

赤血球膜陰性荷電測定の基礎的検討

北野 裕一

Alcian blue による赤血球膜陰性荷電測定法の検討を行った。Alcian blue 使用液は、精製 Alcian blue を等張酢酸緩衝液 (pH 5.5) に完全に溶解したものを使用した。また、抗凝固剤入り静脈血は、生理食塩水で、140 G, 20分間, 3回洗浄した。測定法は次のごとくまとめられる。すなわち、1.0 ml の赤血球懸濁液と 5.0 ml の Alcian blue 使用液を混合後、直ちに、140 G, 5分間遠心し、その上清の吸光度を 650 nm で測定し、赤血球膜への Alcian blue 結合量を求めた。この方法を用いて行った同一対照例の反復測定の結果は、 124.8 ± 2.6 ng, 正常コントロールの結果は、 123.6 ± 7.8 ng であった。これらの値は、従来行ってきた方法に比べて、SD を著しく小さくすることができ、赤血球膜陰性荷電測定の精度をあげるものであった。

(平成元年10月24日採用)

Measurement of the Charge on Red Blood Cells by Alcian Blue

Yuichi Kitano

An improved method of measuring of negative charge on the surface of red blood cells by Alcian blue was established. Alcian blue reagent was prepared with use of purified Alcian blue by dissolving it into isotonic acetate buffer (pH 5.5). Venous blood was washed three times with a combination of 0.9% NaCl and centrifugation (140 G for 20 min). An amount of 1.0 ml RBC suspension was mixed by inversion with 5.0 ml of Alcian blue solution. Immediately, after removal of the cells by centrifugation (140 G for 5 min), the optical density of the supernatant was measured at wave length 650 nm, and calculated the value of Alcian blue binding for a million of RBC. The methodological variations (SD) were 2.6 ng at around 125 ng in six repeated examinations and the normal values were 123.6 ± 7.8 ng (n=11). The comparison of these two SD values may indicate the method is reliable and accurate for the measurement of red cell membrane negative charge by Alcian blue. (Accepted on October 24, 1989) *Kawasaki Igakkaishi* 15(4): 586-592, 1989

Key Words ① The negative charge on red blood cell ② Alcian blue

はじめに

1985年, Levin らは, Alcian blue を用いて, ステロイド反応性ネフローゼ症候群の赤血球膜陰性荷電を測定した.¹⁾その後, この方法を用いて, 腎疾患や糖尿病における赤血球膜陰性荷電の検討がなされてきた.^{2), 3)}著者も, 従来よりこの方法を用いて, 腎疾患の赤血球膜陰性荷電を測定してきた. しかし, Alcian blue の水への溶解性, 洗浄赤血球の遠心時間および incubation の時間など多くの問題が内在していた. そこで, 今回, Alcian blue を用いた赤血球膜陰性荷電の測定法について再検討を試みた.

試薬および測定方法

1) 試薬

- a) 精製 Alcian blue 8GX(以下 AB と略す) 市販の AB (半井化学製, 55%含有) を, アセトン-水系を用いる. Scott の方法に準じて精製した.⁴⁾
- b) メトリザマイド (半井化学製)
- c) 酢酸 (特級, 半井化学製)
- d) 酢酸ナトリウム (特級, 半井化学製)
- e) 塩化ナトリウム (特級, 半井化学製)

