

# フローサイトメトリーによる不安定ヘモグロビン (Hb Köln) のスクリーニング検査法

佐藤晶子、櫻井秀子

筑波大学人間総合科学等支援室 (医学支援室)

〒305-8575 茨城県つくば市天王台 1-1-1

## 概要

ヘモグロビン (Hemoglobin ; Hb) Köln 症の異常赤血球の測定を、フローサイトメトリー (flow cytometry ; FCM) による緑黄色蛍光検出で試みた。新鮮赤血球、溶血後の赤血球膜分画、アセチルフェニルヒドラジンによる Heinz 小体生成試験後の赤血球の3試料を用いて健常人と比較し検討した。

Hb Köln 症の新鮮赤血球では、FCM 測定において健常人では認められない高い蛍光を認め、蛍光顕微鏡による観察では、赤血球封入体の Heinz 小体が特に強い蛍光を発していた。また、Heinz 小体は、溶血後の赤血球膜分画にも検出できた。アセチルフェニルヒドラジンによる Heinz 小体生成試験後の FCM による測定では、より高い蛍光の異常赤血球の割合が増加していた。

これらのことにより、Hb Köln 赤血球は、Hb 変性に伴い高い蛍光を有し、特に Heinz 小体を有する赤血球はより高い蛍光の異常赤血球に相当すると示唆された。

この FCM 測定は、Hb Köln 症等による赤血球内の脱ヘムに起因した Hb 変性の状態をとらえる事が可能であると考えられ、赤血球の蛍光量および高蛍光活性の Heinz 小体封入体の検索は、不安定性 Hb 症のスクリーニング検査の1つになり得ると思われた。また、不安定性 Hb 症の病態を知る検査として有用と推察された。

## 1. はじめに

ヒト赤血球の Hb は、一対の  $\alpha$  鎖と一対の非  $\alpha$  鎖の4量体からなり、それぞれに酸素結合に重要なヘムとグロビン鎖が結合するヘムポケットの構造を伴っている。各ヘムは、4つのピロール環の中央に1つの鉄原子が結合している構造を持ち、このヘムポケットの構造は酸素結合能だけでなく Hb の立体構造の安定性にも重要な役割を果たしている<sup>[1]</sup>。

赤血球に含まれる Hb には、Hb A、Hb A<sub>2</sub>、Hb F 等があり、健常成人 Hb の主な Hb A (約 96%) は  $\alpha_2\beta_2$  からなる。Hb Köln 症は、この  $\beta$  鎖 98 番目のアミノ酸がバリンからメチオニンに置換した不安定 Hb 症の一つである。このグロビン鎖のアミノ酸の配列異常により、酸素親和性の増加や Hb の不安定性によるサブユニット解離の促進およびヘム喪失傾向などを生じる特徴がある。そのため赤血球中では Hb の変性が起こり不溶性となり析出、沈殿、集合し Heinz 小体が形成される<sup>[2]</sup>。そのため Heinz 小体を

有する赤血球の検索は、不安定性 Hb 症の診断にとって重要な意味を持つ。

一般に異常 Hb は、等電点電気泳動や高速液体クロマトグラフィーの Hb 分画の異常から発見されることが多いが、近年はグリコヘモグロビン分析の時に HbA<sub>1c</sub> 測定値の異常やパターンの変化から検出されることが少なくない。また、不安定 Hb 測定のスクリーニング検査として、イソプロパノール試験や熱変性試験などが有用とされ<sup>[2]</sup>、グロビン鎖のアミノ酸分析や遺伝子解析を行って不安定 Hb 症が確定診断される。

今回の Hb Köln 赤血球は、ヘム喪失に起因して分解産物である fluorescent yellow pigment (FYP) が赤血球に蓄積することが報告されている。FYP は緑色蛍光を示し、ジピロールに一致した波長を示すと言われている<sup>[3]</sup>。この Hb Köln の異常な蛍光赤血球を FCM による方法で検出できるかどうか試み、健常人赤血球とこの Hb Köln 赤血球の蛍光量を比較し、FCM による測定法が不安定性 Hb (Hb Köln) 症の病態検索のスクリーニング検査の1つになり得るかどうか検討した。

