

急速凍結・ディープエッチング法による正常 および形態異常赤血球膜の超微形態学的研究

上 沢 奈々子

信州大学医学部第2内科学教室
(主任: 古田 精市教授)

Ultrastructural Studies on Normal- and Abnormal-shaped Erythrocyte Membranes by Quick-freezing and Deep-etching Method

Nanako KAMISAWA

Department of Internal Medicine, Shinshu University School of Medicine
(Director: Prof. Seiichi FURUTA)

The ultrastructural organizations of erythrocyte membrane skeletons were investigated for normal, spherocytic and elliptocytic erythrocytes.

Erythrocytes obtained from healthy adults and patients with hereditary spherocytosis (HS) and hereditary elliptocytosis (HE) were mechanically split open to obtain inside-out erythrocyte membranes. Aliquots of these erythrocytes were fixed with 2% paraformaldehyde after splitting. Replica membranes were prepared by the quick-freezing and deep-etching method and were observed by electron microscopy.

The membrane skeletons of normal erythrocytes consisted of filaments which formed networks under the cell membrane. No remarkable difference in networks could be identified between fixed membranes and non-fixed membranes. The membrane skeletons of abnormally shaped erythrocytes (HS and HE) were much less filamentous and more granular than those of normal erythrocytes. Moreover, filamentous networks of abnormally shaped erythrocyte membranes were more irregular than those of normal ones.

These abnormal organizations in erythrocyte membrane skeletons can be one of the factors that induce abnormally shaped erythrocytes in HS and HE. *Shinshu Med. J.*, 36: 479-493, 1988

(Received for publication February 25, 1988)

Key words: erythrocyte, membrane skeleton, quick-freezing, deep-etching, abnormally shaped erythrocyte

赤血球, 膜骨格, 急速凍結, ディープエッチング, 形態異常赤血球

I 緒 言

赤血球膜は、脂質、蛋白質および少量の糖質から構成されている¹⁾²⁾。脂質は2重膜を形成し、蛋白質は脂質2重膜を貫通あるいは嵌入して存在する内在性蛋

白質 (integral proteins) と2重膜の内面 (細胞質側) に接触して存在する外在性蛋白質 (peripheral proteins) とに大別される³⁾。

赤血球膜の骨格構造については、これまでに透過型および走査型電顕により観察され微細な網状構造が認

められている4)-9)。この網状構造は、主に spectrin, actin, band 4.1, band 4.9, ankyrin, tropomyosin などの蛋白質から構成されている2)10)-13)。Spectrin は、2本の線維状分子(dimer)が相互に head-to-head 結合して tetramer の状態で存在し、dimer の長さは約100Å, tetramer の長さは約200Å になるといわれている14)15)。Spectrin tetramer は、actin, band 4.1, band 4.9 と結合して、3次元網状構造(network)を形成し、さらにこの構造は ankyrin, band 3 を介して脂質2重膜に接着している。これらの蛋白質相互の結合が骨格構造を調節し、赤血球の形態を維持していると考えられている16)-18)。

赤血球の形態変化は、赤血球膜蛋白質の変化による以外に、赤血球膜脂質の変化—赤血球膜 phosphatidyl choline や free cholesterol の増加などによる有口赤血球(stomatocyte)化—や赤血球解糖系でつくられる ATP の低下などによってもおこると言われている19)-21)。

一方、遺伝性球状赤血球症(hereditary spherocytosis 以下 HS)、遺伝性橢円赤血球症(hereditary elliptocytosis 以下 HE)などの形態異常赤血球については、赤血球膜骨格蛋白質に遺伝的欠陥のあることが生化学的検討によりあきらかにされており、spectrin 量の減少、spectrin tetramer 形成障害、spectrin-actin-band 4.1 結合異常などが報告されている22)23)。しかし、形態異常赤血球膜の細胞質側微細構造については、まだ報告されていない。

最近、細胞を機械的に2分割し、細胞質内可溶性蛋

白質を除去した後に、急速凍結・ディープエッチング法を用いて、細胞質内レプリカ膜を作製し、微細構造を高分解能で3次元的に検索する方法が考案された24)。そこで著者はこの方法を用いて、形態異常赤血球膜細胞質側の微細構造を、正常赤血球と比較検討した結果、興味ある所見が得られたので報告する。

II 対象症例

HS 患者6名(男性1名、女性5名、年齢35~78歳)、HE 患者2名(男性2名、年齢45~80歳)、健康成人2名(男性1名、女性1名、年齢28~37歳)の10名を対象とした。対象症例の臨床検査成績を表1に示した。

HS 患者では、ヘモグロビン濃度の低下、網状赤血球数の増加、総ビリルビン(間接型ビリルビン)値の上昇、ハプトグロビンの低下を認め、溶血性貧血の所見を示している。HS 患者6名全例の末梢血塗抹標本で球状赤血球が60%以上みとめられた。今回の実験時において全症例に摘脾術は施行されていなかった。

HE 患者では、2名とも貧血があり、末梢血塗抹標本で約80%以上の橢円赤血球を認めた。2名とも摘脾術は施行されていなかった。

健康成人2名は、貧血もなく、末梢血塗抹標本で円盤状の正常赤血球形態を確認した。以上10名の赤血球について以下の方法により検討を行った。

III 方 法

A 赤血球分離法

対象症例により10mlの静脈血を0.1%ヘパリン加

表1 対象者の検査成績

症例番号 (病名)	性別	年齢	Hb (g/dl)	Ret (%)	T-B/I-B (mg/dl)	haptoglobin	異常率* (%)	
1	(HS)	F	59	11.2	34	3.0/2.0	低下	60~70
2	(HS)	F	54	10.7	69	2.2/1.0	低下	60~70
3	(HS)	F	43	12.1	106	2.5/1.7	低下	60~70
4	(HS)	F	35	9.2	110	2.8/2.3	低下	60~70
5	(HS)	F	40	13.0	106	2.5/1.7	低下	60~70
6	(HS)	M	78	11.8	55	2.1/1.3	低下	70~80
7	(HE)	M	42	9.8	28	0.4/0.3	低下	80~90
8	(HE)	M	80	10.2	—	2.1/1.3	低下	80~90
9	(正常)	M	37	15.8	—	—	—	0
10	(正常)	F	28	12.1	10	0.5/0.2	正常	0

M: 男性 F: 女性 Hb: ヘモグロビン濃度 Ret: 網状赤血球千分率 —: 未検査
T-B: 総ビリルビン値 I-B: 間接型ビリルビン値 *: 末梢血中形態異常赤血球の割合

採血した。血液を試験管に移し、Mg・EGTA 含有 phosphate buffered saline (Pi/NaCl/Mg; 140mM NaCl/5mM NaH_2PO_4 /2mM NaN_3 /2mM MgCl_2 /1mM EGTA, pH 7.5) [以下 PBS] で洗浄・遠沈 (3,000×g, 10分間) を3回繰り返し、赤血球ペレットを作製した。一部の赤血球は、洗浄後、0.1M リン酸緩衝液 (pH 7.4) で希釈した2%パラフォルムアルデヒド水溶液で10分間固定し、PBS で3回洗浄後赤血球ペレットを作製した。

B 赤血球2分割法

赤血球膜細胞質側のレプリカ膜を作製するために、Ohno²⁴⁾により考案された方法を応用して赤血球を2分割した。

ダイヤモンドペンを用いてカバーガラスに直径6mmの円を描き、20%硫酸と純アセトンでそれぞれ洗浄した後、赤血球膜をカバーガラスに付着させるために、3-アミノプロピルトリエトキシシランと1%グルタルアルデヒドをカバーガラスに被覆した²⁵⁾。

スライドガラス上に置いたカバーガラスの円の中央部に赤血球ペレットを1滴置き、もう1枚のカバーガラスを重ねて赤血球を挟み込んだ後、倒立型位相差顕微鏡 (ニコンMD型) の対物鏡 DDL (20×) を使用し、赤血球の形態を確認しながら、上方のカバーガラスをピンセットで適度に圧迫して赤血球を上下のカバーガラスに付着させた。付着した2枚のカバーガラス間にPBSを流し込むと、毛細管現象によりカバーガラスが互いに剝がれ、同時に赤血球も機械的に2分割された。

