

わが国における赤血球膜異常症の病態

—臨床的, 電顕学的, 生化学的研究—

井上 孝文

溶血性貧血諸疾患143例を検索対象とし, 赤血球形態, 膜蛋白, 膜脂質, Na 輸送能などの項目につき解析した.

検索症例の中では遺伝性球形赤血球症 (HS) の頻度が最も高かった (55例; 38.5%).

HS と遺伝性楕円赤血球症 (HE) については, 検索前後の診断がよく一致していたが, 遺伝性有口赤血球症 (HSt.) に関しては診断不能例が多く, 末梢血塗抹標本による形態診断での限界を示唆しているものと思われた.

HS 55例の band 3 含有量の平均値は健常人と差はみられなかったが, 一部の症例で band 3 の含有量が低下 (正常の20~30%減) しており, 同時に band 4.2 の含有量も低下していた. Band 3 の含有量と総脂質量との間には明らかな相関は認められず, このことは band 3 含有量低下と膜脂質量低下が異なる機序によることを示唆していると思われた.

HE に関しては, 16例 (8家系) 中, 13例 (6家系) が band 4.1 部分欠損を伴っていた (家系でみると全 HE の75%). これらの症例では, band 4.1 の含有量は正常の約70%であり, 特に band 4.1a のみが減少していた. Band 4.1 部分欠損症例の臨床像, 生化学所見は比較的均一であった. (平成5年10月28日採用)

Red Cell Membrane Disorders in Japan

—Clinical, Electron Microscopic, and Biochemical Studies—

Takafumi Inoue

The pathogenesis of hemolytic disorders with red cell membrane abnormalities (143 cases) was studied in red cell morphology, membrane proteins, membrane lipids, and Na fluxes.

Hereditary spherocytosis (HS) was most frequent (55 cases; 38.5%), followed by hereditary elliptocytosis (HE), hereditary stomatocytosis (HSt.) and others.

Distinct subsets of HS with a decreased amount of band 3 (by 20~30% of the normal value) were found, although most of the HS patients demonstrated a normal amount of band 3. The amount of band 3 did not correlate significantly with the concentration of total red cell membrane lipids in HS patients. This suggests that the pathogenesis of band 3 deficiency may be different from that of the decreased

membrane lipids associated with membrane surface loss in these HS patients.

Band 4.1 was decreased in 13 cases of 16 HE patients (six out of nine families; 75%). The amount of band 4.1 with respect to band 4.2 was reduced to 70% of normal in the HE patients with a partial band 4.1 deficiency. The extent of the partial band 4.1 deficiency, clinical findings and biochemical features appear to be consistent in these patients with band 4.1 deficiency. (Accepted on October 28, 1993)

Kawasaki Igakkaishi 19(4) : 355-369, 1993

Key Words ① Red cell membrane abnormalities ② Band 3
③ Partial band 4.1 deficiency

はじめに

先天性溶血性貧血諸疾患の中で、赤血球膜異常症の占める重要性は極めて大きい。正確な頻度はいまなお不明であるが、厚生省特定疾患溶血性貧血調査研究班の成績によると、先天性溶血性疾患の約8割以上が赤血球膜異常症と推定されている。赤血球膜異常症は、その特徴ある赤血球形態異常を基盤として、遺伝性球状赤血球症(HS)、遺伝性楕円赤血球症(HE)、遺伝性有口赤血球症(HSt.)などと命名され、現時点においても臨床的にこれに準じた分類がなされている。また、一部の施設では、赤血球膜の詳細な分析が可能となっており、膜脂質の解析の結果から、遺伝性高赤血球膜ホスファチジルコリン溶血性貧血(HPCA)、また、膜蛋白の解析結果より、band 3異常症、band 4.2異常症などといった新しい疾患概念が生まれるに至っている。このことは、膜異常症を形態のみならず、より病因論的にとらえることが可能になったことを意味しており、さらにこれらの蛋白・脂質異常と従来の形態分類との間にいかなる相関がみられるのか、その関連性を調べることは非常に重要であり、現時点での必須の課題であると考えられている。

1974年以降、我々の教室では、他施設より検索依頼のあった赤血球膜異常症の疑われる症例について詳細に解析を行い、種々の膜蛋白異常症、膜脂質異常症を見い出してきた¹⁾。これらの疾患について関心を示す医療従事者も増え、特

に平成3年10月以降より現在にいたるまでの計23カ月間に、実に143例(90家系)の依頼検体につき検索を行ってきた。

そこで今回、それらの検索結果をもとに、(1) 紹介医の診断と当科における最終診断の一致しなかった例、あるいは紹介元で診断不能であった例についてはその疾患別の頻度をとらえ、またその原因を考察すること、(2) 膜疾患の中でも頻度が高く重要であると思われるHS、HEなどの膜病態の解析に主眼をおいた検討を行った。

検索対象

本学附属病院および他施設より検索依頼のあった溶血性疾患症例のうち、2カ月以内に輸血歴がなく、かつ重篤な合併症の存在しない90家系143例(ただし、患者家系調査で異常なしと判明した血縁者8家系13例を含む)を検索対象とした。

方法

基本的に、全症例について、末梢血赤血球形態、CBC、血清学的検査(間接ビリルビン、LDH、GOT、血清鉄、TIBC、血清脂質など)、膜脂質、膜蛋白、Na輸送能などの項目について検索を行い、紹介状に記載されている既往歴、家族歴、現病歴、治療内容とその経過なども参考にして、最終的な診断を行った。溶血の有無、程度の判定は血清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(3%以上)と、さらに典型的な臨床所見、経過を加味して行った。

1. 末梢血赤血球形態観察

末梢血赤血球形態の観察については、検体としてヘパリン加新鮮静脈血を使用し、1%グルタルアルデヒド加0.1Mリン酸buffer (pH 7.4)による固定標本を作製し、光顕および走査電顕的に観察した。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の基準²⁾に従って細胞形態の分類を行った。特にHSの症例については、通常の光顕の観察に加えて、**Figure 1**に示したcriteriaのもとに形態分類を行い、discocyte 1点, discostomatocyte 2点, stomatocyte 4点, stomatospherocyte 8点, spherocyte 16点, microspherocyte 32点のスコアリングシステムも採用し、無作為的に100個カウントした後、そのスコアの合計をspherocytic indexとして算出し、各種検討に用いた。

