

GLYCOSYLATED HEMOGLOBIN

に関する臨床的ならびに実験的研究

1983

筑波大学大学院博士課程  
医学研究科

今川重彦

筑波大学  
医学博士学位論文

Glycosylated hemoglobin に関する臨床的  
ならびに実験的研究

- I 総鉄定量, 5ヒドロキシメチル2フルフラール定量と<sup>3</sup>H-ブドウ糖の取り込みによる構造解析
- II 高速液体クロマトグラフィーを用いた定量分析とその臨床応用
- III 酸素解離曲線と stopped flow 法による酸素平衡機能解析

1983

大学院博士課程医学研究科

今川 重彦

# 目 次

## 第 I 章 緒 言

A	構造解析 .....	2
B	定量分析 .....	2
C	機能解析 .....	3

## 第 II 章 研究方法

(1)	研究操作手順 .....	4
(2)	Hb の調整法 .....	4
(3)	Glycosylated Hb の分離法 .....	4
(4)	Hb の濃縮法 .....	6
(5)	HbA <sub>0</sub> とブドウ糖のふ置法 .....	6
(6)	総磷定量法 .....	8
(7)	5 ヒドロキシメチル 2 フルフラール定量法 .....	9
(8)	<sup>3</sup> H-ブドウ糖の取り込み実験 .....	9
(9)	高速液体クロマトグラフィーを用いた glycosylated Hb の分離法 .....	10
	① 研究材料	
	② Glycosylated Hb の分離法	
(10)	Hb の $\alpha$ 鎖, $\beta$ 鎖分離法 .....	11
(11)	一酸化炭素型 Hb の脱一酸化炭素法 .....	16
(12)	Stripped Hb の作製法 .....	16
(13)	酸素解離曲線による酸素平衡の測定法 .....	19
(14)	Stopped flow 法による酸素平衡の測定法 .....	21
	① 酸素結合速度定数の測定法	
	② 酸素解離速度定数の測定法	
	③ 一酸化炭素結合速度定数の測定法	

第Ⅲ章	結 果	
A	構造解析 .....	27
	1) 総磷定量	
	2) 5ヒドロキシメチル2フルフラール定量	
	3) $^3\text{H}$ -ブドウ糖の取り込み実験	
B	定量分析 .....	31
	1) 糖尿病患者と対照の glycosylated Hb の溶出曲線	
	2) 糖尿病患者と対照の glycosylated Hb の割合	
	3) 採血時における glycosylate Hb の割合と空腹時・食後血糖値との関係	
	4) Glycosylated Hb の割合と過去5ヶ月間の空腹時血糖値との関係	
	5) 糖尿病性白内障, 糖尿病性神経障害の合併の有無による glycosylated Hb の割合	
C	機能解析 .....	38
	1) Glycosylated Hb の酸素平衡	
	2) Glycosylated の $\alpha$ 鎖, $\beta$ 鎖の酸素平衡	
	3) Glycosylated Hb の $\alpha$ 鎖, $\beta$ 鎖の一酸化炭素結合速度と酸素結合速度	
	4) Glycosylated Hb の $\alpha$ 鎖, $\beta$ 鎖の酸素解離速度	
第Ⅳ章	考 察	
A	構造解析 .....	43
	1) 総磷定量	
	2) 5ヒドロキシメチル2フルフラール定量	
	3) $^3\text{H}$ -ブドウ糖の取り込み実験	
B	定量分析 .....	44
C	機能解析 .....	47
第Ⅴ章	結語	

## 第 I 章 緒 言

Glycosylated hemoglobin (Hb) は、1958年 Allen がアンバーライト IRC-50 を用いたカラムクロマトグラフィー法で、正常より早く溶出される分画として初めて報告した Hb である(1)。以後 glycosylated Hb は、アンバーライト IRC-50、カルボキシメチル(CM)セルロース、DEAE-セルロースを用いたカラムクロマトグラフィー法で分離されるようになった(2-9)。1968年 Rahbar は、諸疾患1200例の溶血液を電気泳動で分析した結果2例の糖尿病患者で、glycosylated Hb の増加を認めた(10)。以後 glycosylated Hb は糖尿病患者で解析されるに致った(11-12)。1971年 Trivelli らが Bio-Rex70 陽イオン交換樹脂と Developer No 6 の緩衝液を用いたカラムクロマトグラフィーで glycosylated Hb は  $HbA_{1a}$ 、 $HbA_{1b}$  と  $HbA_{1c}$  とに分離できることを認めた(13)。1978年 McDonald らは、Bio-Rex 70陽イオン交換樹脂を0.05M 磷酸緩衝液で溶出するカラムクロマトグラフィーで、glycosylated Hb が  $HbA_{1a_1}$ 、 $HbA_{1a_2}$ 、 $HbA_{1b}$  と  $HbA_{1c}$  とに分離されることを認めた(14)。この glycosylated Hb はそれぞれ 1,6 二磷酸果糖、6 磷酸ブドウ糖、( $HbA_{1b}$  は不明) およびブドウ糖が  $\beta$  鎖N末端に非酵素的に結合してアルジミン(シッフ基)を形成し、引き続きアマドリ転位を経て安定したケトアミン結合となったものと報告されている(14-19)。またカラムクロマトグラフィー法で分離される  $HbA_0$  にも、 $\beta$  鎖N末端以外に、 $\alpha$  鎖N末端あるいはその他のリジン残基にブドウ糖が結合し、glycosylateされた部分が含まれることが認められている(20-23)。しかし従来のカラムクロマトグラフィー法では、これらを分画として分離することは不可能である(23)。このような構造を有すると考えられる glycosylated Hbには、量的異常と機能的異常が考慮される。まず量的異常の解析としては、Trivelli らの方法によるカラムクロマトグラフィー法は、glycosylated Hb を  $HbA_{1a+b}$ 、 $HbA_{1c}$  として分離し、これらの中で特に  $HbA_{1c}$  が糖尿病で増加し(13, 24-29)、これが赤血球寿命に関連して1~3ヶ月前の血糖値を反映すると指摘されている(30-33)。一方  $HbA_{1a+b}$  も糖尿病で増加することが認められている(13, 26-27)が最近では尿毒症でもこの分画が増加することが認められている(34-35)。また  $HbA_{1c}$  の中にも安定な部分と、変動しやすい不安定な部分が含まれていることが認められている(36-44)。Labile  $HbA_{1c}$  は不安定な部分であり pre  $HbA_{1c}$  とも呼ばれ、ブドウ糖の  $\beta$  鎖N末

端への結合が可逆的であり不安定な状態にある分画とされている(45)。これに対し stable HbA<sub>1c</sub> は pre HbA<sub>1c</sub> からアマドリ転位を経て安定なケトアミン結合となったものと解釈されている(45)。この不安定な labile HbA<sub>1c</sub> は溶血液を生理食塩水で4～6時間ふ置することで除去されることが認められている(41-42)。一方、機能的側面からは McDonald らが glycosylated Hb 四量体の酸素親和性について報告している(46)。HbA<sub>1c</sub> の酸素親和性は HbA<sub>0</sub> に比べ増加しており、逆に HbA<sub>1a</sub> の酸素親和性は HbA<sub>0</sub> に比べ低下していることを認めている。また有機リン酸塩であるイノシトール六リン酸 (IHP) の、glycosylated Hb の酸素親和性に及ぼす効果を検討した結果、glycosylated Hb では IHP の効果が阻害されることが認められている。これは IHP の結合部位の1つである β鎖N末端が上記糖リン酸エステル、ブドウ糖で修飾されているためと考察している(46)。本研究では、上記の性質をもつ glycosylated Hb を、構造解析、量的および機能的側面から検討した。

#### A 構造解析

Glycosylated Hb を McDonald らによる Bio-Rex70 陽イオン交換樹脂を用いたカラムクロマトグラフィーで分離精製した(14)。各 glycosylated Hb の総リン含有量を測定することで β鎖N末端の修飾が、糖リン酸エステルあるいはブドウ糖であるかの検討を行なった。また炭水化物がアミノ酸とケトアミン結合した場合、それを酸性で加熱脱水すると 5ヒドロキシメチル2フルフラール (5HMF) を生成する特異反応が認められ、産生された 5HMF は 5チオバルピタル酸(TBA)により検出されることが Flückiger と Winterhalter により報告されている(47)。分離後の各 glycosylated Hb 分画の炭水化物の定量をこの方法で試み、各分画の β鎖N末端における修飾を検討した。また McDonald らは in vitro で glycosylated Hb を生成するために、HbA<sub>0</sub> とブドウ糖を 37°C、21日間無菌状態でふ置する方法をとっている(14)。そこで本研究では <sup>3</sup>H-ブドウ糖を用い、各 glycosylated Hb への取り込みから HbA<sub>1a</sub>、HbA<sub>1b</sub> と HbA<sub>1c</sub> の構造を検討した。

#### B 定量分析

Glycosylated Hb の分離は、短いカラムを用いて行なわれている(47-57)。最近では大量の検体を短時間に正確に処理するため高速液体クロマトグラフィー (HPLC) を

用いる方法が報告されている(58-60)。HPLC法では glycosylated Hb は  $\text{HbA}_{1a+b}$  と  $\text{HbA}_{1c}$  とに分離され、 $\text{HbA}_{1a+b}$  は  $\text{HbA}_{1a}$  と  $\text{HbA}_{1b}$  とには分離出来ない。本研究では TSK-GEL IEX 535カラムの HPLCを用いることによって  $\text{HbA}_{1a}$  と  $\text{HbA}_{1b}$  を分離でき、 $\text{HbA}_{1b}$  はさらに2つの分画に、また  $\text{HbA}_{1c}$  はさらに3つの分画に再現性よく分離できることを認めた。そこで、これらの分画を糖尿病患者で測定し、血糖値をよく反映する分画と反映しない分画の存在を検討した。また最近では糖尿病性白内障は水晶体クリスタリンの glycosylation が、また糖尿病性神経障害は神経のミエリンの glycosylation がその病因ではないかと報告されている(61-66) ので細分化された glycosylated Hbを、これら合併症のある糖尿病患者と合併症のない糖尿病患者とで比較検討した。水晶体クリスタリンと神経ミエリンの glycosylation を反映する glycosylated Hb 分画があれば、検体採取の容易な Hb の側面から上記合併症の早期発見が可能になると考えたからである。

### C 機能解析

Glycosylated Hb の糖尿病の病態に及ぼす生理的影響をリガンド結合の特徴から検討した。McDonald らは  $\text{HbA}_{1a}$  四量体の酸素親和性の低下を認めている(46)。本研究では、McDonald らの方法(14)により分離した各 glycosylated Hb 四量体の酸素親和性とこれらに及ぼす IHP 効果を再評価した。さらにこの glycosylated Hb を  $\alpha$  鎖、 $\beta$  鎖のサブユニットに分離し、単離鎖の酸素親和性を検討した。その際、証明された  $\text{HbA}_{1a}$   $\beta$  鎖の酸素親和性の低下については、その成因を追及する目的で酸素結合速度、一酸化炭素結合速度、酸素解離速度の検討を加え、その成因が酸素を結合しにくいことに起因するのか、あるいは逆に酸素を解離しやすいことによるのかを検討し、 $\beta$  鎖N末端の修飾がサブユニット自身の機能に変化をもたらすか否かについて検討した。

## 第 II 章 研究方法

### (1) 研究操作手順

研究操作手順の概略をFig 1に示した。濃厚赤血球より溶血液を調整し、Bio-Rex 70 陽イオン交換樹脂を用いたカラムクロマトグラフィー法でglycosylated Hb と HbA<sub>0</sub> を分離した。このglycosylated Hb の総糖含有量と 5 HMF 産生量を測定した。また HbA<sub>0</sub> とブドウ糖をふ置した後、再び上記カラムクロマトグラフィー法でglycosylated Hb を分離、この glycosylated Hb 四量体を、 $\alpha$ 鎖と $\beta$ 鎖に単離した。この glycosylated Hb 四量体と単離鎖の酸素平衡機能を測定した。さらに HbA<sub>0</sub>とブドウ糖をふ置する際に、<sup>3</sup>H-ブドウ糖を添加し、<sup>3</sup>Hの放射活性を測定した。また HPLC を用い、glycosylated Hb を定量分析した。

### (2) Hb の調整法

- ① 輸血用濃厚赤血球(O型)200mlに5倍量の0.9%生理食塩水を添加、よく振盪攪拌したのち1,000Xg,10分間遠心し、上清を除去し、新しく同量の生理食塩水を添加、洗浄操作を3回繰り返した。
- ② 洗浄後の赤血球に3倍量の冷却蒸留水を添加し、振盪攪拌して溶血させ、30分間4℃に放置した。
- ③ 30分後終濃度が等張になるように塩化ナトリウムそのものを添加した。
- ④ 15,000Xg 15分間遠心後、上清の溶血液を検体として使用した。なお上記操作はすべて4℃にて行なった。

### (3) Glycosylated Hb の分離法

Glycosylated Hb の分離は McDonald らの方法(14)に準じ以下の如く施行した。

- ① 濃厚赤血球 200mlから Hb の調整法に記載した方法で溶血液を得た。
- ② セファデックス G-25(Pharmacia, Inc)カラム(5cm×40cm)を0.05M磷酸カリウム緩衝液 pH6.78 で平衡化させた後、①の溶血液をカラムにチャージし、緩衝液置換を行なった。
- ③ Bio-Rex 70 陽イオン交換樹脂(Bio-Rad, Inc)カラム(5cm×40cm)を同緩衝液で平衡化させた後、②で得た溶血液およびカラムに一酸化炭素を通気後、溶



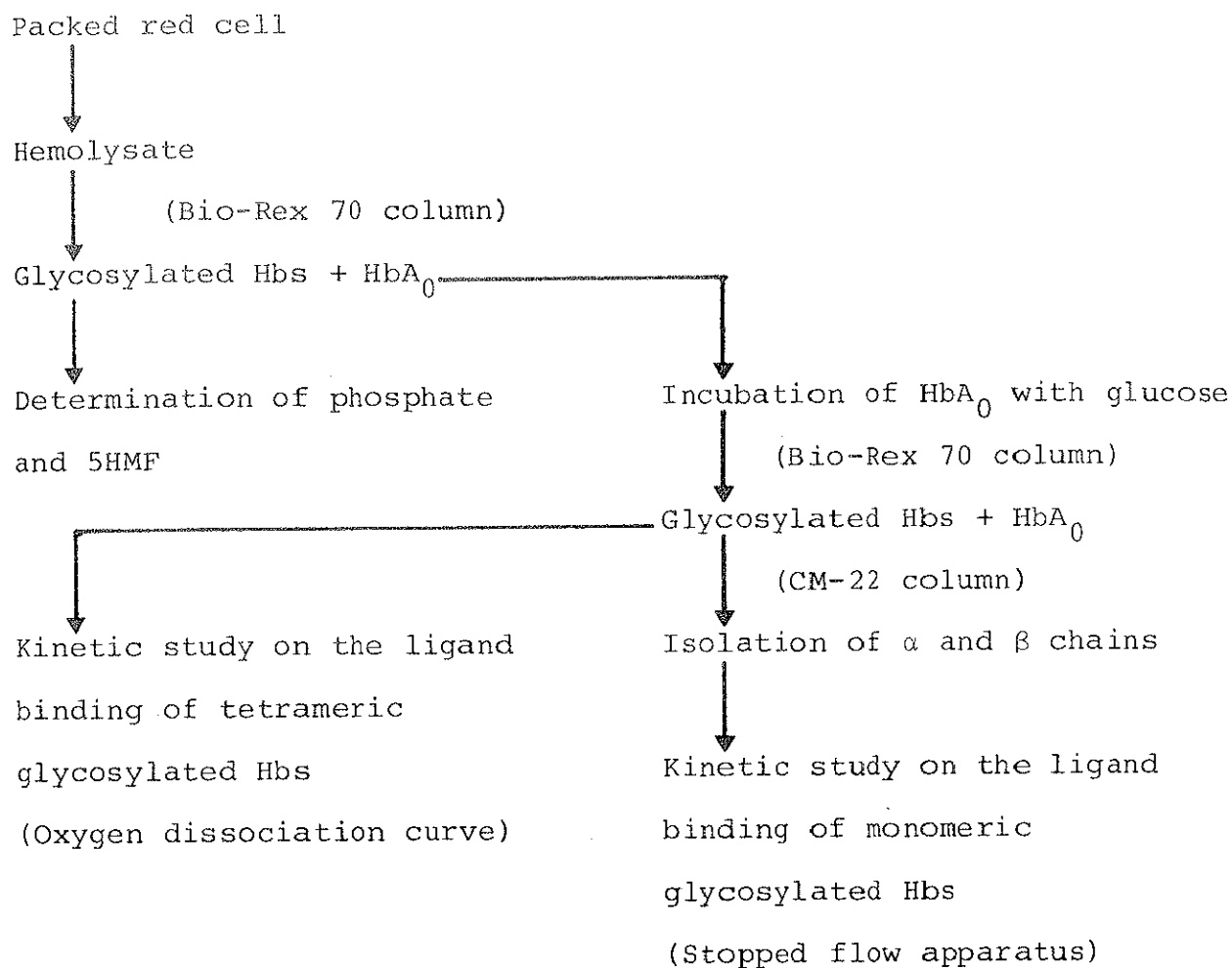


Fig 1. Procedure of the study.

