

高速液体クロマトグラフィーによる異常ヘモグロビンの 分離・同定の試み

川崎医療短期大学 臨床検査科 川崎医科大学 生化学教室*

土井和子 *原野恵子 *原野昭雄 上田 智

(昭和62年8月21日受理)

Isolation and Identification of Abnormal Hemoglobins by High Performance Liquid Chromatography.

Kazuko DOI, Keiko HARANO*, Teruo HARANO*, and Satoshi UEDA.

Department of Medical Technology, Kawasaki College of Allied Health Professions

**Department of Biochemistry, Kawasaki Medical School*

Kurashiki 701-01, Japan

(Received on Aug. 21, 1987)

Key words: 異常ヘモグロビン, グリコヘモグロビン, 高速液体クロマトグラフィー

概 要

全自動グリコヘモグロビン分析計 (HLC-723GHb) の溶離液の切り替え時間, データ処理法を一部変更し, Fast-moving Abn Hb, Slow-moving Abn Hb の分離・同定を試みた。その動態は置換したアミノ酸の等電点差のみによらず, 他の因子に起因することが推察された。

はじめに

グリコヘモグロビン (HbA_{1c} または HbA₁) は糖尿病の血糖値コントロールの指標として注目されている。最近ではその測定に高速液体クロマトグラフィー (HPLC) を応用した全自動グリコヘモグロビン分析計 (HLC-723GHb) が開発され, HbA_{1a}, HbA_{1b}, HbA_{1c}, HbF, HbA₀ の各成分を短時間 (8分) で定量分析が出来るようになった。しかしながら, 全自動分析計での分析の際, 正常分画では見られない異常ピークや, 異常値をもった分析結果を得ることがある。この異常は異常ヘモグロビン (Abn Hb) の存在による可能性が高く, 異常ピークが HbA_{1c} に隣接する場合の HbA_{1c} 値は血糖値コントロールの指標として判断を誤る危険性がある。今回本測定機 (HLC-723GHb) とすでに構造決定された Abn Hb を用いて, 溶離液の切り替え時間, 内

蔵するコンピュータ処理操作等を改変して Abn Hb の分離・同定を試みた。

材料および方法

1. 測定機: HLC-723GHb (東洋曹達社製) を使用した。
2. 溶離液: 3種類の安定剤を含むリン酸ナトリウム緩衝溶液 (HLC-723GHb 専用試薬, 日本ケミファ製) を用いた。緩衝液の実測した pH と Na⁺イオン濃度は次に示す通りであった。
第1溶離液 pH5.8, Na: 105~110mEq/ℓ
第2溶離液 pH5.8, Na: 140~150mEq/ℓ
第3溶離液 pH5.8, Na: 295~310mEq/ℓ
3. 溶血試薬: 安定剤を含む Triton-X100 溶液 (HLC-723GHb 専用試薬, 日本ケミファ製)
4. 血液試料: Abn Hb は川崎医科大学生化学教室ですでに一次構造の決定されている凍結保存血液試料を用い, 正常血液は健康な男女 (18~36