2. 膜蛋白分析

a) 赤血球膜ghostの調製

赤血球を4°Cの150 mM NaCl溶液で3回洗浄し、buffy coatを除去後、Dodgeらの方法³⁾に従い膜ghostを調製した。ただし、protease inhibitorとして溶血bufferに1 mM ethylene

diamine tetraacetic acid (EDTA) と0.2 mM phenylmethyl sulfonyl fluoride (PMSF)を加え、pH 8.0とし、4°Cにて溶血させ、膜ghostを調製した。膜ghostは後述のSDS-polyacrylamide gel電気泳動法(SDS-PAGE)を用いて、各膜蛋白の定量分析に使用した。

b) spectrinの抽出

膜ghostをlow ionic strength buffer (0.1 mM EDTA, 0.1 mM PMSF, 1 mM β -mercaptoethanol (β -ME), pH 8.0)で37°C, 30分間および4°C, 16時間孵置し、220000g, 40分, 4°Cで遠心後、上清をcrude spectrinとして回収した。

c) spectrin重合能の検討

37°C抽出spectrinの重合は、isotonic strength medium (5 mM NaPO₄, 150 mM NaCl, 0.1 mM EDTA, 0.1 mM PMSF, 1 mM β -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、4°C抽出spectrinのsampleとともに、Liuらのnon-denaturing gel電気泳動法⁴⁾を用い、検討した。

d) spectrinの各domainの検出

Lawlerらの方法⁵⁾もしくは、speicherらの方法⁶⁾に従って行った。37°C抽出spectrinを10

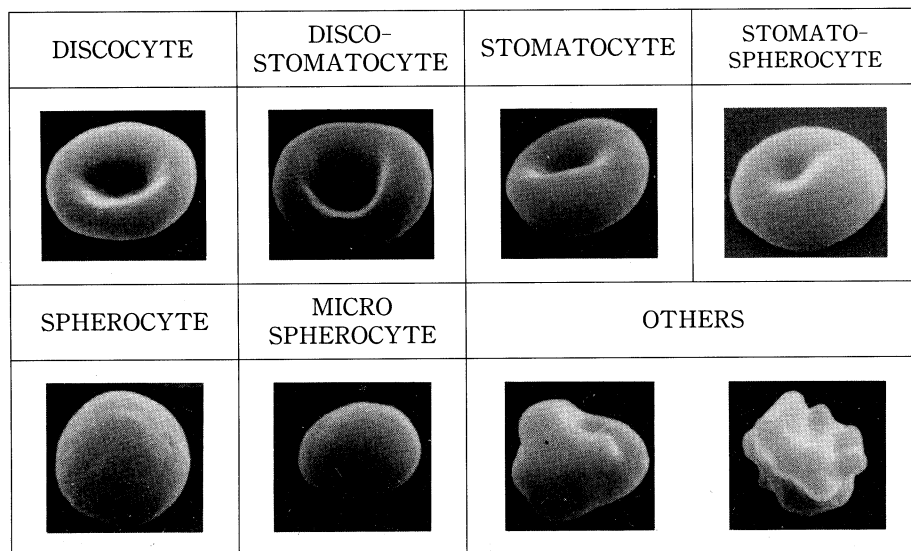


Fig. 1. Criteria for red cell morphology in hereditary spherocytosis examined by scanning electron microscopy.

mM NaPO₄, 40 mM NaCl, 1 mM β-ME, pH 8.0溶液にて 4°C, 16時間透析し, TPCK treated trypsin/substrate 比を 1/40 (wt/wt) に調整し, 4°C, 90分間孵置した. 反応停止には diisopropyl fluorophosphate (DFP) を最終濃度が 2 mM となるように加えた後, -70°C で凍結乾燥し, 電気泳動を行うまで -30°C で保存した.

e) SDS-polyacrylamide gel 電気泳動法 (SDS-PAGE)

Laemmli 法⁷⁾ (ghost の膜蛋白解析には 9.5% polyacrylamide gel, spectrin の domain 解析には 8 ~ 15% linear gradient polyacrylamide gel を使用) により, SDS-PAGE を施行し, coomassie brilliant blue R-250 にて染色後, Beckman DU-8 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⁸⁾ を用いた.

3. 赤血球膜輸送能の測定

赤血球をグルコース加リン酸 buffer (pH 7.4) で Ht 30% に調製し, ²²Na (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 mM 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 ²²Na の放射活性を γ-counter で測定した. また, 赤血球内 Na⁺ および K⁺ 濃度は, 焰光光度計を用いて波長 589 nm および 766.5 nm で測定した⁹⁾.

4. 赤血球膜脂質の分析

赤血球を用い, Rose らの方法¹⁰⁾ で膜脂質の抽出を施行した. 次に, phospholipids は Bartlett らの方法¹¹⁾ を用いて分析し, free cholesterol はネスコート FC キット-K にて測定した.

5. 各種赤血球膜異常症の診断および分類

各種膜疾患の診断は, 特に患者の赤血球形態を最も重要視し, 1) HS, 2) HE, 3) HSt., 4) acanthocytosis など従来 of 形態分類に従った. 次に患者の家族歴の有無, 現病歴, 既往歴などのプロフィールと当科での検索結果 (膜脂質, 膜蛋白, 膜輸送能) を参考に最終的な診断

を決定した.

HS とクームス陰性自己免疫性溶血性貧血との鑑別は極めて困難であるが, 患者の経過や家族歴を参考にしても診断がつかない場合は, 原因不明の溶血性疾患に分類した. また HS の散発例と考えられる症例では, 溶血を認めること, microspherocyte を認めること (5% 以上), 浸透圧抵抗減弱所見があること, Na 輸送能の亢進を認めること (influx 1.6 mmoles/1RBC/h 以上), 膜脂質の減少 (total membrane lipids 3500 μg/10¹⁰RBC 以下) のすべての項目を満たすものだけに HS の散発例との診断を下した.

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とし, かつ鉄欠乏性貧血などによる続発性症例を除外することとした. HE では, spectrin および band 4.1 に分子異常を認めることがしばしばあり, 今回は, band 4.1 部分欠損症を 13 例に認めたので, その欠損症の程度, band 4.1 a/band 4.1 b ratio などについて検討した. Band 4.1 部分欠損の表現型はすべて HE であり, 今回は band 4.1 欠損のある症例もない症例もまとめて HE として分類した.

Hst. はおそらく病因論的に heterogeneous な疾患群で, 診断が困難であるが, 今回は, 必ず家族歴があること, 末梢血中に discostomatocyte および stomatocyte が 20% 以上存在すること, microspherocyte が存在しないこと, 重大な合併症および服薬治療をしていないこと of すべてを満たすものについて診断を下した. HPCHA や band 4.2 異常症のように, 形態学的には stomatocytosis を示すものでも, 膜脂質, 膜蛋白分析で病因为判明した症例については, それぞれ, HPCHA, band 4.2 異常症に分類した. また, 今回は, hydrocytosis および xerocytosis をまとめて HSt. に分類している. March hemoglobinuria として送られてきた 2 例については, 形態学的には stomatocytosis であり, また家族歴を有するため, 今回は, HSt. として分類した.

Table 1. The frequency of various hemolytic disorders studied at Kawasaki Medical School during the last 23 months

検索対象：平成3年10月以降で、本学附属病院および他施設より検索依頼のあった溶血性疾患例143例(90家系)。ただし、患者家系調査で異常なしと判明した血縁者13例(8家系)を含む。

疾患別頻度(最終診断)

| | |
|---|-----------|
| 1. HS (Hereditary spherocytosis) | 55例(36家系) |
| 2. HE (Hereditary elliptocytosis) | 16例(8家系) |
| 3. HSt. (Hereditary stomatocytosis) | 13例(8家系)* |
| 4. HPCHA (Hereditary high red cell membrane phosphatidylcholine hemolytic anemia) | 10例(5家系) |
| 5. Band 4.2異常症 | 8例(5家系) |
| 6. その他 | |
| a. MDS (Myelodysplastic syndrome) | 5例(5家系) |
| b. Chorea-acanthocytosis | 3例(3家系) |
| c. 薬剤性溶血性貧血 | 2例(2家系) |
| d. 温式自己免疫性溶血性貧血 | 2例(2家系) |
| e. 発作性夜間血色素尿症 | 2例(2家系) |
| f. 原因不明の溶血性疾患 | 14例(14家系) |
| g. 患者家系内の健常者 | 13例(8家系) |