2分割された赤血球内可溶性蛋白質をPBSで十分に洗浄した後、0.1M リン酸緩衝液 (pH 7.4) で希釈した2%パラフォルムアルデヒド水溶液で10分間固定した。以上のように処理した赤血球は、カバーガラスに付着させたまま、PBS中に4°Cで保存した。一部の赤血球膜は、未固定のまま速やかにレプリカ作製を行った。また、0.1M リン酸緩衝液 2%パラフォルムアルデヒド水溶液で固定後に2分割された赤血球膜は、0.1M リン酸緩衝液 2.5%グルタルアルデヒド水溶液で30分間固定後、PBS中に4°Cで保存した。

C 急速凍結・ディープエッチング法

固定済みの2分割赤血球膜を急速凍結する前に、蒸留水に浸漬して塩類をのぞき、さらに10%メタノール水溶液に浸漬して氷晶形成防止を行った²⁶⁾。未固定の2分割赤血球膜は前述した処理をせず、急速凍結を行った。2分割赤血球が付着したカバーガラス上の余

分な水分を濾紙で吸い取った後、グリセリンを用いてカバーガラスを試料台に付着させ、液体窒素中で約-190°Cに冷却したイソペンタン・プロパン混合液²⁷⁾中に2分割赤血球が付着したカバーガラスを試料台ごと赤血球付着面より速やかに浸漬し急速凍結した。凍結試料処理装置 (エイコー FD-3S 型) 内であらかじめ-170°C以下に冷却した標本台に凍結試料を移し、-95°C, $2 \sim 6 \times 10^{-7}$ Torr で30~60分間ディープエッチングを行い、白金を25°, 炭素を90°の角度で回転蒸着した。

レプリカ試料を凍結試料処理装置から取り出し、速やかにレプリカ膜上にアミルアセテートで希釈した2%コロジオン液を塗布し、十分に乾燥させた。赤血球膜付きレプリカ膜をカバーガラスごと家庭用漂白剤のハイター (花王石鹼) 液の中に入れ、赤血球膜成分を溶解し、コロジオン膜付きレプリカ膜を得た。さらに、レプリカ膜を蒸留水で2回洗浄した後、あらかじめホルムバル膜を張った銅グリッド (Veco, 150メッシュ) に載せた。その後、アミルアセテートとアセトンを用いてレプリカ膜上のコロジオンを溶解した。作製されたレプリカ膜を電子顕微鏡 (日立H-700型 100kV, または日立HS-9型 75kV) で観察した。レプリカ電顕写真は、白金沈着部位が明るく、背景が暗くなるように、反転ネガより作製した。

IV 結 果

Fig. 1a は正常赤血球の末梢血塗抹標本光顕写真である。中心部の凹んだ円盤状の赤血球が認められた。Fig. 1b は、正常赤血球膜表面レプリカ電顕写真である。赤血球中心部が凹んだ円盤状の形態が確認された赤血球表面は、凹凸が少なく平滑であった。

Fig. 2 は、正常赤血球内の蛋白質が2枚のカバーガラス間に挟み込まれた時に除かれて、赤血球膜が重なった状態 (collapse 状態) のレプリカ写真である (Fig. 2a)。その強拡大像では赤血球膜表面には、赤血球膜細胞質側の網状配列した線維状構造が反映されていた (Fig. 2b)。また、collapse 状態の正常赤血球辺縁部は平滑であった。

Fig. 3 は、正常赤血球膜細胞質側レプリカ電顕写真であるが、網状配列した線維状構造が赤血球膜に付着しているのが観察された。これらの線維状構造の太さと長さは一定ではなく、軽度湾曲していた (Fig. 3a and 3b)。2分割した正常赤血球膜を2%パラフォルムアルデヒド水溶液による固定・無固定処理に分け、

おのおのレプリカ膜を作製して、それらの赤血球膜細胞質側微細構造を比較した (Fig. 3c and 3d)。無固定処理の赤血球膜細胞質側には、一部に線維状構造の解離による network 形成不全を示していたが、全体的に network を形成した微細な線維状構造が認められた (Fig. 3c)。2% パラフォルムアルデヒド固定処理した赤血球膜細胞質側には、微細な線維状構造が3次元的に network を形成し、無固定処理のものとはほぼ同様な所見を示していた (Fig. 3d)。

Fig. 4 は、球状赤血球膜表面写真である。末梢血塗抹標本光顕写真では赤血球全体が一様に染色され中心部の陥凹がない、多数の球状赤血球が観察された (Fig. 4a)。また、表面レプリカ電顕写真でも赤血球中心部の凹みがなく、球状であることが確認され、また球状赤血球膜表面は正常赤血球と比較して著明な差は認められなかった (Fig. 4b)。一方、collapse 状態の球状赤血球膜表面は凹凸が著明で、赤血球辺縁部は、正常赤血球と比べて不整を示していた (Fig. 4c)。

球状赤血球膜の細胞質側微細構造を正常赤血球と比較すると線維状構造が少なく、顆粒状構造が主に観察された (Fig. 5a)。また、網状配列した線維状構造が伸展している部分では、短い線維状構造や顆粒状構造が赤血球膜を裏打ちしているのが認められた (Fig. 5b)。球状赤血球膜細胞質側の線維状構造は、正常赤血球と比較すると構造の太さや形態が不整で (Fig. 5c)、また、配列の乱れも認められた (Fig. 5d)。

Fig. 6a に橢円赤血球の末梢血塗抹標本を示す。この症例の赤血球膜表面レプリカ写真では、正常赤血球と比較して著明な差は認められなかった (Fig. 6b

and 6c)。Collapse 状態の橢円赤血球膜表面レプリカ写真では、膜表面の凹凸は正常赤血球と比較して著明であった (Fig. 6d)。

Fig. 7 は、橢円赤血球膜の細胞質側微細構造である。網状配列した線維状構造が観察されたが (Fig. 7a)、正常赤血球と比較して短く湾曲した線維状構造が主体であった。一部の赤血球では、赤血球膜が部分的に剥がれて、その間から赤血球膜細胞質側微細構造が観察された (Fig. 7b)。これらは、正常赤血球膜の細胞質側微細構造と比較して顆粒状構造が主体であった。また、球状赤血球膜の細胞質側微細構造と比較すると、線維状構造や顆粒状構造の変化については明確な差は認められなかった。

V 考 案

以前より正常赤血球膜の細胞質側微細構造については、透過型電顕および走査型電顕により形態学的に研究されてきた⁴⁾⁻⁷⁾⁹⁾²⁸⁾²⁹⁾。しかし、固定・脱水などによる試料作製法のため *in situ* の赤血球膜細胞質側の網状構造を反映しているとはいえず、赤血球内可溶性蛋白質の除去も不十分で、試料作製段階において蛋白質で形成されている膜骨格構造が修飾されることがさけられなかった。本研究では、細胞2分割法²⁴⁾に急速凍結・ディープエッチング法を併用することにより、赤血球内の可溶性蛋白質を十分に取り除くことを可能とし、また、未固定のまま *in situ* の赤血球膜細胞質側構造の所見を得ることができ、正常赤血球と形態異常赤血球との比較が可能となった。

本研究では、固定剤(2%パラフォルムアルデヒド)

Fig. 1 (a) Light micrograph of normal erythrocytes (Case 10).

Erythrocytes are discoid, with depressed centers.

Wright-Giemsa staining. $\times 1,000$

(b) Electron micrograph of normal erythrocyte membrane surface replica (Case 10).