2) 試薬の調製

- a) pH 5.5 等張酢酸緩衝液

酢酸ナトリウム	2.04 g (0.15 M)
蒸留水	100 ml

 上記の溶液を酢酸で, pH 5.5 に調製する.
- b) AB 溶解液

精製 AB	20 mg
0.1 N 酢酸	2 ml
pH 5.5 等張酢酸緩衝液	100 ml

 精製 AB は, 乳鉢でよくすりつぶし, 0.1 N 酢酸に完全に溶解させた後, 全量を酢酸緩衝液に加えた.
- c) 25% メトリザマイド

メトリザマイド	5 g
蒸留水	20 ml
- d) 0.9% NaCl

3) 測定方法

- a) 3.8% クエン酸ナトリウム 1.0 ml に被検者静脈血 9.0 ml を採血し, 140 G (1000 rpm), 10分間遠心, 上清を除去する.
- b) 25% メトリザマイド 1.0 ml を加え, 1000 G, 15分間遠心, buffy coat を除去する.
- c) その後, 0.9% NaCl で 3回, 140 G, 20分間洗浄し, 約 2.0 ml の沈殿させた赤血球を作製する.
- d) この沈殿させた赤血球 2.0 ml に, 0.9% NaCl を加え, 7.0 ml の赤血球浮遊液を作製する.
- e) この赤血球浮遊液の赤血球数を血球計算盤を用いて計算する. 赤血球数は, $150 \sim 200 \times 10^4 / \mu\text{l}$ 付近である.
- f) この赤血球浮遊液 1.0 ml に $200 \mu\text{g/ml}$ の AB 溶解液 5.0 ml を加え, 転倒混和する. コントロールとして, 0.9% NaCl 1.0 ml に, $200 \mu\text{g/ml}$ の AB 溶解液 5.0 ml を加え, 同様に処理する. その後, 140 G, 5分間遠心し, 赤血球を除去する. その上清を 650 nm (島津紫外可視分光光度計 UV-160 A) で比色分析を行う.
- g) 赤血球 1×10^6 個あたりの AB 結合量を計算する. すなわち, 式) $(A - B) \div C \times 4.55 \times 10^{11}$ で, A はコントロールの比色値, B は検体の比色値, C は 1.0 ml 中の赤血球数であり, 単位は ng である. これを用い計算した.

成績

1) AB の構造及び特性

AB の構造は, **Figure 1** へ示すごとく, 四つの陽性荷電をもつ銅錯化合物で, 分子量 1299, 650 nm の波長でのモル吸光係数は, 17.57 であった. また, ブタノール 20 ml, 酢酸 10 ml, 蒸留水 50 ml の上層を用いたセルロースクロマトグラフィの結果, AB は三分画に分かれるが, 大部分は一つの分画にあり, 他の二つの分画は, 側鎖のとれたものや dimer などと判断されるものであった. 次に, カル

ポキシメチルセルロース (CM セルロース) 樹脂やジエチルアミノエチルセルロース (DEAE セルロース) 樹脂を、それぞれ AB 溶解液に加え、両官能基への結合性を調べると、CM セルロース樹脂は AB で青色に染まったが、DEAE セルロース樹脂の方は、吸着による変化が見られなかった。すなわち、AB は、カルボキシル基と瞬時に結合するが、ジエチルアミノエチル基および糖の水酸基とは結合しないことが明らかになった。この結果から、AB は赤血球膜上で、シアル酸のようなカルボキシル基をもつ陰性荷電とのみ結合することが示唆された。

2) AB 溶解液の検討

試薬の調製法に従って、0.1 N 酢酸に溶解した AB 液を以下の ①~⑨ の等張緩衝液に加え、その溶解性を調べた。すなわち、① phosphate buffered saline (以下 PBS と略す): pH 7.4,

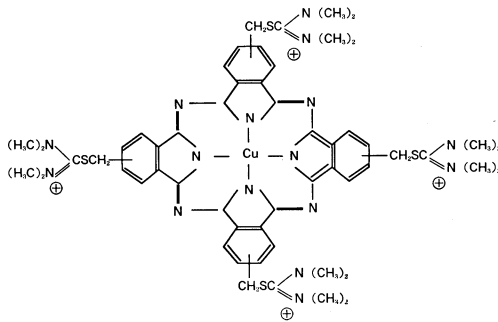


Fig. 1. Structure of Alcian blue 8GX

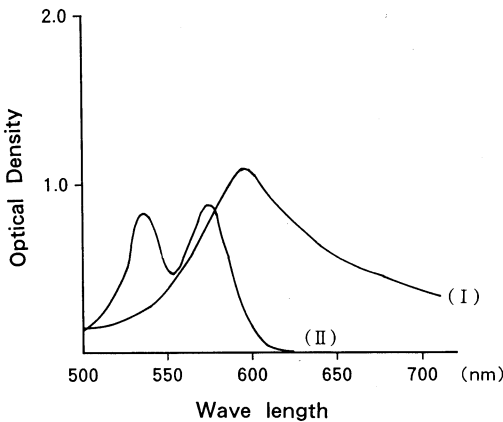


Fig. 2. Absorption spectra of Alcian blue 8GX (I) and hemoglobin (II)