表・1 HLC-723GHbのパラメータ

(a)					(b)				
*** HEMOGLOBIN PARAMETER LIST ***					*** HEMOGLOBIN PARAMETER LIST ***				
PROGRAM NO. 1					PROGRAM NO. 2				
(PARAMETER)					(PARAMETER)				
1 START	0		(100 MS)		1 START	0		(100 MS)	
2 STPTM	4500		(100 MS)		2 STPTM	10000		(100 MS)	
3 OFTIM	260		(100 MS)		3 OFTIM	7000		(100 MS)	
4 SPPCH	3		(100 MS)		4 SPPCH	2000		(100 MS)	
5 SSENS	20.00		(UU/MIN)		5 SSENS	20.00		(UU/MIN)	
6 SINT	5		(COUNT)		6 SINT	20.00		(COUNT)	
7 SENS	20.00		(UU/MIN)		7 SENS	20.00		(UU/MIN)	
8 SINT	5		(COUNT)		8 SINT	20.00		(COUNT)	
9 SLOPE	40.00		(UU/MIN)		9 SLOPE	40.00		(UU/MIN)	
10 ATNAR	2.00		(MU*SEC)		10 ATNAR	2.00		(MU*SEC)	
11 TOTN	5		(RECORDS)		11 TOTN	5		(RECORDS)	
12 TBDN	4		(RECORDS)		12 TBDN	4		(RECORDS)	
(IDT)					(IDT)				
IDTNO 1,RT	3,TR	3,NAME	4,CF	5,K	IDTNO 1,RT	3,TR	3,NAME	4,CF	5,K
1 3.00	0.00	010	1.00	1.00	1 3.00	0.00	010	1.00	1.00
2 2.00	1.00	010	1.00	1.00	2 2.00	1.00	010	1.00	1.00
3 4.00	0.00	010	1.00	1.00	3 4.00	0.00	010	1.00	1.00
4 4.00	0.00	010	1.00	1.00	4 4.00	0.00	010	1.00	1.00
5 4.00	1.00	010	1.00	1.00	5 4.00	1.00	010	1.00	1.00
6 4.00	1.00	010	1.00	1.00	6 4.00	1.00	010	1.00	1.00
7 4.00	1.00	010	1.00	1.00	7 4.00	1.00	010	1.00	1.00
8 4.00	0.00	010	1.00	1.00	8 4.00	0.00	010	1.00	1.00
9 4.00	0.00	010	1.00	1.00	9 4.00	0.00	010	1.00	1.00
(TED)					(TED)				
TEDNO 1,TIME	2,CODE	3,DATA			TEDNO 1,TIME	2,CODE	3,DATA		
1 0.50		5.00			1 0.50		5.00		
2 1.00		10000.00			2 1.00		10000.00		
3 4.00		5000.00			3 4.00		5000.00		
4 2.00		7.00			4 2.00		7.00		
5 4.00		0.00			5 4.00		0.00		
6 4.00		0.00			6 4.00		0.00		
7 4.00		0.00			7 4.00		0.00		
8 4.00		0.00			8 4.00		0.00		
9 4.00		0.00			9 4.00		0.00		

歳)20名から採血し使用した。

5. 測定方法

a. 溶血液の調整：付属のダイリュータを使用し、血液 $5\mu\text{l}$ を溶血試薬1mlで希釈した。

b. HLC-723GHbを30分間予備稼働後、上記溶血液を測定室にセットした。

c. 標準操作：第1, 2, 3溶離液の切り替え時間を試料注入後順次1.8, 3.6, 5.5分で行い、Hb成分の分画・分析をする。全分析過程は 23°C で8分を要する。データ処理はPROGRAM No.1を選択し、表1(a)のように設定した。

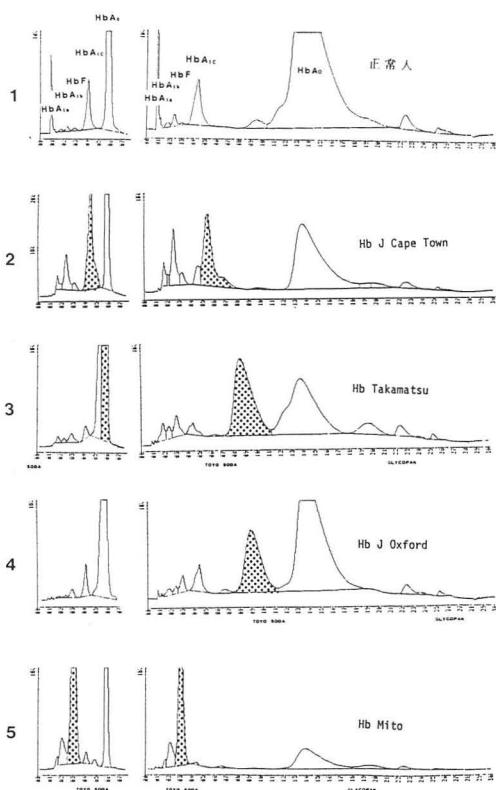
d. 改変法操作：Abn HbがHbA₀より短時間で溶出される場合とHbA₀より長時間を要する場合に大別し、溶離液の切り替え時間、データ処理のPROGRAMを変更した。Abn HbがHbA₀より短時間で溶出される場合は第1, 2, 3溶離液の切り替え時間を試料注入後順次20, 23, 26分とし、全分析過程は30分とした。データ処理はPROGRAM No.2を使用し、次に示すPARAMETERを変更した(表1(b))。スタート、ストップタイムを変更するため(PARAMETER)の2 STPTMおよび3 OFTIMを、HbA₀のクロマト位置がずれるためIDTNO 5のRTを、クロマト時間が長くなりピーク処理、スロープ処理を変更するためTBDNO 4

