

# 赤血球膜異常症における膜蛋白の 病態に関する研究

—特に遺伝性橢円赤血球症について—

川崎医科大学大学院 生化学系 I  
蛋白質と核酸の生化学  
(指導: 細川桂一教授)

神 崎 暁 郎

(昭和61年11月1日受付)

## Studies on Red Cell Membrane Disorders with Membrane Protein Abnormalities —Special Reference to Hereditary Elliptocytosis—

Akio Kanzaki

Graduate Course of Biochemistry, Kawasaki Medical School

(Accepted on November 1, 1986)

遺伝性橢円赤血球症 25 例 (HE), 遺伝性球状赤血球症 5 例 (HS) および 遺伝性有口赤血球症 5 例 (H. St.) における溶血の病因について, それらの spectrin の生化学的性状, 膜機能および細胞形態の立場から検討した。

HE 症例では, その細胞形態によって 2 群に分類された。第 1 は rod shape type (rod 型細胞が 15% 以下の群), 第 2 は non-rod type (rod 型細胞が 5% 以下の群) で, 前者は 16 例, 後者は 9 例であった。溶血型の多くは non-rod type であった。さらに典型的な溶血型では, その橢円赤血球に stomatocytic change が加わっていた。一方, 膜機能 Na-influx から溶血型をみると 9 例中 8 例に, Na-influx の亢進が認められた。

rod 型細胞を遠心法により集め, その rod 型細胞の cell age と Na-influx について検討した。結果は rod 型細胞は, ovalocyte および discocyte よりさらに ageing の進行した細胞と考えられた。また, Na-influx に関しては何ら正常赤血球と有意な差を示さなかった。

しかし, この rod 型細胞より作られた Triton shell では, 明らかに mechanical stability の低下が認められた。

溶血型 HE 症例のうちで, 膜蛋白 band 4.2 欠損例が発見され, この症例では spectrin  $\alpha$ -IV domain の等電点にも異常が検出された。その他の HE, HS および H. St. 症例における spectrin の検討では, 各 domain, dimer-dimer association および耐熱安定性には異常を認めなかった。

The pathogenesis of increased hemolysis was studied on spectrin biochemistry, membrane functions and morphology in hereditary elliptocytosis (25), spherocytosis (5) and stomatocytosis.

Based on morphological features, the HE patients were classified into two major groups; those with a rod shape type ( $>15\%$ ) of elliptocytosis (16), and those with a non-rod type ( $<5\%$ ) of elliptocytosis. Most of cases with overt hemolysis were detected among the non-rod type cases. Overt hemolysis typically tended to be accompanied with stomatocytic changes, which appear to be superimposed on elliptic changes. Sodium influx increased in 8 of 9 HE patients with overt hemolysis.

Rod shaped elliptocytes were collected by the centrifugation method, and these cells were examined on the cell age and sodium influx. By this method, it was concluded that the cell age of rod shaped elliptocytes was older than ovalocytes and discocytes, and that no significant difference was detected between rod shaped elliptocytes and normal discocytes in sodium influx.

On the other hand, instability of these rod shaped elliptocytes in triton shells was detected under the mechanical shaking.

The membrane protein band 4.2 deficiency was detected in a case of hemolytic HE, in which abnormal isoelectric point of spectrin  $\alpha$ -IV domain was observed. Spectrin abnormality in domain composition, dimer-dimer association, and thermal stability were not observed in other cases with HE, HS, H. St. patients studied.

Key Words ① Hereditary elliptocytosis ② Spectrin ③ Cytoskeleton  
④ Sodium influx

## 緒 言

赤血球膜は脂質二重層と蛋白から成り、その膜内側面は cytoskeleton によって裏打ちされている。現在その cytoskeleton は、赤血球形態および機能を維持する上で不可欠なものと考えられている。これら cytoskeleton については、その分子構造面はかなり明らかにされてきた。最近先天性溶血性貧血症例の一部で、この cytoskeleton の分子異常が発見されている。すなわち、hereditary elliptocytosis (HE) では、主に hereditary pyropoikilocytosis (HPP) を中心に spectrin の種々の分子異常例<sup>1)~3)</sup>が発見され、また、その他の蛋白では band 4.1 欠損例<sup>4)</sup>も発見されている。さらに、hereditary spherocytosis (HS) でも spectrin 欠損例<sup>5)</sup>が発見されている。しかし、これらの分子異常例はむしろ特殊な例と思われる。実際、HE をはじめとする多くの先天性溶血性貧血症例、特に膜異常症における、分子異常と溶血、さらには個々の細胞形態および膜機能と溶

血との関連についてはいまだ不明な点が多い。

そこで本研究では膜蛋白異常が推定されている HE, HS, hereditary stomatocytosis (H. St.) 例における cytoskeleton, 特に spectrin の生化学的検討を踏まえた上で、それらの細胞形態および膜機能の立場から溶血機序について検討を行った。

## 対 象

HE 25 症例, HS 5 症例, H. St. 5 症例について検討を行った。H. St. 症例では全体に明らかな溶血を認め、5 例中 4 例は hydrocytosis 型であった。また、HE 症例では 9 例が溶血型、16 例が非溶血型であった。これらの HE 症例は、Lux<sup>6)</sup> および Palek<sup>7)</sup> らのいう common HE type に該当し、HPP および infantile HE は含まれていない。HE の診断はその末梢血中に楕円赤血球が 50% 以上認められる症例をもって行い、かつ鉄欠乏性貧血、巨赤芽球性貧血、サラセミアなどによる続発性症例を除外し

た。なお、溶血型の定義は血漿中の間接型ビリルビン値の高値(0.6 mg/dl 以上)、末梢血の網赤血球増加症(3%以上)、さらに典型的な臨床所見を加味して行い、これに該当しない症例を非溶血型とした。

検体にはヘパリン加新鮮静脈血を使用し、その形態観察には湿潤標本を用いた光顕による直接観察のほか、1%グルタルアルデヒド加0.1Mリン酸 buffer (pH 7.4)による固定標本についても、光顕および走査電顕的に観察した。

HEの細胞形態分類にあたっては、走査電顕写真を使用し、個々の症例で末梢血赤血球を無作為的に200個以上観察し、Bessis<sup>9)</sup>の基準に従って各細胞形態別に百分比として表現した。

## 方 法

### 1) Ghost の調製

赤血球を4°Cの150mM NaCl溶液で3回洗浄し buffy coat を除去後、Dodgeら<sup>9)</sup>の方法に従い ghost を調製した。ただし、protease inhibitor として lysing buffer に 1mM ethylene diamine tetraacetic acid (EDTA) と、0.4 mM diisopropyl fluorophosphate (DFP) を加え、pH 8.0とした。

なお、一部の症例では protease の影響を最少限にする目的で、以下の方法で ghost を調製した。新鮮静脈血から遠心操作によって、血漿と buffy coat を除去し、いわゆる赤血球分画 (packed red cells) に 0.75% (w/v) dextran T-500 加リン酸 buffer (pH 7.4)<sup>10)</sup> を、10倍量加え混和後、4°C で静置し白血球を除去した。この操作を2回行うことで、白血球をほぼ完全に除去し、赤血球を4°Cの150mM NaCl溶液で3回洗浄後、lysing buffer として 5mM NapO<sub>4</sub>, 1mM EDTA, 1.2mM phenylmethyl sulfonyl fluoride (PMSF) もしくは、2.0mM DFP を加え、pH 8.0とし、0°C で溶血させ赤血球 ghost を調製した。

### 2) Spectrin の抽出<sup>11)</sup>

ghost を low ionic strength buffer (0.1 mM NapO<sub>4</sub>, 0.1 mM EDTA, 0.25 mM DFP,

0.1mM PMSF, 0.1mM N- $\alpha$ -p-tosyl-l-lysine chloromethyl ketone (TLCK), 1 mM  $\beta$ -mercaptoethanol ( $\beta$ -me), pH 8.0) で 37°C, 20分間と 4°C, 16時間孵置し、220,000 g, 25分, 4°C で spectrin を分離抽出した。

### 3) 赤血球および抽出 spectrin の耐熱安定性<sup>12)</sup>

赤血球浮遊液および抽出 spectrin 溶液を 46°C から 49°C まで下記の条件で10分間孵置し、赤血球については budding 現象の有無を、spectrin についてはその solubility をもって、耐熱安定性の指標として、同時に行った正常コントロールの成績と対比して耐熱安定性を検討した。

#### (a) 赤血球:

赤血球をグルコース加リン酸 buffer (pH 7.4) で Ht. 5% に調製した後、上記の各温度で孵置した。それらの血球形態は1%グルタルアルデヒド加0.1Mリン酸 buffer (pH 7.4) で固定後、光顕的および走査電顕的に検討した。

#### (b) 抽出 spectrin:

37°C で抽出した crude spectrin を isotonic medium (5 mM NapO<sub>4</sub>, 150 mM NaCl, pH 7.4) で赤血球と同様に孵置 (最終 spectrin 濃度; 0.25~0.40 mg/ml) した後、4°C に冷却し、さらに、それを 100,000 g, 1時間, 4°C で超遠心した後の上清中の蛋白濃度を、O. D. 280 nm の紫外線で測定し検討した。