0.15 N 酢酸緩衝液: ② pH 6.0, ③ pH 5.5, ④ pH 5.0, ⑤ pH 4.5, 0.10 N クエン酸緩衝液: ⑥ pH 6.0, ⑦ pH 5.5, ⑧ pH 5.0, ⑨ pH 4.5 において、完全に溶解したのは、③ pH 5.5, ④ pH 5.0, ⑤ pH 4.5 の酢酸緩衝液のみであった。

3) 酢酸緩衝液の溶血への影響

緩衝液に溶解させた AB 溶解液は、最終的には、赤血球と反応させる。そこで、pH 5.5, pH 5.0, pH 4.5 の各酢酸緩衝液 5.0 ml に、測定方法に従って調製した赤血球浮遊液 1.0 ml を加えて、溶血について経時的変化を測定した。その結果、pH 5.5 の酢酸緩衝液で、溶血がほとんどおこらないことが示されたので、pH 5.5 酢酸緩衝液を AB 溶解液に用いることにした。

4) AB 溶解液の吸収スペクトル及び検量線

pH 5.5 酢酸緩衝液に溶解した AB の吸収スペクトルを、Figure 2 へ示す。最大吸収波長は、597.0 nm であった。また、同じ酢酸緩衝液中のヘモグロビンの最大吸収波長は 576.0 nm であり、測定波長を 597.0 nm とすると、溶血による影響を受け、測定値に誤差が生じるため、それを避けた測定波長として、650.0 nm を採用した。次に、この AB 溶解液で、100 μg/ml, 200 μg/ml, 300 μg/ml の濃度の溶液を作製し、検量線を作製した (Fig. 3)。検量線は直線的で、Beer の法則に従い、650.0 nm

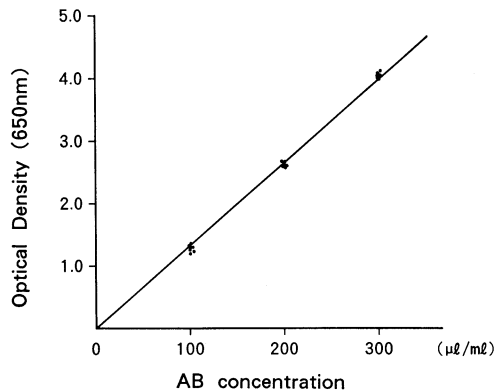


Fig. 3. Correlation between expected optical density and AB concentration

の測定波長での $100 \mu\text{g/ml}$ の吸光度は 1.32 であった。

5) 赤血球洗浄液及び AB 溶解液の安定性

赤血球の洗浄に、従来から使用されている pH 7.4 PBS と今回洗浄に用いた 0.9% NaCl の両者の AB 溶解液への影響を検討した。37°C、振盪数 100 回/分で、incubation したときの経時的吸光度変化を調べると、PBS も NaCl も、吸光度の変化に差はなく、30 分では両者とも、まったく吸光度の減少はなかった。120 分で、約 5% の吸光度の減少を示した。しかし、PBS の測定値は、NaCl に比し、変動が大きかった (Fig. 4)。このため、今回の測定では、赤血球洗浄に、0.9% NaCl を用いることにした。また、振盪数 50 回/分でも上記と同様な結果が得られた。Alcian blue 溶解液のみの場合、120 分後には、3.7% の吸光度の減少が認められた。

