

新生児黄疸発症における血漿中赤血球膜 抵抗安定化因子に関する研究

大阪市立大学医学部産科婦人科学教室

大西 賢哲 荻田 幸雄 島本 雅典
石河 修 志村研太郎 川村 朝章
須川 信

Studies on RBC Stabilizing Factors in Plasma

Masanori OHNISHI, Sachio OGITA, Tadafumi SHIMAMOTO, Osamu ISHIKO,

Kentaro SHIMURA, Tomoaki KAWAMURA and Tadashi SUGAWA

Department of Obstetrics and Gynecology, Osaka City University Medical School, Osaka

概要 Coil Planet Centrifuge System (CPC 法) を用いた臍帯血の動的滲透圧抵抗を測定し、臍帯血中の脆弱赤血球量と生後における最高総ビリルビン値との間に高い相関があることを、既に報告して来た。しかしながら、臍帯血並びに新生児血の動的滲透圧抵抗の推移の解析過程において、脆弱赤血球量が同一であっても、その血中における消失速度が必ずしも同一ではなく、例外的に脆弱赤血球量に比例した黄疸発症を見ない例が存在することも認められた。そこで、赤血球存在の環境要因である血漿の赤血球動的滲透圧抵抗に及ぼす影響を検討し、血漿中に赤血球安定化因子 (P-factor) の存在を確認すると共に、P-factor の性格及び物性を解析し、以下の結果を得た。

① P-factor は赤血球膜と速やかに結合し、赤血球膜の動的滲透圧抵抗性の増強作用は、dose responsivity を有する。

② P-factor の膜安定化作用は、同一個体の血球に対してばかりでなく、他の異った個体の血球に対しても発現する。

③ P-factor の力価 = (生理的食塩水中浮遊赤血球の H.S.P mOsM) - (血漿中浮遊赤血球の H.S.PmOsM) と表現し得る。

④ 血漿中には、高分子分画 P_1 (分子量 $5.0 \times 10^4 \sim 7.0 \times 10^4$) 並びに低分子分画 P_2 (分子量 1.5×10^4 以下) の少なくとも2種の P-factor が存在し、 P_1 は低分子物質 P' (分子量 1.5×10^4 以下) と蛋白質とが結合したものであることが、強く示唆された。

Synopsis Measurement of the dynamic fragility of red blood cells in cord blood, using the coil planet centrifuge system, has revealed that there is a close relation between the amount of fragile cells with hemolysis starting point over 110 mOsM and the degree of neonatal jaundice. However, there are some exceptional cases in which the degree of jaundice does not seem to correspond with the amount of fragile cells.

In a process of studying this phenomenon, there were found 2 kinds of red blood cell stabilizing factor in serum with molecular weight below 1.5×10^4 and 5.0×10^4 to 7.0×10^4 , which was contained in cord blood serum as well as in adult blood serum. Presently, a study was made of the nature of the above substances and the effects on the red cell membranes.

緒 言

新生児黄疸発症の要因は、その1つを新生児の肝解毒機構の未熟性に求められるが⁵⁾、これに加えて、赤血球過剰崩壊に起因するビリルビンの絶対的あるいは相対的生成過剰も重要な因子として

考慮されねばならない。

この観点から、我々は Coil Planet Centrifuge System (CPC 法) を用いて臍帯血並びに新生児血の赤血球膜動的滲透圧抵抗を測定し、その特徴ある pattern の推移を明らかにすると共に、動的

滲透圧抵抗の脆弱な血球の量が児の黄疸重症度と深い関連を有することを認め、本法による臍帯血の動的滲透圧抵抗測定の意義を明らかにして来た^{1) 2) 3) 4)}。

しかしながら、臍帯血並びに新生児血の動的滲透圧抵抗性の推移の解析過程において、脆弱血球量が同一であつても脆弱赤血球の血中における消失速度が必ずしも同一ではなく、例外的に脆弱血球量に比例した黄疸発症を見ない例が存在することも認められた。