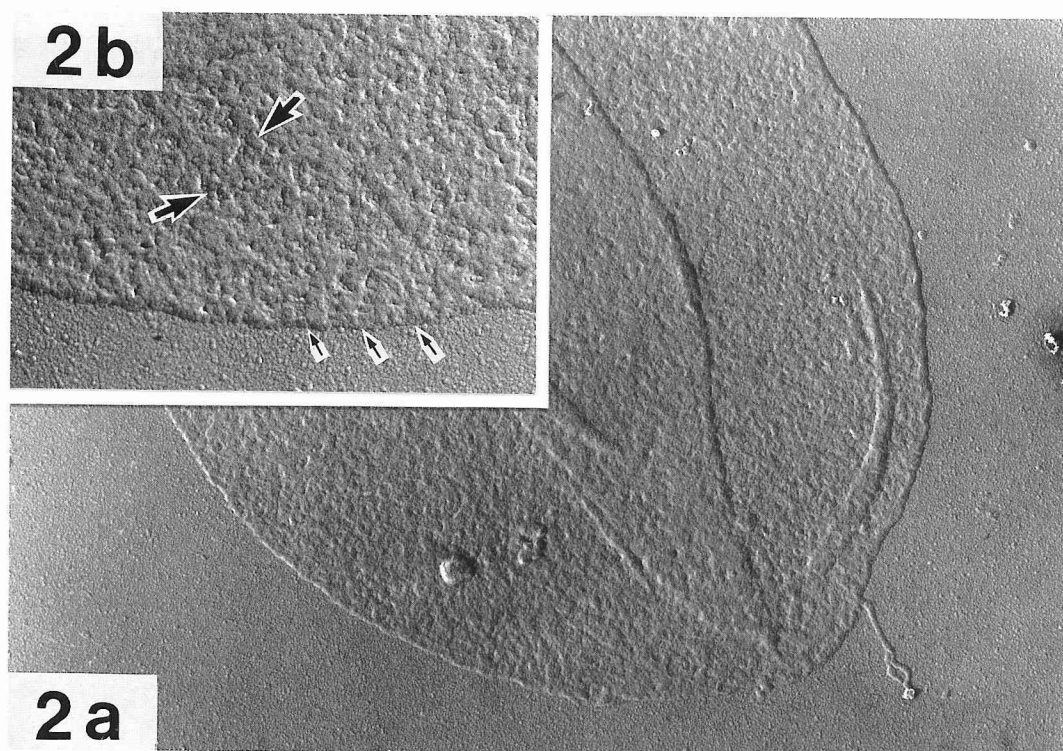
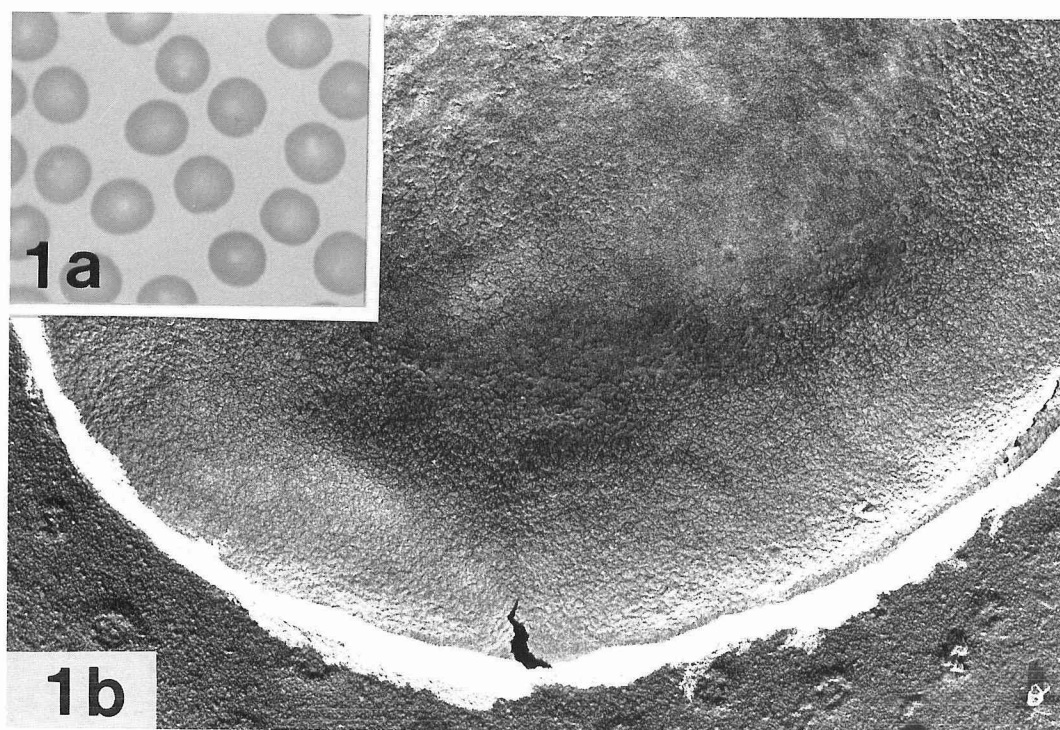
The center of the erythrocyte is depressed.

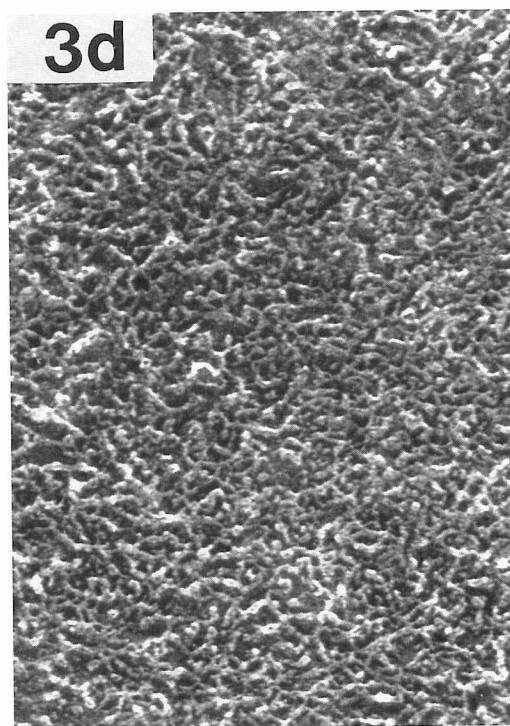
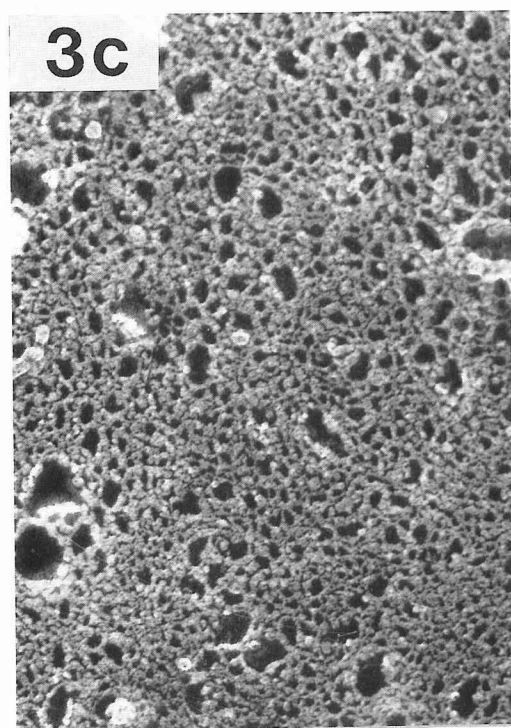
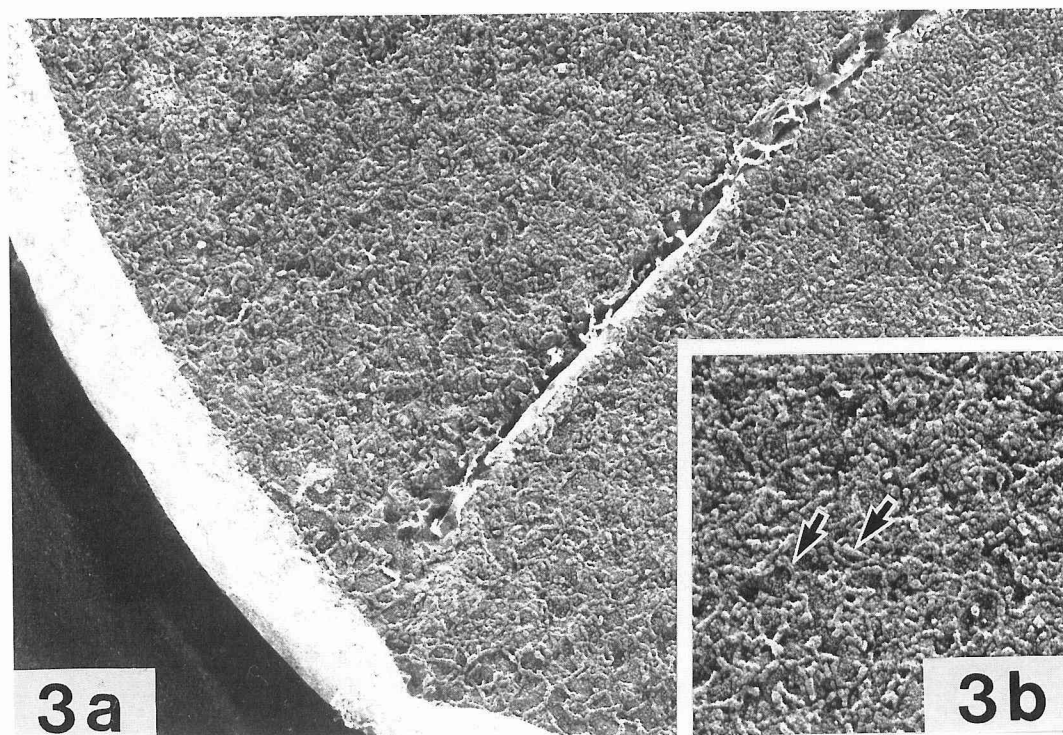
The membrane surface is smooth. $\times 25,000$

