

## Electron Spin Resonance (ESR) のスピンラベル法による赤血球膜異常症の赤血球膜流動性の検討

肥後 郁代

3種類のラベル剤を用いて、electron spin resonance (ESR) のスピンラベル法を施行した。対象は、遺伝性球形赤血球症、遺伝性楕円赤血球症、蛋白4.2分画欠損症、遺伝性高ホスファチジルコリン溶血性貧血、発作性夜間血色素尿素の患者赤血球とした。これらのうち細胞骨格分子異常を伴う症例では、健常者に比べ明らかな膜流動性の異常を認めた。また、この膜流動性の変化の度合いは用いたラベル剤によって異なっていた。的確なラベル剤の選択によっては、未だ不明な膜構成分子の機能も察知しうると思われた。

(平成4年10月30日採用)

## Membrane Fluidity Studied by Electron Spin Resonance (ESR) in Red Cells of Various Membrane Disorders

Ikuyo Higo

An ESR study was performed on red cells from patients with various membrane disorders using three types of spin labels; that is, 5-doxyl-stearic acid, 16-doxyl-stearic acid, and maleimide. Experiments were carried out on the red cells of patients with hereditary spherocytosis, hereditary elliptocytosis, band 4.2 deficiency, hereditary high red cell membrane phosphatidylcholine hemolytic anemia (HPCHA), and paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH). In the cases with cytoskeletal abnormalities, band 4.1 deficiency and band 4.2 deficiency, the membrane fluidity was enhanced, while it was diminished in HPCHA and PNH. To elucidate impaired membrane functions in membrane on abnormalities, it is advisable to choose adequate labels for the detection of these abnormalities. (Accepted on October 30, 1992) *Kawasaki Igakkaishi* 18(4): 315-322, 1992

**Key Words** ① ESR study ② Membrane disorders

## はじめに

これまでに多くの溶血性貧血が知られているが、その中には赤血球の変形能が低下するものが存在する。<sup>1)</sup> 赤血球は細胞変形能を有するがために、体内の毛細血管や脾洞を通りぬけることができる。しかし、この変形能が低下すると、赤血球はこれらを通り抜けて体内を循環することができなくなり、溶血をきたしてしまう。

今回、種々の赤血球膜異常症の赤血球に electron spin resonance (ESR) のスピラベル法を用いて膜の局所をラベルし、その流動性を検討した。その結果、赤血球膜異常の種類によって、異なった結果が認められた。

## 材料および方法

### 1) 濃厚赤血球浮遊液の作成

ヘパリン加採血した静脈血を 2000 g, 10 分間遠心し、血漿成分と血球成分に分離した。その後約 5 倍量の 0.9% NaCl にてさらに 3 回洗浄し、十分に buffy coat を取り除き、濃厚赤血球浮遊液を得た。

### 2) スピラベル試薬

脂肪酸スピラベル剤 2 種、すなわち, stearic acid spin labels (SAL): 5-SAL および 16-SAL と、蛋白ラベル剤 1 種、すなわち, maleimide label (MAL-6) を用いた。5-SAL は nitroxide radical をアシル基の第 5 位に持ち、細胞膜の親水基近くに結合し、16-SAL は nitroxide radical をアシル基の第 16 位に持ち疎水部近くに結合する。即ち、5-SAL は膜表面の、16-SAL は膜深部層の動的環境を示すことになる。また、MAL-6 は SH 基に結合する。従って MAL-6 は赤血球膜においては、主にスペクトリンに結合し、膜骨格蛋白の状態を示すことになる。

### 3) スピラベル法

5-SAL, 16-SAL のラベルについては前述のごとく,<sup>2)</sup> ラベル剤の thin film を作成した試験

管内に赤血球浮遊液を入れ、37°C 15 分間にてラベルを施行した。

一方、MAL-6 をラベルするためには、まず、赤血球膜 ghost を作成し、thin film 化したラベル剤とその膜 ghost を 4°C 15 時間反応させた。なお、膜 ghost は、5 mM Tris HCl, 7 mM NaCl, 0.2 mM phenyl-methylsulfonyl fluoride (PMSF), pH 7.4, 37°C の低張溶液を用いて作成した。

