溶出用, 残りの Hb 溶出用のいずれも 0.01% KCN を含むグリシン緩衝液に NaCl, NaN<sub>3</sub> が添加されているものを使用しているが処方は明らかにされていない。Hb A<sub>2</sub> 溶出量は 8ml, 残りの Hb 溶出量は 4ml で, 415nm の吸光度から Hb A<sub>2</sub> 含量を算出する。

## 〔C〕セルロースアセテート膜電気泳動法

Tris-EDTA-Borate 緩衝液 pH 8.0 を用い泳動後, 同緩衝液で抽出し, 415nm に於ける吸光度を測定し, Hb A<sub>2</sub> 含量を算出した。

## 結 果

表 1 は正常人 7 検体を用いた各々の方法で Hb A<sub>2</sub> 含量を測定した値である。我々の方法ならびにセルロースアセテート膜電気泳動法はよく一致した値を与え, Helena 法および Isolab 法はやや低値を示した。

## 〔1〕Helena キットについて

Helena キットで Hb の溶出を 1ml ごとに分画し, Hb A<sub>2</sub> 及び残りの Hb の溶出の有様をみると図 1 の様になった。使用説明書によると Hb A<sub>2</sub> 溶出用の溶出液は 1ml, 残りの Hb 溶出には 1.5ml となっているが図 1 の様に両 Hb 分画に tailing がみられ, Hb A<sub>2</sub> の約 80%, また残りの Hb の溶出には 2ml 使用しても約 90% しか溶出していないことがわかった。この為, Hb A<sub>2</sub> 定量値は我々の方法に比べ, 約 10~20% 低い値となっていた。また充填されている樹脂の高さ (4cm) に比べ, カラムの長さ (14.5cm) が長すぎて, 試料を添加

表1 正常人7検体における Hb A<sub>2</sub> 定量値。

検体 No.	Helena 法	Isolab 法	電気泳動法	改良型カラム法
1	2.5%	2.5%	3.0%	3.1%
2	2.4	2.3	2.9	3.0
3	2.4	2.3	2.9	3.0
4	2.8	2.7	3.3	3.4
5	2.6	2.4	2.8	2.9
6	2.3	2.3	2.8	2.8
7	3.2	2.9	3.5	3.5
平均	2.6	2.5	3.0	3.1