のCODEおよびDATAをそれぞれ表に示すように変更した。Abn HbがHbA₀より溶出に長時間を要する場合は溶離液の切り替え時間を7, 24, 27分とし、全分析過程は30分とした。データ処理はPROGRAM No.2を使用し前者と同じPARAMETERの変更を行い、かつHbA₀のクロマト位置の変動のためIDTNO 5のRTを10.5に変えた。

結 果

正常人血液の標準分析法では図1, 1(a)に示すようなクロマトグラムが得られる。各ヘモグロビン成分はHbA_{1a}, HbA_{1b}, HbF, HbA_{1c}, HbA₀の順に溶出され、クロマト図と同時に各分画%およびretention time(RT)をプリントアウトする。Abn Hbを含む場合は図1, 2(a)~5(a)に示すように正常成分では見られない分画の出現や、RTのずれが生じ、正常人とは異なった溶出パターンがみられた。

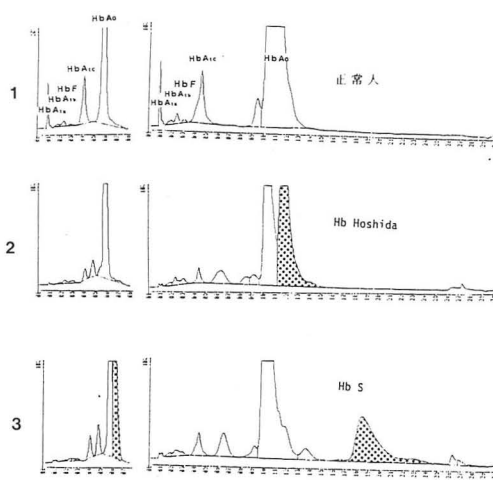
Abn Hbは電気泳動で正常HbA₀より早く(陽極側)泳動されるFast-moving Abn Hbと正常HbA₀より遅く(陰極側)泳動されるSlow-moving Abn Hbに大別され、それらのHb間でHPLCの溶出パターンが異なった(図1, 2)。



(a) 標準法 (b) 改変法

図・1 正常人とAbn. Hb症の分析例(Fast moving).

1. 正常人の血液から得た溶血液の分析.
- 2 ~ 5. Abn. Hb 保因者からの溶血液の分析
(Abn. Hb 分画はスクリーントーンで示されている).



(a) 標準法 (b) 改変法

図・2 正常人とAbn. Hb症の分析例(Slow moving).

1. 正常人の血液から得た溶血液の分析.
- 2 ~ 5. Abn. Hb 保因者からの溶血液の分析
(Abn. Hb 分画はスクリーントーンで示されている).