### 4) Spectrin の dimer-dimer association<sup>11)</sup>

抽出 spectrin と膜 ghost 内で、spectrin の重合能を下記の Liu ら<sup>13)</sup> の方法に従い検討した。

#### (a) 抽出 spectrin:

抽出 spectrin の重合は、isoionic strength medium (5 mM NapO<sub>4</sub>, 150 mM NaCl, 0.1 mM EDTA, 0.25 mM DFP, 0.1 mM PMSF, 0.1 mM TLCK, 1 mM  $\beta$ -me, pH 7.4) 下で、30°C, 3時間孵置 (最終 spectrin 濃度; 0.25~0.70 mg/ml) し検討した。

## (b) 膜 ghost:

ghost を hypotonic medium (5 mM  $\text{NaPO}_4$ , 15 mM NaCl, 0.1 mM EDTA, 0.25 mM DFP, 0.1 mM PMSF, 0.1 mM TLCK, 1 mM  $\beta$ -me, pH 7.4) 下で, 37°C, 20 分間 孵置し, spectrin を一度脱重合させた後, 再度その ghost を isoionic strength medium 下で, 37°C, 30 分間 孵置することで spectrin の重合能を検討した。

なお, これらの spectrin は Liu ら<sup>13)</sup> の non-denaturing gel 法を用い検討した。

## 5) Spectrin の各 domain の検出

Lawler ら<sup>14)</sup> の方法もしくは, Speicher ら<sup>15)</sup> の方法に従って行った。抽出 spectrin を low ionic strength medium (40 mM Tris, 20 mM sodium acetate, 10 mM dithiothreitol (DTT), pH 7.4 もしくは, 10 mM  $\text{NaPO}_4$ , 40 mM NaCl, 1 mM  $\beta$ -me, pH 8.0) 下で, TPCK treated trypsin/substrate 比を, 1/20, 1/50, 1/100, 1/200, 1/400 (wt/wt) に調製し, 4°C, 20 時間 孵置した。さらに, 一部の症例では, isoionic strength medium<sup>16)</sup> (10 mM Tris HCl, 130 mM KCl, 20 mM NaCl, 1 mM  $\beta$ -me, pH 8.0) 下でも検討を加えた。反応停止には DFP を最終濃度が 1 mM となるように加えた後, -70°C で凍結乾燥し, -20°C で保存した。

## 6) Polyacrylamide gel 電気泳動法

(a) SDS-polyacrylamide gel 電気泳動法 (SDS-PAGE):

Fairbanks 法<sup>17)</sup> および Steck の変法,<sup>18)</sup> もしくは Laemmli 法<sup>19)</sup> を用いた。ただし, Laemmli 法で行った一部の検索では, acrylamide/bisacrylamide 比を 26.7 とした。

(b) Spectrin の dimer-dimer association の検討:

Liu ら<sup>13)</sup> の non-denaturing gel 電気泳動法を用いた。buffer は, sample, gel および electrophoresis とともに 同とし, 40 mM Tris, 20 mM sodium acetate, 1 mM EDTA, pH 7.4

を使用し, 0.3% agarose—2.5% acrylamide disc gel で, 1 mA/disc, 4°C, 20 時間の条件で電気泳動を行った。

(c) Spectrin の各 domain の検出: 二次元電気泳動法 (IEF/SDS-PAGE)

等電点電気泳動法は, O'Farrell<sup>20)</sup> の方法もしくは, それの Speicher らの変法<sup>21), 22)</sup> を用いた。

検体を 9 M urea, 2% Triton X-100, 5%  $\beta$ -me, 2.4% ampholines (pH 4—6, pH 5—7, pH 3.5—10 の各 ampholine を 0.8% ずつ加えた) で溶解し, 2×120 mm polyacrylamide gel, 5,440 volt hours でまず一次元分析として等電点電気泳動を行い, その後, 10% glycerol, 3% SDS, 1 mM EDTA, 2%  $\beta$ -me, 10 分間で gel を平衡化した。<sup>21), 22)</sup> 次いで行った二次元分析には, Laemmli 法<sup>19)</sup> による SDS-PAGE 法を用い, 泳動には 10% もしくは, 11% polyacrylamide (acrylamide/bisacrylamide = 26.7) を使用した。

polyacrylamide gel の染色は, Coomassie brilliant blue,<sup>17)</sup> また一部では PAS 染色<sup>17)</sup> を行い, DU-8 Beckman spectrophotometer を用い, 波長 560 nm で各分画染色濃度を測定した。なお, 蛋白濃度の測定には, Lowry 法<sup>23)</sup> を用いた。

## 7) Na-influx

赤血球をグルコース加里ン酸 buffer (pH 7.4) で Ht. 30% に調製し, <sup>22</sup>Na (NEZ-081, New England Nuclear, Boston, Mass) を加え, 37°C, 2 時間 孵置した。定時に 4°C の 0.1 M MgCl 溶液を用いて赤血球を洗浄後, 赤血球内に取り込まれた <sup>22</sup>Na の放射活性を  $\gamma$ -counter で測定<sup>24)</sup> した。また, 赤血球内  $\text{Na}^+$  および  $\text{K}^+$  濃度は, フレームフォトメトリーを用いて波長 589 nm および 769 nm で測定した。

## 8) 遠心分離による赤血球分離法

新鮮静脈血より buffy coat を除去後, packed cell を作製し, microcapillary tube に分注し, 15,000 g, 10 分間, 室温で遠心分離した。これを均等に 8 分画し, 各赤血球分画を採取し

た. 分離された各赤血球分画につき, MCV, MCHC, 網赤血球数, glucose-6-phosphate dehydrogenase (G-6-PD) 活性,<sup>25)</sup> Na-influx を測定し, また, 赤血球形態は1%グルタルアルデヒド加0.1Mリン酸 buffer (pH 7.4) で固定し, 走査電顕的に検討した.

#### 9) Triton shell の mechanical stability

遠心分離法によって採取された赤血球から, 10 mM Tris HCl buffer (pH 8.0) で ghost を調整した. この ghost を1% Triton X-100, 10 mM Tris HCl, pH 8.0 の medium 下で3時間 magnetic stirrer を用い機械的刺激を加えた. その際, 経時的にその Triton shell を取り出し, 1% uranyl acetate で固定後, 直ちに位相査鏡頭によりその shell の形態を観察した. なお, これらの操作はすべて4°C 下で行った.

#### 10) Ektacytometry を用いた赤血球の deformability<sup>26)</sup>

deformability 測定用 medium として, 15% (w/v) dextran T-40 加リン酸 buffer pH 7.4

(浸透圧; 290 mOsm) を使用し, この medium 10 ml に対し, Ht. 45% に調製した新鮮静脈血を 50  $\mu$ l 加え, これに 30~240 dyne/cm<sup>2</sup> の shear stress を加えることで, 赤血球の deformability を検討した. なお, ektacytometry の flat cell は 6.5 $\times$ 0.21 mm で, 光源は波長 633 nm の Heliumneon laser (Model No. LL 2R/220v, CW Radiation Inc., USA) を使用した. また, HE 症例に関しては, 赤血球自体の elliptocytic shape を補正する意味で, 1% グルタルアルデヒド加0.1Mリン酸 buffer (pH 7.4) で固定した赤血球について同様の方法で deformability を測定し, グルタルアルデヒド固定前後のその値を比較検討した.

## 結 果

### 1) HE 症例における赤血球形態の特徴

赤血球形態では rod-shaped elliptocyte, rod-shaped sphero-elliptocyte, ovalocyte, ovalo-stomatocyte, ovalo-spherocyte, discocyte, disco-stomatocyte, disco-spherocyte

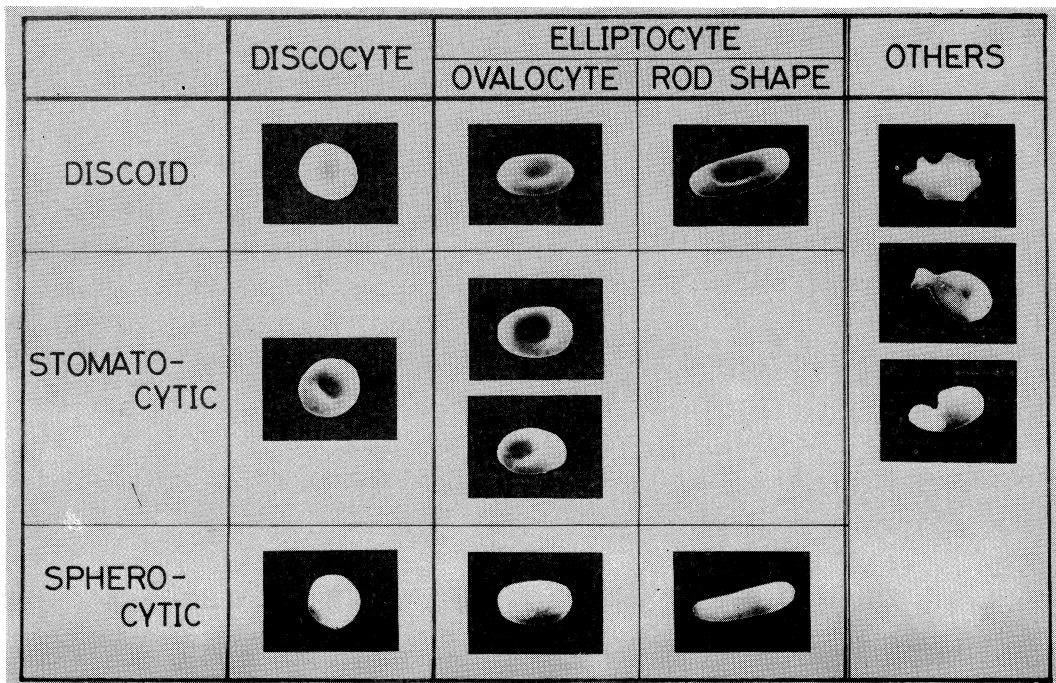


Fig. 1. Classification of abnormal red cells in hereditary elliptocytosis.

