

# 赤血球膜脂質異常症の研究

— 膜脂質異常と膜輸送能との代謝的相関に  
関する臨床的および実験的研究 —

川崎医科大学 血液内科  
(指導: 八幡義人教授)

橋 本 正 志

(昭和61年10月29日受付)

## Studies of Erythrocyte Membrane Lipid Abnormalities

— Clinical and Experimental Studies to Elucidate  
the Relationship between Membrane Lipid  
Abnormality and Membrane Transport —

Masashi Hashimoto

Division of Hematology, Department of Medicine  
Kawasaki Medical School

(Accepted on October 29, 1986)

赤血球膜の主たる構成成分である脂質あるいは蛋白の先天的・後天的異常による溶血性貧血症例において、赤血球膜輸送能の異常がしばしば認められる。また赤血球膜異常症に膜脂質異常を伴う場合がある。本研究では主に赤血球膜異常症諸種疾患の膜脂質分析と膜輸送能の相関を検討し、あわせて実験的に作製した膜脂質異常赤血球を検索することにより、赤血球膜異常症の病態を検討した。

赤血球膜脂質異常症では、hereditary high red cell membrane phosphatidyl choline hemolytic anemia (HPCHA) 7例、congenital lecithin: cholesterol acyltransferase (LCAT) deficiency 1例、congenital  $\beta$ -lipoprotein ( $\beta$ -LP) deficiency 4例。膜蛋白異常症では、hereditary spherocytosis (HS), hereditary elliptocytosis (HE), hereditary stomatocytosis (HSt), およびその他疾患。実験的には phospholipase A<sub>2</sub> (PLase A<sub>2</sub>) にて膜 phosphatidyl choline (PC) に修飾を加えた膜脂質異常赤血球群を対象とした。

先天性赤血球膜脂質異常症群では、HPCHA, LCAT 欠損症で膜 free cholesterol (FC) 量・膜総 phospholipids (PL) 量共に著増、特に PC 分画の著増が認められた。Na<sup>+</sup> influx では、HPCHA の著明な亢進に対し LCAT 欠損症ではむしろ低値であった。 $\beta$ -LP 欠損症では赤血球膜脂質総量はほぼ正常に維持されていたが、PC 分画の減少と sphingomyelin 分画の増加傾向が認められ、Na<sup>+</sup> influx がほぼ正常であるのに対し Ca<sup>2+</sup> uptake は他に類を見ないほど著明な亢進を示しており、本症での2者に著しい解離が注目された。赤血球膜蛋白異常症群においては、HS で摘脾前・後の変化が注目された。すなわち、摘脾前の膜 FC 量・膜総 PL 量・phosphatidyl ethanolamine 分画の減少が、摘脾後には正常化するが、Na<sup>+</sup> influx の亢進は変化が認められず、病因の主体と考えられる膜蛋白の異常が Na<sup>+</sup> influx の亢進に関与していると推定された。HE では際立った

異常は認められなかった。HSt では、膜脂質・膜輸送能とも各病型により異なる異常を呈するが両者間に相関は認められず、他の因子が関与しているものと推定された。PLase A<sub>2</sub> を用いる実験系では、無処理の control 群、PLase A<sub>2</sub> 処理により膜 PC 減少と lyso-PC (L-PC) の増加を来した群、および PLase A<sub>2</sub> 処理後さらに albumin 処理を加え増加した L-PC を除去し膜総 PL 量も減少した群、の 3 群について膜 PL と Na<sup>+</sup> influx および Ca<sup>2+</sup> uptake を測定した。この結果、膜脂質の変化と Na<sup>+</sup> influx あるいは Ca<sup>2+</sup> uptake の変化は明らかに相関を持つことが判明したが、PC・L-PC・総 PL 量のどの因子が主に関与しているかの特定には至らなかった。また、PLase A<sub>2</sub> 処理赤血球の albumin 処理追加により、亢進した Na<sup>+</sup> influx は変化を示さないのに比べ、Ca<sup>2+</sup> uptake では更なる亢進を示し、Na と Ca とではその輸送機構上に明らかな相違が存在することが判明した。

Membrane lipid analyses and membrane transport (Na<sup>+</sup> influx and Ca<sup>2+</sup> uptake) studies were performed in red cell of patients with membrane abnormalities.

Among hereditary disorders with membrane lipid abnormalities, a marked increase of free cholesterol (FC) and of phosphatidyl choline (PC) was detected in the red cells of 7 cases of hereditary high red cell membrane PC hemolytic anemia (HPCA) and one case of congenital lecithin: cholesterol acyltransferase (LCAT) deficiency. Na<sup>+</sup> influx was elevated significantly in the HPCA red cells, contrary to the decreased Na<sup>+</sup> influx in LCAT deficiency. In 4 cases of congenital  $\beta$ -lipoprotein ( $\beta$ -LP) deficiency with a marked decrease of plasma lipids, total membrane lipids were maintained almost normally, even though a moderate decrement of PC and an increased sphingomyelin were observed. In the disorder, Ca<sup>2+</sup> uptake was markedly increased (approximately 100 fold greater than those in normal control), with normal Na<sup>+</sup> influx.

Among red cell membrane protein abnormalities, moderate decrement of FC, total phospholipids (PL), and phosphatidyl ethanolamine in the non-splenectomized hereditary spherocytosis patients was normalized after splenectomy. Increased Na<sup>+</sup> influx, however, was not improved after the treatment, suggesting a possible contribution of the abnormal membrane proteins to increased Na<sup>+</sup> influx, if they may exist. In hereditary stomatocytosis, various membrane lipid abnormalities were observed dependent on the type of the disorders.

To clarify a possible role of membrane lipids on the abnormal membrane transport functions, such as Na<sup>+</sup> influx, normal red cells were treated with phospholipase A<sub>2</sub> (PLase A<sub>2</sub>) to convert PC to lyso-PC (L-PC). In some experiments, the PLase A<sub>2</sub>-treated red cells were further incubated with albumin to cleave membrane L-PC, which was formed by the enzymatic degradation of membrane PC. In the PLase A<sub>2</sub>-treated red cells, Na<sup>+</sup> influx and Ca<sup>2+</sup> uptake were markedly elevated. Ca<sup>2+</sup> uptake increases further in the presence of albumin, in contrast to no response in Na<sup>+</sup> influx.

In conclusion, (1) membrane lipid abnormalities do affect the membrane transport functions, and (2) a different mechanism would exist between Na<sup>+</sup> influx

and  $\text{Ca}^{2+}$  uptake.

Key Words ① Membrane lipid abnormalities ② Membrane transport  
③ Phospholipase  $\text{A}_2$

## 緒 言

赤血球膜が主として脂質と蛋白から構成されていることは、よく知られるところである。そして溶血性貧血の成因のひとつとして、赤血球膜異常症の存在が知られており、そのうち膜脂質異常が主たる病因と考えられる疾患も多数存在が認められている。たとえば、先天性疾患としては、hereditary high red cell membrane phosphatidyl choline hemolytic anemia (HPCHA), congenital lecithin: cholesterol acyltransferase (LCAT) deficiency, congenital  $\beta$ -lipoprotein ( $\beta$ -LP) deficiency など、後天性疾患としては、肝疾患に伴う膜脂質異常による溶血性貧血などがよく知られる疾患である。また、これら疾患において赤血球膜輸送能の異常がしばしば認められることも知られている。また、赤血球膜蛋白異常が溶血の主因と目される疾患、hereditary spherocytosis (HS), hereditary elliptocytosis (HE), hereditary stomatocytosis (HSt) などでも、膜脂質異常を二次的に伴う場合がある。しかし本邦では、これらの膜脂質異常症の検索は十分とは言えず、病因、疫学、病態などについては不明な点が多々残されているのが現状である。そこで本研究では、これら疾患の赤血球膜脂質の組成分析とその機能的相関を検索することにした。またあわせて、正常者赤血球に人為的操作を加えて膜脂質異常赤血球モデルを作製し、この膜脂質変化に伴う赤血球膜の機能異常を膜輸送能を指標として観察することにより、赤血球膜脂質異常症の病態との関連を探ることとした。

## 対 象

先天性赤血球膜異常症のうち、原発性膜脂質異常症として HPCHA 7例, LCAT 欠損症 1例,  $\beta$ -LP 欠損症 4例について、また主に膜

蛋白に異常を認める疾患としては HS 22例, HE 13例, HSt 18例をとりあげ、検索の対象とした。その他、赤血球形態異常を伴う溶血性貧血として病因不明あるいは続発性の stomatocytosis 14例, chorea-acanthocytosis 2例, その他の acanthocytosis 1例, さらに他の原因による溶血性貧血 33例についても検索した。

