

## 25) Duchenne 型筋ジストロフィー症における赤血球機能および形態に関する研究

茂 在 敏 司\*

研究協力者 福 田 市 蔵\* 吉 田 照 雄\*  
 頼 經 元\* 木 曾 昭 彦\*

### はじめに

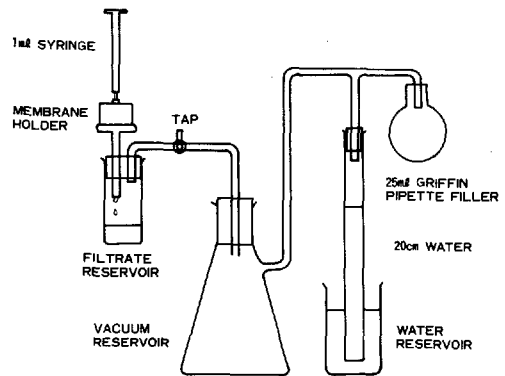
1974年 Kunze らは筋ジストロフィー症患者赤血球膜の脂肪酸、燐脂質の異常を報告し、また dystrophic mouse の赤血球膜表面の形態異常を走査電顕による観察で認め、Matheson (1974年)<sup>1)</sup>, Miller (1976年)<sup>2)</sup> らも Duchenne 型筋ジストロフィー症 (Duchenne muscular dystrophy ; DMD) 患者における赤血球形態異常を報告した。これらの研究は、進行性筋ジストロフィー症における本質的な欠陥が赤血球に異常をもたらしていることを推定せしめるものである。つまり臨床的に採取容易な赤血球の異常を追求することにより、この疾患の本質を解明する手がかりが開かれることが期待される。我々は赤血球変形能 (Red Blood Cell Deformability) を測定し、またその形態を走査電顕により検討した。

### 対象ならびに方法

対象は男子6才から20才までの DMD 症例36例で、同様年令の健常男子を対照とした。

赤血球変形能 : Schmidt-Schonbein 原法<sup>3)</sup>に基づいて、Reid<sup>4)</sup> らの装置により測定した。平均直径  $5 \mu$  の細孔 (pore) を  $1 \text{ cm}^2$  当り  $4 \times 10^5$  個もつ厚さ  $10 \mu$  の polycarbonate

nuclepore membrane (Lot No. 54A7D66) を図1に示した膜固定装置に固定し、3.8% クエン酸1/10容添加静脈血より platelet poor plasma (PPP) 浮遊赤血球を調整し



A schematic representation of the apparatus. (H.L.Reid)

図1

たものを、37°Cに incubate した後、1 ml をプラスチック製注射器に満たし、membrane に20cm水柱の圧勾配を与え、5秒、15秒、30秒の各単位時間に細孔を通過する血液量(ml) および同浮遊赤血球1mlの通過に要する時間(秒)をそれぞれ Deformability Index (D.I.)

\* 大阪医科大学第一内科

として、D.I. (5") (ml), D.I. (15") (ml), D.I. (30") (ml), D.I. (1 ml) (秒)と表現した。同様に、pH 7.2 および 8.0 の 0.25M 磷酸緩衝液浮遊赤血球ならびに 200 mosm/kg と 500 mosm/kg の食塩水浮遊赤血球についても、各 D.I. を検討した。

走査電顕による赤血球の観察：肘静脈より採血した全血 (EDTA-2K 添加) を、1% グルタルアルデヒド (0.1M 磷酸緩衝液, pH 7.4) にて固定、室温自然乾燥 (24時間) 後、EIKO 社製 IB-3 型 ION COATER にて 200 Å の厚さに金蒸着し、日立 SSM-2A 型走査電子顕微鏡により、電圧 20KV, フィラメント電流 100 μA で観察した。更に pH 7.2 と 8.0 の 0.25M 磷酸緩衝液および 200 mosm/kg と 500 mosm/kg の食塩水に浮遊させた赤血球についても併せて検討した。

### 結 果 (表 I)

PPP 浮遊赤血球における赤血球変形能は、患者群 D.I. (5") ; 0.42±0.11ml (対照群 : 0.33±0.05ml), D.I. (15") ; 0.90±