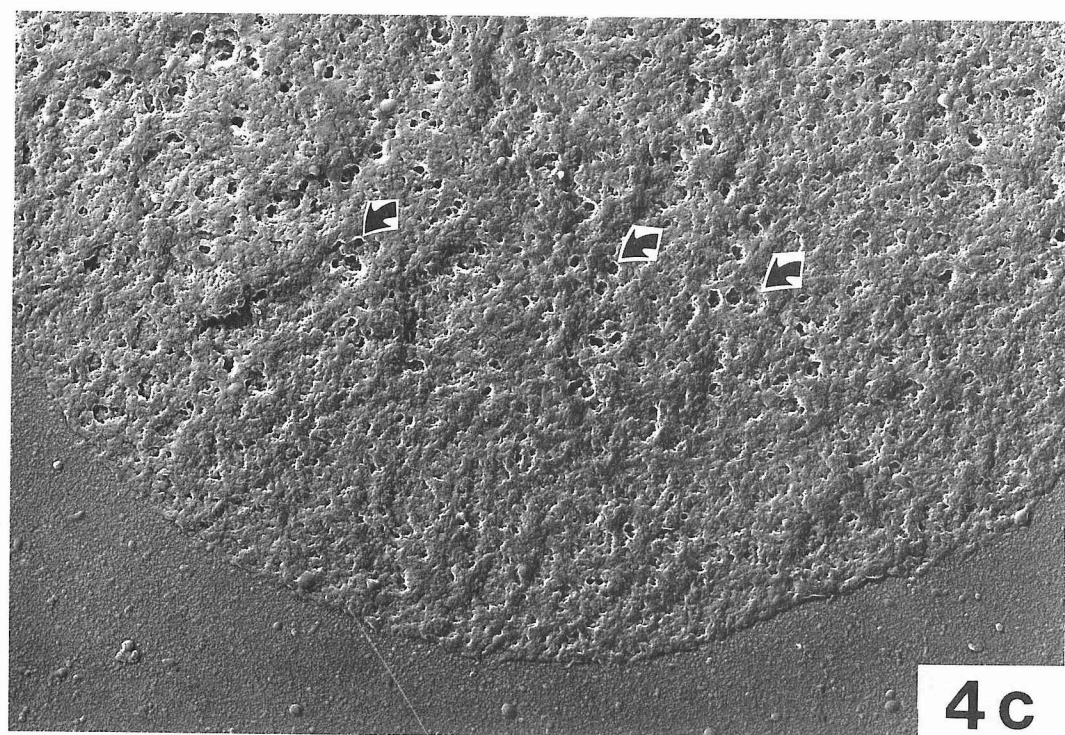
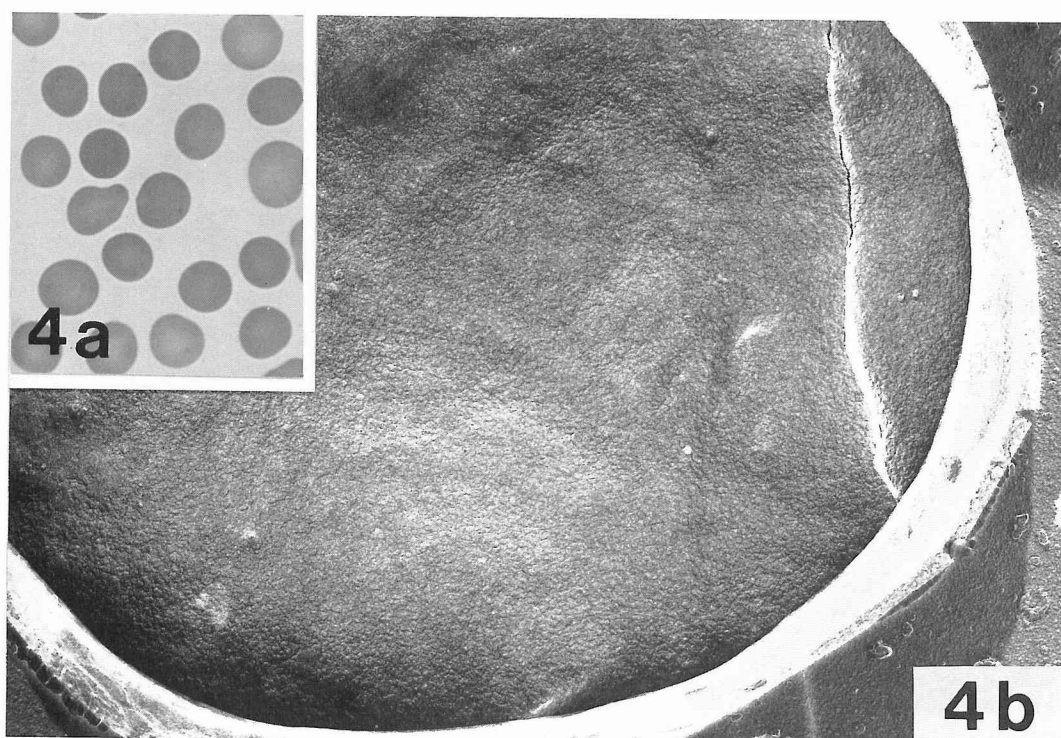
Fig. 2 Electron micrographs of normal erythrocyte membrane surface replicas (Case 9).

