



Title	血液の凍結竝に乾燥に関する研究：特にアルコール添加について
Author(s)	藤田, 英夫
Citation	低温科学. 生物篇, 17, 85-103
Issue Date	1959-10-24
Doc URL	<a href="http://hdl.handle.net/2115/17626">http://hdl.handle.net/2115/17626</a>
Type	bulletin (article)
File Information	17_p85-103.pdf



[Instructions for use](#)

## 血液の凍結並に乾燥に関する研究\*

特にアルコール添加について

藤田英夫

(低温科学研究所 医学部門)

(昭和34年7月受理)

### I. 緒言

近來輸血の需要が増加するに伴い、血液の保存に関する研究は枚挙に遑なく従つて多くの改良進歩が遂げられては來たが、保存液や保存温度等に改良工夫を加へても血液の長期保存ということには自ら限度がある。そこで他の生物学的材料と同様に血液の凍結乾燥が注目されて既に輸血材料としての血漿或いは免疫血清等が乾燥され実用に供されて來た<sup>1)</sup>。しかし全血液特に赤血球の凍結乾燥は極めて困難で、これまで2, 3の<sup>2), 3), 4)</sup>により試みられているがいずれも成功していない。

元來、血液が凍結により溶血するということは一般に認められている事實だが、最近ではいろいろな条件を与えてかなりの低温でも溶血を避けることが出来るようになった。

特に英國国立医学研究所のグリセリン添加による一連の業績<sup>5), 6)</sup>は、凍結による溶血の阻止に著しい成果と多くの实用価値をもたらしたが、しかし凍結保存後のグリセリン加血液を輸血に使用するためには該血液からグリセリンをとり除かなければならない不便がある<sup>7), 8), 9)</sup>。更にまたグリセリン添加血液はその物理化学的性質から見てそのまま凍結乾燥させることが容易でない。

一方、アルコール(エタノール)を血液に添加すれば、血液の凍結点を降下させることが出来るばかりでなく溶血も或る程度阻止する効果があることが既に知られている<sup>10), 11)</sup>。しかもアルコール(エタノール)は生体に必ずしも有害でなくその上乾燥が容易な点はグリセリンとは比較にならない。

ここに於いて、血液の凍結乾燥は改めて検討されねばならない段階となつた。

然るにこれまで血液のアルコール添加についての研究は過冷却保存が目的であつたり<sup>10)</sup>、或いはその他の効果<sup>12)</sup>のための使用であつて、血液の凍結融解乃至凍結乾燥に対してアルコールの添加を試みたものは曾つてこれを見ない。

著者はアルコール添加による凍結乾燥を最終目的として先ずその適合性を検討すると共に

\* 北海道大学低温科学研究所業績 第516号

従来使用されたグリセリン及びエチレングライコールとの比較実験を行い、併せてこれら各媒質の作用機序を考究したのである。

## II. 実験方法

### 1) 実験材料

(a) 血液 心臓穿刺により採取された家兎の血液である。採血に当つては、予め定量の 1/4 の ACD 液 (クエン酸ソーダ 4%, クエン酸 0.48%, ブドウ糖 3%)<sup>13)</sup> を入れた 20 cc 注射器を使用、採取した血液を滅菌試験管に移し入れて綿栓し、5°C の恒温槽内に静置保存した。その後は必要量を他の小試験管にとり出し、すべて採血後 48 時間以内に使用した。試料としての血液量は特殊の場合を除き 1 回の実験に 0.5 cc ずつである。

(b) 媒質 血液に添加される媒質は、エチルアルコール (以下エタノールと記す)・メチルアルコール (同メタノール)・グリセリン及びエチレングライコールの 4 種で、いずれも pure として市販されているものを用いたが本実験ではこれを 100% と見なし、以下順次生理食塩水によつて所望の稀釈液 (容量 %) を作製した。これを前記 ACD 加全血液と等量に混和し、所定の濃度の媒質加血液とした。なお実験の一部に使用したブドウ糖溶液も同様生理食塩水に溶解されたものである。

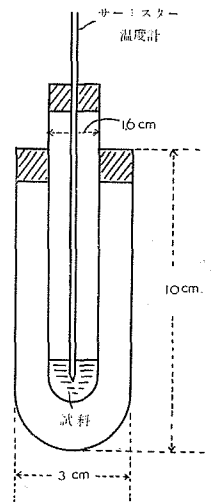
以上のうち、アルコールは室温のまま血液に添加されると溶血を起し易く、ために実験値に安定性を欠くので添加に当り予め器具とともに -10°C に冷却したものを使用した。(この事実は既に Lorant ら<sup>10)</sup> が指摘しており著者も予備実験でこれを確かめている。アルコールの使用に当つて注意すべきことであろう。) その他の媒質については必ずしも添加前の冷却を要しなかつた。

すべての実験に於いて血液と媒質とは等量 (0.5 cc ずつ) に混和された。混和後はなるべく速かに実験に供したが、グリセリンのみは血球内に滲透して平衡を保たしめるために 10 分間室温放置後実験を開始した。なおこの放置時間については 30 分~1 時間半<sup>14)</sup> 等を予備実験で試みてみたが、さほどの長時間放置する必要はない。

### 2. 冷却方法

血液を凍結させる場合、それぞれの実験目的によつて -50°C までの低温が使用されているがこの際試料が平等に冷却されることと試料内の温度を時間的に測定する必要がある。さらに冷却速度も緩急を加減して実施出来ることが望ましい。こうした条件を充すために第 1 図のような硝子製容器を採用した。

急速凍結には内管のみを使用し、緩慢凍結の場合に外管をとりつけるようにした。内管に入れる試料は全血液又は媒質等量添加血液でいずれの実験に於いてもその総量は 1 cc である。試料内の温度は第 1 図のよ