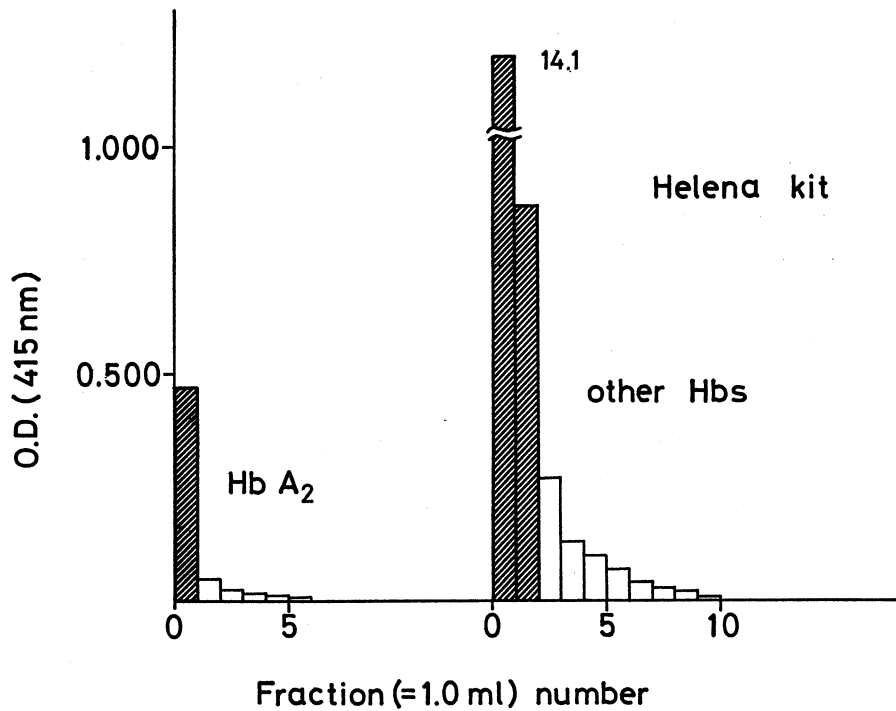


図1 Helena キットによるカラムクロマトグラム。斜線部は指定された溶出量を示す。

するのが不便であり、しかも同じロット番号の21本のカラムのうち3本に満足のいく Hb A<sub>2</sub> 分離がみられず Hb A が混入していた。

#### 〔2〕 Isolab キットについて

Hb A<sub>2</sub> および残りの Hb の溶出パターンは図2の如くであった。Hb A<sub>2</sub> 溶出液量は 8 ml, 残りの Hb 溶出液量は 4 ml と指定されているが、図2の様な tailing がみられた、この場合、残りの Hb は 4 ml の溶出液で殆んど(約97%) が溶出されたが、Hb A<sub>2</sub> は 8 ml

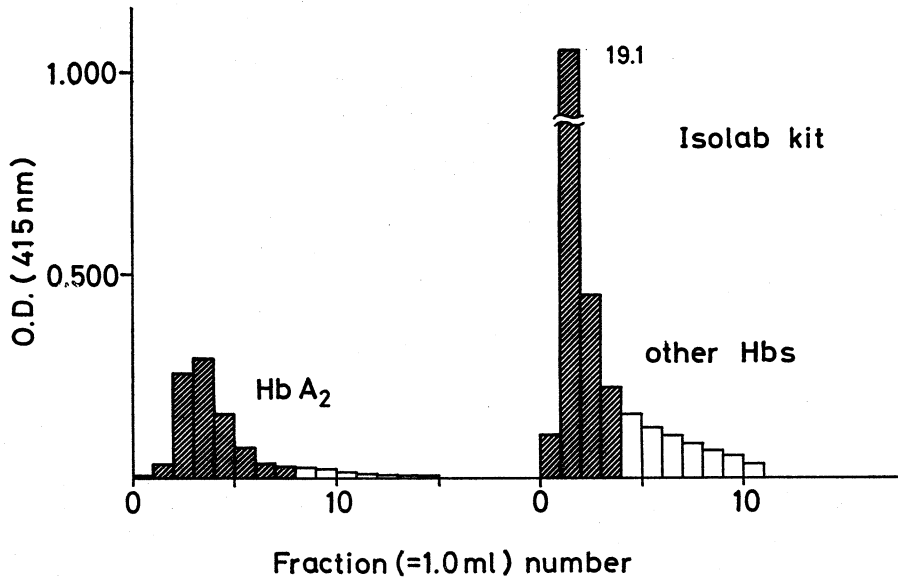


図2 Isolab キットによるカラムクロマトグラム。斜線部は指定された溶出量を示す。

の溶出量で約90%しか溶出されていない。この為、我々の改良法に比べ約10~20%低い値を示したものと思われる。図2からも明らかな如く、Hb A<sub>2</sub> 溶出バンドは幅広い溶出帯をなしていた。

また展開液は使用説明書に従い 30°C 以下で保存したが、有効期限の2ヶ月前にもかかわらず、わずかに黄色味を帯びていた。そこで、この展開液の 415nm における吸光度を測定したところ、納入時0.000であったのが変色時には0.011に増加していた。また展開液の pH も 7.6から7.2に低下していることがわかった。