6) incubation time の検討

incubation time を決定するため、37°C、振盪数 100 回/分で、 $300 \mu\text{g/ml}$ の AB 溶解液 5.0 ml に、赤血球浮遊液 1.0 ml を加え、incubation したところ、視覚的に 60 分後には、明らかな溶血が認められた。そこで、37°C 振盪数 50 回/分で、0 分、4 分、10 分、20 分と incubation したときの赤血球 1×10^6 個に対する AB 結合量を検討した。0 分とは、AB 溶解液

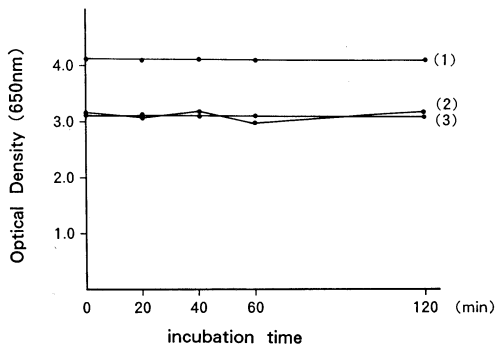


Fig. 4. Correlation between incubation time and expected optical density (1) Alcian blue $300 \mu\text{g/ml}$ (ab), (2) ab 5.0 ml + pH 7.4 PBS 1.0 ml, (3) ab 5.0 ml + 0.9% NaCl 1.0 ml (incubation: 37°C, vibration 100/min)

5.0 ml に赤血球浮遊液 1.0 ml を入れ、転倒混和し、直ちに、140 G、5 分間遠心し、赤血球を除去したものである (Fig. 5)。この結果、混和直後において、すでに最大量の AB が赤血球膜に結合し、その後の incubation において、AB 結合量には変化が認められなかった。したがって、incubation はせず、転倒混和のみでも、十分、AB と赤血球膜の陰性荷電物質とは結合するものと判断され、また溶血の危険性も考慮して、AB と赤血球の結合反応は、転倒混和のみを行うことにした。

7) AB 量と AB 結合量

赤血球と反応させる AB 量を $100 \mu\text{g}$ から $1500 \mu\text{g}$ の間で変化させ、赤血球 1×10^6 個あたりの AB 結合量を測定した。各 AB 量における赤血球との反応後の全溶液量は、いずれも 6.0 ml であった (Fig. 6)。この結果、少なくとも AB

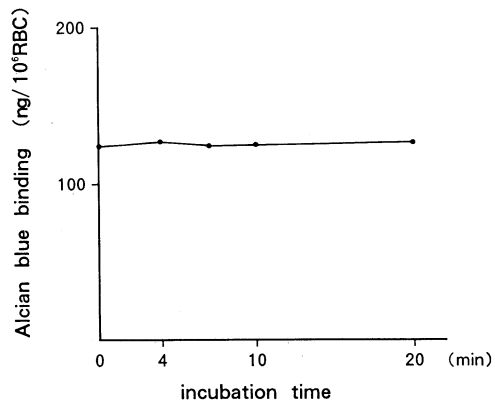


Fig. 5. Correlation between incubation time and Alcian blue binding to RBC (incubation: 37°C, vibration 50/min)

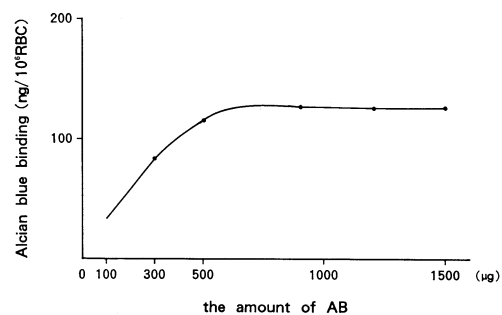


Fig. 6. Correlation between the amount of AB and Alcian blue binding to RBC

量が 900 μg 以上では、赤血球に結合する AB 量は、ほぼ一定であることがわかった。今回の測定では、赤血球と反応させる AB 量を、1000 μg と決めた。