いずれにおいてもラベル終了後は十分量の buffer にて洗浄し、その上清に free のラベル剤が存在しないことを確認した後、測定に使用した。また、ラベルした膜 ghost は 130 mM KCl, 10 mM NaCl, 10 mM Tris, 0.2 mM PMSF, pH 7.4, 37°C の等張溶液にて resealing を施行した後、測定に用いた。

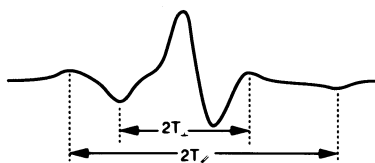
### 4) ESR 測定装置と ESR スペクトル解析

作成した試料をマイクロピペットに取り、それを ESR 測定用試料管にいれ、cavity 内温度を 37°C に設定した ESR 測定装置 (日本電子 JES-RE2X 型) にて測定した。測定条件は power: 10 mW, field:  $327.5 \pm 5$  mT, sweep time: 2 min., modulation: 100 kHz, amplitude:  $2 \times 100$  とした。

スピラベル剤は、それが存在する周囲の環境の束縛の程度によって、異なったスペクトルを描く。全く束縛のない溶液中では、radical が自由に運動できる (等方性回転) ため、先鋭な 3 本のシグナルを認める。しかし、radical が膜内に取り込まれ、運動が束縛されるようになると、異方性回転をとり、シグナルも変形していく。<sup>3,4)</sup> 生体膜においては、深層ほど流動性が高くなるため、膜の浅層と深層では異なった ESR のスペクトルが得られる。各々の部位のスペクトルを定量化するために、5-SAL では order parameter を、16-SAL では motion parameter を用い、流動性の指標とした (Fig. 1)。この order parameter および motion parameter はその値が小さいほど、その局所の流動性が高いことを示す。<sup>5,6)</sup>

MAL-6 については、Figure 1-(3)のごとく

(1) 5-SAL

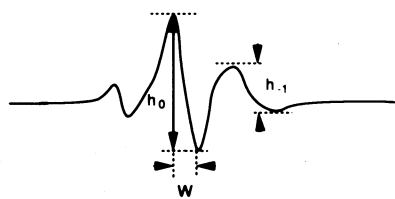


$$\text{Order parameter (S)} = \frac{1}{2} (3 \cos^2 \theta - 1)$$

$$= \frac{T_{\parallel} - T_{\perp}}{T_{ZZ} - \frac{1}{2}(T_{XX} + T_{YY})} = \frac{1/3(T_{XX} + T_{YY} + T_{ZZ})}{1/3(T_{\parallel} + 2T_{\perp})}$$

( $T_{XX}, T_{YY}, T_{ZZ}$  : hyperfine coupling constant)

(2) 16-SAL



$$\text{Motion parameter} = K \cdot W [(h_0/h_{-1})^{1/2} - 1]$$

(K : hyperfine coupling constant)

(3) MAL-6

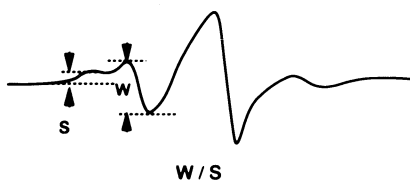


Fig. 1. Diagrams of electron spin resonance in 5-SAL or 16-SAL-labeled intact red cells, and in MAL-6-labeled red cell ghosts

W/S比を用いて流動性の指標としたが、これは値が高いほど流動性が高いことを示す。<sup>7)</sup>

5) 対象

正常者：47例, hereditary spherocytosis (HS)：17例, hereditary elliptocytosis (HE)：14例, band 4.2 deficiency：4例, hereditary high red cell membrane phosphatidylcholine hemolytic anemia (HPCHA)：1例, paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH)：13例について検索した。

6) 熱処理

Band 4.2 deficiencyの赤血球については、さらに37, 41, 43, 45, 47°Cの熱処理を10分間施行した後、MAL-6ラベルを行い、37°Cにて流動性を測定した。

結 果

1) 正常コントロール (Table 1)

Table 1. Membrane fluidity studied by electron spin resonance in intact red cells of membrane disorders