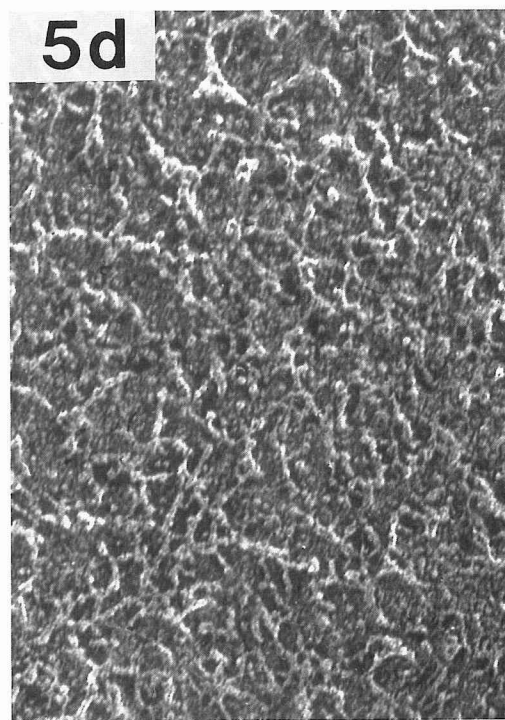
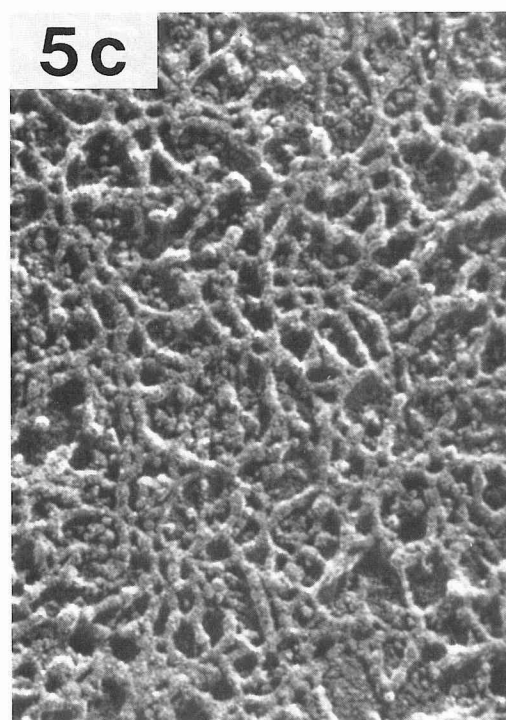
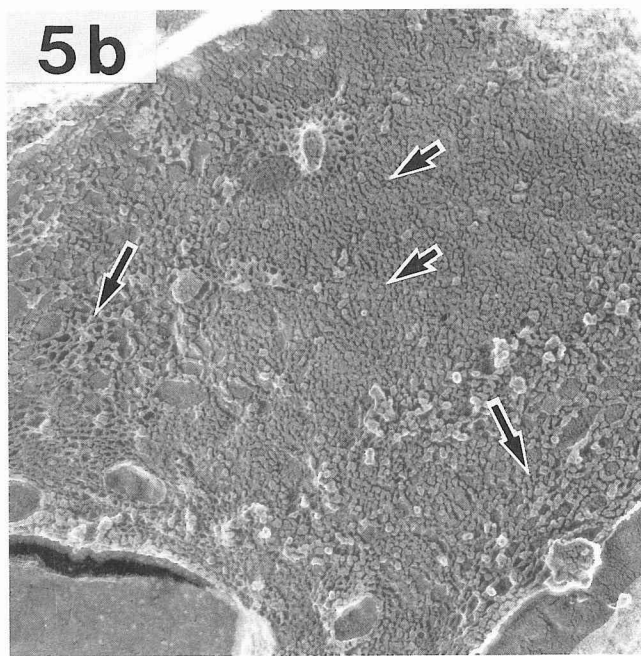
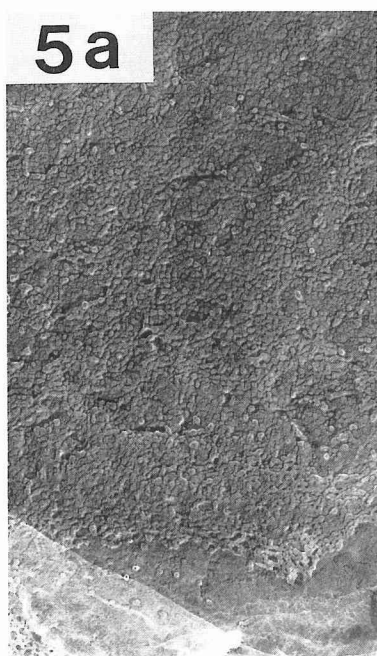
(a) Erythrocyte membranes are partially collapsed and the contents of erythrocytes are removed. $\times 20,000$

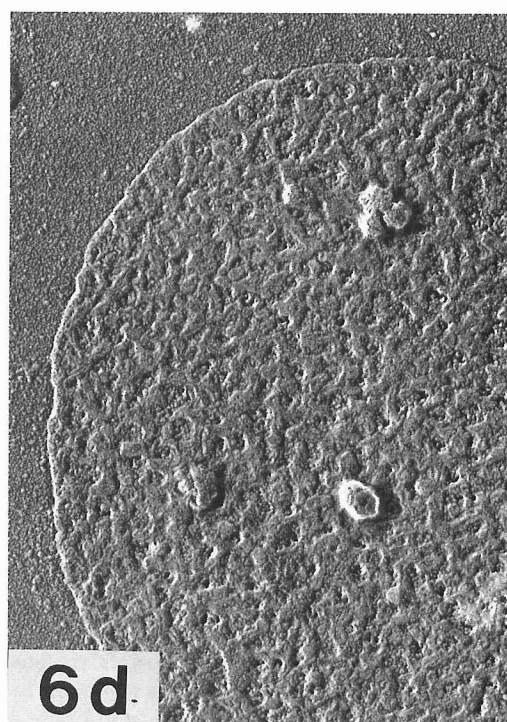
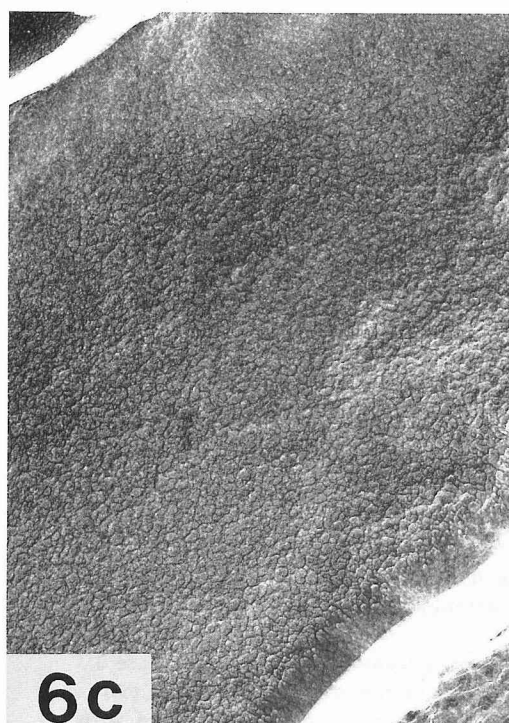
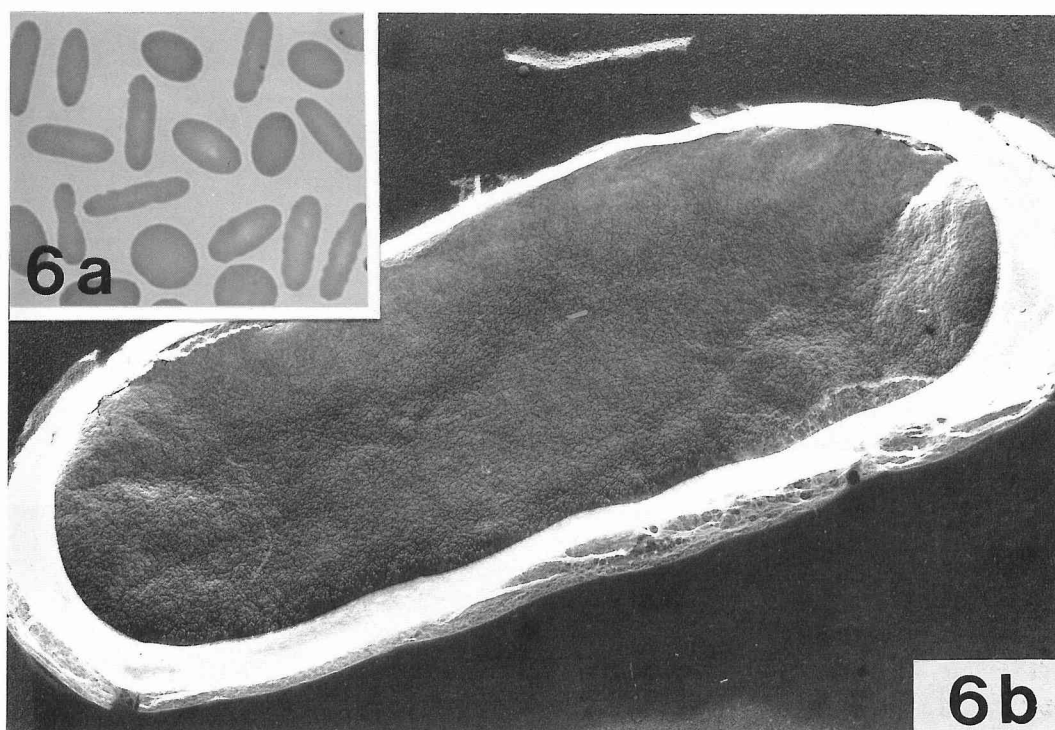
(b) Higher magnification of the membrane surface replica. The underlying networks can be identified in some places (large arrows). The edges of the erythrocyte are smooth (small arrows), as compared with Fig. 4c and Fig. 6d. $\times 25,000$