この理由として、まず児肝臓におけるビリルビン処理能の問題もあるが、脆弱血球の生体内消失の速度がより重要であると考え、この点を解明すべく、赤血球存在の環境要因である血漿が赤血球の動的滲透圧抵抗性にどのような影響を及ぼしているかにつき、検討を加えた。

実験材料並びに方法

1. 試料

大阪市立大学付属病院にて分娩せる胎齢39週から40週の子27例の臍帯血及び健康成人10例の静脈血を採取しヘパリンを加え、以下の実験に供した。

2. 試料の調製及び動的滲透圧測定

得られたヘパリン処理血を3,000rpm, 10分間遠沈して血漿を分離した。沈渣は、まず白血球層を除去したのち、生理的食塩水で5回洗浄し、これに① 血漿、② 血漿を生理的食塩水で段階希釈した試料、および③ 血漿を等張コロイド溶液 (Saviosol-3.0 Dextran 40, pH8.2±0.2) で段階希釈した試料のそれぞれに、ヘマトクリット値50%になる様に洗浄血球を加え、各種実験条件における赤血球膜動的滲透圧抵抗を測定した。尚、動的滲透圧抵抗の測定は既報の如く、Coil Planet Centrifuge System (CPC 法) を用いた。

3. 血漿の限外濾過及び透析処理

Dia filter (日本真空 KK) を用いて CO₂gasにて (1.5kg/cm²) 加圧のもとに pore size 1.5×10⁴, 5.0×10⁴, 及び7.0×10⁴ の membrane filter を用いて血漿を限外濾過し、得られた各残液及び濾液のそれぞれに洗浄赤血球をヘマトクリット50

%になる様に加え、動的滲透圧抵抗を測定した。尚、濾過残液には、濾過前量と等しくなる様に生理的食塩水を加えた。また、濾過残液並びに濾液を visking tube を用いて生理的食塩水に対して5℃, 24時間透析し、透析前後における試料について比較検討した。

4. 試料液相の Coil 内移動状態の検討

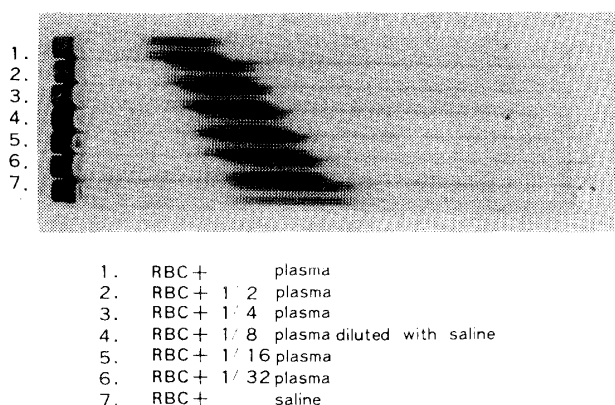
試料血に少量の色素 (サフラニン-0) を加えて試料液相を標識し、Coil 内移動状況を観察した。

成 績

1. 血漿の赤血球膜抵抗性に及ぼす影響

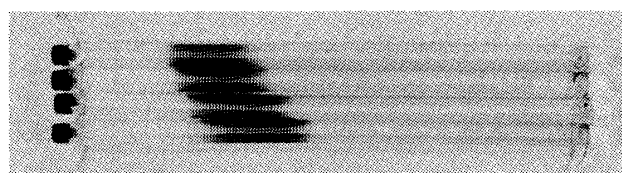
血漿が赤血球膜の動的滲透圧抵抗性に如何なる影響を及ぼすかを検索するため、臍帯血及び成人血の洗浄血球に、まず生理的食塩水で段階希釈した血漿を加えて動的滲透圧抵抗の変動を検討した。その結果を図1に示す。