および poikilocyte が認められた。これらの細胞形態は Bessis<sup>9)</sup> の定義に従い分類した (Fig. 1)。また elliptocyte は、長短軸に明らかな差を有する細胞とし、その長短軸比をもって、そ

れが 2:1 以上のものを rod 型細胞とし、それが 2:1 以下の場合を ovalocyte と定義した。

Figure 2 に、HE における典型的な非溶血型 1 例と溶血型 3 例の赤血球形態像を示した。

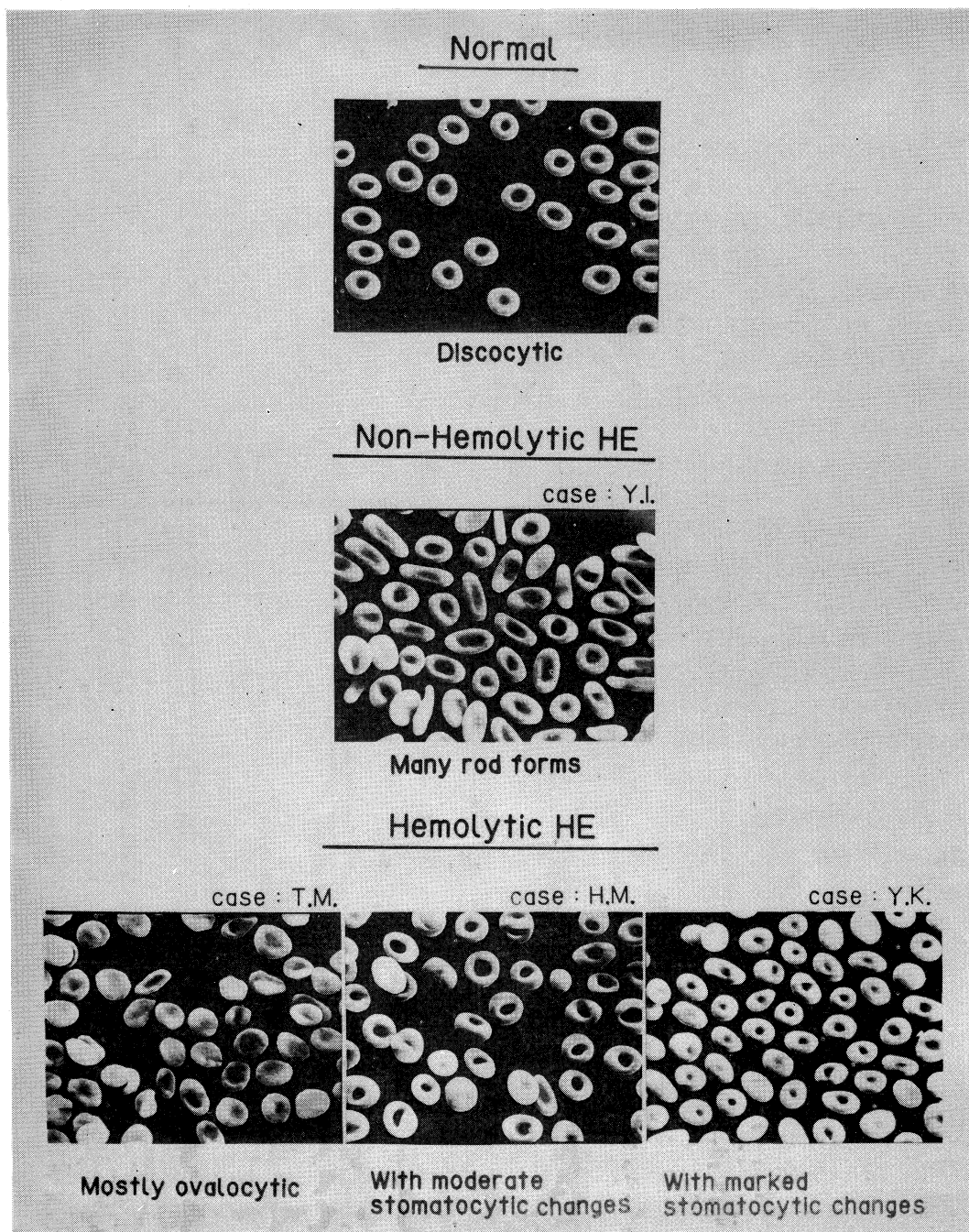


Fig. 2. Morphological features in red cells of hereditary elliptocytosis with or without overt hemolysis.

同図中段に示すように典型的非溶血型では、rod 型細胞が圧倒的に多いのが特徴的であった。同図下段に示す溶血型では、ovalocyte が主体を占めており、しかもそれに種々の程度に stomatocytic change が加わっている点が注目される。これらの事実から HE の赤血球形態は、症例間で非常に多様性に富むことが判明した。

2) HE 症例における赤血球形態および膜機能 (Na-influx) と溶血の関係:

(a) 赤血球形態と溶血の関係 (Table 1)

HE では明らかに2種の異なった赤血球形態変化が認められた。すなわち、第1はelliptocytic change であり、この変化の終末像は長棒状形態を示す rod 型細胞と考えられる。この典型的 rod 型細胞の比率は、溶血型;  $2.1 \pm 1.7\%$ 、非溶血型;  $21.1 \pm 11.4\%$  と、溶血型では rod 型細胞がほとんど認められず、これに対し非溶血型では、rod 型細胞比率が明らかに増加していた ( $p < 0.001$ )。第2は ovalocyte に加わった stomatocytic change であり、溶血型;  $40.4 \pm 13.9\%$ 、非溶血型;  $21.1 \pm 7.9\%$  となり、溶血型では stomatocytic change が多かった ( $p < 0.05$ )。

(b) rod 型細胞と Na-influx および溶血との関係 (Fig. 3)

Table 1 の結果から、溶血型、非溶血型をみる際に、rod 型細胞の比率が重要な要素と考えられるため、HE 症例を rod 型細胞の比率から3群に分け、それぞれの Na-influx との関係を検討した。結果では、group-1 は rod 型細胞の最も多い群 (15% 以上)、group-3 は最も少ない群 (5% 以下) で、これらの中間を group-2 (5-15%) とした。各 group の Na-influx は、group-1 (9例);  $1.31 \pm 0.32$  m moles/l RBC/hr, group-2 (4例);  $1.55 \pm$

Table 1. Morphological characteristics in HE with overt hemolysis.

1) The extent of elongation of elliptic red cells in elliptocytic transformation

	Rod Shaped Red Cells* (%)
Hemolytic (n=9)	$2.1 \pm 1.7$
Non-Hemolytic (n=16)	$21.1 \pm 11.4$

(p < 0.001)

\*:  $\frac{\text{Rod forms}}{\text{Rod forms} + \text{Ovalocytes}}$

2) The extent of stomatocytic changes superimposed on ovalocytes

Hemolytic (n=9)	$40.4 \pm 13.9\%$
Non-Hemolytic (n=16)	$21.2 \pm 7.9\%$

(p < 0.05)

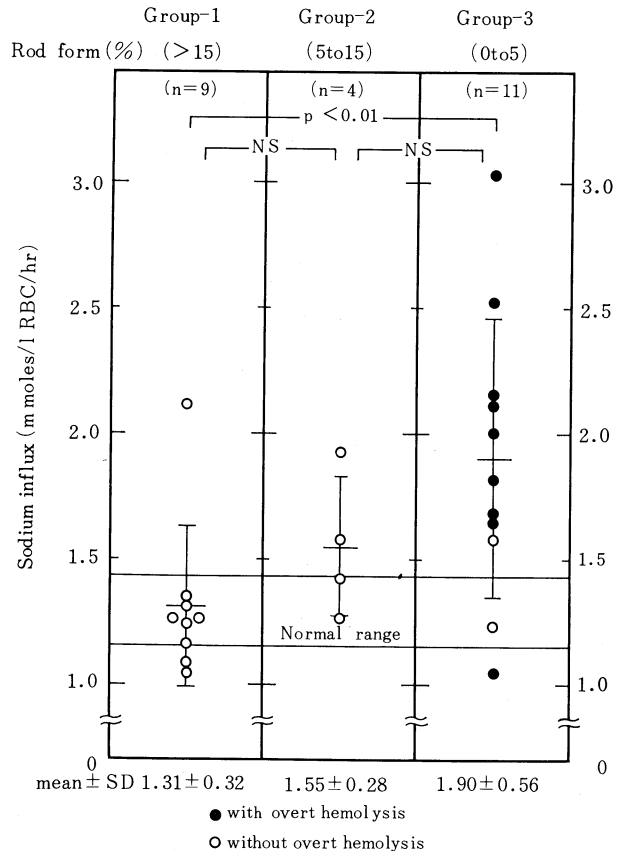


Fig. 3. Relationship between sodium influx and extent of rod-shape transformation.

