

4 赤血球膜異常による遺伝性溶血性貧血

先天性溶血性貧血の中で赤血球膜異常症の占める割合が高い。これらは従来から形態学的に**遺伝性球状赤血球症**、**楕円赤血球症**、**有口赤血球症**などと分類されていたが、現在では SDS-PAGE を用いた赤血球膜蛋白の解析により生化学的に原因が明らかにされるようになった。すなわち、遺伝性球状赤血球症は α -スペクトリン、 β -スペクトリン、アンキリン、バンド 3、バンド 4.2 の異常が、遺伝性楕円赤血球症は α -スペクトリン、 β -スペクトリン、バンド 4.1、バンド 4.2、グリコホリン C と D の異常が、遺伝子検査により同定されている（詳細は八幡義人：血液病学，第 2 版，pp 643-680，文光堂，1995，神崎暁朗ほか：Annual Review 血液，pp 77-95，中外医学社，1995 を参照）。以下に，SDS-PAGE を用いる赤血球膜蛋白の解析について記す。

原理 Dodge らの方法によって得られた赤血球膜ゴーストを **Fairbanks 法**による SDS-PAGE により分離し，蛋白染色する。

赤血球膜ゴーストの作製 抗凝固剤を加えて採血した全血を 1,000g，20 分間遠心し，血漿と buffy coat を除去する。等張リン酸緩衝液 (310 mOsm) (0.15 M NaCl 加 0.02 mol/l リン酸緩衝液，pH7.4) で 3 回洗浄後，赤血球層の 2 倍量の等張リン酸緩衝液を加えて，赤血球浮遊液を調製する。この 2 ml に対して低張リン酸緩衝液 (20 mOsm) (0.005 M NaCl 加 0.02 mol/l リン酸緩衝液，pH7.4) 28 ml を加え，ゆっくり混和後 20,000g，40 分間遠心する。この操作を 3 回繰り返して，赤血球膜ゴーストを得る。

試薬と実施

① 10×電気泳動用緩衝液

1 M Tris 40 ml，2.0 M 酢酸 Na 10 ml，0.2 M EDTA 10 ml に酢酸を加えて pH7.4 とし，精製水で 100 ml とする。

② SDS-PAGE ゲル作製 (ディスク電気泳動用)

常法に従い，1% SDS 加 4% ポリアクリルアミドゲルを電気泳動用緩衝液を加えて作製する。混和後ゲル管に注入する。

③ 赤血球膜ゴースト 25 μ l，20% SDS 10 μ l，2-mercaptoethanol 10 μ l，電気泳動用緩衝液 55 μ l を加えて，5～10 分間煮沸して可溶化する。

④ 蛋白量として 150～200 μ g の③赤血球膜ゴーストを重層し，ゲル管当たり 3 mA の定電流で電気泳動を行う。

⑤ 0.05% Comassie blue で蛋白染色を行う。

判定 正常赤血球膜の SDS-PAGE 分離染色像を，**図 4-39** に示した。

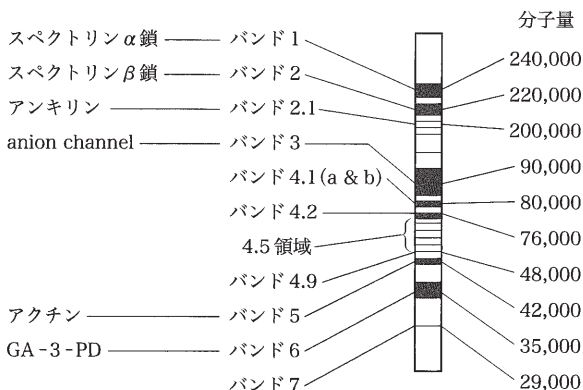


図 4-39 赤血球膜の SDS-ポリアクリルアミド電気泳動像 (藤井)