第 1 図  
使用容器の略図

うに内管に挿入したイトー製サーミスター式温度計または熱電対を用いた記録電位差計によって測定した。

凍結方法としては試料入り硝子製容器(第1図)をブライン(-35°C)またはドライアイス・アルコール(-70°C)或いは液体窒素(-190°C)中に浸し、試料の温度がそれぞれの実験目的に達するまで降下するや直ちにこれを取り出し次いで融解させた。

なお同一温度で一定時間持続的に凍結させるためには低温恒温槽によらねばならない。この装置は-35°Cまでの任意の低温を任意の時間持続させることが出来るので、最初ブラインまたはドライアイス・アルコールで凍結した試料を直ちにこの装置内に移してその温度に保つた。

凍結後の融解については一般に急速融解が溶血率は少ないとされている<sup>15),16)</sup>。著者も予備実験に於いて20°Cと40°Cとの温浴槽に浸して融解させた場合を比較した結果、本実験では専ら40°Cの温浴槽に浸して急速に融解させることとし、氷が全部融けたところで直ちに室温にとり出した。

### 3. 検査法

(a) 溶血率の測定 凍結融解後の溶血率の測定にはすべてベックマン光電分光光度計を使用した<sup>17)</sup>。まず凍結融解後の試料を遠心沈澱し(2,000 r.p.m. 15分間)上清を分離して得た血漿0.02 ccにN/10 HClの適当量(溶血程度に応じて増減する)を加え40°Cの温浴槽に浸してColour development<sup>18)</sup>を行つてから前記分光光度計を用い波長372.5 m $\mu$ で吸光度を測定した。

対照として採血直後の全血液(試料と同一のもの)0.02 ccをN/10 HClに混和し前述同様にして吸光度を測つておく。

このときの溶血率(%)は次のようにして求められる。

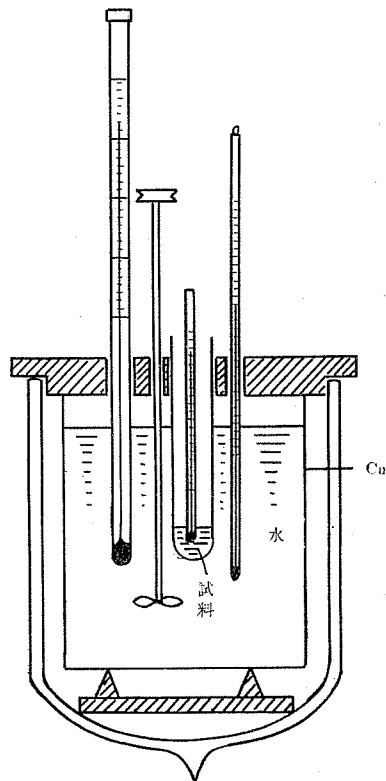
$$\frac{X'}{X} \times \frac{a}{5} \times \frac{1}{100} = \text{溶血率}$$

$X$  = 全血液のHbの吸光度の読みの値

$X'$  = 血漿のHbの吸光度の読みの値

$a$  = 血漿を加えるときのN/10 HCl量

(b) 水量の測定 凍結した血液中の水量自体を測定することは極めて困難なので、普通は融解する際に生ずる熱量(Calorie)を計算する方法が採られている<sup>19),20)</sup>。本実験では第2図のような熱量計を自製して使用した。要するに水槽の中で熱の出入を行わしめ、それによる水



第2図 熱量計の略図

槽の温度の変化を測定してから計算で熱量を求めるわけである。即ち供試血液を凍結させて所定温度に達したとき直ちにこの熱量計の中に挿入する。挿入後は備付のベックマン寒暖計によつて温度変化を測る。爾後の計算方法はすべて成書<sup>21)</sup>に拠つた。先ず熱量計を組立てているすべての物体(容器・水・大小寒暖計・攪拌器等)の熱容量(比熱×質量)の和を求めておき次の式<sup>21)</sup>に挿入する

$$L = \frac{Q}{G} - C_l(t_1 - T) - C_s(T - t_2)$$

$L$  = 融 解 熱

$Q$  = 熱量計に与えた熱量

$G$  = 物 質 量

$T$  = 融 点

$t_1$  = 熱量計の温度

$t_2$  = 試料の温度

$C_s$  = 固体の比熱

$C_l$  = 液体の比熱

この  $L$  から更に試料容器とそれに挿入した温度計の熱容量を補正して融解熱を求める。実際には対照として水を用いて本熱量計による融解熱を求め、また引続き各条件の血液についての融解熱を測定して、試料中の水量の割合を求めた。

この測定法には種々議論の余地があり、関与する因子を定量的に正確に表現することは出来ないので実質的に高い精度を期待することは困難である。しかしすべて同一方法で測定すれば各例相互間を比較して大体の傾向を知ることは出来ると思う。

(c) その他 赤血球の低張食塩水に対する抵抗試験及びヘマトクリット値(Ht)の測定はそれぞれ Creed<sup>22)</sup> 及び 森<sup>13)</sup> の方法に準じた。

#### 4. 乾燥方法

試料には、全血液そのままのもの及びエタノール、メタノールまたはグリセリン加血液を用いた。

容量凡そ 5 cc の硝子製アンプルにこれらの試料をそれぞれ 1 cc ずつとり、 $-30^{\circ}\text{C}$  の低温室に放置して緩慢凍結したもの及び  $-190^{\circ}\text{C}$  の液体窒素中でアンプルを回転しながら急速凍結したものを、直ちに凍結乾燥機にとりつけ  $20^{\circ}\text{C}$  の室温で乾燥を行つた。乾燥機のコンデンサーには液体窒素を用い油回転ポンプだけを使用して約  $10^{-2}$  mm Hg の真空度のもとで凡そ 3 時間で乾燥を終了した。