0.10ml (0.81±0.11ml), D.I. (1 ml) ; 17.62±6.08秒 (21.08±4.65秒) であって、患者群と対照群の間に有意差を認めなかった。pH 7.2 の 0.25 M 磷酸緩衝液浮遊赤血球においては、D.I. (5") ; 0.26±0.11ml (0.25±0.06ml), D.I. (15") ; 0.52±0.20ml (0.49±0.15ml), D.I. (30") ; 0.65±0.25ml (0.89±0.11ml), D.I. (1 ml) ; 111.84±62.90秒 (35.33±7.42秒) であり、D.I. (30") においては軽度の、D.I. (1 ml) では著しい通過遅延を示した。pH 8.0 の同浮遊赤血球では、D.I. (5") ; 0.37±0.07ml (0.36±0.07ml), D.I. (15") ; 0.72±0.17ml (0.75±0.10ml), D.I. (30") ; 0.91±0.09ml (通過完了), D.I. (1 ml) ; 33.66±16.41秒 (23.42±4.99秒) であり、D.I. (30"), D.I. (1 ml) において通過遅延が認められた。一方浸透圧の変化による影響についてみると、200 mosm/kg の食塩水浮遊赤血球では、D.I. (5") ; 0.73±0.18ml (0.50±0.09ml), D.I. (15") ; 0.86±0.11ml (0.86±0.11ml), D.I. (30") ; 0.93±0.07ml (0.93±0.07ml), D.I. (1 ml) ; 9.95±4.25秒 (22.73±11.63秒) と患者群においては通過時間の短縮が著明であった。500 mosm/kg の食塩水浮遊赤血球においては、D.I. (5") ; 0.26±0.08ml (0.25±0.05ml), D.I. (15") ; 0.63±0.18ml (0.62±0.11ml), D.I. (30") ; 0.91±0.09ml (0.94±0.06ml), D.I. (1 ml) ; 31.79±13.07秒 (27.32±9.12秒) と対照群との間に有意差を認めなかった。

走査電顕による患者赤血球の形態的特徴について、Bessis の分類に従い検討した成績は以下のごとくである。対照群赤血球 (写真 1-上) では、大多数が両面凹型の discocyte を呈しているのに対し、患者群では形態の多様性が目立つことが注目された (写真 1-下)。すなわち、赤血球 500 個に対する各形態赤血球の出現頻度は、stomatocyte I 46.2%, stomatocyte II 25.4%, discocyte 18.7%, echinocyte I 5.6%, echinocyte II 4.1% であり、stomatocyte が 71.6% と大部分を占めていた。ついで患者群および対照

表 I

R.C.—Deformability Index of controls (n=25)  
(membrane Lot. No. 54A7D66)

D.I.	5 sec	15 sec	30 sec	1 ml
PPP	0.33±0.05 nf	0.81±0.11 nf	⇒ nf	21.08±4.65 sec
pH 7.2	0.25±0.06 nf	0.49±0.15 nf	0.89±0.11 nf	35.33±7.42 sec
pH 8.0	0.36±0.07 nf	0.75±0.10 nf	⇒ nf	23.42±4.99 sec
200 mosm	0.50±0.09 nf	0.86±0.11 nf	0.93±0.07 nf	22.73±11.63 sec
500 mosm	0.25±0.05 nf	0.62±0.11 nf	0.94±0.06 nf	27.32±9.12 sec

R.C.—Deformability Index of patients with D.M.P.  
(membrane Lot. No. 54A7D66) (n=36) (Duchenne type)

D.I.	5 sec	15 sec	30 sec	1 ml
PPP	0.42±0.11 nf	0.90±0.10 nf	⇒ nf	17.62±6.08 sec
pH 7.2	0.26±0.11 nf	0.52±0.20 nf	0.65±0.25 nf	118.4±62.90 sec
pH 8.0	0.37±0.07 nf	0.72±0.17 nf	0.91±0.09 nf	33.66±16.41 sec
200 mosm	0.73±0.18 nf	⇒ nf	⇒ nf	9.95±4.25 sec
500 mosm	0.26±0.08 nf	0.63±0.18 nf	0.91±0.09 nf	31.79±13.07 sec

(⇒ 通過完了)



写真1 上：健常者  
下：患者  
(×1000)