### 〔3〕セルロースアセテート膜電気泳動法について

Hb A<sub>2</sub> の分離および定量値ともに優れた成績が得られた。

### 〔4〕我々の改良型マイクロカラム法について

DE-52 の平衡化における適正 pH 値については、平衡化に用いる展開液 I の pH を 6.70~7.20の範囲内で Oxy 型 Hb の同一試料を用いて測定したところ、6.95~7.05では Hb A<sub>2</sub> は鮮明で濃い細いバンドとして現われ、同じ定量値を示した。しかし、pH 6.95 以下ではまだ Hb A<sub>2</sub> が溶出しているのに残りの Hb 群がカラムの下部まで降下し、Hb A<sub>2</sub> に重なった。一方、pH 7.05 以上になると Hb A<sub>2</sub> バンドが非常に幅広くなり tailing が大きくなる。この結果 Hb A<sub>2</sub> 溶出展開液および DE-52 の平衡化の pH は 7.00±0.05が最適と判断された。

各画分の適正溶出量については図3に示す様に Hb A<sub>2</sub> および残りの Hb 共に溶出量を 15ml にすることにより99%以上の回収ができた。

またカラムへの Hb 添加量変化による影響をみると、Hb の絶対量が 6~15 mg の範

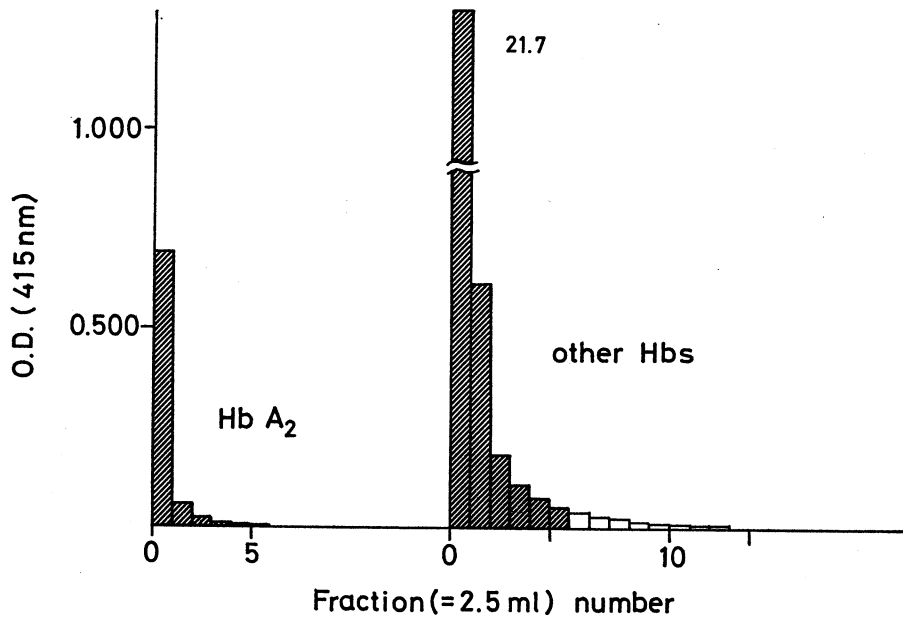


図3 改良型マイクロカラム法によるカラムクロマトグラム。斜線部は15mlの溶出量を示す。

管内ならば同一検体で同一の定量値を示した。6 mg 以下の場合、A<sub>2</sub> 溶出液の吸光度が低すぎて正確度を欠き、また 15mg 以上になると Hb A<sub>2</sub> はそれ以外の Hb を伴って溶出して来た。市販のパスツールピペット 2 滴分の溶血液は Hb 量が丁度 6～15 mg の範囲内で、最適添加量の安全範囲内であることがわかった。

Hb 型の影響は、Oxy 型 Hb および CNmet 型 Hb ではクロマトに於て同じ展開挙動を示し、定量値に差を与えなかった。CO 型 Hb の場合は、カラム展開中および溶出後希釈された溶液中で Oxy 型への変化がみられ、クロマトの分離には影響はないが、比色時に若干の誤差を伴う恐れがあった。事実、この変化のため、吸光度測定中にも吸光度が安定せず、少しずつ低下した。

