〔原 著〕

血清ハプトグロビン欠損の遺伝学的検討

吉岡尚文*・横井 毅**・那谷雅之***・目黒ひとみ*

森田 香†・勾坂 馨***

SUMMARY

The cause of haptoglobin (Hp) deficiency in healthy adults is still unclear. Here, we picked up 7 Hp phenotype deficient samples out of 9,711 sera from healthy donors by three successive serological procedures and then performed DNA analysis with Hp 2 α specific probe. Hp gene was clearly detected in six individuals, which should be classified into temporary deficiency. One individual, however, was suggested to be a homozygous deletion of Hp gene cluster. The case (30-years-male) has a history of liver disease in his childhood and complains no clinical symptom caused by Hp deficiency. The analysis of chromosome on his leukocytes showed no deletion or abnormality. His mother was typed as Hp 2-2 with normal concentration of Hp. DNA linkage analysis with probes locating near Hp gene is under consideration.

Key words: haptoglobin, haptoglobin deficiency, haptoglobin-specific DNA probe.

はじめに

血清ハプトグロビン (Hp) は、臨床的には肝炎の急性期や肝硬変症などで Hp の合成が障害されたり、溶血性貧血や異型血輸血による溶血などで Hp が消費されたような場合に著減や欠損がみられる¹⁻⁴⁾。一方、健康人にも、Hp 欠損者がみられ、その原因として家族性であるとする報告の他に、一過性の欠損であったり、遺伝的に説明のつかない欠損例も報告されている⁵⁻⁷⁾。これらの患者あるいは健康人の欠損は、これまで免疫血清学的方法で得られた成績により議論されてきた。近年 DNA 分析による遺伝子レベルでの検査が確立されてきたことでもあり^{8,9)}。それらによる分析は価値のあるも

のと考えられる。

今回、健康人血清を対象に3種類の免疫学的方法により Hp の有無をスクリーニングし、欠損例については白血球より DNA を抽出し、Hp α 鎖特異的プローブ (Hp 2 α) を用いて Southern hybridization を行った。その結果、Hp をコードする遺伝子の欠損ではないかと考えられる1例が見いだされたのでこの例を中心に報告する。

材料および方法

1. 対象

被検血清は秋田県赤十字血液センターより、諸検査の終了した献血者血清 9,711 検体の供与を受けたものである。

Haptoglobin deficiency detected by DNA analysis.

* Naofumi Yoshioka, Hitomi Meguro; 秋田大学医学部法医学教室

** Tsuyoshi Yokoi; 北海道大学薬学部分析化学教室

*** Masayuki Nata, Kaoru Sagisaka; 東北大学医学部法医学教室

† Kaoru Morita; 東邦大学医学部免疫学教室

Correspondence address: Naofumi Yoshioka, Department of Forensic Medicine, Akita University School of Medicine, 1-1-1 Hondo, Akita 010, Japan.

(受付 1991年6月5日, 受理 1991年6月11日)

本稿は故 児玉桂三先生生誕百年記念号に向けて執筆したものである。

Table 1. Flow chart of screening for Hp phenotype deficiency.

る。Table 1 に示す方法で血清学的にスクリーニングし、最終段階まで陰性の例については、血液センターにストックしてある抗凝固剤入り血液の白血球から DNA を抽出し、分析を行った。

2. 血清学的スクリーニング (Table 1)

Table 1 に概略を示してあるが、最初のステップはアガロースゲルによる二元免疫拡散法である。ヘキスト社製の抗 Hp 血清を中心孔に入れ、周囲に 6 個の試料孔をあけ、一晚拡散後沈降線を観察した。この方法で陰性の例については、血清をライホゲルで約 3 倍に濃縮し、ヘモグロビン (Hb) 溶液と 1:1 に混合した。これについて通常のポリアクリルアミドゲル泳動 (PAGE) を行った後、オルトトルイジンにより Hp-Hb 複合体の染色を施し観察した。これによっても陰性の場合は、検体を PAGE にかけて、Western blotting (WB) 後の膜を自家製抗 Hp α 鎖血清で感作し、酵素標識二次抗体により Hp を検出した¹⁰⁾。ここまでの検査で陰性の例を phenotype の欠損とし、次のステップの DNA 分析を行った。

3. DNA 分析 (Table 2)

白血球 DNA をフェノール・クロロホルムで抽出し、以下に示す制限酵素で消化後、常法に従ってアガロースゲル泳動、Southern blotting を行った。次いで Hp 2 α 特異的プローブとハイブリダイズさせ、オートラジオグラフィーを行いバンドを観察した。Hp 2 α 特異的プローブは University of North Carolina at Chapel Hill の Dr. Maeda より供与を受けた¹¹⁾もので、長さ 500 bp、領域は 16 q 22.1 である。ラベリングは Multiprime DNA Labeling System (Amersham U.K.) による ³²P- α dCTP (3,000 μ Ci/mmol) を用いた。ここで使用した制限酵素は、*Eco* RI, *Hind* III, *Pst* I, *Bcl* I, *Sst* I, *Xba* I, *Bam* HI および *Bgl* II の計 8 種であり、詳細は既報のとおりである⁹⁾。

Table 2. Procedure of Southern blotting analysis of genomic DNA.