8) 赤血球洗浄時の遠心時間と AB 結合量

赤血球洗浄時の遠心時間を、5分、10分、20分で検討した (Fig. 7)。3回洗浄後、20分の遠心時間では上清は無色透明であったが、それと比較して、5分と10分では、洗浄後上清に血清色が残る傾向があり、また AB 結合量も、20分比べ、ばらつきが大きかった。このため、今回の測定では、赤血球洗浄時の遠心時間は、20分間とした。

9) 操作終了後より吸光度測定までの経過時間と AB 結合量

赤血球と AB 溶解液を反応させ、転倒混和後、140 G、5分間遠心、赤血球を除去し、室温下で放置し、0分、10分、20分、30分後の測定時に十分攪拌した上で、吸光度測定を行った。その結果、吸光度の低下は認められなかった。

10) 同一対照例での反復測定値及び正常コントロール値

同一対照例での6回の反復測定を行った結果、赤血球 1×10^6 個に対する AB 結合量は、平均 124.8 ng、標準偏差 2.6 ng であり、正常コントロール 11名 (男 6名、女 5名、平均年齢 28.3歳) では、平均 123.6 ng、標準偏差 7.8 ng であった (Fig. 8)。

考 察

腎糸球体毛細管は陰性荷電の charge barrier としても機能し、糸球体での蛋白選択透過性を規定する重要な因子のひとつとして知られている。一方、赤血球膜の表面にも、陰性荷電が存在し、連鎖形成を防止し、さらに存在している補体成分 C_3b receptor (CR-1 complement receptor) が、網内系への免疫複合体の運搬をつかさどっている。この CR-1 は、赤血球膜とともに腎糸球体上皮細胞にも存在し、⁵⁾

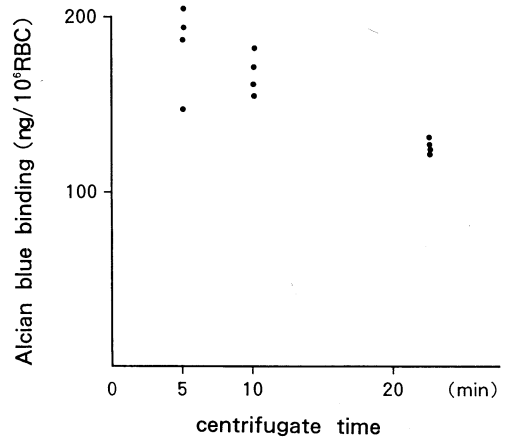


Fig. 7. Correlation between centrifugate time and Alcian blue binding to RBC

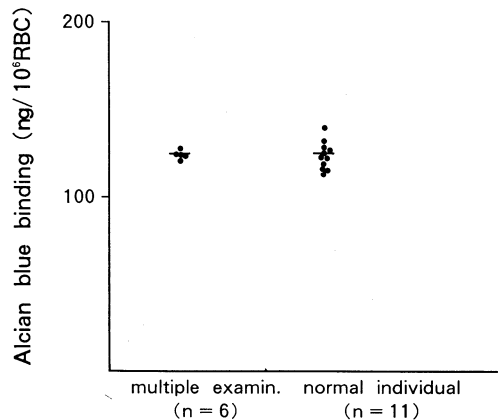


Fig. 8. Alcian blue binding to RBC in multiple examinations in one specimen and the values of normal individual

赤血球膜と腎糸球の構造上と機能上の共通性が推測される。腎疾患における尿蛋白の存在は、腎糸球体の障害による陰性荷電の減少も原因のひとつとして疑われているが、常時、腎生検を反復して行うことは不可能である。最近、腎糸球体の荷電状態が、赤血球膜の荷電状態にも反映されているという注目すべき報告がある。^{1),2)} 赤血球は比較的容易に得ることができ、しかも反復検査も可能である利点がある。そこで、著者も、この方法を追試してみたが、十分満足すべき測定法とは、みなしにくく、今回、この方法を吟味、検討を行い、測定法の確立を行った。