グリセリン加のものは乾燥の途中で次第に融解し極めて粘稠な液状のものとなるので乾燥は非常に困難であつた。もちろん結果は完全溶血である。またエタノール加のものも特に  $-30^{\circ}\text{C}$  での緩慢凍結のものは途中で多少融解のみではあるが、大体原形を保つて乾燥を終了した。

再生には 10% のエタノール(またはメタノール)生理食塩水及び生理食塩水だけを用いた。

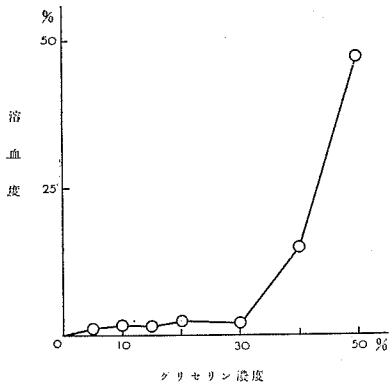
食塩濃度は1.3%くらいになり等張よりもやや高いが溶血を防止する目的でこのような試みをしてみたのである。

### III. 実験成績

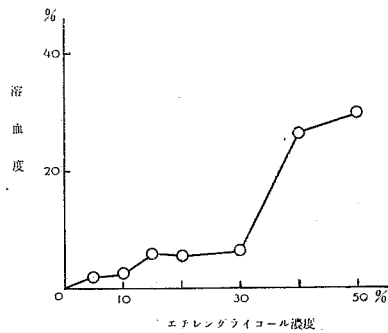
#### 実験 1 媒質添加による溶血率の比較

各種媒質を凍結実験に使用するに当つて先ずそれらの媒質自体が溶血を誘起するかどうかを確かめるために、種々な濃度の媒質を ACD 加血液 (以下単に血液と略記) に添加してそれぞれの場合に於ける溶血率を測定した。

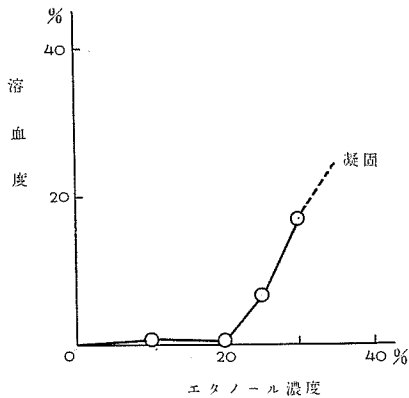
その結果によれば、ブドウ糖液加血液は最終濃度 40% に及ぶまで全く溶血をみないが (図省略) その他の媒質では、或る濃度以上になるとそれぞれ添加の影響が判然と認められる。即ちグリセリンまたはエチレングライコール加血液にあつては 30% (以下いずれも最終濃度) まで軽微の溶血をみるにすぎないが 40% 以上では次第に溶血度を増して来る (第 3 図・第 4 図)。



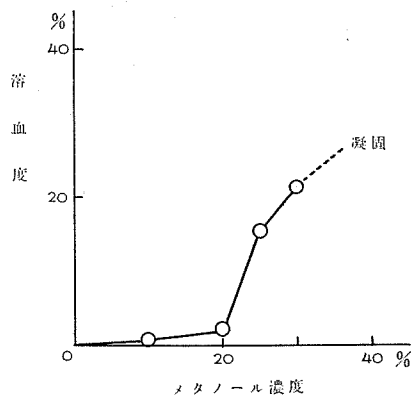
第3図 各種濃度グリセリン加血液の溶血曲線



第4図 各種濃度エチレングライコール加血液の溶血曲線



第5図 各種濃度エタノール加血液の溶血曲線



第6図 各種濃度メタノール加血液の溶血曲線

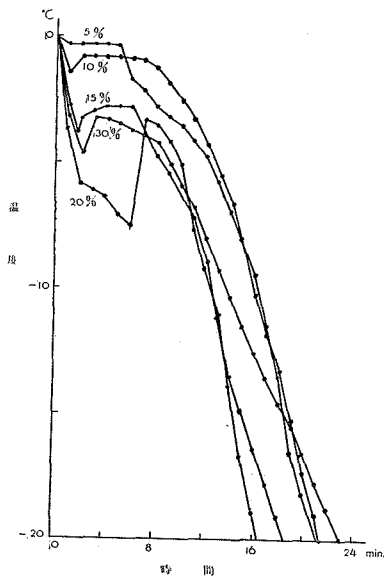
またエタノール加及びメタノール加血液では、20%まで殆んど溶血を認めないが25%でかなり溶血し30%では溶血度はさらに大となる。しかもそれ以上の濃度では血液蛋白が凝固して、もはやこの種の実験に供することが出来ない(第5図・第6図)。

本実験によりグリセリン及びエチレンジグリコールの使用可能濃度は30%まで、アルコールに於いては20%までということがいえよう。

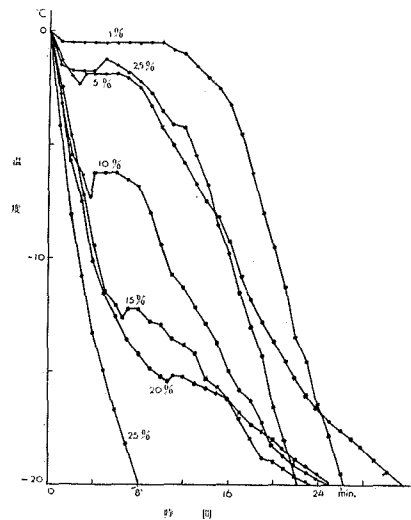
### 実験 2 各種媒質添加血液の凍結曲線

凍結過程を時間的に記録して、各種媒質を添加した血液の凍結曲線<sup>23)</sup>を比較して見た。この実験では特に植氷して過冷却を破るようなことはせず $-30^{\circ}\text{C}$ までの緩慢凍結( $-20^{\circ}\text{C}$ まで測定)と $-73^{\circ}\text{C}$ までの緩慢凍結とについて調べた。