次に、正常赤血球を用いた膜脂質修飾実験には、代表的な膜脂質分解酵素である phospholipase  $\text{A}_2$  (PLase  $\text{A}_2$ )を用い、膜 phosphatidyl choline (PC) を lyso-PC (L-PC) に変換する際に生ずる赤血球膜機能および形態の変化についても検索した。

## 方 法

原則として各症例に、末梢血検査、赤血球膜脂質分析、 $\text{Na}^+$  influx の測定を施行した。また、正常赤血球の膜脂質を人為的に修飾し、これに伴う  $\text{Na}^+$  influx,  $\text{Ca}^{2+}$  uptake の変化を観察した。

### 1. 臨床血液学的検討

被検血液を自動血球計算装置にて、赤血球数、ヘモグロビン量、ヘマトクリット値を、さらに塗沫標本にて網赤血球数を算定した。また赤血球形態は、wet-film 法、および採血後直ちに 0.1 M リン酸緩衝生理食塩水-1% グルタルアルデヒド溶液にて固定 (1:30, v/v) した後、光顕および走査電顕的に観察した。

### 2. 赤血球膜脂質分析

ヘパリン加にて静脈血を採取後、可及的速やかに 1,000 g にて 20 分、さらに 3,000 g にて 10 分遠沈し血球と血漿を分離し、血球を生理食塩液にて 3 回洗浄して buffy coat を除去、濃厚赤血球浮遊液を作成した。

(i) 赤血球膜脂質の抽出: 赤血球膜脂質の抽出は、Rose らの方法<sup>1)</sup>に従った。濃厚赤血

球浮遊液の1 ml を蒸留水1 ml にて完全溶血させ、攪拌しながら isopropyl alcohol 11 ml を徐々に加え、1時間後に攪拌しながら chloroform 7 ml を徐々に加え、さらに1時間後に生理食塩液4 ml を加えた。これを一昼夜静置した後遠沈し、最上層の水分を除去し、沈殿物も除き、赤血球膜脂質成分を含んだ抽出液を $-60^{\circ}\text{C}$  2時間凍結。これを解凍する際に表層に浮遊する微小な水分層をも除去し、純粋な赤血球膜脂質抽出液を作成した。この抽出液をロータリーエバポレーターにて乾固させ、これに Folch 液 (chloroform・methanol 2:1 混合液) 0.5 ml を加え、再溶解した。

(ii) 膜 free cholesterol (FC) および膜総 phospholipids (PL) の測定: 上記抽出液の再溶解液の適量 (20~50  $\mu\text{l}$ ) を取り、赤血球膜 FC 量および総 PL 量の定量に供した。FC は遊離コレステロール測定キット (FC キット-K, 日本商事株式会社) にて測定した。<sup>2), 3)</sup> 総 PL は, Bartlett 法<sup>4)</sup> に従って測定した。すなわち, 検体を  $100^{\circ}\text{C}$  15分間加熱し液体成分を除去, これに 10N  $\text{H}_2\text{SO}_4$  0.5 ml を加え,  $180^{\circ}\text{C}$  1.5 時間加熱・放冷した後,  $\text{H}_2\text{O}_2$  を駒込ピペットにて2滴加え, 再び  $180^{\circ}\text{C}$  にて1時間加熱。放冷後 0.22% モリブデン酸アンモニウム液 4.6 ml, Fiske-SubbaRow 液 0.2 ml を加えて  $100^{\circ}\text{C}$  の沸騰水中で10分間加温し呈色反応を起こさせ, これを分光光度計 830 nm にて測定した。

(iii) 膜 PL 分画の定量: 赤血球膜 PL 各構成成分の分析・定量は, Skipski らの方法<sup>5)</sup> に従い, 薄層クロマトグラフィーによった。すなわち, シリカゲル H 板 (22 cm  $\times$  22 cm, Merck 社) 上に再溶解液の適量を塗布し, chloroform-methanol-acetic acid-water (25:15:4:2) の展開液にて展開。各分画スポットをかき取り, 前記 Bartlett 法にて定量した。

### 3. 膜輸送能の検索

(i)  $\text{Na}^+$  influx の測定: 被検洗浄赤血球を作製し, これをグルコース加 (250 mg/dl) 0.145 M Na/K リン酸緩衝液 (pH 7.4) でヘマ

トクリット 30% に調整した後, その赤血球浮遊液 1 ml を  $^{22}\text{Na}$  (NEZ-081, New England Nuclear, Boston, MA) と  $37^{\circ}\text{C}$  2時間孵置した後,  $4^{\circ}\text{C}$  0.1M  $\text{MgCl}_2$  液にて 1,200 g 2分 で3回洗浄し, 外液中に存在する  $^{22}\text{Na}$  を除去し, 赤血球内に取り込まれた  $^{22}\text{Na}$  の放射活性を  $\gamma$ -カウンターにて測定した。<sup>6)</sup>

赤血球ナトリウムおよびカリウムは, フレームフォトメトリーにて, 589 nm および 769 nm で測定した。<sup>7)</sup>

(ii)  $\text{Ca}^{2+}$  uptake の測定: 一部の症例については, 必要に応じて  $\text{Ca}^{2+}$  uptake の測定をも施行した。被検赤血球を, 5 mM KCl と 20 mM imidazole HCl を加えた等張生理食塩液 (pH 7.4) にて4回洗浄しヘマトクリットを 30% に調整し, 測定に供した。まず, 活発な  $\text{Ca}^{2+}$  efflux をとめる必要があるため, 赤血球内の adenosine 5'-triphosphate (5'-ATP) をほぼ完全に除去することにした。<sup>8)</sup> この目的には洗浄赤血球を, 2 mM iodoacetate と 10 mM inosine を加えた等張 imidazole・HCl 緩衝生理食塩液 (pH 7.4) を用いて  $37^{\circ}\text{C}$  90分間孵置した。この条件下では, 赤血球 5'-ATP 濃度は 0.001 mM 以下となった。この ATP-depleted 赤血球を用いて,  $\text{Ca}^{2+}$  uptake を測定した。まずこの赤血球浮遊液 1 ml を  $37^{\circ}\text{C}$  にて2時間, 1.5 mM  $^{45}\text{CaCl}_2$  (1  $\mu\text{Ci}/\text{ml}$ ) と孵置した後,  $4^{\circ}\text{C}$  生理食塩液で4回洗浄し, 赤血球内の  $^{45}\text{Ca}$  放射活性を liquid scintillation counter で測定した。<sup>9)</sup>

### 4. PLase $\text{A}_2$ による正常赤血球膜脂質修飾

洗浄赤血球をさらに, 30 mM N-2-hydroxyethyl piperazine-N'-2-ethanesulfonic acid (HEPES), 10 mM  $\text{CaCl}_2$ , 140 mM NaCl, 0.25 mM  $\text{MgCl}_2$ , 5 mM KCl および 15 mM glucose より成る incubation buffer (339 mOsm, pH 7.6) にて洗浄し, ヘマトクリットを 10% に調整した。<sup>10), 11)</sup> 実験は, 原則として同一赤血球群を用いた3検体を1グループとして行った。すなわち, 第1群は, PLase  $\text{A}_2$  処理を行わないコントロール, 第2群は, PLase  $\text{A}_2$  処理を行うもの, 第3群は, PLase  $\text{A}_2$  処理後さ

らに albumin にて処理するものとした。したがって、第2群と第3群には、PLase A<sub>2</sub> (20 IU/ml RBC) を加えることとし、これに PLase A<sub>2</sub> 非処理の第1群をコントロールとして、37°C にて孵置した。1時間後、各々に、10 mM EDTA, 30 mM HEPES と 140 mM NaCl よりなる buffer(332 mOsm, pH 7.4) を同量加えて反応を終了させ、30mM HEPES, 145 mM NaCl および 5 mM KCl よりなる洗浄用 buffer (pH 7.4) にて3回洗浄した。PLase A<sub>2</sub> を加えた2検体のうち第3群には、さらに albumin 処理を行った。すなわち、10 mM HEPES, 5 mM KCl および 145 mM NaCl よりなる buffer (pH 7.4) に albumin (100 mg/ml RBC) を加えた液にて、PLase A<sub>2</sub> 処理赤血球をさらに 37°C 10分間孵置し、その後前述の洗浄用 buffer にて3回洗浄した。こうして得た赤血球

標品について、赤血球膜脂質分析、Na<sup>+</sup> influx および Ca<sup>2+</sup> uptake を測定した。

結果および考察

(1) 先天性赤血球膜脂質異常症群について (Table 1)

(i) HPCHA: 本症赤血球膜脂質では、FC量、総 PL 量ともに増加していた。この増量は、患者赤血球がやや大型であることを考慮してもなお明らかに異常高値であった。PL 分画では、phosphatidyl ethanolamine (PE), phosphatidyl serine (PS)+phosphatidyl inositol (PI), sphingomyelin (SM) の各々の分画では、赤血球の大型化を反映して絶対量の増加を認めるが、特に PC 分画が他の分画に比べ著しく増加しており、これは各分画の総 PL 量中に占めるパーセンテージを見れば明らかであ

Table 1. Characteristics of clinical data, membrane lipids and membrane transport in congenital erythrocyte membrane abnormalities and others.