血液をカラムにチャージした。Vario perperx peristaltic pump(LKB Produkter)で流速を100~120ml/時間に調整し、フラクションコレクターで9.0mlずつ収集した。Fig 2に上記方法による溶出曲線を示す。まず  $HbA_{1a1}$  と  $HbA_{1a2}$  が溶出された。この後、上記開始液に0-0.1M塩化ナトリウム(それぞれ500mlずつ)の直線グラジエントで  $HbA_{1b}$  を溶出させた。次に0.1M塩化ナトリウムを含む開始液に切り替え、 $HbA_{1c}$  を溶出させた。最後に1M塩化ナトリウムを含む開始液で  $HbA_0$  を溶出させた。各画分の吸光度を波長540nmで分光光度計にて測定した。なお上記操作はすべて4℃の条件下で施行した。

#### (4) Hb の濃縮法

(3)の glycosylated Hb の分離法で得られた各 glycosylated Hb を透析チューブを用い吸引減圧濾過で濃縮した。

#### (5) $HbA_0$ とブドウ糖のみ置法

$HbA_0$  とブドウ糖とのみ置は、McDonaldらの方法(14)に準じ以下の如く施行した。

- ① (3)の glycosylated Hb の分離法で得られた  $HbA_0$  を(4)の方法で濃縮後、セファデックスG-25カラムクロマトグラフィーにて krebs-Ringer 燐酸緩衝液 pH7.2で緩衝液の置換を行なった。
- ② この  $HbA_0$  (6mMヘム)38mlに300mM ブドウ糖溶液2ml を添加し、ブドウ糖の終濃度を15mM にした。
- ③ これにペニシリン10,000単位 0.5ml, ストレプトマイシン100mgを 0.5ml 添加した。
- ④ 最後に一酸化炭素を通気させ37℃で21日間み置した。
- ⑤ ②以降の操作はすべて無菌的に行ない、 $HbA_0$  とブドウ糖溶液の添加には、ミリポアフィルターを使用した。
- ⑥ 21日後セファデックス G-25カラムに、この  $HbA_0$  とブドウ糖のみ置した検体をチャージし反応を終了させた。溶出は 0.05M燐酸カリウム緩衝液 pH6.78で行なった。

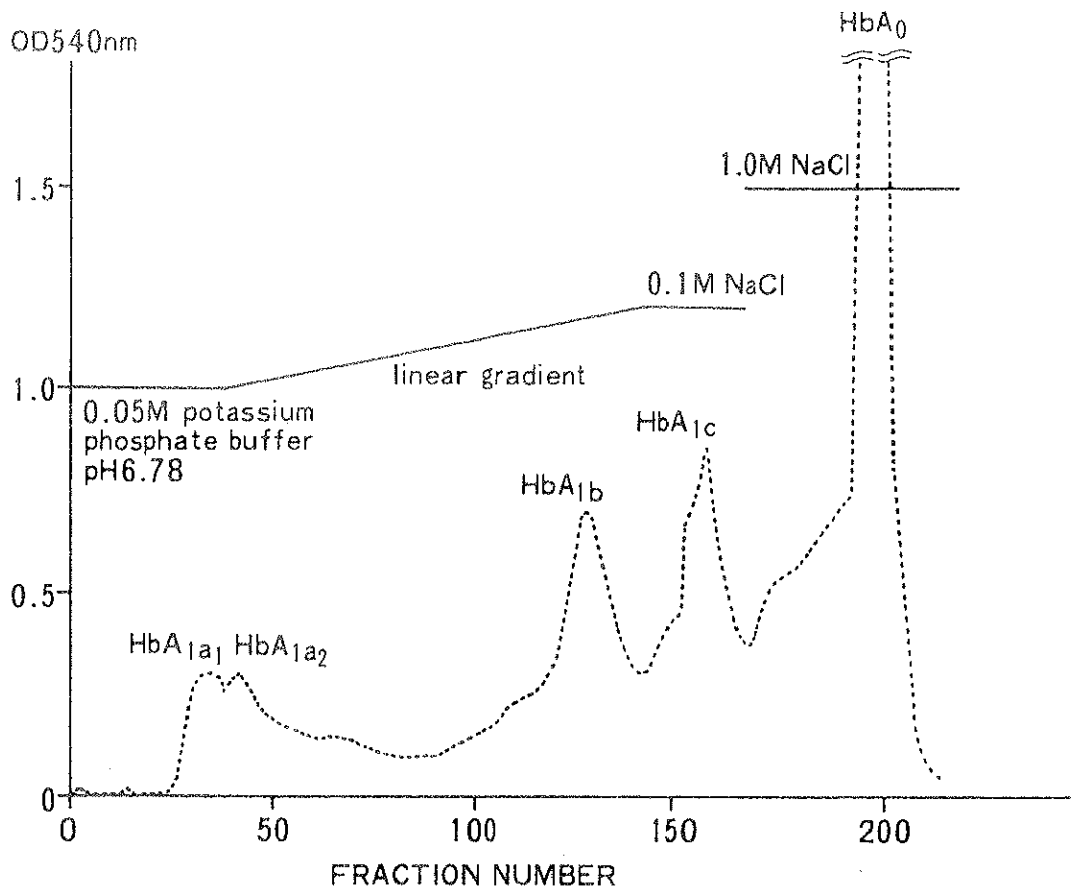


Fig 2. Elution profile of hemolysate on Bio-Rex 70 column chromatography.

The hemolysate was converted to the proper pH and ionic strength by passage through a Sephadex G-25 column (5 cm x 40 cm) previously equilibrated with 0.05 M potassium phosphate buffer, pH 6.78. The hemolysate was then loaded onto a Bio-Rex 70 column (5 cm x 40 cm) equilibrated with at least one column volume of 0.05 M potassium phosphate buffer, pH 6.78. The flow rate was 100 ml/hr. Nine ml fractions were collected. After the elution of HbA<sub>1a1</sub> and HbA<sub>1a2</sub>, a linear gradient of 0-0.1 M NaCl in starting buffer was needed to elute HbA<sub>1b</sub>. Then 0.1 M NaCl was continued until the HbA<sub>1c</sub> peak was eluted. At this point the column could be stripped of HbA<sub>0</sub> with 1 M NaCl. All chromatography was done at 4°C.

## (6) 総燐定量法

総燐定量法は、2,3-ジホスホグリセリン酸(DPG) を標準溶液として用い、Fiske-Subbarow法 (67)に準じ、以下の如く施行した。

- ① 各 glycosylated Hb 分画を脱塩するために セファデックス G-25カラムを用い 0.05M ビストリス/塩酸、pH7.0(0.1M塩化ナトリウムを含む)で緩衝液を置換した後、各 glycosylated Hb 分画の Hb 濃度を定量、その1.0mlを被検溶液としマイクロキエールダール酸化コルベンにとった。また2,3 DPG 0.05~0.40  $\mu$ mole になるよう、0.1mM 2,3DPG 溶液を用い標準溶液とした。なお Hb 濃度は  $1\text{mM} \equiv \frac{540}{15}$  で測定した。
- ② これに10N 硫酸1.5ml を添加した。
- ③ 100℃で加熱した。(吸引して水蒸気をひく。白煙がでてきたら吸引を止め白煙がもれないよう温度を調整した。)
- ④ 液内容が黒変したら酸化コルベンをはずして冷却した。
- ⑤ 冷却後30%過酸化水素溶液を1滴滴下し再び100℃で加熱した。
- ⑥ 黒色調が消失しなかったら再び 30%過酸化水素溶液を1滴滴下し100℃で再び加熱した。これを加熱後も無色になるまで続けた。
- ⑦ 無色になった後も1分間は加熱を続けた。
- ⑧ 灰化終了後(30~60分後)冷却した。
- ⑨ 少量の蒸留水を添加し、沸騰水浴中に10分間放置した。
- ⑩ 全内容に、5%モリブデン酸アンモニウム 0.5mlを添加して全内容量を蒸留水で9.5mlとし、攪拌後0.95mlをとった。
- ⑪ 次に Fiske-Subbarow 試薬0.05mlを添加し7分間100℃で沸騰水浴中で加熱した。Fiske-Subbarow 試薬は以下の処方で作製した。1アミノ2ナフトール4スルホン酸\* 0.5gを15%亜硫酸水素ナトリウム水溶液200mlに添加し攪拌後、無水亜硫酸ナトリウム 1.0g を添加、攪拌し濾過後遮光びんに保存して使用した。
- ⑫ 7分後水につけて冷却した。
- ⑬ 830nm で吸光度を測定し、検量線から総燐含有量を定量した。

\*註) 1アミノ2ナフトール4スルホン酸は以下の如く精製して用いた。

i) 蒸留水500mlを90℃に加熱し、これに亜硫酸水素ナトリウム75g、亜硫

酸ナトリウム 5g, 1アミノ2ナフトール4スルホン酸 7.5gを加えて攪拌しながら溶解した。

ii) 溶液の温度を90℃に保つた状態で溶液を濾過し、濾液を水道水で冷却した。

iii) これに12N塩酸 5ml を徐々に添加し攪拌した。

iv) この全溶液をブフナー漏斗にのせ、濾液が無色になるまで吸引濾過した。

v) 最後に漏斗内残留物を収集し、遮光広口びんにとり、デシケーターに入れて乾燥した。

#### (7) 5 HMF 定量法

5 HMF の定量は Pecoraro らの方法(68)に準じ、以下の如く施行した。

① 各 glycosylated Hb 分画の Hb 濃度を測定した後、この0.8mlを被検溶液とした。また 5 HMF 50~150nmole になるよう、1 mM 5HMF 溶液を用い標準溶液とした。なお Hb 濃度は  $1 \text{ mM} \epsilon_{540} = 15$  で測定した。

② 被検溶液あるいは標準溶液0.8 mlに蒸留水0.2mlを添加し、1.0M 蔞酸1.0mlを添加、攪拌し、試験管先を加熱して封入後 110℃で3時間加水分解を行なった。

③ 加水分解終了後、40%トリクロール酢酸溶液1.0 ml を添加し攪拌した。

④ 1000Xg, 10分間遠心後上清を得た。

⑤ この上清1.5 ml に0.05M TBA 溶液0.5ml を添加した。

⑥ これを40℃で30分間ふ置した。

⑦ ふ置終了後15分間室温にて放置した。

⑧ 443nmで吸光度を測定し、検量線から 5HMF を定量した。

#### (8) <sup>3</sup>H-ブドウ糖の取り込み実験

(5)に記載した HbA<sub>0</sub> と ブドウ糖のふ置法と同様に操作した。

① 1.68mM HbA<sub>0</sub> 18mlに0.15Mブドウ糖溶液2.0ml を添加、ブドウ糖の終濃度を15mMとした。

② これに87.7 μM <sup>3</sup>H-ブドウ糖\* 0.3ml を添加し、攪拌した。

- ③ ペニシリン10,000単位0.5ml, ストレプトマイシン100mg を0.5mlずつ添加した。
- ④ 最後に一酸化炭素を通気させ37℃で21日間ふ置した。
- ⑤ 上記操作はすべて無菌的に行ない, HbA<sub>0</sub> とブドウ糖溶液の添加には, ミリポアフィルターを使用した。
- ⑥ 21日後セファデックスG-25カラムに, この検体をチャージして反応を終了させた。溶出には0.05M 燐酸カリウム緩衝液pH6.78を用いた。

\* 註) <sup>3</sup>H-ブドウ糖 ; 比活性 10.2 curies/mmol, 57mCi/mg 放射活性濃度 0.9mCi/ml (The Radiochemical Centre Ltd, England)

#### (9) HPLC を用いた glycosylated Hb の分離法

##### ① 研究材料

対象には45例の非インスリン依存型糖尿病患者と10例の健康成人を用いた。糖尿病患者の年齢は27~76才, 健康人の年齢は22~45才であった。糖尿病患者は筑波大学附属病院外来患者であり, 血液・腎疾患患者, 妊娠合併者, アルコール中毒者, 鉛中毒者およびアスピリンの大量服用者は, 対象から除外して検討した。糖尿病性白内障は, 細隙灯鏡検査により診断した。糖尿病性神経障害は, 知覚異常, 灼熱痛, 振動覚の低下, 踝反射の消失など, 典型的な末梢神経障害の徴候より診断した。上記糖尿病合併症は, とともに未治療の状態の患者で検討した。健康人対照は, 糖尿病の家族歴をもたないものを選択した。糖尿病患者は, 検体を空腹時に採取した群(A<sub>D</sub>群), 検体を食後採取した群(B<sub>D</sub>群)の2群に分けて検討した。A<sub>D</sub>群の平均空腹時血糖値は, 170.4±54.2(平均値±標準偏差)mg/dl, 初診時より検体採取までの平均期間は 42.6±17.5(平均値±標準偏差)ヶ月であった。B<sub>D</sub>群の平均食後血糖値は 217.0±86.4(平均値±標準偏差)mg/dl, 初診時より検体採取までの平均期間は30.1±17.9(平均値±標準偏差)ヶ月であった。一方, 対照例も同様, 検体を空腹時に採取した群(A<sub>N</sub>群), 検体を食後採取した群(B<sub>N</sub>群)に分けて検討した。対照のA<sub>N</sub>群の平均空腹時血糖値は93.2±2.9(平均値±標準偏差)mg/dl, B<sub>N</sub>群の平均食後血糖値は99.8±13.0(平均値±標準偏差)mg/dlであった。また検体は5ヶ月間毎月採取し, 血糖値を測定した。その際, A群の検体は毎月空腹時に, B群の検体は毎月食後に採取した。血糖値は Beckman glucose analyzer(Beckman Instrument, Co. Inc. USA)にてグルコース・オキシターゼ法で測定した。

## ② Glycosylated Hb の分離法

検体はヘパリン加静脈血2.0ml を用いた。採血後ただちに検体を0.9%生理食塩水で3回洗浄した。洗浄後、赤血球沈渣に1.5容蒸留水と0.5容トルエンを添加して攪拌し、1,000×g で15分遠心後、上清を速やかに HPLC の開始液(50mM 燐酸ナトリウム緩衝液 pH5.80)で9倍に希釈し、その8μl\* を試料とした。

Glycosylated Hb の分離には Solvent Delivery System Model 638 (Hitachi Co., Ltd, Tokyo, Japan) を用いた。Glycosylated Hb 分画の同定は JASCO UVIDEC III variable wavelength detector (Japan spectroscopic Co. Ltd)を用い、波長 415 nm, レンジ0.16 で解析した。溶出は、開始液に 0-0.2M 塩化ナトリウムの直線グラジエントを30分間行ない、次に50mM燐酸ナトリウム緩衝液 pH5.80(0.2M塩化ナトリウムを含む)で15分間行なった。この間、カラムの流速は 1.0ml/分 で、温度は 25℃に循環恒温槽(MESSGERÄTE-WERK LAUDA, Western Germany)で一定に保った。またこのカラムの平衡化は、開始液で10分間行なった。各 glycosylated Hb の全 Hb 量に対する割合をハンドプランメトリーの変法で\*\*測定した。以上の方法による測定間変動を変動係数で示すと、HbA<sub>1b1</sub> 5.8%, HbA<sub>1b2</sub> 5.2%, HbA<sub>1c1</sub> 2.0%, HbA<sub>1c2</sub> 5.0%, HbA<sub>1c3</sub> 1.5%, HbA<sub>1b</sub> 0.6%, HbA<sub>1c</sub> 4.0%, HbA<sub>1</sub> 3.4%, HbA<sub>0</sub> 0.2% であった。各群間の有意差検定は Student "t" testを用いた。

\*註1) 8μlを使用したのは、溶血液を9倍希釈し、検出器の波長415nm, レンジ0.16での吸光度から、Hb 量の直線性を検討したところ10μlまで直線性を認めため8μl を試料とした。

\*\*註2) データ解析をクロマトパックで施行したところベースライン補正すると、Hb 分画の割合に直線性を認めなかった。そこで記録計を 50mv, 200mv で2点検定し、溶出曲線の谷からベースラインに垂直分割して記録紙を切り抜き、各 glycosylated Hb分画の重量を秤量計で測定し、全 Hb の重量に対する比率で表示した。この方法による計測誤差は、変動係数で0.72%であった。

## (10) Hb のα鎖, β鎖の分離法

Hbのα鎖, β鎖の分離法は, Bucci と Fronticelli の方法(69)および Makino らの方法(70)に準じ以下の如く施行した。その概略を示すと

### ① Hb の p-クロル水銀安息香酸 (PCMB) 処理

- ② CM-22カラムクロマトグラフィーによる $\alpha$ -PCMB と  $\beta$ -PCMB の分離
- ③  $\beta$ -PCMB-CO の濃縮
- ④  $\alpha$ -PCMB-CO の濃縮と脱 PCMB
- ⑤  $\beta$ -PCMB-CO の脱 PCMB
- ⑥  $\alpha$ 鎖,  $\beta$ 鎖の SH 基の定量

の6段階に分けられる。

① Hb の PCMB 処理

- i) 各 glycosylated Hb のヘム濃度を  $1\text{mM} \times \frac{\text{OXY}}{577} = 14.6$  より計算し、次式よりヘム量を求めた。ヘム量( $\mu\text{mole}$ ) = ヘム濃度(mM)  $\times$  容積(ml)。
- ii) PCMB を次式からヘムの2倍定量した。ヘムの $\mu\text{mole}$ 数  $\times 0.357 \times 2 = \text{PCMB}$ 重量(mg)。この PCMB を, PCMB 20mg あたり 1N 水酸化ナトリウム 1ml に懸濁した。しばらく攪拌後, 1M酢酸を少量ずつゆっくり添加し, 少し濁った状態で酢酸の添加を止めた。
- iii) Hb 溶液上に一酸化炭素を通気し, 栓をした後, 泡立たない程度に攪拌して一酸化炭素を溶解した。
- iv) Hb 溶液に ii) の水酸化ナトリウムと等量の 1M 磷酸カリウム緩衝液 pH6.0 を添加した。
- v) Hb 溶液を氷冷しながらスターラーで攪拌し, ii) で作製した PCMB 溶液を 1 滴ずつゆっくり添加した。
- vi) 次にこの Hb 溶液 1ml あたり, 塩化ナトリウム 6mg を v) の Hb 溶液に添加し攪拌した。
- vii) この Hb 溶液を, 1 M 酢酸で pH 6.0 に調整した。
- viii) この Hb 溶液上に一酸化炭素を通気し, 密栓して一晩放置した。
- ix) 1,000Xg 15分間遠心後沈澱を除き上清を得た。
- x) セファデックス G-25カラム(4.5cm $\times$ 35cm)を0.01M磷酸カリウム緩衝液pH 6.7で平衡化した後, ix)で得られた上清をこのカラムにチャージして, 未反応の PCMB を除去した。
- xi) 上記カラム通過後の Hb 溶液の pH を6.7に, 1 M 酢酸か 1 M 磷酸水素ニカリウム溶液で調整した。



② CM-22カラムクロマトグラフィーによる  $\alpha$ -PCMB と  $\beta$ -PCMBの分離

- i) CM-22カラム(3cm×15cm)を0.01M 燐酸カリウム緩衝液 pH6.7, 1l で平衡化した。流出液のpHが6.6~6.8の間にあることを確認した。
- ii) ①で得えられた H $\beta$ -PCMBを, 上記カラムにチャージした。
- iii) 0.01M 燐酸カリウム緩衝液 pH 6.7を用い, 流速 50ml/時間で溶出し, フラクションコレクターで10mlずつ収集した。
- iv)  $\beta$ 鎖のピークが溶出した後, 0.01M 燐酸カリウム緩衝液500ml pH 6.7と0.02M 燐酸水素二カリウム溶液500mlで pH 勾配をかけた。
- v) Fig 3 に示すように,  $\beta$ 鎖, 四量体(A),  $\alpha$ 鎖, X(?)の順に溶出された。この $\beta$ 鎖および $\alpha$ 鎖のピークを収集し, それぞれに一酸化炭素を通気し,  $\beta$ -PCMB-CO,  $\alpha$ -PCMB-COとした。

③  $\beta$ -PCMB-CO の濃縮

- i) CM-22カラム(2cm×10cm)を用い, 0.01M 燐酸カリウム緩衝液 pH 5.8 に平衡化した。
- ii) ②で得られた  $\beta$ -PCMB-COを1M 酢酸で pH を5.5に調整した。
- iii) これを上記カラムにチャージした後, 0.1M 燐酸カリウム緩衝液 pH7.0 で溶出させ, 回収後一酸化炭素を通気した。