Disorders	Order parameter (by 5-SAL)	Motion parameter ( $\times 10^{-10}$ ) (by 16-SAL)
Control	0.667 $\pm$ 0.004 (N=47)	7.71 $\pm$ 0.40 (N=35)
HS	0.667 $\pm$ 0.005 (N=17)	7.72 $\pm$ 0.29 (N=17)
Presplenectomy	0.667 $\pm$ 0.005 (N=11)	7.80 $\pm$ 0.32 (N=11)
Postsplenectomy	0.668 $\pm$ 0.005 (N=6)	7.59 $\pm$ 0.18 (N=6)
HE	0.669 $\pm$ 0.007 (N=14)	7.52 $\pm$ 0.42 (N=9)
Band 4.1 deficiency	0.669 $\pm$ 0.006 (N=12)	7.38 $\pm$ 0.32 (N=7)*
Band 4.2 deficiency	0.672 $\pm$ 0.004 (N=4)*	7.13 $\pm$ 7.19 (N=2)
HPCHA	0.672 (N=1)	7.84 (N=1)
PNH	0.676 $\pm$ 0.007 (N=13)**	7.81 $\pm$ 0.32 (N=13)

HS : hereditary spherocytosis

HE : hereditary elliptocytosis

HPCHA : hereditary high red cell membrane phosphatidylcholine hemolytic anemia

PNH : paroxysmal nocturnal hemoglobinuria \* : p < 0.05 \*\* : p < 0.001

正常者47例における order parameter は,  $0.667 \pm 0.004$ , motion parameter ( $\times 10^{-10}$ ) は,  $7.71 \pm 0.40$  であった. また, 正常者19例における W/S 比は  $3.34 \pm 0.27$  だった.

2) HS 症例

HS 患者17症例における order parameter は,  $0.667 \pm 0.005$ , motion parameter ( $\times 10^{-10}$ ) は  $7.72 \pm 0.29$  で, 正常者との間に有意差は認めなかった. またこの結果は, 摘脾前の患者(11例)赤血球では, 各々  $0.667 \pm 0.005$ ,  $7.80 \pm 0.32$ , 摘脾後の患者(6例)赤血球では  $0.668 \pm 0.005$ ,  $7.59 \pm 0.18$  で, いずれも有意差を認めなかった.

3) HE 症例

HE 患者14症例における order parameter は  $0.669 \pm 0.007$ , motion parameter ( $\times 10^{-10}$ ) は  $7.52 \pm 0.42$  と正常者との間に有意な差を認めなかった. しかし, 細胞骨格の band 4.1 蛋白が欠損している7例については, motion parameter ( $\times 10^{-10}$ ) は  $7.38 \pm 0.32$  で,  $p < 0.05$  となった. また, W/S 比も, band 4.1 蛋白欠損例では,  $3.93 \pm 0.48$  で  $p < 0.02$  と有意差を認めた (Fig. 2).

4) band 4.2 蛋白欠損症

band 4.2 蛋白欠損症4例における order parameter は  $0.669$ ,  $0.669$ ,  $0.678$ ,  $0.672$  と1例だけ高値を示したが, 4例まとめると  $0.672 \pm 0.004$  で  $P < 0.05$ , 高値であった1例を除くと  $0.670 \pm 0.002$  で  $P < 0.5$  だった. 一方, motion parameter ( $\times$

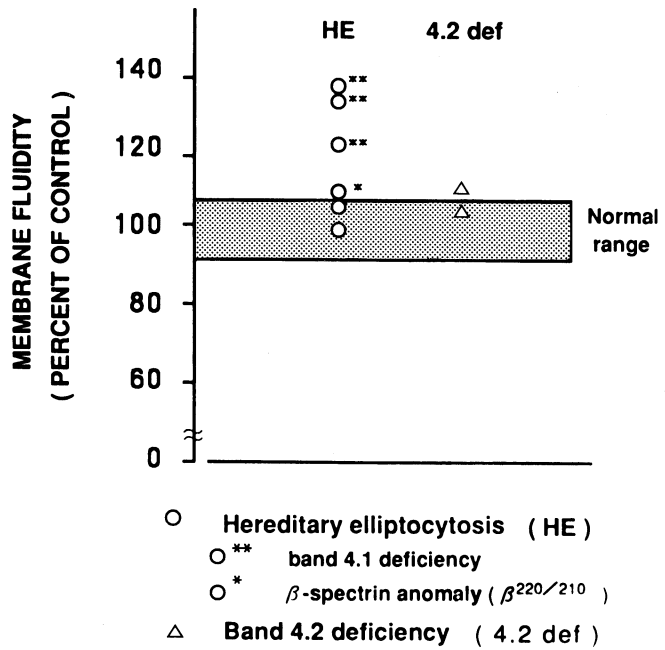


Fig. 2. Increased membrane fluidity studied by electron spin resonance in MAL-6-labeled red cell ghosts