* March hemoglobinuria の2例(2家系)を含む。

結 果

1. 疾患別頻度(最終診断)

検索症例の疾患別頻度を **Table 1** に示した。検索依頼検体の中では、HS が最も頻度が高く、55例(36家系)；38.5%，次いで HE (band 4.1 部分欠損症を含む) 16例(8家系)；11.2%，HSt. 13例(8家系)；9.1%，HPCHA 10例(5家系)；7.0%，band 4.2異常症 8例(5家系)；5.6%となっている。その他の疾患として頻度は少ないが MDS 5例(5家系)；3.5%，Chorea-acanthocytosis 3例(3家系)；2.1%，薬剤性溶血性貧血 2例(2家系)；1.4%，温式自己免疫性溶血性貧血 2例(2家系)；1.4%，発作性夜間血色素尿症 2例(2家系)；1.4%，また、検索後も診断のつかなかつた原因不明の溶血性疾患が14例(14家系)；9.8%，患者の家系調査の結果、健常者であることが判明したのが13例(8家系)；9.1%であった。

2. 検索前後における診断の比較

他施設での診断と当科における検索後の診断の比較を **Table 2** に示した。

まず、HS および HS の疑いとして紹介されてきたのは、全部で65例であり、そのうち最終診断も HS であったものは55例であった。残りの10例のうち、一般に HS との鑑別が問題となる HSt. が4例、また、当科の検索結果が直接診断に結びついたところの HPCHA が1例、band 4.2異常症が2例認められた。

次に、HE はその特徴ある赤血球形態から診断は比較的容易であると考えられるが、実際に16例全例が、各施設で正確な診断が下されている。HE は膜蛋白異常(特に band 4.1 異常症、spectrin 異常症など)が高率に発見されている症候群であり、したがって検体が送られてくる目的としては、診断確定のためではなく、むしろ何らかの分子異常が見つかることを期待しているものが多い。

原因不明の溶血性貧血として送られてきた25

Table 2. Accurate diagnosis after biochemical and biophysical investigations in our laboratory on various hemolytic disorders

| 他施設での診断 | | 当科における検索後の診断 | |
|--|----------|--------------------------------|------|
| ① HS および HS (疑) (Hereditary spherocytosis) | 65 例 — ① | 1. HS | 55 例 |
| | | 2. HSt. | 4 例 |
| | | 3. HPCHA | 1 例 |
| | | 4. Band 4.2 異常症 | 2 例 |
| | | 5. その他 | |
| | | a. MDS | 1 例 |
| | | b. 発作性夜間血色素尿症 | 1 例 |
| | | c. 温式自己免疫性溶血性貧血 | 1 例 |
| ② HE (Hereditary elliptocytosis) | 16 例 — ② | HE | 16 例 |
| ③ HSt. (Hereditary stomatocytosis) | 1 例 — ③ | HSt. | 1 例 |
| ④ HPCHA (Hereditary high red cell membrane phosphatidylcholine hemolytic anemia) | 0 例 | | |
| ⑤ Band 4.2 異常症 | 3 例 — ⑤ | Band 4.2 異常症 | 3 例 |
| ⑥ その他 | | ⑥ その他 | |
| 1. MDS (Myelodysplastic syndrome) | 4 例 | 1. MDS | 4 例 |
| 2. March hemoglobinuria | 2 例 | 2. March hemoglobinuria (HSt.) | 2 例 |
| 3. Chorea-acanthocytosis | 3 例 | 3. Chorea-acanthocytosis | 3 例 |
| 4. 薬剤性溶血性貧血 | 2 例 | 4. 薬剤性溶血性貧血 | 2 例 |
| 5. 温式自己免疫性溶血性貧血 | 1 例 | 5. 温式自己免疫性溶血性貧血 | 1 例 |
| 6. 膜脂質異常症 (疑) | 1 例 | 6. HPCHA | 1 例 |
| 7. 原因不明の溶血性貧血 | 25 例 | 7. a. HPCHA | 6 例 |
| | | b. HSt. | 3 例 |
| | | c. Band 4.2 異常症 | 1 例 |
| | | d. 発作性夜間血色素尿症 | 1 例 |
| | | e. 原因不明の溶血性貧血 | 14 例 |
| 8. 家系調査として送られてきたもの | 20 例 | 8. a. HSt. | 3 例 |
| | | b. HPCHA | 2 例 |
| | | c. Band 4.2 異常症 | 2 例 |
| | | d. 家系内の健常者 | 13 例 |

症例については、最終的に何らかの診断が可能であったものが11例(HPCHA 6例, HSt. 3例, band 4.2異常症 1例, 発作性夜間血色素尿症 1例)で、残りの14例については、検索後も診断が確定できず、原因不明の溶血性貧血として分類した。

項目⑥-8“家系調査として送られてきたもの”というのは、ある家系の発端者に何らかの赤血球膜疾患(特に分子異常症)を認めた場合、その血縁者についても同様の検索を行うために、当科の方より依頼して送られてきた検体のことである。家系調査により、診断をさらに確実にすること、あるいはある未知の分子異常症の遺伝形式を調べることが主な目的である。

そこで、検索後の診断を疾患別に分類し、各疾患別の検索前診断について検討したものを**Table 3**に示す。HSとHEに関しては、検索前後の診断がよく一致しており、特に問題はない。一方、HSt.に関しては、検索前に正確に診断されていたものは1例に過ぎず、むしろHSと診断されていた症例の方が多い。行軍血色素尿症の2例(2家系)については、運動後のヘモグロビン尿の既往が明らかであったが、赤血球形態から見ると stomatocytosis (xerocytosis) に一致するものと考えられた。家系調査によって、血縁者にも同様の赤血球形態異常を示す例が認められたことから、当科における最終診断は Hst. とした。患者の臨床症状に注目すれば行軍血色素

Table 3. Comparison of diagnosis before and after investigation in our laboratory

| 当科における検索後の診断 | | 他施設での診断 | |
|--|------|---------|--|
| ① HS (Hereditary spherocytosis) | 55 例 | ① | 1. HS 44 例 2. HS (疑) 11 例 |
| ② HE (Hereditary elliptocytosis) | 16 例 | ② | HE 16 例 |
| ③ HSt. (Hereditary stomatocytosis) | 13 例 | ③ | 1. HSt. 1 例 2. HS 4 例 3. その他 a. 原因不明の溶血性疾患 3 例 b. 行軍血色素尿症 2 例 c. 家系調査において判明 3 例 |
| ④ HPCHA (Hereditary high red cell membrane phosphatidylcholine hemolytic anemia) | 10 例 | ④ | 1. HPCHA 0 例 2. 膜脂質異常症 (疑) 1 例 3. HS 1 例 4. その他 a. 原因不明の溶血性疾患 6 例 b. 家系調査において判明 2 例 |
| ⑤ Band 4.2 異常症 | 8 例 | ⑤ | 1. Band 4.2 異常症 3 例 2. HS 2 例 3. その他 a. 原因不明の溶血性疾患 1 例 b. 家系調査において判明 2 例 |
| ⑥ その他 (MDS など) | 14 例 | ⑥ | 1. HS 3 例 2. その他 (MDS など) 11 例 |
| ⑦ 原因不明の溶血性疾患 | 14 例 | ⑦ | 原因不明の溶血性疾患 14 例 |