	Clinical Data			Membrane lipids $\mu\text{g}/10^{10}$ RBC						Membrane Transport		
	RBC $\times 10^4/\mu\text{l}$	Hb g/dl	Retic. %	FC	total PL	PE	PS+PI	PC	SM	L-PC ( )内%	Na <sup>+</sup> influx m moles/L RBC /hr	Ca <sup>2+</sup> uptake n moles/ml RBC /2hrs
Normal range	M480 $\pm$ 70 F420 $\pm$ 60	15.5 $\pm$ 2.0 13.0 $\pm$ 1.5	1.0 $\pm$ 0.5	1202 $\pm$ 103	2604 $\pm$ 241	806 (30.9) $\pm$ 86( $\pm$ 0.8)	366 (14.1) $\pm$ 38( $\pm$ 0.9)	733 (28.2) $\pm$ 64( $\pm$ 1.0)	663 (25.4) $\pm$ 73( $\pm$ 1.2)	39 (1.5) $\pm$ 11( $\pm$ 0.5)	1.29 $\pm$ 0.14	8.0 $\pm$ 2.0
HPCHA	298	11.9	—	1793	3644	966(26.5)	532(14.6)	1206(33.1)	940(25.8)	—	4.22	—
	—	—	—	1539	3222	796(24.7)	403(12.5)	1102(34.2)	921(28.6)	—	—	—
	—	—	—	1797	3271	892(27.3)	444(13.6)	1040(31.8)	892(27.3)	—	—	—
	251	9.4	19.2	1415	3102	862(27.8)	481(15.5)	1042(33.6)	676(21.8)	41(1.3)	3.72	—
	402	13.1	14.3	1365	2899	786(27.1)	481(16.6)	925(31.9)	661(22.8)	46(1.6)	4.78	—
	—	—	—	1557	3279	948(28.9)	492(15.0)	1043(31.8)	751(22.9)	45(1.4)	2.86	—
	217	8.4	24.8	2030	3262	904(27.7)	506(15.5)	1020(31.3)	822(25.2)	10(0.3)	3.91	59.8
				1642 $\pm$ 239	3240 $\pm$ 224	879 (27.1) $\pm$ 69( $\pm$ 1.3)	476 (14.8) $\pm$ 46( $\pm$ 1.4)	1054(32.5) $\pm$ 85( $\pm$ 1.1)	809 (24.9) $\pm$ 115( $\pm$ 2.5)	36 (1.2) $\pm$ 17( $\pm$ 0.6)	3.90 $\pm$ 0.71	
LCAT deficiency	613	19.9	—	1763	3435	694(20.2)	429(12.5)	1707(49.7)	577(16.8)	28(0.8)	0.93	—
$\beta$ -LP deficiency	413	13.3	1.4	1364	2398	789(32.9)	453(18.9)	493(20.6)	643(26.8)	20(0.8)	—	—
	363	11.5	2.1	1514	2591	793(30.6)	479(18.5)	565(21.8)	731(28.2)	23(0.9)	—	—
	440	13.5	0.7	1099	2454	729(29.7)	410(16.7)	540(22.0)	748(30.5)	27(1.1)	1.13	440.0 (25分値)
	387	13.6	1.3	1071	2652	835(31.5)	509(19.2)	528(19.9)	764(28.8)	16(0.6)	1.22	1055.8
				1262 $\pm$ 214	2524 $\pm$ 118	787 (31.2) $\pm$ 44( $\pm$ 1.4)	463 (18.3) $\pm$ 42( $\pm$ 1.1)	532 (21.1) $\pm$ 30( $\pm$ 1.0)	722 (28.6) $\pm$ 54( $\pm$ 1.5)	22 (0.9) $\pm$ 5( $\pm$ 0.2)		
chorea acanthocytosis	369	11.9	0.4	1242	2729	540(19.8)	491(18.0)	835(30.6)	808(29.6)	55(2.0)	1.47	16.0
	403	12.9	0.8	1206	2500	725(29.0)	387(15.5)	708(28.3)	662(26.5)	18(0.7)	1.78	—
drug induced acanthocytosis	283	8.9	1.0	1336	2361	710(30.1)	481(20.4)	548(23.2)	583(24.7)	38(1.6)	2.59	3.3

\*Retic.: Reticulocytes

る。すなわち、PC 以外の他の分画のパーセンテージは正常からやや減少傾向を示しているにもかかわらず、PC 分画では明らかな増加が認められる。次にこの膜脂質異常に伴って Na<sup>+</sup> influx の異常亢進が認められ、正常 1.29 ± 0.14 m moles/L RBC/hr に対し、本症赤血球では 3.90 ± 0.71 と約 3 倍であった。HPCHA の臨床像は HS と似た所見を示し、中等度の非代償性溶血性貧血を呈すが、HS の非摘脾群 (2.14 ± 0.25) と比較してもこの Na<sup>+</sup> influx の亢進は、明らかにさらに高値を示した。

(ii) LCAT 欠損症：本症は血漿酵素 LCAT の欠損によるが、特徴的な膜脂質の変化は

HPCHA 症例に類似している。すなわち、膜 FC 量、膜総 PL 量の著明な増加および PC 分画の著明な増加である。PC 分画の増加は、HPCHA 例に比べても著しいことがわかる。興味深いのは、それでありながら、Na<sup>+</sup> influx は、HPCHA 例とは逆に正常よりむしろ低値となっていることである。この差異が何に基因するものであるかは現段階では明らかでなく、今後の課題である。

(iii) 先天性 β-LP 欠損症：本症では赤血球膜 FC 量、総 PL 量はほぼ正常範囲に維持されていた。しかし、その PL 分画を見ると、PC 分画の明らかな減少と SM 分画の増加傾向

**Table 2.** Characteristics of clinical data, membrane lipids and membrane transport in hereditary spherocytosis.

	Clinical Data			Membrane lipids μg/10 <sup>8</sup> RBC						Membrane Transport		
	RBC ×10 <sup>6</sup> /μl	Hb g/dl	Retic. %	FC	total PL	PE	PS+PI	PC	SM	L-PC ( )内%	Na <sup>+</sup> influx m moles/L RBC /hr	Ca <sup>2+</sup> uptake n moles/ml RBC /2hrs
Normal range	M480±70 F420±60	15.5±2.0 13.0±1.5	1.0±0.5	1202 ±103	2604 ±241	806 (30.9) ±86(±0.8)	366 (14.1) ±38(±0.9)	733 (28.2) ±64(±1.0)	663 (25.4) ±73(±1.2)	39 (1.5) ±11(±0.5)	1.29±0.14	8.0±2.0
HS	245	8.1	30.0	1131	2531	825(32.6)	364(14.4)	780(30.8)	562(22.2)	—	1.88	—
	318	10.0	6.8	1037	2099	613(29.2)	321(15.3)	605(28.8)	537(25.6)	23(1.1)	2.15	—
	397	12.7	0.4	1374	2704	803(29.7)	416(15.4)	695(25.7)	752(27.8)	38(1.4)	1.70	—
	356	12.1	14.0	976	2071	601(29.0)	317(15.3)	590(28.5)	530(25.6)	33(1.6)	2.98	—
	396	12.9	7.2	1142	2285	674(29.5)	377(16.5)	624(27.3)	576(25.2)	34(1.5)	1.78	—
	394	12.4	1.8	1263	2550	747(29.3)	339(13.3)	778(30.5)	655(25.7)	31(1.2)	2.10	—
	433	13.3	2.2	1144	2306	692(30.0)	323(14.0)	639(27.7)	616(26.7)	36(1.6)	2.01	—
	372	12.9	13.6	1028	2214	620(28.0)	345(15.6)	662(29.9)	549(24.8)	38(1.7)	3.05	—
	333	11.1	17.6	941	2250	827(36.8)	304(13.5)	590(26.2)	495(22.0)	34(1.5)	2.05	36.2
	436	14.8	1.0	1112	2859	781(27.3)	397(13.9)	915(32.0)	680(23.8)	86(3.0)	1.93	27.1
	220	7.6	19.2	1187	2433	727(29.9)	389(16.0)	691(28.4)	572(23.5)	54(2.2)	2.34	—
	415	13.9	21.2	1088	2372	697(29.4)	413(17.4)	695(29.3)	505(21.3)	62(2.6)	2.42	—
	304	9.8	17.8	1214	2360	701(29.7)	394(16.7)	673(28.5)	538(22.8)	54(2.3)	2.20	—
	377	10.9	13.0	997	2156	582(27.0)	353(16.4)	591(27.4)	591(27.4)	39(1.8)	2.47	—
			1117 ±119	2371 ±227	706 (29.8) ±83(±2.4)	361 (15.3) ±37(±1.3)	681 (28.6) ±92(±1.8)	583 (24.6) ±72(±2.0)	43 (1.8) ±17(±0.6)		2.22 ±0.41	
HS (splenecto- mized)	—	—	—	1178	2448	722(29.5)	353(14.4)	693(28.3)	680(27.8)	—	3.04	—
	—	—	—	1242	2568	768(29.9)	357(13.9)	732(28.5)	711(27.7)	—	2.82	—
	—	—	—	1151	2593	775(29.9)	376(14.5)	726(28.0)	716(27.6)	—	3.17	—
	441	14.9	—	1519	2790	790(28.3)	382(13.7)	795(28.5)	770(27.6)	53(1.9)	2.41	—
				1273 ±169	2600 ±142	764 (29.4) ±29(±0.8)	367 (14.1) ±14(±0.4)	737 (28.3) ±43(±0.2)	719 (27.7) ±37(±0.1)		2.86 ±0.33	
HS (non-splene- ctomized)	—	—	—	1061	2227	635(28.5)	332(14.9)	641(28.8)	619(27.8)	—	—	—
	319	10.1	4.4	1041	2367	706(29.8)	367(15.5)	606(25.6)	660(27.9)	28(1.2)	1.60	16.4
	253	9.0	15.2	1316	2474	700(28.3)	356(14.4)	735(29.7)	636(25.7)	47(1.9)	5.25	11.6
	363	11.0	7.7	854	1926	495(25.7)	266(13.8)	595(30.9)	526(27.3)	44(2.3)	1.71	17.8
			1068 ±190	2249 ±238	634 (28.1) ±98(±1.7)	330 (14.7) ±45(±0.7)	644 (28.8) ±64(±2.3)	610 (27.2) ±59(±1.0)				