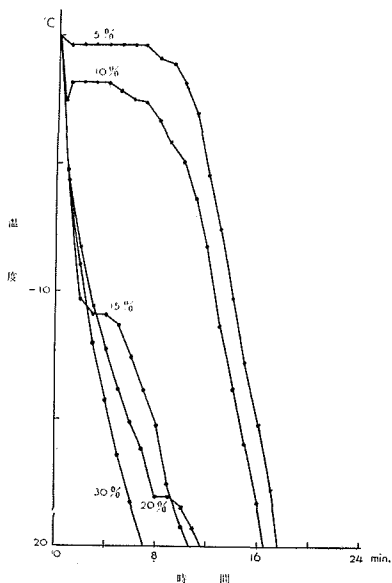
得られた凍結曲線によれば(第7図~第15図)ACD加全血液の氷点は $-1.6^{\circ}\text{C}$ を示し、ブドウ糖液、グリセリン、エチレンジグリコール、アルコール等を加えると、その濃度を増すに従つて過冷却点や氷点が次第に低下することを認めた。特にアルコール濃度30%のものでは殆んど氷点がみとめられぬくらいであつた。



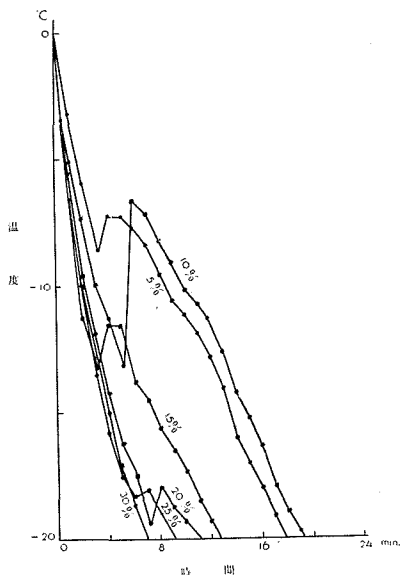
第7図 ブドウ糖加血液の凍結曲線



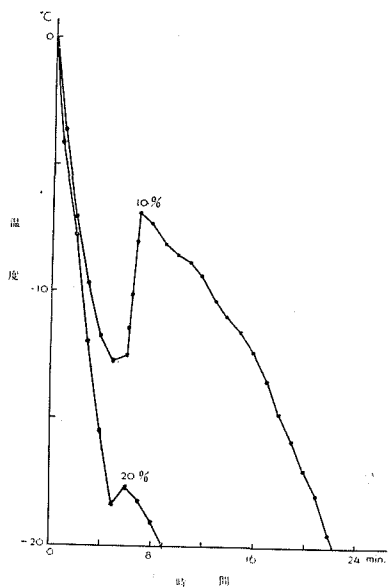
第8図 グリセリン加血液の凍結曲線



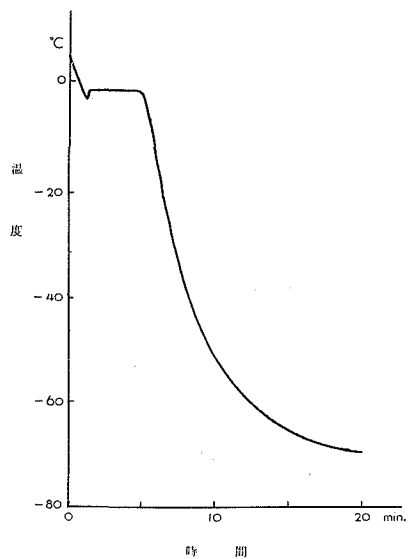
第9図 エチレングライコール加血液の凍結曲線



第10図 エタノール加血液の凍結曲線

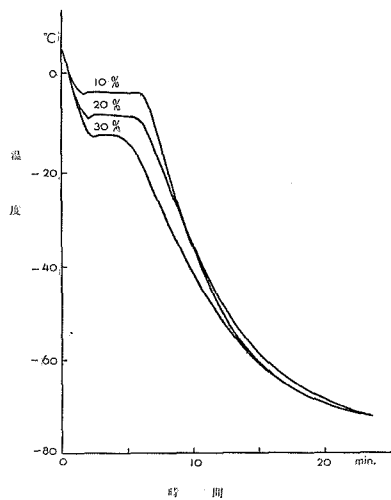


第11図 メタノール加血液の凍結曲線

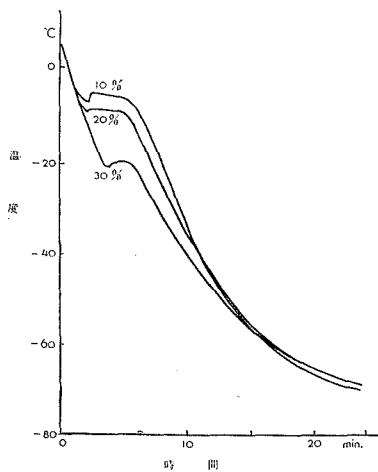


第12図 全血液の凍結曲線  
(記録電位差計による)

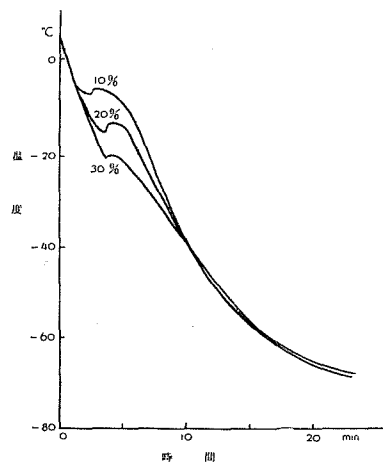




第13図 ブドウ糖加血液の凍結曲線  
(記録電位差計による)