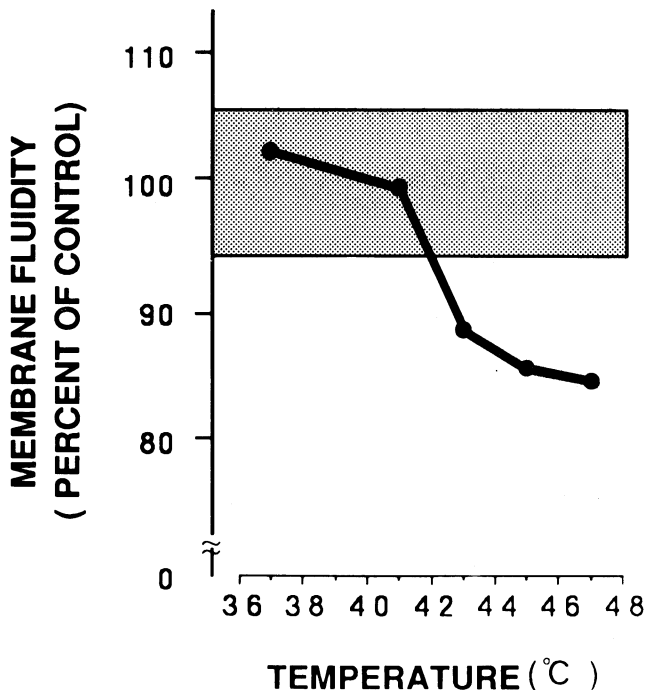


Fig. 3. Decreased membrane fluidity studied by ESR in MAL-6-labeled red cell ghosts of band 4.2-deficiency under heat treatment

$10^{-10}$ ) は2例のみの検索であるが、7.13, 7.19と著差を認めた。また、MAL-6によるW/S比は、 $3.63 \pm 0.11$ で  $P < 0.5$ となった。

熱処理施行後のMAL-6の流動性は37, 41°Cでは正常赤血球と差を認めなかったものの、43, 45, 47°Cでは正常血球の89, 86, 85%と低下していた (Fig. 3)。

### 5) その他の膜異常症

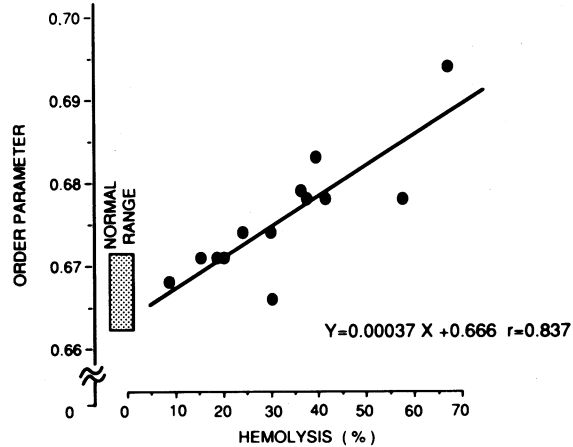
HPCA及びPNHについては、order parameter, motion parameter ( $\times 10^{-10}$ )の順にそれぞれHPCA: 0.672, 7.84, PNH:  $0.676 \pm 0.007$  ( $P < 0.001$ ),  $7.81 \pm 0.32$  ( $P < 0.5$ )となった。またPNH症例におけるorder parameter, motion parameterの値とHam testの成績との間には相関係数0.837及び0.479と、order parameter, 即ち膜浅層の膜流動性との間に高い相関が認められた (Fig. 4)。このHam testの成績との対比所見は、sugar water testにおいてもほぼ同様であった。更に

