血液通過性への赤血球膜蛋白の関与
——血流の保存による変化の検討——

高松 滋* 長内 郁子* 川村 洋子*
佐藤 敬* 水野 成徳* 高松 むつ**

The role of changes of erythrocyte membrane
proteins on blood filtrability

——The effect of blood preservation——

Shigeru TAKAMATSU*, Ikuko OSANAI*, Yōko KAWAMURA*,
Kei SATOH*, Seitoku MIZUNO* and Mutsu TAKAMATSU**

Key words: blood filtrability, erythrocyte membrane, proteins,
blood preservation, spectrin, syndein

Erythrocyte participate in low blood filtrability by their decreased stroma ATP content and quality changes in the membrane constituents. This study was intended to clarify fundamental association of erythrocyte membrane proteins with blood filtrability by the observation of changes of erythrocyte membrane proteins following the storage of whole blood added ACD solution. Blood specimens were drawn from 12 healthy volunteers aged 30 to 43 years. Hemorheological and biochemical determinations were carried out immediately after blood collection, on 1, 3, and 6 day after storage at 4°C. Blood filtrability determined by the method of Reid et al. and whole blood glucose decreased on 1, 3, 6 day. Levels of total erythrocyte membrane protein and spectrin 1 decreased on 6 day. Deformability index was directly proportional to the concentration of spectrin 1 in connection with contents of spectrin 2 and 4.1 fraction on blood collection as shown in previous articles. The storage of blood specimens resulted in the gradual disappearance of the above mentioned relations. The index was

* 弘前大学医学部附属脳卒中研究施設病態生理部門〔〒036 弘前市在府町5番地〕, Department of Pathologic Physiology, Institute of Cerebrovascular Diseases, Hirosaki University School of Medicine, Hirosaki, Japan.

** 同 教育学部養護学科〔〒036 弘前市文京町1〕, Training Course of School Nursing, Faculty of Education, Hirosaki University.

in direct proportion to the level of syndein affected by whole blood glucose and glycophorin on 6 day. The results obtained indicate that much attention should be raised to syndein other than spectrin in clinical hemorheology dealing with erythrocyte membrane proteins.

はじめに

脳や心臓などの虚血性病変に重要な意義がある血液が小孔を通過する能力、すなわち通過性 (filtrability) が低下する原因の一つとして赤血球膜の硬化¹⁾ が挙げられる。膜の硬化にはその中に含まれる脂質²⁾ や蛋白³⁻⁶⁾ のかわりがある。そこで、血液流動学的な異常に対する赤血球膜の関与を追究するため血液を保存した際の血液通過性と赤血球膜蛋白の変化について観察した。

I. 方 法

30, 40歳代の健康な男性 12 例から 12 時間絶食後 ACD 液を加えて採血した血液を 4°C に保

存し、採血当日, 1, 3, 6 日後に観察した。赤血球膜 (以下膜) は Dodge ら⁷⁾ の方法により分離, その中に含まれる総蛋白量を Lowry 法により測定, その分画を Weber ら⁸⁾ の方法に従い SDS polyacrylamide gel disc 電気泳動法により分析, これらから赤血球 10⁴ 個の膜に含まれる分画毎の蛋白量を算出した。血液通過性は Reid ら⁹⁾ の方法により測定し, deformability index (DI) として表わした。

II. 成 績

膜蛋白は spectrin (Sp). 1, Sp. 2, ankyrin (Anky.)¹¹⁻¹³⁾, syndein (Synd.)¹⁴⁾ など 15 分画に分離された。表 1 に DI, 全血 ATP, glucose, 膜総蛋白とともに採血直後から 4°C で保存した

Table 1 Changes of parameters

day		0	1	3	6
DI	ml/min	0.68±0.14	0.53±0.16**	0.50±0.14***	0.38±0.11***
ATP	mg/dl	20±4.0	20±4.0	20±2.16	19±4.80
Glucose	"	373±15.6	350±18.0***	331±35.5***	326±19.8**
Sp. 1	ng/10 ⁴ RBC	0.98±0.16	1.00±0.20	0.86±0.19	0.80±0.17**
Sp. 2	"	0.89±0.14	0.91±0.19	0.80±0.18	0.71±0.16***
Ankyrin	"	0.23±0.05	0.24±0.08	0.20±0.05	0.20±0.06
Syndein	"	0.29±0.16	0.40±0.19	0.35±0.07	0.24±0.22
Glycophorin	"	1.95±0.26	2.17±0.38	1.86±0.31	1.84±0.33
4.1	"	0.28±0.04	0.28±0.03	0.26±0.05	0.26±0.04
4.2	"	0.40±0.05	0.43±0.08	0.36±0.09	0.39±0.09
4.3	"	0.23±0.06	0.20±0.08	0.19±0.07	0.22±0.08
4.4	"	0.15±0.03	0.14±0.04	0.11±0.04	0.12±0.04
Catalase	"	0.26±0.05	0.24±0.06	0.21±0.06	0.20±0.05
Actin	"	0.30±0.08	0.29±0.08	0.26±0.08	0.30±0.06
G3PDH	"	0.15±0.06	0.15±0.09	0.12±0.06	0.20±0.06*
7	"	0.25±0.08	0.19±0.09	0.17±0.08	0.20±0.10
8	"	0.18±0.09	0.13±0.12	0.12±0.10	0.14±0.16
Hb	"	0.38±0.38	0.18±0.20	0.38±0.11	0.30±1.16
TMP	"	6.29±0.95	6.95±0.91	6.10±0.46**	6.12±0.89*

*, **, ***: Significant differences compared with values of 0 day. $p<0.05$, $p<0.02$, $p<0.01$, G3PDH: Glucose 3 phosphate dehydrogenase.
TMP: Total erythrocyte membrane protein.

