Osaka University Knowledge Archive

Title	遺伝性球状赤血球症（HS）の赤血球膜蛋白質異常
Author(s)	河本, 良平
Citation	大阪大学, 1981, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/33089
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

Osaka University

【32】

氏名・(本籍)	河本良平（こうもりょうへい）
学位の種類	医学博士
学位記番号	第 5466 号
学位授与の日付	昭和56年12月1日
学位授与の要件	学位規則第5条第2項該当
学位論文題目	**遺伝性球状赤血球症（HS）の赤血球膜蛋白質異常**
論文審査委員	(主査) 教授 田中 武彦
	(副査) 教授 垣内 史朗　教授 木谷 照夫

論文内容の要旨

〔実験目的〕

遺伝性球状赤血球症（Hereditary Spherocytosis, HS）は末梢血中に球状赤血球が出現し，この形態異常のために溶血が生じ臨床的に貧血，黄疸，脾腫などを主徴とする先天性溶血性貧血である。発症要因については赤血球膜に第一次的な欠陥が存在すると推定されているがその本態は現在なお不明である。そこで，本症の発症要因を分子レベルで解明するために赤血球膜蛋白質をSDS（Sodium Dodecyl Sulfate)-ポリアクリルアミドディスクゲル電気泳動法で分析し，ＨＳ赤血球膜にはバンド4.2蛋白質に特異的異常が存在することをみいだした。このバンド4.2異常とHS発症の因果関係をあきらかにするために正常赤血球膜よりバンド4.2を分離・精製し，性状を調べるとともに抗血清を調製してHS赤血球膜異常，免疫学的に検討した。さらに，抗血清をresealed ghostsに封入処理してHS病態が再現されるかどうかを検討した。

〔実験方法〕

①赤血球膜蛋白質の分析：HS，対照赤血球はSulfoethyl（SE）セルローズで混入する白血球を完全に除去後，Dodgeらの方法でghostsを調製し，0.1％SDS，5％ポリアクリルアミドディスクゲル電気泳動法で膜蛋白の分析をおこなった。②膜蛋白質の分離・精製：大阪大学医学部第一外科教室より提供をうけた心臓手術後の残余新鮮血より調製した。③抗血清の調製：精製spectrin，バンド4.2，5を家兎foot pad内に注射免疫し3～4回め注射1週間後に採血，精製しそのIgG分画を使用。抗血清の膜蛋白質に対する特異性はOuchterlony法，抗原抗体沈降反応で確かめた。④抗血清のresealed ghostsへの封入：溶血を穏やかにおこない赤血球内容物をできるだけ回収するためにSeemannらの

gradual hypotonic hemolysis法のFurusawaらの変法にさらにATP（1 mA）を加えておこなった。fluorescein isothiocyanate標識Ig Gを使いIgGがresealed ghosts内に一様に封入されていることを確認した。

