

先天性溶血性貧血早期診断のための臍帯血を用いた  
赤血球膜の評価に関する検討：成人との比較  
(要約)

日本大学大学院医学研究科博士課程  
内科系小児科学専攻

中原 衣里菜

修了年 2023 年

指導教員 谷ヶ崎 博

## 【背景】

先天性溶血性貧血（congenital hemolytic anemia: CHA）は、赤血球の構成要素である膜蛋白・酵素・ヘモグロビンなどの遺伝子変異により、生理的機能が破綻することで赤血球の寿命が短縮する遺伝性疾患群である<sup>1)</sup>。日本では、赤血球膜異常症が CHA 患者の約 70%を占めている<sup>2),3)</sup>。近年そのスクリーニング検査としてフローサイトメトリーを用いた定量的赤血球浸透圧脆弱性試験（flow cytometric osmotic fragility: FCM-OF）と Eosin 5'-Maleimide（EMA）結合能検査が有用と報告されている<sup>4),5)</sup>。FCM-OF は、赤血球浮遊液に途中で低張液を加えて溶血させ、その前後の赤血球数をフローサイトメーター（flow cytometer: FCM）で経時的にカウントする。残存する赤血球が少ないほど赤血球膜の抵抗性が減弱していることを意味し、逆に残存する赤血球が多い場合には、赤血球膜の抵抗性が増加していることを意味する。EMA 結合能検査は、主に赤血球膜表面の Band3 を EMA で染色し、その蛍光強度を FCM で検出する。赤血球膜の細胞骨格蛋白の減少もしくは質的な変化によって、EMA 結合能は低下する。

CHA はビリルビン脳症の原因となり得るため、早期診断と迅速な介入が重要であるが<sup>6)-8)</sup>、新生児期の診断は困難な場合が多い<sup>9)-14)</sup>。臍帯血（umbilical cord blood: CB）は出生時に無侵襲に採取でき、これを用いた FCM-OF、EMA 結合

能検査は、新生児早期の溶血性疾患の鑑別に役立つ可能性があると考えた。しかし、CB 中赤血球は胎児型ヘモグロビンを多く含み、赤血球膜の組成や酵素活性も成人赤血球と異なる<sup>15)</sup>など性質の差があるため、検査基準値は異なると仮定した。新生児期のヘモグロビン分画や赤血球酵素活性に関する報告はあるが<sup>16)</sup>、これまでに CB を用いた FCM-OF および EMA 結合能検査の新生児基準値に関する報告はない。

## 【目的】

CHA 早期診断の可能性を模索するため、CB 中赤血球の FCM-OF および EMA 結合能検査の値を測定して新生児基準値を作成し、成人末梢血 (adult peripheral blood: AP) 中赤血球の値と比較した。また、採血後の FCM-OF と EMA 結合能検査の値の経時的な変化を評価し、検査測定が検体採取後何日目まで可能かを検討した。さらに、出生時の新生児の健康状態が、検査の測定値に影響を及ぼすかを評価した。

## 【方法】

### 1. 対象と解析方法

帝王切開により出生した日本人新生児の CB と健康診断時に採取した健常成

人の末梢静脈血を対象とした。CB については、出生体重 90% tile 以上の児を large-for-gestational age (LGA)、出生体重 10~90% tile の児を appropriate-for-gestational age (AGA)、出生体重 10% tile 未満の児を small-for gestational age (SGA) に分類し<sup>18)</sup>、37 週未満で出生した児を早産児と定義した。CB の基準値作成にあたり、早産児および生後 1 か月の健診までに貧血や黄疸を認めた児を除外した。また、mean corpuscular volume (MCV) 80 fL 未満の場合には鉄欠乏性貧血の可能性があるため除外した。

CB は手術室で帝王切開時に臍帯静脈より採取した。検体は CB、AP とともに ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) 管に採取し、速やかに 4℃で静置保存した。検査直前に遠心して血漿と Buffy coat を除去し、その後、生理食塩水 1mL を用いて 3 回遠心洗浄して得られた赤血球沈査を検査に用いた。検体採取日を day1 とし、day1、2、3、4、7、10、14 に FCM-OF と EMA 結合能検査を施行した。FCM は FACSVia™、解析ソフトは BD FACSVia™ Research Software を用いた。