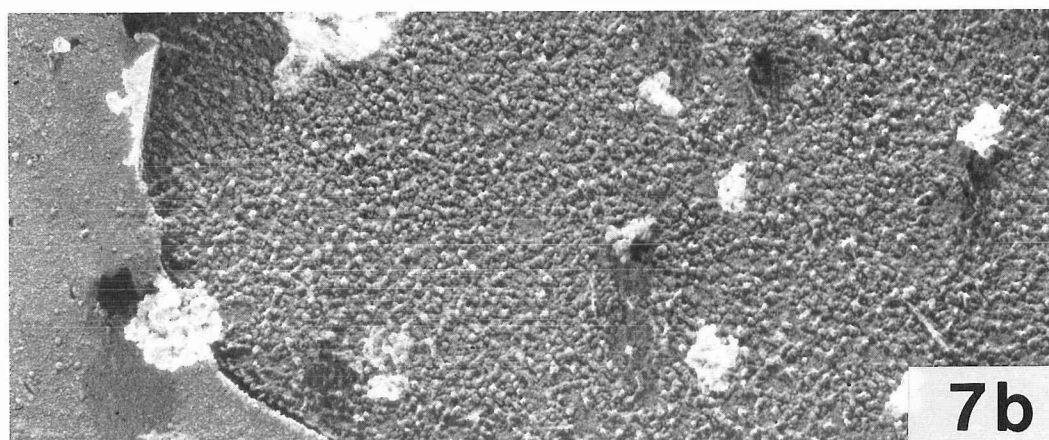
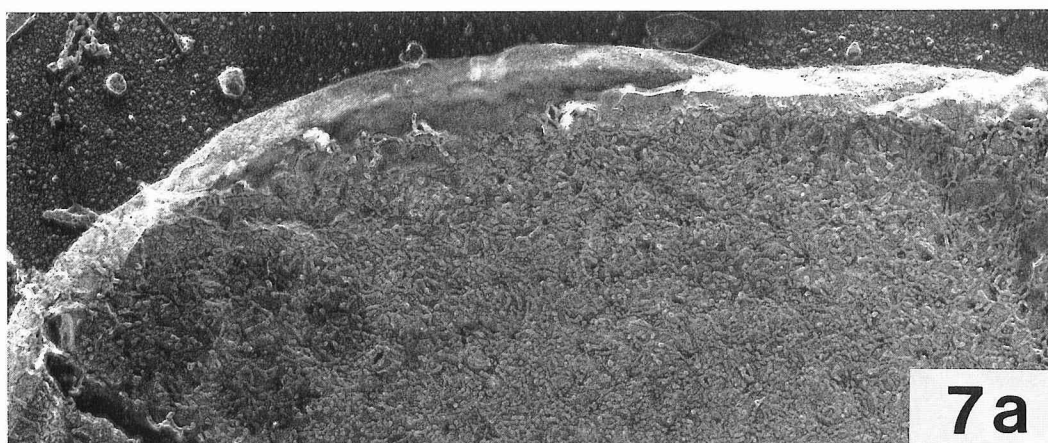


Fig. 3 Electron micrographs of cytoplasmic sides of normal erythrocyte membrane replicas.

- (a) Filamentous networks are attached to the membrane, and show three-dimensional organizations (Case 9). $\times 35,000$
- (b) Higher magnification (Case 9).
The networks are composed of long and short-, thin and thick, and slightly curved filaments (arrows). $\times 60,000$
- (c) and (d) No remarkable difference in filamentous networks is seen between non-fixed membranes (c) and fixed membranes (d) (Case 10).
(c, $\times 100,000$ d, $\times 100,000$)

Fig. 4 (a) Light micrograph of spherocytes (Case 5).

There are many erythrocytes without depressed centers.
Wright- Giemsa staining. $\times 1,000$

- (b) Electron micrograph of spherocyte membrane surface replica (Case 1).
No depression can be seen in the center of the erythrocyte. The ultra-structure of the membrane surface shows no change, as compared with the normal erythrocyte membrane surface shown in Fig.1b. $\times 25,000$

の処理が赤血球膜細胞質側構造に与える影響について、未固定処理・固定後処理の正常赤血球膜細胞質側構造を比較検討した。未固定処理赤血球膜細胞質側構造では、一部に線維状構造相互の解離が生じ、解離部の蛋白質間の短縮も認められたが、固定処理後の赤血球膜は基本的に同様な網状構造であった。このことより2%パラフォルムアルデヒド固定処理の赤血球膜所見は、*in situ*の状態に非常に近いものであると考えられた。

以前より、赤血球膜細胞質側に存在する膜骨格を構成する蛋白質については、多くの生化学的研究報告がされてきた³⁾¹²⁾¹³⁾³⁰⁾⁻³⁶⁾。正常赤血球膜骨格は、spectrin, actin, band 4.1, band 3, band 4.9, ankyrinなどの蛋白質が結合して構成されている。これらの蛋白質が構成する3次元的構造は、赤血球膜

を裏側(細胞質側)より支持し、赤血球の形態、変形態³⁷⁾⁻⁴⁰⁾に重要な影響を及ぼしている。

一方、形態異常赤血球の膜骨格については、従来より主に膜骨格を形成している蛋白質の量的質的検索がなされており、多くの異常が報告されている。すなわち、HSに関しては①spectrin分子(β -spectrin)の部分的異常によりband 4.1との結合ができない²²⁾⁴¹⁾⁻⁴³⁾、②膜蛋白質合成に異常があり、特にspectrin量が正常赤血球と比較して、その半分しかなく、またband 4.1も僅かに少ない⁴⁴⁾⁴⁵⁾、③低温で膜骨格蛋白質を抽出すると、spectrin tetramerの割合が少なく、dimerの状態で存在するものが多い⁴⁶⁾、④band 4.1分子の異常によりspectrinおよびactinが赤血球膜より解離しにくく、膜蛋白質間相互作用が障害されている⁴⁷⁾、などが明らかとなっている。

- (c) Electron micrograph of spherocyte membrane surface replica (Case 2). Spherocyte membranes are partially collapsed and the contents of spherocytes are removed. There are many depressions (arrows) on surface membranes, as compared with those of normal erythrocytes. $\times 25,000$

Fig. 5 Electron micrographs of cytoplasmic sides of spherocyte membrane replicas.

- (a) The membrane skeletons are much less filamentous and more granular than those of normal erythrocytes (Case 6). $\times 30,000$
(b) Some parts of the networks are stretched out, and short filaments (long arrows) and granular structures (short arrows) are also attached to the membranes (Case 5). $\times 45,000$
(c) Filamentous networks are irregular, as compared with normal erythrocyte membranes (Case 5). $\times 100,000$
(d) In filamentous networks the arrangement of the networks is disorderly (Case 3). $\times 100,000$

Fig. 6 (a) Light micrograph of elliptocytes (Case 8).

Many oval and rod-shaped erythrocytes can be seen.
Wright-Giemsa staining. $\times 1,000$

- (b) and (c) Electron micrographs of elliptocyte membrane surface replicas (Case 8).
There are no changes in the membrane surface structures, as compared with normal erythrocytes. (b, $\times 18,000$ c, $\times 25,000$)
(d) Electron micrograph of elliptocyte membrane surface replica (Case 7). Elliptocyte membranes are partially collapsed and the contents of elliptocytes are removed. There are many depressions on the surface membrane. $\times 25,000$

Fig. 7 Electron micrographs of cytoplasmic sides of elliptocyte membrane replicas.

- (a) Filamentous structures are less than those in normal erythrocytes, so that the three-dimensional structures are not formed under the membrane (Case 7). $\times 45,000$
(b) The elliptocyte membranes are partially taken off and cytoplasmic sides of membranes can be seen (Case 8).
These are mainly granular structures, as compared with those in normal erythrocytes. $\times 45,000$

HE における 膜骨格蛋白質の異常に関しては、① spectrin の dimer 分子が正常赤血球より多く⁴⁸⁾、spectrin の α -subunit の異常⁴⁹⁾⁻⁵¹⁾や β -subunit の異常²²⁾⁵²⁾⁵³⁾による tetramer の形成の異常、②band 4.1の減少による spectrin-band 4.1-actin complex の形成障害⁵⁴⁾、③赤血球の熱感受性が高く、抽出 spectrin が正常 (49°C)に比べて、より低温 (44°C)で変性する⁵⁵⁾、④ankyrin と spectrin 間の結合異常がある⁵⁶⁾、などが報告されている。

すなわち、形態異常赤血球の膜骨格蛋白質の異常に関しては、分子レベルで多様であり、いくつもの異なった原因が存在することが知られている。このような膜骨格蛋白質異常が複雑に影響しあって赤血球の形態を球状あるいは楕円状へと変化させている可能性が示唆される。