図1 Dilution effect of Plasma on CPC pattern



臍帯血球では、全血漿浮遊血球の溶血開始値 (H.S.P) 111.1mOsM, 溶血終了値 (H.E.P) 51.3 mOsMに対して、血漿の希釈度の増加に従って膜抵抗性が減弱し、生理的食塩水 (無血漿成分) 中血球の H.S.P 及び H.E.P はそれぞれ126.3mOsM 及び 53.3mOsM となつた。成人血球でも同様に血漿濃度が低下するに従って膜抵抗性が減弱し、全血漿中の赤血球膜抵抗の H.S.P 101.6mOsM, H.E.P 62.6mOsM に対して生理的食塩水中では H.S.P 及び H.E.P はそれぞれ 118.4mOsM, 67.0mOsM となり、臍帯血及び成人血共に4倍

図2 Dilution effect of plasma by iso-osmotic colloidal solution on CPC pattern



1. RBC + plasma
 2. RBC + 1/4 plasma
 3. RBC + 1/8 plasma
 4. RBC + "Saviosol"
- diluted with Saviosol: 3% dextran 40 in RL-8
(incubated for 3hrs. at 37 C)

希釈血漿中血球の動的滲透圧抵抗が、非希釈血漿中での抵抗値、並びに生理的食塩水中での抵抗値のほぼ中間値を示した。

次に、血漿を等張コロイド溶液で生理的食塩水の場合と同様に段階希釈し、各種血漿濃度における血球の動的滲透圧抵抗を測定した。

その結果、図2に示す如く生理的食塩水による希釈と同様、血球の膜抵抗性は減弱し、その減弱の程度は血漿濃度に従うことが明らかとなった。

以上の実験結果から、血漿は赤血球の膜抵抗性を増強させる作用を有し、この膜抵抗増強作用は血漿のコロイド滲透圧に基づくものではなく、血漿中に存在する他の因子によるものと判断された。そこで、血漿の赤血球膜安定化因子 (RBC stabilizing factor in plasma, P-factor) を、更に詳細に検討すべく以下の実験を行った。

2. 赤血球膜安定化因子 (P-factor) の作用発

現機構とその力価

P-factor の赤血球膜に対する安定化作用の発現機構を解明すべく以下の検討を行った。

まず、CPC 法において coil 内に注入した試料血の赤血球並びに浮遊液相が相対的にどの様に移動するかを明らかにすべく、液相を色素標識し、遠心後の溶血 pattern 並びに標識液相の位置的關係を検討した。その結果、図3に示す如く、注入試料血の液相は全く移動せず、赤血球のみが coil 内を移動することが明らかとなった。

次に、生理的食塩水及び血漿にヘマトクリット値50%になる様にそれぞれ洗浄血球を加え、血球浮遊液を調製し、あらかじめ高張側より 8cm 分の coil 内溶液を除去した3本の coil に、それぞれ① 生理的食塩水、② 生理的食塩水、③ 血漿の等量 (8cm分) を注入し、続いて①の coil に赤血球の生理的食塩水浮遊液、②の coil に赤血球の血漿浮遊液、③の coil に赤血球の生理的食塩水浮遊液を試料として入れ、各々の CPC 法による溶血 pattern の検討を行った。

その結果、図4の如く②の coil と③の coil では全く同じ溶血 pattern を呈し、H.S.P, H.E.P とともに①より低値であつた。即ち、動的滲透圧抵抗が強化されている事が判明した。このことは、とりもなおさず、先の実験で得た結果と同様、CPC 法に於ては溶液は移動せず、赤血球のみが