CB 中赤血球と AP 中赤血球の比較に加え、CB の中で性別 (男 vs 女)、在胎週数 (正期産 vs 早産)、体格 (AGA vs SGA)、仮死の有無、合併症の有無により、2 群間の比較を行った。また、測定値の経時的変化や、CB 血液ガス分析の FCM-OF、EMA 結合能検査の測定値への影響について検討した。得られた

データは統計ソフト JMP™ を用いて解析し、 $p < 0.05$  を有意水準とした。

本研究は、日本大学医学部倫理委員会による承認（令和 2 年 3 月 23 日承認、承認番号: 283-0、284-0）を得ており、CB は事前に親から、AP は本人から文書による同意を得た。

## 2. FCM-OF

Won ら<sup>4)</sup>の方法に準じて検査を行った。生理食塩水 500 $\mu$ L と赤血球沈査 5 $\mu$ L を混合し、赤血球浮遊液を作成した。生理食塩水 1,200 $\mu$ L と作成した赤血球浮遊液 10 $\mu$ L を混合したものをサンプルとした。time / forward-scatter (FSC) で軸を取り、plot を作成した。測定開始から測定終了までは 5 分間とし、第 1 区画 (R1) を最初の 30 秒、第 2 区画 (R2) を最後から 2 番目の 30 秒、第 3 区画 (R3) を最後の 30 秒とした。サンプルを FCM に取り付けて細胞数をカウントし、R1 を過ぎた時点で蒸留水を 800 $\mu$ L 加えて、残りの 4 分 30 秒間測定した。残存赤血球 (residual red cells: %RRC) を以下の式で計算し、赤血球浸透圧抵抗を算出した。

$$\%RRC = \frac{(R2+R3) \times 1/2}{R1 \times 1.2/2} \times 100$$

### 3. EMA 結合能検査

King ら<sup>5)</sup>の方法に準じて検査を行った。(染色サンプル) 0.5mM/mL EMA 25 $\mu$ L と赤血球沈査 5 $\mu$ L を混合し、暗所、室温 (25 $^{\circ}$ C) で 60 分間振盪インキュベーションした。スピンドウンして上清の EMA 試薬を除去し、0.5% bovine serum albumin (BSA) / phosphate-buffered saline (PBS) 500 $\mu$ L で 2 回遠心洗浄した。赤血球ペレットを 0.5% BSA/PBS 500 $\mu$ L で再懸濁し、赤血球懸濁液とした。(未染色陰性コントロールサンプル) 0.5% BSA/PBS 500 $\mu$ L と赤血球沈査 5 $\mu$ L を混合した。

両サンプルとも、この赤血球懸濁液 100 $\mu$ L を 0.5% BSA/PBS 900 $\mu$ L に加えて 10 倍希釈液を作成した。凝集塊を取り除き、未染色陰性コントロールサンプル、染色サンプルの順に FCM で測定を行った。赤血球領域を選択し、その平均 fluorescein isothiocyanate (FITC) 値 $\times 10^{-3}$  を EMA 結合能 (mean channel fluorescence: MCF 値) とした。

#### 【結果】

CB 53 名 (正期産児 39 名、早産児 14 名)、AP 32 名の検体について、FCM-OF と EMA 結合能検査を施行した。正期産の中で 1 か月健診時まで貧血・黄疸を認めた児 3 名を除外し、残りの 36 名を CB 群として基準値作成を行った。

## 1. FCM-OF、EMA 結合能検査：CB 中赤血球と AP 中赤血球の比較

CB 群 36 名と AP 群 32 名の FCM-OF、EMA 結合能検査の測定値の比較を図 1、2 に示す。FCM-OF の測定値 (%RRC) は、どの測定日においても CB 群が AP 群より有意に高値だった。EMA 結合能の測定値 (MCF 値) は、day1、2 は AP 群が有意に高値だったが、day10、14 は CB 群が有意に高値だった。