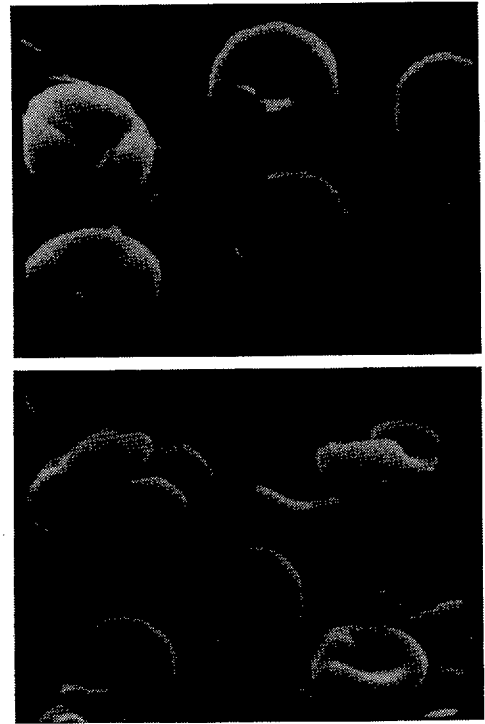


写真2 上：健常者  
下：患者  
(×5000)

群の赤血球を0.25M磷酸緩衝液 (pH7.2および8.0) ならびに食塩水 (200mosm/kgおよび500mosm/kg) に浮遊させ、pHあるいは滲透圧の変動に対する赤血球の形態変化を検討した。pH7.2, 0.25M磷酸緩衝液浮遊赤血球では、対照群赤血球 (写真2-上) では軽度膨化した stomatocyte I が多くみられ、膜表面はほぼ滑らかでゆるやかな凹凸が所々にみられた。一方患者赤血球 (写真2-下) では、その辺縁に鋭い角状の突起を多数もつもの、すなわち stomato I-acanthocyte 様の変化を呈するものが数多く出現していた。pH8.0, 0.25M磷酸緩衝液浮遊赤血球では、対照群赤血球 (写真3-上) において、その大半が discocyte の形状をとどめていたが、膜表面は細顆粒状の凹凸を呈しており、辺縁

には細長い突起を認めた。また明らかに echinocyte Iと思われるものも10~20%程度みられた。患者群赤血球 (写真3-下) においては、明らかに echinocyte I, IIあるいはIIIとみられるものが少なくなく、対照群赤血球に比しその変化は強度であった。しかし膜表面はほぼ滑らかであり、所々に円形の小隆起を認めたにすぎなかった。200mosm/kgの食塩水浮遊赤血球においては、対照群赤血球 (写真4-上) ではほとんどがほぼ均等に膨化した stomatocyte IまたはIIを呈した。それらの膜表面は滑らかで、一部に小隆起を認めたのみであった。患者群赤血球 (写真4-下) は不規則な膨化を呈し、stomatocyte II, sphero-stomato I acanthocyte, sphero-stomato II acanthocyte がみられ、

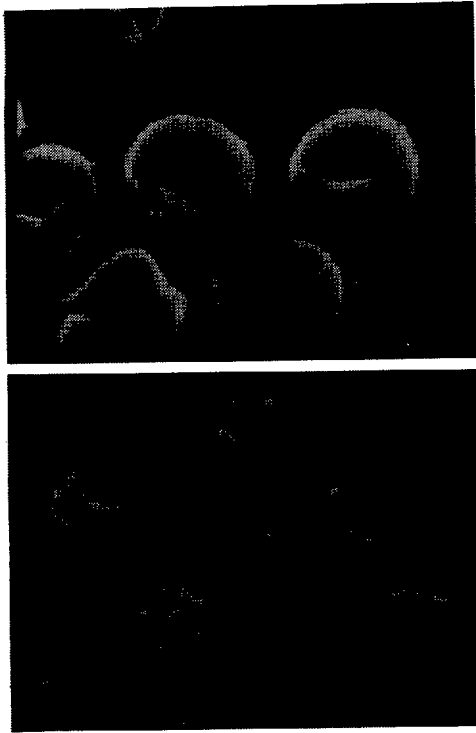


写真3 上：健常者  
下：患者  
(×5000)