\*Retic.: Reticulocytes

を認めることが特徴であった。従来の報告では、 $\text{Na}^+$  influx は亢進とされているが、今回の2例の検索ではほぼ正常であった。しかし、この2例とも  $\text{Ca}^{2+}$  uptake においては、正常の100倍以上の亢進を示し、他の諸種膜異常症では全く認められない異常成績であった。したがって、本症では  $\text{Na}^+$  influx と  $\text{Ca}^{2+}$  uptake の間には大きな解離が認められた。

本症と同様の赤血球形態異常 (acanthocytosis) を示す疾患群、たとえば chorea acanthocytosis などでは、赤血球膜脂質には前記疾患のような特徴的变化は認められなかった。また、膜輸送能でも  $\text{Na}^+$  influx と  $\text{Ca}^{2+}$  uptake は、いずれも軽度の亢進傾向にある程度で、先天性  $\beta$ -LP 欠損症に見られた  $\text{Ca}^{2+}$  uptake の異常亢進成績は認められず、病的には主要な鑑別点と考えられる。

(2) 赤血球膜蛋白の異常が主体と推定される溶血性貧血群について

HS, HE, HSt を中心に検索を行った。

(i) HS: 本症の検索結果は Table 2 に示した。HS では、摘脾前と摘脾後では赤血球膜

脂質に変化があると言われているが、はっきり摘脾の有無の information のある症例は、摘脾前・後とも4例ずつであり、14例は明らかな information はないが、摘脾前の症例と推定される。摘脾前 HS 群では、膜 FC 量、膜総 PL 量の減少が認められ、PL 分画では PE 分画が減少傾向にあるようである。ところが摘脾後の HS 群では、膜 FC 量、膜総 PL 量、PE 分画の減少傾向は解消され、正常域へと増加している。しかし、 $\text{Na}^+$  influx を見ると摘脾の有無に関係なく、軽度の亢進状態が持続しているようである。膜脂質の正常化にもかかわらず、 $\text{Na}^+$  influx が亢進状態のままであるということは、おそらく、この疾患の病変の主体と考えられる膜蛋白の異常が本症では  $\text{Na}^+$  influx の亢進に関与しているのであろう。

(ii) HE: 本症の検索結果は Table 3 に示した。HE も病因の主体が膜蛋白異常にあると推定されている疾患であるが、HS のように膜脂質の異常は認められず、脂質量、分画ともに正常であった。しかし、膜輸送能では、 $\text{Na}^+$  influx の軽度亢進傾向と  $\text{Ca}^{2+}$  uptake の軽度

Table 3. Characteristics of clinical data, membrane lipids and membrane transport in hereditary elliptocytosis.

	Clinical Data			Membrane lipids $\mu\text{g}/10^{10}$ RBC						Membrane Transport		
	RBC $\times 10^3/\mu\text{l}$	Hb g/dl	Retic. %	FC	total PL	PE	PS+PI	PC	SM	L-PC (%)内%	$\text{Na}^+$ influx n moles/L RBC /hr	$\text{Ca}^{2+}$ uptake n moles/ml RBC /2hrs
Normal range	M480 $\pm$ 70 F420 $\pm$ 60	15.5 $\pm$ 2.0 13.0 $\pm$ 1.5	1.0 $\pm$ 0.5	1202 $\pm$ 103	2604 $\pm$ 241	806 (30.9) $\pm$ 86 $\pm$ 0.8	366 (14.1) $\pm$ 38 $\pm$ 0.9	733 (28.2) $\pm$ 64 $\pm$ 1.0	663 (25.4) $\pm$ 73 $\pm$ 1.2	39 (1.5) $\pm$ 11 $\pm$ 0.5	1.29 $\pm$ 0.14	8.0 $\pm$ 2.0
HE	362	10.2	1.0	1460	3151	989(31.4)	441(14.0)	841(26.7)	879(27.9)	—	—	—
	363	11.3	1.8	1189	2555	807(31.6)	370(14.5)	713(27.9)	664(26.0)	—	—	—
	—	—	—	1147	2580	816(31.6)	376(14.6)	740(28.7)	648(25.1)	—	1.92	—
	—	—	—	1185	2553	778(30.5)	411(16.1)	689(27.0)	675(26.4)	—	1.59	—
	—	—	—	1195	2667	818(30.7)	419(15.7)	739(27.7)	691(25.9)	—	1.58	—
	—	—	—	1350	2949	932(31.6)	451(15.3)	793(26.9)	773(26.2)	—	1.44	—
	214	7.6	1.6	1438	2706	752(27.8)	455(16.8)	782(28.9)	666(24.6)	51(1.9)	2.15	7.6
	345	10.8	0.8	1179	2290	660(28.8)	334(14.6)	607(26.5)	646(28.2)	43(1.9)	1.16	5.5
	398	12.2	2.5	1007	2148	670(31.2)	322(15.0)	584(27.2)	554(25.8)	17(0.8)	1.27	3.8
	318	10.0	3.2	1105	2436	767(31.5)	382(15.7)	597(24.5)	663(27.2)	27(1.1)	1.27	6.0
	376	11.3	0.8	1002	2297	677(29.5)	354(15.4)	648(28.2)	597(26.0)	21(0.9)	1.27	5.2
	321	10.1	13.2	1169	2535	750(29.6)	434(17.1)	679(26.9)	631(24.9)	41(1.6)	2.15	—
	494	14.2	3.0	1078	2301	690(30.0)	325(14.1)	552(24.0)	688(29.7)	46(2.0)	2.11	—
				1193 $\pm$ 145	2551 $\pm$ 278	777(30.4) $\pm$ 99 $\pm$ 1.2	390(15.3) $\pm$ 48 $\pm$ 1.0	690(27.0) $\pm$ 89 $\pm$ 1.4	675(26.5) $\pm$ 80 $\pm$ 1.5	35(1.5) $\pm$ 13 $\pm$ 0.5	1.63 $\pm$ 0.39	

\*Retic.: Reticulocytes

低下が認められ、Na<sup>+</sup> influx の軽度亢進と Ca<sup>2+</sup> uptake の軽度亢進を示す HS と異なっている。

(iii) HSt: 本症の検索結果は Table 4 に

示した。HSt はその病型より 5 型に分類し、各々について検討した。5 型の各々の病型の特徴は、第 I 型は、Na<sup>+</sup> influx が著明な亢進を示し、赤血球内 Na 濃度の著増を呈する群で、

**Table 4.** Characteristics of clinical data, membrane lipids and membrane transport in hereditary stomatocytosis and secondary stomatocytosis.