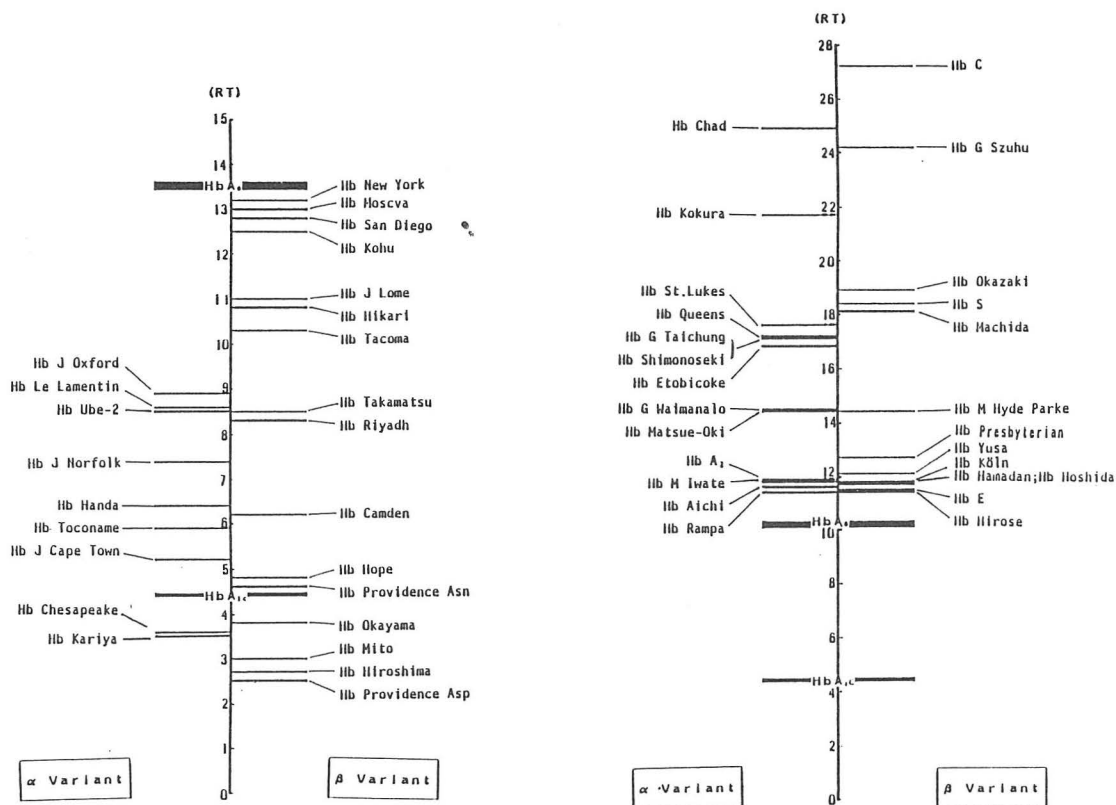
Abn Hb の性質によって 2 群に分けて分析を試みた。

(i) Fast-moving Abn Hb の分析(HbA₀より早く溶出される場合)

標準分析法では HbA₀より短い RT をもつ成分(HbA_{1a}, HbA_{1b}, HbF, HbA_{1c})は 1~2 溶離液で溶出しているが、この領域で溶出される各成分の分離能を高めるために低 Na⁺イオン濃度の溶離液(第 1 溶離液)の溶出時間を延長した(改変法操作の項参照)。

正常人の分析結果を図 1, 1 (b) に示す。

HbA_{1c}~HbA₀間の溶出時間が長くなり分離もよくなるようである。図1, 2~5 (b)に Fast-moving Abn Hb を含む血液について分析した結果を示す。HbA_{1c}ピークと重なっていた Hb J Cape Town は明瞭な異常ピークとして分離された(図1, 2(b))。Hb Takamatsu や Hb J Oxford では HbA₀と分離されていなかったピークが改変法では Abn Hb のピークとしてはっきりと分離された(図1, 3(b), 4(b))。図1, 5(a), (b)は 2 荷差あるアミノ酸置換を起こした Hb Mito [144(HC1)Lys → Glu] の例であり、HbA_{1b}と HbF の位置に重なって現れている。



(a) Abn. Hbs 分析 (Fast-moving Type)

(b) Abn. Hbs 分析 (Slow-moving Type)

図・3, HPLCによるAbn. Hb分析

Fast-moving Abn Hb の血液試料 (α 鎖 9 例, β 鎖 16 例) を改変法で測定し, RT (min) の順に並べたのが図 3 である。種々の Abn Hb を HbA_{1c} 領域から HbA₀ 付近の間に分離することが出来た。この改変法を未知 Abn Hb に応用すればその構造を推定することが可能のように思われる。