## 2. 測定方法

### 2.1 測定検体 および測定機器

EDTA 採血の健常人および Hb Köln 症 (脾摘出術施行) の末梢血液を用いた。

FCM の測定は FACSsort (Becton Dickinson) を用い、赤血球の蛍光はアルゴンレーザー (488nm) , FL1 検出器 (530±15nm) で測定し、CELLQuest で解析した。

また、蛍光顕微鏡の観察は、BX61 蛍光顕微鏡 (Olympus) で行い U-MNIBA2 フィルター (EX480 ±10 nm , EM530±20nm) を用いて 400 倍で観察し、CoolSNAP カメラで取り込み Meta View で解析をした。

### 2.2 新鮮赤血球の FCM による測定

末梢血液 10  $\mu$ l に PBS 4ml を加え混和し、1000 rpm、5 分間遠心し、赤血球を PBS に再浮遊した。

FCM の測定は、血小板を内部陰性コントロールとして赤血球の蛍光量を比較した。また未染色赤血球浮遊標本を作製し蛍光顕微鏡による観察を行った。

## 2.3 溶血後の赤血球膜分画測定

末梢血液に PBS を加え混和し遠心する。この洗浄操作を 3 回する。洗浄血球の 3 倍量の蒸留水を加えて 5 分間激しく混和し、16000rpm、30 分間遠心する。上清は溶血液として利用し、沈査に蒸留水と PBS を加え 1 回ずつ遠心洗浄する。これに PBS を加えて再浮遊させ赤血球膜分画とした。これを FCM による測定と蛍光顕微鏡による観察を行った。

## 2.4 アセチルフェニルヒドラジンによる Heinz 小体生成試験後の赤血球測定

末梢血液 100  $\mu$ l にアセチルフェニルヒドラジン溶液 (0.1%アセチルフェニルヒドラジン、0.2%グルコース、0.066M リン酸緩衝液 PH7.6) 2ml を加え、数回吸い上げて空気にさらし、37°C で反応させた。途中 2 時間目で数回吸い上げて空気にさらし、4 時間反応させ<sup>[4]</sup>、反応後の検体を FCM による測定と蛍光顕微鏡による観察をした。

## 3. 測定結果

### 3.1 新鮮赤血球の FCS による測定

健常人および Hb Köln 症の新鮮赤血球を FCM で測定し、血小板を内部陰性コントロールとして比較し

た。Hb Köln 症の血小板の平均蛍光値は 1.7 で、健常人血小板の平均蛍光値 1.7 と同じ値であったが、Hb Köln 症の赤血球平均蛍光値は 114.9 であり、健常人赤血球の平均蛍光値 2.8 に比べ高値であった。また、Hb Köln 赤血球の蛍光量は、分布範囲が広いパターンであった (図 1)。

蛍光顕微鏡の観察では、Hb Köln 症において特に類円形状の Heinz 小体に一致して強い緑色蛍光を発する赤血球が観察されたが (図 2)、健常人赤血球では蛍光は認められず、蛍光を発する封入体も認められなかった。

### 3.2 溶血後の赤血球膜分画測定

健常人に比べて Hb Köln 症では、多量の赤血球膜分画の沈殿を認め、健常人分画は赤色を呈しているのに対し白色を呈していた。

健常人の FCM による測定では、前方散乱光 (forward scatter ; FSC) と側方散乱光 (side scatter ; SSC) の解析で、赤血球より小さなサイズの赤血球膜分画が認められたが、その蛍光は認められなかった。Hb Köln 症では、FSC と SSC の解析において健常人赤血球膜分画と同じ様なサイズとそれよりもやや大きいサイズの分布が認められた。健常人赤血球膜分画と同じ様なサイズの解析では、高蛍光は認められなかったが、それよりもやや大きいサイズの範囲 (R1) では、高い蛍光を示した (図 3)。

