

1) 進行性筋ジストロフィー症患者の赤血球膜に関する研究

荒木 淑 郎*

研究協力者 俵 哲*

目 的

進行性筋ジストロフィー症(以下PMDと略す)の成因としては種々の角度から考えられているが、筋肉のみでなく赤血球膜でも、ATPaseのOuabain(ウアバイン)に対する反応態度や、赤血球膜の脂質構成が正常人と異っている事が明らかにされており、本疾患を全身性疾患として考える者もいる。本研究では我国で開発されたCoil Planet Centrifuge(CPC)法および走査電子顕微鏡を用いて、進行性筋ジストロフィー症患者赤血球の浸透圧抵抗、ウアバインによる影響、Echinocyteの出現率などについて研究し、赤血球にも異常があるのか否か、異常をおこす因子は何かを明らかにする事を目的とした。

対象と方法

(1)CPCによるPMD患者の赤血球の浸透圧抵抗:対象としたのはDuchenne型PMD 35名、Duchenne保因者7名、肢帯型PMD 20名、顔面肩甲上腕型PMD 1名、正常対照として小児18名、成人31名である。

方法はNaCl液、NaSCN液、NaI液にウアバインを 10^{-7} mole 加えた液の4種の30~mOsmの浸透圧勾配を作り、抗凝血液添加静脈血12 μ l(全血)をCPCにかけ、溶血点により浸透圧抵抗を測定した。またウアバインに対する反応態度を検討した。

(2)正常人血球に対する、浸透圧抵抗からみたPMD患者血清の影響:PMD患者赤血球

が正常人赤血球と浸透圧抵抗が違うとすれば、その異常をきたす因子は何かを調べた。

前記(1)で対象とした患者のうち、Duchenne型PMD 3名(10才、8才、14才、血液型が各々O型、A型、A型)と正常小児男子2名(A型)、計5名について肘静脈血5mlから2,500回転15分で分離した血球を、10倍量のBuffered saline glucose(BSG液、浸透圧 300 ± 20 mOsm)で3回洗浄し、2,500回転5分で分離し、患者血清と正常者血球を混じ、(1)で用いた4種の勾配液のほかにNaI液にウアバイン 10^{-4} moleを加えた30~150 mOsm勾配液でもCPC法による変化をみた。10才O型患児、および8才正常小児については、これらの処理操作による影響も検討した。

(3)PMD患者赤血球の走査電顕による観察:Howlandらは1973年以来¹⁾、ジストロフィーマウス、進行性ジストロフィー症患者などの赤血球がEchinocyteとなり易い事を走査電顕で認めている。この事実を確認するため以下の検索を行なった。対象としたのは、Duchenne型PMD 4名(10才、12才、8才、7才)および肢帯型PMD 1名(26才)、顔面肩甲上腕型2名(19才、48才)および正常人3名である。方法は、肘静脈血2mlを採血し、0.1mole磷酸緩衝液で3回洗い、1%glutaraldehyde(pH 7.4, 320 mOsm)2時間固定後、0.1mole磷酸緩衝液で2回洗い、25%~99.5%エタノールで緩徐に脱水し、醋酸イソアミルで更に脱水後、臨界点で乾燥し、日立HHS 2 R型走査電顕で観察した。更に⑤検体については、同時にMatheson, Howland

*川崎医科大学内科学教室

表1 CPCによる血球血清交叉実験

(単位 mOsm)

	NaCl	NaSCN	NaI	NaI+ Ouabain 10 ⁻⁷ mole
A. DMP 14才	75	71	50	49
B. DMP 10才	74	71	51	49
C. 正常 8才	68	62	45	37
D. 正常 14才	71	67	49	46
E. Cの血球 + Aの血清	78	62	44	40
F. Cの血球 + Cの血清	64	65	48	45
G. Bの血球 + Bの血清	77	75	56	55
H. Dの血球 + DMP8才の血清	70	70	53	49

らに準拠し、0.9%食塩水で2回洗った赤血球を3%glutaraldehyde (pH 7.4) で22°C 2時間固定し、更に1回洗い、70%エタノールと95%エタノールで脱水したものも比較検討した。

結 果

(1) CPCによるPMD患者の赤血球の浸透圧抵抗：①正常人では男より女、小児より成人の方が、それぞれNaCl, NaI勾配で抵抗が小である。② Duchenne 型PMDは正常小児男子に比べ、NaCl, NaSCN, NaIで有意な差 (P<0.01) で Duchenne 型PMDの方が浸透圧抵抗が小である。③肢帯型PMDも正常成人に比べ、抵抗が小である。(P<0.01) ④ Duchenne 型保因者も NaSCN 液で有意な差で浸透圧抵抗が小である。(P<0.05) ⑤ ウアバイン添加で正常小児では抵抗が減弱するが、Duchenne 型PMDでは変化せず、保因者および肢帯型、肩甲上腕型では低浸透圧側に移った。