(ii) Slow-moving Abn Hb の分析 (HbA₀ より遅く溶出される場合)

Slow-moving Abn Hb の標準分析法では HbA₀ の RT が正常人のそれより長く, また HbA₀ 以降に異常ピークが観察される。Fast-moving Abn Hb と異なり HbA₀ 以後の成分に異常成分が含まれる。HbA₀ 以後を分離するため 1, 2, 3 溶離液の切り替え時間およびデータ処理は前に記したように行った (改変法操作

の項参照)。図 2 に Slow-moving Abn Hb の分析例を示す。HbA₀ より遅く Abn Hb が溶出される。

本法による Slow-moving Abn Hb (α 鎖 13 例, β 鎖 13 例) の分析結果をまとめて図 3 に示す。分析した試料の中で溶出時間の最も遅い Hb C は第 2 溶離液では溶出されず第 3 溶離液で溶出された。Hb Chad, Hb G Szuhu は第 2 溶離液で完全に溶出されず第 3 溶離液に約 30% 分割されて溶出た。第 2 溶離液で完全にするには溶離液の切り替え時間を 7, 27, 30 に設定し, 1 試料の分析に 33 分必要とした。HbA₂ は A₂ サラセミア症の血液を等電点電気泳動法¹⁾ で分画後 HbA₂ を取り出し, 溶出後濃縮した試料を分析した。Fast moving の場合と同じく本改変法を未知試料に応用すればその構造を推定すること

表・2, HPLC と等電点電気泳動法による異常ヘモグロビンの含量比較

Fast moving type				Slow moving type			
	Hb name	HPLC%	泳動%		Hb name	HPLC%	泳動%
α鎖異常Hb	Hb J Oxford	22.1	23.2	α鎖異常Hb	Hb Chad	19.2	23.9
	Hb Le Lamentin	25.7	28.6		Hb Kokura	9.5	10.4
	Hb Ube-2	18.6	20.9		Hb St. Lukes	11.4	13.8
	Hb Norfolk	18.8	28.4		Hb Queens	11.1	16.8
	Hb Handa	13.5	18.0		Hb Shimomoseki	13.7	20.6
	Hb Tokoname	24.1	24.0		Hb G Taichung	12.2	16.0
	Hb J Cape Town	13.5	21.9		Hb Etobicoke	14.6	13.1
	Hb Chesapeake	29.5	20.7		Hb G Waimanalo	17.1	17.8
β鎖異常Hb	Hb Kariya	10.9	13.1	β鎖異常Hb	Hb Matsue-Oki	20.3	25.3
	Hb J Lome	40.2	48.0		Hb M Iwate	21.0	18.9
	Hb Hikari	35.8	42.7		Hb Aichi	37.4	24.9
	Hb Takamatsu	38.3	47.0		Hb Rampa	25.8	13.4
	Hb Riyadh	44.1	43.8		Hb C	46.8	52.1
	Hb Camden	45.2	54.2		Hb G Szuhu	27.7	43.2
	Hb Hope	44.4	43.0		Hb Okazaki	37.7	40.2
	Hb ProvidenceAsn	16.0	13.2		Hb S	21.3	27.2
	Hb Okayama	45.5	40.0		Hb Machida	34.2	42.4
	Hb Mi to	45.3	42.2		Hb M Hyde Park	7.6	-
β鎖異常Hb	Hb Hiroshima	47.6	42.3	β鎖異常Hb	Hb Presbyterian	35.7	30.8
	Hb ProvidenceAsp	31.5	33.1		Hb Yusa	36.5	35.2
					Hb koln	15.5	7.4
					Hb Hoshida	49.2	44.5
				Hb Hamadan	51.6	43.9	
				Hb E	78.4	71.1	
				Hb Hirose	45.2	42.5	