第14図 グリセリン加血液の凍結曲線  
(記録電位差計による)



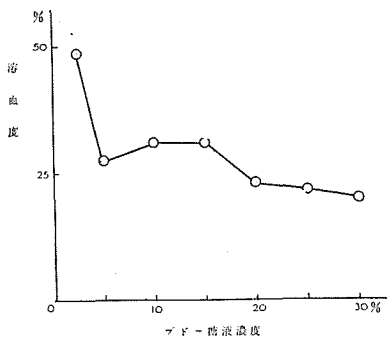
第15図 エタノール加血液の凍結曲線  
(記録電位差計による)

実験 3 -20°C 凍結の場合の媒質濃度と溶血率との関係

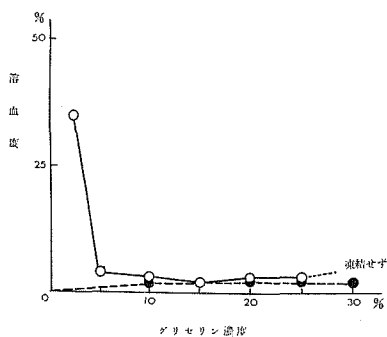
種々な濃度の媒質をそれぞれ血液に等量添加し、これを -20°C まで緩慢凍結、次いで融解してから溶血率を調べてみた。

まず対照の全血液では -20°C までの凍結で完全に溶血するのをみとめた。次いでブドウ糖加血液はいずれの濃度に於いても -20°C の凍結融解によりほぼ 20% 以上の溶血を示した。しかしブドウ糖液の濃度が増すに伴い僅かながら溶血度の減少して行く傾向があることもわかる (第 16 図)。

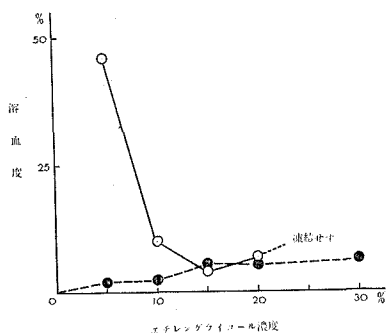
これに反しその他の媒質では溶血阻止の効果が顕著で特にグリセリン加血液の成績は最もよく (第 17 図) エタノール及びメタノール加血液がこれに次いでいた (第 19 図・第 20 図)。エチレングライコー



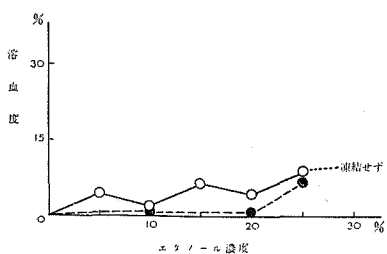
第 16 図 各種濃度ブドウ糖加血液の溶血曲線 (-20°C までの凍結)



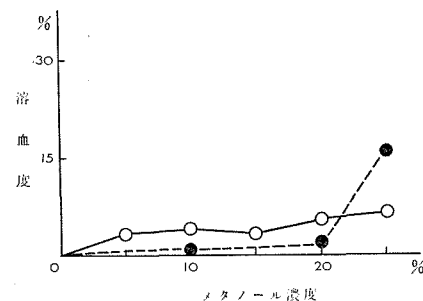
第 17 図 各種濃度グリセリン加血液の溶血曲線 (-20°C までの凍結)  
実線は凍結、破線は対照 (非凍結、第 3 図に同じ)



第 18 図 各種濃度エチレングライコー加血液の溶血曲線 (-20°C までの凍結)  
実線は凍結、破線は対照 (非凍結、第 4 図に同じ)



第 19 図 各種濃度エタノール加血液の溶血曲線 (-20°C までの凍結)  
実線は凍結、破線は対照 (非凍結、第 5 図に同じ)



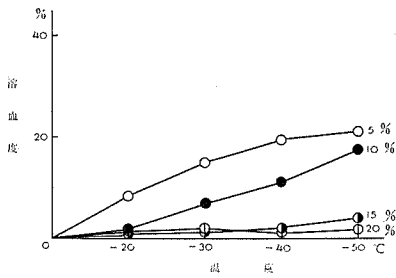
第 20 図 各種濃度メタノール加血液の溶血曲線 (-20°C までの凍結)  
実線は凍結、破線は対照 (非凍結、第 6 図に同じ)

ル加血液の場合 10% 以下の低濃度では添加の影響が余りなく相当溶血するのが認められた (第 18 図)。

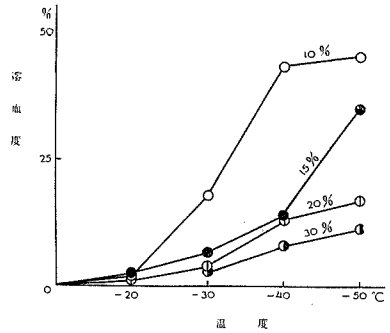
なお本実験の凍結温度 (-20°C) では高濃度の媒質を添加した場合全く凍結しない。その濃度限界は、アルコール及びグリセリンにあつては 25% 以上、エチレンジグリコールにあつては 20% 以上であつて (第 17 図~第 20 図) これらの濃度より高いところではその媒質自身の影響による溶血が現われている (実験 1)。