図3 Migration of liquid and particle in the counter current system

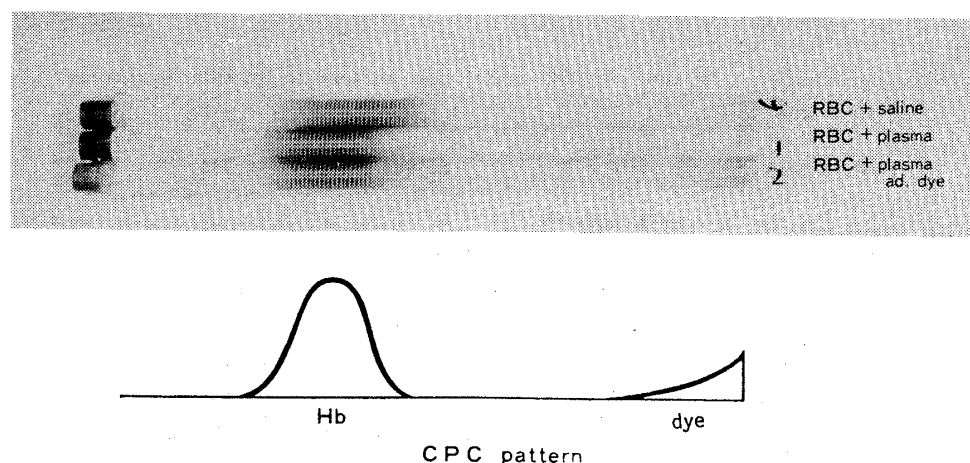
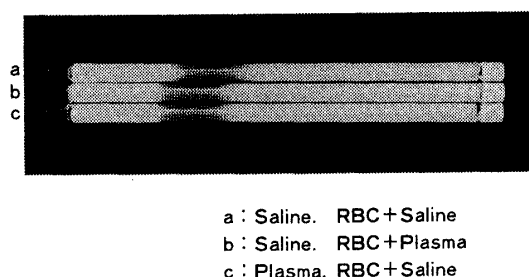


図4 Binding process of erythrocyte membrane and p-factor



coil 内を移動し、且つ、血漿中 P-factor が赤血球膜に速やかに結合して赤血球膜の抵抗性が増強されることを推測させるものである。

次に、同一血液型の個体間における血球及び血漿をそれぞれ相互に交換し、動的滲透圧抵抗を測定した。その結果、血漿の膜安定化作用は同一個体の血球に対してばかりでなく、他の異なつた個体の血球に対しても発現することが明らかとなつた。

以上の実験結果より、血漿の膜安定化作用の発現は速やかであり、且つ、可逆的であること、また dose responsivity を示すことがうかがわれた。さらに、この血漿中の膜安定化因子の力価は、生理的食塩水中における赤血球の H.S.P の価が、血漿添加によりどれ位に減少するかで表現し得るものである。すなわち、P-factor の力価 = (生理的食塩水中浮遊赤血球の H.S.P mOsM) - (血漿中浮遊赤血球の H.S.P mOsM) と表現できる。

3. P-factor の物性の検討

これまでの実験により、血漿中には赤血球の膜

抵抗を増強させる物質 (P-factor) が含有されていることが明らかとなつたが、それがどのような物性をもつかを解析すべく、以下の検討を加えた。

① P-factor の分子量の検討

血漿を各種 pore size の membrane filter で限外濾過し、残液並びに濾液の洗浄赤血球に対する膜抵抗増強作用の有無から P-factor の分子量を測定した。

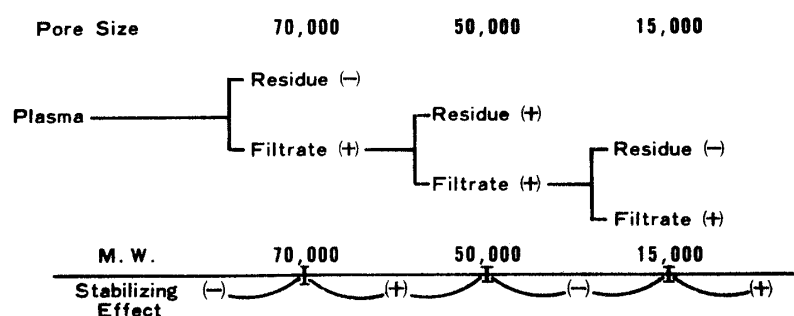
まず、pore size 7×10^4 の membrane filter で得られた残液 (R_1)、並びに濾液 (F_1) の膜抵抗増強作用の有無を検討したところ、 R_1 には殆んどその作用は認められず F_1 には膜抵抗増強作用の存在を認めた。そこで、 F_1 をさらに pore size 5×10^4 の filter にて限外濾過し、得られた残液 (R_2)、並びに濾液 (F_2) の膜安定化作用の有無を検討したところ、 R_2 及び F_2 共にその作用を有することが認められた。次いで、 F_2 を pore size 1.5×10^4 の filter にて濾過し、得られた残液 (R_3)、及び (F_3) の膜安定化作用の有無を検索したところ、 R_3 はもはや膜安定化作用は無く、 F_3 に存在することを認めた。