(2) 正常人血球に対する、浸透圧抵抗からみたDMP患者血清の影響：各液の溶血終了点 (Max) の値で示すと表1の如くである。

これらの結果からは、①正常小児に比して Duchenne 型PMD赤血球は浸透圧抵抗が小

表2 走査電顕による異常細胞出現率

(単位は%)

	年齢・性別	処理方法 ①	処理方法 ② (Matheson らの方法)
Normal	30 M	2.0	
	28 M	0	2.5
	26 M	1.0	2.5
Duchenne	7 M	4.0	82.0
	8 M	2.5	14.5
	10 M	2.5	
Limb-Girdle	12 M	3.0	
	26 M	0	44.0
FSH	19 M	4.7	
	48 F	39.0	

である。②正常小児の赤血球にPMDの血清を加えた場合、E液のNaClでのみC液のNaClに比べ、浸透圧抵抗が小となったが、H液の如く認められない場合もあり、患者血清中に浸透圧抵抗を減弱化する因子がある事を積極的に支持する成績は得られなかった。③BSG液で洗うことにより、血球に対するウアバインの作用が変化することが示された。

(3) PMD患者赤血球の走査電顕による観察：Echinocyteの出現率は、正常者およびPMD患者では表2の如くである。Mathesonらの方法で処理した数が不充分であるので、断定的な事は言えないが、我々の検索した方法では、かならずしもMathesonらの示したごとく Duchenne 型に著明にEchinocyteが出現し、肢帯型および顔面肩甲上腕型、更に正常人の順に出現率が低くなる事はなかった。これは我々の方法では生理食塩水での洗浄を行なっておらず、脱水過程が緩徐であったためかもしれない。最近、MialeらがMathesonらの結果に異論をのべているが、洗浄および固定に用いた液の浸透圧が明らかにされていないので、詳細に比較検討する事は困難である。

考 案

進行性筋ジストロフィー症、特にその赤血

球の異常は、1967年Brownにより²⁾、Duchenne型PMDの赤血球膜のATPaseが、正常人とは逆にウアバインで活性化される事を示し、Peter³⁾、Araki⁴⁾らの成績もこの事を支持した。一方、膜の組成については、Kunze⁵⁾がSphingomyelinがPMD赤血球膜の方で有意に、多いことを示している。形態学的にもMathesonらはPMD赤血球がEchinocyteとなりやすい事を示しているが、Mathesonらの成績は必ずしも支持されておらず、これは洗浄および固定に用いられた液の浸透圧が異っているためと考えられる。我々の走査電顕での成績はかならずしもMathesonらの成績を支持するものではない。

我国で開発されたCoil Planet Centrifuge法⁶⁾は、赤血球の浸透圧性脆弱性および赤血球膜の性質をみるのに適しており、我々の成績では進行性筋ジストロフィー症患者、とくにDuchenne型PMDでは赤血球の浸透圧抵抗は減弱していることを明らかにした。患者血清と正常人血球を混じても、正常血球を脆弱化するには必ずしもいえず、赤血球自体に何らかの異常があるのではないかと思われる。またウアバインに対する態度は、Duchenne型では 10^{-7} moleでは影響をうけないと考えられるが、 10^{-4} moleでは症例により態度が異なる。これらの結果は赤血球ストローマを用いたATPase活性に対する効果とは必ずしも相関しておらず、同一機序でこれら2つの結

果を説明する事は困難である。

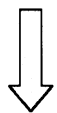
ま と め

今回の研究によって、次の点を明らかにした。すなわち

- (1) PMD患者赤血球は浸透圧性脆弱性があること。
- (2) 赤血球を脆弱にさせる因子は血清中に認めなかったこと。
- (3) 走査電顕で患者と正常者の赤血球形態を比較観察しても処理方法により差異が異なること。

参考文献

- 1) Howland J.L., Challberg M.D.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 50: 574~580, 1973.
- 2) Brown H.D., Chattopadhyay S.K., Patel A.B., *Science* 157: 1577~1578, 1967.
- 3) Peter J.B.: *J. Lab. Clin. Med.* 74: 103~108, 1969.
- 4) Shukuro Araki, Shiro Mawatari: *Arch. Neurology* 24: 187~190, 1971.
- 5) Kunze D., Reichmann G., Egger E., Leuschner G., Eckhard H.: *Clinica Chimica Acta* 43: 333~341, 1973.
- 6) 中川茂男: C P C 彙報, 新技術開発事業団, 三鬼エンジニアリング株式会社, 1975. P. 8



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



目的

進行性筋ジストロフィー症(以下 PMD と略す)の成因としては種々の角度から考えられているが、筋肉のみでなく赤血球膜でも、ATPase の Ouabain(ウアバイン)に対する反応態度や、赤血球膜の脂質構成が正常人と異っている事が明らかにされており、本疾患を全身性疾患として考える者もいる。本研究では我国で開発された Coil Planet Centrifuge(CPC)法および走査電子顕微鏡を用いて、進行性筋ジストロフィー症患者赤血球の浸透圧抵抗、ウアバインによる影響、Echinocyte の出現率などについて研究し、赤血球にも異常があるのか否か、異常をおこす因子は何かを明らかにする事を目的とした。