実験 4 -50°C に於ける溶血率の比較

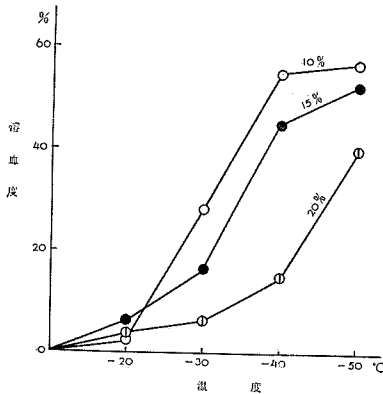
以上の実験で知られるように血液は或る濃度以上の媒質を添加すると、-20°C では凍結しない。一方、余り濃度が大きすぎるとその媒質だけで溶血を起すので或る濃度以上は使用できない。この両者のかねあいを考えながら、種々の媒質濃度で温度を更に -30°, -40°, -50°C まで順次下げてそれぞれの場合の溶血率を検討してみた。但しブドウ糖液加血液にあつては -20°C で既にかかなりの溶血を認めているので今回の実験ではこれを省略した。なお本実験は



第 21 図 グリセリン加血液の各温度まで凍結させた場合の溶血曲線



第 22 図 エチレンジグリコール加血液の各温度まで凍結させた場合の溶血曲線



第 23 図 エタノール加血液の各温度まで凍結させた場合の溶血曲線

二重管を用いてドライアイス・アルコール中に浸したもので、その凍結曲線は実験 2 の各図に示した通りである。

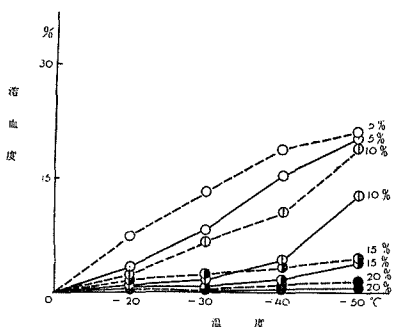
その結果はやはりグリセリン添加血液の成績が最も良く、特に 15% 及び 20% の濃度では -50°C の凍結融解にあつても殆んど溶血を見ない (第 21 図)。しかしエタノール添加血液にあつては各濃度とも温度が低くなるほど溶血が甚だしく 10% 及び 15% では全く低温に耐えられない (第 23 図)。エチレンジグリコール加血液はほぼ中間の成績を示し、やはり高濃度になるほど溶血が少なかった (第 22 図)。なおエタノールにしてもエチレンジ

ライコールにしても、 $-30^{\circ}\text{C}$ 以下の低温では急速に溶血度を増すことが認められる。

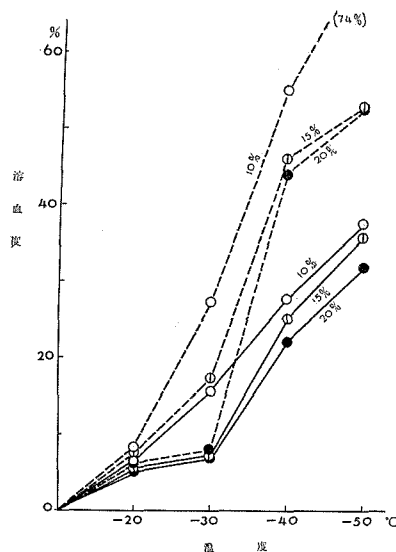
**実験 5 冷却速度の溶血に及ぼす影響**

実験3・4はいずれも緩慢凍結であつたが次に急速凍結との比較をエタノールとグリセリンとについて検討した。その要領は実験方法の2(冷却方法)に既述してあるが、いずれもドライアイスを使用し、緩慢凍結では二重管で所要時間概ね20~30分、急速凍結にあつては一重管で1分以内に、それぞれ所望の温度に到達している。

エタノール添加血液では $-30^{\circ}\text{C}$ を限界として俄かに溶血が甚だしくなるがそのうちでも緩慢凍結のものは急速凍結のものに比較してかなり溶血度が大きい(第25図)。一方グリセリン添加血液にあつては、5~10%の低濃度のもものではやはり急速凍結より緩慢凍結の方が、溶血度やや大であつたが、高濃度になるといずれも溶血少く急速・緩慢両凍結方法の間に殆んど差がなかつた。



第24図 グリセリン加血液の各温度まで凍結させた場合の溶血曲線 破線は緩慢凍結、実線は急速凍結

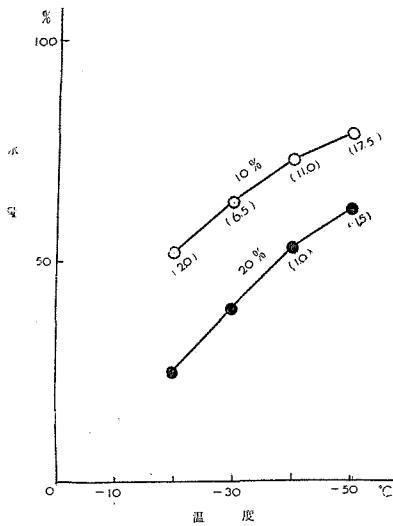


第25図 エタノール加血液の各温度まで凍結させた場合の溶血曲線 破線は緩慢凍結、実線は急速凍結

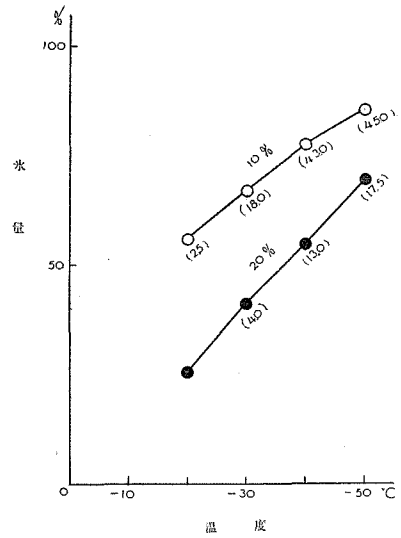
**実験 6 凍結血液中の氷量の比較**

血球が凍結によつて障害されることの理由についてはいろいろな原因があげられるが、そのひとつとして凍結血液中の氷の量について検討してみた。実験方法の3(検査法)に既述した熱量計を使用して各氷量を比較したのが第26~28図である。ここで示した氷量とは、試料全量に対する氷量の百分率であるが、実験方法の項に於いても述べたようにその絶対値については正確を期し得ない。

