

# 赤血球内変性ヘモグロビンの定量分析の試み： アセチルフェニルヒドラジン処理ヒト赤血球による検討

佐藤晶子

筑波大学人間総合科学等支援室（医学系）

〒305-8575 茨城県つくば市天王台 1-1-1

## 概要

Heinz 小体は、赤血球内で変性ヘモグロビンが沈殿して形成され、ニューメチレン青等の超生体染色により染色される。この Heinz 小体の存在は、ヘモグロビンの変性が赤血球内で生じたことを示す指標となるが、変性ヘモグロビンの量を推定することは困難であった。

今回、アセチル・フェニルヒドラジンの酸化作用により生じた赤血球内変性ヘモグロビンの、フローサイトメトリー (FACSort, BD Biosciences) による自然蛍光検出 (Ex 488 nm, Em 530±15 nm) を試み、赤血球内変性ヘモグロビンの定量分析が可能か否か、従来法の超生体染色と比較し検討した。

健常人によるヘマトクリット (Hct) 低下検体を作成して、Hct 正常検体 (Hct = 45%) をコントロールとし、アセチル・フェニルヒドラジン反応の経時的変化を 6 時間まで観察した。両者とも反応時間に比例して赤血球の蛍光は直線的に増加した。Hct 低下検体は、Hct 正常検体に比較し強い自然蛍光を認め、赤血球内で高いヘモグロビン変性を生じていることが確認できた。

また、健常人希釈検体によるアセチル・フェニルヒドラジン反応 (4 時間) では、フローサイトメトリーによる蛍光測定と超生体染色法による Heinz 小体 score 5 陽性率は正の相関を示した。

このフローサイトメトリーによる測定法は、アセチル・フェニルヒドラジンにより誘発されたヘモグロビン変性を、平均蛍光強度を用いて客観的に解析することができ、超生体染色法に比較し、より精密な分析が行えた。この赤血球の緑色蛍光検出は、赤血球内のヘム喪失に起因した変性ヘモグロビンの新しい定量分析の 1 つになると推察された。

## 1. はじめに

赤血球には生体内で酸素と二酸化炭素の運搬を担うヘモグロビンが含まれており、赤血球成分の約 2/3 は水分で残り約 1/3 はヘモグロビンから成る。ヘモグロビン濃度に関しては、シアンメトヘモグロビン法がヘモグロビン定量の国際標準法として用いられている。また近年、廃液処理等で問題がないノンシアン法としてラウリル硫酸ナトリウムヘモグロビン測定法等もある。変性ヘモグロビンについては、通常溶血液による等電点電気泳動や高速液体クロマトグラフィーによるヘモグロビン分画の分析、あるいは超生体染色による赤血球内の Heinz 小体の有無により証明が行われているが、個々の赤血球内の変性

ヘモグロビンの定量分析に関しては、あまり検討がなされていない。

不安定ヘモグロビン症の 1 つである Hb köln 赤血球は、酸化変性を起しやすく、ヘム喪失に起因してヘモグロビンの変性をきたし分解産物の fluorescent yellow pigment が赤血球内に蓄積され、特に Heinz 小体に一致して強い緑色蛍光が認められることが知られている。先に筆者らは、Hb köln 症において、体内循環中のヘモグロビン変性の蓄積にともない赤血球の自然蛍光の増強を経験し、フローサイトメトリーによる検出と蛍光顕微鏡による観察について報告した<sup>[1,2]</sup>。今回、その経験を応用してフローサイトメトリーによる赤血球内の変性ヘモグロビンの定量分析について検討した。

アセチル・フェニルヒドラジンは、赤血球内のヘモグロビンの酸化変性を誘発することが知られており、Heinz 小体生成試験として不安定ヘモグロビン症等の診断検査法として活用されている。このアセチル・フェニルヒドラジン反応により生じた変性ヘモグロビンのフローサイトメトリーによる測定 (Ex 488 nm, Em 530±15 nm) を試み、この方法が新しい赤血球内の変性ヘモグロビンの定量測定法として活用可能か否か、塗抹標本による超生体染色による生成 Heinz 小体の観察と比較して検討した。

## 2. アセチル・フェニルヒドラジン反応による検討

### 2.1 対象

健常人の EDTA 採血による末梢血液を用いた。アセチル・フェニルヒドラジンによる赤血球への影響は、血液のヘマトクリット (Hct) 値が低いほど強いことが、超生体染色等による観察で知られている。今回、ヘモグロビン異常症は稀な疾患であり、自己血漿を添加して Hct 値の低下検体 (Hct = 25%, 17%) を作成し、ヘモグロビン異常症の血液の代りとした。また、コントロールは健常人血液 Hct = 45% とした。

### 2.2 Heinz 小体生成試験

リン酸緩衝液 (pH 7.6) にアセチル・フェニルヒドラジンとグルコースを加えて溶解し、アセチル・フェニルヒドラジン溶液を作成する。75×10 mm の試験管に 2 ml のアセチル・フェニルヒドラジン溶液と血液 100 μl を加え、数回混和し、37°C で反応させた。2 時間ごとにその一部を採取し、フローサイトメトリ