以上の実験結果を図示すると、図5の如くなり血漿中には高分子分画 P_1 (分子量 $5.0 \times 10^4 \sim 7.0 \times 10^4$) 並びに低分子分画 P_2 (分子量 1.5×10^4 以下) の少なくとも2種の赤血球膜安定化物質が存在することが明らかとなつた。

② P-factor の透析性並びに耐熱性

この様に、血漿中には P_1 及び P_2 の少なくとも2種の膜安定化物質が存在することが明らかと

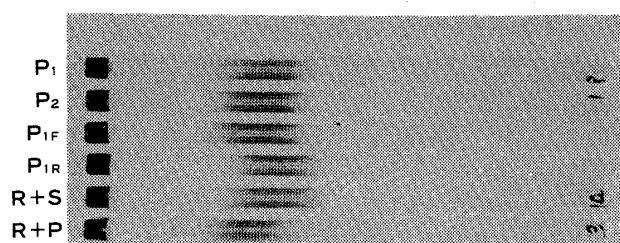
図5 Gravimetric analysis of RBC stabilizing factors in plasma by means of membrane filter



なつたが、さらに、 P_1 及び P_2 の透析性について検討を行つた。その結果、高分子分画の P_1 は透析により膜安定化作用が減弱し、 P_2 は透析後膜安定化作用は消失した。

次に、 P_1 及び P_2 を 56°C 、30分間及び 100°C 、10分間熱処理し、その前後の膜安定化作用の有無を検討した。その結果、 P_1 及び P_2 とも処理前後の膜安定化作用に殆んど差は認められなかつたが、熱処理した P_1 を再度 1.5×10^4 の membrane filter にて限外濾過したところ、この残液には膜安定化作用は認められず、濾液にその作用が移行していることが明らかとなつた (図6)。

図6 Effect of heat treatment with filtrated plasma on RBC stability



P_1 ; MW $5 \times 10^4 - 7 \times 10^4$
 P_2 ; MW below 1.5×10^4
 P_{1F} ; filtrate of heated P_1
 P_{1R} ; residue of heated P_1
 $R+S$; RBC + Saline
 $R+P$; RBC + Plasma

以上の実験結果から、 P_1 は高分子であるにも拘らず透析によりその作用が減弱し、また熱処理によつて活性を有する分画が低分子分画に移行したことは、 P_1 は低分子物質 P_1' と蛋白質と結合したものであることを強く示唆するものである。但し、 P_2 とこの P_1' とが同一物質であるかどうかは未だ不明で、現在、尚、検討中である。

考 察

赤血球を低張液中に浮遊させると細胞内に水分が流入し、細胞は膨張して球形となるが、さらに水分の流入が続くと逆にヘモグロビンが溶出する (溶血)。そしてこの溶血は、赤血球膜を通過し得ない物質、例えばアルブミン、デキストラン、蔗糖、PVP 等を溶液中加入しておくで抑制される

ことが知られている⁶⁾⁷⁾。従つて、赤血球は血漿中にあつては、血漿中の蛋白質の作用によりその膠質浸透圧は保持されて、生理的食塩水中に浮遊するよりも浸透圧抵抗性が強くなつていとも考えられる。

しかしながら本法の如く counter current の原理を用いた system では、加えた試料中の血漿は注入点にとどまり、赤血球のみ浸透圧勾配のついた食塩水中を移動することから、血漿の膠質浸透圧が赤血球の抵抗性を高めたとは考え難く、また等張膠質浸透圧溶液中に於ても、対照とする生理的食塩水中での動的浸透圧抵抗と有意差が認められなかつたことは、少なくとも動的浸透圧抵抗に関する限り、血漿の colloid 浸透圧の差に基づくものではないことは明らかである。