4. その他の検査

DNA 分析でバンドの認められなかった例については再度採血し、一通り同様の検査を繰り返し実施した。それ以外に、染色体分析 (エスアールエルの Genetic Research Laboratory に依頼)、肝機能を中心とした血液化学的検査を行った。

成 績

9,711 検体のうち、二元免疫拡散法にて沈降線の認められなかったのは 24 例であった。引き続き行った PAGE-オルトトルイジン染色での陰性例はこの 24 例中 20 例であった。さらに抗 Hp α 鎖抗体を用いる PAGE 後の Western blotting では、7 例が依然陰性であった。すなわち、9,711 例のうち 7 例が、免疫血清学的検査で Hp 欠損であった。

この 7 例の白血球 DNA を Southern hybridization で検査すると、6 例は通常の 2-2 型のバンドを呈したが、1 例は制限酵素 *Eco* RI, *Hind* III, *Pst* I, *Bcl* I, *Sst* I, *Xba* I で消化したときにはいかなるバンドも認められなかった。また *Bam* HI または *Bgl* II で消化したときには、6.9 kb および 8.5 kb の位置に非常に薄いバンドを認めた (Fig. 1)。この例については再度採血し、確認の意味で同様の制限酵素を用いて再検査したが結果はまったく同じであった。同時に母からも採血し (父はすでに死亡、同胞一人の協力は得られなかった) 検査を行ったが、母は通常の 2-2 型で一元拡散法による定量でも Hp 量は正常内範囲であった。Fig. 1 に母と同時にを行った DNA 検査成績を示す。

発端者は 30 歳男性、独身。既往歴として、5 歳頃肝臓を悪くしたとのことであるが、詳細は不明である。その後はとくに疾病に罹患したという既往はなく、健康に生活してきており、献血回数も 20 回に及んでいる。現

Fig. 1. Autoradiogram of hybridized DNA from propositus and his mother.

Fragment length was indicated in kb. When samples were digested with *EcoRI*, *HindIII*, *PstI*, *BclI*, *SstI* and *XbaI*, no band was observed in propositus lane, but a faint band was observed at 6.9 kb or 8.5 kb digested with *BamHI* or *BglII* respectively.

Table 3. Laboratory findings of the propositus.

GOT	40 (KU)	CHOL	213 (mg/dl)	RBC	490 ($\times 10^4/\mu\text{l}$)
GPT	81 (KU)	BUN	16 (mg/dl)	WBC	6500 ($/\mu\text{l}$)
LDH	160 (U/l)	T-Bil	0.8 (mg/dl)	Ht	48 (%)
ALP	9 (KAU)	TP	7.4 (g/dl)	Hb	15.1 (g/dl)
γ -GTP	51 (IU/l)	ALB	3.9 (g/dl)	PLT	23 ($\times 10^4/\mu\text{l}$)
CPK	92 (IU/l)	A/G	1.1		

Fig. 2. Immunoelectrophoretic pattern of propositus. Pattern was almost similar to standard serum except Hp defect.

在も体格は肥満体であるが平常に仕事をし、自覚症状はまったくない。赤血球血液型には亜型や変異型はなく、蛋白分画は正常で、血清の免疫電気泳動法による観察では (Fig. 2), Hp の欠損以外、免疫グロブリンや他の血清蛋白に異常は認められなかった。血清の生化学的検査では、ALT (GPT) が 81 KU とやや高値を示すのみで他の検査項目や血算値はほとんど正常であった (Table 3)。念のため行った染色体分析では、Gバンド法で 17 染色体短腕にわずかのヘテロクロマチンの増大が認められたが正常範囲内の変異と解釈され、Hp 遺伝子が存在する 16 染色体にはまったく異常は認められなかった。