*家系内の健常者13例は含まない。

素尿症の診断に間違いはなく、誤診例というわけではない。

HPCHA に関しては、診断の際、赤血球膜脂質分析が必須であるので、検索前に診断された症例はなく、原因不明の溶血性貧血として送られてきた症例が多かった。

band 4.2 異常症は、わが国にはほぼ特有と考えられている症例群¹²⁾で、近年、医療関係者のあいだでも認識が高まりつつある。実際、紹介施設で独自に膜蛋白分析を行い、band 4.2 異常症と診断されて送られてきた症例が3例もあった。

3. 疾患別に見た検査所見、膜輸送能、膜脂質分析の比較

各種赤血球膜異常症の疾患別検査所見を Table 4、膜輸送能および膜脂質分析結果を Table 5 に示した。

従来の報告に一致して、HE、HSt. では溶血所見が比較的軽微であり、特に HE では16例中

2例にしか明らかな溶血所見を認めなかった。Na 輸送能の亢進は、一般的に HS や HSt. で良く知られている所見であり、今回の検索においても HE を除いた主要膜疾患の大部分で Na 輸送能の亢進が認められた。したがって、Na 輸送能亢進所見は、疾患特異性にやや欠けるものの、患者が膜疾患であるか否かを考える場合の一つの重要な要素であり、特に今回の検索に関して言えば、患者家系内の健常人の識別の際に重要な役割を果たしたといえる。

また、膜脂質の検索結果に関しては、従来の報告どおり HS において総膜脂質量の減少が認められた症例が多かった。一方、HS との鑑別が問題となる HSt. では、膜脂質量の減少している症例はむしろ少なく、両者の鑑別の際、一つの指標になると考えられた。

HPCHA に関しては、膜脂質分析の結果が直接に診断につながるため、必須の検査であるが、

Table 4. Hematological and biochemical features in various red cell membrane disorders

| | Age (year) | Sex : male, female | RBC ($\times 10^6/\mu\text{l}$) | Hb (g/dl) | Ht (%) | MCV (fl) | MCH (pg) | MCHC (%) | Reticulocytes (%) | Indirect bilirubin (mg/dl) |
|--------------------------|------------|--------------------|-----------------------------------|-----------|-----------|------------|-----------|-----------|-------------------|----------------------------|
| HS (n=55) | 17 | 29 | 3.34 | 10.2 | 29.1 | 86.9 | 30.5 | 35.4 | 8.3 | 1.6 |
| | ± 16 | 26 | ± 0.95 | ± 3.2 | ± 9.0 | ± 8.2 | ± 3.3 | ± 2.5 | ± 6.1 | ± 1.5 |
| HE (n=16) | 19 | 9 | 4.12 | 12.0 | 35.9 | 87.6 | 29.2 | 33.3 | 2.7 | 0.5 |
| | ± 17 | 7 | ± 1.02 | ± 3.0 | ± 8.7 | ± 3.9 | ± 1.9 | ± 1.9 | ± 1.6 | ± 0.5 |
| HSt (n=13) | 24 | 5 | 3.62 | 10.9 | 32.2 | 88.8 | 30.5 | 34.3 | 4.2 | 1.1 |
| | ± 12 | 8 | ± 0.77 | ± 2.5 | ± 7.3 | ± 7.0 | ± 3.3 | ± 1.5 | ± 3.6 | ± 1.3 |
| HPCHA (n=10) | 31 | 7 | 3.52 | 12.4 | 36.6 | 104.5 | 35.7 | 34.2 | 16.2 | 3.3 |
| | ± 13 | 3 | ± 0.57 | ± 2.0 | ± 4.5 | ± 11.0 | ± 5.5 | ± 3.7 | ± 10.9 | ± 2.7 |
| Band 4.2 anomalies (n=8) | 37 | 2 | 3.46 | 11.7 | 32.4 | 93.9 | 33.7 | 36.3 | 13.7 | 0.8 |
| | ± 15 | 6 | ± 0.76 | ± 2.8 | ± 7.0 | ± 5.4 | ± 2.1 | ± 2.4 | ± 11.2 | ± 0.3 |
| Others (n=28) | 39 | 15 | 3.08 | 9.6 | 29.4 | 96.6 | 32.3 | 33.3 | 8.2 | 0.7 |
| | ± 24 | 13 | ± 0.98 | ± 2.8 | ± 7.8 | ± 12.4 | ± 5.1 | ± 2.9 | ± 7.4 | ± 0.8 |
| Normal (n=30) | | | ± 5.50 | 15.5 | 47.0 | | | | | |
| | | | ± 1.00 | ± 2.5 | ± 7.0 | 86.0 | 29.5 | 32.5 | 1.0 | 0.2 |
| | | | ± 4.80 | 14.0 | 42.0 | ± 10.0 | ± 2.5 | ± 2.5 | ± 0.5 | ± 0.2 |
| | | | ± 1.00 | ± 2.5 | ± 5.0 | | | | | |

Abbreviation HS : Hereditary spherocytosis, HE : Hereditary elliptocytosis, HSt : Hereditary stomatocytosis. HPCHA : Hereditary high red cell membrane phosphatidylcholine hemolytic anemia

Table 5. Sodium transport and membrane lipid composition in red cells of various red cell membrane disorders, compared to those in normal subjects

| | Na influx (m moles/1 RBC/h) | Na efflux (m moles/1 RBC/h) | [Na] RBC (mM) | [K] RBC (mM) | Membrane lipids ($\mu\text{g}/10^{10}$ RBC) | | Membrane phospholipid composition ($\mu\text{g}/10^{10}$ RBC) | | | | |
|--------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-------------------|--------------------|--|-------------------|--|------------------|------------------|------------------|----------------|
| | | | | | FC | Total PL | PE | PS+PI | PC | SM | L-PC |
| HS (n=55) | 2.13 ± 0.71 | 4.12 ± 1.72 | 17.3 ± 6.7 | 74.5 ± 10.3 | 1073 ± 161 | 2295 ± 363 | 660 ± 100 | 352 ± 55 | 606 ± 104 | 578 ± 91 | 69 ± 18 |
| HE (n=16) | 1.25 ± 0.18 | 3.38 ± 0.57 | 17.0 ± 3.3 | 79.7 ± 7.4 | 1123 ± 61 | 2259 ± 156 | 655 ± 56 | 372 ± 30 | 571 ± 46 | 589 ± 33 | 72 ± 15 |
| HSt (n=13) | 1.95 ± 0.69 | 5.45 ± 2.31 | 26.3 ± 5.7 | 75.2 ± 13.0 | 1291 ± 318 | 2514 ± 319 | 709 ± 70 | 421 ± 55 | 684 ± 117 | 621 ± 82 | 79 ± 15 |
| HPCHA (n=10) | 2.94 ± 0.72 | 8.05 ± 1.68 | 22.3 ± 3.5 | 67.1 ± 4.8 | 1454 ± 184 | 2921 ± 272 | 742 ± 161 | 429 ± 107 | 931 ± 71 | 734 ± 99 | 85 ± 38 |
| Band 4.2 anomalies (n=8) | 2.33 ± 0.85 | 3.61 ± 0.23 | 8.9 ± 0.4 | 83.2 ± 0.4 | 1306 ± 291 | 2774 ± 507 | 773 ± 114 | 448 ± 73 | 780 ± 209 | 669 ± 101 | 84 ± 27 |
| Others (n=28) | 1.78 ± 0.65 | 5.02 ± 3.51 | 16.3 ± 5.8 | 84.7 ± 9.5 | 1259 ± 130 | 2435 ± 377 | 708 ± 88 | 411 ± 41 | 658 ± 83 | 633 ± 74 | 80 ± 13 |
| Normal (n=30) | 1.29 ± 0.14 | 2.40 ± 0.50 | 10.0 ± 3.0 | 90.0 ± 5.0 | 1202 ± 103 | 2604 ± 241 | 806 ± 86 | 366 ± 38 | 733 ± 64 | 663 ± 73 | 39 ± 11 |