5-SALによるorder parameterと、two color analysisによるdecay accelerating factor (DAF)陰性かつMACIF陰性赤血球 (TCA class III)の比率の間にも高い相関 ( $r=0.991$ ) が得られ、同時にDAFおよびMACIFの正常活性を有するTCA class I赤血球の間には逆相関が認められた ( $r=0.991$ ) (Fig. 5)。

## 考 察

赤血球膜は、脂質二重層と構造蛋白および骨格蛋白からなる。従来より細胞の変形能には、細胞骨格が関与すると言われてきたが、この主な

### LABELING BY 5-SAL



### LABELING BY 16-SAL

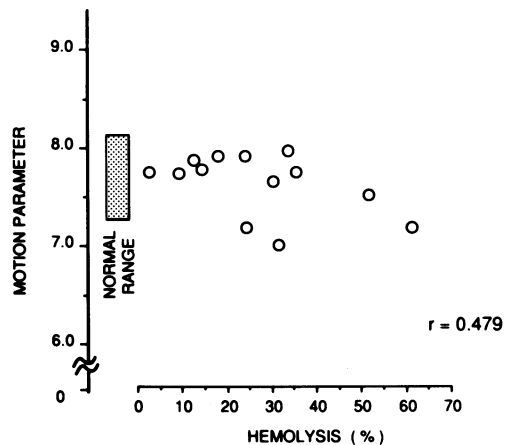


Fig. 4. Relationship between membrane fluidity and extent of hemolysis in Ham test

ものとして、骨格蛋白であるスペクトリン、アンキリン、アクチン、band 4.1蛋白等が含まれる。今回、この骨格蛋白異常を含む溶血性貧血の赤血球を用いて、スピラベル法により膜の流動性を検討してみた。なお、このスピラベル法を用いると、ラベル剤の選択によっては、目的とする分子の動きを直接知ることが可能である。

まず、HS赤血球の変形能が低下していることは、microcapillary法およびfiltration法によりよく知られている。<sup>1),8),9)</sup> その原因として細胞内粘度の上昇、表面積/容積比の減少、脂質分画の変化、脂質・蛋白間の相互関係の変化等が示

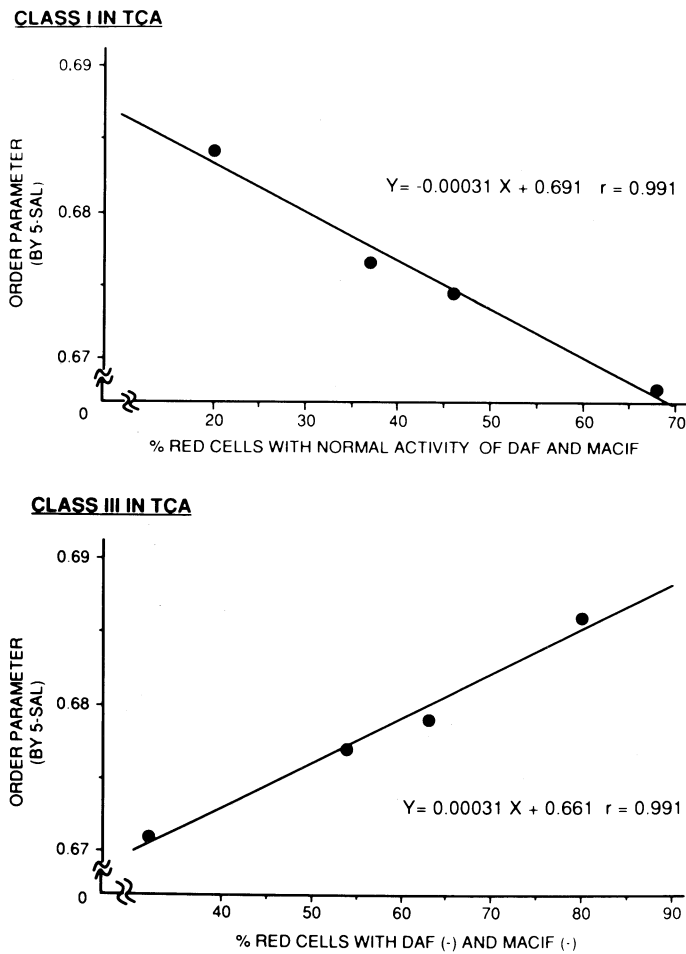


Fig. 5. Membrane fluidity studied by electron spin resonance with 5-SAL in PNH-red cells classified by two color analysis on DAF and MACIF