以上のごとく、発端者には Hp が欠損であることによる自他覚的な症状、所見はまったく認められなかった。

考 察

Hp の欠損は著者等が過去に行った免疫血清学的方法による成績では、200~300 人に 1 人の割合で見いだされていた。しかし検査の手法や感度の相違などで、今回の検索では、約 1,400 人に 1 人という割合で、しかも DNA レベルまでの検査で陰性と考えられるのは約 1 万人に 1 人というきわめて低頻度であった。Hp の欠損は一般的に家族性と考えられることが多いが、一方で Rougemont ら⁵⁾は、遺伝的な Hp 欠損は本当に存在するのかという疑問を投げかけている。今回、免疫血清学的検査で Hp の認められなかった 7 例のうち 6 例は DNA 分析で Hp gene は正常に存在することが確認された。これはおそらく一過性欠損の範疇に含まれるものと考えられる。また、DNA 検査でも Hp gene の欠損と考えられた例の母には Hp は認められており、通常

の 2-2 型と判定されたことなどからすると、この例については遺伝的な原因は考えにくい。むしろ突然変異のようなことが起こり Hp を code する遺伝子が欠落したと考えれば説明は容易である。しかし、使用したプローブが 1 種類であることから確定的なことはいえず、もし可能ならば Hp 遺伝子の局在している 16 q 22.1¹²⁾ 付近の遺伝子をプローブとした連鎖解析法など、 β 鎖 related gene のプローブを用いた検討により、より明確な情報が得られるものとする。これまで DNA レベルの検査では変異型の報告は散見されるが⁸⁻¹¹⁾、本例のような gene 欠損と考えられる報告はこれまでのところ見られない。この例が今後何らかの臨床症状を示さずに経過するかどうかの観察は必要であるが、危惧される点として将来何らかの病気や外傷などで輸血がなされた際、抗 Hp 抗体を産生する可能性が考えられることである。抗 Hp 抗体による輸血副作用は本邦で 1 例報告があり¹³⁾、それによると、IgA 欠損症患者が血液製剤の輸注でアナフィラキシー様反応を呈するようなきわめて重篤な症状を示すとされている。したがって、発端者へ Hp が欠損していることの説明も考慮中であり、前述した Hp 欠損の原因をより明確にできる DNA 検査を含めた諸検査を、同胞 1 人についても実施する必要がある。

稿を終えるにあたり、Hp 2 α 特異的プローブの供与を受けたノースカロライナ大学 Dr. N. Maeda に深謝いたします。被検血清の供与を受けた秋田県赤十字血液センターにお礼申し上げます。

文 献

- 1) 大城 猛: 臨床ハプトグロビン, 初版, 永井書店, 大阪, 1987, p. 89.
- 2) 吉岡尚文, 他: 診断と治療, 67: 149, 1979.
- 3) Kallai, L.: Gastroenterology, 105: 27, 1966.
- 4) Nosslin, B. F.: Lancet, 1: 1000, 1958.
- 5) Matsunaga, E.: Jpn. J. Hum. Genet., 7, 133, 1962.
- 6) Rougemont, A. et al.: Hum. Hered., 30: 201, 1980.
- 7) Yoshioka, N. et al.: Asean J. Clin. Sci., 1: 232, 1980.
- 8) David, F. et al.: Electrophoresis, 7: 570, 1986.
- 9) Yokoi, T. and Sagisaka, K.: Forensic Sci. Int., 45: 39, 1990.
- 10) Shindo, S.: Electrophoresis, 11: 483, 1990.
- 11) Maeda, N. et al.: Nature, 309: 131, 1984.
- 12) McGill, J. R. et al.: Cytogenet. Cell Genet., 38: 155, 1984.
- 13) 加藤俊明, 他: 日輸血会誌, 29: 221, 1982.

要 旨

健康人のハプトグロビン (Hp) 欠損の原因は不明の部分が多い。9,711 例を血清学的にスクリーニングしたところ、7 例が表現型欠損と考えられた。この 7 例について Hp 2 α プローブを用い白血球 DNA の分析を行った。その結果、6 例は intact な Hp 遺伝子の存在が確認されたが、1 例は、Hp をコードする遺伝子の欠損ではないかと考えられた。この例は 30 歳男性、体格はや

や肥満体、幼少時肝臓を悪くしたという既往があるほかは、ずっと健康に成育し、現在も平常に仕事をしている。臨床検査成績では、GPT に軽度の上昇をみるのみで、他の肝機能検査値、血算値は正常範囲内である。母は通常の 2-2 型と判定され、定量値も正常範囲である。したがって、本例は遺伝的な原因は考えにくく、むしろ突然変異のようなことが起こり、Hp の合成が障害されたのではないかと推察される。