Abbreviation FC : free cholesterol, PL : phospholipids, PE : phosphatidylethanolamine, PS : phosphatidylserine, PI : phosphatidylinositol, PC : phosphatidylcholine, SM : sphingomyelin, L-PC : Lyso-phosphatidylcholine

Table 6 (A). The contents of band 3 and band 4.2 in HS patients compared to those in normal subjects

(A)

| | Band 3/Band 5 (ratio) | Band 3/TMP (%) | Band 4.2/Band 5 (ratio) | Band 4.2/TMP (%) |
|------------------|--------------------------|-------------------|----------------------------|---------------------|
| Normal (n=30) | 4.66±0.86 | 30.45±2.36 | 0.80±0.14 | 5.43±0.65 |
| HS (n=55) | 4.60±1.07 | 30.36±4.73 | 0.79±0.20 | 5.27±1.10 |

Abbreviation TMP : Total membrane proteins

Table 6 (B). The values of the amount of band 4.2 with respect to band 5, the concentration of total membrane lipids, and spherocytic index in HS patients

(B)

| | Band 4.2/Band 5 (ratio) | Total membrane lipids ($\mu\text{g}/10^{10}$ RBC) | Spherocytic index |
|--|----------------------------|---|-------------------|
| Band 3/Band 5 < 3.53 (n=7) a | 0.67±0.01 | 3367±371 | 617±77 |
| 3.53 ≤ Band 3/Band 5 ≤ 5.67 (n=41) b | 0.77±0.03 | 3318±497 | 644±128 |
| Band 3/Band 5 > 5.67 (n=7) c | 1.06±0.03 | 3379±563 | 573±120 |

Statistical significance between two groups as shown above (P values)

| | | | |
|---|--------|-------|-------|
| a | N. S. | N. S. | N. S. |
| b | <0.001 | N. S. | N. S. |
| c | <0.01 | N. S. | N. S. |

These HS patients were classified into three groups based on the relative content of band 3 (a ratio of band 3 to band 5).

今回の検索では、HPCHAにおける赤血球膜PC (phosphatidylcholine) は $931 \pm 71 \mu\text{g}/10^{10}$ RBC (PC/total phospholipids = $31.8 \pm 2.5\%$) であり、正常 ($733 \pm 64 \mu\text{g}/10^{10}$ RBC (PC/total phospholipids = $28.2 \pm 1.0\%$)) に比べて明らかに高値を示した。

4. HSにおけるband 3, band 4.2含有量の検討および赤血球形態, 膜脂質量との関係

HSにおける膜蛋白band 3およびband 4.2の含有量について検索した結果をTable 6 (A) に示した。

Band 3およびband 4.2のtotal membrane

proteinsあるいはband 5に対する比率は、mass処理を行う限りnormal controlと全HS症例の間でほとんど差が認められなかった。しかし、今回検索し得たHS 55症例の中には、明らかにband 3含有量の低下(正常に比し約20~30%減)を示す症例が7例含まれており、そこでband 3の含有量別に、HS症例を3群に分類し、各々のband 4.2含有量、総膜脂質量、spherocytic index(形態)との関連性について検討した。その結果をTable 6(B)に示す。全HS症例におけるband 3/band 5 ratioは 4.60 ± 1.07 (n=55) であるが、band 3/band 5

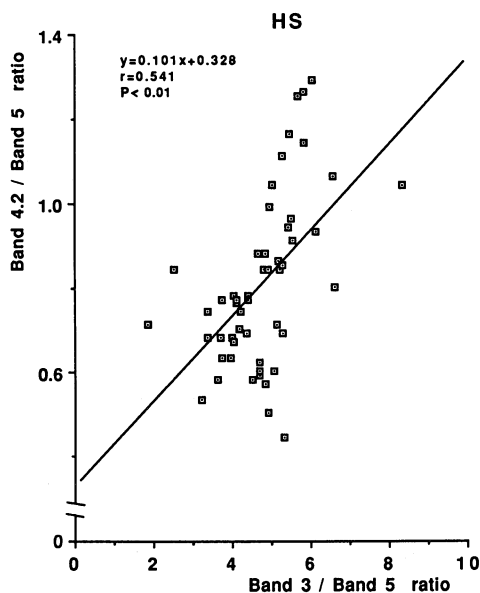


Fig. 2. Relationship between the ratio of band 4.2 to band 5 and the ratio of band 3 to band 5 in HS patients

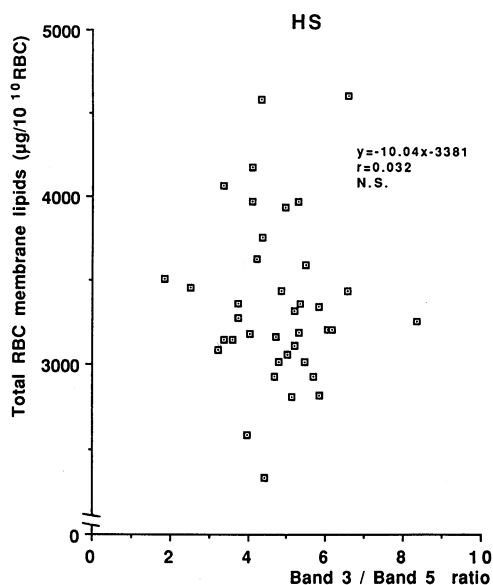


Fig. 4. Relationship between total red cell membrane lipids and the ratio of band 3 to band 5 in HS patients

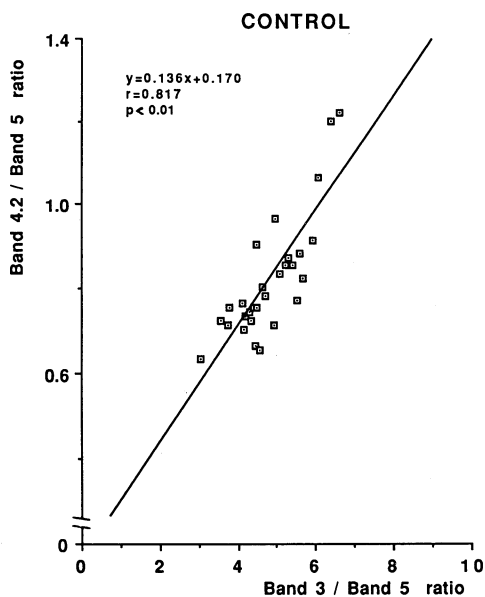


Fig. 3. Relationship between the ratio of band 4.2 to band 5 and the ratio of band 3 to band 5 in normal subjects