〔実験結果〕

①赤血球膜蛋白質の分析：HS47家系65例の分析をおこない2家系4症例でバンド4.2のほとんど完全な欠損，その他のＨＳではバンド4.2の減少を認めた。前者を4.2欠損型ＨＳ，後者を4.2減少型ＨＳと分類した。②バンド4.2異常がartifactである可能性の検討：ghosts調製時白血球の混入により白血球由来のプロテアーゼがバンド4.2，5を特異的に消化することを実験中にみい出した。しかし，この影響は第1にＳＥセルローズ処理で白血球を完全に除去してもバンド4.2異常が観察され，第2に正常，4.2欠損型ＨＳ赤血球を等量混合後ghostsを調製，電気泳動をおこなうとバンド4.2のピークは両者の相加的値を示したことから否定された。また，密度勾配遠心法で分画したＨＳの老若赤血球の膜蛋白質像には変化がなく，バンド4.2異常が赤血球のaging，網赤血球の影響によるものでないことが示された。③ＨＳ以外の疾患の赤血球膜蛋白質異常：遺伝性楕円赤血球症1例，発作性夜間ヘモグロビン尿症4例，鉄欠乏性貧血4例には異常を認めなかったが，ピルビン酸キナーゼ欠乏症の2例中1例，自己免疫性溶血性貧血1例でバンド4.2の減少が認められ，このことからバンド4.2の減少は必らずしもＨＳに特異的でないことが示唆された。④バンド4.2の分離・精製：赤血球ghostsよりバンド6を高イオン強度で抽出除去後，低イオン強度処理してspectrin，バンド5を抽出(spectrin，バンド5の精製に使用)。残査にメルサリールを作用させ粗バンド4.2分画を可溶抽出。この分画をSephadex G 200ゲルロ過（0.1%SDS，10mMトリス塩酸緩衝液pH 8.0）で分離し，第2のピークを集め再ゲルロ過をおこないバンド4.2を分離した。純度は95%以上，収量は12%であった。⑤バンド4.2のアミノ酸組成：荷電アミノ酸35.2%，中間極性アミノ酸35.6%に比して非極性アミノ酸29.3%の割合が少なく，spectrin，ankyrinと類似した傾向をもち細胞質側の膜面に結合していることがうかがわれた。⑥ＨＳ赤血球膜蛋白質の免疫学的検討：抗血清をもちいて25例のＨＳ赤血球膜蛋白質の免疫学的異常をOuchterlony法で検討したところ，異常は4.2欠損型ＨＳの3例のみでしかもバンド4.2のみに異常がみられた。spectrin，バンド5には異常をみなかった。⑦抗血清のresealed ghostsへの封入：無処置IgGの封入では無傷赤血球と同様にdiscocyteを示した。抗バンド4.2IgG封入ghostsは形態およびosmotic fragility，ATP ase活性とも対照と有意の差はみられなかったが，抗spectrin IgG封入ghostsは内方に陥凹した形態をしめし著明な形態変化を呈した。Na^{+},K^{+},Mg^{++}-ATP ase活性には異常を認めなかったが，Ca^{++}-ATP ase活性の低下があり，osmotic fragilityも小さくなりspectrinが赤血球形態維持と関係あることが推測された。

〔結　論〕

ＨＳ赤血球膜蛋白質にはバンド4.2の特異的異常が存在し，電気泳動像から4.2欠損型ＨＳ，4.2減少型ＨＳの少なくとも2型に分類され，前者はバンド4.2欠損がＨＳ発症の要因であるが，後者はバンド4.2異常というより種々のheterogenousな要因より発症したＨＳ症候群といわれるべきものと推定した。抗バンド4.2IgGを封入したresealed ghostsの形態異常およびosmotic fragiliy, ATPase

(Na^+, K^+, Ca^{++}, Mg^{++}-)活性は対照と有意の差がみられず，ＨＳ病態の再現はできなかったが，免疫学的に4.2欠損型ＨＳではバンド4.2の量的，質的異常がみられ，バンド4.2の調節遺伝子，あるいは構造遺伝子の異常の可能性が推定され，バンド4.2がＨＳ発症となんらかの因果関係をもっていると考えられる。

論文の審査結果の要旨

本論文は遺伝性球状赤血球症（ＨＳ）の赤血球膜蛋白質の異常を分子レベルであきらかにするとともに，膜蛋白質の異常と本症発症の因果関係を追求したものである。すなわち，本症赤血球膜蛋白質にはバンド4.2異常（欠損ないし減少）が存在し，SDS-ポリアクリルアミドディスクゲル電気泳動から，ＨＳは4.2欠損型ＨＳ，4.2減少型ＨＳの２群に分類できることをあきらかにした。また，本症発症との関係を追求するために，正常赤血球膜からバンド4.2を分離・精製し，精製バンド4.2のアミノ酸分析をおこなうとともに，抗血清を作成し，4.2欠損型ＨＳでは免疫学的にバンド4.2の質的・量的な異常をあきらかにした。

以上，本論文はＨＳ発症機構の一端をあきらかにしたものであり，また，バンド4.2の分離・精製は赤血球膜骨格構造の研究発展に寄与するものであり，学位論文に値するものと評価される。