唆されている。今回膜の極く浅層と、深層の流動性を調べてみたが、両者とも明らかな異常は認めなかった。HS 症例は摘脾により、赤血球の形態も膜脂質も変化するが、今回の検討では、摘脾の有無による流動性に、差は認められなかった。摘脾前後で膜脂質が変化するにも関わらず、今回のラベル剤でその変化がつかまえていないのは、この脂質の変化が脂質二重層の中間層で起こっている可能性もあり、<sup>10)</sup> 12-SAL 等の膜中間部のラベル剤を用いて同様に検討する必要もあろう。

次に HE 症例であるが、今回検索し得た HE 症例のうち、分子異常として band 4.1 欠損およ

び  $\beta$  スペクトリン異常をもつ症例を含んでいる。これらの骨格蛋白異常、特に欠損がある場合には、膜脂質の浅層のラベルでは、変化を認めなかったが、膜脂質の深層のラベルでは、膜流動性が増加する傾向が、また、蛋白ラベルでは、明らかな流動性の増加が認められた。この変化は、骨格蛋白として重要である band 4.1 蛋白の欠損が膜流動性にも反映したものと思われる。ところで、骨格蛋白の異常あるいは欠損によって、細胞変形能が低下することはよく知られている<sup>9),11)</sup> が、スピラベル法を用いると、病因となる分子異常の種類に応じて、その測定結果を異にする可能性が示唆される。

band 4.2 欠損症は我が国に比較的特異的な疾患であるが、現在まだ band 4.2 蛋白の機能は明確にはなっていない。しかし、ektacytometry による患者赤血球の変形能は、37°C では正常者と変わらないもの

の、46°C 以上の熱処理を加えると正常赤血球に比し、著明な低下を認めることが知られている。<sup>12)</sup> 37°C においては、5-SAL ラベルによる膜流動性は 1 例では正常に比し低下していた。これは、この症例が他の 3 例とは異なる機能異常を持っている可能性もあり、今後検討が必要である。また、16-SAL ラベルは 2 例にしか施行していないが、正常より流動性が顕著に増大する傾向が認められた。また、患者赤血球に熱処理を加えた後に MAL-6 ラベルを施行し、37°C で膜流動性を測定すると、43°C 以上で、正常赤血球に比べ明らかに流動性が低下した。これらの結果は band 4.2 蛋白が細胞骨格に何らかの関与をする

ことを示す所見であると思われた。しかし、band 4.2 蛋白の機能を探るためには、今後さらに種々の検討を重ねる必要がある。

その他の膜異常症として HPCHA および PNH についても検索し得た。HPCHA は膜の総脂質量と phosphatidylcholine (PC) の絶対的増加を特徴に持つ。これまでに HPCHA の赤血球に 5-SAL ラベルを施行した際の報告<sup>13)</sup>があるが、これでは患者赤血球から抽出したリン脂質のリポゾームの流動性は増加するものの、赤血球の膜流動性には変化は認められていない。一般に PC の増大は流動性の増加を来とし、free cholesterol (FC) の増大は流動性の低下を来すと言われているが、患者のリン脂質のリポゾームで流動性が増加するのはこの PC の増大を反映するもので、赤血球全体としての流動性に変化を認めないのは PC の増大に伴い FC の増大が認められているためと考察している。今回の検索では 5-SAL ラベルでは正常コントロールと著差を認めなかったが、16-SAL ラベルでは流動性が低下する傾向を示した。HPCHA 症例の赤血球膜の分子状態については、症例を重ね、検討する必要がある。

近年 PNH の病態に glycosylphosphatidylinositol (GPI) 蛋白の欠損が指摘されてきている<sup>14)</sup>が、今回 16-SAL すなわち膜深層のラベルでは大きな異常を認めなかったものの、5-SAL すなわち膜浅層のラベルを用いた際に膜流動性の低下が認められ、この低下の程度は Ham test