Fig. 1 Influences of erythrocyte membrane proteins on deformability index

時の膜蛋白分画毎の経日変化を示した。採血当日 DI は 0.68 ± 0.14 ml/min, glucose は 373 ± 15.6 mg/dl であったがいずれも 1 日後から有意に低下を続け 6 日後にはそれぞれ 0.38 ± 0.11 ml/min, 326 ± 19.8 mg/dl となった。また、採血当日膜総蛋白は 6.29 ± 0.95 ng/ 10^4 RBC, Sp.1 は 0.98 ± 0.16 ng/ 10^4 RBC, Sp.2 は 0.89 ± 0.14 ng/ 10^4 RBC であったが、膜総蛋白は 3 日後 6.10 ± 0.46 ng/ 10^4 RBC, 6 日後 6.12 ± 0.89 ng/ 10^4 RBC, Sp.1, Sp.2 はそれぞれ 0.80 ± 0.17 ng/ 10^4 RBC, 0.71 ± 0.16 ng/ 10^4 RBC となり、採血当日に比べていずれも有意に低値となった。採血当日 DI と Sp.1 との間には図 1 (左) に示したように有意の正の相関関係がみられ、Sp.1 は Anky., 4.1 分画との間に有意の正の相関関係を示した。1, 3 日後 DI は膜蛋白のいずれの分画との間にも一定の関係を示さなかった。6 日後 DI と Sp.1, Sp.2 との間にはいずれも一定の関係はなかったが、図 1 (右) のように DI と Synd. との間に有意の正の相関関係がみられた。Synd. は Anky. と Synd. との比 (A/S) との間に有意の負の相関関係を、A/S は glucose との間に有意の正の相関関係を示し

た。また、glucose は glycophorin のほか DI との間にも有意の正の相関関係を示した。

ま と め

赤血球膜の裏打ち構造の基本骨格となっている Sp. は Anky. や 4.1 分画とつながりを持ち赤血球変形能に影響を与えている。採血当日の成績はこれを支持している。しかし、6 日後低下した DI への直接のかかわりを持つのは Synd. であり、これには glucose や glycophorin が大きな影響を与えていることが明らかにされた。したがって、赤血球膜の硬化を防止して血液の通過性を改善するには Sp. とともに Synd. およびこれに密接な関係がある Anky. などに注目した対策が講じられなければならない。

文 献

- 1) Weed, R.I.: The importance of erythrocyte deformability. Am. J. Med., **49**; 147~150, 1970.
- 2) Cooper, R.A., Arner, E.C., Wiley, J.S. and Shatliil, S.J.: Modification of red cell membrane struction by cholesterol-rich lipid disper-

- sion. J. Clin. Invest., **55**; 115~126, 1975.
- 3) Ohnishi, T.: Extraction of actin and myosin like proteins from erythrocyte membranes. J. Biochem., **52**; 307~312, 1962.
 - 4) Sheetz, M.P. and Singer, S.J.: On the mechanism of ATP-induced shape changes in human erythrocyte membranes. 1. The role of the spectrin complex. J. Cell Biol., **73**; 638~646, 1977.
 - 5) Lux, S.E.: Spectrin-actin membrane skeleton of normal and abnormal red blood cells. Semin. Hematol., **16**; 21~51, 1979.
 - 6) Palek, J. and Li, S.C.: Dependence of spectrin organization in red blood cell membranes on cell metabolism: Implications for control of red cell shape, deformability and surface area. Semin. Hematol., **16**; 75~93, 1979.
 - 7) Dodge, J.T., Mitchell, C. and Hanahan, D.J.: The preparation and chemical characteristics of hemoglobin-free ghost of human erythrocytes. Arch. Biochem. Biophys., **100**; 119~130, 1963.
 - 8) Weber, K. and Osborn, M.: The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. J. Biol. Chem., **244**; 4406~4412, 1969.
 - 9) Reid, H.L., Barnes, A.J., Lock, P.J., Dormandy, J.A. and Dormandy, T.L.: A simple method for measuring erythrocyte deformability. Clin. Pathol., **29**; 855~858, 1976.
 - 10) Marchesi, V.T. and Steers, E., Jr.: Selective solubilization of a protein component of the red cell membrane. Science, **159**; 203~204, 1968.
 - 11) Bennett, V. and Branton, D.: Selective association of spectrin with the cytoplasmic surface of human erythrocyte membranes. J. Biol. Chem., **252**; 2753~2763, 1977.
 - 12) Hargreaves, W.R., Giedd, K.N., Verkleij, A. and Branton, D.: Reassociation of ankyrin with band 3 in erythrocyte and in lipid vesicle. J. Biol. Chem., **255**; 11965~11972, 1980.
 - 13) Bennet, V. and Stenbuck, P.J.: Association between ankyrin and the cytoplasmic domain of band 3 isolated from the human erythrocyte membrane. J. Biol. Chem., **255**; 6424~6432, 1980.
 - 14) Yu, J. and Goodman, S.: The spectrin-binding protein(s) of the human erythrocyte membrane. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **76**; 2340~2344, 1979.

●葉酸研究の完全なる集大成！

葉 酸 — 基礎と臨床

編集 京都大学内科教授 内野治人 岐阜歯科大学内科教授 外林秀紀
専門医18氏分担執筆

A5判 484頁 図172 表104 定価9,800円(千300円)