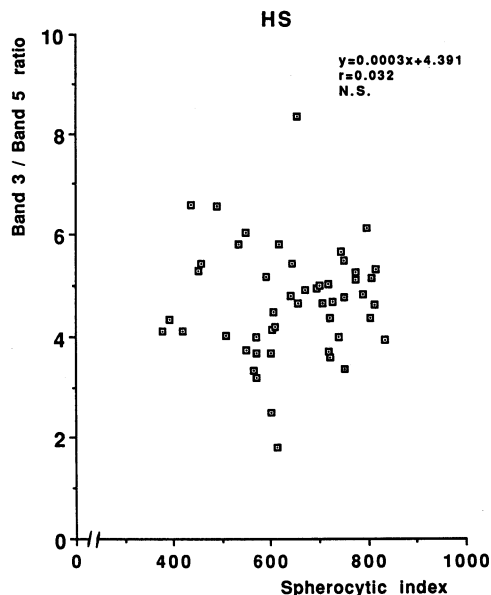


Fig. 5. Relationship between the ratio of band 3 to band 5 and spherocytic index in HS patients

ratio が① $\text{mean} \pm \text{SD}$ より小さい群 (band 3 / band 5 < 3.53 ($n=7$)), ② $\text{mean} \pm \text{SD}$ の範囲内の群 ($3.53 \leq \text{band 3 / band 5} \leq 5.67$ ($n=41$)), ③ $\text{mean} \pm \text{SD}$ より大きい群 (band 3 / band 5 $>$

5.67 ($n=7$)) の 3 群に分類した. Band 3 の含有量と総膜脂質量あるいは spherocytic index との間には, 特に関連性は認められなかったが, band 4.2 / band 5 ratio に関しては, band 3 含

有量の少ない症例ほど小さい傾向がみられた。さらにそのことを相関図にプロットしたものが **Figure 2** で、band 3 含有量と band 4.2 含有量の相関係数は $r=0.541$ ($p<0.01$) であった。同

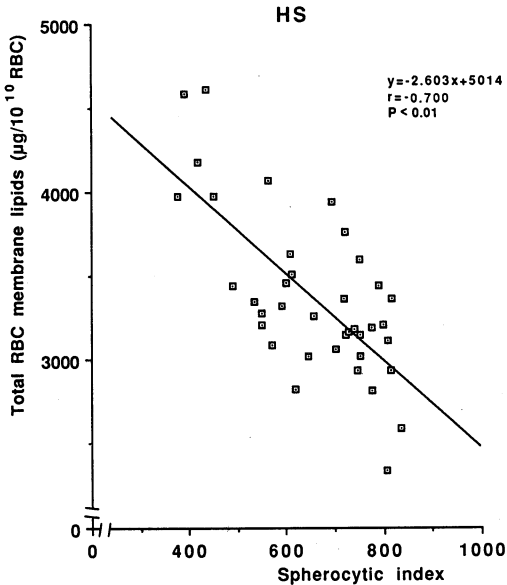


Fig. 6. Relationship between total red cell membrane lipids and spherocytic index in HS patients

様の検討を健常人30例について行ったものが **Figure 3** であるが、やはり同様の相関がみられた ($r=0.817$, $p<0.01$)。また、HS 症例における band 3 含有量と総膜脂質および band 3 含有量と spherocytic index の関連性をみたものが **Figure 4**, **Figure 5** であるが、いずれも明らかな相関は認められなかった ($r=0.032$, NS)。ただし、**Figure 6** に示すように、総膜脂質量と spherocytic index との間には相関が認められ ($r=-0.700$, $p<0.01$)、形態変化の明らかな症例ほど、総膜脂質量が低い傾向がみられた。

5. HE における spectrin, band 4.1 含有量および band 4.1a/band 4.1b ratio の検討

今回検索し得た HE 症例は 8 家系 16 例であるが、そのうち、band 4.1 の部分欠損を伴っている症例は 6 家系 13 例と高率に認められた (家系でみると全 HE の 75%)。また、残りの 2 家系 3 症例については、band 4.1 および spectrin 含有量の低下が認められず、また患者赤血球膜より抽出した spectrin dimer の重合能および trypsin 処理後の peptide mapping (domain 解析) でも明らかな異常を見い出せなかった症例

Table 7. The contents of spectrin+ankyrin and band 4.1 in HE patients with or without partial band 4.1 deficiency, compared to those in normal subjects

| | Sp.+Ank./Band 5 (ratio) | Sp.+Ank./TMP (%) | Band 4.1/Band 5 (ratio) | Band 4.1/TMP (%) |
|--|-------------------------|------------------|-------------------------|------------------|
| Normal (n=30) | 6.60±1.54 | 44.04±3.76 | 0.96±0.18 | 6.38±0.87 |
| HE total (n=16) | 6.77±1.48 | 46.52±5.84 | 0.72±0.20 | 4.92±0.98 |
| HE with partial band 4.1 deficiency (n=13) | 6.39±1.03 | 45.73±5.61 | 0.65±0.16 | 4.64±0.87 |
| He with normal amount of band 4.1 (n=3) | 8.34±2.46 | 49.95±6.72 | 0.99±0.14 | 6.10±0.28 |

Statistical significance between two groups as shown above (P values)

| | | | | |
|---|-------|-------|--------|--------|
| a | N. S. | N. S. | <0.001 | <0.01 |
| b | N. S. | N. S. | <0.01 | <0.01 |
| c | N. S. | N. S. | N. S. | N. S. |
| d | N. S. | N. S. | <0.05 | <0.001 |

Abbreviation Sp.: Spectrin, Ank.: Ankyrin, TMP: Total membrane proteins

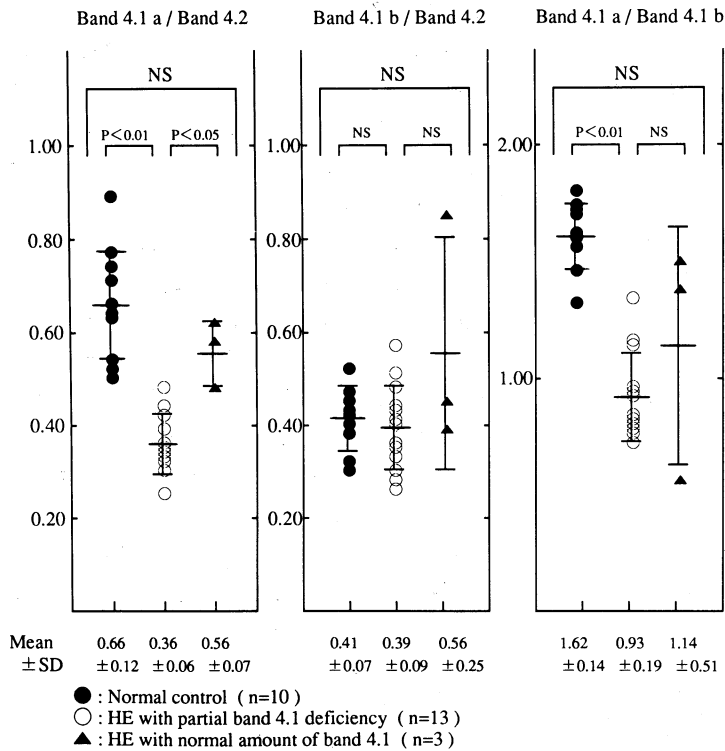


Fig. 7. The values of the amount of band 4.1 a, band 4.1 b, and the ratio of band 4.1 a to band 4.1 b in hereditary elliptocytosis with or without partial band 4.1 deficiency, compared to those in normal subjects

