

6 赤血球酵素異常による遺伝性溶血性貧血

遺伝性球状赤血球症などの膜異常やヘモグロビン異常症などが否定され、原因不明の遺伝性非球状溶血性貧血の場合には赤血球酵素異常の検査が必要である。表 4-29 に酵素異常による遺伝性溶血性貧血の種類、特徴とわが国での報告例数を一覧した。このような異常症の検査には、酵素活性の測定と、赤血球の中に蓄積される解糖中間体や減少するアデニンヌクレオチドの測定が行われる。現在では、遺伝子検査によって赤血球酵素活性異常の原因となる遺伝子異常が検索されている（詳細は 359 頁文献参照）。

1 赤血球酵素活性測定法

●原理 赤血球酵素活性測定法は、Beutler らによる方法が ICSH の標準法とされている。多くの酵素活性測定の原理は、血漿・白血球・血小板を除いて作製した赤血球溶血液を試料として、それぞれの酵素に対応する基質と NAD（NADH）あるいは NADP⁺（NADPH）などを添加し、最終的には NADH あるいは NADPH による 340 nm の吸光度の増減を分光光度計で測定するものである。わが国で頻度の高いピルビン酸キナーゼ（PK）とグルコース-6-リン酸脱水素酵素（G-6-PD）の測定原理について図 4-40 に示した。ここに示さない酵素活性の測定は 359 頁文献参照。

●試料の作成 通常はヘパリンを抗凝固剤として、静脈血を 5～10 ml 採血する。常法の遠心により血漿と buffy coat を除去し、赤血球層に等量の生理食塩水を加えた溶液を micro-crystalline cellulose/α-cellulose を詰めたミニカラムに通して、残存する白血球・血小板を完全に除去する。赤血球はさらに生理食塩水で 3 回洗浄後、ヘマトクリット約 50% の赤血球浮遊液とし、この 0.2 ml に EDTA 安定化溶液 [2.7 mmol/l EDTA（pH7.0）、0.7 mmol/l 2-mercaptoethanol] 1.8 ml を加えて完全に溶血させ（1：20 溶血液）、測定まで－80℃で保存する。

ただちに測定できない場合や専門の研究施設に検査を依頼する場合は全血のまま 4℃に保存し、運搬する。採血後 3 日以内は測定可能である。

●試薬 ① PK 測定試薬

0.1 M Tris-HCl/0.5 mM EDTA pH8.0 緩衝液中に最終濃度 10 mM MgCl₂；100 mM KCl；0.2 mM NADH；1.5 mM ADP；5 mM PEP（phosphoenolpyruvate）；6 U LD を溶解する。

② G-6-PD 測定試薬

0.1 M Tris-HCl/0.5 mM EDTA pH8.0 緩衝液中に最終濃度 10 mM MgCl₂；0.2 mM NADP；

表 4-29 赤血球酵素異常による遺伝性溶血性貧血とわが国での頻度（藤井・三輪，1988）

酵 素 名	遺伝形式	特 徴	家系	症例
Embden-Meyerhof 回路 ヘキソキナーゼ（HK） グルコースリン酸イソメラーゼ（GPI） ホスホフルクトキナーゼ（PFK） アルドラーゼ（ALD）	常染色体劣性 常染色体劣性 常染色体劣性 常染色体劣性	〔ATP 産生低下による溶血〕 解糖系では PK 異常症について多い 筋症状を伴う例と欠く例あり 精神身体発育異常、外表奇形を伴う例と溶血性貧血のみの家系あり	0 9 5 1	0 11 9 2
三炭糖リン酸イソメラーゼ（TPI）	常染色体劣性	精神神経症状、筋症状、易感染性、心筋障害（突然死）	1	2
ホスホグリセリン酸キナーゼ（PGK） ピルビン酸キナーゼ（PK）	伴 性 常染色体劣性	精神神経症状、筋症状を伴う例が多い 解糖系では最も多い	3 60	3 68
Rapoport-Luebering 回路 ジホスホグリセリン酸ムターゼ（DPGM）	常染色体劣性	2,3-DPG 低下、酸素解離曲線の左方偏位	1	1
五炭糖リン酸回路およびグルタチオン代謝・合成系 グルコース-6-リン酸脱水素酵素（G-6-PD） グルタチオン還元酵素（GR）	伴 性 常染色体劣性	〔薬剤惹起性溶血〕 頻度最多、世界で 4 億人以上 リボフラビン欠乏による後天性の例あり	105 0	119 0
グルタチオンペルオキシダーゼ（GSH-Px）	常染色体劣性	人種間で活性値に差あり、セレニウム欠乏による活性低下もある	3	3
グルタチオン合成酵素（GSH-S） グルタミルシステイン合成酵素（GC-S）	常染色体劣性 常染色体劣性	GSH 著減 GSH 著減	0 0	0 0
ヌクレオチド代謝 アデニル酸キナーゼ（AK） ピリミジン-5'-ヌクレオチダーゼ（P-5'-N） アデノシンデアミナーゼ（ADA）（過剰産生）	? 常染色体劣性 常染色体優性	赤血球 ATP 正常 好塩基性斑点、ピリミジンヌクレオチドの著明な蓄積 正常酵素蛋白の過剰産生	2 10 2	2 14 2

