

【臨床・研究】

高速液体クロマトグラフィ法による
HbA1c 測定を契機に発見された異常
ヘモグロビン (Hb Hirose) の7症例もり
森とし
俊あき
明

要 旨

高速液体クロマトグラフィ (HPLC) による HbA1c 測定に際し、正常では認められない溶出ピークを示す症例を7例経験した。それら症例に異常ヘモグロビンの存在を疑い、1例について構造解析を行ったところ Hb Hirose を検出した。Hb Hirose は本邦のみで発見されているまれな異常ヘモグロビンで、今回島根県江津市に集積して検出された。HPLC では、Hb Hirose の糖化成分は正常糖化成分より早く溶出するためピークが二峰性になり、HbA1c 分画が低値となる。一方、免疫比濁法 (ラテックス凝集反応) では、 β 鎖N末端のグルコース結合部位に特異的に結合する抗体を使用しているため、N末端より離れた codon 37 に変異が存在する Hb Hirose ではこの免疫反応に影響はない。以上より Hb Hirose を有する症例の HbA1c 測定には免疫比濁法が適する。

緒 言

HbA1c は糖尿病の血糖コントロールの指標として临床上広く用いられている検査で、HbA0 の β 鎖N末端のバリンがグルコースと非酵素的に結合したものである。HbA1c の測定に高速液体クロマトグラフィ (High Performance Liquid Chromatography, 以下 HPLC と略す) が使用されるようになり異常ヘモグロビンの検出が増加している¹⁻³⁾。当院では平成16年4月より HPLC 法による HbA1c 測定を行い、血糖値と HbA1c

が解離し、異常な溶出パターンを示す症例を、これまでに7例経験した。これらの症例について異常ヘモグロビンの存在を疑い精査したので報告する。

対 象

H16年4月からH18年3月の2年間に、当院で HPLC 法による HbA1c の測定を行った3,000例。

方 法

全対象の HbA1c は HPLC を測定原理とする自動 HbA1c 測定器 (ARKRAY, HA-8160) にて測定された。異常溶出パターンを示した7症例について、同一検体で免疫比濁法による HbA1c

Toshiaki MORI

島根県済生会江津総合病院内科

連絡先: 〒695-8505 島根県江津市江津町1016-37

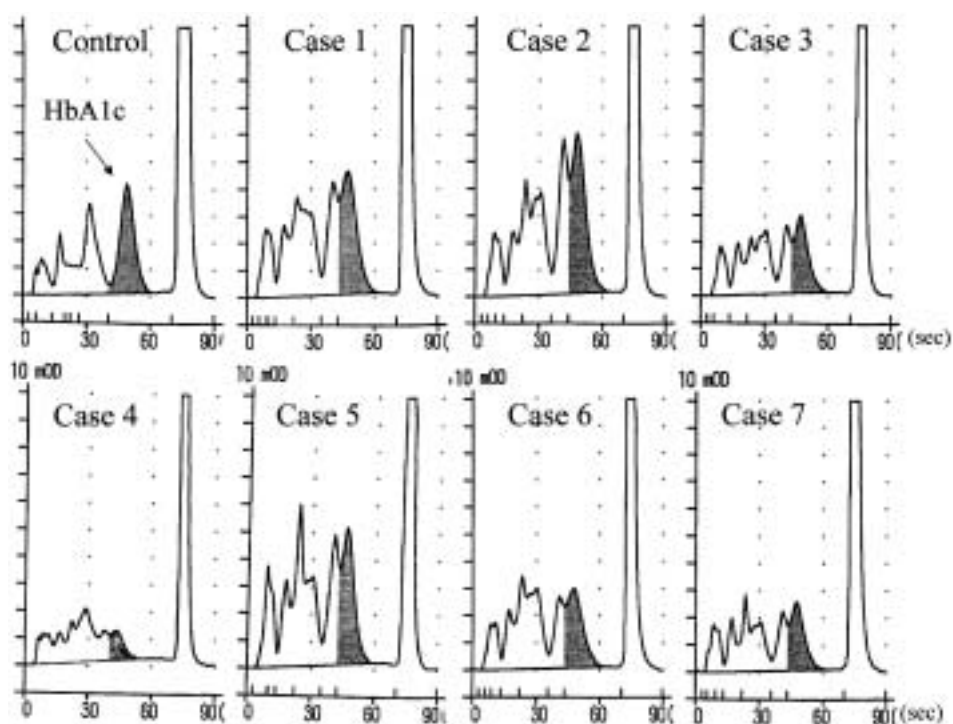


図1 HA-8160で検出された異常溶出パターン

表1 HPLCによるHbA1c測定で異常溶出パターンを示した7症例

case	age	sex	disease	HbA1c (%) (HPLC)	HbA1c (%) (Latex)	GA (%)
1	48	M	DM, CI	6.4	8.5	22.4
2	61	M	DM	6.6	8.6	30.8
3*	72	M	DM, AP	4.2	5.2	13.4
4*	69	F	DM, CRF	4.0	4.6	-
5	73	M	BPH	4.2	6.1	17.2
6	89	F	Appetite loss	5.0	5.8	-
7	80	M	Hypertension	4.1	4.9	17.0