の結果、さらには、DAF および MACIF 陰性赤血球の比率との間に高い相関関係を認めた。これらの結果は、PNH 赤血球の病因の主座が GPI 蛋白の構成成分である PI、糖鎖、蛋白部分など様々な可能性があげられる中で、特に糖鎖添加に関する生合成過程が注目されている現在、病因の主座解明につながる可能性もあると思われた。なお 5-SAL による order parameter が病状との相関を呈することは Ham test との対比結果から明らかとなった。

以上、いくつかの赤血球膜異常症について述べてきた。今後検討を重ねる必要はあるが、スピララベル法をうまく利用することにより、細胞構成分子の状態およびその分子の機能を察知しうるということが可能であり、また症例によっては病気の重症度を推察することも可能であると思われる。

ところで、細胞の変形能に異常を来すものとして、他の血液疾患(鉄欠乏性貧血、白血病等)や、血液疾患以外の筋ジストロフィー、糖尿病、高血圧、ステロイド服用者等も知られており、膜流動性の検討と各症例の病態との関連についての検討がこれらの方面へ応用されることも考えられる。

稿を終えるにあたり、ご指導、ご校閲を賜った川崎医科大学化学教室 細川桂一教授、川崎医科大学血液内科 八幡義人教授、ならびに直接ご指導いただいた同科 神崎暁郎講師に深甚なる謝意を表します。

## 文 献

- 1) Lacelle, P. L. : Alteration of membrane deformability in hemolytic anemia. *Semin. Hematol.* 7: 355-371, 1970
- 2) 肥後郁代, 神崎暁郎, 八幡義人, 細川桂一: Ektacytometry 及び Electron Spin Resonance (ESR) 法を用いた赤血球膜物性の検討. *川崎医会誌* 18: 305-313, 1992
- 3) 石津和彦: 実用 ESR 入門. 東京, 講談社. 1981, pp. 145-156
- 4) Larry, M. G. and Cyril, C. C. : Electron spin resonance analysis of model and biological membranes. *In Methods for studying membrane fluidity*, ed. by Roland, C. A., Cyril, C. C. and Larry, M. G. New York, Alan. R. Liss, Inc. 1988, pp. 25-88
- 5) Simon, I. : Differences of membrane unsaturated fatty acids and electron spin resonance in different types of myeloid leukemia cells. *Biochim. Biophys. Acta* 556: 408-422, 1979

- 6) Henry, S. A. and Keith, A. D. : Membrane properties of saturated fatty acid mutants of yeast revealed by spin labels. *Chem. Phys. Lipids*. 7 : 245-265, 1971
- 7) Farmer-II, B. T., Harmon, T. M. and Butterfield, D. A. : ESR studies of the erythrocyte membrane skeletal protein network : influence of the state of aggregation of spectrin on the physical state of membrane proteins, bilayer lipids, and cell surface carbohydrates. *Biochim. Biophys. Acta* 821 : 420-430, 1985
- 8) Mohandas, N., Phillips, W. M. and Bessis, M. : Red blood cell deformability and hemolytic anemias. *Semin. Hematol.* 16 : 95-114, 1979
- 9) Mohandas, N., Chasis, J. A. and Shohet, S. B. : The influence of membrane skeleton on red cell deformability, membrane material properties, and shape. *Semin. Hematol.* 20 : 225-242, 1983
- 10) Jansson, S-E., Johnsson, R., Gripenberg, J. and Vuopio, P. : The fluidity gradient in erythrocyte membranes in hereditary spherocytosis : a spin label study. *Br. J. Haematol.* 46 : 73-78, 1980
- 11) 高桑雄一 : 赤血球膜機能の維持における4.1蛋白の役割—4.1蛋白欠損赤血球の再構築による膜機能の回復. *医のあゆみ* 155 : 935-939, 1990
- 12) 阿多雄之, 八幡義人 : 我が国に特有な赤血球膜 band 4.2異常症. *医のあゆみ* 155 : 900-906, 1990
- 13) Yawata, Y., Sugihara, T., Mori, M., Nakashima, S. and Nozawa, Y. : Lipid analyses and fluidity studies by electron spin resonance of red cell membranes in hereditary high red cell membrane phosphatidylcholine hemolytic anemia. *Blood* 64 : 1129-1134, 1984
- 14) 植田悦子, 木谷照夫, 木下タロウ : PNH における membrane protein anchors の異常. *Annual Review 血液*, 東京, 中外医学社. 1988, pp. 15-21