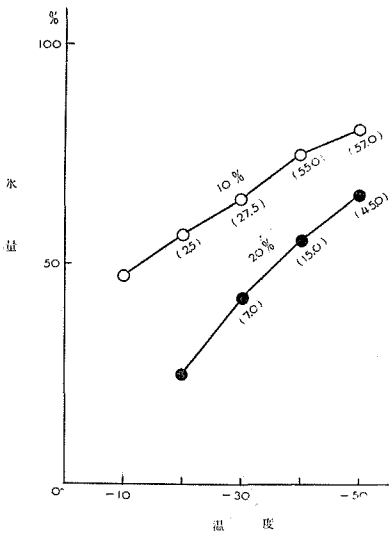
その結果は各図に示すように、各濃度とも温度の低下と共に氷量を増し、濃度が大きくなるに従い氷量が減少している。つまりこれらの媒質を含む場合の氷量は温度には比例し、濃度に



第26図 グリセリン加血液の各温度の氷量 ( )内の数字は溶血度を示す



第27図 エチレングライコール加血液の各温度の氷量 ( )内の数字は溶血度を示す



第28図 エタノール加血液の各温度の氷量 ( )内の数字は溶血度を示す

逆比例することを知った。

次に氷量と融解後の溶血率との関係を見るに例えばグリセリン (第26図) でみれば10%の場合は-20, -30, -40, -50°Cと温度が低下するに伴い氷量も溶血率もほぼ平行して増加しているが、20%のものは氷量が増しているに拘らず溶血は殆んど増していない。また10%の-30°Cと20%の-50°Cのものは、氷量に於いてはほぼ同程度の67%を示すのに溶血率では6.5%と1.5%との開きがある。エタノール (第28図) やエチレングライコール (第27図) についても同様のことがいわれる。殊に媒質間の比較を行つても、10%グリセリンの-30°Cは氷量約70% 溶血率7%、それに対し10%エタノールはやはり-30°Cで氷量70%であるのに溶血は27.5%というわけで、

氷量と溶血率との間に正確な関連性を認めることが出来なかつた。

なお冷却時間を持続させて見たが、各媒質とも60分間放置しても氷量の増加は全く見られなかつた。例えば、試料をそれぞれ-20°C及び-35°Cに凍結してから15~60分間放置し

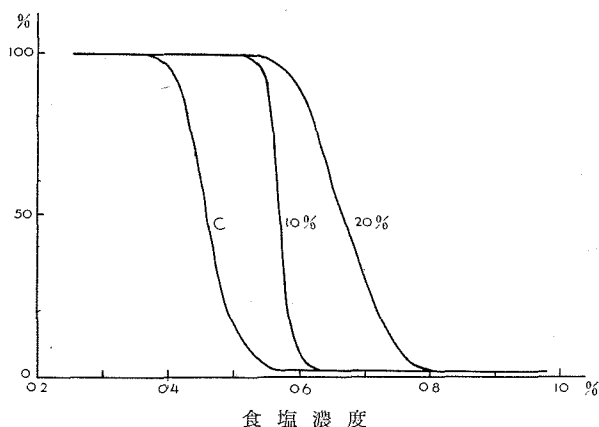
て凍結を持続させても、氷量の増加は対照（凍結直後融解のもの）に比べて認められなかつたのである（図省略）。

### 実験 7 アルコールの血球膜に及ぼす影響

アルコールの赤血球に及ぼす物理化学的作用をみるために2, 3の小実験を行つた。このことはアルコールが血球膜を強固にするかどうか或いは血球膜を透過するかどうかに関連している。

#### (1) 食塩水抵抗試験

第29図のようにアルコール加血液は無処置の血液に比べて食塩水に対する抵抗減弱し、特に10%より20%の方が低下していることが認められる。



第29図 エタノール加血液の食塩水抵抗試験

C……対 照  
 10%……20%エタノール等量加血液  
 20%……40%エタノール等量加血液

(2) ヘマトクリット値	Ht 値 (平均)
10% アルコール加血液 1 cc	20
20%       "       1 cc	20
20% グリセリン加血液 1 cc	20
対照 (血液のみ)       1 cc	39.5

以上いずれも混和10分後に遠沈して測定したものであるが、アルコールやグリセリンを添加したものは血液量が半分になっているから対照と比較して殆んど差はなかつたわけである。

#### (3) 透過率の変化

##### 実験方法

A 液……血液 0.5cc + 生理食塩水 49.5 cc

B<sub>0</sub> 液……生理食塩水のみ

B<sub>1</sub> 液……40%アルコール食塩水

B<sub>2</sub> 液……80%アルコール食塩水

A 液 3 cc + B<sub>0</sub> (B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>) 液 1 cc

上記各混和後 15~20 分間室温放置, ベックマン光電分光比色計により波長 200~700 m $\mu$  間の透過率を測定したが, B<sub>0</sub>, B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub> 三者の間に透過率の差は認め難かつた (図省略)。

#### 実験 8 凍結乾燥の試み

##### (1) グリセリン加血液の場合

実験方法の項で述べたようにグリセリン加の場合は, 試料自身を極く低温で冷却しない限り, 通常のアンプルを室温に露出する方法では乾燥の途中で融解することを認めた。結局, 乾燥は困難でありこのように融解したものは更に水を加えても既に溶血を起しているのので, 乾燥にはグリセリンを加えることが不適当であることがわかる。