DM: diabetes mellitus, CI: cerebral infarction, AP: angina pectoris, CRF: chronic renal failure, BPH: benign prostatic hypertrophy, GA: glycoalbumin, *: sibling

測定 (SRL) とグリコアルブミン測定 (SRL) を行った。7症例の内1例に PolyCAT A カラムを用いた高分解能 HPLC, エレクトロスプレーイオン化質量分析 (ESI/MS), タンデム質量分析 (MS/MS) をおこない異常ヘモグロビンの構造解析を行った⁴⁾。

結 果

全対象は3,000人であり, HA-8160によるHbA1c測定にて二峰性のHbA1cピーク示す症例を7例認めた(図1)。いずれも同様の溶出パターンを示しており, 同一の異常ヘモグロビンと疑われた。表1に示すように, 7例中2症例は同胞(症例3, 4)であったが, その他には血縁関

係を認めなかった。7例中1例(症例1)に多血傾向を認めた。全例に共通した臨床的異常は認めなかった。HPLCと免疫比濁法で得られたHbA1c測定値には、いずれの症例にも解離が認められた。血糖値(表示なし)、グリコアルブミン値から推測されるHbA1cは、免疫比濁法によるHbA1c値と妥当性があった。症例1に行った高分解能HPLCではA0分画より早く溶出する異常成分を認めた(図2)。エレクトロスプレーイオン化質量分析(ESI/MS)では100 Da小さい異常β鎖を認めた(図3)。タンデム質量分析(MS/MS)ではβ37 Trp → Serの変異を検出し、Hb Hiroseのヘテロ接合体と同定した。

考 察

異常ヘモグロビンは構成グロビンのアミノ酸変異体であり、これまで世界で約720種の変異が報告されている。日本における発現頻度は約3,000人に1人とされているが⁵⁾、調査を行った2年間の当院でのHPLC法によるHbA1c測定は3,000人に対してであり、6家系7例の異常検出は高頻度であった。異常ヘモグロビンは常染色体優性遺伝形質のため、比較的地域性の高い島根県江津市で高頻度に認められたものと考えた。異常ヘモグロビンが検出された際には家族のみならず、周辺地域での保因者の有無にも注意し検査結果を評価する必要があると考える。

Hb Hiroseは1971に山岡らにより初めて報告され⁶⁾、2000年までの統計では5例(島根2例、福岡2例、山口1例)が報告されている⁷⁾。酸素親和性亢進とサブユニットへの解離傾向を特徴とするが⁸⁻⁹⁾、ヘテロ接合体での多血症やその他の臨床的異常は報告されていない¹⁰⁾。今回、ヘモグロビン構造解析を行った症例1(48歳の男性)に多

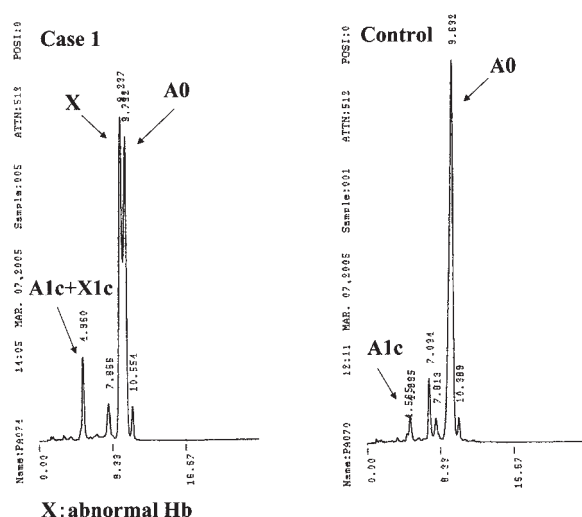


図2 高分解能HPLC (PolyCAT A カラム)

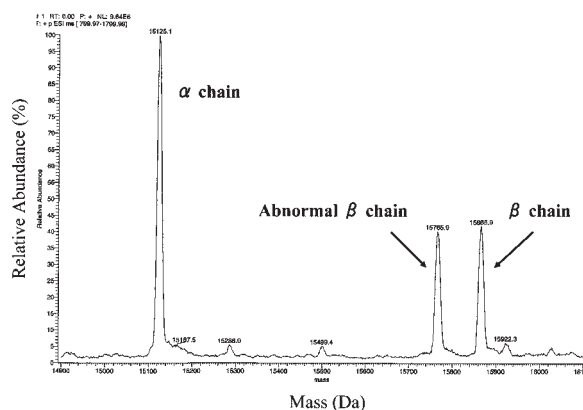


図3 エレクトロスプレーイオン化質量分析 (ESI/MS)