血 液

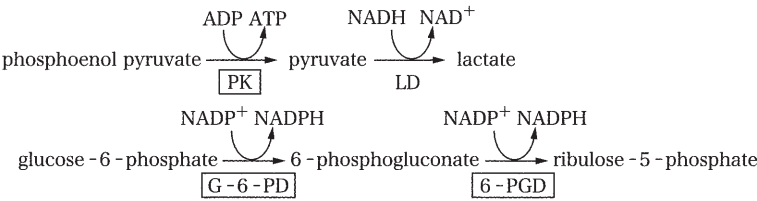


図 4-40 PK、G-6-PD 活性測定原理

0.6 mM G-6-P（glucose-6-phosphate）；0.6 mM 6-phosphogluconic acid を溶解する。

③ 6-phosphgluconate dehydrogenase（6-PGD）測定試薬

0.1 M Tris-HCl/0.5 mM EDTA pH8.0 緩衝液中に最終濃度 10 mM MgCl₂；0.2 mM NADP；0.6 mM 6-phosphogluconic acid を溶解する。

●実施 ① 37℃に加温した測定試薬 980 μl に 1：20 溶血液 20 μl を添加する。

② 37℃での吸光度変化を 10 分間以上レコーダーに記録する。

③ 溶血液の代わりに水 20 μl を加え、ブランクとする。

④ それぞれの 1 分間当たりの吸光度変化を求める（ΔOD）。

⑤ ヘモグロビン 1 g 当たりの酵素活性を次式に従い計算する。

IU/gHb＝ΔOD/6.3×1.000（ml）/0.001（ml）×100/溶血液の Hb 濃度（g/dl）

ただし、G-6-PD 活性は試薬②を使用した活性から試薬③を使用した活性（6-PGD 活性）を引いたものである。

●基準範囲 PK：12.0-15.6 IU/gHb（PK：11.2-34.4 IU/gHb；低 PEP 濃度使用時，下記③参照）

G-6-PD：6.33-7.91 IU/gHb

●測定上の変動要因 ① 被検者赤血球の真の活性を測定するためには、過去 3 カ月以内に輸血を受けていないことが重要である。輸血に依存している患者においては、最低 1 カ月以上輸血を受けていないことが必要である。

② 酵素活性は温度に依存するので、37℃で吸光度変化を測定できる分光光度計が必要である。

③ 酵素異常症は、一次構造の異なった変異酵素の産生によるものであり、至適に近い活性測定の条件下では必ずしも活性低下がみられずに、正常または活性増加を示すことがある。このような場合には、基質濃度を下げて（low substrate system）測定するか、中間代謝物の測定によって確認できる。例えば、PK 活性測定においては PEP の濃度を下げて実施する。

④ 基質・補酵素・酵素類に不純物が混入していると正しい測定ができない。Boehringer-Mannheim 社あるいは Sigma 社のものが用いられることが多いが、十分に注意が必要である。また、NADH あるいは NADPH など不安定なものは、溶解後 8 時間以内に使用する。

2 解糖中間体の測定法

●原理 中間代謝物測定の原理は、全血から溶血・除蛋白して作製した試料（抽出液）について、NAD（NADH）あるいは NADP（NADPH）を補酵素とする反応系を利用し、最終的には NADH あるいは NADPH による 340 nm の吸光度の増減を分光光度計で測定するものである。ここに示さない中間代謝産物の測定は 359 頁文献参照。