0.28 m moles/l RBC/hr, group-3 (11例);  
 1.90±0.56 m moles/l RBC/hr, 正常対照群;  
 1.29±0.14 m moles/l RBC/hr であった。  
 group-1 は全例が非溶血型で、9 例中 8 例では

Na-influx が正常であったのに対し、group-3  
 では 11 例中 9 例は溶血型で、Na-influx も 11  
 例中 9 例に亢進が認められ、この 2 群間には有  
 意な差が認められた (p<0.01). group-2 は非

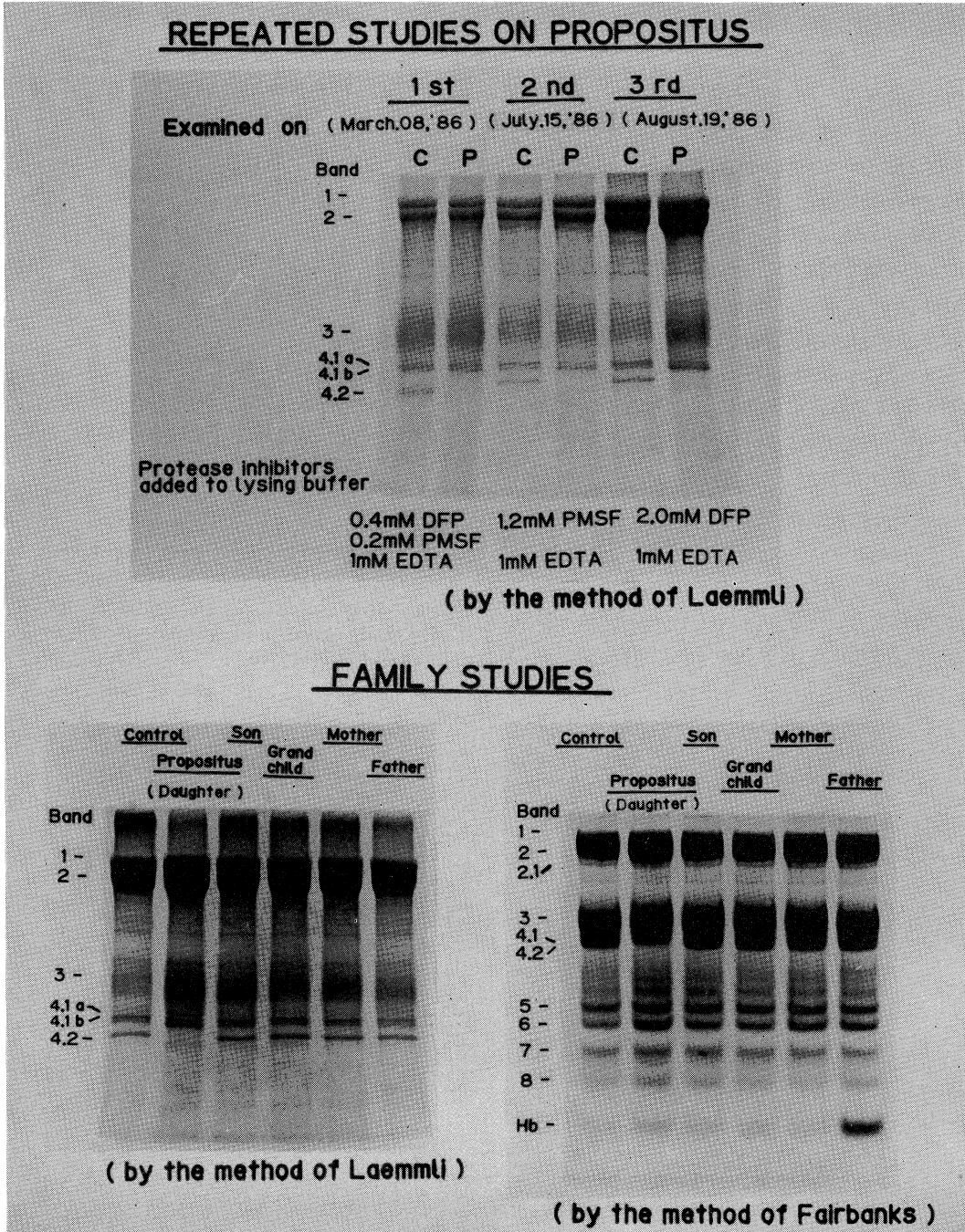


Fig. 4. SDS-PAGE patterns of red cell membrane proteins in band 4.2 deficiency.



溶血型で4例中2例では Na-influx は正常であった。

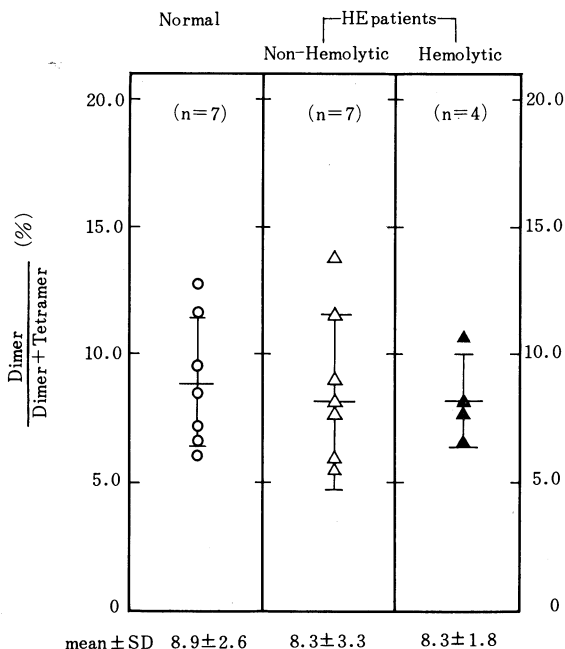
3) SDS-PAGE による膜 ghost 蛋白の検討 HE (12例), HS (5例), H. St. (5例)のうち, HE 1例に band 4.2欠損が発見された。このような膜蛋白欠損例を検討する際には, protease の関与が常に問題となるため, 検討日時を変えて3回検索を行った。さらに, 血液は新鮮血とし, 毎回採血時には同時に正常人コントロールをおき, ghost 調製時には初回を除き, 後の2回では, 白血球を完全に除去後, 異なった protease inhibitor を高濃度で使用した。その結果は **Figure 4** 上段に示すように, 3回同様で band 4.2は約95%の欠損が認められた。また, 家族についても検討を行ったが, propositus 以外では band 4.2の欠損は認められず, 他の膜蛋白に関しても異常を認めなかった (**Fig. 4** 下段)。

4) Spectrin の dimer-dimer association

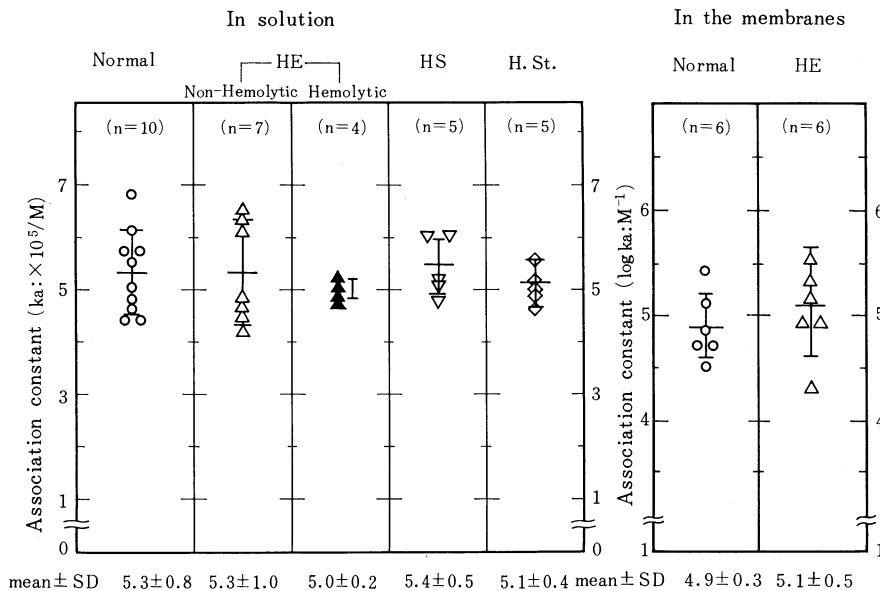
4°C 抽出 spectrin の dimer/dimer+tetramer 比は, HE (11例)で, 溶血型 (4例); 8.3±1.8%, 非溶血型 (7例); 8.3±

3.3%, 正常対照群 (7例); 8.9±2.6% となり, 有意な差は認められなかった (**Fig. 5**)。

抽出 spectrin の重合能を association constant (Ka) で表わす (**Fig. 6**)と, HE (11例)



**Fig. 5.** Analysis of spectrin dimers in 4°C low-salt extracts of ghosts from hereditary elliptocytosis.



**Fig. 6.** Association constants in dimer-tetramer conversion of red cell spectrins in hereditary elliptocytosis, spherocytosis and stomatocytosis.