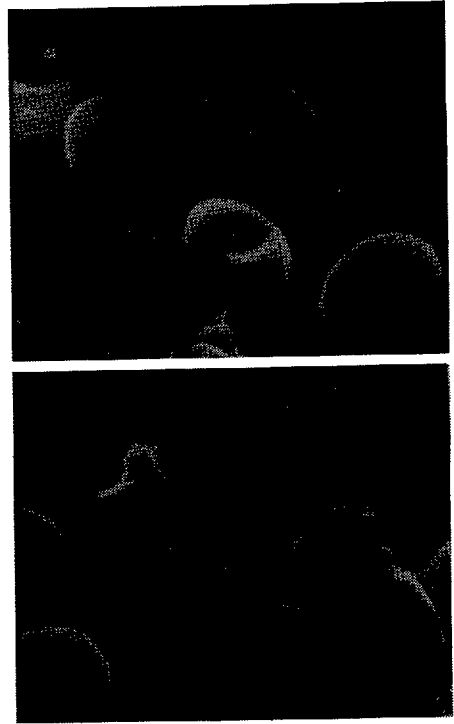


写真4 上：健常者  
下：患者  
(×5000)

いずれも膜表面は斑点状ないしは細顆粒状のゆるやかな隆起がみられた。500 mosm/kg の食塩水浮遊赤血球（写真省略）では、対照群赤血球は、全体に木の葉状を思わせる著しい形の変化を呈している印象を受ける。これは echinocyte I あるいはそれに類似した形態変化をほとんどの赤血球にきたしているものである。やや細長くなったその先端は鋭い角状を呈しているものもみられ、一部に Keratocyte 様の変化もみられた。患者赤血球では、その赤血球形態変化は対照群のそれと類似していたが、echinocyte I および II の出現が主であり、いずれもその膜表面に小隆起を多数認めた。また echino-acanthocyte もわずかであるがみられた。

#### 考 按

昭和51年度の本報告書において、DMD 症例の全血粘度の上昇を報告したが、その際のヘマトクリット値は正常範囲内変動であったから、この原因としてはヘマトクリットを除くその他の血漿因子または血球側因子の関与が推定される<sup>5)</sup>。血漿因子として、fibrinogen, globulin, 血漿 pH ならびに血漿滲透圧などがその重要な因子としてあげられるが、前回の測定ではいずれも正常範囲であり、かつ患者群と対照群との間に差を認めなかった。そこで、今回我々は血球側因子の1つである赤血球について、その変形能および形態的特徴を検討した。赤血球変形能は、赤血球浮遊媒体の pH または滲透圧の変動によっても影響を受けることが知られている。我々の

成績によれば、赤血球変形能において、PPP浮遊赤血球では対照群に比し有意差をみなかったのに対し、pH 7.2および8.0の0.25M磷酸緩衝液浮遊赤血球では、患者群はそれぞれ著明な変形能の低下を示した。滲透圧の変化に対しては、低滲透圧(200mosm/kg)食塩水浮遊赤血球では、細孔通過時間の著しい短縮がみられ変形能の亢進を示したが、高滲透圧(500mosm/kg)食塩水浮遊赤血球では、対照群との間に有意差を認めなかった。低滲透圧における細孔通過時間の短縮は、極めて興味ある所見であり、その機構については今後更に検討を必要とするものである。1976年Fisherらは0.5%から0.3%までの低張食塩水において、DMD患者赤血球の著明な抵抗減弱を報告しているが、後の形態学的研究に示すごとく、我々の実験条件(200mosm/kg)では溶血の存在は示されなかった。次にこれら種々の条件の変化による赤血球の形態的变化を走査電顕により検討した結果から考えてみたい。1974年Matheson<sup>1)</sup>らはDMD患者において、echinocyteの多数出現を報告したが、その後、Miale<sup>6)</sup>らは同疾患で赤血球の特異な形態的变化を認めなかったとしている。またRoses<sup>7)</sup>らは、異なった方法で処理したDMD患者赤血球に、多数のstomatocyteの出現を認めた。1976年Matheson<sup>8)</sup>らは、同疾患における赤血球が種々の処理に対して、極めて影響を受けやすいことを報告した。同年Miller<sup>9)</sup>らは、別の処理方法で走査電顕的観察を行ない、DMD患者赤血球において多数のstomatocyteの出現を認めており、同様に種々の処理に対してDMD患者赤血球の脆弱性を併記している。我々の走査電顕による観察では、両面凹型discocyteの他に、stomatocyte I, stomatocyte II, echinocyte I, echinocyte IIの出現など赤血球形態の多様性が目立つが、stomatocyteの出現が多くみられたことは、Millerらの成績に一致している。更にpHおよび滲透圧の変化に対しては、pH 7.2においてstomato-