●試料の作成 あらかじめ氷冷しておいた 0.6N 過塩素酸 20 ml に、ヘパリンを抗凝固剤として採血した静脈血 5 ml を正確に加え混和する。10～30 分間氷冷後、3,500 rpm 15 分間 4℃で冷却遠心する。上清 10 ml に 1 M トリエタノールアミン-HCl 緩衝液、pH7.4 を 1 ml 加え氷冷する。10N KOH で pH7.2～7.4 に中和する（10N KOH 使用量を記録する）。中和後、さらに 10 分間冷却し過塩素酸を十分沈殿させる。沈殿物を 2,500 rpm 5 分間 4℃で冷却遠心して除去し、上清を抽出液として測定に使用する。

ただちに測定できない場合や専門の研究施設に検査を依頼する場合は、抽出液を－80℃で保存する。30 日間は保存可能である。

●試薬と測定 ① ピルビン酸、PEP(phosphoenolpyruvate)、2PG(2-phosphoglycerate)、3PG(3-phosphoglycerate) 測定

抽出液 950 μl に、0.05 M トリエタノールアミン-HCl 緩衝液 pH7.4 200 μl、10 mg/ml NADH 10 μl、1 M MgCl₂ 50 μl、30 mg/ml ADP 20 μl を添加し、さらに 300 U/mg LD 5 μl を加え、340 nm の吸光度変化を吸光度が一定になるまで記録する（ピルビン酸測定）。さらに、同様に 200 U/mg PK 5 μl を加え PEP を、400 U/mg enolase 5 μl を加え 2PG を、500 U/mg phosphoglyceromutase 5 μl を加え 3PG を測定する。

② G-6-P（glucose-6-phosphate）、F-6-P（fructose-6-phosphate）測定

抽出液 1,000 μl に、0.05 M トリエタノールアミン-HCl 緩衝液 pH7.4 200 μl、25 mg/ml NADP 20 μl を添加し、さらに 350 U/mg G-6-PD 5 μl を加え、340 nm の吸光度変化を吸光度が一定になるまで記録する（G-6-P 測定）。さらに、同様に 350 U/mg glucose phosphate isomerase 5 μl を加え、吸光度が一定になるまで記録する（F-6-P 測定）。

●計算 それぞれの 1 分間当たりの吸光度変化（ΔOD）を求め、ピルビン酸・乳酸・ブドウ糖は赤血球内外で同濃度と考え nmol/ml 全血、その他の中間体は nmol/ml RBC として、次式に従い計算する。

中間体濃度＝ΔOD/6.3×（V or V'）×f'

ただし、V or V'：全血の希釈倍数

V＝ $\frac{\text{過塩素酸量}+\text{血液中水分量}}{\text{血液量}} \times \frac{\text{中和後総量}}{\text{採取上清量}}$ 単位：nmol/ml 全血

ただし、血液中水分量＝血液量× $\left(0.7 \times \frac{\text{Ht}}{100} + 0.93 \times \frac{100-\text{Ht}}{100}\right)$ である。

V'＝V×100/Ht 単位：nmol/ml RBC

f'：測定による抽出液希釈倍数

f'＝反応総液量/反応に使用する抽出液量

●基準範囲 3PG：25.6～55.2 nmol/ml RBC

2PG：3.0～11.0 nmol/ml RBC

PEP：8.9～19.7 nmol/ml RBC

ピルビン酸：20.0～103.2 nmol/ml 全血

G-6-P：11.8～50.2 nmol/ml RBC

F-6-P：4.9～10.1 nmol/ml RBC

●臨床的意義 赤血球の酵素活性を測定し活性低下が認められた場合、あるいは活性値が通常の測定条件で正常な場合でも強く酵素異常症が疑われる場合には、酵素の所属する代謝系の上位中間体の蓄積（PK 異常症で PEP、2PG、3PG、2,3-ジホスホグリセリン酸の蓄積と ATP の低下）、あるいは代謝産物の低下（HK 異常症や PFK 異常症では 2,3-ジホスホグリセリン酸や ATP の減少）を証明することが必要である。とりわけ、PK 異常症でしばしばみられる基質親和性の高い変異酵素では、生理的基質濃度では著しい活性低下をきたすにもかかわらず、酵素活性測定に用いる基質濃度（5 mM PEP）ではほとんど正常の活性を示す。

●測定上の変動要因 赤血球酵素活性測定法と同様

血 液