一による蛍光測定および塗抹標本を作成し超生体染色用とした。

## 2.3 フローサイトメトリーによる蛍光測定

Heinz 小体生成試験前(新鮮血)では、血液に生食液を加え遠心洗浄し、再浮遊させ測定用とした。Heinz 小体生成試験後の検体は、その一部をとり洗浄せずにそのまま測定した。FACSort (BD Biosciences) を用いて、赤血球 1 万個を測定し、FL1 検出器:BP 530 / 30 nm による赤血球の蛍光検出を行った。解析には Quest を用いた。

## 2.4 超生体染色法

末梢血液をガラス染色毛細管(ニューメチレン青; キャピロット, テルモ社)に入れ混和し 15 分間反応させ、塗抹標本を作製した。Heinz 小体を有する赤血球の判定は、Heinz 小体生成試験に準じて行った。赤血球中の Heinz 小体の数により「0~5」に分類し、Heinz 小体が 5 個以上のものを「score 5」として分類し陽性率を求めた。

## 2.5 アセチル・フェニルヒドラジン反応における経時的変化

各 Hct (17%, 25%, 45%) ごとに 3 サンプルを用意し、6 時間までアセチル・フェニルヒドラジン反応を行い、それぞれのサンプルをフローサイトメトリーによる 2 重測定を行った。アセチル・フェニルヒドラジン反応の対照として生食に浮遊させた赤血球では、自然蛍光の増加は認められなかったが、アセチル・フェニルヒドラジン反応群では、反応時間に比例して赤血球の自然蛍光は直線的に増加した。コントロールの Hct = 45% の蛍光値に比較し、Hct = 25% 検体では平均 1.28 倍、Hct = 17% 検体は平均 1.41 倍の蛍光強度の増加を認め、Hct 値が低い試料ほど自然蛍光の強度は高値を示した。

超生体染色では、アセチル・フェニルヒドラジン反応前(新鮮血)では、各サンプル(Hct = 17%, 25%, 45%)共に Heinz 小体を有する赤血球は認められなかった(Heinz 小体陽性率 = 0%)。2 時間反応後では、微細に染色された Heinz 小体を有する赤血球が認められたが、陽性顆粒かどうか判定が難しいものもあった。4 時間反応後では、陽性顆粒は小円形に明瞭に染色され、赤血球内に 1~2 個のときは比較的同じ大きさの Heinz 小体であったが、陽性顆粒が増加するに従い、大小不同の Heinz 小体が赤血球内に認められた。6 時間反応後では、さらに陽性顆粒の数は増大した。また、Hct 値が低い試料ほど Heinz 小体数(score 5)も増加を示した。

健康人血液の自己血漿を添加し、Hct を 17%~45% に調整した試料の 4 時間反応によるフローサイトメトリーの赤血球の自然蛍光強度と超生体染色法による Heinz 小体 5 個以上を有する赤血球(score 5)の比率を比較した。両者の結果は、相関係数  $r = 0.65$ 、回帰曲線  $y = 0.998x + 20.1$  となった。

ヘモグロビンは 4 分子のヘムと 4 分子のグロビンから成る複合蛋白である。正常ヘモグロビンに比べて、ヘム喪失やサブユニット解離を生じやすい不安定ヘモグロビン症は、容易に酸化変性をおこし立体構造を維持できずに不溶性となり、最終産物である Heinz 小体を生ずる。従来、Heinz 小体の証明は、ニューメチレン青等の超生体染色を用いて行われ、アセチル・フェニルヒドラジンの酸化誘発剤による Heinz 小体生成試験(4 時間反応)の判定法としても活用されている。変性ヘモグロビンの集合体の Heinz 小体は赤血球内に類円形の封入体として観察され、その陽性率 score 5 の比率(%)により、不安定ヘモグロビン症やグルコース 6 リン酸脱水素酵素欠乏症等の鑑別に用いられている。この Heinz 小体の個数による判定法は、疾患鑑別法としては優れていると思われるが、今回の生成された Heinz 小体では大小不同(変性量の相違)が認められ、個数による判定法では Heinz 小体の大きさの反映は難しく、健康人の赤血球内の変性ヘモグロビン量を適切に評価することは難しいと推察された。

その点、フローサイトメトリー測定では、短時間に多数の赤血球の自然蛍光を測定し分析することが可能であり、Heinz 小体生成試験の 6 時間までの観察では直線的な蛍光強度の増加が認められた。アセチル・フェニルヒドラジンの赤血球への影響は、血液の Hct が低いほど強いことが知られており、フローサイトメトリーによる測定でも同様に蛍光強度による相違を認め、超生体染色による従来の Heinz 小体陽性率(%)による判定法に比較し、精密な分析を行うことができた。また、健康人希釈検体によるフローサイトメトリーの蛍光測定値と超生体染色法による Heinz 小体 score 5 陽性率は正の相関を示し、ヘモグロビン崩壊の 1 つの評価法として有用と思われた。このフローサイトメトリーによる赤血球の緑色蛍光検出は、赤血球内のヘム喪失に起因した新しい変性ヘモグロビンの定量法の 1 つになると推察された。

## 参考文献

- [1] 佐藤晶子, 櫻井秀子, 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, 第 4 回筑波大学技術職員技術発表会報告集(2005) 38-41.
- [2] S. Sato, et al., Pseudoreticulocytosis in a patient with hemoglobin Köln due to autofluorescent erythrocytes enumerated as reticulocytes by the Cell-Dyn 4000, Lab. Hematol. 10 (2004) 65-67.