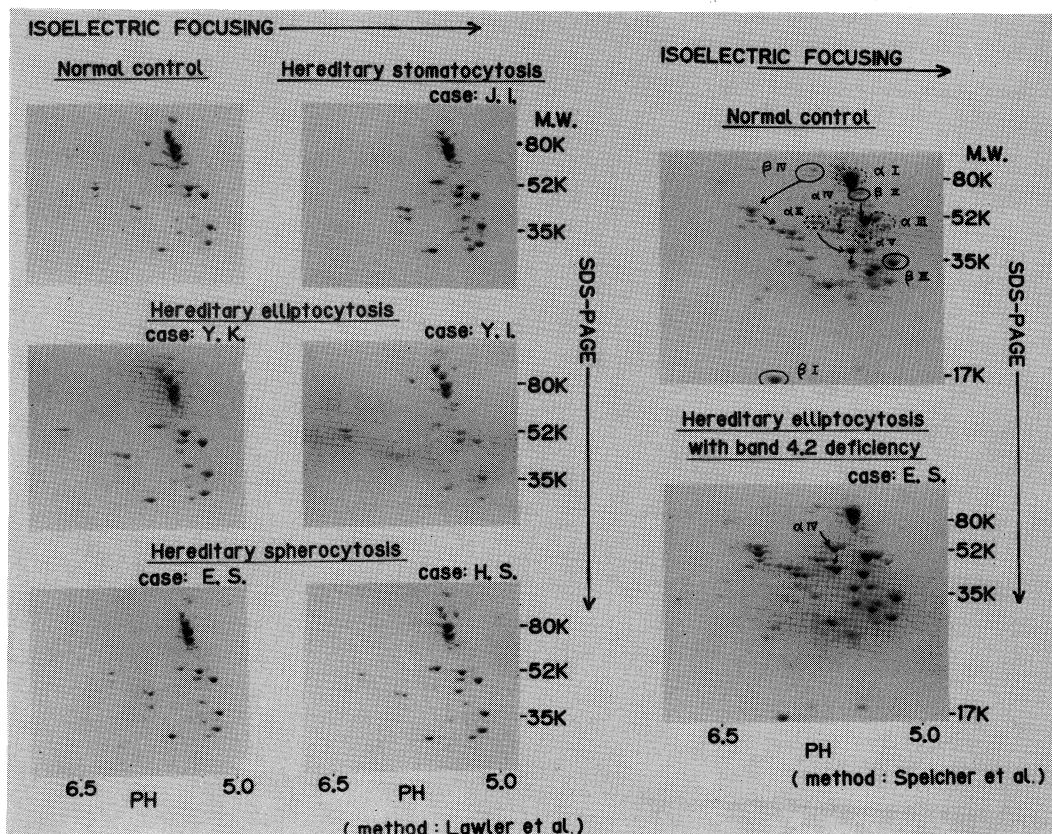


Fig. 7. Domain analyses of red cell spectrins in hereditary elliptocytosis, spherocytosis and stomatocytosis.

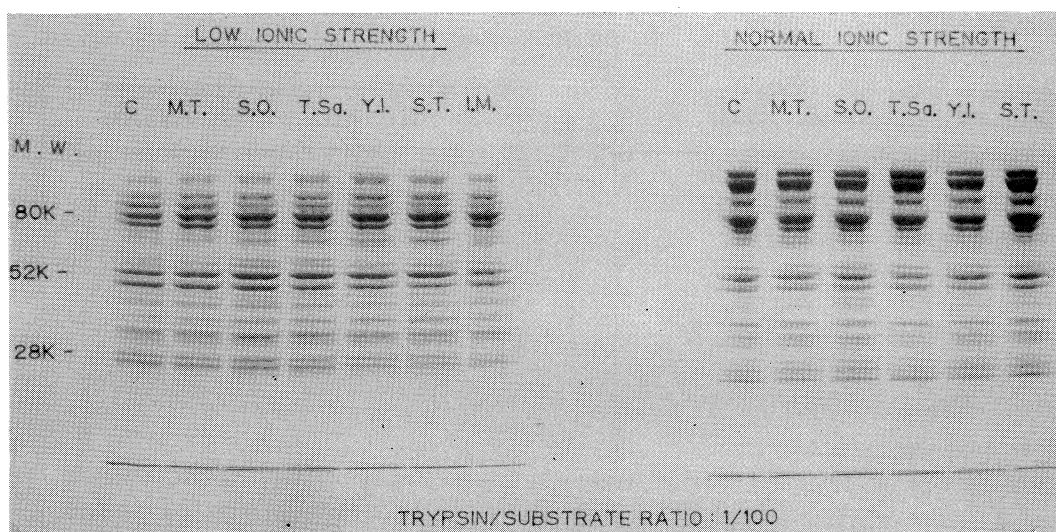


Fig. 8. Tryptic digestion of spectrin of normal and HE patients in low ionic strength and normal ionic strength.

で、溶血型 (4 例);  $5.0 \pm 0.2 \times 10^5/M$ , 非溶血型 (7 例);  $5.3 \pm 1.0 \times 10^5/M$ , HS (5 例);  $5.4 \pm 0.5 \times 10^5/M$ , H. St. (5 例);  $5.1 \pm 0.4 \times 10^5/M$  となり, 正常対照群 (10 例);  $5.3 \pm 0.8 \times 10^5/M$  と比較して各症例に異常は認められなかった。また, 膜 ghost 内での spectrin の重合能 (log Ka) では, 非溶血型 HE (6 例); log  $5.1 \pm 0.5 M^{-1}$  に対し, 正常対照群 (6 例); log  $4.9 \pm 0.3 M^{-1}$  で, これについても異常は認められなかった (Fig. 6)。

5) Spectrin の各 domain の 検出

HE (12 例), HS (5 例), H. St. (5 例) の spectrin について, low ionic strength medium 下で, trypsin 処理し SDS-PAGE と二次元電気泳動法を用い検討したが, band 4.2 欠損を伴う HE 症例を除き異常は認められなかった (Fig. 7)。また, isoionic strength medium 下で HE 8 例 (溶血型 1 例を含む) に対し同様の検討を行ったが, これにも異常は認められなかった (Fig. 8)。異常が認められた症例の spectrin では,  $\alpha$ -IV domain の isoelectric point が 5.7 (正常人対照群: pI 5.6) と正常に比べアルカリ側に shift していた (Fig. 7)。

6) 遠心分離法によって分離した赤血球の性状

A: 正常血球について

① Cell age dependency

MCV 値では top 層から bottom 層へ移行するに従って, その値は減少し bottom 層で最小となった。これに対し MCHC 値は,

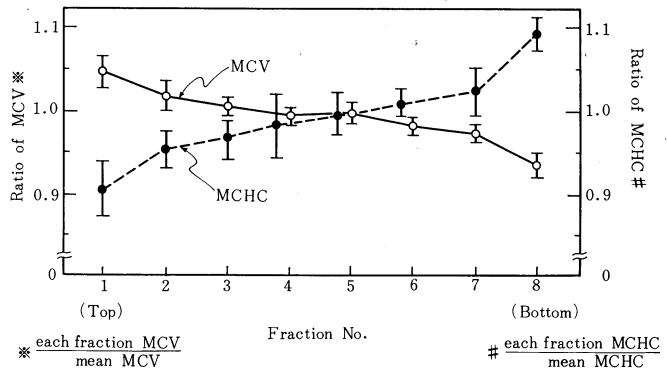


Fig. 9. Profile of MCV and MCHC on separated normal red cells.

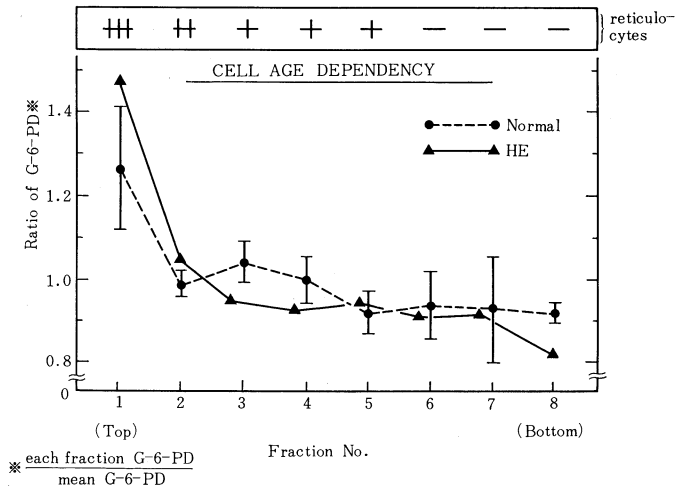


Fig. 10. Red cell G-6-PD activities in each fraction.