	Clinical Data			Membrane lipids $\mu\text{g}/10^{10}$ RBC							Membrane Transport	
	RBC $\times 10^4/\mu\text{l}$	Hb g/dl	Retic. %	FC	total PL	PE	PS+PI	PC	SM	L-PC (%)	Na <sup>+</sup> influx m moles/L RBC /hr	Ca <sup>2+</sup> uptake n moles/ml RBC /2hrs
Normal range	M480 $\pm$ 70 F420 $\pm$ 60	15.5 $\pm$ 2.0 13.0 $\pm$ 1.5	1.0 $\pm$ 0.5	1202 $\pm$ 103	2604 $\pm$ 241	806 (30.9) $\pm$ 86( $\pm$ 0.8)	366 (14.1) $\pm$ 38( $\pm$ 0.9)	733 (28.2) $\pm$ 64( $\pm$ 1.0)	663 (25.4) $\pm$ 73( $\pm$ 1.2)	39 (1.5) $\pm$ 11( $\pm$ 0.5)	1.29 $\pm$ 0.14	8.0 $\pm$ 2.0
Hst Type I	307	10.4	6.4	1340	2714	817(30.1)	415(15.3)	684(25.2)	727(26.8)	71(2.6)	9.32	21.4
	—	—	—	1404	3006	799(26.6)	505(16.8)	818(27.2)	815(27.1)	69(2.3)	8.92	8.8
	290	10.1	11.4	1549	2632	674(25.6)	476(18.1)	708(26.9)	708(26.9)	66(2.5)	12.66	14.7
	306	8.7	—	1702	2870	876(30.3)	454(15.7)	809(28.0)	714(24.7)	37(1.3)	—	—
	456	16.0	3.0	1302	2723	713(26.2)	501(18.4)	787(28.9)	659(24.2)	63(2.3)	4.90	—
			1459 $\pm$ 165	2789 $\pm$ 149	776 (27.8) $\pm$ 82( $\pm$ 2.3)	470 (16.9) $\pm$ 37( $\pm$ 1.3)	761 (27.2) $\pm$ 61( $\pm$ 1.4)	725 (25.9) $\pm$ 57( $\pm$ 1.4)	61 (2.2) $\pm$ 14( $\pm$ 0.5)		8.95 $\pm$ 3.18	
Type II	240	7.2	—	1820	3140	886(28.2)	499(15.9)	801(25.5)	810(25.8)	144(4.6)	1.70	—
	—	—	—	951	2329	750(32.2)	300(12.9)	692(29.7)	587(25.2)	—	2.21	—
	217	7.7	3.6	1384	3137	860(27.4)	486(15.5)	929(29.6)	778(24.8)	84(2.7)	1.70	17.1
	226	9.0	12.8	1294	2522	663(26.3)	411(16.3)	699(27.7)	631(25.0)	118(4.7)	2.74	58.6
	289	10.1	2.8	1175	2683	862(32.1)	416(15.5)	701(26.1)	685(25.5)	19(0.7)	1.72	11.9
	266	9.3	2.1	1342	2455	726(29.6)	449(18.3)	609(24.8)	624(25.4)	—	2.15	11.1
	398	12.6	5.8	1016	2008	621(30.9)	349(17.4)	522(26.0)	468(23.3)	48(2.4)	1.93	4.8
	200	7.1	15.7	1598	2868	843(29.4)	508(17.7)	786(27.4)	677(23.6)	54(1.9)	1.59	—
			1323 $\pm$ 288	2643 $\pm$ 396	776 (29.5) $\pm$ 101( $\pm$ 2.2)	427 (16.2) $\pm$ 74( $\pm$ 1.7)	717 (27.1) $\pm$ 124( $\pm$ 1.8)	658 (24.8) $\pm$ 108( $\pm$ 0.9)	78 (2.8) $\pm$ 47( $\pm$ 1.6)		1.97 $\pm$ 0.38	20.7 $\pm$ 21.6
Type III	—	—	—	997	2116	686(32.5)	292(13.8)	584(27.6)	552(26.1)	—	1.57	—
	248	7.0	—	1135	2534	763(30.1)	349(13.8)	794(31.3)	628(24.8)	—	1.39	—
	283	9.0	4.8	1485	2924	845(28.9)	450(15.4)	868(29.7)	743(25.4)	18(0.6)	1.54	51.3
Type IV	202	7.7	17.0	1434	3015	905(30.0)	485(16.1)	856(28.4)	709(23.5)	60(2.0)	1.41	—
Type V	351	11.3	0.6	1677	3703	1033(27.9)	655(17.7)	992(26.8)	967(26.1)	56(1.5)	1.73	7.9
VC-induced (stomatocytosis)	251	7.8	50.0	1364	3094	860(27.8)	495(16.0)	953(30.8)	727(23.5)	59(1.9)	2.23	—
	449	12.4	14.0	1174	2860	945(33.0)	280(9.8)	795(27.8)	766(26.8)	74(2.6)	1.27	9.8
	—	—	0.1	1023	2538	802(31.6)	264(10.4)	733(28.9)	599(23.6)	140(5.5)	1.76	—
	—	—	—	1390	2728	816(29.9)	374(13.7)	750(27.5)	747(27.4)	41(1.5)	1.39	—
	178	5.4	3.4	1505	2951	871(29.5)	398(13.5)	974(33.0)	664(22.5)	44(1.5)	1.71	17.9
	247	7.4	0	1424	2346	544(23.2)	380(16.2)	786(33.5)	591(25.2)	45(1.9)	1.62	2.9
	249	8.7	6.0	1355	2877	929(32.3)	504(17.5)	693(24.1)	699(24.3)	52(1.8)	1.43	18.0
			1319 $\pm$ 165	2771 $\pm$ 256	824 (29.6) $\pm$ 134( $\pm$ 3.3)	385 (13.9) $\pm$ 93( $\pm$ 2.9)	812 (29.4) $\pm$ 109( $\pm$ 3.3)	685 (24.8) $\pm$ 70( $\pm$ 1.8)	65 (2.4) $\pm$ 35( $\pm$ 1.4)		1.63 $\pm$ 0.32	12.2 $\pm$ 7.3
stomatocytosis due to unknown origin	—	—	—	951	2210	636(28.8)	360(16.3)	617(27.9)	597(27.0)	—	—	—
	375	11.0	11.4	1098	2536	738(29.1)	439(17.3)	708(27.9)	652(25.7)	—	—	—
	231	7.7	9.4	1272	2604	765(29.4)	448(17.2)	703(27.0)	646(24.8)	42(1.6)	1.74	—
	399	10.6	1.5	1385	2858	769(26.9)	409(14.3)	855(29.9)	769(26.9)	56(2.0)	1.45	8.5
	340	11.6	1.8	1365	2477	753(30.4)	369(14.9)	699(28.2)	609(24.6)	47(1.9)	1.62	—
	310	10.2	9.4	1251	3057	923(30.2)	544(17.8)	856(28.0)	633(20.7)	101(3.3)	1.25	48.7
	173	6.3	10.0	1810	2365	546(23.1)	362(15.3)	868(36.7)	539(22.8)	50(2.1)	0.98	—

\*Retic.: Reticulocytes



いわゆる hydrocytosis type である。第II型は、Na<sup>+</sup> influx が軽度亢進を示す群で、浸透圧抵抗試験、自己溶血試験は正常である。第III型は Na<sup>+</sup> influx が正常を示す群で、第IV型は Na<sup>+</sup> efflux が著明に亢進し赤血球内 Na はむしろ低下を示す群、第V型は病因不明のものである。以下に各々について述べる。

第I型では、もっとも大きな変化は膜 FC 量の増加である。総 PL 量はやや増加傾向を示す

もののほぼ正常であり、PL 分画でも PS+PI 分画が軽度の増加を示しているのみである。しかし、Na<sup>+</sup> influx は著明な亢進（正常対照の約10倍）を示し、この異常高値は他のどの膜疾患と比べても明白である。Ca<sup>2+</sup> uptake は3例の検索では、網赤血球増加の程度により一定の傾向を示していないが、一般的には軽度の亢進かと推定される。

第II型では、膜脂質、PL 分画ともに異常は

**Table 5.** Characteristics of clinical data, membrane lipids and membrane transport in hemolytic anemias due to unknown origins.