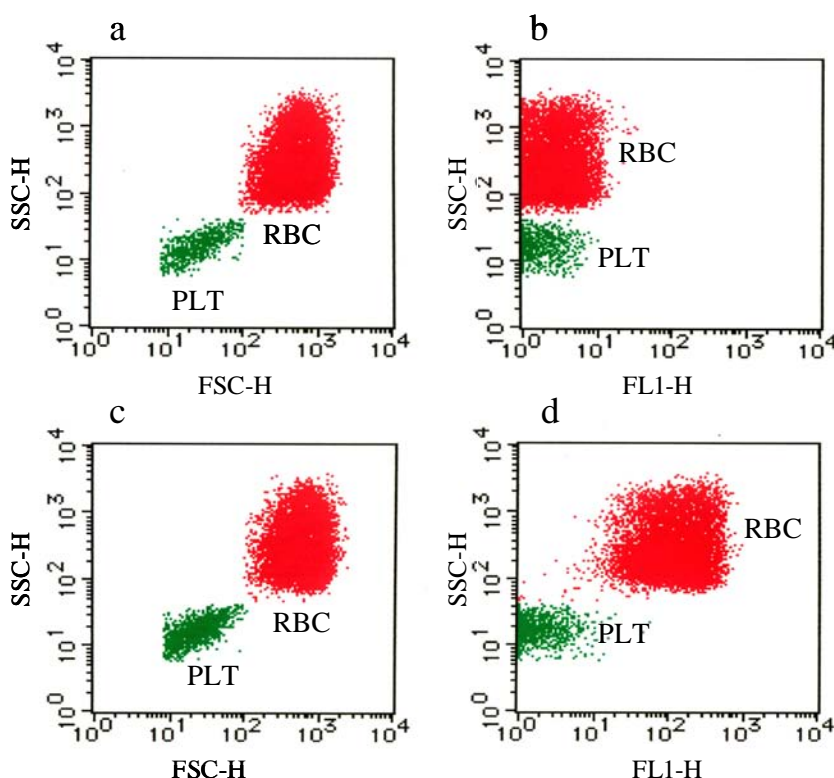


図 1. 健常人および Hb Köln 症の PBS 浮遊未染色血球のフローサイトメトリーによる解析図。

健常人 (a,b), Hb Köln 症 (c,d). 健常人赤血球は、血小板と同様に蛍光は認められないが、Hb Köln 赤血球は FL1 検出 (530 $\pm$ 15nm) で自然蛍光を認めた。

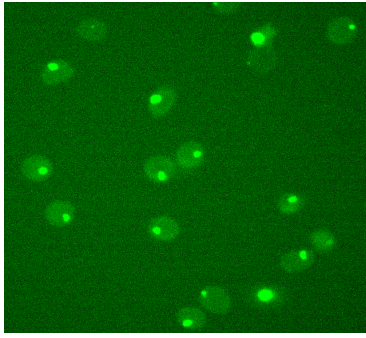


図2. 蛍光顕微鏡による Hb Köln 症の PBS 浮遊未染色赤血球.

赤血球内封入体の Heinz 小体に一致してより高い緑色蛍光が観察された。

また、蛍光顕微鏡の観察では、健常人では蛍光は認められなかったが、Hb Köln 症では赤血球の膜に付着した高い蛍光を発する Heinz 小体が多数観察された。

### 3.3 アセチルフェニルヒドラジンによる Heinz 小体生成試験後の赤血球測定

FCM による新鮮赤血球とアセチルフェニルヒドラジンによる Heinz 小体生成試験後の赤血球の蛍光を比較した (図4)。健常人のアセチルフェニルヒドラジン反応による赤血球の平均蛍光量は 1.8 から 28.8 と新鮮赤血球よりもやや高い蛍光を示した。Hb Köln 症では、87.4 から 137.1 へと赤血球の蛍光活性がさらに増加した。

健常人の新鮮赤血球の蛍光範囲を R1、アセチルフェニルヒドラジン反応後の健常人の蛍光範囲を R2、それ以上の蛍光量を R3 として解析を行った (図4)。Hb Köln 症の新鮮赤血球では、R1=1%、R2=48%、R3=51% となり、健常人のアセチルフェニルヒドラジン反応後と同等の蛍光を放つ赤血球およびそれ以上の蛍光量の赤血球が増加していた。アセチルフェニ

ルヒドラジン反応後の Hb Köln 赤血球では、R1=0.1%、R2=31%、R3=69% となり、低い蛍光を放つ赤血球 (R2) の割合は減少し、高い蛍光活性の赤血球 (R3) の割合が多くなった。

蛍光顕微鏡の観察では、反応後の健常人赤血球は標本全体にやや弱い蛍光が認められる程度で、肉眼的観察では新鮮赤血球との蛍光量の差との鑑別は困難であった。一方、反応後の Hb Köln 赤血球では、赤血球全体に弱く蛍光を帯びているのが観察され、Heinz 小体は高蛍光活性を示して観察された。