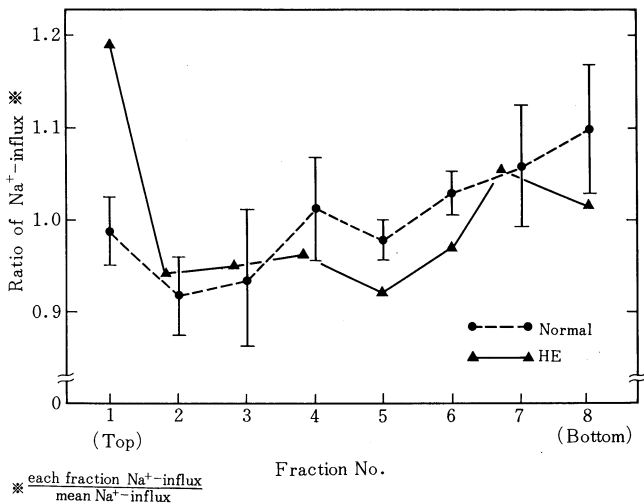


Fig. 11. Na<sup>+</sup>-influx profile in each fraction.

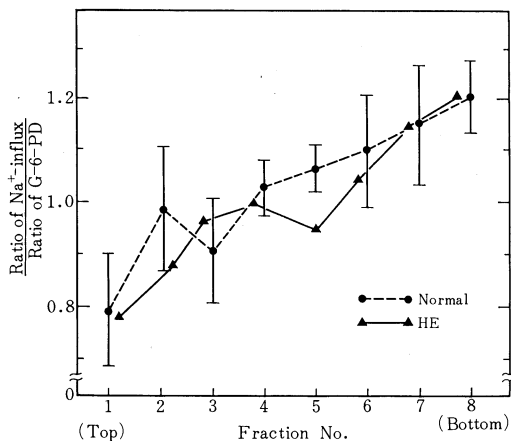


Fig. 12. Cell age-dependency of Na<sup>+</sup>-influx in each fraction.

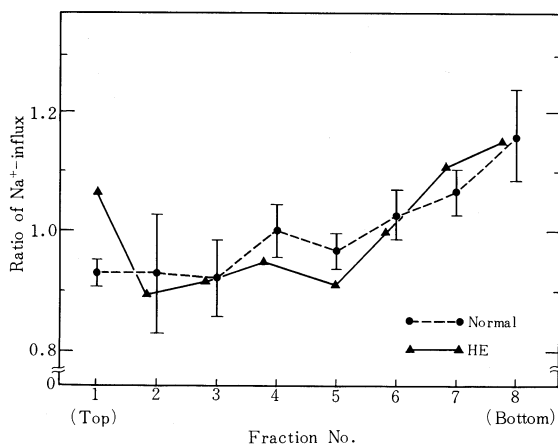


Fig. 13. Na<sup>+</sup>-influx adjusted by cell volume (MCV) in each fraction.

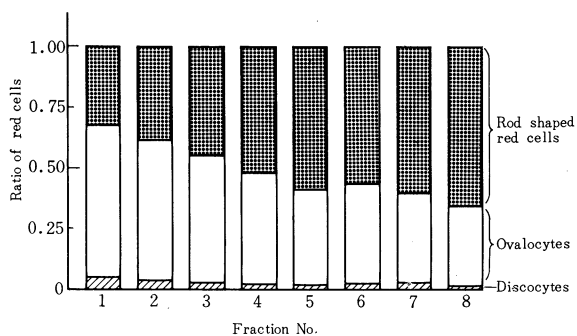


Fig. 14. Characteristics of separated red cells in non-hemolytic HE.

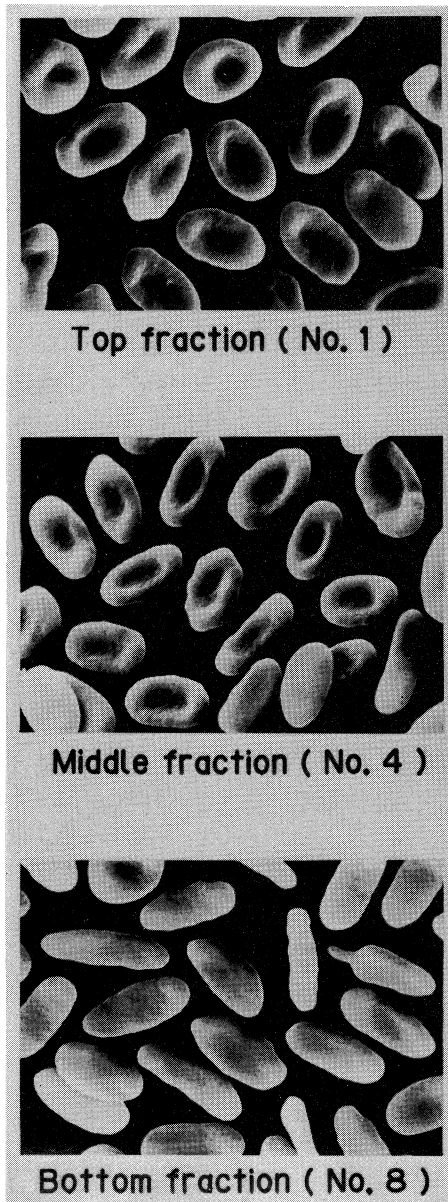


Fig. 15. Separated red cells in non-hemolytic HE.

MCV 値と相反して bottom 層で最大となった (Fig. 9). また, G-6-PD 活性値では, MCV と同様に top 層で高値を示し, bottom 層で低値を示した. さらに, 網赤血球は top 層に集中した (Fig. 10). よって, この分離法では幼若赤血球を主体とする top 層から順次 bottom 層へ移

行するに従い, cell age は進行し bottom 層では, 最も cell age の進行した老化赤血球が主体となっていると考えられた.

#### ⑥ Na-influx

top 層で高値を示し, その後低下傾向を示し, 再び bottom 層に近づくに従い高値を示した(Fig. 11). ここで, Na-influx は赤血球の表面積, 容積およびその cell age によって影響を受ける可能性があるため, MCV (Fig. 12) および G-6-PD 活性値 (Fig. 13) で Na-influx を補正した. 結果は, bottom 層へ移行するに従い Na-influx は高くなる傾向を示し, bottom 層でこれらの相対値は最大となった.

#### B: HE 症例について

rod 型細胞の多い典型的な非溶血型 HE につき, 同様の検討を行った. その際の赤血球形

態像をみると, 分離された各分画の赤血球分布像 (Fig. 14) は, bottom 層へ移行するに従い rod 型細胞比率が高くなり, bottom 層では, その rod 型細胞比率が最大 (約70%) となった. 次に cell age dependency (Fig. 10) をみると, 正常赤血球と同様の傾向を示し, top 層で G-6-PD 活性値が最大となり, bottom 層で最小となった. また網赤血球についても top 層で最大値が得られた. 以上から rod 型細胞は最も ageing の進行した細胞であると考えられた. さらに, Na-influx (Fig. 11) に関しても, 正常赤血球と同様の傾向を示し, その上, MCV (Fig. 12) および G-6-PD 活性値 (Fig. 13) で補正を行っても, その傾向は変わらず, 正常赤血球の場合と同様に bottom 層で Na-influx の相対活性は最大となった. 以上