	Clinical Data			Membrane lipids $\mu\text{g}/10^{10}$ RBC						Membrane Transport		
	RBC $\times 10^4/\mu\text{l}$	Hb g/dl	Retic. %	FC	total PL	PE	PS+PI	PC	SM	L-PC (%)	Na <sup>+</sup> influx m moles/L RBC /hr	Ca <sup>2+</sup> uptake n moles/ml RBC /2hrs
Normal range	M480 $\pm$ 70 F420 $\pm$ 60	15.5 $\pm$ 2.0 13.0 $\pm$ 1.5	1.0 $\pm$ 0.5	1202 $\pm$ 103	2604 $\pm$ 241	806 (30.9) $\pm$ 86( $\pm$ 0.8)	366 (14.1) $\pm$ 38( $\pm$ 0.9)	733 (28.2) $\pm$ 64( $\pm$ 1.0)	663 (25.4) $\pm$ 73( $\pm$ 1.2)	39 (1.5) $\pm$ 11( $\pm$ 0.5)	1.29 $\pm$ 0.14	8.0 $\pm$ 2.0
hemolytic anemia due to unknown origin	560	5.5	10.0	1233	2619	827(31.6)	299(11.4)	780(29.8)	653(24.9)	60(2.3)	1.23	20.6
	182	6.6	7.8	3760	4244	1396(32.9)	730(17.2)	1430(33.7)	658(15.5)	30(0.7)	1.81	47.9
	225	7.3	2.9	1404	3120	889(28.5)	571(18.3)	861(27.6)	768(24.6)	31(1.0)	2.19	40.6
	312	9.6	3.0	1252	3271	932(28.5)	559(17.1)	880(26.7)	844(25.8)	56(1.7)	1.72	15.2
	269	9.4	14.4	1154	2424	688(28.4)	504(20.8)	640(26.4)	582(24.0)	10(0.4)	1.81	18.4
	340	10.8	3.5	1256	2614	727(27.8)	460(17.6)	677(25.9)	669(25.6)	81(3.1)	1.54	7.9
	363	11.1	1.5	1210	2806	845(30.1)	474(16.9)	791(28.2)	685(24.4)	11(0.4)	1.44	20.7
	415	11.7	0.7	1632	3761	1147(30.5)	583(15.5)	1045(27.8)	952(25.3)	34(0.9)	1.10	15.7
	459	14.8	1.3	1160	2580	769(29.8)	377(14.6)	717(27.8)	653(25.3)	64(2.5)	1.51	6.9
	228	7.8	4.1	1487	3052	848(27.8)	510(16.7)	882(28.9)	778(25.5)	34(1.1)	1.51	—
	279	8.9	2.2	1432	2913	865(29.7)	469(16.1)	851(29.2)	702(24.1)	36(0.9)	1.05	16.4
	316	8.9	4.2	1229	2369	673(28.4)	398(16.8)	682(28.8)	595(25.1)	21(0.9)	1.66	46.5
	242	9.3	29.8	2216	2881	746(25.9)	461(16.0)	960(33.3)	671(23.3)	43(1.5)	1.94	31.2
	358	11.9	16.0	1287	2505	686(27.4)	381(15.2)	754(30.1)	634(25.3)	50(2.0)	3.04	28.1
	175	7.4	15.5	1291	2628	773(29.4)	418(15.9)	744(28.3)	665(25.3)	28(1.1)	1.53	30.6
	251	9.3	6.0	1419	2995	913(30.5)	464(15.5)	698(23.3)	869(29.0)	51(1.7)	1.92	—
	210	7.2	1.5	1792	3255	960(29.5)	446(13.7)	937(28.8)	863(26.5)	49(1.5)	1.38	—
	150	8.1	3.5	1888	2829	662(23.4)	509(18.0)	911(32.2)	693(24.5)	54(1.9)	1.67	—
	254	7.4	7.8	1515	3063	928(30.3)	450(14.7)	769(25.1)	858(28.0)	58(1.9)	1.33	—
	206	6.7	2.4	1241	2979	897(30.1)	426(14.3)	923(31.0)	673(22.6)	60(2.0)	1.82	—
460	11.4	0.2	1159	2711	805(29.7)	415(15.3)	724(26.7)	724(26.7)	43(1.6)	1.66	—	
135	4.3	3.3	1300	3115	931(29.9)	458(14.7)	994(31.9)	692(22.2)	40(1.3)	1.58	—	
438	12.7	1.6	1192	3024	980(32.4)	426(14.1)	832(27.5)	750(24.8)	36(1.2)	1.42	—	
431	9.9	0.9	1103	2857	877(30.7)	360(12.6)	900(31.5)	677(23.7)	43(1.5)	1.46	—	
—	—	—	1037	2353	661(28.1)	332(14.1)	663(28.2)	696(29.6)	—	—	—	
—	—	—	1455	3219	921(28.6)	570(17.7)	843(26.2)	885(27.5)	—	1.58	—	
252	8.0	1.2	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
—	—	—	—	—	1246	2705	803(29.7)	413(15.3)	752(27.8)	735(27.2)	—	—
—	—	—	—	—	1317	2873	894(31.1)	468(16.3)	638(22.2)	873(30.4)	—	1.67
353	9.6	4.0	1152	2538	682(26.9)	409(16.1)	771(30.4)	640(25.2)	36(1.4)	2.04	24.0	
314	9.3	5.0	1123	2376	720(30.3)	411(17.3)	618(26.0)	537(22.6)	90(3.8)	2.66	35.0	
357	11.0	8.0	1126	2476	711(28.7)	433(17.5)	733(29.6)	562(22.7)	37(1.7)	1.71	23.2	
218	6.8	12.6	1468	3474	1046(30.1)	528(15.2)	907(26.1)	917(26.4)	76(2.2)	1.72	6.4	

\*Retic.: Reticulocytes

**Table 6.** Characteristics of clinical data, membrane lipids and membrane transport in normal control.

	Clinical Data			Membrane lipids $\mu\text{g}/10^6$ RBC							Membrane Transport	
	RBC $\times 10^7/\mu\text{l}$	Hb g/dl	Retic. %	FC	total PL	PE	PS+PI	PC	SM	L-PC ( )内%	Na <sup>+</sup> influx m moles/L RBC /hr	Ca <sup>2+</sup> uptake n moles/ml RBC /2hrs
Normal range	M480 $\pm$ 70 F420 $\pm$ 60	15.5 $\pm$ 2.0 13.0 $\pm$ 1.5	1.0 $\pm$ 0.5	1202 $\pm$ 103	2604 $\pm$ 241	806 (30.9) $\pm$ 86 ( $\pm$ 0.8)	366 (14.1) $\pm$ 38 ( $\pm$ 0.9)	733 (28.2) $\pm$ 64 ( $\pm$ 1.0)	663 (25.4) $\pm$ 73 ( $\pm$ 1.2)	39 (1.5) $\pm$ 11 ( $\pm$ 0.5)	1.29 $\pm$ 0.14	8.0 $\pm$ 2.0
Normal control	418	7.8	—	922	2180	735(33.7)	261(12.0)	593(27.2)	591(27.1)	—	1.73	—
	537	17.5	—	1194	2399	746(31.1)	348(14.5)	677(28.2)	629(26.2)	—	1.85	—
	436	12.7	—	1179	2516	775(30.8)	398(15.8)	684(27.2)	659(26.2)	—	1.46	—
	585	17.5	—	1085	2513	777(30.9)	392(15.6)	709(28.2)	636(25.3)	—	1.87	—
	521	14.4	—	1170	2488	776(31.2)	371(14.9)	699(28.1)	642(25.8)	—	1.43	—
	386	13.0	—	1176	2597	774(29.8)	410(15.8)	789(30.4)	623(24.0)	—	1.41	—
	—	—	—	1000	2241	681(30.4)	336(15.0)	659(29.4)	565(25.2)	—	1.53	—
	345	12.0	0.4	1217	2599	793(30.5)	377(14.5)	681(26.2)	702(27.0)	46(1.8)	1.72	—
	394	12.2	0.7	1234	2749	827(30.1)	445(16.2)	733(26.7)	717(26.1)	27(1.0)	1.27	—
	407	13.2	0.4	1253	2692	837(31.1)	385(14.3)	727(27.0)	697(25.9)	46(1.7)	1.21	—
	389	11.3	0.6	1174	2672	858(32.1)	377(14.1)	684(25.6)	713(26.7)	40(1.5)	1.17	—
	—	—	—	1242	2639	731(27.7)	438(16.6)	723(27.4)	686(26.0)	61(2.3)	1.35	9.8
				1154 $\pm$ 102	2524 $\pm$ 176	776 (30.8) $\pm$ 50 ( $\pm$ 1.4)	378 (14.9) $\pm$ 49 ( $\pm$ 1.2)	697 (27.6) $\pm$ 47 ( $\pm$ 1.3)	655 (26.0) $\pm$ 49 ( $\pm$ 0.9)	44 (1.7) $\pm$ 12 ( $\pm$ 0.5)	1.50 $\pm$ 0.24	

\*Retic.: Reticulocytes

認められず、ほぼ正常であり、Na<sup>+</sup> influx の亢進も軽度の範囲にとどまっている。Ca<sup>2+</sup> uptake は、亢進から低下まで一定の傾向を示していない。

第Ⅲ型の3例の検索では著変は認められず、膜脂質量およびPL分画には微差があるのみであった。Na<sup>+</sup> influx はほぼ正常であるようであるが、Ca<sup>2+</sup> uptake の明らかに亢進している症例が1例見出された。