## 4. 考察

FCM による測定は、多数の血球を短時間に計測でき、比較的簡単に蛍光値を比較検討できる利点がある。赤血球内の Hb の変性状態をとらえることは、不安定性 Hb 症の病態を知るうえで重要である。

Hb 変性の最終生成体の Heinz 小体は、脾臓でとられ処理されるために末梢血中にはあまり認められないことが多いが、今回は、脾臓の摘出術を行っている為 Heinz 小体有する赤血球が末梢血液中に数多く流れていた。従来の超生体染色による Heinz 小体の測定は、今回は Heinz 小体を有する赤血球が数多く認められるため鑑別が容易にもかかわらず、Heinz 小体の他に網赤血球、Howell-Jolly 小体、Pappenheimer 小体なども染色されるために識別が困難であった (データ示さず)。

しかし FCM による測定は、比較的簡単に赤血球の測定が可能であり、Hb Köln 赤血球では、健常人では認められない高い蛍光が検出され、赤血球膜分画では Heinz 小体が高い蛍光活性に測定されることが確認された。アセチルフェニルヒドラジンによる Heinz 小体生成試験後の FCM による測定では、より高い蛍光の異常赤血球の割合が増加し、また平均蛍光量が高値に推移した。これらにより FCM による測定は、アセチルフェニルヒドラジンによる Hb 変性に伴い、赤血球内の分解産物が蓄積された状態をとらえていると推察することができた。この FCM による緑黄色蛍光を測定することは、不安定性 Hb 症の病態を知

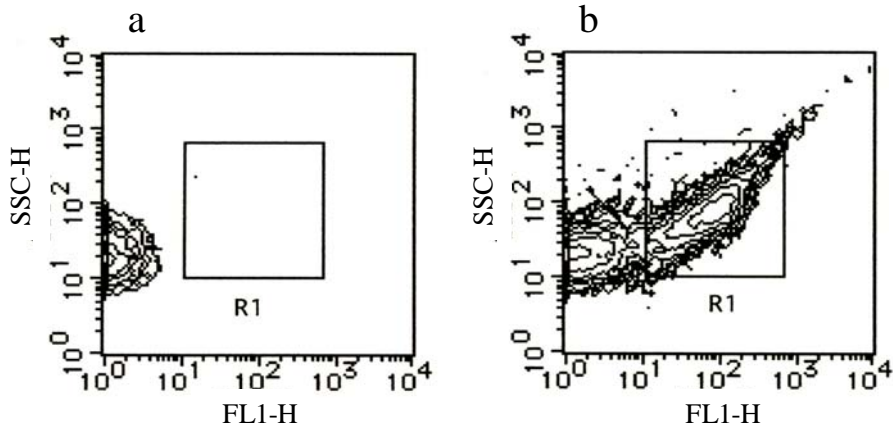


図3. 健常人および Hb Köln 症における溶血後の赤血球膜分画のフローサイトメトリーによる解析図.

健常人 (a), Hb Köln 症 (b). 健常人では R1 ゲートに蛍光は認められないが、Hb Köln 症では R1 ゲートに蛍光を発する Heinz 小体が認められる。