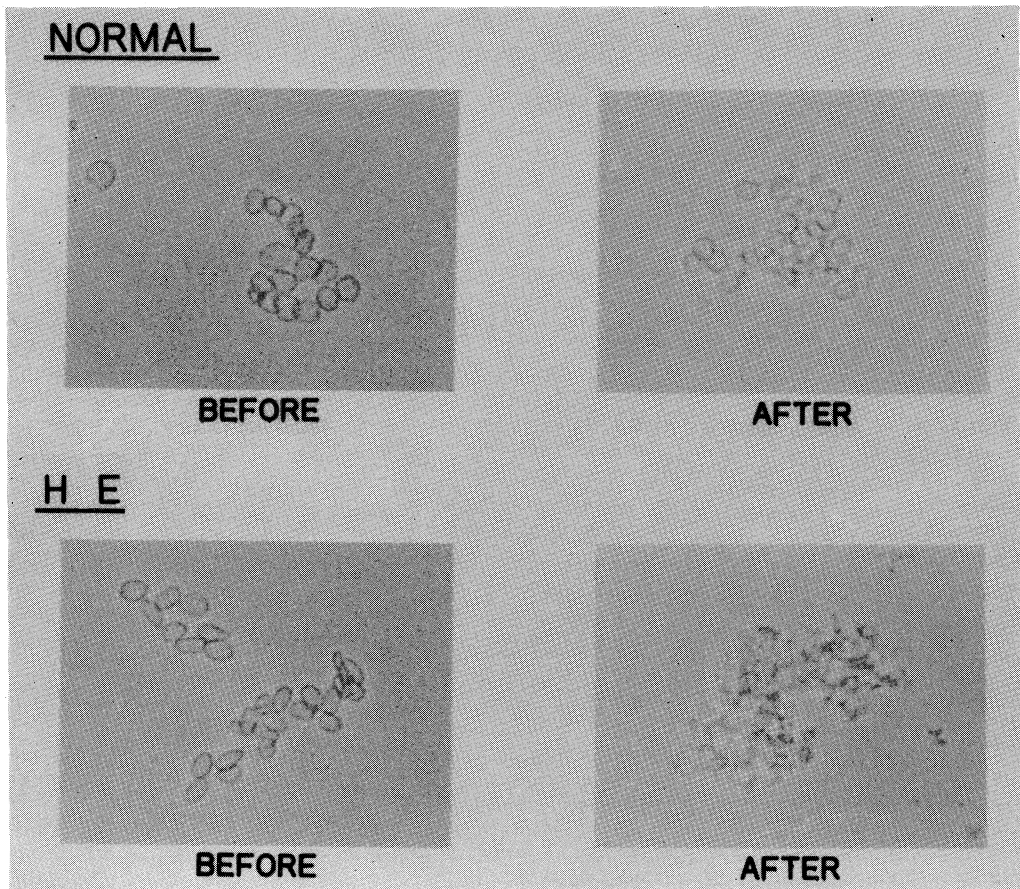


Fig. 16. Mechanical instability of red cell Triton-shells in the rod-shaped elliptocyte rich fraction in HE.

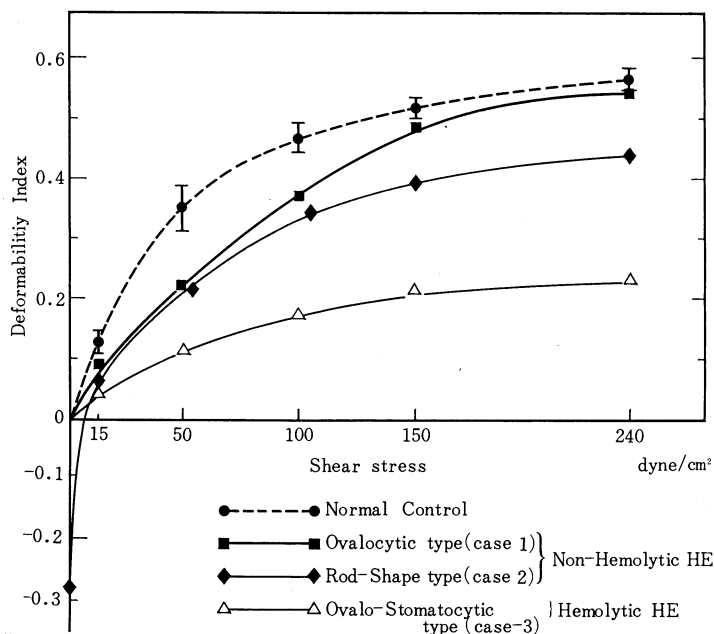


Fig. 17. Ektacytometry in red cells with hereditary elliptocytosis.

Table 2. Decreased deformability in rod-shaped red cells of hereditary elliptocytosis on ektacytometry.

	Deformability Index (DI)		
	Fresh RBCs	Fixed RBCs	Δ DI
Normal (Discocytes)	0.55 ± 0.01	0.07 ± 0.02	0.48 ± 0.01
HE (Ovalocytic type)	0.53	0.11	0.42
HE (Rod-shape type)	0.44	0.28	0.16

(Shear Stress: 240 dyne/cm²)

Δ DI: Fresh RBCs\*DI-Fixed RBCs\*DI

から Na-influx に関しても rod 型細胞は、正常赤血球と何ら変わらないものと考えられた。

なお、Figure 15 に第 1, 4 および 8 分画より採取された HE 細胞の赤血球形態像を示した。

7) Triton shell の mechanical stability (Fig. 16)

非溶血型 HE の rod 型細胞と正常人赤血球を用い、遠心分離法によって赤血球を分離し、そのうち最も ageing の進行した赤血球群 (第 8 分画) を集め、それらから Triton shell を作り検討を行った。この Triton shell に機械的刺激を 1 時間加えると、正常コントロール

(第 8 分画) の Triton shell の形態は最も老化赤血球群であるにもかかわらず、ほぼ完全に保たれていた。ところが、同じ ageing の進んだ第 8 分画より調製した HE 赤血球の Triton shell は、完全に破壊されていた。したがって、HE 赤血球のうち最も楕円化の進行した rod 型細胞では、正常赤血球 (discocyte) に比べ明らかに mechanical stability の低下を有するものと考えられた。

8) Ektacytometry による赤血球の deformability

HE 症例として cell population の異なる 3 例を Figure 17 に示した。これらの症例では、その細胞形態は、case-1 (非溶血型) は ovalocyte が主体、case-2 (非溶血型) は rod 型細胞が主体であり、case-3 (溶血型) では ovalo-stomatocytic elliptocyte が主体であった。各症例での新鮮赤血球を用いた deformability curve の pattern

は多様性を示した。この原因のひとつは、HE 細胞特徴である elliptocytic shape に由来するものと考えられ、HE 細胞の真の deformability は表現されないものと考えられる、そこで、赤血球を 1% グルタルアルデヒド加 0.1M リン酸 buffer (pH 7.4) で固定することで、赤血球の変形能を完全に失わせ、この固定赤血球を同一各症例の対照として使用した。すなわち、固定前の新鮮赤血球の変形能から固定後の赤血球変形能を差し引く (この値を ΔDI とする) ことで、各 HE 症例の赤血球の deformability を検討した。なお、その

際の条件として、固定された赤血球に安定した shear stress が加わると考えられる条件 (shear stress: 240 dyne/cm<sup>2</sup>) を選び、その一時点における変形能を比較検討した。その結果を **Table 2** に示したが、HE 症例の△DI を比較すると、case-2: 0.42 dyne/cm<sup>2</sup> に対し case-3: 0.16 dyne/cm<sup>2</sup> となり、rod型細胞は明らかに ovalocyte に比べ、その変形能の低下した細胞であると考えられた。

## 考 案

本研究では HE, HS, H. St. 症例につき種々の検討を行ったが、stomatocyte 形成は、場合によっては二次的病因<sup>27), 28)</sup> によって生じうるのに対し、楕円赤血球症はこの二次的病因に起因する可能性の最も低い赤血球異常症と考えることができる。したがって、HE 赤血球の elliptocytic shape の病因が原発性である可能性が最も高く、よって赤血球形態と膜蛋白および膜機能、さらに血球形態と溶血との関連を考える上で、好都合な疾患と思われる。そこで、HE について疫学も含め、この疾患の溶血機序について考察を行った。

HE における疫学をみると、諸外国の報告<sup>29)</sup> をみると頻度は 0.02—0.05% といわれている。本邦においては当教室が過去 7 年間に検討した結果では、全先天性溶血性貧血症例 (200 例) 中、HE 症例は 27 例で、その頻度は 13.5% で第 2 位であった。それらのうちで溶血型の頻度は 37% で、その臨床所見上および赤血球形態学上では、Lux<sup>6)</sup> および Palek<sup>7)</sup> らのいう、いわゆる common HE に属するものであった。

細胞形態の特徴については、従来より単に elliptocytic shape を示す細胞としか表現されていない場合が多い。しかし、本研究でその細胞形態を走査電顕的に詳細に検討を加えると、elliptocytic shape の程度は個々の症例間で、その幅は広く、軽度の卵円型を示す ovalocyte 程度の形態から、長桿状を呈するいわゆる rod 型細胞まで種々の形態が存在することが判明した。さらに、別の変化として、これらの細胞に

は、種々の程度の stomatocytic change が加わっており、この現象は特に ovalocyte を主体とする赤血球群に多く観察された。これらの変化が個々の症例で、種々の程度に加わることで、HE では遺伝学的側面のみならず、細胞形態においても非常に多様性に富んだ疾患群であることが判明した。

ところで、HE の溶血機序に関しては未だ不明な点が多いが、現在のところ、ageing およびその他の要因により赤血球が変形すること、すなわち discocyte から ovalocyte へ、さらに rod 型細胞となって溶血するものと、一般的には考えられている。<sup>30)</sup> この仮説によれば、rod 型細胞は elliptocyte の終末像であり、HE 細胞が有する全ての異常がこの rod 型細胞に端的に表現されることになるはずである。

しかし、本研究で明らかのように非溶血型に対し、溶血型ではむしろ明らかに rod 型細胞が少なく、ovalocyte が主体を占めていた。その上、膜機能 Na-influx に関しても rod 型細胞が主体を占めている非溶血型では、ほぼ正常であった。これに対し、rod 型細胞比率の極めて低い溶血型では、むしろ著明に亢進していた。一方、遠心分離法による分析成績では、rod 型細胞は最も ageing の進行した細胞と考えられるが、それにもかかわらず Na-influx は、正常細胞と有意な差を示さなかった。したがって、いわゆる HE の rod 型細胞、すなわち elliptocytic change 自体では、直接溶血を引き起こす主たる原因とはなりえないと思われた。実際、自然界で、ある種の動物<sup>31)</sup> の赤血球は elliptocytic shape を呈するにもかかわらず、溶血をみない点は上記の推論とよく合致する所見である。