また、早産児も含めて検討するため、CB 群 36 名に早産児 14 名を加えた CB 50 名に対して、FCM-OF、EMA 結合能検査の測定結果に影響を与えうる因子を検討した。性別 (男 vs 女)、在胎週数 (正期産 vs 早産)、体格 (AGA vs SGA)、仮死の有無、合併症の有無について比較を行ったが、いずれも有意差は認めなかった。

## 2. 検査結果の経時的変化、CB 血液ガス分析との相関に関する検討

検査結果の経時的変化を図 3 に示す。FCM-OF について、CB 群と AP 群の両者とも、day1 から day4 の測定値に有意差はなかったが、day7 以降は有意に低下を認めた。EMA 結合能について、CB 群では day1 から day3、AP 群では day1 から day7 までの値に有意差を認めなかった。

CB 群について、出生時の CB 血液ガス分析の pH、pCO<sub>2</sub>、pO<sub>2</sub> の値と FCM-OF、EMA 結合能の測定値について、明らかな相関関係は認めなかった。

## 【考察と結論】

FCM-OF の測定値は、どの測定日においても CB 群が AP 群より有意に高値であり、CB 中赤血球は AP 中赤血球と比べて浸透圧抵抗が増大していた。原因としては、CB 中赤血球と AP 中赤血球の形態学的な差<sup>19)</sup>、網状赤血球や赤芽球などの未熟な赤血球の比率や膜蛋白の違い<sup>20), 21)</sup>、胎児型ヘモグロビンの割合の差<sup>22)</sup>などが推測される。一方、EMA 結合能の測定値は、day1、2 は AP 群が有意に高値だったが、day10、14 は CB 群が有意に高値であった。経時的な蛍光強度の変化には、Band3 の数または構造変化<sup>23), 24)</sup>、Band3 以外の膜蛋白に結合する EMA の割合<sup>25)</sup>の変化などが関与している可能性がある。

検査測定値の経時的な変化については、FCM-OF は両群とも day4 までの値に差を認めず、EMA 結合能検査は CB 群では day1 から day3、AP 群では day1 から day7 の値に差を認めなかった。そのため両検査を同時施行する場合、測定値が安定している検体採取後 3 日目までに行うことが望ましい。仮死、合併症の有無によって FCM-OF および EMA 結合能検査の測定結果には有意差を認めず、CB 血液ガス分析の pH、pCO<sub>2</sub>、pO<sub>2</sub> の値と FCM-OF、EMA 結合能の間にも相関は認められなかった。従って、出生時の新生児の状態は検査に影響を及ぼさないと考えられた。

本研究により、CB と AP では赤血球膜の浸透圧抵抗性や EMA 結合能が異な

ることを明らかにできた。そのため、新生児早期に **CHA** を診断するためには、現在行われているように成人の基準値を用いるのではなく、**CB** のデータを基に新生児の基準値を定める必要がある。本研究は、**CB** による **FCM-OF**、**EMA** 結合能検査を用いた **CHA** 早期診断のための基礎的なデータとなる。