今回の急速凍結・ディープエッチング法による形態学的検討では、Fig. 1b, 4b, 6c で示すように collapse 状態でない赤血球膜表面は、正常と形態異常赤血球とでは著明な差は認められず、一方、Fig. 2, 4c, 6d で示すように collapse 状態での正常赤血球膜表面は平滑で陥凹が少ないのに対して、HS および HE の赤血球膜表面は不整で陥凹が著明に認められた。このことより赤血球内容物が取り除かれた状態で正常と形態異常赤血球膜所見の違いは、形態異常赤血球膜細胞質側に存在する骨格構造に変化が生じていることを示唆している。

形態異常赤血球は、正常赤血球と比較すると、それらの膜細胞質側構造に変化が認められた。すなわち、網状配列した線維状構造よりなる正常赤血球膜細胞質側と比べて、線維状構造が少なく、顆粒状構造や短い線維状構造より構成されているという特徴が認められた。特にこの顆粒状構造は HE の赤血球膜細胞質側にしばしば観察された。前述した HE の膜骨格蛋白質異常の中で、正常赤血球より spectrin dimer 分子が多いという報告がある²²⁾⁴⁹⁾⁻⁵³⁾ことから、HE では spectrin tetramer により構成される網状構造が不全な状態で、tetramer 分子より短い dimer 分子が多く存在するために、このような超微形態学所見がえられたことが考えられる。

また、HS と HE の形態異常赤血球膜細胞質側構造の違いについては今回の実験では明確な結論は得られなかった。しかし、HE の赤血球膜細胞質側では、HS と比較すると顆粒状構造が主体であったことより、顆粒状構造への変化の差が両者の形態の違いに大きく影

響を及ぼしていると推測される。

さらに、今回の実験において HS および HE の同一症例に、一見正常円盤形態を示している赤血球についても、赤血球膜細胞質側の構造を検討した (所見未発表)。これらの赤血球の細胞質側構造では線維状構造が減少して、一部分で顆粒状構造への変化を認めた場合と、正常赤血球と同様な線維状構造を示す場合があった。このことより今回は、一見正常円盤形態を示している赤血球膜細胞質側の変化については明確な結論は出せなかった。おそらく、おのおのの赤血球の加齢にともなう network 形成蛋白質の変化が形態異常に大きな影響を及ぼすことが考えられるが、さらに詳細な検索が必要である。

In situ の正常赤血球では spectrin の線維状構造は湾曲したり縮小した状態であり、これが赤血球膜の可動性・変形能に大きく関与しているものと考えられる。しかし、HS および HE の赤血球膜細胞質側では、この線維状構造が少なく顆粒状構造が観察された。この変化は前述したような膜骨格蛋白質の異常、すなわち spectrin-band 4.1 の結合異常、spectrin の量的減少、spectrin tetramer の形成障害、spectrin と ankyrin の結合異常などによるものと考えられる。また、膜骨格蛋白質相互の結合異常のために膜細胞質側に 3 次元的構築を形成することが不可能となり赤血球膜の支持力も低下していると考えられる。

赤血球膜細胞質側構造を構成する蛋白質の結合異常のために、どのような機序で円盤状の赤血球が球状、または楕円状に変形するのかという点については現在までのところ明快な結論はえられていない。赤血球の形態異常の共通の機序は、赤血球膜細胞質側構造が部分的に欠損、あるいは結合解離などが存在するのではないと思われる。この仮説に対しては今後さらに正常および形態異常赤血球の加齢にともなう赤血球膜細胞質側構造の変化や膜細胞質側構築の蛋白質の免疫染色などを用いた研究が必要である。しかし、赤血球形態異常は赤血球膜細胞質側構造の変化が基本にあり、さらに膜浸透圧の変化や膜代謝エネルギーの変化などが複雑に関係しあっておくと考えられる。

VI 結 語

正常赤血球および形態異常赤血球 (球状赤血球、楕円状赤血球) を機械的に 2 分割し、急速凍結・ディープエッチング法を用いて、それらの赤血球膜細胞質側を透過型電子顕微鏡により検討した結果、以下の結論

を得た。

1. *In situ* での正常赤血球膜細胞質側には、主に網状配列した線維状構造が3次元的に赤血球膜に付着していた。

2. 形態異常赤血球(球状および橢円赤血球)膜細胞質側には、正常赤血球と比較すると線維状構造が少なく、顆粒状構造が観察された。

3. 球状と橢円赤血球の形態の違いは、赤血球膜細胞質側の顆粒状構造への変化が関係していると推測された。

4. 以上より、赤血球の形態を維持する上で赤血球膜細胞質側の網状構造が重要な働きを示し、この構造の変化が赤血球形態に大きな影響を及ぼすと考えられ

た。

本研究の要旨は第29回臨床血液学会総会(昭和62年10月, 千葉)において発表した。

稿を終わるにあたり、御指導、御校閲を賜りました古田精市教授、第1解剖学教室、永田哲士教授、大野伸一助教授に深く感謝の意を表します。

また、御協力をいただきました当教室血液班の諸先生、ならびに試料を提供していただいた長野赤十字病院内科 和田秀一先生、須坂病院内科 飯島康美先生に感謝の意を表します。

文 献

- 1) Steck, T.L. : The organization of proteins in the human red blood cell membrane. A review. *J Cell Biol*, 62 : 1-19, 1974
- 2) Sheetz, M.P. : Integral membrane protein interaction with Triton cytoskeleton of erythrocytes. *Biochim Biophys Acta*, 557 : 122-134, 1979
- 3) Bennett, V. : The membrane skeleton of human erythrocytes and its implications for more complex cells. *Ann Rev Biochem*, 54 : 273-304, 1985
- 4) Hainfeld, J.F. and Steck, T.L. : The sub-membrane reticulum of the human erythrocyte : A scanning electron microscope study. *J Supramol Struct*, 6 : 301-311, 1977
- 5) Tsukita, S., Tsukita, S. and Ishikawa, H. : Cytoskeletal network underlying the human erythrocyte membrane. *J Cell Biol*, 85 : 567-576, 1980
- 6) Fujikawa, S. : Tannic acid improves the visualization of the human erythrocyte membrane skeleton by freeze-etching. *J Ultrastruct Res*, 84 : 289-298, 1983
- 7) Byers, T.J. and Branton, D. : Visualization of the protein associations in the erythrocyte membrane skeleton. *Proc Natl Acad Sci USA*, 82 : 6153-6157, 1985
- 8) Liu, S.C., Derick, L.H. and Palek, J. : Visualization of the hexagonal lattice in the erythrocyte membrane skeleton. *J Cell Biol*, 104 : 527-536, 1987
- 9) Shen, B.W., Josephs, R. and Steck, T.L. : Ultrastructure of the intact skeleton of the human erythrocyte membrane. *J Cell Biol*, 102 : 997-1006, 1986
- 10) Sheetz, M.P. and Sawyer, D. : Triton shell of intact erythrocyte. *J Supramol Struct*, 8 : 339-412, 1978
- 11) Ungewickell, E., Bennett, P.M., Calvert, R., Ohanian, V. and Gratzel, W.B. : *In vitro* formation of a complex between cytoskeletal proteins of human erythrocyte. *Nature*, 280 : 811-814, 1979
- 12) Branton, D., Cohen, C.M. and Tyler, J. : Interaction of cytoskeletal proteins on the human erythrocyte membrane. *Cell*, 24 : 24-32, 1981
- 13) Haest, C.W.M. : Interactions between membrane skeleton proteins and the intrinsic domain of erythrocyte membrane. *Biochim Biophys Acta*, 694 : 331-352, 1982
- 14) Ungewickell, E. and Gratzel, W. : Self-association of human spectrin. *Eur J Biochem*, 88 : 379-385, 1978
- 15) Shotton, D.M., Burke, B.E. and Branton, D. : The molecular structure of human erythrocyte spectrin. *J Mol Biol*, 131 : 303-329, 1978
- 16) Liu, S.C. and Palek, J. : Spectrin tetramer-dimer equilibrium and the stability of erythro-