ところで、rod 型細胞から作られた cytoskeleton の形態が、膜脂質、integral protein を除去する Triton 処理を行っても、元の elliptocytic shape を呈することから、その cytoskeleton を構成する膜蛋白自体に何らかの異常があると推定されている。<sup>12)</sup> 本研究でも rod 型で、かつ最も ageing の進行した細胞群から作製した Triton shell では、明らかにその mechanical stability の低下が認め

られた。また、ektacytometry を用い、HE 細胞の deformability をみても、rod 型細胞は明らかに ovalocyte よりもさらに、その deformability を失っていた。したがって、非溶血型の rod 型細胞であっても正常とはいいがたい。そのため、おそらくこの rod 型赤血球の寿命は正常と比べ、やや短縮しているであろうと推定される。実際、非溶血型 HE 症例でも、赤血球寿命の短縮が起因と考えられる軽度の慢性貧血が認められている。<sup>32)</sup>

一方、溶血型では諸外国で spectrin の分子異常が報告<sup>1)~3)</sup>されているが、これは主に HPP 症例に限られており、この種の特異型 HE では人種差が著しく、多くが黒人症例である。

今回本邦の HE 症例で spectrin について検討を行い、分画 4.2 欠損症例が発見された。しかし、従来諸外国で報告されているような spectrin に関する分子異常は発見されなかった。ところで、細胞形態および Na-influx の

立場からみると、rod 型細胞が前景に出ている非溶血型とは対照的に、溶血型では ovalocyte が主体となり、それに stomatocytic change が多く加わり、かつ Na-influx も亢進していた。以上の事実から、HE の溶血機序を考えると、rod 型細胞の性状で記したごとく、赤血球の elliptocytic change 自体が溶血の主たる原因とは考えにくいことから、膜機能異常 (Na-influx) および stomatocytic change が溶血の病因に深く関与していると考えるか、もしくは何らかの別の要因を考える必要があるものと思われる。

今回発見された band 4.2 欠損と、その spectrin 分子異常との関連をも含め、今後さらに検討を行いたい。

稿を終えるにあたり、御指導、御校閲を賜った細川桂一教授、八幡義人教授に深甚なる謝意を表します。

また、技術的援助を頂いた川崎医科大学血液内科、高原真弓氏に深く感謝いたします。

## 文 献

- 1) Palek, J., Liu, S. C., Prchal, J. and Castleberry, R. P.: Altered assembly of spectrin in red cell membranes in hereditary pyropoikilocytosis. *Blood* 57: 130—139, 1981
- 2) Zarkowsky, H. S., Mohandas, N., Speaker, C. B. and Shohet, S. B.: A congenital haemolytic anemia with thermal sensitivity of the erythrocyte membrane. *Brit. J. Haematol.* 29: 537—543, 1975
- 3) Lecomte, M. C., Dhermy, D., Solis, C., Ester, A., Feo, C., Gautero, H., Bournier, O. and Bouin, P.: A new abnormal variant of spectrin in black patients with hereditary elliptocytosis. *Blood* 65: 1208—1217, 1985
- 4) Tchernia, G., Mohandas, N. and Shohet, S. B.: Deficiency of skeleton membrane protein 4.1 in homozygous hereditary elliptocytosis. *J. clin. Invest.* 68: 454—456, 1981
- 5) Agre, P., Orringer, E. P. and Bennett, V.: Deficiency red-cell spectrin in severe recessively inherited spherocytosis. *N. Engl. J. Med.* 306: 1155—1161, 1982
- 6) Lux, S. E.: Disorders of the red cell membrane skeleton; Hereditary spherocytosis and hereditary elliptocytosis. *In* The metabolic basis of inherited diseases. eds. by Stanbury, J. B., Wyngaarden, J. B., Fredrickson, D. S., Goldstein, J. L. and Brow, M. S. New York, McGraw-Hill. 1983, pp. 1573—1605
- 7) Palek, J.: Hereditary elliptocytosis and related disorders. *Clin. Haematol.* 14: 45—87, 1985
- 8) Bessis, M.: Blood smears reinterpreted. New York, Springer International. 1977
- 9) Dodge, J. T., Mitchell, C. and Hanahan, D. J.: The preparation and chemical characteristics of hemoglobin-free ghosts of human erythrocytes. *Arch. Biochem.* 100: 119—130, 1963
- 10) Bennet, V. and Stenbuck, P. J.: Association between ankyrin and the cytoplasmic domain



- of band 3 isolated from the human erythrocyte membrane. *J. biol. Chem.* 255 : 6424—6432, 1980
- 11) Liu, S. C., Palek, J. and Prchal, J. T.: Defective spectrin dimer-dimer association with hereditary elliptocytosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79 : 2072—2076, 1982
  - 12) Tomaselli, M. B., John, K. M. and Lux, S. E.: Elliptical erythrocyte membrane skeletal and heat-sensitive spectrin in hereditary elliptocytosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78 : 1911—1915, 1981
  - 13) Liu, S. C., Palek, J., Prchal, J. and Castleberry, R. P.: Altered spectrin dimer-dimer association and instability of erythrocyte membrane skeletal in hereditary pyropoikilocytosis. *J. clin. Invest.* 68 : 597—607, 1981
  - 14) Lawler, J., Palek, J., Liu, S. C., Prchal, J. and Butler, W. M.: Molecular heterogeneity of hereditary pyropoikilocytosis. *Blood* 62 : 1182—1189, 1983
  - 15) Speicher, D. W., Morrow, J. S., Knowles, W. J. and Marchesi, V. T.: Identification of proteolytically resistant domains of human erythrocyte spectrin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77 : 5673—5677, 1980
  - 16) Morrow, J. S., Speicher, D. W., Knowles, W. J., Hsu, C. J. and Marchesi, V. T.: Identification of functional domains of human erythrocyte spectrin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77 : 6592—6596, 1980
  - 17) Fairbanks, G., Steck, T. L. and Wallach, D. F. H.: Electrophoretic analysis of the major polypeptides of the human erythrocyte membrane. *Biochemistry* 10 : 2606—2617, 1971
  - 18) Steck, T. L. and Yu, J.: Selective solubilization of proteins from red blood cell membranes by protein perturbants. *J. Supramol. Struct.* 1 : 220—232, 1973
  - 19) Laemmli, U. K.: Cleavage of structural proteins during the assembly of the heat of bacteriophage T<sub>4</sub>. *Nature* 227 : 680—685, 1970
  - 20) O'Farrell, P. H.: High, resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J. biol. Chem.* 250 : 4007—4021, 1975
  - 21) Speicher, D. W., Morrow, J. S., Knowles, W. J. and Marchesi, V. T.: A structural model of human erythrocyte spectrin. Alignment of chemical and functional domains. *J. biol. Chem.* 257 : 9093—9101, 1982
  - 22) Knowles, W. J., Bologna, M. L., Chasis, J. A., Marchesi, S. L. and Marchesi, V. T.: Common structural polymorphisms in human erythrocyte spectrin. *J. clin. Invest.* 73 : 973—979, 1984
  - 23) Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J.: Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. biol. Chem.* 193 : 265—275, 1951
  - 24) Jacob, H. S. and Kavnovsky, M. L.: Concomitant alterations of sodium flux and membrane phospholipid metabolism in red blood cells: Studies in hereditary spherocytosis. *J. clin. Invest.* 46 : 173—185, 1967
  - 25) Beutler, E.: Red cell metabolism. *In* A manual of biochemical method. 2nd ed. New York, Grune and Stratton. 1975
  - 26) Mohandas, N., Clark, M. R., Jacob, M. S. and Shohet, S. B.: Analysis of factors regulation erythrocyte deformability. *J. clin. Invest.* 66 : 563—573, 1980
  - 27) Weed, R. I. and Bessis, M.: The discocyte-stomatocyte equilibrium of normal and pathologic red cells. *Blood* 41 : 471—475, 1973
  - 28) Wislöff, F. and Boman, D.: Acquired stomatocytosis in alcoholic liver disease. *Scand. J. Haematol.* 23 : 43—50, 1979
  - 29) Bannerman, R. M. and Renwick, J. H.: The hereditary elliptocytosis: Clinical and linkage

- data. *Ann. Hum. Genet.* 26: 23—38, 1962
- 30) Palek, J. and Lux, S. E.: Red cell membrane skeleton defects in hereditary and acquired hemolytic anemias. *Semin. Hematol.* 20: 189—224, 1983
- 31) Mitruka, B. M. and Rawnsley, H. M.: Hematological values in experimental animals. *In* *Clinical biochemical and hematological reference values in normal experimental animals.* eds. by Mitruka, B. M. and Rawnsley, H. M. New York, Masson. 1977, pp. 71—116
- 32) Geerdink, R. A., Helleman, P. W. and Verloop, M. C.: Hereditary elliptocytosis and hyperhaemolysis. A comparative study of 6 families with 145 patients. *Acta Med. Scand.* 179: 715—728, 1966