④  $\alpha$ -PCMB-CO の濃縮と脱 PCMB

- i) CM-22カラム(2cm×7cm)を用い, 0.01M 燐酸カリウム緩衝液 pH6.7 で平衡化した。
- ii) ②で得られた  $\alpha$ -PCMB 溶液を1M 酢酸で pH 6.7 に調整した。この後一酸化炭素を通気した。
- iii)  $\alpha$ -PCMB-CO 溶液を上記カラムに吸着後, カラム容量の3倍量の15mMメルカプトエタノール溶液(12mg/10ml;0.01M 燐酸カリウム緩衝液 pH 6.7)で洗った。この時, 約30分で洗い終わるように流速を調節した。
- iv) iii)と同様にカラム容量の3倍量の0.01M 燐酸カリウム緩衝液 pH 6.7で洗った。

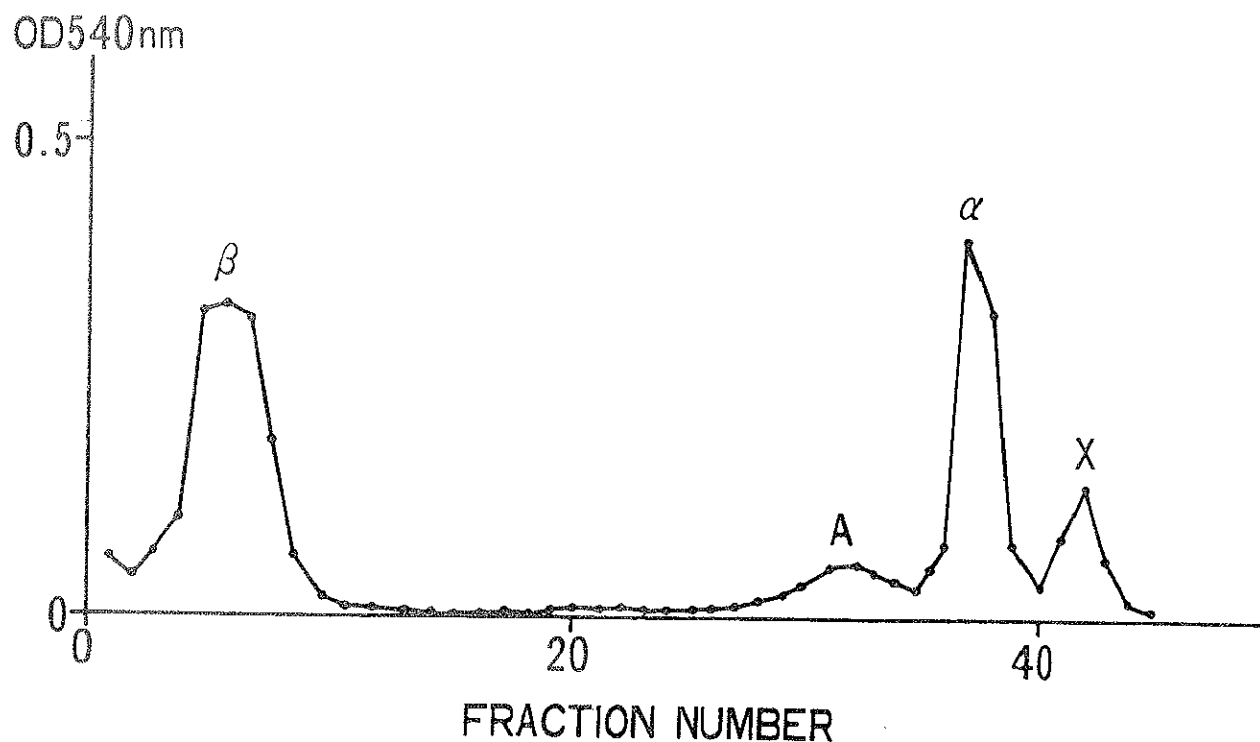


Fig 3. Isolation of  $\alpha$  and  $\beta$  chains of hemoglobin on CM-22 column chromatography.

Hb treated with PCMB was loaded onto a CM-22 column (3 cm x 15 cm) previously equilibrated with 0.01 M potassium phosphate buffer, pH 6.7. The flow rate was 50 ml/hr. 10 ml fractions were collected. After the elution of  $\beta$  chain, a pH gradient of 0.01 M potassium phosphate buffer (500 ml) and 0.02 M  $K_2HPO_4$  (500 ml) was needed to elute undissociated hemoglobin A and  $\alpha$  chain.

v) 次に一酸化炭素を通気させた0.1M 燐酸カリウム緩衝液 pH 8.0で $\alpha$ 鎖をゆっくりと溶出した。

vi) 得られた $\alpha$ 鎖を収集して一酸化炭素を通気し、濃度を測定後凍結保存した。

なお  $\alpha$ -CO の濃度測定には  $1 \text{ mM} \equiv \frac{\text{CO}}{569} = 13.4$  を用いた。

#### ⑤ $\beta$ -PCMB-COの脱 PCMB

i) セファデックス G-25ファインカラム(2.5cm×41cm)を用いた。

ii) 一酸化炭素を通気した 0.01M 燐酸カリウム緩衝液 pH 7.0, 200ml で上記カラムを平衡化した。

iii) 続いて一酸化炭素を通気させた 0.4Mメルカプトエタノール溶液 (0.626g/20ml:0.01M 燐酸カリウム緩衝液 pH 7.0)20mlを流速40ml/ 時間で30分間流した。

iv) 次に、④で得られた $\beta$ -PCMB-CO を上記カラムにチャージした。

v) 次に、0.01M 燐酸カリウム緩衝液 pH7.0を流速 5ml /時間で4時間溶出し、フラクションコレクターにて回収した。

vi) メルカプトエタノール臭の無いことを確認後 $\beta$ 鎖の画分を収集した。

vii) この $\beta$ 鎖に一酸化炭素を通気して、 $\beta$ 鎖の濃度を測定後凍結保存した。なお  $\beta$ -CO の濃度測定には  $1 \text{ mM} \equiv \frac{\text{CO}}{569} = 13.4$  を用いた。

#### ⑥ $\alpha$ 鎖と $\beta$ 鎖の SH 基の定量

上記操作は先ずHbのSH 基に PCMB を結合させて $\alpha$ 鎖( $\alpha$ -PCMB)と $\beta$ 鎖( $\beta$ -PCMB)を分離した。次にこの  $\alpha$ -PCMB と  $\beta$ -PCMB をそれぞれメルカプトエタノールに接触させることにより $\alpha$ 鎖、 $\beta$ 鎖に結合していた PCMB をメルカプトエタノールのSH基に結合させて、 $\alpha$ 鎖 $\beta$ 鎖の脱 PCMB を行なった。そこで最終的に回収された $\alpha$ 鎖、 $\beta$ 鎖の脱 PCMB が充分に行なわれたか否かを確認するため $\alpha$ 鎖、 $\beta$ 鎖のSH 基の定量を行なった。

i) 1 mM PCMB 溶液(3.5716mg/10ml:0.1N 水酸化ナトリウム)を用意した。

ii)  $\alpha$ 鎖を、 $\alpha$ 帯の吸収が約0.3になるように0.1M 燐酸カリウム緩衝液 pH 8.0で調整し、その2.5ml を用いた。

iii)  $\beta$ 鎖を、 $\beta$ 帯の吸収が約0.15になるように0.01M 燐酸カリウム緩衝液 pH7.0

で調整し、その2.5ml を用いた。

iv) 10mm 光路長のガラスセルに $\alpha$ 鎖あるいは $\beta$ 鎖0.25ml を入れた。次に1 mM PCMB 溶液を10 $\mu$ lずつ添加し、その都度、波長 250nm で吸光度を測定した。その1例を Fig 4に示す。PCMB 添加後の吸光度の増加は単離鎖の SH と PCMB が結合した時の増加を示す。しかし単離鎖の SH が PCMB で飽和された後は添加した PCMB 自身の分だけ吸光度が増加することになり、屈曲点を形成する。この屈曲点から結合した PCMB 量およびヘムあたりの SH 基を計算した。以下にその計算法を示す。

$$\cdot \text{結合した PCMB 量}(\mu\text{mole}) = \text{PCMB 濃度}(\text{mM}) \times \text{屈曲点の PCMB 容積}(\text{ml})$$

$$\cdot \text{ヘム量}(\mu\text{mole}) = \text{ヘム濃度}(1\text{mM} \leftarrow \frac{\text{CO}}{570} = 13.4) \times \text{Hb 溶液の容積}(\text{ml})$$

$$\cdot \text{ヘムあたりの SH} = \text{結合した PCMB 量}(\mu\text{mole}) / \text{ヘム量}(\mu\text{mole})$$

上記計算より、 $\alpha$ 鎖、 $\beta$ 鎖ともに85%以上再生されたものを検体として使用した。

#### (11) 一酸化炭素型 Hb の脱一酸化炭素法

- ① 三方活栓を使用し、吸引ポンプでセル内の Hb 溶液から、気泡が立たないように一酸化炭素を吸引した。
- ② 三方活栓を酸素ポンプに接続してセル内に酸素を、バキュームゲージで10mmHg になるように充填させた。
- ③ 冷水中で、セルをライトにあてながら気泡を立てない程度に、水平振盪を3分間行なった。
- ④ ①の操作で、セル内の一酸化炭素を吸引した。
- ⑤ 上記操作を少なくとも5回以上繰り返した。
- ⑥ Hb 溶液から一酸化炭素が完全に除去されたことをフローチャートで確認した。

Fig 5にその1例を示す。

#### (12) Stripped Hb の作製法

- ① Bio-Rex70 陽イオン交換樹脂を用いたカラムクロマトグラフィーで得られた各 glycosylated Hb は、0.05M 磷酸カリウム緩衝液 pH 6.78 で溶出したため、各 glycosylated Hb には磷酸が含有されている。この磷酸は、Hb の機能上、酸素

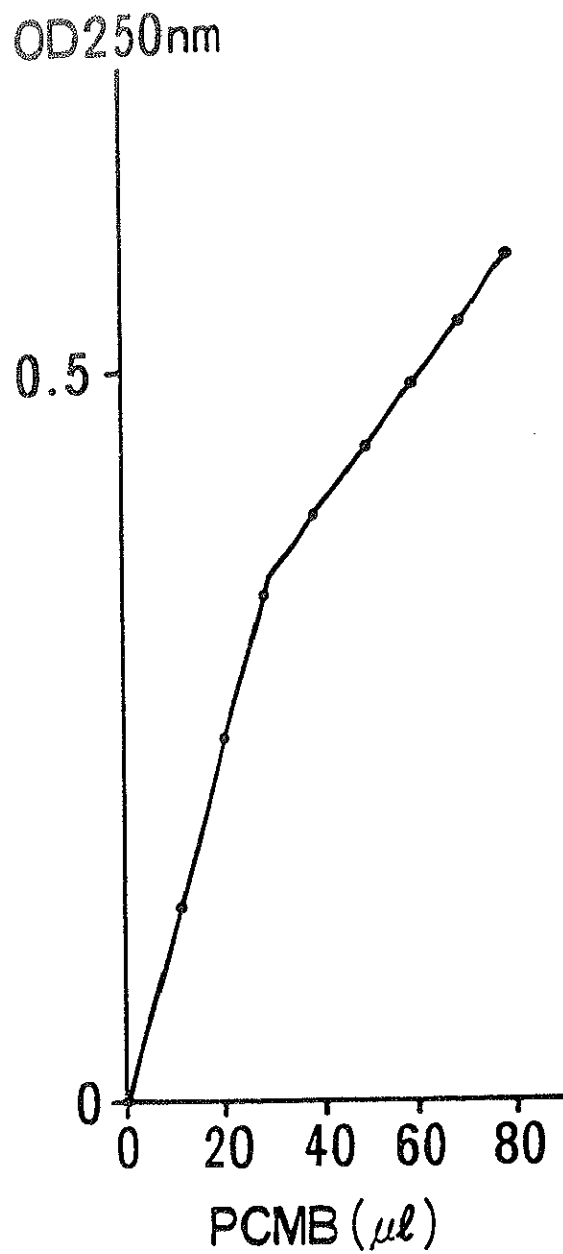


Fig 4. Absorbance of isolated chain of Hb, at a wavelength of 250 nm when 1 mM PCMB solution added.

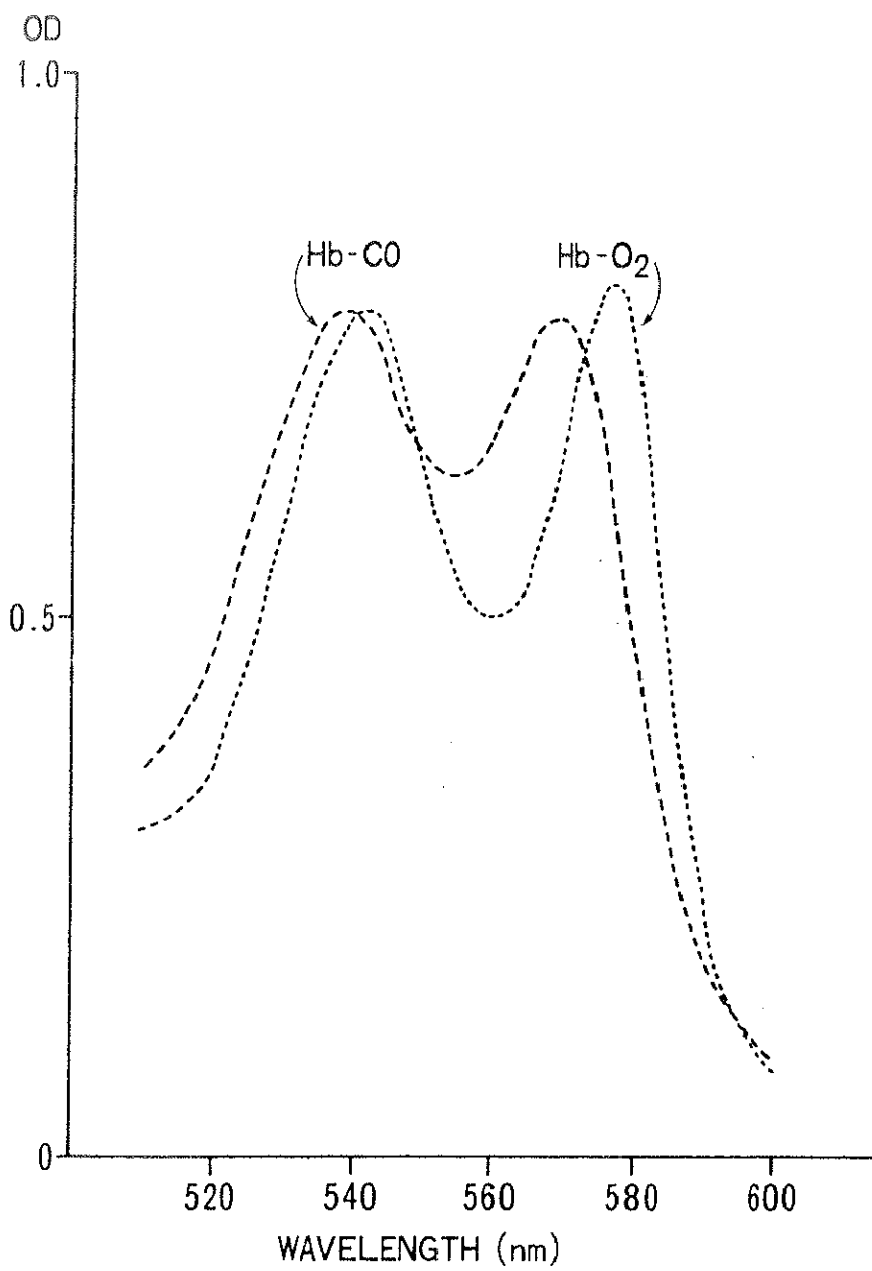


Fig 5. The difference spectra in Hb-O<sub>2</sub> and Hb-CO.  
 Hb-O<sub>2</sub> (.....) and Hb-CO (-----) are shown.

親和性を低下させる効果があるため除去する必要がある。

- ② セファデックス G-25 カラムを、0.05 M ピーストリス/塩酸緩衝液 pH 7.0 (0.1 M 塩化ナトリウムを含む) で平衡化させた後、各 glycosylated Hb をカラムにチャージして脱塩を行ない stripped Hb を得た。

### (13) 酸素解離曲線による酸素平衡の測定法

酸素解離曲線による酸素平衡の測定は、Makino らの方法(70)に準じ、以下の如く施行した。

酸素解離曲線測定装置の概略を Fig 6 に示す。すなわち、ステンレススチール製の反応槽の中に Hb 溶液 2.4 ml を入れ、マグネチック・スターラーで攪拌しながら反応槽中の気体を高純度のアルゴンで置換すると、溶液中の溶存酸素が気相に拡散し、溶液中の酸素分圧が低下してゆくので、Hb は次第に脱酸素化される。このときの反応槽を分光光度計に組みこみ、578nm の波長で Hb 溶液の吸光度変化を測定すると、その変化の割合は Hb の酸素飽和度に比例する。一方、溶液中の酸素分圧をクラーク型の酸素電極で測定し、その電気信号を先の分光光度計からの電気信号とともに X-Y 記録計に送ると、記録紙の上に酸素解離曲線が自動的に記録される。

- ① 50  $\mu$  M ヘム量に調整した Hb 溶液 2.4 ml を反応槽 (光路長 22 mm, 容量 5 ml) に入れた。
- ② 反応槽は 20°C に Haake FK-2 thermostat で調整した。
- ③ 吸光度の変化 (Y 軸) と Hb 溶液の酸素濃度の変化 (X 軸) は、それぞれ Cary 118 spectrophotometer (Varian) と Clark oxygen electrode (Yellow-Springs) を用いて測定し、ともに Yokogawa 3078 X-Y 記録計に記録させた。吸光度は 578 nm で測定した。
- ④ Hb 溶液の脱酸素化は、反応槽のガス相に高純度のアルゴンを通気させて行なった。
- ⑤ 99.5% 空気を Hb 溶液から除去した後、少量の亜ニチオン酸ナトリウムを反応槽内に添加し、残存する酸素を消費させて 0% 酸素飽和度を得るとともに、メトヘム化した Hb 溶液を還元した。
- ⑥ 次に空気をゆっくりと反応槽内の小さな穴から通気させ、酸素化を行なった。
- ⑦ 100% 酸素飽和度を得るために酸素を最後に通気し、酸素化を終了した。上記

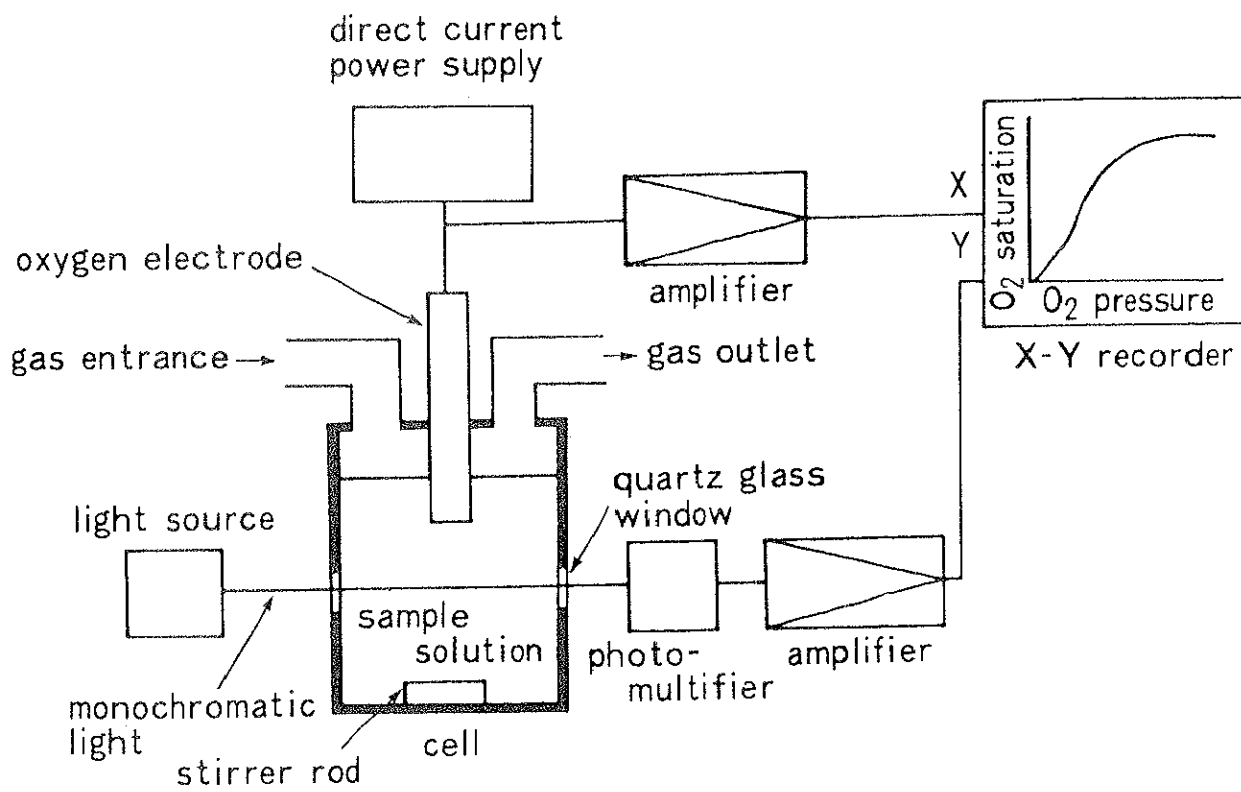


Fig 6. Automatic recorder equipment of oxygen dissociation curve.