血傾向、多発性脳梗塞を認めたが、その他の症例には同様の異常は認めなかった。本症例では喫煙、肥満、糖尿病があることから、これらが多血、脳血管障害の原因と考えた。一般的に異常ヘモグロビンのうち症状を有するのは約30%であり、不安定ヘモグロビン症による溶血性貧血、多血症、チアノーゼ等を来すが、残りの約70%は無症候性とされている¹¹⁾。

現在本邦で行われているHbA1c測定法にはHPLC、免疫比濁法、アフィニティカラムクロマトグラフィ法などがあるが、このうちHPLC

は精度と再現性に優れており、広く用いられている。異常ヘモグロビンでは、赤血球寿命の短縮により異常低値を示す場合¹²⁾、変異のために糖化度や等電点が変わり測定値に影響を及ぼす場合などがある¹³⁾。Hb Hirose の糖化成分は正常糖化成分より少し早く溶出するためピークが二峰性になり、HbA1c 分画が実際より低めに測定されると考えられる。これに対し免疫比濁法では、 β 鎖N末端にグルコースの結合した構造に特異的に結合する抗体を使用しているため β 鎖N末端より離れた位置 (codon 37) に変異の存在する Hb Hirose は抗原抗体反応には影響を与えないと考えられる。したがって本症例の糖尿病コントロールの指標には、HPLC は不適で免疫比濁法が適切であ

る。実際に両測定法で得られた HbA1c 値には解離があり、血糖値、グリコアルブミン値から推測される HbA1c はラテックス凝集法で得られた値が妥当であった。HPLC で測定した HbA1c の評価に際して、血糖値と解離した値が得られた場合には、測定に影響を与える要因として異常ヘモグロビンの存在を考慮しパターンの再チェックをする必要があると考えられる。

謝 辞

異常ヘモグロビンの構造解析を施行して頂いた大阪医科大学病態検査学教室の宮崎彩子先生に感謝いたします。

文 献

- 1) 小川紘一, 坂東智子, 小川真紀, 宮崎彩子, 中西豊文, 清水章 (2003) 成人病健診で血糖値と HbA1c 値の解離を示し発見された異常ヘモグロビン. 臨床病理 51: 508-515
- 2) 樋口由美子, 関口香苗, 石川伸介, 坪田芳子, 菅野光俊, 戸塚実, 大久保登美江, 奥村伸生 (2000) HPLC を用いた HbA1c の測定により発見された異常ヘモグロビンの解析. 検査医学 49: 917-921
- 3) 岸田修, 鷺見誠一, 鈴木興康, 椿尾忠博, 中西豊文, 宮崎彩子, 清水章 (2000) 血糖値と HbA1c 値の著しい解離により発見された新型異常ヘモグロビン症 (Hb Hokusetsu) の 1 例. 糖尿病 43: 681-685
- 4) 清水章, 中西豊文, 宮崎彩子, 井口健 (2000) HbA1c 測定に及ぼす異常ヘモグロビンの影響—質量分析による評価—. 日本臨床検査自動化学会雑誌 25: 629-635
- 5) 原野昭雄 (1999) 日本人のヘモグロビン異常症の現状とその解析. 臨床病理 47: 215-223
- 6) Yamaoka K (1971) Hemoglobin Hirose. Blood 38: 730-738
- 7) 原野昭雄 (2000) 日本人の異常ヘモグロビン. 自然科学社: 135
- 8) Sasaki J, Imaura T, Yamase T (1978) Hemoglobin Hirose, A Human Hemoglobin Variant with a Substitution at the $\alpha_1\beta_2$ Interface. The Journal of Biological Chemistry 235: 87-89
- 9) Fujita S (1972) Oxygen Equilibrium Characteristics of Abnormal Hemoglobins: Hirose, L Ferrara, Broussais, and Dhofar. The Journal of Clinical Investigation 51: 2520-2529
- 10) Ohba Y, Hattori Y, Fuyuno K, Takeda I, Matsuoka M, Yoshida H, Satoh T, Miyaji T (1983) Two Further Examples of Hb Hirose, $\beta 37$ (C3) Trp \rightarrow Ser. HEMOGLOBIN 7: 191-193
- 11) 山城安啓 (2004) ヘモグロビン異常症の検査. Medical Technology 32: 565-572
- 12) Nakanishi T, Miyazaki A, Kishikawa M, Shimizu A, Aoki Y, Kikuchi M (1998) Hb Peterborough [$\beta 111$ (G3) Val \rightarrow Phe] in Japan. Hemoglobin 22: 23-25
- 13) Ohba Y, Miyaji T, Murakami M, Kadowaki S, Fujita T, Oimomi M, Hatanaka H, Ishikawa K, Baba S, Hitaka K, Imai K (1986) Hb Himeji or $\beta 140$ (H18) Ala \rightarrow Asp. Hemoglobin 10:109-125