cyte I-acanthocyte様の変化を示すものが多く、またpH 8.0に対しては、echinocyteの出現頻度の増加が目立ち、健常者におけるWeed<sup>9)</sup>の成績と比較しても、それぞれpHの変動に対するDMD患者赤血球の形態変化が対照群赤血球より強度であることを示した。また滲透圧の変化に対しての影響をみると、低滲透圧では赤血球膜の不規則な膨化と膜表面の多数の顆粒状隆起が認められた。高滲透圧においても、やはり赤血球膜表面の小隆起が多数存在し、いずれも赤血球膜の不規則な異常を示している。すなわちDMD患者の赤血球は、我々の検討によればstomatocyteを主とする変形が目立つものであり、多くの研究者の成績と同じく非生理的な環境においては、正常赤血球より、より強い形の変化をきたすものである。低滲透圧における変形能の亢進と形態変化との関連は不明であるが、このことも含めてDMD患者赤血球の特質を示すものと考えたい。そしてそれはおそらくDMDという疾患の本質と結びついた所見であろう。

## 結 論

- (1) DMD患者赤血球変形能を検討し、走査電顕により赤血球形態を検討した。
- (2) 赤血球変形能は、pH 7.2および8.0において、対照群に比し著明な低下を認めた。また、低滲透圧に対しては、変形能の著明な亢進を示した。
- (3) 走査電顕観察にて患者赤血球形態の多様性がみられ、特にstomatocyteの出現が著明であった。またpHおよび滲透圧の変動に対する患者赤血球の形態は、対照群赤血球に比し多様性に富み、より強度な形態変化を示した。

## 文 献

- 1) Matheson, D. W., Howland, J. L. : Erythrocyte deformation in human muscular dystrophy, Science, 184 :

- 165--166 (1974)
- 2) Sara, E., Miller, M. D., Roses, A. D., Appel, S. H., : Scanning Electron Microscopy Studies in Muscular Dystrophy, Arch. Neurolo., 33 : 172-174, March (1976)
  - 3) Schmidt-Schonbein, H., Weiss, J., Ludwig, H. : A simple method for measuring red cell deformability in model of the microcirculation, Blut, Band, XXVI, Seite. 369-379 (1973)
  - 4) Reid, H. L., Barnes, A. J., Lock, P. J., Dormandy, J. A., Dormandy, T. L. : A simple method for measuring erythrocyte deformability, Clin. pathology, 29 : 855 (1976)
  - 5) Dintenfass, L. : Blood Microrheology-Viscosity Factors in Blood Flow. Ischaemia and Thrombosis. 25-113 (1971)
  - 6) Miale, T. D., Frias, J. L., Lawson, D. L. : Erythrocytes in human muscular dystrophy, Science, 187 : 453-454 (1975)
  - 7) Roses, A. D., Appel, S. H. : Muscular dystrophies, Lancet, 2 : 1400 (1974)
  - 8) Matheson, D. W., Engel, W. K., Derrer, E. C. : Erythrocyte shape in Duchenne muscular dystrophy, Neurology, 26 : 1182-1183, Dec. (1976)
  - 9) Bessis, M., Weed, R. I., Leblond, P. F. : Red Cell Shape 60-61, Springer-Verlag, New York, Heidelberg, Berlin (1973)

↓  
**検索用テキスト** OCR(光学的文字認識)ソフト使用  
論文の一部ですが、認識率の関係で誤字が含まれる場合があります  
↓

はじめに

1974年 Kunze らは筋ジストロフィー症患者赤血球膜の脂肪酸, 燐脂質の異常を報告し, また dystrophic mouse の赤血球膜表面の形態異常を走査電顕による観察で認め, Matheson(1974年)<sup>1</sup>), Miller(1976年)<sup>2</sup>)らも Duchenne 型筋ジストロフィー症(Duchenne muscular dystrophy; DMD)患者における赤血球形態異常を報告した. これらの研究は, 進行性筋ジストロフィー症における本質的な欠陥が赤血球に異常をもたらしていることを推定せしめるものである. つまり臨床的に採取容易な赤血球の異常を追求することにより, この疾患の本質を解明する手がかりが開かれることが期待される. 我々は赤血球変形能(Red Blood Cell Deformability)を測定し, またその形態を走査電顕により検討した.