方法より得られた酸素解離曲線の1例を Fig. 7に示す。この曲線より  $Y$  (酸素飽和度)  $= KP^n / 1 + KP^n$  ( $K$  : 定数,  $P$  : 酸素分圧) の Hill の式で計算したのが Fig. 8 の Hill プロットである。ヘム間相互作用を示す  $n_{max}$  は上記 Hill の式より得られた  $n$  値の最大値を使用した。

#### (14) Stopped flow 法による酸素平衡の測定法

Glycosylated Hb 単離鎖の酸素平衡の測定は、Makinoらの方法(71)に準じ、以下の如く施行した。

Bio-Rex 70 陽イオン交換樹脂を用いたカラムクロマトグラフィー法で分離した  $HbA_{1a}$  と対照としての  $HbA_0$ 。それぞれの  $\alpha$  鎖,  $\beta$  鎖を試料として用いた。 $\alpha$  鎖は 0.1M 燐酸カリウム緩衝液 pH 8.0で,  $\beta$  鎖は0.01M 燐酸カリウム緩衝液 pH 7.0で  $1 \mu M$  ヘム濃度に調整した。一酸化炭素あるいは酸素溶液用の緩衝液には,  $\alpha$  鎖は0.1M 燐酸カリウム緩衝液 pH 8.0,  $\beta$  鎖は0.01M 燐酸カリウム緩衝液 pH 7.0を用いた。酸素平衡機能の測定には, stopped flow apparatus, Model RA-401, data processor, Model 71 (Union Giken Co. Ltd, Hirakata, Japan)を用いた。セルは A, B 2つから成り, dead time は 0.25 msec であった。またこのセルの光路長は 2 mm のものを使用した。

#### ① 酸素結合速度定数の測定法

- i)  $1 \mu M$  ヘム濃度の Hb 溶液 3.0 ml をセル A へ入れた。
- ii) 緩衝液 3.0 ml をセル B へ入れ, 8% 酸素あるいは 4% 酸素で充分通気した。
- iii) Hb 溶液の脱酸素化を完全にするためセル A へグルコース・オキシダーゼ (100 mg/ml, Sigma Type IX) 溶液 30  $\mu$ l と, カタラーゼ (130.43 mg/ml, Sigma C-10) 溶液 30  $\mu$ l を添加し, さらに 0.5M ブドウ糖溶液 30  $\mu$ l を加え, ただちに攪拌した。
- iv) 5 分後 Hb 溶液と 8% あるいは 4% 酸素溶液とを瞬時に混合させ, 波長 419 nm で Hb の酸素化を吸光度で測定した。その 1 例を Fig 9 に示す。

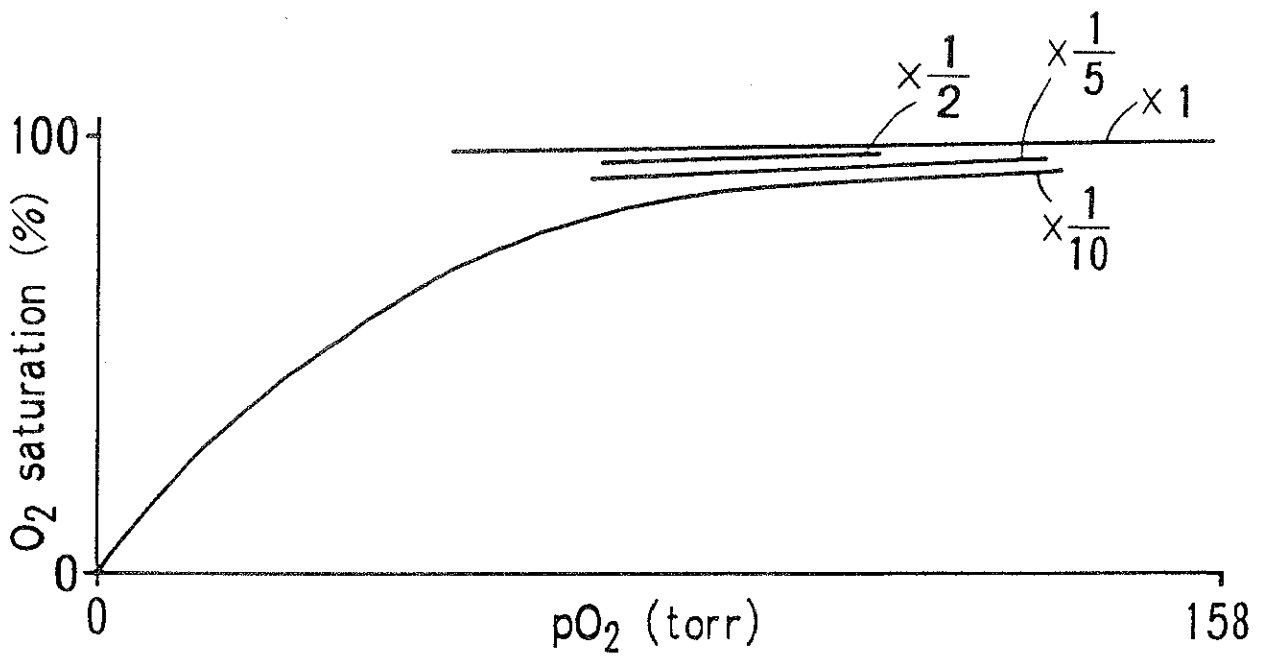


Fig 7. Example of oxygen dissociation curve.

The oxygen equilibria of glycosylated Hbs were measured on the solutions containing 50  $\mu$ M heme as described in materials and methods. The temperature was controlled at 20°C.

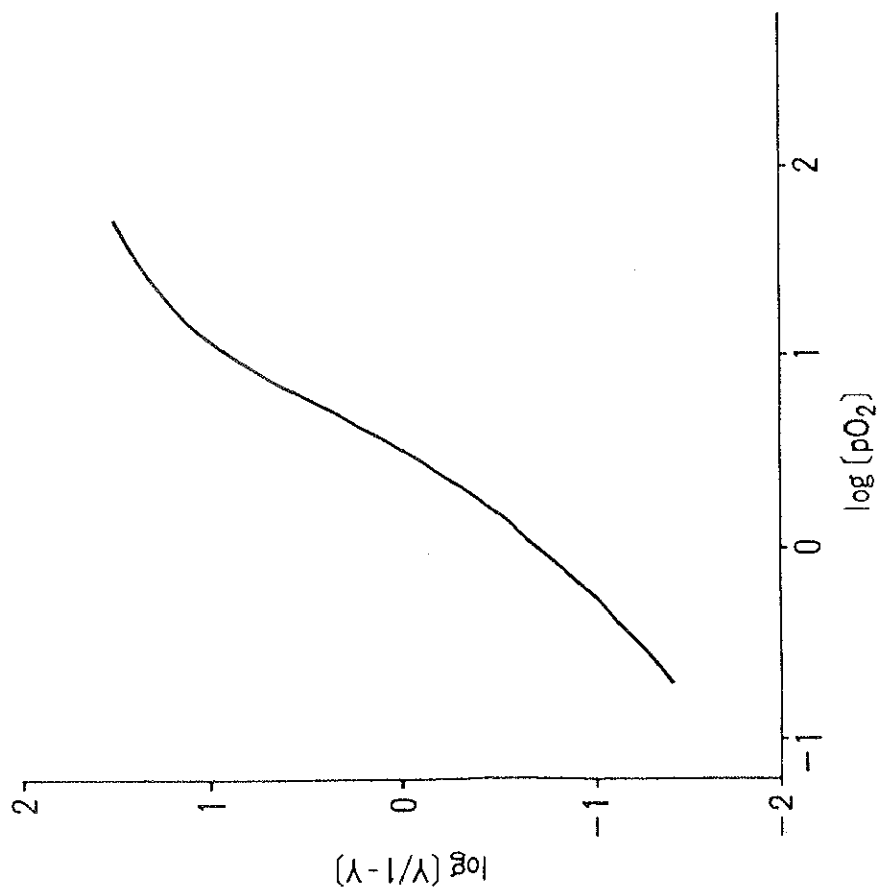


Fig 8. Example of Hill plot.

The oxygen equilibria of glycosylated Hbs were measured at 20°C. The Hill plot of O<sub>2</sub> saturation was calculated from Hill's equation as described in materials and methods.

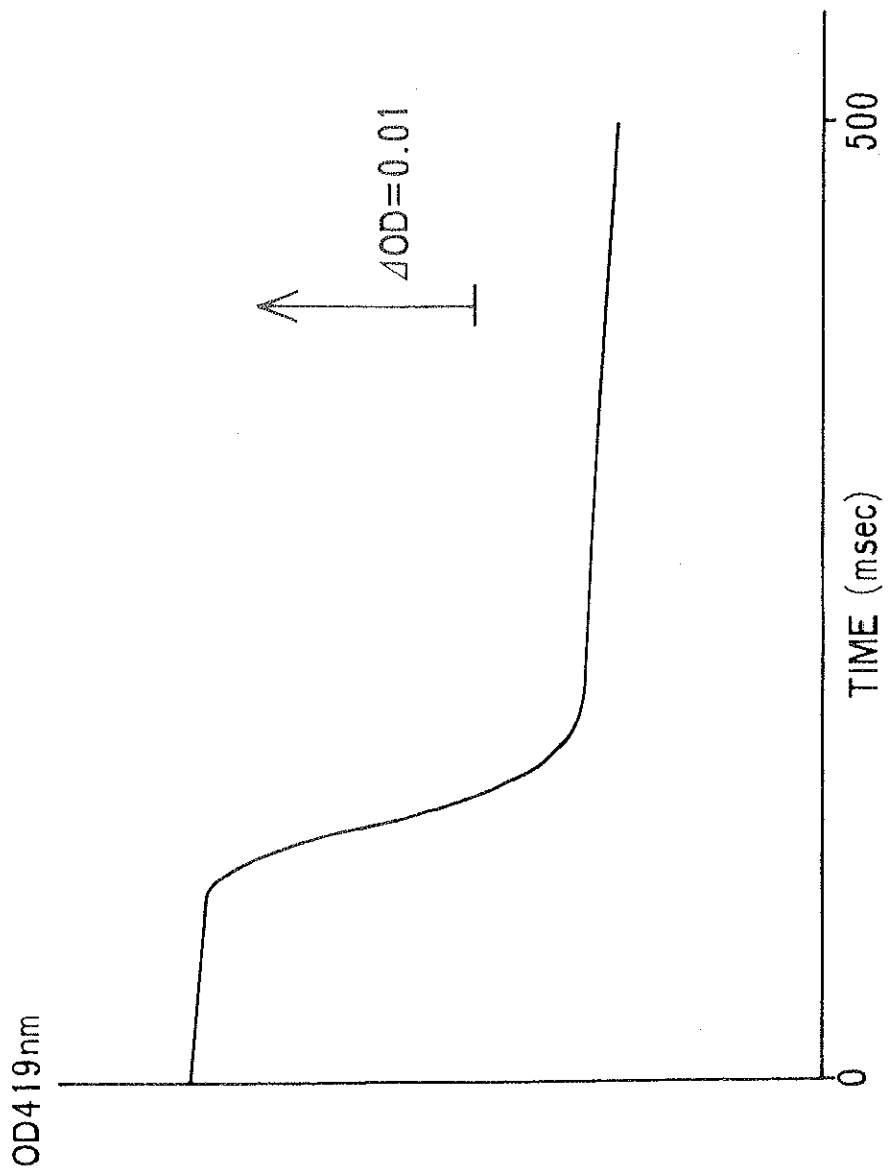


Fig 9. Example of stopped flow measurement of  $O_2$  association by isolated subunit of Hb.

Kinetic measurements were made on the subunit solutions containing  $1 \mu M$  heme with a stopped flow apparatus. The dead time of the apparatus was 0.25 msec, and the light path of the optical cell was 2 mm.

## ② 酸素解離速度定数の測定法

- i) 1  $\mu$ M ヘム濃度の Hb 溶液3.0 ml をセルAへ入れた。
- ii) 緩衝液3.0 mlをセルBへ入れ、窒素で充分通気して、緩衝液中の酸素を抜いた。
- iii) 亜ニチオン酸ナトリウム30 mg, あるいは15mg をセルBへ添加して1.0%あるいは 0.5%亜ニチオン酸ナトリウム水溶液とし、窒素で充分通気しながら攪拌した。
- iv) セルAの Hb 溶液とセルBの亜ニチオン酸ナトリウム水溶液を瞬時に混合し、波長419nm でHb の脱酸素化を吸光度より測定した。その1例を Fig 10 に示す。

## ③ 一酸化炭素結合速度定数の測定法

- i) 1  $\mu$ M ヘム濃度の Hb 溶液3.0 ml をセルAへ入れた。
- ii) 20% あるいは10%一酸化炭素溶液をフラスコ内で作製し、その3.0mlをセルBへ入れた。
- iii) Hb溶液および一酸化炭素溶液を脱酸素化するためにグルコース・オキシダーゼ (100mg/ml, Sigma Type IX) 溶液30  $\mu$ l とカタラーゼ (130.43mg/ml, Sigma C-10)溶液 30  $\mu$ l を両方のセルA・Bへ添加し、さらに0.5Mブドウ糖溶液30  $\mu$ l を両方のセルA・Bへ添加しただちに攪拌した。
- iv) 5分後、両方のセルA・Bへ亜ニチオン酸ナトリウムそのものを 1.5mgずつ添加し、ただちに攪拌した。
- v) 攪拌後すみやかに Hb 溶液と 20%あるいは10%一酸化炭素溶液を瞬時に混合させ、波長430nm で一酸化炭素の結合反応を吸光度より測定した。

上記測定結果より初期反応部分の傾きを、片対数プロットして結合速度定数・解離速度定数を計算した。なお100%酸素濃度は $1.384 \times 10^{-3}$  M, 100%一酸化炭素濃度は $1.035 \times 10^{-3}$  M として計算した。

統計処理は Student "t" test を用いた。

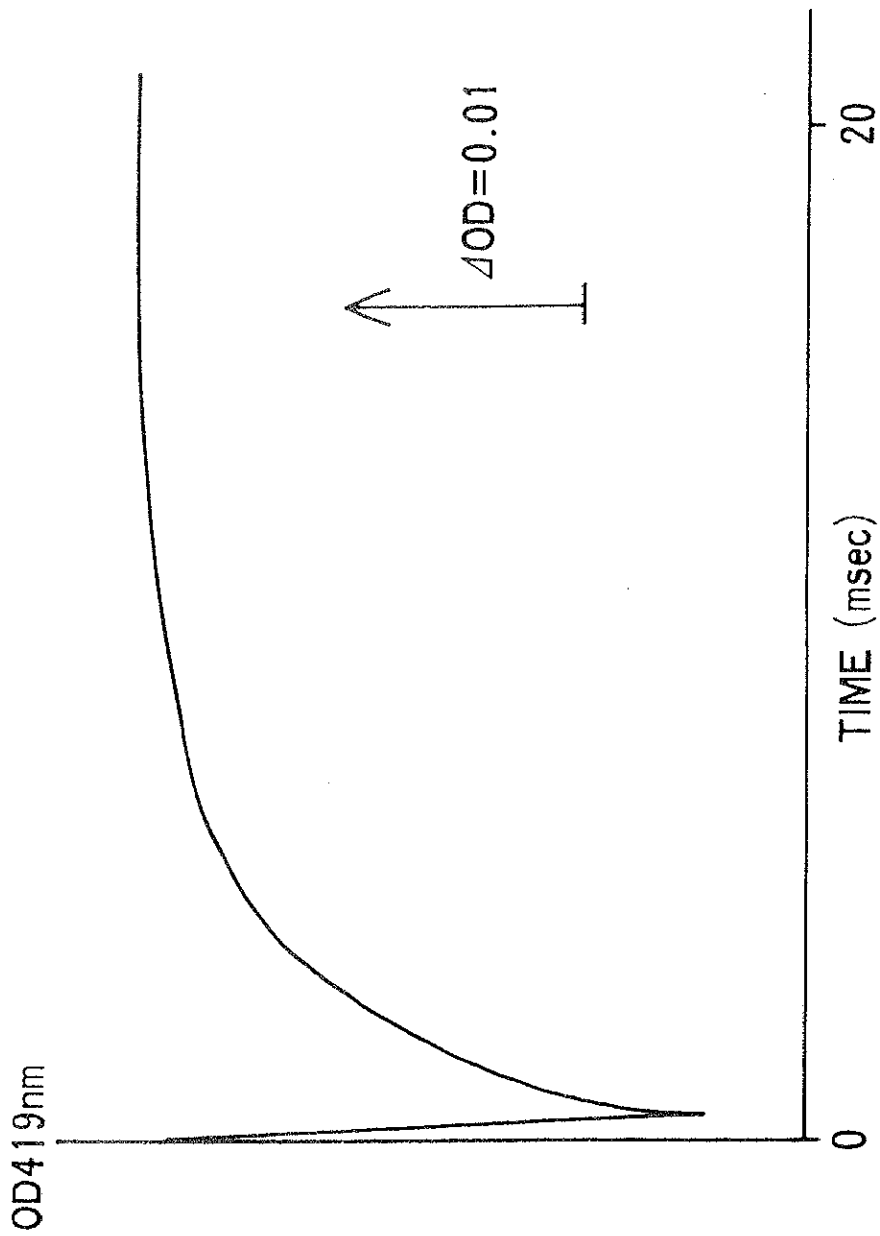


Fig 10. Example of stopped flow measurement of  $O_2$  dissociation by isolated subunit of Hb. The conditions were the same as in Fig 9.