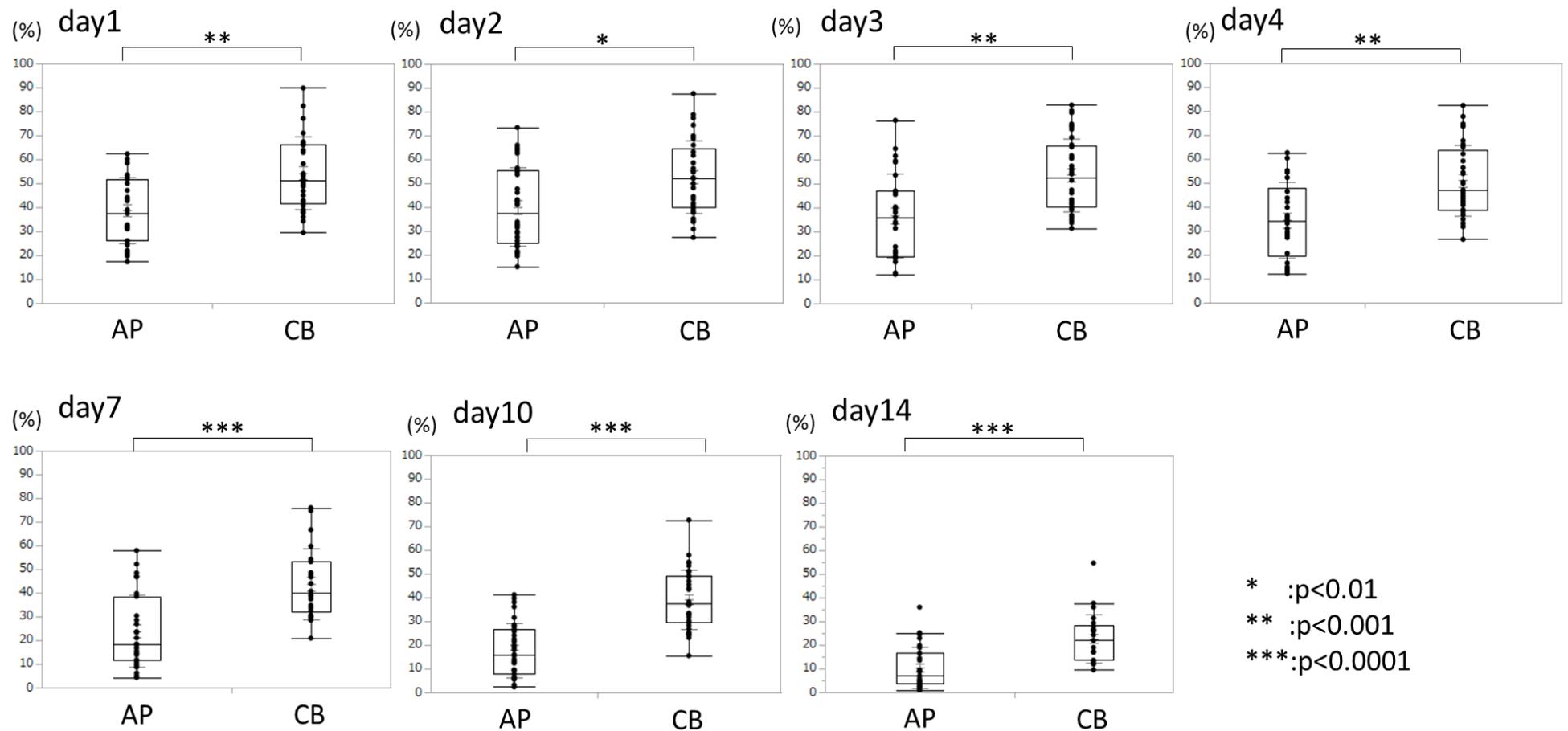


図 1. CB 中赤血球と AP 中赤血球の FCM-OF の測定値 (%RRC) の比較

どの測定日においても、浸透圧抵抗性は CB 中赤血球が AP 中赤血球より高かった。

AP, adult peripheral blood; CB, umbilical cord blood; FCM-OF, flow cytometric osmotic fragility; %RRC, residual red cells