第Ⅳ型では、著明なNa<sup>+</sup> efflux 亢進が存在するにもかかわらず、膜FC量・膜総PL量の軽度増加以外はほぼ正常であった。

第Ⅴ型では、膜FC量・膜総PL量は著増しており、各PL分画の絶対量はこれを反映して増加しているが、PE分画に相対的減少を認めた。膜輸送能では、Na<sup>+</sup> influx は軽度に亢進し、Ca<sup>2+</sup> uptake はほぼ正常と思われる。

これらと抗腫瘍剤である vincristine (VC) によって惹起された後天性有口赤血球症を比較してみると、また別の様態を呈している。すなわち、VC症例では、膜FC量は軽度増加しているが、膜総PL量、PL分画に関しては正常、膜輸送能では、Na<sup>+</sup> influx は軽度亢進傾向、

Ca<sup>2+</sup> uptake はほぼ正常であった。

なお、以上の特定の膜異常症以外の検索成績は **Table 5** にまとめて表示した。また対照として検索した正常人の成績を **Table 6** に表示した。

### (3) PLase A<sub>2</sub> 処理正常赤血球における膜脂質異常と膜機能について<sup>12)</sup>

正常赤血球膜PLを膜脂質分解酵素であるPLase A<sub>2</sub>にて処理し、膜PL分画の組成変化と、Na<sup>+</sup> influx, Ca<sup>2+</sup> uptake 各々との相関を、それぞれ **Figure 1**, **Figure 2** に示した。赤血球膜は、内層・外層の脂質二重層より成り、PCは主に外表面側に分布していることが知られている。PLase A<sub>2</sub>を赤血球膜に作用させると、このPCが修飾分解を受け、L-PCと脂肪酸となる。すなわち、赤血球膜上では、PCが減少しL-PCが増加することになる。この場合、L-PCはそのまま赤血球膜内にとどまり、総PL量は変化しない。しかし、このPLase A<sub>2</sub>処理赤血球に albumin 処理を加えると、PCから変換されたL-PCが赤血球膜内から除去され、したがって、赤血球膜上では、総PL

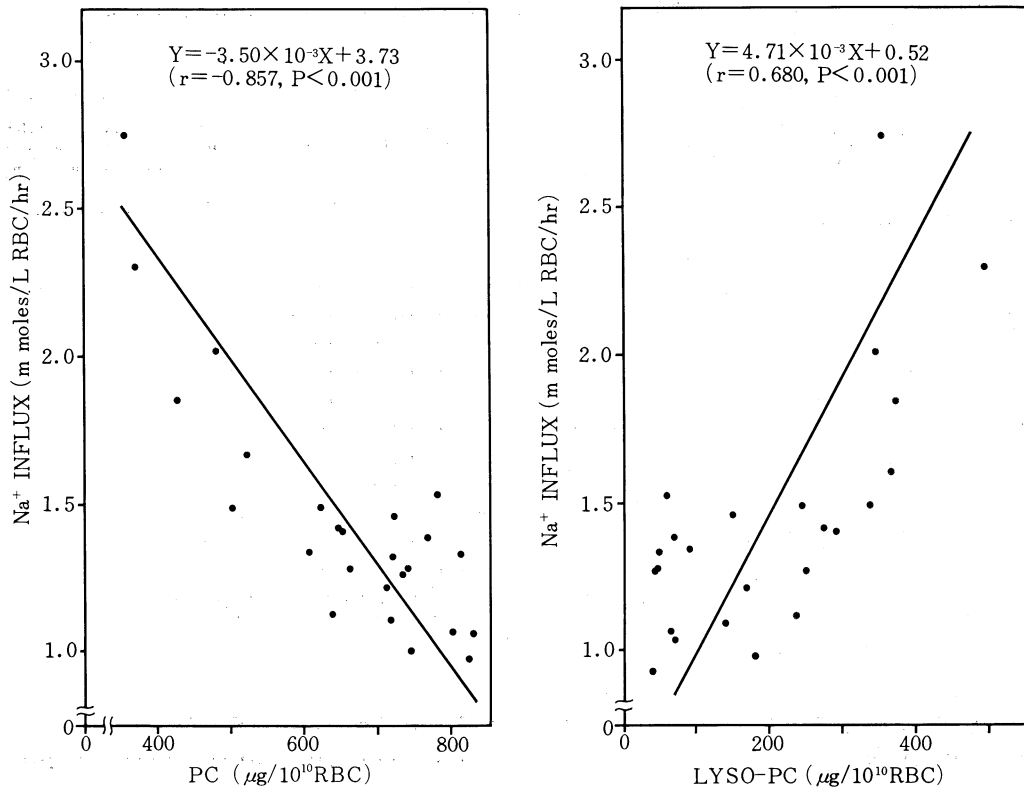


Fig. 1. Correlation between Na<sup>+</sup> influx and phosphatidyl choline or lyso-phosphatidyl choline content in normal red cells treated with phospholipase A<sub>2</sub>.

量・PC分画が減少した状態となる。このような膜脂質異常赤血球モデルにおいて、膜PC量あるいは膜L-PC量の変化と輸送能の変化との相関を検索することは、前述のような膜脂質組成に異常を来す疾患の病態を探る一助となるであろう。

そこで、まずNa<sup>+</sup> influxと膜PL量との相関をFigure 1でみると、PC量が減少するほど、Na<sup>+</sup> influxは亢進しており、負の相関を示している。また、生成したL-PC量の増加に応じて、Na<sup>+</sup> influxは亢進し、正の相関を示す。Figure 3は、PLase A<sub>2</sub>処理前赤血球、PLase A<sub>2</sub>処理後赤血球およびさらにalbumin処理を加えた赤血球のNa<sup>+</sup> influxを比較した成績である。処理前に比べ、PLase A<sub>2</sub>処理後では明らかにNa<sup>+</sup> influxは亢進を示しているが、PLase A<sub>2</sub>処理後は、albumin処理を行ったものもそうでないものもNa<sup>+</sup>

influxに著差は認められない。ここでNa<sup>+</sup> influx亢進の原因を考えると、まずPLase A<sub>2</sub>処理前と処理後のNa<sup>+</sup> influxの変化より、PCの減少あるいはL-PCの増加が関与していることは明らかである。次に、PLase A<sub>2</sub>処理後とそれにさらにalbumin処理を加えた場合とでは、Na<sup>+</sup> influxに著差を認めないことから、2通りの考え方ができる。すなわち、(1) PCの減少がNa<sup>+</sup> influx亢進の原因の主体である可能性、(2) L-PCの増加が主体と仮定した場合、albumin処理によってL-PCが減少すると亢進したNa<sup>+</sup> influxが改善されるはずであるが、この時、同時に膜表面上の総PL量も減少しており、この因子がNa<sup>+</sup> influxを亢進させる方向に働き、この両者によって相殺されるためにNa<sup>+</sup> influx値に変化が起らなかった可能性、である。しかし残念ながら、各分画に変化を生せず、しかも膜総PL量のみの

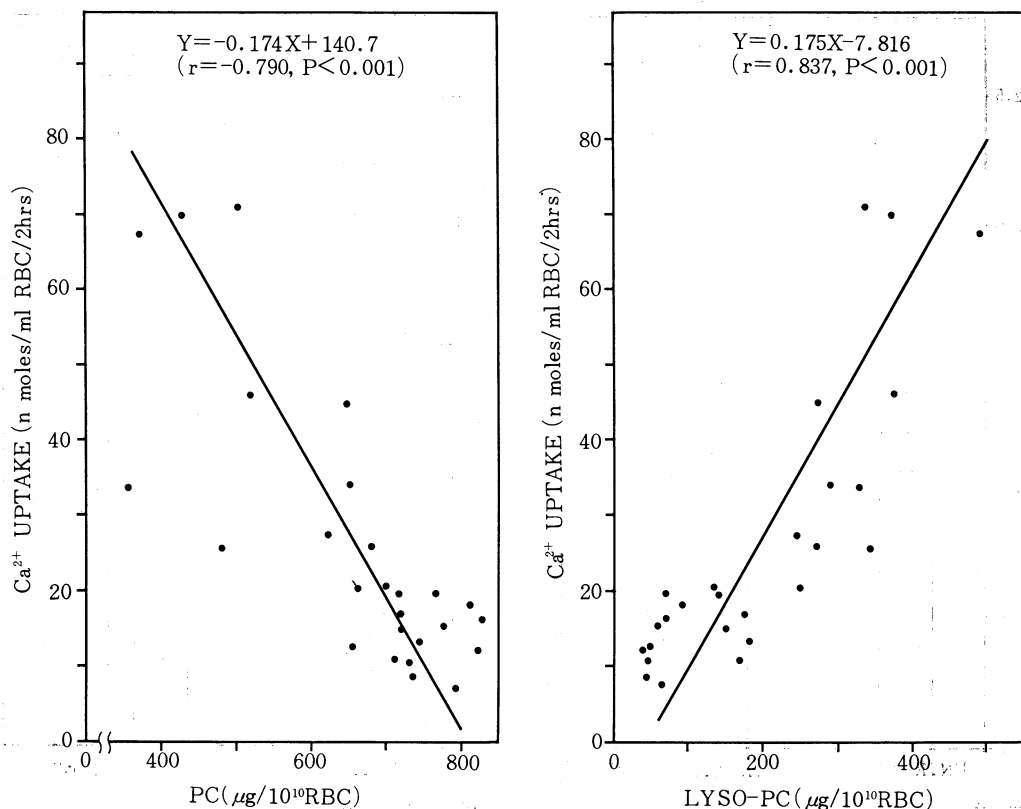


Fig. 2. Correlation between Ca<sup>2+</sup> uptake and phosphatidyl choline or lyso-phosphatidyl choline content in normal red cells treated with phospholipase A<sub>2</sub>.