ABは、その構造により、四つの陽性荷電をもつ物質であり、酸性官能基とは結合するが、塩基性官能基や糖の水酸基とは結合しないという特性をもっている。この特性は、ABとカルボキシル基を有するシアル酸と容易に結合することを推測させる。事実、今回の検討において、赤血球とAB溶解液との反応では、incubation timeの有無にかかわらず、赤血球に対するAB結合量には、変化を認めなかった。つまり、ABは赤血球膜表面の陰性荷電と、ほとんどが瞬時に結合するものと考えられる。

次に、赤血球洗浄時の遠心時間を、5分、10分、20分と変化させてAB結合量をみると、遠心時間が長くなるに従い、AB結合量は低下した。この理由として、20分遠心では、上清は無色透明になるが、5分、10分では、洗浄後にも、上清に依然として血清色が残っており、そのため、赤血球層に血小板や血清シアル酸が残存していたのではないかと考えられた。

次に、ABは、その形状、溶解液の種類及びpHなどにより、溶解性が著しく異なってくるので、緩衝液と混合する前に、ABは少量の酢酸などで完全に溶解しておくことが重要であると考えられた。

最後に、Levinらの方法に準じて行ってきた従来法と比べて、今回の方法では、同一対照例における反復測定及び正常コントロールでの測定結果は、その標準偏差を著しく小さくすることができた。その理由としては、次のことが考えられる。すなわち、従来法では、市販ABを、25 mmol/l MgCl₂を含む生理食塩水に溶解したときのpHは4.2であり、この溶液5.0 mlにPBS 1.0 ml (pH 7.4)を加え、incubation

したときのpHは7.0であった。ABはpHが高くなると、AB溶解液の安定性が悪くなることから、赤血球とのincubationの間に、ABが析出し、incubation後の上清のAB濃度に差があらわれ、これが標準偏差を大きくする要因であると推測される。以上、今回の測定方法は、従来の方法よりも、標準偏差を小さくすることができ、赤血球膜陰性荷電測定の精度をあげることができた。

結 語

1) Levinらの方法に従って行ってきた赤血球膜陰性荷電測定法の再検討を行い、独自の方法を確立した。

2) ABを溶解させるときに重要なのは、使用前に、ABが酢酸に溶けやすいように、よくすりつぶし、やや酸性のpH 5.5の緩衝液に、完全に溶解させることが必要である。

3) 今回の実験結果から、ABと赤血球とのincubationは行わないで、転倒混和のみで十分であることがわかった。

4) 新しい方法で測定した、同一対照例での反復測定及び正常コントロールの結果は、従来行ってきた方法に比べて、標準偏差を著しく小さくすることができ、赤血球膜陰性荷電測定の精度をあげることができた。

稿を終えるにあたり、本研究の御指導、御校閲を賜りました川崎医科大学内科 大澤源吾教授に深謝いたします。

本研究の一部は、厚生省特定疾患「進行性腎障害」調査研究班(班長 東条静夫)の助成金による。記して、感謝の意を表わす。(大澤源吾)

文 献

- 1) Levin, M., Smith, C., Walters, M. D., Gascine, P. and Barrat, T. M.: Steroid responsive nephrotic syndrome: A generalized disorder of membrane negative charge. *Lancet* ii: 239-242, 1985
- 2) Bouton-Jones, J. M., McWilliams, G. and Chandrachud, L.: Variation in charge on red cells of patients with different glomerulopathies. *Lancet* ii: 186-188, 1986

- 3) 五味崇行, 内山 聖: 糖尿病小児の赤血球膜陰性荷電状態および影響する因子の検討. 新潟医学会誌 102 : 155-159, 1988
- 4) Scott, J. E.: The histochemistry of Alcian blue; note on the presence and removal of boric acid as the major diluent in Alcian blue 8GX. Histochemine 29 : 129-133, 1972
- 5) 吉田健三: 補体レセプター (CR1, CR2, CR3) の測定法. 臨免疫 19 : 591-601, 1987