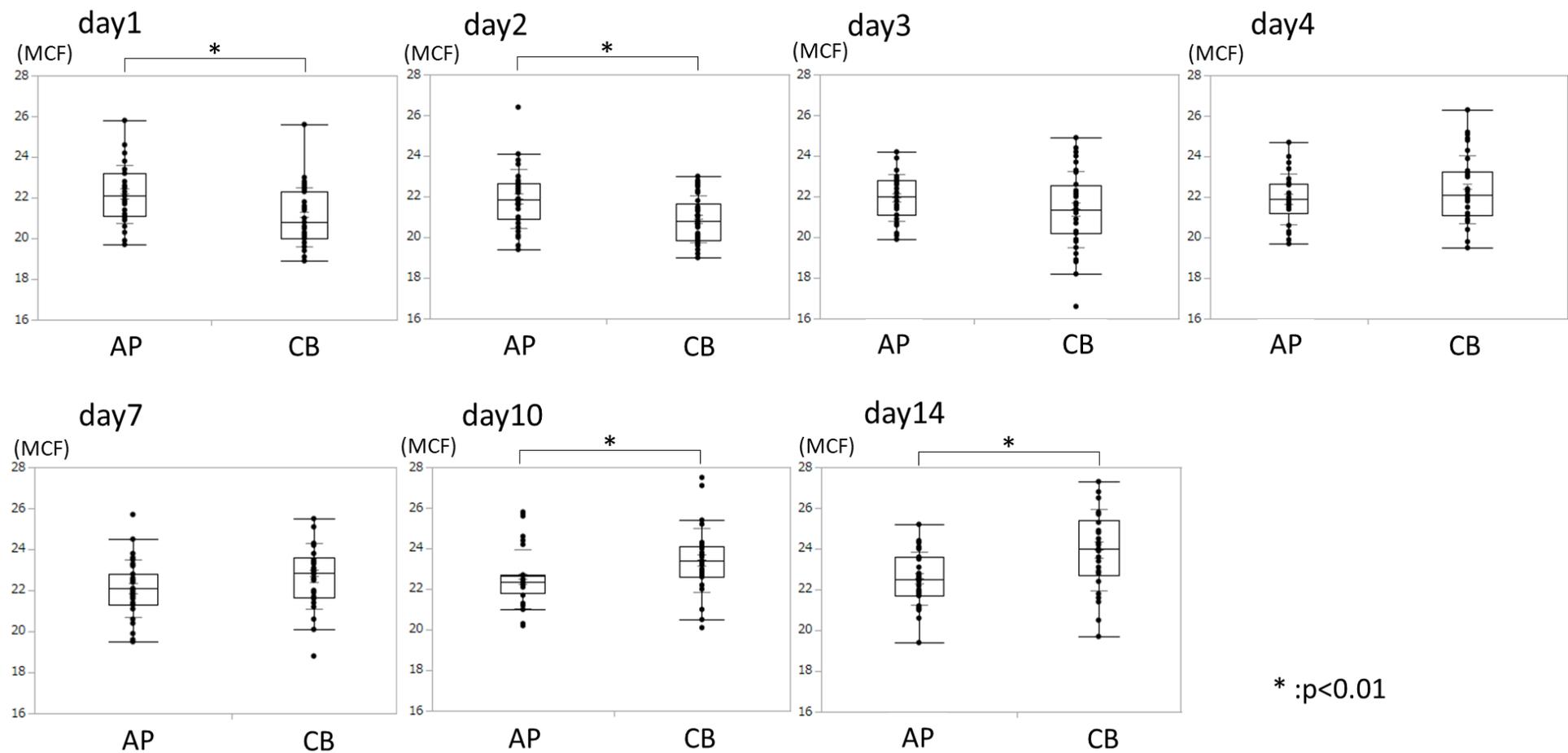
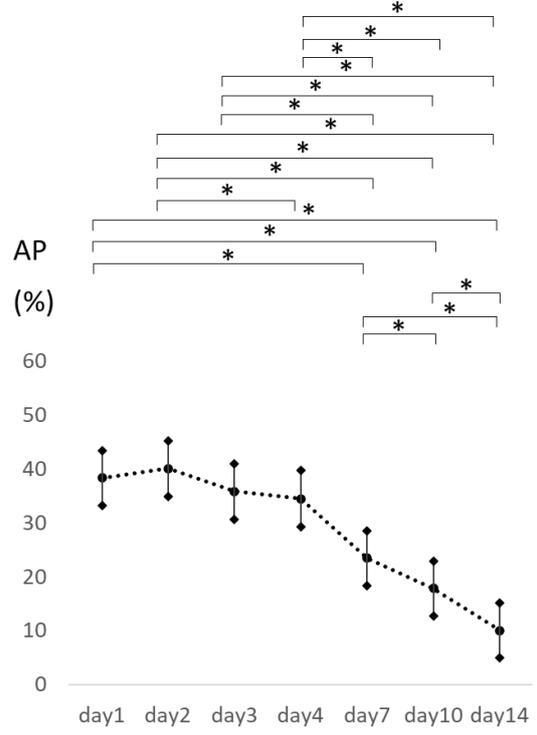
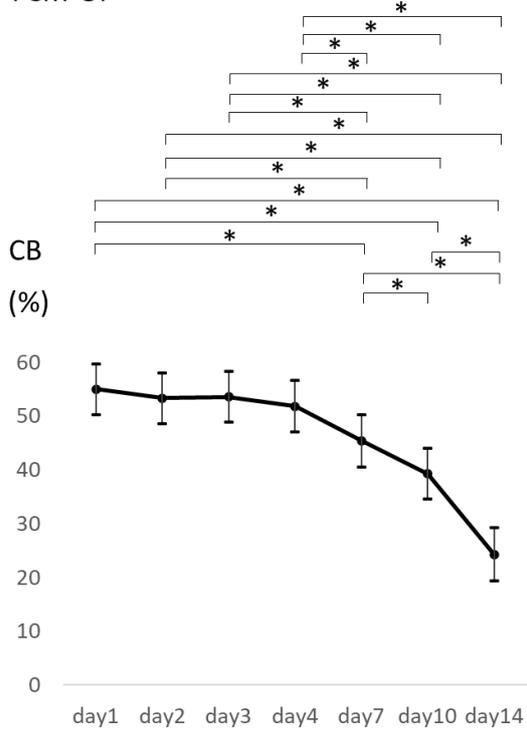