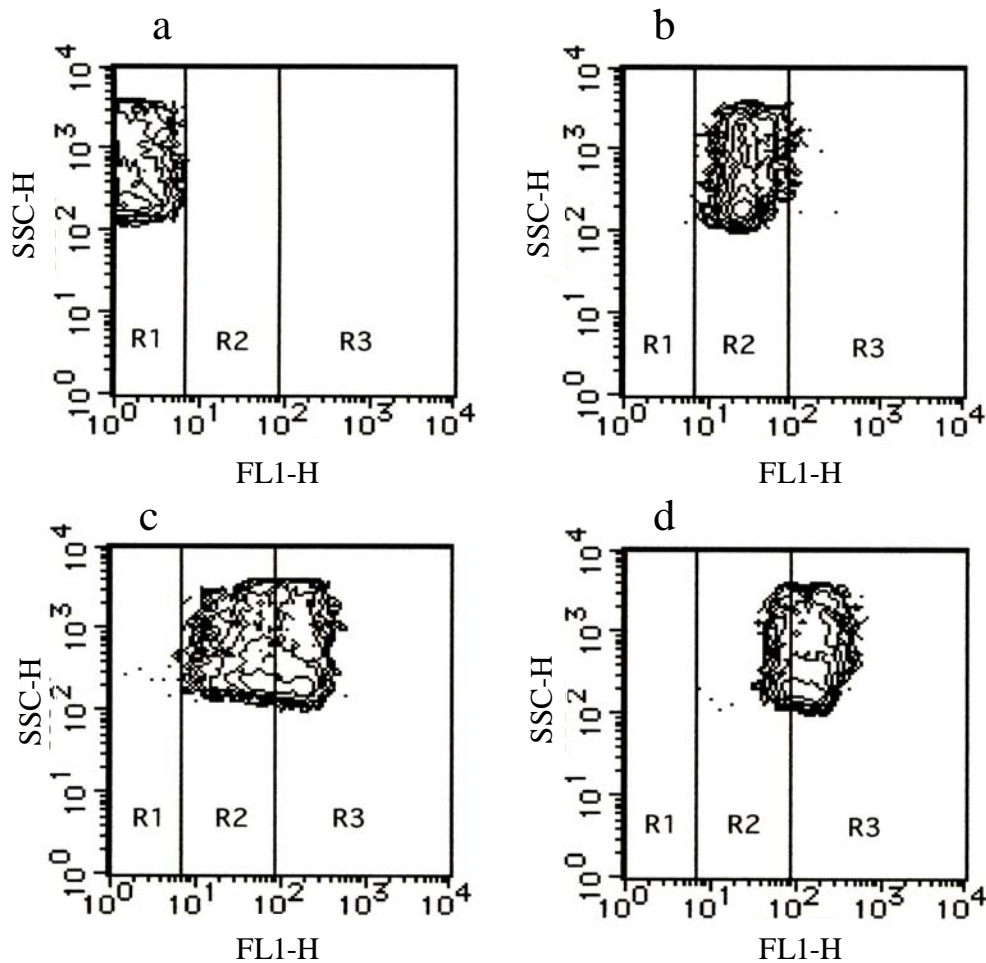


図4. 新鮮赤血球とアセチルフェニルヒドラジンによる Heinz 小体生成試験後の健常人および Hb Köln 赤血球におけるフローサイトメトリー測定による比較.

健常人新鮮赤血球 (a) の蛍光範囲を R1 とし、アセチルフェニルヒドラジン反応後の健常人赤血球 (b) の蛍光範囲を R2 とし、それ以上の蛍光範囲を R3 する.

新鮮な Hb Köln 赤血球 (c) では、R2~R3 の蛍光赤血球が認められ、アセチルフェニルヒドラジン反応後の Hb Köln 赤血球 (d) では、より蛍光活性の高い R3 の赤血球が増加した.

るうえで有用な測定方法の 1 つに成り得ると思われた。

## 5. 結語

Hb Köln 症の異常赤血球の測定を、FCM による緑黄色蛍光検出で試みた。健常人よりも高い蛍光を有する血球として、Hb Köln 赤血球を検出することができた。また Heinz 小体を有する赤血球は、より高い蛍光の異常赤血球として測定された。

この FCM による測定は、赤血球内の脱ヘムに起因した Hb 変性の病態をとらえる事が可能であると考えられ、赤血球の蛍光量および高蛍光活性の Heinz 小体封入体の検索は、不安定性 Hb 症のスクリーニング検査の 1 つになり得ると思われた。また、特異性に関しては今後他の症例と比較し検討していきたい。

## 参考文献

- [1] 大庭雄三. A.貧血:先天性溶血性貧血 2) 不安定ヘモグロビン症, 血液病学第2版, 三輪史朗編, 分光堂, 東京 (1995) 704-712.
- [2] 宮地隆興. 不安定血色素, 蛋白質 核酸 酵素. 32 (1987) 629-634.
- [3] Eisinger J, et al. Fluorescent cytoplasm and Heinz bodies of haemoglobin Köln erythrocytes : Evidence for intracellular heme catabolism, Blood. 65 (1985) 886-893.
- [4] 宮地隆興. 異常ヘモグロビン b 細胞学的検査, 臨床検査技術全書 3 血液検査, 三輪史朗編, 医学書院, 東京 (1982) 243-244.