### 第 III 章 結 果

#### A 構造解析

##### 1) 総燐定量

各 glycosylated Hb の総燐含有量を Fiske-Subbarow 法で測定した結果が Table 1 である。Glycosylated Hb は Bio-Rex 70 陽イオン交換樹脂によりカラムクロマトグラフィーで分離したものであるが、溶出には 0.05 M 燐酸カリウム緩衝液 pH 6.78 を使用した。従って glycosylated Hb 分画に燐酸が含まれており、これを除去する目的でセファデックス G-25 カラムを用いて脱塩を行なった。この stripped glycosylated Hb の総燐含有量を測定した。この結果 HbA<sub>1a1</sub> は約 1.0 mmol の燐酸が、また HbA<sub>1a2</sub> は約 0.5 mmol の燐酸が Hb 単量体の 1 mmol あたり含有されていることを認めた。これに対し、HbA<sub>1b</sub>、HbA<sub>1c</sub> および HbA<sub>0</sub> にはほとんど燐酸の含有を認めなかった。

##### 2) 5 HMF 定量

各 glycosylated Hb 分画の炭水化物含有量を Pecoraro らによる、稀酸で加水分解後に産生される 5 HMF の比色定量法で測定した結果が Table 2 である。HbA<sub>1a1</sub>、HbA<sub>1a2</sub>、HbA<sub>1b</sub>、および HbA<sub>1c</sub> はともに、約 0.5 mmol の 5 HMF が Hb 単量体の 1 mmol あたり産生されることを認めた。これとは対照的に HbA<sub>0</sub> には、ほとんど 5 HMF の産生は認められなかった。

##### 3) <sup>3</sup>H-ブドウ糖の取り込み実験

ユニバーサルラベルの<sup>3</sup>H-ブドウ糖を HbA<sub>0</sub> とみ置することにより、<sup>3</sup>Hラベルしたブドウ糖がどの glycosylated Hb 分画に取り込まれるかについて実験した結果を Fig. 11 に示す。比活性で見ると HbA<sub>1a</sub> と HbA<sub>1c</sub> に<sup>3</sup>H-ブドウ糖の取り込みが認められたのに対し、HbA<sub>1b</sub> では、ほとんど<sup>3</sup>H-ブドウ糖の取り込みは認められなかった。HbA<sub>1c</sub> は複数の取り込みが認められた。さらに HbA<sub>0</sub> の中にも<sup>3</sup>H-ブドウ糖が取り込まれる部分の存在することを認めた。なお<sup>3</sup>H-ブドウ糖の取り込みを認めた HbA<sub>1a</sub>、HbA<sub>1c</sub> および HbA<sub>0</sub> をセファデックス G-25 カラムで脱塩し、比活性で比

Table 1 Phosphate content (per Hb monomer)

Hb	$\bar{x} \pm \text{I.S.D. (mmol/Hb mmol)}$
HbA <sub>1a1</sub>	0.98 $\pm$ 0.07
HbA <sub>1a2</sub>	0.48 $\pm$ 0.16
HbA <sub>1b</sub>	0.03 $\pm$ 0.04
HbA <sub>1c</sub>	0.08 $\pm$ 0.10
HbA <sub>0</sub>	0.02 $\pm$ 0.03

(N=5)



Table 2. 5 hydroxymethyl-2-furfural content  
(per Hb monomer)

Hb	$\bar{x} \pm 1S.D.$ (mmol/Hb mmol)
HbA <sub>1a1</sub>	0.48 $\pm$ 0.12
HbA <sub>1a2</sub>	0.57 $\pm$ 0.20
HbA <sub>1b</sub>	0.50 $\pm$ 0.13
HbA <sub>1c</sub>	0.45 $\pm$ 0.13
HbA <sub>0</sub>	0.05 $\pm$ 0.03

(N=10)

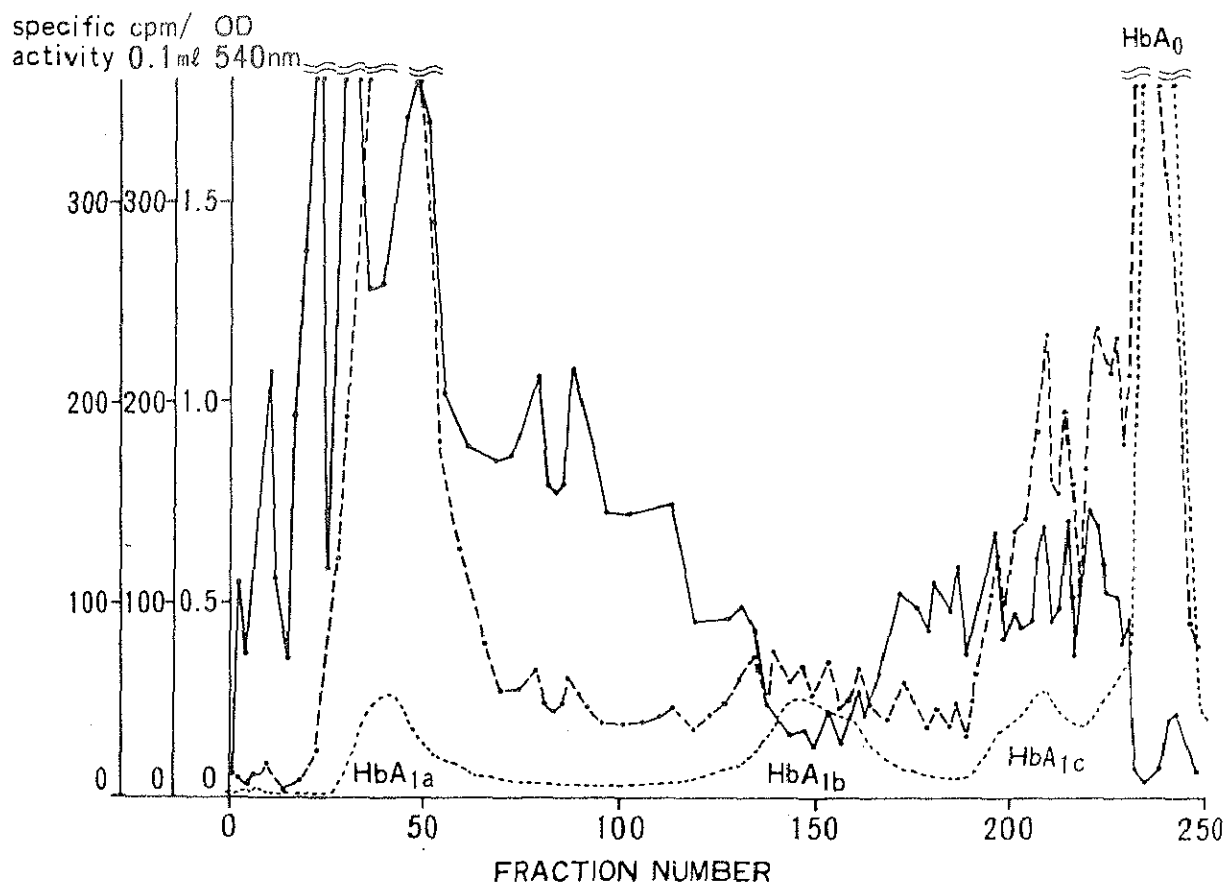


Fig 11. Elution profile of purified HbA<sub>0</sub> incubated in vitro with <sup>3</sup>H-glucose on Bio-Rex 70 column chromatography.

Purified HbA<sub>0</sub> (1.68 mM in heme, 18 ml) was incubated with 0.15 M glucose (2.0 ml) and 87.7 μM <sup>3</sup>H-glucose (0.3 ml) for 21 days at 37°C. After passage through a Sephadex G-25 column to stop the reaction, the incubation mixture was chromatographed on a Bio-Rex 70 column. The conditions were the same as in Fig 2. Optical density (·····), radioactivity (-----) and specific activity (——) of eluate from Bio-Rex 70 column are shown.

較してみると  $\text{HbA}_{1c}$  と  $\text{HbA}_0$  は、脱塩前後でその値に変化は認められなかった。これに対し、 $\text{HbA}_{1a}$  は、その比活性が脱塩後に1.3%に低下することを認めた。

## B 定量分析

### 1) 糖尿病患者と対照の glycosylated Hb の溶出曲線

糖尿病患者と対照の glycosylated Hb の溶出曲線を Fig 12 に示す。 $\text{HbA}_{1b}$  は、さらに2つ、 $\text{HbA}_{1c}$  はさらに3つの分画に細分化され順に  $\text{HbA}_{1b_1}$ 、 $\text{HbA}_{1b_2}$  と  $\text{HbA}_{1c_1}$ 、 $\text{HbA}_{1c_2}$ 、 $\text{HbA}_{1c_3}$  と命名して検討した。McDonaldらの方法(14)により、Bio-Rex 70 陽イオン交換樹脂を用いて分離した  $\text{HbA}_{1a}$ 、 $\text{HbA}_{1b}$ 、 $\text{HbA}_{1c}$  のそれぞれを、本 HPLC 法で cochromatography にかけて、各分画を確認した。一方、臍帯血の溶出曲線より、HbF は本 HPLC 法では、 $\text{HbA}_{1b_2}$  と  $\text{HbA}_{1c_1}$  の間に認められた。しかし本研究では、この  $\text{HbA}_{1b_2}$  と  $\text{HbA}_{1c_1}$  分画の含有量だけが增加している検体は認められなかった。

### 2) 糖尿病患者と対照の glycosylated Hb の割合

糖尿病患者と対照の glycosylated Hb の割合を Table 3 に示す。糖尿病患者の  $\text{HbA}_1$  は、 $A_D$  群・ $B_D$  群とも対照  $A_N$  群・ $B_N$  群に比べ有意な増加を認めた ( $A_D$ :  $\text{HbA}_1$   $p < 0.001$ ,  $B_D$ :  $\text{HbA}_1$   $p < 0.001$ )。  $\text{HbA}_{1b}$  とその亜分画である  $\text{HbA}_{1b_1}$ 、 $\text{HbA}_{1b_2}$  は糖尿病患者の  $A_D$  群・ $B_D$  群とも対照  $A_N$  群・ $B_N$  群に比べ有意な増加を認めた ( $A_D$ :  $\text{HbA}_{1b}$   $p < 0.001$ ,  $\text{HbA}_{1b_1}$   $p < 0.01$ ,  $\text{HbA}_{1b_2}$   $p < 0.02$ ,  $B_D$ :  $\text{HbA}_{1b}$   $p < 0.001$ ,  $\text{HbA}_{1b_1}$   $p < 0.05$ ,  $\text{HbA}_{1b_2}$   $p < 0.001$ )。  $\text{HbA}_{1c}$  とその亜分画である  $\text{HbA}_{1c_2}$ 、 $\text{HbA}_{1c_3}$  ( $\text{HbA}_{1c_1}$  は除く) は、糖尿病患者  $A_D$  群・ $B_D$  群で、対照  $A_N$  群・ $B_N$  群に比べ有意な増加を認めた ( $A_D$ :  $\text{HbA}_{1c}$   $p < 0.01$ ,  $\text{HbA}_{1c_2}$   $p < 0.01$ ,  $\text{HbA}_{1c_3}$   $p < 0.001$ ,  $B_D$ :  $\text{HbA}_{1c}$   $p < 0.01$ ,  $\text{HbA}_{1c_2}$   $p < 0.01$ ,  $\text{HbA}_{1c_3}$   $p < 0.02$ )。しかし、 $A_D$  群と  $B_D$  群、 $A_N$  群と  $B_N$  群の間では、各 glycosylated Hb 分画の割合に有意差を認めなかった ( $p > 0.05$ )。

### 3) 採血時における glycosylated Hb の割合と空腹時・食後血糖値との関係

採血時における各 glycosylated Hb 分画の割合と空腹時血糖値および食後血糖値との相関関係を Table 4 に示す。 $\text{HbA}_1$ 、 $\text{HbA}_{1c}$  とその亜分画は、空腹時・食後血糖値ともよい相関を示した ( $A_D$ :  $\text{HbA}_1$   $r=0.589$ ,  $p < 0.01$ ,  $\text{HbA}_{1c}$   $r=0.664$ ,  $p <$

Absorbance at 415nm

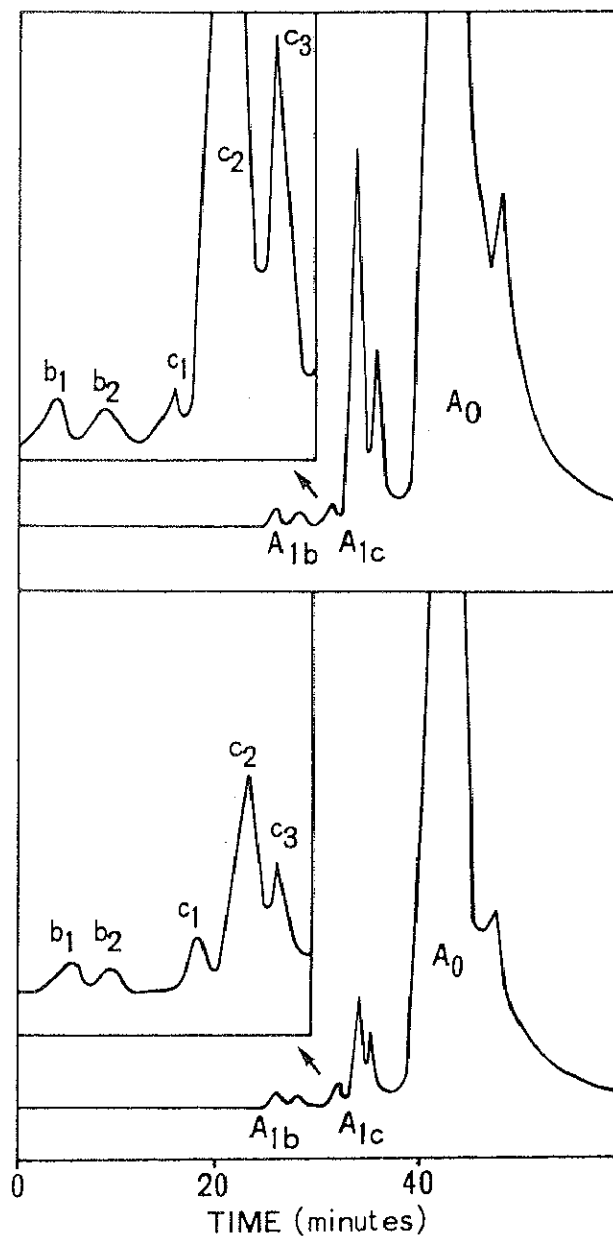


Fig 12. Elution curves for hemoglobin from a diabetic patient and a normal subject. (upper panel: a diabetic patient, lower panel: a normal subject)

Eight  $\mu$ l of the hemolysate diluted 9 times with 50 mM sodium phosphate buffer pH 5.80 were applied on the HPLC column. The column was eluted at a speed of 1 ml/min with 50 mM sodium phosphate biffer pH 5.80 with a linear 0-0.2 M gradient of NaCl for 30 minutes at 25°C. The effluent was monitored at a wavelength of 415 nm.

Table 3. Percentages of glycosylated Hbs in diabetic patients and in normal subjects.

	n	HbA <sub>1b</sub>	HbA <sub>1b1</sub>	HbA <sub>1b2</sub>	HbA <sub>1c</sub>	HbA <sub>1c1</sub>	HbA <sub>1c2</sub>	HbA <sub>1c3</sub>	HbA <sub>1</sub>
A <sub>D</sub> : Diabetic patients	26	1.53* ±0.43	0.96** ±0.30	0.58*** ±0.33	9.30** ±2.13	0.52 ±0.17	5.79** ±1.47	2.98* ±0.92	10.83* ±2.44
A <sub>N</sub> : Normal subjects	5	0.74 ±0.14	0.48 ±0.08	0.19 ±0.07	5.90 ±0.33	0.63 ±0.15	3.51 ±0.40	1.75 ±0.37	6.64 ±0.46
B <sub>D</sub> : Diabetic patients	19	1.59* ±0.38	0.97*** ±0.37	0.62* ±0.22	9.41** ±2.08	0.63 ±0.37	6.00** ±1.51	2.88*** ±0.69	11.00* ±2.23
B <sub>N</sub> : Normal subjects	5	0.73 ±0.14	0.58 ±0.12	0.13 ±0.01	6.42 ±0.74	0.69 ±0.09	3.73 ±0.52	1.91 ±0.93	7.15 ±0.78

1)

2)

1) Upper panel; fasting state, 2) lower panel: postprandial state

Results represent mean±1 standard deviation.

\*Difference from the control significant, p<0.001.

\*\*Difference from the control significant, p<0.01.

\*\*\*Difference from the control significant, p<0.02.

\*\*\*\*Difference from the control significant, p<0.05.

Table 4. Coefficients of correlation between the percentages of each Hb subfraction and the levels of fasting blood glucose, and between the percentages of each Hb subfraction and the levels of postprandial blood glucose of the day when the blood samples were taken. The conditions were the same as in Table 3.

	HbA <sub>1b</sub>	HbA <sub>1b1</sub>	HbA <sub>1b2</sub>	HbA <sub>1c</sub>	HbA <sub>1c1</sub>	HbA <sub>1c2</sub>	HbA <sub>1c3</sub>	HbA <sub>1</sub>	n
A D	0.375	0.135	0.325	0.664*	0.601*	0.688*	0.472**	0.589**	26
B D	0.206	-0.074	0.498***	0.677**	0.319	0.642**	0.679**	0.665**	19

\* Coefficient of correlation significant,  $p < 0.001$ .

\*\* Coefficient of correlation significant,  $p < 0.01$ .

\*\*\* Coefficient of correlation significant,  $p < 0.02$ .

\*\*\*\* Coefficient of correlation significant,  $p < 0.05$ .