である。band 4.1 部分欠損症例と欠損のない症例について、spectrin+ankyrin 含有量および band 4.1 含有量の比較したものを Table 7 に示した。spectrin+ankyrin 含有量については、band 4.1 非欠損症例でやや高い傾向がみられたが、統計学的に有意差は認められなかった。また band 4.1 の含有量については、band 4.1 部分欠損症例において、band 4.1/band 5 ratio が 0.65 ± 0.16 (正常の68%の含有量)、また band 4.1/total membrane proteins が $4.64 \pm 0.87\%$ (正常の73%の含有量) であり、健常人の band 4.1 含有量と比べて、約30%の欠損であることが判明した。また band 4.1 は、SDS-PAGE で2本の isoforms (band 4.1a: 分子量 8.0万, band 4.1b: 分子量 7.8万) が認められるが、band 4.1 部分欠損症例における、各々の含有量について検討したものを Figure 7 に示した。

各々の含有量を band 4.2 に対する比で表わすと、band 4.1 部分欠損症例では、特に band 4.1a のみが減少しており、その結果、band 4.1a/band 4.1b ratio が正常の 1.62 ± 0.14 に比べ 0.93 ± 0.19 と低下していた ($p < 0.01$)。

考 察

わが国の先天性溶血性貧血の中で最も頻度の高い赤血球膜異常症の研究は、各病型の phenotype の検索から、遺伝子レベルにおける病因解析へと移りつつある。しかし、ある疾患の遺伝子変異が判明したとしても、その溶血機序や赤血球形態異常のすべてが説明できるわけではなく、臨床的な立場からみると、むしろ phenotype

の検索が不可欠であり、また、phenotype からみた疾患概念や疾患分類が明確でないと、今後の genotype の解析が期待できない。たとえば、赤血球膜異常症の中で遺伝性有口赤血球症 (HSt.) の研究¹³⁾ は、ある意味で最も遅れていると思われるが、その理由は本症が heterogeneous な症候群で、病因も多岐にわたっていると考えられるため、遺伝子解析をしようにも目的が絞れないところにあると考えられる。換言すれば、phenotype からみた疾患の定義づけ、あるいは分類が不十分であるため、その診断すら困難であるのが現状である。実際、今回の検索では最終的に13例の HSt. を経験しているが、紹介施設で正確な診断が下されていたものは1例にすぎなかった。また、HPCHA や band 4.2 異常症などもその赤血球形態に注目すれば広義の stomatocytosis であるが、stomatocytosis と診

断されていたものは1例もなかった。

依頼検体の多くは、診断を明らかにする目的のものであるので、診断率が低いことは予測できるが、むしろ問題となるのは誤診例であろう。特に目立つのが、HSt. を HS と診断されている場合である。この両疾患は非常に類似点が多く、一般検査レベルでは鑑別が困難であることが少なくない。有口赤血球 (stomatocyte) とは、正常の赤血球 (discocyte) から、赤血球のある意味での最終像ともいえる球状赤血球 (spherocyte) までの過程のうち stomatocytic change とよばれる特徴的な変化を呈する細胞の総称と考えることができる。通常末梢血塗抹乾燥標本では、Wright-Giemsa 染色によると、典型的な stomatocyte は赤血球中央部にスリット状の陥凹を示すとされているが、全てがこうした典型的所見を示すとは限らない。この点、新鮮赤血球を全血のまま浸潤標本として鏡検し、位相差鏡検すると、その立体像を観察することができ、また特徴的なカップ状の形態を確認することができる。当科でルチンとして行っている glutaraldehyde 固定後の走査電顕像で観察すれば、なお確実である。

赤血球膜異常症のうち、HS、HE、Hst. などの代表的な疾患はすべてその赤血球形態による分類であるので、綿密な形態観察が必須である。したがって、HS と HSt. の鑑別は本来その形態のみで行うべきものであるが、今回の検索において、膜脂質量の測定が両者の鑑別の一つの指標になり得ると考えられた。

Sugihara ら¹⁴⁾ は HS において、spherocytic index の高い症例ほど総膜脂質量が少ないことを報告しているが、今回の検索においても **Figure 6** に示したように microspherocyte が多く形態異常の強い HS 症例ほど膜脂質量の減少が顕著である傾向がみられた。膜脂質の減少が以前にも報告¹⁵⁾ されているように HS 赤血球膜の surface loss の結果であるとする、microspherocyte を認めない HSt. では、赤血球膜の surface loss がなく、したがって膜脂質の減少も認めないことが理論的に予想される。実際、今回

の検索においても、HSt. 症例で総膜脂質量が明らかに低下しているものは認められなかった。

一般的に、HS と HSt. との鑑別について論じた報告は極めて少なく、Na 輸送能や MCHC 値がある程度参考にはなるものの、Na 輸送能が全く正常である HSt. 群が存在すること¹⁶⁾ や、鉄欠乏状態を合併した HS で MCHC 値が修飾されている症例はしばしば経験するので、あくまでも参考程度にとどめるべきであろう。

さて、上述のように HS では、赤血球膜の surface loss に伴う膜脂質量の減少がよく知られているが、膜蛋白含有量について検討した報告は意外と少ない。Szymanski ら¹⁷⁾ は、20例の HS 症例について、その赤血球膜上の血液型物質である Rh (D) の抗原量が健常人に比べて減少していることを報告している。また最近では、Lux ら¹⁸⁾ が、典型的 HS 症例の中に band 3 含有量が正常の 72~76% に低下している症例があることを報告し、band 3 が lipid bilayer を安定化させ、surface loss を防ぐのに重要な役割を果たしていることを推測している。同様に Jarolim¹⁹⁾ らは、HS 73例中 9例に band 3 の 40% までの欠損を見出し、Triton を用いた band 3 extractability の実験から、これらの症例では band 3 と ankyrin の interaction に異常があると報告している。今回当科で検索し得た全 HS 症例の band 3 含有量の平均は、健常人 30例と差は認められなかったが、一部の症例では、明らかな band 3 含有量の低下 (正常の 20~30% 減) を認めており、また band 3 含有量の低い症例は、同時に band 4.2 含有量も低い傾向がみられた。しかし、この傾向は HS だけではなく、健常人にも認められるものであり、band 4.2 含有量が低下していることは、band 3 含有量低下に伴う二次的な所見なのかもしれない。実際に、Mimaglia Del Giudice²⁰⁾ らは、band 3 および band 4.2 が同時に部分欠損 (band 3 が正常の 77~79%、band 4.2 が正常の 86~88%) している HS の家系を報告し、band 4.2 は band 3 に結合している膜蛋白であるので、band 4.2 の部分欠損は二次的なものと考察を加えている。

Band 3の含有量が低下する理由は不明であるが、今回の検索では形態変化の明らかな症例(spherocytic indexの高い症例)ほど膜脂質量が低い傾向があるものの、それに対応するband 3の減少は認められず、このことは、少なくとも膜脂質の喪失に伴うband 3の減少ではないことを示唆していると思われる。