さらに、作用発現機構解明の過程に於て、血漿を通過した血球が血漿浮遊赤血球と同様の抵抗性を獲得したことは、膜抵抗増強因子 (P-factor) が物質として存在し、しかもその作用の発現過程から赤血球膜と容易に結合し得る物質であることが明らかとなつた。

又、今回の実験成績により① 血漿中の P-factor は、高分子及び低分子の少なくとも2種類存在すること、② 高分子物質を透析するとその作用が消失すること、及び③ 低分子物質単独で作用を発揮することから、膜抵抗増強作用を発揮する物質は、主として低分子物質であり、これと赤血球膜との相互作用の結果、膜抵抗増強作用が発現すると考えられる。従つて、高分子物質は単なる低分子物質の担体であり、それ自体、膜抵抗増強作用には直接関与しないと考えるのが合理的である。この様に、膜と本物質とが接触するだけで膜抵抗増強効果が出現することは、本物質が赤血球膜と著しい親和性を有することを意味するものであり、また血漿中の濃度による dose responsivity を示し、且つ、洗浄操作により抵抗性を減弱することは、赤血球膜側に P-factor の receptor が多数存在し、しかもその結合の様式は、赤血球側の energy を要しない単なる物理化学的なものであることを強く示唆するものである。

又、赤血球膜の構造に関しては、現在なお議論のあるところであるが、Weed et al. によれば蛋白質及び脂質の三層からなり、赤血球膜の乾燥重量の約40%が脂質だとされている。また、通常、脂質は膜にのみ存在するが、膜のコレステロールは12時間で殆んど全部が入れ替り、この交替はenergyを要せず非酵素的におこる血漿と赤血球間の平衡現象であると説明されている⁸⁾。

今回の実験では、P-factor の同定に迄は到らなかったが、今後の問題として、血漿と赤血球との接点に於て、血漿中の脂質並びに脂質蛋白量が赤血球膜の動的滲透圧抵抗性に、どのような影響を及ぼすかを中心に、検討を加えて行きたい。

文 献

1. 荻田幸雄, 島本雅典, 大西賢哲, 亀井輝二, 石河 修, 松本雅彦, 須川 信: 新生児溶血性黄疸発症に関する研究—Coil Planet Centrifuge System による赤血球膜滲透圧抵抗の経日的推移について—, 日産婦誌, 27: 1099, 1975.
2. 荻田幸雄, 島本雅典, 大西賢哲, 亀井輝二, 石

- 河 修, 野間英晴, 志村研太郎, 川村朝章, 須川 信: 新生児溶血性黄疸発症に関する研究—Hb-F 含有血球の赤血球滲透圧抵抗性について—, 日産婦誌, 28: 37, 1976.
3. 島本雅典, 大西賢哲, 荻田幸雄, 石河 修, 野間英晴, 志村研太郎, 川村朝章, 須川 信: 新生児溶血性黄疸発症に関する研究—CPC 法による赤血球膜抵抗測定と新生児血中ビリルビン値の推移について—, 日産婦誌, 28: 466, 1976.
4. 島本雅典, 大西賢哲, 石河 修, 志村研太郎, 川村朝章, 荻田幸雄, 須川 信: 新生児溶血性黄疸発症に関する研究—新生児黄疸発症の重症度予知法—, 日産婦誌, 30: 19, 1978.
5. Gartner, L.M. and Arias, I.M.: Developmental pattern of gluconide formation in rat and guinea pig liver. Am. J. Physiol., 205: 663, 1963.
6. Jacob, H.S. and Jandl, J.H.: Effects of sulfhydryl inhibition on red blood cells. I. Mechanism of hemolysis. J. Clin. Invest., 41: 779, 1962.
7. Jacob, H.S. and Jandl, J.H.: Effects of sulfhydryl inhibition on red blood cells. II. Studies in vivo. J. Clin. Invest., 41: 1514, 1962.
8. Weed, R.I. and Reed, C.F.: Membrane alterations leading to red cell destruction. Am. J. Med., 41: 681, 1966.

(No. 4197 昭 52・5・20受付)