0.001,  $HbA_{1c_1}$ ,  $r=0.801$ ,  $p<0.01$ ,  $HbA_{1c_2}$ ,  $r=0.688$ ,  $p<0.001$ ,  $HbA_{1c_3}$ ,  $r=0.472$ ,  $p<0.02$ ,  $B_D$ :  $HbA_{1c}$ ,  $r=0.665$ ,  $p<0.01$ ,  $HbA_{1c}$ ,  $r=0.677$ ,  $p<0.01$ ,  $HbA_{1c_2}$ ,  $r=0.642$ ,  $p<0.01$ ,  $HbA_{1c_3}$ ,  $r=0.679$ ,  $p<0.01$ 。これに対し  $HbA_{1b}$  とその亜分画である  $HbA_{1b_1}$ ・ $HbA_{1b_2}$  は、糖尿病患者で有意に増加している (Table 3) にもかかわらず空腹時・食後血糖値とはともに相関を示さなかった ( $B_D$ :  $HbA_{1b_2}$ ,  $r=0.498$ ,  $p<0.05$  以外は  $p>0.05$ )。また  $A_D$  群と  $B_D$  群の間に相関係数でほとんど差を認めず、測定日の食事による影響は認められないため以後は空腹時採血群で検討した。

#### 4) Glycosylated Hb の割合と過去5ヶ月間の空腹時血糖値との関係

各 glycosylated Hb 分画の割合と過去5ヶ月間の空腹時血糖値との相関関係を Table 5 に示す。 $HbA_{1c}$ ,  $HbA_{1c}$  とともに  $HbA_{1c_1}$ ,  $HbA_{1c_2}$ ,  $HbA_{1c_3}$  とともに過去4-5ヶ月間の空腹時血糖値とよい相関を示した ( $HbA_{1c}$ : 0~5ヶ月間  $p<0.001$ ~ $p<0.01$ ,  $HbA_{1c}$ : 0~5ヶ月間  $p<0.001$ ~ $p<0.01$ ,  $HbA_{1c_1}$ : 0~4ヶ月間  $p<0.001$ ~ $p<0.01$ ,  $HbA_{1c_2}$ : 0~4ヶ月間  $p<0.001$ ~ $p<0.05$ ,  $HbA_{1c_3}$ : 0~5ヶ月間  $p<0.001$ ~ $p<0.05$ )。これに対し  $HbA_{1b}$  とその亜分画は過去5ヶ月間の空腹時血糖値とは相関を認めなかった ( $HbA_{1b}$ : 2~3ヶ月前  $p<0.01$ ~ $p<0.02$ ,  $HbA_{1b_1}$ : 2ヶ月前  $p<0.001$  以外はすべて  $p>0.05$ )。  $HbA_{1c}$  の亜分画では、 $HbA_{1c_1}$  と  $HbA_{1c_2}$  が、3ヶ月前の空腹時血糖値と最もよい相関を認めた ( $HbA_{1c_1}$ ,  $p<0.001$ ,  $HbA_{1c_2}$ ,  $p<0.001$ )。

#### 5) 糖尿病性白内障, 糖尿病性神経障害の合併の有無による glycosylated Hb の割合

糖尿病性白内障, 糖尿病性神経障害の合併例と, 合併症のない糖尿病例の各 glycosylated Hb 分画の割合の比較を Table 6 に示す。上記糖尿病合併例と, 合併症のない糖尿病例は  $HbA_{1c}$  と  $HbA_{1b}$ ・ $HbA_{1c}$  と, その亜分画の中では特に  $HbA_{1b_1}$ ,  $HbA_{1c_2}$  が対照に比べ有意な増加を認めた (糖尿病性白内障合併例  $HbA_{1b_1}$ ,  $p<0.001$ ,  $HbA_{1c_2}$ ,  $p<0.01$ , 糖尿病性神経障害合併例  $HbA_{1b_1}$ ,  $p<0.001$ ,  $HbA_{1c_2}$ ,  $p<0.001$ , 合併症のない糖尿病例  $HbA_{1b_1}$ ,  $p<0.01$ ,  $HbA_{1c_2}$ ,  $p<0.01$ )。しかし糖尿病性白内障, 糖尿病性神経障害, 合併症のない糖尿病例の3群の間では, 各 glycosylated Hb 分画の割合に, いずれも有意差は認められなかった ( $p>0.05$ )。

Table 5. Coefficients of correlation between the percentages of each Hb subfraction and the levels of fasting blood glucose in the prior 5 months.

Hb	0	1	2	3	4	5
HbA <sub>1b</sub>	0.375	0.245	0.469 <sup>**</sup>	0.412 <sup>***</sup>	0.251	0.026
A <sub>1b1</sub>	0.135	0.183	0.634 <sup>*</sup>	0.155	0.278	-0.214
A <sub>1b2</sub>	0.325	0.290	-0.069	-0.014	-0.059	0.056
HbA <sub>1c</sub>	0.664 <sup>*</sup>	0.719 <sup>*</sup>	0.616 <sup>*</sup>	0.774 <sup>*</sup>	0.594 <sup>**</sup>	0.578 <sup>**</sup>
A <sub>1c1</sub>	0.601 <sup>**</sup>	0.626 <sup>*</sup>	0.670 <sup>*</sup>	0.741 <sup>*</sup>	0.599 <sup>**</sup>	0.373
A <sub>1c2</sub>	0.688 <sup>*</sup>	0.638 <sup>*</sup>	0.573 <sup>**</sup>	0.729 <sup>*</sup>	0.444 <sup>***</sup>	0.327
A <sub>1c3</sub>	0.472 <sup>**</sup>	0.406 <sup>***</sup>	0.413 <sup>***</sup>	0.426 <sup>***</sup>	0.573 <sup>**</sup>	0.665 <sup>*</sup>
HbA <sub>1</sub>	0.589 <sup>*</sup>	0.527 <sup>**</sup>	0.605 <sup>**</sup>	0.754 <sup>*</sup>	0.550 <sup>**</sup>	0.522 <sup>**</sup>

\*Coefficient of correlation significant,  $p < 0.001$ .

\*\*Coefficient of correlation significant,  $p < 0.01$ .

\*\*\*Coefficient of correlation significant,  $p < 0.02$ .

\*\*\*\*Coefficient of correlation significant,  $p < 0.05$ .



Table 6. Percentages of each Hb subfraction of patients with or without complications and normal subjects.

	n	HbA <sub>1b</sub>	HbA <sub>1b1</sub>	HbA <sub>1b2</sub>	HbA <sub>1c</sub> (%)	HbA <sub>1c1</sub>	HbA <sub>1c2</sub>	HbA <sub>1c3</sub>	HbA <sub>1</sub>	blood glucose (mg/dl)
Diabetic patients with										
Diabetic cataracts	5	1.41 <sup>**</sup> ±0.37	1.10 <sup>*</sup> ±0.20	0.44 ±0.24	8.48 <sup>**</sup> ±1.31	0.45 ±0.09	5.58 <sup>**</sup> ±0.86	2.45 ±0.70	9.89 <sup>*</sup> ±1.33	138.2 <sup>**</sup> ±24.2
Diabetic neuropathy	5	1.26 <sup>**</sup> ±0.32	0.98 <sup>*</sup> ±0.17	0.44 ±0.28	8.96 <sup>*</sup> ±1.00	0.51 ±0.12	5.71 <sup>*</sup> ±0.29	2.51 ±0.85	10.39 <sup>*</sup> ±1.04	204.7 <sup>*</sup> ±38.7
No complica- tion	13	1.63 <sup>*</sup> ±0.45	0.98 <sup>**</sup> ±0.32	0.65 <sup>**</sup> ±0.34	9.44 <sup>**</sup> ±2.67	0.53 ±0.19	6.12 <sup>**</sup> ±1.76	2.79 <sup>***</sup> ±0.95	11.06 <sup>**</sup> ±3.06	164.2 <sup>***</sup> ±56.7
Normal subjects	5	0.74 ±0.14	0.48 ±0.08	0.19 ±0.07	5.90 ±0.33	0.63 ±0.15	3.51 ±0.40	1.75 ±0.37	6.64 ±0.46	93.2 ±2.9

Results represent mean±1 standard deviation.

\*Difference from the control significant, p<0.001.

\*\*Difference from the control significant, p<0.01.

\*\*\*Difference from the control significant, p<0.02.

\*\*\*\*Difference from the control significant, p<0.05.

## C 機能解析

### 1) Glycosylated Hb の酸素平衡

Glycosylated Hb 四量体の酸素平衡機能を Table 7 に示す。HbA<sub>1c</sub> の酸素親和性は HbA<sub>0</sub> の酸素親和性に比べ増加を認めた ( $p < 0.001$ )。反対に HbA<sub>1a1</sub>, HbA<sub>1a2</sub> の酸素親和性は HbA<sub>0</sub> に比べ低下を認めた ( $p < 0.001$ ,  $p < 0.001$ )。また HHP の酸素親和性に及ぼす効果は glycosylated Hb では HbA<sub>0</sub> に比べ低下することを認めた ( $p < 0.001$ )。特に HbA<sub>1a1</sub>, HbA<sub>1a2</sub> は他の成分に比べその効果は著しく低下していた ( $p < 0.001$ ,  $p < 0.001$ )。以上の結果は McDonald らの成績とほぼ一致していた(46)。

### 2) Glycosylated Hb の $\alpha$ 鎖, $\beta$ 鎖の酸素平衡

各 glycosylated Hb を  $\alpha$  鎖と  $\beta$  鎖に単離し, その酸素親和性を検討した (Table 8)。Bio-Rex 70 陽イオン交換樹脂を用いたカラムクロマトグラフィーで glycosylated Hb を分離する前の unfractionated Hb の  $\alpha$  鎖,  $\beta$  鎖の  $P_{50}$  は各々 0.43 mmHg, 0.37 mmHg と Brunori らの成績とほぼ一致した(72)。HbA<sub>1a</sub>, HbA<sub>1b</sub> と HbA<sub>1c</sub> の  $\alpha$  鎖の酸素親和性は, HbA<sub>0</sub> の  $\alpha$  鎖に比べやや増加していることを認めた ( $p < 0.001$ ,  $p < 0.001$ ,  $p < 0.05$ )。  $\beta$  鎖の場合 HbA<sub>1c</sub> と HbA<sub>0</sub> の間に差は認められなかった ( $p > 0.05$ ) が, HbA<sub>1a</sub> の  $\beta$  鎖の酸素親和性は著しい低下を認めた ( $p < 0.001$ )。ゆえに HbA<sub>1a</sub> 四量体の酸素親和性の低下は, HbA<sub>1a</sub> の  $\beta$  鎖の酸素親和性の低下に基づくものと思われた。

### 3) Glycosylated Hb の $\alpha$ 鎖, $\beta$ 鎖の一酸化炭素結合速度と酸素結合速度

HbA<sub>1a</sub>  $\beta$  鎖の酸素親和性の低下の酸素平衡特性を探るために, stopped flow 法により, HbA<sub>1a</sub> と対照としての HbA<sub>0</sub> の  $\alpha$  鎖,  $\beta$  鎖の結合速度定数と解離速度定数を測定した。Table 9 に一酸化炭素結合速度定数と酸素結合速度定数を示す。単離した  $\alpha$  鎖,  $\beta$  鎖ともに HbA<sub>1a</sub> の一酸化炭素結合速度定数 ( $l'$ ), 酸素結合速度定数 ( $k'$ ) は, HbA<sub>0</sub> の  $\alpha$  鎖,  $\beta$  鎖の  $l'$ ,  $k'$  とほぼ一致することを認めた。

### 4) Glycosylated Hb の $\alpha$ 鎖, $\beta$ 鎖の酸素解離速度

HbA<sub>1a</sub> と対照として HbA<sub>0</sub> の  $\alpha$  鎖,  $\beta$  鎖の酸素解離速度定数を Table 10 に示す。HbA<sub>1a</sub> の  $\alpha$  鎖は, HbA<sub>0</sub> の  $\alpha$  鎖と比べて差を認めなかった ( $p > 0.05$ )。これに対して HbA<sub>1a</sub> の  $\beta$  鎖の酸素解離速度定数は, HbA<sub>0</sub> の  $\beta$  鎖に比べて有意な亢進を認めた ( $p < 0.001$ )。

Table 7. O<sub>2</sub> equilibrium parameters of hemoglobin components in 0.05 M bis-Tris/HCl buffer, pH 7.0 plus 0.1 M NaCl at 20°C.

	NO IHP		500 μM IHP		P <sub>50</sub> (IHP)/	
	P <sub>50</sub>	n <sub>max</sub>	P <sub>50</sub>	n <sub>max</sub>	P <sub>50</sub>	P <sub>50</sub>
HbA <sub>1a1</sub>	* 4.41±0.13	1.89±0.03	* 6.12±0.10	1.83±0.04	1.39	
HbA <sub>1a2</sub>	* 4.26±0.18	1.41±0.03	* 7.77±0.08	1.24±0.04	1.82	
HbA <sub>1b</sub>	3.93±0.30	1.84±0.08	* 12.03±0.94	2.17±0.17	3.06	
HbA <sub>1c</sub>	* 2.08±0.08	1.56±0.06	* 13.45±0.66	1.74±0.17	6.47	
HbA <sub>0</sub>	3.63±0.07	2.30±0.03	41.67±2.29	2.06±0.14	11.48	

Results represent mean±1 standard deviation of four experiments.

\* Difference from HbA<sub>0</sub> significant, p<0.001.

Abbreviations and symbol: IHP, inositol hexaphosphate; P<sub>50</sub>,

partial pressure of O<sub>2</sub> giving half saturation of the heme;

n<sub>max</sub>, maximum slope in the Hill plots.

Table 8. P<sub>50</sub> values for O<sub>2</sub> of the  $\alpha$  and  $\beta$  chains of hemoglobin components at 20°.

Chain	P <sub>50</sub> (mmHg)		
	HbA <sub>1a</sub>	HbA <sub>1b</sub>	HbA <sub>1c</sub> HbA <sub>0</sub>
$\alpha^a$	* 0.30±0.02	* 0.35±0.02	** 0.36±0.07 0.46±0.04
$\beta^b$	* 0.57±0.02	** 0.31±0.04	0.36±0.01 0.36±0.01

a) In 0.1 M potassium phosphate buffer pH 8.0.

b) In 0.01 M potassium phosphate buffer pH 7.0.

Results represent mean±1 standard deviation of five experiments.

\* Difference from HbA<sub>0</sub> significant, p<0.001.

\*\* Difference from HbA<sub>0</sub> significant, p<0.05.

Table 9. Rate constants of CO and O<sub>2</sub> binding of the isolated chains. The conditions were the same as in Table 8.

Hb chain	for CO ( $\text{l}'\times 10^{-6}$ )			for O <sub>2</sub> ( $\kappa'\times 10^{-7}$ )		
	10% CO	5% CO	4% O <sub>2</sub>	4% O <sub>2</sub>	2% O <sub>2</sub>	
	$\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$			$\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$		
HbA <sub>1a</sub> α	1.0±0.1	1.1±0.1	3.3±0.1	4.2±0.9		
HbA <sub>0</sub> α	1.2±0.1	1.3±0.2	4.1±1.3	4.0±0.6		
HbA <sub>1a</sub> β	1.3±0.1	1.4±0.1	3.9±1.0	5.2±1.1		
HbA <sub>0</sub> β	1.2±0.1	1.3±0.2	3.1±0.9	5.1±0.6		

Results represent mean±1 standard deviation of four experiments.

Table 10. Rate constants of O<sub>2</sub> dissociation of the isolated chains.  
The conditions were the same as in Table 8.

Hb chain	Rate constant (κ)	
	0.50% dithionite	0.25% dithionite
HbA <sub>1a</sub> α	21.5 ± 0.9	21.0 ± 1.7
HbA <sub>0</sub> α	21.7 ± 0.5	22.1 ± 0.8
HbA <sub>1a</sub> β	* 18.3 ± 0.6	* 18.6 ± 1.1
HbA <sub>0</sub> β	13.6 ± 0.7	12.5 ± 0.8

Results represent mean ± standard deviation of five experiments.

\* Difference from HbA<sub>0</sub> significant, p < 0.001.

## 第 IV 章 考 察

### A 構造解析

#### 1) 総磷定量

HbA<sub>1a1</sub>, HbA<sub>1a2</sub>, HbA<sub>1b</sub> と HbA<sub>1c</sub> は  $\beta$ 鎖 N 末端に, それぞれ 1,6 二磷果糖, 6 磷糖ブドウ糖, (HbA<sub>1b</sub> は不明) とブドウ糖が結合して形成されたものと報告されている(14-19)。従って各 stripped glycosylated Hb の総磷含有量は, Hb 単量体 1 mmol あたり HbA<sub>1a1</sub> 1 mmol, HbA<sub>1a2</sub> 0.5 mmol, HbA<sub>1b</sub>・HbA<sub>1c</sub> と HbA<sub>0</sub> は 0 mmol であることが予測される。本研究では, HbA<sub>1a1</sub>, HbA<sub>1a2</sub>, HbA<sub>1b</sub>, HbA<sub>1c</sub> と HbA<sub>0</sub> の総磷含有量の測定値が, 予測値と近似した結果を示したことから, McDonald らの説(14)が当を得たものであることが再確認できた。また HbA<sub>1b</sub> は, 0.03 mmol と低値を示し, この HbA<sub>1b</sub> の構造には磷酸は関与していないことが推察される。

#### 2) 5 HMF 定量

HbA<sub>1a1</sub>, HbA<sub>1a2</sub> と HbA<sub>1c</sub> は,  $\beta$ 鎖 N 末端に糖磷酸エステルかブドウ糖が結合することにより, それぞれ Hb 単量体 1 mmol あたり 0.5 mmol の 5 HMF 産生が予測される。本研究の結果は各 glycosylated Hb が約 0.5 mmol の 5 HMF 産生を示し, 予測値と一致する成績が得られた。また HbA<sub>1b</sub> に関しては, 他の glycosylated Hb と同様約 0.5 mmol の 5 HMF 産生が認められたことより, HbA<sub>1b</sub> も何らかの炭水化物の結合体であることが考察される。

#### 3) <sup>3</sup>H-ブドウ糖の取り込み実験

Bio-Rex 70 陽イオン交換樹脂のカラムクロマトグラフィーで得られた HbA<sub>1a</sub> をセファデックス G-25 カラムクロマトグラフィーで脱塩すると, HbA<sub>1a</sub> に <sup>3</sup>H の取り込みはほとんど認められなくなった。これは <sup>3</sup>H-ブドウ糖が, Bio-Rex 70 陽イオン交換樹脂を用いたカラムクロマトグラフィーでは素通りし, HbA<sub>1a</sub> 分画に混入したためと考えられる。これに対し HbA<sub>1c</sub> と HbA<sub>0</sub> は, セファデックス G-25 カラムクロマトグラフィーで脱塩しても, 脱塩前後で <sup>3</sup>H の取り込みに差を認めなかった。これは, <sup>3</sup>H-ブドウ糖が HbA<sub>1c</sub> と HbA<sub>0</sub> に結合したためと考えられる。