さて、赤血球膜異常症の中で、phenotype, genotypeともに最も解析の進んでいるのが、HEである。本症の病態に関して、spectrinやband 4.1を中心とした細胞骨格の分子異常が次々と発見されつつある²¹⁾。欧米では、その多くはおそらくspectrin異常症と推定されているが、わが国では現時点においてspectrin異常症は極めて稀である。今回検討し得たHEは、8家系16例であるが、そのうちband 4.1の部分欠損を伴っている症例が6家系13例(家系で見ると全HEの75%)と高率であり、これがわが国におけるHEの疫学的特徴を反映しているかどうかは疑問であるが、今後さらに症例を積み重ねて検討する必要がある。Band 4.1部分欠損症の表現型はすべてHEであり、Alloisio²²⁾らは、(1)赤血球形態がほぼ100% smooth elliptocyteであること、(2)無症候性であること、(3)遺伝形式は常染色体優性遺伝であること、(4)band 4.1の含有量が正常の約70%であること、(5)glycophorin Cの含有量も正常の約50~70%であること、などを特徴として挙げている。今回検索し得た13例についても、これらの特徴をそなえている症例が多く、慢性腎不全を合併した一例を除いて明らかな溶血を認めるものはなく、患者band 4.1

の含有量は正常の約70%であり、band 4.1a/band 4.1b ratioの検討から、特にband 4.1aの減少が示唆された。家系ごとに若干の相違点はみられるものの、band 4.1部分欠損症例の臨床像や生化学的所見は比較的均一であると考えられた。

結 語

平成3年10月以降より、23カ月間に当科で検索した溶血性貧血諸疾患143例(90家系)を対象に、その末梢血赤血球形態、血液生化学検査、膜脂質、膜蛋白、Na輸送能などの項目について検索を行った。紹介医の診断と当科における最終診断の一致しなかった例、あるいは紹介元で診断不能であった例について、その疾患別の頻度をとらえ、その原因と診断上の注意点につき考察を加えた。また、先天性膜異常症の中でも頻度の高いHSおよびHEに関しては、膜脂質・膜蛋白分析の結果をもとに、それらの膜病態を解析した。今後、さらに症例の検索を続け、病因・病態解明に向けて研究を進めていきたい。

稿を終えるにあたり、ご指導、ご校閲を賜った川崎医科大学血液内科 八幡義人教授に深甚なる謝意を表します。また種々のご助言を賜りました血液内科教員諸兄姉に感謝いたします。

本研究の一部は、八幡義人への川崎医科大学プロジェクト研究費(2-301, 3-305, 4-301, 5-101)のもとで行われた。

文 献

- 1) 神崎暁郎, 和田秀穂, 八幡義人: Cytoskeletonからみた赤血球膜異常症. 臨床血液 32: 573-579, 1991
- 2) Bessis M: Red cell shapes: An illustrated classification and its rationale. In Bessis M, Weed RI, Leblond PF (eds): "Red Cell Shape." New York, Heidelberg, Berlin: Springer Verlag. 1973, pp. 1-25
- 3) Dodge JT, Mitchell C, Hanahan DJ: The preparation and chemical characteristics of hemoglobin-free ghosts of human erythrocytes. Arch. Biochem. Biophys. 100: 119-130, 1963
- 4) Liu SC, Palek J, Prchal J, Castleberry RP: Altered spectrin dimer-dimer association and instability of erythrocyte membrane skeleton in hereditary pyropoikilocytosis. J. Clin. Invest. 68: 597-607,

1981

- 5) Lawler J, Palek J, Liu SC, Prchal J, Butler WM : Molecular heterogeneity of hereditary pyropoikilocytosis. *Blood* 62 : 1182—1189, 1983
- 6) Speicher DW, Morrow JS, Knowles WJ, Marchesi VT : Identification of proteolytically resistant domains of human erythrocyte spectrin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77 : 5673—5677, 1980
- 7) Laemmli UK : Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T 4. *Nature* 227 : 680—685, 1970
- 8) Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ : Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193 : 265—275, 1951
- 9) Jacob HS, Karnovsky ML : Concomitant alterations of sodium flux and membrane phospholipid metabolism in red blood cells : Studies in hereditary spherocytosis. *J. Clin. Invest.* 46 : 173—185, 1967
- 10) Rose HG, Oklander M : Improved procedure for the extraction of lipids by thin-layer chromatography. *J. Lipid Res.* 6 : 173—185, 1967
- 11) Bartlett GR : Phosphorus assay in column chromatography. *J. Biol. Chem.* 234 : 466—468, 1959
- 12) 八幡義人, 神崎暁郎, 井上孝文 : 赤血球膜タンパク band 4.2 異常症. 「Annual Review 血液1993」(高久史麿, 宮崎澄雄, 齊藤英彦, 溝口秀昭 編), 第1版. 東京, 中外医学社. 1993, pp. 29—48
- 13) 八幡義人, 神崎暁郎 : 有口赤血球症の膜輸送能の病態. 「Annual Review 血液1989」(高久史麿, 青木延雄, 仁保喜之, 長尾大 編), 第1版. 東京, 中外医学社. 1989, pp. 13—38
- 14) Sugihara T, Miyashima K, Yawata Y : Disappearance of microspherocytes in peripheral circulation and normalization of decreased lipids in plasma and in red cells of patients with hereditary spherocytosis after splenectomy. *Am. J. Hematol.* 17 : 129—139, 1984
- 15) Reed CF, Swisher SN : Erythrocyte lipid loss in hereditary spherocytosis. *J. Clin. Invest.* 45 : 777—781, 1966
- 16) Kanzaki A, Yawata Y : Hereditary stomatocytosis : phenotypical expression of sodium transport and band 7 peptides in 44 cases. *Br. J. Haematol.* 82 : 133—141, 1992
- 17) Szymanski IO, Araszkiwicz P, Odgren P, Snyder LM : Decreased amount of the Rh antigen D in hereditary spherocytosis (HS). *Br. J. Haematol.* 73 : 537—540, 1989
- 18) Lux S, Bedrosian C, Shalev O, Morris M, Chasis J, Davies K, Savvides P, Telen M : Deficiency of band 3 in dominant hereditary spherocytosis with normal spectrin content. *Clin. Res.* 38 : 300A, 1990 (Abstract)
- 19) Jarolim P, Ruff P, Coetzer TL, Prchal JT, Ballas SK, Poon M-C, Brabec V, Palek J : Subset of patients with dominantly inherited hereditary spherocytosis has a marked deficiency of the band 3 protein. *Blood* 76 : 37a, 1990 (Abstract, Suppl. 1)
- 20) Miraglia del Giudice E, Perrotta S, Pinto L, Cappellini MD, Fiorelli G, Cutillo S, Iolascon A : Hereditary spherocytosis characterized by increased spectrin/band 3 ratio. *Br. J. Haematol.* 80 : 133—136, 1992
- 21) Palek J, Sahr KE : Mutations of the red blood cell membrane proteins : From clinical evaluation to detection of the underlying genetic defect. *Blood* 80 : 308—330, 1992
- 22) Alloisio N, Morlé L, Dorléac E, Gentilhomme O, Bachir D, Guetarni D, Colonna P, Bost M, Zouaoui Z, Roda L, Roussel D, Delaunay J : The heterozygous form of 4.1 (—) hereditary elliptocytosis (the 4.1 [—] trait). *Blood* 65 : 46—51, 1985