図 2. CB 中赤血球と AP 中赤血球の EMA 結合能検査の測定値 (MCF 値) の比較

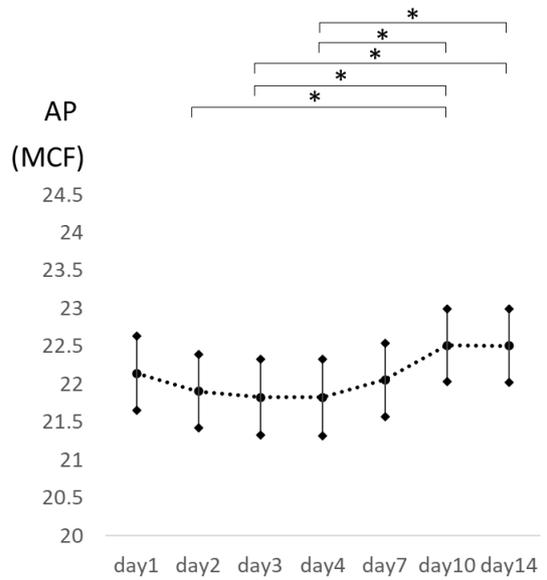
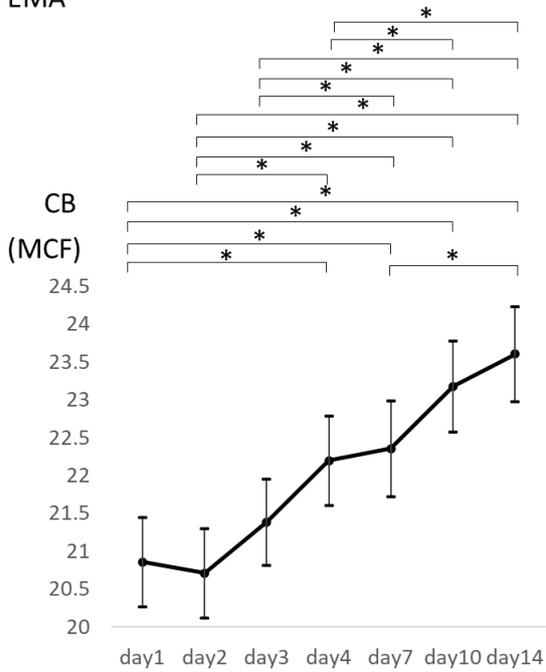
day1、2 において、EMA 結合能は CB 中赤血球が AP 中赤血球より低かった。