比活性でみると、 $\text{HbA}_{1b}$  にはほとんど取り込みは認められなかった。従って $\text{HbA}_{1b}$  はブドウ糖を結合していないこと、それにもかかわらず5 HMF産生がみられたことはブドウ糖以外の炭水化物の結合を推測させる。また $\text{HbA}_{1c}$  の取り込みが複数の成分から構成された成績は、 $\text{HbA}_{1c}$  がいくつかの分画を含んでいることを考察させる。なお  $\text{HbA}_0$  の中にも、その初めの部分に $^3\text{H}$ -ブドウ糖の取り込みが認められた。これは、Shapiroらの結果(23)と一致し、 $\text{HbA}_0$  の中にも glycosylateされた部分が含有されていることを示していると思われる。

上記の成績を総括すると  $\text{HbA}_{1a_1}$ 、 $\text{HbA}_{1a_2}$  と $\text{HbA}_{1c}$  はそれぞれ Hb に1,6 二磷酸果糖, 6 磷酸ブドウ糖とブドウ糖が結合した際に予測させる総磷酸含有量, 5 HMF 産生量を示した。 $\text{HbA}_{1b}$  に関しては、 $\text{HbA}_0$  の脱アミド化したものではないかとの報告もある(73)が、 $\text{HbA}_{1b}$  が  $^3\text{H}$ -ブドウ糖を取り込まなかったことは、この仮説と一致するが、5 HMF 産生が他の glycosylated Hb と同量みられたことは炭水化物が含まれていることを示唆しており、この仮説に否定的な所見である。また、 $\text{HbA}_{1b}$  は、 $\text{HbA}_{1c}$  の脱アミド化したものではないかとの報告もある(74)が、 $^3\text{H}$ -ブドウ糖の $\text{HbA}_0$  への取り込み実験で  $\text{HbA}_{1b}$  への取り込みがみられなかったことよりこの可能性も考えにくい。従って本研究成績は、 $\text{HbA}_{1b}$  が磷酸を含まないブドウ糖以外の炭水化物の結合体を推測させる新知見であると思われる。

## B 定量分析

Glycosylated Hbの増加は、糖尿病患者だけでなく、尿毒症例(34-35, 75-78), アルコール中毒症例(79), 鉛中毒症例(80), アスピリンの大量服用例(81)にも認められている。また血液疾患を伴う患者や、妊娠例では HbF の高値が報告されている(82)。本研究では上記の問題をもつ患者は対象から除外して検討した。Allen は  $\text{HbA}_0$  と glycosylated Hbが分離可能なことを認めた(1)。McDonald らは、Bio-Rex 70 陽イオン交換樹脂を用いたカラムクロマトグラフィー法で、glycosylated Hb が $\text{HbA}_{1a_1}$ 、 $\text{HbA}_{1a_2}$ 、 $\text{HbA}_{1b}$  と $\text{HbA}_{1c}$  に分離されることを認めた(14)。Cole や Davis は、HPLCでのglycosylated Hbの分離法を報告した(58-59)。HPLC 法は操作が迅速、簡便かつ正確であると報告している。しかし現在までの HPLC 法では  $\text{HbA}_{1c}$  の分離を目標としており、 $\text{HbA}_{1a}$  と  $\text{HbA}_{1b}$  は $\text{HbA}_{1a+b}$  分画として一緒に分離されていた。本研究では TSK-GEL IEX 535 カラムを用いた HPLC法で、glycosylated Hb を $\text{HbA}_{1a}$ ,



HbA<sub>1b</sub>とHbA<sub>1c</sub>に細分化することができ、HbA<sub>1b</sub>はさらに2つの分画、HbA<sub>1c</sub>はさらに3つの分画に分離することができた。また本HPLC法ではHbA<sub>1a</sub>はHbA<sub>1b</sub>の前に分離されたが、HbA<sub>1a</sub>の含有量は極めて少なくピークとしての測定は不可能であった。最近、glycosylated Hbの中にstable HbA<sub>1c</sub>と不安定なlabile HbA<sub>1c</sub>とがあり、後者は生理食塩水で4-6時間ふ置することで除去されると報告されている(41-42)。しかし同時にこのふ置操作によりHbA<sub>1a+b</sub>分画が増加することが認められている(41-42)。本研究ではHbA<sub>1b</sub>とHbA<sub>1c</sub>の細分化された分画を評価することが目的であるため、ふ置操作は行わず、血液を採血後、ただちに溶血液の検体をこのHPLCにチャージして解析を試みた。この結果、糖尿病患者では、HbA<sub>1</sub>の中ではHbA<sub>1b</sub>とHbA<sub>1c</sub>の含有量の増加がみられ、亜分画では特にHbA<sub>1c2</sub>分画の増加を認めた。HbA<sub>1b</sub>の中では、糖尿病患者ではHbA<sub>1b1</sub>、HbA<sub>1b2</sub>ともに対照に比べて増加を認めるものの、血糖値との相関は認めなかった。本HPLC法におけるHbFの位置はHbA<sub>1b2</sub>とHbA<sub>1c1</sub>の間に認められた。Allenは、アンバーライトIRC-50を用いたカラムクロマトグラフィー法ではHbFはHbA<sub>1c</sub>の位置に一致して溶出されたと報告している(1)。McDonaldらはBio-Rex 70陽イオン交換樹脂を用いたカラムクロマトグラフィー法では、HbA<sub>1a</sub>、HbA<sub>1b</sub>、HbA<sub>1c</sub>とHbA<sub>0</sub>のいずれの分画にも有意な量のHbFは認められなかったと報告している(14)。最近の短いカラムを用いる方法ではHbFはHbA<sub>1c</sub>の位置に一致して溶出されている(27)。またHPLC法ではHbFの位置は明確にされていない(58-59)。本研究で用いたHPLC法ではHbFは、HbA<sub>1b2</sub>とHbA<sub>1c1</sub>の間に認められた。糖尿病患者ではHbFの関与のないHbA<sub>1c2</sub>分画の増加が認められた。この所見は、従来HbA<sub>1c</sub>が血糖値を反映すると考えられたがHbA<sub>1c2</sub>分画が主にglycosylateされた分画であることを考察させる。これに対しHbA<sub>1b1</sub>分画は、ブドウ糖の関与の少ない部分であり、あるいはglycosylateされていない分画である可能性も考慮される。HbA<sub>1b</sub>に関してはMcDonaldらは、糖尿病患者のHbA<sub>1b</sub>は対照に比べわずかながら増加していることを認めている(14)。最近の短いカラムを用いる方法では、HbA<sub>1a+b</sub>は糖尿病患者で対照に比べ増加すると報告されている(13、26-27)。また最近ではde BoerやOimomiらは、糖尿病だけでなく、尿毒症患者でもHbA<sub>1a+b</sub>が対照に比べ増加すると報告している(34-35)。この際のHbA<sub>1b</sub>は、尿素によるカルバミレーションで形成されるという仮説も報告されている(34)。しかし本研究では、腎

疾患を対象から除外しており本 HPLC法によるHbA<sub>1b</sub>の増加は尿素によるものより、糖尿病による影響と考えられる。本研究では、HbA<sub>1c</sub>とその亜分画が血糖値をよく反映するのに対し、HbA<sub>1b</sub>とその亜分画は血糖値を反映しなかった。これは HbA<sub>1b</sub>と HbA<sub>1c</sub>の glycosylationの動態の違いを示唆するものと思われる。現在まで HbA<sub>1b</sub>の構造は不明であるが、HbA<sub>0</sub>の脱アミド化したものであるという報告もある(73)。しかし、一般に脱アミド反応がブドウ糖で促進されるとは考えにくい。また HbA<sub>1c</sub>の脱アミド化したものであるという報告もある(74)。しかし、HbA<sub>1b</sub>では、HbA<sub>1c</sub>で認められた血糖値との相関を認めず、これも考えにくい。この点で、HbA<sub>1b</sub>が糖尿病患者で増加している事実を説明できず、単に HbA<sub>0</sub>あるいは HbA<sub>1c</sub>の脱アミド化したものとは考えにくいことを示唆する所見と思われる。

<sup>3</sup>H-ブドウ糖のHbA<sub>0</sub>への取り込み実験で、HbA<sub>1c</sub>に複数のピークが認められたことは、HbA<sub>1c</sub>が複数の成分からなることを示すものと思われた。またこの HPLC法でも、HbA<sub>1b</sub>と HbA<sub>1c</sub>がさらに細分化されたことは、HbA<sub>1b</sub>と HbA<sub>1c</sub>の中での heterogeneity を示唆するものと思われる。Gabbay と McDonald は、ブドウ糖がβ鎖N末端だけでなくα鎖N末端や、その他のリジン残基にも結合していることを認めている(14, 20-23)。また Shapiroらは Bio-Rex70 陽イオン交換樹脂を用いたカラムクロマトグラフィー法で分離されるHbA<sub>0</sub>の中にも glycosylateされた部分が含まれていることを認めている(23)。α-バリン-1, α-リジン-7, α-リジン-16, β-バリン-1, β-リジン-17, β-リジン-66, β-リジン-120の各残基が glycosylate されている(23)。この glycosylationの程度に関しては、β鎖N末端は pKa が低く、glycosylate されやすく、一方α鎖N末端やリジン残基は pKa が高く、glycosylationはβ鎖N末端の1/10程度とされている(21-22)。この点から、Hb側でブドウ糖との親和性に差がありその上に糖尿病の血糖因子が関与して、Hbの中での glycosylation に差がでることが考えられる。Shapiro らが HbA<sub>0</sub>の中に glycosylateされた部分が含まれているのを認めた(23)のと同様に、HbA<sub>1b</sub>, HbA<sub>1c</sub>の中にもβ鎖N末端以外に、リジン残基やα鎖N末端が glycosylate され、それらが異なる分画として分離され、HbA<sub>1b</sub>, HbA<sub>1c</sub>が複数の成分から成ることが認められたと考えられる。その確証のためには、亜分画の構造決定が残された課題である。

糖尿病では、赤血球膜タンパク、アルブミン、コラーゲンなどが glycosylateさ

れている(83-87)。特にクリスタリンとミエリンも Hb と同様に glycosylate され、それらが糖尿病性白内障、糖尿病性神経障害の病因となる可能性が示唆されている(61-66)。本研究では、これら合併症で特異的に増加する分画が存在するかどうかを検討した。上記合併症を特異的に反映する分画が存在するとしたら、これら合併症のモニターに有効となるように思われた。本研究では、検体採取の容易な Hb の側面からクリスタリンとミエリンの glycosylation の程度を検討した。上記合併症の糖尿病例は、合併症のない糖尿病例と比較して、各 glycosylated Hb 分画に有意差は認められなかった。以上から、上記糖尿病合併症に特異的とされるクリスタリンとミエリンの glycosylation は Hb の glycosylation と平行関係にないことが推測される。この点に関しては、クリスタリン、ミエリン と Hb を構成する蛋白のブドウ糖との親和性の相異によることも考えられるが、また各蛋白の寿命の相違による可能性も考慮される。

### C 機能解析

本研究では、HbA<sub>1a</sub> を  $\alpha$  鎖、 $\beta$  鎖 に単離したサブユニットで、その酸素平衡機能を測定したところ、HbA<sub>0</sub> のサブユニットとの間に、一酸化炭素結合速度定数と酸素結合速度定数では差は認められなかった。これに対して、HbA<sub>1a</sub> の  $\beta$  鎖の酸素解離速度定数は、HbA<sub>0</sub> の  $\beta$  鎖に比べて有意に高かった。Steinmeiner と Parkhurst は、HbA<sub>1a</sub> 四量体と HbA<sub>0</sub> 四量体の間に酸素解離速度定数で差は認められなかったと報告している(89)。しかし本研究では HbA<sub>1a</sub> の単離した  $\beta$  鎖の酸素解離速度定数が有意に亢進している新知見を得た。この知見によれば、四量体としての HbA<sub>1a</sub> の酸素親和性の低下は、 $\beta$  鎖の酸素解離速度が内因的に増加していることに起因すると考察される。

Glycosylated Hb の酸素親和性に関する IHP 効果の低下は、以前から認められている(46, 90)。HbA<sub>1a1</sub>, HbA<sub>1a2</sub> と HbA<sub>1c</sub> の  $\beta$  鎖 N 末端は、それぞれ 1, 6 二磷酸果糖, 6 磷酸ブドウ糖とブドウ糖が結合している(14-19)。ゆえに IHP の結合部位の 1 つである  $\beta$  鎖 N 末端における上記修飾が IHP 効果を低下させていると考えられる。さらに HbA<sub>1a1</sub>, HbA<sub>1a2</sub> の IHP 効果が最も低下しているのは、これらの  $\beta$  鎖 N 末端に結合している磷酸が、IHP と競合阻害を起こすためと考えられる(46)。また Table 8 に示す HbA<sub>1a</sub> の  $\beta$  鎖の酸素親和性の低下は、 $\beta$  鎖 N 末端の糖磷酸エ

ステルによる修飾が、 $\beta$ 鎖というサブユニット自身のリガンド親和性を低下させていることを示唆していると考えられる(91)。この糖磷酸エステルが、Hb 四量体における燐酸の結合部位と同様に、サブユニットのポリペプチド鎖の陽イオングループと反応して、サブユニット自身で作用している可能性が考慮される。Peruz と Imai は各種哺乳類の Hb の酸素親和性を検討し、サブユニットの A ヘリックスの固定がデオキシ構造を安定化させ、四量体としての Hb のリガンド親和性を低下させることを認めている(92)。本研究成果は、 $\beta$ 鎖サブユニットの修飾が、アミノ末端を固定して、内因的に酸素解離速度を亢進させ、その結果として $\beta$ 鎖サブユニット自身のリガンド親和性を低下させていることを考察させる。

## 第 V 章 結 語

- ① Glycosylated HbをBio-Rex 70陽イオン交換樹脂を用いたカラムクロマトグラフィ法でHbA<sub>1a1</sub>, HbA<sub>1a2</sub>, HbA<sub>1b</sub> と HbA<sub>1c</sub> に分離した。各glycosylated Hbの総燐含有量は Hb 単量体 1 mmol あたり約1.0, 0.5, 0, 0 mmol であった。
- ② 各 glycosylated Hb の 5 HMF 産生量は Hb 単量体 1 mmol あたり, それぞれ約0.5 mmol 認められた。
- ③ <sup>3</sup>H-ブドウ糖の HbA<sub>0</sub> への取り込み実験より HbA<sub>1c</sub> では, <sup>3</sup>Hの複数の取り込みを認め, HbA<sub>1c</sub> が複数の成分からなることを示唆した。また HbA<sub>1b</sub> にはほとんど取り込みを認めなかった。  
これらの成績より, HbA<sub>1b</sub> は燐酸を含まないブドウ糖以外の炭水化物の結合体であると考察された。
- ④ HPLC により, 従来の HbA<sub>1b</sub> は HbA<sub>1b1</sub> と HbA<sub>1b2</sub> に, HbA<sub>1c</sub> は HbA<sub>1c1~3</sub> と細分化され再現性よく分離された。糖尿病患者で, これらの分画を検討した結果, HbA<sub>1c</sub> の中でも HbA<sub>1c2</sub> 分画が最もよく血糖値を反映することを認めた。HbA<sub>1b</sub> は糖尿病患者では対照に比べ増加しているものの血糖値との相関を認めなかった。
- ⑤ 糖尿病性白内障, 糖尿病性神経障害合併例のglycosylated Hb分画を上記 HPLC で分析したところ, 合併症の無い糖尿病患者と比較し, 各 glycosylated Hb 分画の割合に有意差を認めなかった。
- ⑥ 各 glycosylated Hb 四量体の酸素親和性を検討したところ, HbA<sub>1a</sub> 四量体は酸素親和性の低下を認め, HbA<sub>1c</sub> 四量体は酸素親和性の増加を認めた。
- ⑦ IHP 効果は glycosylated Hb で低下を認めた。特に HbA<sub>1a1</sub>, HbA<sub>1a2</sub> での低下が顕著であった。
- ⑧ Glycosylated Hb の単離鎖で酸素親和性を検討した結果, HbA<sub>1a</sub> β鎖の酸素親和性の低下を認めた。
- ⑨ HbA<sub>1a</sub> の単離鎖と HbA<sub>0</sub> の単離鎖について, 一酸化炭素結合速度, 酸素結合速度と酸素解離速度をそれぞれ比較した。前二者は, 差を示さなかったが, 酸素解離速度定数は, HbA<sub>1a</sub> の β鎖では亢進像を示した。このことから HbA<sub>1a</sub> β鎖の酸素親和性の低下は酸素解離速度の亢進に基づくことを考察した。

稿を終えるに臨み, 本研究にあたって終始御指導された杉田良樹教授, 山下亀次郎助教授に深く感謝いたします。

## 文 献

1. Allen, D. W., Schroeder, W. A., and Balog, J. (1958). Observations on the chromatographic heterogeneity of normal adult and fetal human hemoglobin: a study of the effects of crystallization and chromatography on the heterogeneity and isoleucine content: J. Am. Chem. Soc. 80, 1628-1634.
2. Clegg, M. D., and Schroeder, W. A. (1959). A chromatographic study of the minor components of normal adult human hemoglobin including a comparison of hemoglobin from normal and phenylketonuric individuals: J. Am. Chem. Soc. 81, 6065-6069.
3. Huisman, T. H. J., and Meyering, C. A. (1960). Studies on the heterogeneity of hemoglobin. I. the heterogeneity of different human hemoglobin types in carboxymethylcellulose and in Amberlite IRC-50 chromatography: qualitative aspects: Clin. Chim. Acta. 5, 103-123.
4. Meyering, C. A., Israels, A. L. M., Sebens, T., and Huisman, T. H. J. (1960). Studies on the heterogeneity of hemoglobin. II. the heterogeneity of different human hemoglobin types in carboxymethylcellulose and in Amberlite IRC-50 chromatography: qualitative aspects: Clin. Chim. Acta. 5, 208-222.
5. Schnek, A. G., and Schroeder, W. A. (1961). The relation between the minor components of whole normal adult hemoglobin as isolated by chromatography and starch block electrophoresis: J. Am. Chem. Soc. 83, 1472-1478.