本法によって単離した Hb A<sub>2</sub> および残りの Hb の溶出画分を濃縮して Hb A<sub>2</sub> 含量の異なる液を調整し、それを用いて Hb A<sub>2</sub> 定量し正確度をみた結果を図 4 に示した。理論値と実測値との喰い違いは 0.1% 以下で、相関係数(r)は 0.999 となり、各種 Hb A<sub>2</sub> 濃度で完全に一致する値が得られた。また同一検体を用いて 10 回測定し、その再現性をみると、SD=0.047, CV=1.47% を得、定量法に十分な精度を有することがわかった。本法による Hb A<sub>2</sub> 正常値は、122 例の測定で  $3.2 \pm 0.25\%$  であった。

#### 〔5〕標準試料に CO 型 Hb を用いた時の問題点

委員会より供与を受けた CO 型 Hb A<sub>2</sub> 標準液を用いた定量結果は表 2 に示す如く、Helena および Isolab キットに於て、いずれの Hb A<sub>2</sub> 濃度溶液でも低値を示し、また測定波長 (419nm : CO 型 Hb, 415nm : Oxy 型 Hb) の違いによっても喰い違いがみられた。

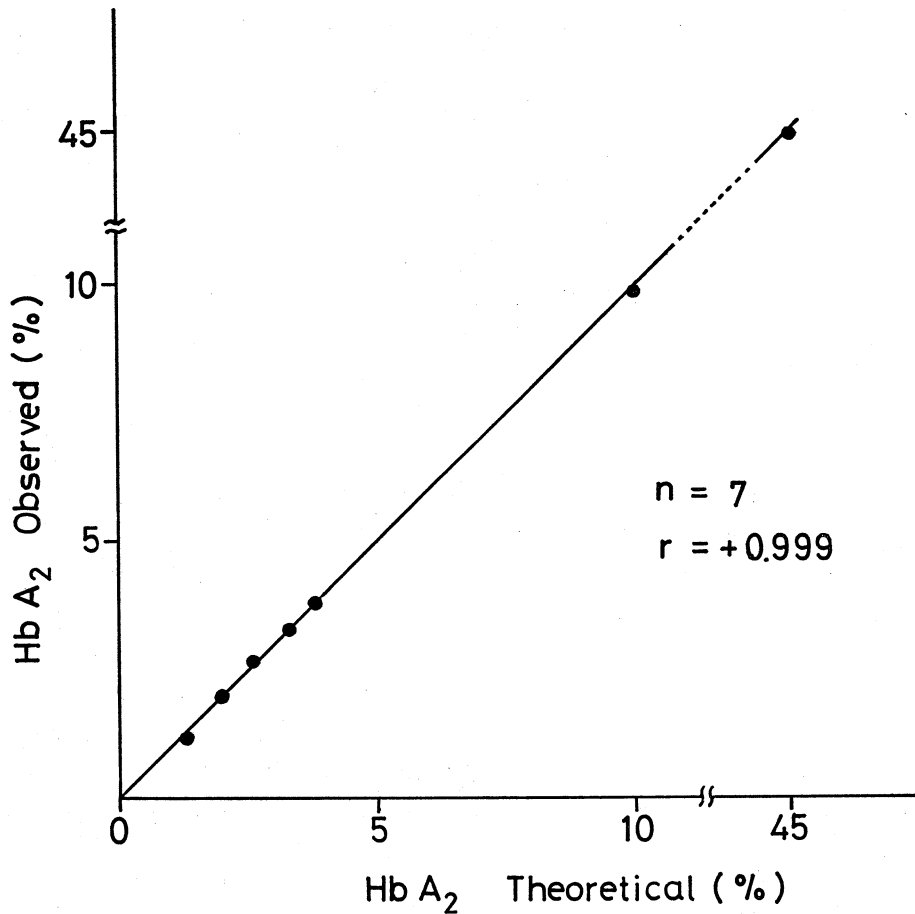


図4 改良型マイクロカラム法での理論値と実測値との相関。

表2 Hb A<sub>2</sub> 標準試料における Hb A<sub>2</sub> 定量値。  
 ( ) 内は波長 415nm での比色定量値。

標準試料 A <sub>2</sub> (%)	Helena 法	Isolab 法	電気 泳動法	改良型 カラム法
1.7%	1.3 (1.6)	1.0 (1.1)	1.6 (1.6)	1.7 (1.8)
3.3%	2.9 (3.2)	2.4 (2.6)	3.3 (3.3)	3.4 (3.5)
4.8%	3.9 (4.4)	3.7 (4.0)	4.7 (4.7)	4.8 (4.9)