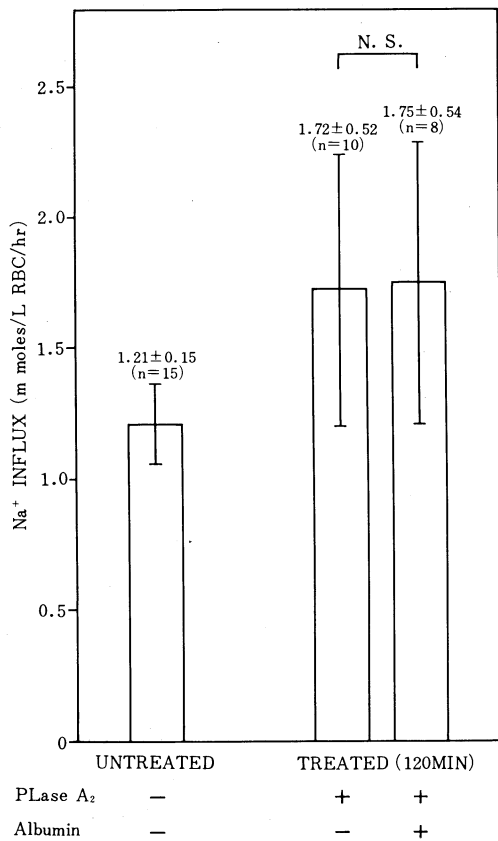
減少時の Na<sup>+</sup> influx の変化を推測するような疾患モデルはなく、PC の減少あるいは L-PC 増加のいずれが、より主要な因子であるかを特定するには至らなかった。

次に Figure 2 は、Figure 1 と同様に、膜脂質の変化と Ca<sup>2+</sup> uptake との相関を示したものであるが、Na<sup>+</sup> influx と脂質量との関係に類似した結果が得られた。すなわち、膜 PC の減少に逆相関して Ca<sup>2+</sup> uptake は亢進し、膜 L-PC の増加に相関して Ca<sup>2+</sup> uptake が亢進する。Figure 4 は、Figure 3 と同内容を Ca<sup>2+</sup> uptake について検索したものである。ここでは、処理前赤血球に比べ、PLase A<sub>2</sub> 処理赤血球では Ca<sup>2+</sup> uptake が亢進し、albumin 処理を加えると Ca<sup>2+</sup> uptake はさらに亢進している。この場合には、Ca<sup>2+</sup> uptake に最も関与する因子を探ることは困難である。また、Figure 3 と Figure 4 の情報より、膜輸送能

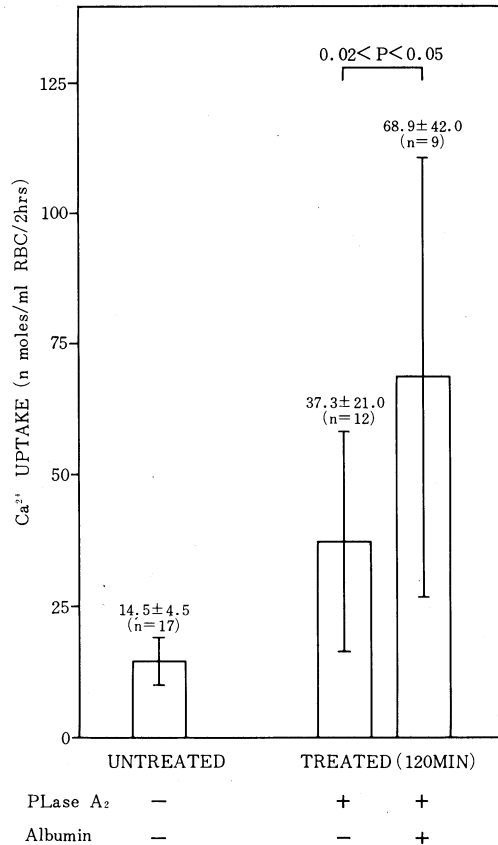
でも Na と Ca では別々の機構を持ち、必ずしも相関するものではないと言える。これは前述の疾患群の検索結果とも一致する所見である。

## 結 語

以上の検索を総合すると、①赤血球膜脂質異常症でも、膜蛋白異常症の場合と同様に、膜脂質異常を介して膜輸送能に異常を来すことが判明した。② PLase A<sub>2</sub> を用いた実験モデルから、膜脂質の特定の変化と膜輸送能とが密接な関係にあることは明白であった。③諸疾患群の検索成績および実験モデルによる成績の双方から、膜輸送能に関しては、Na と Ca とでは同一の膜脂質異常においても、その輸送機構上に明らかな相違が存在することが判明した。④ PC あるいは L-PC 以外の各 PL 分画と膜輸送能との関連の詳細は今後の課題である。



**Fig. 3.** Effect of addition of albumin on Na<sup>+</sup> influx in phospholipase A<sub>2</sub>-treated red cells.



**Fig. 4.** Effect of addition of albumin on Ca<sup>2+</sup> uptake in phospholipase A<sub>2</sub>-treated red cells.

### 謝 辞

御指導、御校閲を頂いた八幡義人教授に厚く感謝致します。

### 文 献

- Rose, H. G. and Oklander, M.: Improved procedure for the extraction of lipids from human erythrocytes. *J. Lipid Res.* 6: 428—431, 1965
- Richmond, W.: Preparation and properties of a cholesterol oxidase from *Nocardia* sp. and its application to the enzymatic assay of total cholesterol in serum. *Clin. Chem.* 19: 1350—1356, 1973
- Allain, C. C., Poon, L. S., Chan, C. S. G., Richmond, W. and Fu, P. C.: Enzymatic determination of total serum cholesterol. *Clin. Chem.* 20: 470—475, 1947
- Bartlett, G. R.: Phosphorus assay in column chromatography. *J. biol. Chem.* 234: 466—468, 1959
- Skipski, V. P., Peterson, R. F. and Barclay, M.: Quantitative analysis of phospholipids by thin-layer chromatography. *Biochem. J.* 90: 374—378, 1964
- Jacob, H. S. and Karnovski, 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
- 7) Ballentine, R. and Burford, D.D.: Determination of metals (Na, K, Mg, Ca, Mn, Fe, Co, Cu, Zn). *In Methods in enzymology*, Vol. 3, eds. by Colowick, S. P. and Kaplan, N. O. New York, Academic Press. 1960, pp. 1002—1035
  - 8) Lew, V. L.: On the ATP dependence of the  $\text{Ca}^{2+}$ -induced increase in K permeability observed in human red cells. *Biochim. biophys. Acta* 233:827—830, 1971
  - 9) Ferreira, H. G. and Lew, V. L.: Passive Ca transport and cytoplasmic Ca buffering in intact red cells. *In Membrane transport in red cells*, eds. by Ellory, J. C. and Lew, V. L. New York, Academic Press. 1974, pp. 53—91
  - 10) Martin, J. K., Luthra, M. G., Wells, M. A., Watts, R. P. and Hanahan, D. J.: Phospholipase  $\text{A}_2$  as a probe of phospholipid distribution in erythrocyte membranes. Factors influencing the apparent specificity of the reaction. *Biochemistry* 14:5400—5408, 1975
  - 11) Haest, C. W. M., Plasa, G. and Deuticke, B.: Selective removal of lipids from the outer membrane layer of human erythrocytes without hemolysis. Consequences for bilayer stability and cell shape. *Biochim. biophys. Acta* 649:701—708, 1981
  - 12) Hashimoto, M. and Yawata, Y.: The possible mechanism of increased sodium influx in red cells with abnormal membrane lipid induced by phospholipase  $\text{A}_2$ . *Am. J. Hematol.* in press, 1987