AP, adult peripheral blood; CB, umbilical cord blood; EMA, eosin 5'-maleimide; MCF, mean channel fluorescence

FCM-OF



EMA



\* :p<0.05

### 図 3. FCM-OF と EMA 結合能検査の経時的変化

FCM-OF について、CB 群では day1 と day7、10、14、day2 と day7、10、14、day3 と day7、10、14、day4 と day7、10、14、day7 と day10、14、day10 と day14 の間で有意差を認めた。AP 群では day1 と day7、10、14、day2 と day4、7、10、14、day3 と day7、10、14、day4 と day7、10、14、day7 と day10、14、day10 と day14 の間で有意差を認めた。つまり、%RRC は検体採取日と比較すると、両群ともに 4 日目までは有意差を認めなかった。

EMA 結合能について、CB 群では day1 と day4、7、10、14、day2 と day4、7、10、14、day3 と day7、10、14、day4 と day10、14、day7 と day14 の間で有意差を認めた。AP 群では day2 と day10、day3 と day10、14、day4 と day10、14 の間で有意差を認めた。つまり、検体採取日と比較すると、MCF 値は CB 群では 3 日目まで、AP 群では 7 日目まで有意差を認めなかった。

AP, adult peripheral blood; CB, umbilical cord blood; EMA, eosin 5'-maleimide; FCM-OF, flow cytometric osmotic fragility; MCF, mean channel fluorescence

## 【引用文献】

- 1) Haley K. Congenital Hemolytic Anemia. *Med Clin North Am.* 2017;101(2):361-374. doi: 10.1016/j.mcna.2016.09.008.
- 2) Nakanishi H, Wada H, Suemori S, Sugihara T. Hereditary red cell membrane disorders in Japan: comparison with other countries. *Rinsho Ketsueki.* 2015;56(7):760-770. doi:10.11406/rinketsu.56.760
- 3) Yawata Y, Kanzaki A, Yawata A, Doerfler W, Ozcan R, Eber SW. Characteristic features of the genotype and phenotype of hereditary spherocytosis in the Japanese population. *Int J Hematol.* 2000;71(2):118-135.
- 4) Won DI, Suh JS. Flow cytometric detection of erythrocyte osmotic fragility. *Cytometry B Clin Cytom.* 2009;76(2):135-141. doi:10.1002/cyto.b.20448
- 5) King MJ, Behrens J, Rogers C, Flynn C, Greenwood D, Chambers K. Rapid flow cytometric test for the diagnosis of membrane cytoskeleton-associated haemolytic anaemia. *Br J Haematol.* 2000;111(3):924-933. doi:10.1046/j.1365-2141.2000.02416.x
- 6) Saada V, Cynober T, Brossard Y, et al. Incidence of hereditary spherocytosis in a population of jaundiced neonates. *Pediatr Hematol Oncol.*

2006;23(5):387-397. doi:10.1080/08880010600646662

- 7) Christensen RD, Yaish HM, Gallagher PG. A pediatrician's practical guide to diagnosing and treating hereditary spherocytosis in neonates. *Pediatrics*. 2015;135(6):1107-1114. doi:10.1542/peds.2014-3516
- 8) Johnson L, Bhutani VK, Karp K, Sivieri EM, Shapiro SM. Clinical report from the pilot USA Kernicterus Registry (1992 to 2004). *J Perinatol*. 2009;29 Suppl 1(S1):S25-45. doi:10.1038/jp.2008.211
- 9) Perrotta S, Gallagher PG, Mohandas N. Hereditary spherocytosis. *Lancet*. 2008;372(9647):1411-1426. doi:10.1016/S0140-6736(08)61588-3
- 10) Bolton-Maggs PH, Langer JC, Iolascon A, Tittensor P, King MJ, General Haematology Task Force of the British Committee for Standards in Haematology. Guidelines for the diagnosis and management of hereditary spherocytosis – 2011 update. *Br J Haematol*. 2012;156:37-49.
- 11) Matoth Y, Zaizov R, Varsano I. Postnatal changes in some red cell parameters. *Acta Paediatr*. 1971;60(3):317-323. doi:10.1111/j.1651-2227.1971.tb06663.x
- 12) Aher S, Malwatkar K, Kadam S. Neonatal anemia. *Semin Fetal Neonatal Med*. 2008;13(4):239-247. doi:10.1016/j.siny.2008.02.009