- cyte membrane skeletons. *Nature*, 285 : 586-588, 1980
- 17) Correas, I., Speicher, D.W. and Marchesi, V.T. : Structure of the spectrin-actin binding site of erythrocyte protein 4.1. *J Biol Chem*, 261 : 13362-13366, 1986
- 18) Marchesi, V.T. : Stabilizing infrastructure of cell membrane. *Ann Rev Cell Biol*, 1 : 531-561 1985
- 19) 三輪史朗 : 血球膜異常症. *日本臨牀*, 43 : 842-845, 1985
- 20) Nakao, M., Nakao, T., Yamazoe, S. and Yoshikawa, H. : Adenosine triphosphate and shape of erythrocytes. *J Biochem*, 49 : 487-492, 1961
- 21) Nakao, M., Nakao, T. and Yamazoe, S. : Adenosine triphosphate and maintenance of shape of the human red cells. *Nature*, 187 : 945-946, 1960
- 22) Goodman, S.R. and Shiffer, K. : The spectrin membrane skeleton of normal and abnormal human erythrocytes : a review. *Am J Physiol*, 244 : C121-C141, 1983
- 23) Liu, S.C., Palek, J. and Prchal, J.T. : Defective spectrin dimer-dimer association in hereditary elliptocytosis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 79 : 2072-2076, 1982
- 24) Ohno, S. : Immunocytochemical study on the cytoplasmic side of cell membranes infected with vesicular stomatitis virus by quick-freezing and deep-etching replica method. *Histochemistry*, 82 : 565-575, 1985
- 25) Büechi, M. and Bächli, T. : Immunofluorescence and electron microscopy of the cytoplasmic surface of the human erythrocyte membrane and its interaction with Sendai virus. *J Cell Biol*, 86 : 338-347, 1979
- 26) Heuser, J.E. and Kirschner, M.W. : Filament organization revealed in platinum replicas of freeze-dried cytoskeleton. *J Cell Biol*, 86 : 212-234, 1980
- 27) Jehl, B., Bauer, R., Dörge, A. and Rick, R. : The use of propane/isopentane mixture for rapid freezing of biological specimens. *J Microsc*, 123 : 307-309, 1981
- 28) Timme, A.H. : The ultrastructure of the erythrocyte cytoskeleton at neutral and reduced pH. *J Ultrastruct Res*, 77 : 199-209, 1981
- 29) Nermut, M.V. : Visualization of the "membrane skeleton" in human erythrocytes by freeze-etching. *Eur J Cell Biol*, 25 : 265-271, 1981
- 30) Tilney, L.G. and Detmers, P. : Actin in erythrocyte ghosts and its association with spectrin. *J Cell Biol*, 66 : 508-520, 1975
- 31) Lux, S.E. : Dissecting the red cell membrane skeleton. *Nature*, 281 : 426-429, 1979
- 32) Cohen, C.M., Tyler, J.M. and Branton, D. : Spectrin-actin associations studied by electron microscopy of shadowed preparations. *Cell*, 21 : 875-883, 1980
- 33) Tsukita, S., Tsukita, S., Ishikawa, H., Sato, S. and Nakao, M. : Electron microscopic study of reassociation of spectrin and actin with human erythrocyte membrane. *J Cell Biol*, 90 : 70-77, 1981
- 34) Marchesi, V.T. : The red cell membrane skeleton : Recent progress. *Blood*, 61 : 1-11, 1983
- 35) Liu, S.C., Windisch, P., Kim, S. and Palek, J. : Oligomeric states of spectrin in normal erythrocyte membranes : Biochemical and electron microscopic studies. *Cell*, 37 : 587-594, 1984
- 36) Siegel, D.L. and Branton, D. : Partial purification and characterization of an actin-bundling protein, Band 4.9, from human erythrocytes. *J Cell Biol*, 100 : 775-785, 1985
- 37) Lin, D.C. and Lin, S. : High affinity binding of [³H] Dihydrocytochalasin B to peripheral membrane proteins related to the control of cell shape in human red cell. *J Biol Chem*, 253 : 1415-1419, 1978
- 38) Johnson, R.M., Taylor, G. and Meyer, D.B. : Shape and volume changes in erythrocyte ghosts and spectrin-actin networks. *J Cell Biol*, 86 : 371-376, 1980
- 39) Robert, Y.L., Hadesman, R.A. and Steck, T.L. : Role of the reticulum in the stability and shape of the isolated human erythrocyte membrane. *J Cell Biol*, 92 : 714-721, 1982

- 40) Seetz, M.P. : Membrane skeletal dynamics : Role in modulation of red cell deformability, mobility of transmembrane proteins, and shape. *Semin Hematol*, 20 : 175-188, 1983
- 41) Wolfe, L.C., John, K.M., Falcone J.C., Byrne, A.M. and Lux, S.E. : A genetic defect in the binding of protein 4.1 to spectrin in a kindred with hereditary spherocytosis. *N Engl J Med*, 307 : 1367-1374, 1982
- 42) Goodman, S.R., Shiffer, K.A., Casoria, L.A. and Eyster, M.E. : Identification of the molecular defect in the erythrocyte membrane skeleton of some kindreds with hereditary spherocytosis. *Blood*, 60 : 772-784, 1982
- 43) Agre, P., Casella, J.F., Zinkham, W.H., McMillan, C. and Bennett, V. : Partial deficiency of erythrocyte spectrin in hereditary spherocytosis. *Nature*, 314 : 380-383, 1985
- 44) Agie, P., Orringer, E.P. and Bennett, V. : Deficient red-cell spectrin in severe recessively inherited spherocytosis. *N Engl J Med*, 306 : 1155-1161, 1982
- 45) Evans, D.A.P., Mackie, M.J. and Anand, R. : Diminished extractable spectrin in the erythrocytes of a patient with 'Sporadic' hereditary spherocytosis. *Acta haemat*, 76 : 136-140, 1986
- 46) Burke, B.E. and Shotton, D.M. : Erythrocyte membrane skeleton abnormalities in hereditary spherocytosis. *Br J Haemat*, 54 : 173-187, 1983
- 47) Sawyer, W.H., Hill, J.S., Howlett, G.J. and Wiley, J.S. : Hereditary spherocytosis of man. Defective cytoskeletal interactions in the erythrocyte membrane. *Biochem J*, 211 : 349-356, 1983
- 48) Coetzer, T. and Zail, S. : Spectrin tetramer-dimer equilibrium in hereditary elliptocytosis. *Blood*, 59 : 900-905, 1982
- 49) Lawler, J., Liu, S.C. and Palek, J. : A molecular defect of spectrin in a subset of patients with hereditary elliptocytosis. *J Clin Invest*, 73 : 1688-1695, 1984
- 50) Lecomte, M.C., Dhermy, D., Garbarz, M., Bournier, O., Galand, C. and Bovin, P. : Hereditary elliptocytosis with a spectrin molecular defect in a white patient. *Acta Haemat*, 71 : 235-240, 1984
- 51) Lecomte, M.C., Dhermy, D., Solis, C., Ester, A., Fèò, C., Gautero, H., Bounier, O. and Bovin, P. : A new abnormal variant of spectrin in black patients with hereditary spherocytosis. *Blood*, 65 : 1208-1217, 1985
- 52) Dhermy, D., Lecomte, M.C., Garbarz, M., Bournier, O. and Galand C. : Spectrin β -chain variant associated with hereditary elliptocytosis. *J Clin Invest*, 70 : 707-715, 1982
- 53) Pothier, B., Morle, L., Alloisio, N., Ducluzeau, M.T., Caldani, C., Fèò, C., Garbarz, M., Chaveroche, I., Dhermy, D., Lecomte, M.C., Bovin, P. and Delaunay, I. : Spectrin nice ($\beta^{220/210}$) : A shortened β -chain variant associated with an increase of the $\alpha^{1/74}$ fragment in a case of elliptocytosis. *Blood*, 69 : 1759-1765, 1985
- 54) Garbarz, M., Dhermy, D., Lecomte, M.C., Fèò, C., Chaveroche, I., Galand, C., Bournier, O. and Bovin, P. : A variant of erythrocyte membrane skeletal protein band 4.1 associated with hereditary elliptocytosis. *Blood*, 64 : 1006-1015, 1984
- 55) Tomaselli, M.B., John, K.M. and Lux, S.E. : Elliptical erythrocyte membrane skeletons and heat sensitive spectrin in hereditary elliptocytosis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 78 : 1911-1915, 1981
- 56) Zail, S.S. and Coetzer, T.L. : Defective binding of spectrin to ankyrin in a kindred with recessively inherited hereditary elliptocytosis. *J Clin Invest*, 74 : 753-762, 1984

(63. 2. 25 受稿)