この原因はカラムクロマト中に溶液の CO 分圧が低下する為、測定波長で吸光度を大いに異にする CO 型 Hb ( $\epsilon_{415}^{Hb} = 194$ ) から Oxy 型 Hb ( $\epsilon_{415}^{Hb} = 131$ ) にゆっくり変化し、しかも Hb A<sub>2</sub> と Hb A では Hb A<sub>2</sub> の方が低濃度であるため、より迅速に変化してゆくことに



あった。

同じカラムクロマト法でも我々の方法が真値を得るのは、前2法に比べ、溶出液量が多い為 CO 型 Hb→Oxy 型 Hb 変化がクロマト展開中に充分進行した為であった。他方、CO 型 Hb はセルロースアセテート膜電気泳動中に、いずれの Hb 成分も完全に Oxy 型 Hb に変化していた。従って、Hb A<sub>2</sub> の定量値は比色時の測定波長に左右されないことがわかった。

### 考 察

DE-52 を用いた我々のマイクロカラム法は操作が簡単で、正確な Hb A<sub>2</sub> 定量値を与えた。従来の同種の報告に比べ、本法の一番大きな改良点は Hb A<sub>2</sub> 展開における展開液の溶出量である。Helena キットおよび Isolab キットでの Hb A<sub>2</sub> 溶出パターン(図1&2)を見ても明らかな如く、指定量では溶出は不完全であり、その為、定量値も完全に回収した我々の改良法での値に比べ約10~20%低い結果となっている。

我々は展開に多少時間を要する(2時間)が、溶出液量を 15ml に変更し Hb A<sub>2</sub> および残りの Hb とともにほぼ完全に溶出できる様にした。この様に Hb A<sub>2</sub> の溶出液量を 15ml にした為、使用する Hb 量も多くする必要があったが、これは市販のパスツールピペット 2 滴分で充分であった。

次いで DE-52 を用いたマイクロカラムクロマト法で最も注意すべき点は、樹脂の平衡化の pH であった。これは Huisman 等の原法<sup>7)</sup>にも詳細に記されている様に、わずかの pH 範囲にその有効性が限定されていた。その為、pH メーターの電極の応答感度、コンディション等によるわずかの変動にも注意を払う必要があった。また Hb A<sub>2</sub> 定量の為の CO 型 Hb 標準液は、Hb A<sub>2</sub> 分離に支障はないが、比色時に問題があり、定量値に誤差を伴うことが判明した。

### References

- 1) Rowley, P.T., Am. J. Hematol., 1 : 129-137, 1976.
- 2) Weatherall, D.J. and Clegg, J.B., *The thalassemia syndromes*, 311-313, (Blackwell Oxford) 1972.
- 3) Marengo-Rowe, A.J., J. Clin. Path. 18 : 790-792, 1965.
- 4) Willard, R.F., Lovell, W.J. and Dreiling, B.J., Clin. Chem. 19 : 1082-1084, 1973.
- 5) Kunkel, H.G. and Wallenius, G., Science, 122 : 288-288, 1955.
- 6) Efremov, C.D., Huisman, T.H.J., Bowman, K., Wrihstone, R. N. and Schroeder, W.A., J. Lab. Clin. Med., 83 : 657-664, 1974.
- 7) Huisman, T.H.J., Schroeder, W.A., Brodie, A.N., Nayson, S.M. and Jakway, J., J. Lab. Clin. Med., 86 : 700-702, 1975.
- 8) van Kampen, E.J. and Zijlstra, W.G., Clin. Chim. Acta, 6 : 538-545, 1961.