が可能であろう。

3. HbA_{1c}含量%について

標準分析法でHbA_{1c}含量(%)を分析した。正常人(健康な男女20人(18~36歳))のHbA_{1c}は平均5.3%(5.8~4.8, SD=0.25), Fast-moving type Abn Hbを含む血液は8.9%, Slow-moving Abn Hbを含む血液の場合3.3%であった。Fast-moving Abn HbでHbA_{1c}前後に異常ピークのRTを持つもの(Hb J Cape Town, Hb Chesapeake, Hb Hope, Hb Providence, Hb Okayama)を除くとHbA_{1c}(%)は3.8となりFast-moving Abn Hb, Slow-moving Abn Hbを含む血液はいずれも正常人よりも低い値を示し, グリコシル化Abn Hbは正常なHbA_{1c}とは分離して溶出されていることを示した。

4. Abn. Hb含量(%)について

本測定法で測定したAbn Hb含量(%)と等電点電気泳動法により測定した含量(%)を表2に示す。双方での結果はよく一致していた。

5. Abn Hbの置換アミノ酸による等電点差とHPLCとの関係について

Abn Hbの置換したアミノ酸の等電点差(ΔpI)と今回使用したHLC-723GHbで得たAbn HbのRTの間にはFast-moving Abn Hb, α chain variantで $\gamma=0.898$, β chain variantで $\gamma=0.462$ であった。またSlow-moving Abn Hbは α chain variantおよび β chain variantではそれぞれ $\gamma=0.453$, $\gamma=0.371$ となり, 強い相関関係は見られなかったが, さらに分子構造との関係について詳細に検討する必要がある。

考察および結論

HLC-723GHbはグリコヘモグロビン(HbA_{1c}, HbA₁)を定量分析する専用機であるがAbn Hbを含む血液では正常パターンに見

られない分画が出現する。多くの場合 HbA_{1c} (%)への Fast-moving Abn Hb の干渉による HbA_{1c} の異常高値がみられたり、Slow-moving Abn Hb のグリコシル化 Abn Hb の HbA_{1c} との分裂 peak による HbA_{1c} の低値が観察され、Abn Hb の存在を予知することが出来る。HLC-723GHb による Abn Hb の分離・同定はここで示した改変法により可能であるが、置換したアミノ酸の等電点差と HPLC による溶出した異常ピークの示す RT は強い相関関係はみられず、その動態は等電点差のみによるものでなく、他の因子(Hbの形状、アミノ酸の置換位置等)が影響していると思われる。異常ピークの出現する可能性は異常ヘモグロビンのみでなく薬剤等²⁾によることもあるが、異常ヘモグロビンの発見のきっかけは HPLC による HbA_{1c} スクリーニング検査によることも多い。^{3),4)} Abn Hb 検索は等電点電気泳動、CM-52カラムクロマトグラフィーによる α , β 鎖分離、⁵⁾ Tripsin 消化処理後フィンガープリントからの異常ペプチドの検索とアミノ酸分析など一連の術式をマスターした技術者が必要である。ここに示したように日常の HPLC による HbA_{1c} 検査のクロマトグラムを注意深くチェックし、精査することにより Abn Hb の構造を推定することが可能で

あろう。特に不安定 Abn Hb や機能異常を持つ Abn Hb の推定が出来れば臨床的にもさらに有益なものとなることであろう。

謝 辞

本稿を終えるにあたり HLC-723GHb の使用にご助力下さいました東洋曹達工業株式会社・科学計測事業部、固屋義己氏に深謝いたします。

本論文の要旨は第33回日本臨床病理学会総会(三重)で発表した。

文 献

- 1) 原野昭雄, 他: 等電点分画法による異常血色素の mass screening 法. 臨床病理, 28, 149-152, 1980
- 2) グリコヘモグロビンと糖尿病: 東洋曹達工業株式会社, 東京, 1985
- 3) 田中良枝, 他: グリコヘモグロビン測定時に発見された異常ヘモグロビン・Hb Takamatsu—ヘモグロビン A_{1c} への干渉—. 臨床病理, 35, 297-302, 1987
- 4) 阿部房江, 他: 高速液体クロマトグラフィーで発見された異常ヘモグロビン症の一家系. 臨床病理, 35, 797-803, 1987
- 5) Clegg JB, et al: Separation of the α and β -chains of human haemoglobin. Nature, 219, 69-70, 1968