- 13) Hann IM. The normal blood picture in neonates. Letsky EA. Anemia in the neonate. In: Hann IM, Gibson BES, Letsky EA, eds. Fetal and Neonatal Haematology. Bailliere Tindall Press; 1991:29-50, 51-86.
- 14) Sugita K, Maruo Y, Kurosawa H et al. Severe hyperbilirubinemia in a 10-year-old girl with a combined disorder of hereditary spherocytosis and Gilbert syndrome. *Pediatr Int.* 2007;49(4):540-542.
- 15) Zhurova M, Akabutu J, Acker J. Quality of red blood cells isolated from umbilical cord blood stored at room temperature. *J Blood Transfus.* 2012;2012:102809. doi: 10.1155/2012/102809.
- 16) Miyazono Y, Hirono A, Miyamoto Y, Miwa S. Erythrocyte enzyme activities in cord blood of extremely low-birth-weight infants. *Am J Hematol.* 1999;62(2):88-92. doi:10.1002/(sici)1096-8652(199910)62:2<88::aid-ajh4>3.0.co;2-x
- 17) Oski FA. Fetal hemoglobin, the neonatal red cell, and 2,3-diphosphoglycerate. *Pediatr Clin North Am.* 1972;19(4):907-917. doi:10.1016/s0031-3955(16)32773-0
- 18) Itabashi K, Miura F, Uehara R, Nakamura Y. New Japanese neonatal anthropometric charts for gestational age at birth: Japanese neonatal

- anthropometric charts. *Pediatr Int.* 2014;56(5):702-708.  
doi:10.1111/ped.12331
- 19) Manna S, Biswas P, Haldar R, Naskar TK, Law S. Cord and peripheral blood erythrocyte analysis by scanning electron microscopy and flow cytometry. *Int J Lab Hematol.* 2022;44(3):679-687. doi:10.1111/ijlh.13810
- 20) Wiley JS, Shaller CC. Selective loss of calcium permeability on maturation of reticulocytes. *J Clin Invest.* 1977;59(6):1113-1119. doi:10.1172/JCI108735.
- 21) Agre P, Smith BL, Baumgarten R et al. Human red cell aquaporin CHIP. II. Expression during normal fetal development and in a novel form of congenital dyserythropoietic anemia. *J Clin Invest.* 1994;94(3):1050-1058.  
doi: 10.1172/JCI117419.
- 22) 古谷博, 鹿志村朝江. 新生児赤血球の抵抗性と HbF. *産婦人科の世界.* 1964;16(8):1089-1090.
- 23) Arashiki N, Kimata N, Manno S, Mohandas N, Takakuwa Y. Membrane peroxidation and methemoglobin formation are both necessary for band 3 clustering: mechanistic insights into human erythrocyte senescence. *Biochemistry.* 2013;52(34):5760-5769. doi:10.1021/bi400405p

- 24) Leal JKF, Adjobo-Hermans MJW, Bosman GJCGM. Red blood cell homeostasis: Mechanisms and effects of microvesicle generation in health and disease. *Front Physiol.* 2018;9:703. doi:10.3389/fphys.2018.00703
- 25) King MJ, Smythe JS, Mushens R. Eosin-5-maleimide binding to band 3 and Rh-related proteins forms the basis of a screening test for hereditary spherocytosis: EMA-reactive Membrane Components in Human Red Cells. *Br J Haematol.* 2004;124(1):106-113. doi:10.1046/j.1365-2141.2003.04730.x