6. Huisman, T. H. J., and Dozy, A. M. (1962). Studies on the heterogeneity of hemoglobin. IV. chromatographic behavior of different human hemoglobins on anion-exchange cellulose (DEAE-cellulose): *J. Chromatogr.* 7, 180-203.
7. Jones, R. T., and Schroeder, W. A. (1963). Chromatography of human hemoglobin: factors influencing chromatography and differentiation of similar hemoglobins: *J. Chromatogr.* 10, 421-431.
8. Horton, B. F., and Huisman, T. H. J. (1965). Studies on the heterogeneity of haemoglobin. VII. minor haemoglobin components in haematological diseases: *Br. J. Haematol.* II, 296-304.
9. Huisman, T. H. J., and Horton, B. F. (1965). Studies on the heterogeneity of hemoglobin. VIII. chromatographic and electrophoretic investigations of various minor hemoglobin fractions present in normal and in vitro modified red blood cell hemolysates: *J. Chromatogr.* 18, 116-123.
10. Rahbar, S. (1968). An abnormal hemoglobin in red cells of diabetics: *Clin. Chim. Acta.* 22, 296-298.
11. Rahbar, S., Paulsen, E., and Ranney, H. M. (1969). Studies of hemoglobins in patients with diabetes mellitus: *Diabetes.* 18 (Suppl). 332.
12. Rahbar, S., Blumenfeld, O., and Ranney, H. M. (1969). Studies of an usual hemoglobin in patients with diabetes mellitus: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 36, 838-843.
13. Trivelli, L. A., Ranney, H. M., and Lai, H-T. (1971).

- Hemoglobin components in patients with diabetes mellitus:  
N. Engl. J. Med. 284, 353-357.
14. McDonald, M. J., Shapiro, R., Bleichman, M., Solway, J., and Bunn, H. F. (1978). Glycosylated minor components of human adult hemoglobin. purification, identification, and partial structural analysis: J. Biol. Chem. 253, 2327-2332.
  15. Holmquist, W. R., and Schroeder, W. A. (1966). A new N-terminal blocking group involving a Schiff base in hemoglobin A<sub>1c</sub>: Biochemistry. 5, 2489-2503.
  16. Bookchin, R. M., and Gallop, P. M. (1968). Structure of hemoglobin A<sub>1c</sub>: nature of the N-terminal  $\beta$  chain blocking group: Biochem. Biophys. Res. Commun. 32, 86-93.
  17. Bunn, H. F., Haney, D. N., Gabbay, K. H., and Gallop, P. M. (1975). Further identification of the nature and linkage of the carbohydrate in hemoglobin A<sub>1c</sub>: Biochem. Biophys. Res. Commun. 67, 103-109.
  18. Koenig, R. J., Blobstein, S. H., and Cerami, A. (1977). Structure of carbohydrate of hemoglobin A<sub>1c</sub>: J. Biol. Chem. 252, 2992-2997.
  19. Stevens, V. J., Vlassara, H., Abati, A., and Cerami, A. (1977). Nonenzymatic glycosylation of hemoglobin: J. Biol. Chem. 252, 2998-3002.
  20. Bunn, H. F., Shapiro, R., Garrick, L. M., McDonald, M. J., Gabbay, K. H., and Gallop, P. M. (1978). Heterogeneity of human hemoglobin A<sub>0</sub> due to non-enzymatic glycosylation: Fed. Proc. 37, 1390.
  21. Bunn, H. F., Shapiro, R., McManus, M., Garrick, L., McDonald,



- M. J., Gallop, P. M., and Gabbay, K. H. (1979). Structural heterogeneity of human hemoglobin A due to nonenzymatic glycosylation: *J. Biol. Chem.* 254, 3892-3898.
22. Gabbay, K. H., Sosenko, J. M., Banuchi, G. A., Mininsohn, M. J., and Flückiger, R. (1979). Glycosylated hemoglobins: increased glycosylation of hemoglobin A in diabetic patients: *Diabetes*. 28, 337-340.
23. Shapiro, R., McManus, M. J., Zault, C., and Bunn, H. F. (1980). Sites of nonenzymatic glycosylation of human hemoglobin A: *J. Biol. Chem.* 255, 3120-3127.
24. Paulsen, E. P. (1973). Hemoglobin A<sub>1c</sub> in childhood diabetes: *Metabolism*. 22, 269-271.
25. Bunn, H. F., Haney, D. N., Kamin, S., Gabbay, K. H., and Gallop, P. M. (1976). The biosynthesis of human hemoglobin A<sub>1c</sub>. slow glycosylation of hemoglobin in vivo: *J. Clin. Invest.* 57, 1652-1659.
26. Dolhofer, R., Städele, A., and Wieland, O. H. (1977). Clinical and biochemical studies on the significance and formation of hemoglobins A<sub>1c</sub> and A<sub>1a+b</sub> in diabetes mellitus: *Klin. Wochenschr.* 55, 945-954.
27. Gabbay, K. H., Hasty, K., Breslow, J. L., Ellison, R. C., Bunn, H. F., and Gallop, P. M. (1977). Glycosylated hemoglobins and long-term blood glucose control in diabetes mellitus: *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 44, 859-864.
28. Gonen, B., Rubenstein, A. H., Rochman, H., Tanega, S. P., and Horwitz, D. L. (1977). Haemoglobin A<sub>1</sub>: an indicator of the metabolic control of diabetic patients: *Lancet*.

II, 734-736.

29. Graf, R. J., Halter, J. B., and Porte, D. Jr. (1978). Glycosylated hemoglobin in normal subjects and subjects with maturity-onset diabetes. evidence for a saturable system in man: *Diabetes*. 27, 834-839.
30. Koenig, R. J., Peterson, C. M., Jones, R. L., Saudek, C., Lehrman, M., and Cerami, A. (1976). Correlation of glucose regulation and hemoglobin A<sub>1c</sub> in diabetes mellitus: *N. Engl. J. Med.* 295, 417-420.
31. Dunn, P. J., Cole, R. A., Soeldner, J. S., Gleason, R. E., Kwa, E., Firoozabadi, H., Younger, D., and Graham, C. A. (1979). Temporal relationship of glycosylated haemoglobin concentrations to glucose control in diabetics: *Diabetologia*. 17, 213-220.
32. Heinze, E., Kohne, E., Meissner, C., Beischer, W., Teller, W. M., and Kleihauer, E. (1979). Hemoglobin A<sub>1c</sub> (Hb A<sub>1c</sub>) in children with long standing and newly diagnosed diabetes mellitus: *Acta. Paediatr. Scand.* 68, 609-612.
33. Bunn, H. F. (1981). Evaluation of glycosylated hemoglobin in diabetic patients: *Diabetes*. 30, 613-617.
34. Flückiger, R., Harmon, W., Meier, W., Loo, S., and Gabbay, K. H. (1981). Hemoglobin carbamylation in uremia: *N. Engl. J. Med.* 304, 823-827.
35. Oimomi, M., Ishikawa, K., Kawasaki, T., Kubota, S., Yoshimura, Y., and Baba, S. (1981). Glycosylated haemoglobin in renal failure: *Diabetologia*. 21, 163.
36. Leslie, R. D. G., Pyke, D. A., John, P. N., and White, J.

- M. (1979). Fast glycosylation of haemoglobin, letter to the editor: *Lancet*. I, 773-774.
37. Svendsen, P. Aa., Christiansen, J. S., Welinder, B., and Nerup, J. (1979). Fast glycosylation of haemoglobin, letter to the editor: *Lancet*. I, 603.
38. Svendsen, P. Aa., Christiansen, J. S., Andersen, A. R., Welinder, B., and Nerup, J. (1979). Fast glycosylation of haemoglobin, letter to the editor: *Lancet*. I, 1142-1143.
39. Boden, G., Master, R. W., Gordon, S. S., Shuman, C. R., and Owen, O. E. (1980). Monitoring metabolic control in diabetic outpatients with glycosylated hemoglobin: *Ann. Intern. Med.* 92, 357-360.
40. Bolli, G., Cartechini, M. G., Campagnucci, P., Santeusanio, F., Massi-Benedetti, M., Calabrese, G., Puxeddu, A., and Brunetti, P. (1980). Modification of glycosylated haemoglobin concentration during artificial endocrine pancreas treatment of diabetics. evidence for a short-term effect on HbA<sub>1(a+b+c)</sub> levels: *Diabetologia*. 18, 125-130.
41. Goldstein, D. E., Peth, S. B., England, J. D., Hess, R. L., and Costa, J. D. (1980). Effects of acute changes in blood glucose on HbA<sub>1c</sub>: *Diabetes*. 29, 623-628.
42. Svendsen, P. Aa., Christiansen, J. S., Sjøgaard, U., Welinder, B. S., and Nerup, J. (1980). Rapid changes in chromatographically determined haemoglobin A<sub>1c</sub> induced by short-term changes in glucose concentration: *Diabetologia*. 19, 130-136.
43. Vlachokosta, F., Koenig, R., Cahill, G. F. Jr., and Soeldner, R. (1980). Rapid changes in chromatographically determined haemoglobin A<sub>1c</sub> induced by short-term changes in glucose concentration: *Diabetologia*. 19, 130-136.

- J. S. (1980). Abstract. Evidence of reversibility of hemoglobin (Hb)A<sub>1c</sub>: Diabetes. 29, 22A.
44. Widness, J. A., Rogler-Brown, T. L., McCormick, K. L., Petzold, K. S., Susa, J. B., Schwartz, H. C., and Schwartz, R. (1980). Rapid fluctuations in glycohemoglobin (hemoglobin A<sub>1c</sub>) related to acute changes in glucose: J. Lab. Clin. Med. 95, 386-394.
45. Higgins, P. J., and Bunn, H. F. (1981). Kinetic analysis of the nonenzymatic glycosylation of hemoglobin: J. Biol. Chem. 256, 5204-5208.
46. McDonald, M. J., Bleichman, M., Bunn, H. F., and Noble, R. W. (1979). Functional properties of the glycosylated minor components of human adult hemoglobin: J. Biol. Chem. 254, 702-707.
47. Flückiger, R., and Winterhalter, K. H. (1976). In vitro synthesis of hemoglobin A<sub>1c</sub>: FEBS. Lett. 71, 356-360.
48. Efremov, C. D., Huisman, T. H. J., Bowman, K. and Wrightstone, R. N. (1974). Microchromatography of hemoglobins. II. a rapid method for the determination of hemoglobin A<sub>2</sub>: J. Lab. Clin. Med. 83, 657-664.
49. Huisman, T. H. J., Schroeder, W. A., Brodie, A. N., Mayson, S. M., and Jakway, J. (1975). Microchromatography of hemoglobins. III. a simplified procedure for the determination of hemoglobin A<sub>2</sub>: 86, 700-702.
50. Schroeder, W. A., Huisman, T. H. J., Powars, D., Evans, L., Abraham, E. C., and Lam, H. (1975). Microchromatography of hemoglobins. IV. an improved procedure for the detection

- of hemoglobins S and C at birth: 86, 528-532.
51. Schroeder, W. A., and Nelson, N. C. (1975). Microchromatography of hemoglobins. V. thin-layer chromatography of some hemoglobins on CM-cellulose: J. Chromatogr. 115, 527-533.
  52. Abraham, E. C., and Huisman, T. H. J. (1977). Microchromatography of hemoglobins. VII. detection of some uncommon hemoglobin variants and two rapid methods for the quantitation of HbA<sub>2</sub> in the presence of HbC: J. Chromatogr. 143, 57-63.
  53. Kynoch, P. A. M., and Lehmann, H. (1977). Rapid estimation (2 1/2 hours) of glycosylated haemoglobin for routine purposes: Lancet. II, 16.
  54. Abraham, E. C., Huff, T. A. Cope, N. D., Wilson, J. B., Bransome, E. D., and Huisman, T. H. J. (1978). Determination of the glycosylated hemoglobins (HbA<sub>1</sub>) with a new microcolumn procedure. suitability of the technique for assessing the clinical management of diabetes mellitus: Diabetes. 27, 931-937.
  55. Jones, M. B., Koler, R. D., and Jones, R. T. (1978). Microcolumn method for the determination of hemoglobin minor fractions A<sub>1a+b</sub> and A<sub>1c</sub>: Hemoglobin. 2, 53-58.
  56. Schroeder, W. A., and Pace, L. A. (1978). Microchromatography of hemoglobins. VIII. a general qualitative and quantitative method in plastic drinking straws and the quantitative analysis of Hb-F: J. Chromatogr. 145, 203-212.
  57. Wajcman, H., Dastugue, B., and Labie, D. (1979).

- Quantitation of hemoglobin A<sub>1c</sub>: a rapid, automated precision-chromatography technique: Clin. Chim. Acta. 92, 33-39.
58. Cole, R. A., Soeldner, J. S., Dunn, P. J., and Bunn, H. F. (1978). A rapid method for the determination of glycosylated hemoglobins using high pressure liquid chromatography: Metabolism. 27, 289-301.
59. Davis, J. E., McDonald, J. M., and Jarett, L. (1978). A high-performance liquid chromatography method for hemoglobin A<sub>1c</sub>: Diabetes. 27, 102-107.
60. Dunn, P. J., Cole, R. A., and Soeldner, J. S. (1979). Further development and automation of a high pressure liquid chromatography method for the determination of glycosylated hemoglobins: Metabolism. 28, 777-779.
61. Stevens, V. J., Rouzer, C. A., Monnier, V. M., and Cerami, A. (1978). Diabetic cataract formation: potential role of glycosylation of lens crystallins: Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 75, 2918-2922.
62. Monnier, V. M., Stevens, V. J., and Cerami, A. (1979). Nonenzymatic glycosylation, sulfhydryl oxidation, and aggregation of lens proteins in experimental sugar cataracts: J. Exp. Med. 150, 1098-1107.
63. Pande, A., Garner, W. H., and Spector, A. (1979). Glucosylation of human lens protein and cataractogenesis: Biochem. Biophys. Res. Commun. 89, 1260-1266.
64. Chiou, S-H., Chylack, L. T. Jr., Bunn, H. F., and Kinoshita, J. H. (1980). Role of nonenzymatic glycosylation in

- experimental cataract formation: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 95, 894-901.
65. Chiou, S-H., Chylack, L. T. Jr., Tung, W. H., and Bunn, H. F. (1981). Nonenzymatic glycosylation of bovine lens crystallins: *J. Biol. Chem.* 256, 5176-5180.
  66. Flückiger, R., and Winterhalter, K. H. (1978): *Biochemical and clinical aspects of hemoglobin abnormalities* (Caughy, W. S., ed) Academic press, New York, pp 205-214.
  67. Fiske, C. H., and Subbarow, Y. (1925). The colorimetric determination of phosphorus: *J. Biol. Chem.* 66, 375-400.
  68. Pecoraro, R. E., Graf, R. J., Halter, J. B., Beiter, H., and Porte, D. Jr. (1979). Comparison of a colorimetric assay for glycosylated hemoglobin with ion-exchange chromatography: *Diabetes.* 28, 1120-1125.
  69. Bucci, E., and Fronticelli, C. (1965). A new method for the preparation of  $\alpha$  and  $\beta$  subunits of human hemoglobin: *J. Biol. Chem.* 240, PC551-PC552.
  70. Makino, N., and Sugita, Y. (1978). Oxygen equilibria of hybrid-heme hemoglobins containing proto- and mesoheme groups: *J. Biol. Chem.* 253, 1174-1178.
  71. Makino, N., Sugita, Y., and Nakamura, T. (1979). Kinetic studies on the cooperative ligand binding by hemoglobin M Milwaukee: *J. Biol. Chem.* 254, 2353-2357.
  72. Brunori, M., Noble, R. W., Antonini, E., and Wyman, J. (1966). The reactions of the isolated  $\alpha$  and  $\beta$  chains of human hemoglobin with oxygen and carbon monoxide: *J. Biol. Chem.* 241, 5238-5243.

73. Krishnamoorthy, R., Gacon, G., and Labie, D. (1977).  
Arguments for deamidation as the modification in hemoglobin A<sub>1b</sub>: INSERM (INST NATL SANTE RECHMED) colloq. 70, 309-318.
74. Bunn, H. F., Gabbay, K. H., and Gallop, P. M. (1978). The glycosylation of hemoglobin: relevance to diabetes mellitus: Science. 200, 21-27.
75. Casparie, A. F., and Miedema, K. (1977). Glycosylated haemoglobin in diabetes and renal failure: Lancet. II, 758-759.
76. Stanton, K. G., Davis, R., and Richmond, J. (1978). Glycosylated haemoglobin-A in renal failure: Lancet. I, 100.
77. Schernthaner, G., Stummvoll, K. H., and Müller, M. M. (1979). Glycosylated haemoglobin in chronic renal failure: Lancet. I, 774.
78. De Boer, M-J., Miedema, K., and Casparie, A. F. (1980). Glycosylated haemoglobin in renal failure: Diabetologia. 18, 437-440.
79. Hoberman, H. D. (1979). Adduct formation between hemoglobin and 5-deoxy-D-xylulose-1-phosphate: Biochem. Biophys. Res. Commun. 90, 764-768.
80. Charache, S., and Weatherall, D. J. (1966). Fast hemoglobin in lead poisoning: Blood, 28, 377-386.
81. Spicer, K. M., Allen, R. C., and Buse, M. G. (1978). A simplified assay of hemoglobin A<sub>1c</sub> in diabetic patients by use of isoelectric focusing and quantitative microdensitometry: Diabetes, 27, 384-388.



82. Rucknagel, D. L., and Chernoff, A. I. (1955). Immunologic studies of hemoglobins. III. fetal hemoglobin changes in the circulation of pregnant women: *Blood*. 10, 1092-1099.
83. Tanzer, M. L., Fairweather, R., and Gallop, P. M. (1972). Collagen crosslinks: isolation of reduced N<sup>E</sup>-hexosylhydroxylysine from borohydride-reduced calf skin insoluble collagen: *Arch. Biochem. Biophys.* 151, 137-141.
84. Robins, S. P., and Bailey, A. J. (1972). Age-related changes in collagen: the identification of reducible lysine-carbohydrate condensation products: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 48, 76-84.
85. Bailey, A. J., Robins, S. P., and Tanner, M. J. A. (1976). Reducible components in the proteins of human erythrocyte membrane: *Biochim. Biophys. Acta.* 434, 51-57.
86. Day, J. F., Thorpe, S. R., and Baynes, J. W. (1979). Nonenzymatically glucosylated albumin. *in vitro* preparation and isolation from normal human serum: *J. Biol. Chem.* 254, 595-597.
87. Miller, J. A., Gravallesse, E., and Bunn, H. F. (1980). Nonenzymatic glycosylation of erythrocyte membrane proteins. relevance to diabetes: *J. Clin. Invest.* 65, 896-901.
88. Cohen, M. P., Urdanivia, E., Surma, M., and Wu, V-Y. (1980). Increased glycosylation of glomerular basement membrane collagen in diabetes: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 95, 765-769.
89. Steinmeier, R. C., and Parkhurst, L. J. (1975). Kinetic studies on the five principal components of normal adult

- human hemoglobin: *Biochemistry*. 14, 1564-1572.
90. Bunn, H. F., and Briehl, R. W. (1970). The interaction of 2, 3-diphosphoglycerate with various human hemoglobins: *J. Clin. Invest.* 49, 1088-1095.
91. Imagawa, S., Makino, N., Abe, T., and Sugita, Y. (1982). Kinetic studies on the ligand binding of glycosylated hemoglobin: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 107, 1355-1360.
92. Perutz, M. F., and Imai, K. (1980). Regulation of oxygen affinity of mammalian haemoglobins: *J. Mol. Biol.* 136, 183-191.

筑波大学附属図書館



1 00920 05046 5

本学関係