##### (2) アルコール加血液の場合

10% または 20% の割にエタノール (或いはメタノール) 食塩水を加えた血液をアンプルに 1 cc とり, 液体窒素中で回転させて急速凍結させたもの及び -30°C の低温室で徐々に凍結させたものを, 乾燥機にとりつけ乾燥を行つた結果は (アンプルは室温に露出) やや融解の傾向はみられるが大體に於いて原形を保つて乾燥は完了する。これに生理食塩水又は 10% エタノール (或いはメタノール) 食塩水を加えて再生を試みるとやや溶解性が悪く瞬時にはとけない。しかもその結果はすべて完全溶血を示し, この範囲内の実験条件では凍結乾燥にはまだ成功出来ないことを知つた。

### IV. 考 察

各種生物学的材料の凍結保存に当つて, グリセリン或いはエチレングライコールを添加することの優秀性については既に多くの研究が発表されている。特にグリセリンは血液の凍結保存にも利用されて保存後の輸血に於ける赤血球の生存率も良く, 実用価値の点では他の中性媒質にその比を見ない。このように凍結によつて起る溶血現象がグリセリン添加により阻止されるということについてはまだ断定的な説明はなされていないが, グリセリン添加による氷点の降下, 脱水或いは細胞膜の透過などに関連する細胞内外の氷晶生成の状態<sup>9)</sup> 特に氷晶の成長速度を弱めること<sup>26)</sup> などの外に, 凍結に伴う塩類の濃縮に対するグリセリンの緩衝作用<sup>27)</sup> が重視されている。

いずれにしてもグリセリン加保存の方法は血液の分野に於いても極めて有効に利用されているが, 極く長期の保存となるとなお改良の余地がある上に, 輸血に当つては有害なグリセリンを除去するのに煩雑な操作を必要とする<sup>9), 26), 27)</sup>。また実験 8 で確認されたように, 凍結乾燥を試みても乾燥過程で融解するし而も完全乾燥は極めて困難であるから, グリセリン加血液の

凍結乾燥は先ず不可能である。

こうした見地から、著者は恐らく乾燥には好都合であるかと予想されるアルコールの血液添加に注目して、グリセリン或いはエチレングライコールと比較しながら種々な実験を行つたのである。

先ず実験1で示したように、アルコールの赤血球に対する作用をグリセリン等と比較してみると、これら媒質の濃度が或る程度以上になればそれだけで溶血をひき起すが、適当な範囲の濃度ではアルコールやグリセリンそのものによる影響は見られない。換言するとアルコールは添加自体に於いて必ずしもグリセリン等に劣るものでないことがわかる。また実験2の結果は各媒質の添加が血液の氷点降下をもたらすことを示しておりその作用はアルコールに於いて最も顕著であることが知られるが、実験3及び4の結果と対照すると、血液の氷点降下と溶血率の低下とが直接平行した関係にあるとは考えられない。事実、血液の過冷却保存を試みるのでない限り、また氷晶の成長状態を徹視的形態的に観察するのでない限り、氷点の降下がどれほどの意味を持つものかは決められない。

次に実験3, 4, 5で見られるようにアルコールは凍結による障害の阻止という点ではグリセリンにもエチレングライコールにも劣ることが判つた。即ち10~20%アルコール加血液は-20°Cまでの凍結融解では溶血軽微であるが-30°C前後から急激に障害をうけ-50°Cに至ると50%以上の溶血率を示して来る。このことは冷却速度の緩・急に関わりなかつた。

更にまた実験6に於いて凍結血液中の氷量を比較した場合、アルコールはグリセリン及びエチレングライコールと同様いずれも濃度と温度とによつて氷量は変化するが、それらの条件に於いて氷量と溶血率との間に一定の関係を見出すことは出来なかつた。Luyet et al.<sup>23), 24)</sup>は凍結による血球の障害を大量の氷の生成によると述べており、本実験に於いても同一試料の同じような条件にあるものは氷量が多くなるほど溶血度は大きくなるが、試料が異り冷却条件が異ると氷量と溶血度は必ずしも一致しないことから、溶血の原因となる因子は氷の量だけではないことがうかがわれる。

次に透過性の問題であるが、周知のようにグリセリンは比較的容易に赤血球膜を透過するものと考えられている。アルコールはこの点に於いてどうであろう。赤血球の膜構造についてはPonderの詳細に亘る観察が報告されているが<sup>29)</sup>、そういう構造をもつ赤血球膜に対して、アルコールの作用に次の二つの面が考えられる。即ちその一つは脂質特にコレステリン、レシチンなどに対する溶解性が強いことであり他の一つはアルコールが水と同様OH基を有することから一定構造の下に存在する膜内の水を追出すことである。実験7に於ける2, 3の観察から推測するとアルコールでは滲透作用よりもむしろ赤血球の脂質に対する影響の方に注目したい。一般に蛋白質がアルコールによつて変性される場合、多くは蛋白質分子を構成する水素結合或いはH<sup>+</sup>及びOH<sup>-</sup>に対する影響が考えられているが、脂質が重要な構成要素となつている赤血球膜では蛋白質のみの場合よりも更に強い影響をうけるであろうことが想像される。特にメタノールはエタノールに比べて脂質との親和性が大きく且つ水素結合をつくり易いから、



赤血球膜の破壊はより強いであろう。このように見て来るとアルコールが赤血球膜の脂質を溶解することがかなり重要な意味を持ち、特にグリセリンと比較した場合溶血阻止作用が劣つて来るのではないだろうか。もちろんこのほか細胞の成分中、凍結に際して起る物理化学的变化に敏感なりポ蛋白<sup>30)</sup>に対しても同様な影響を与えているものと考えられる。

以上の点を考慮しながら凍結乾燥を行つてみたが、従来行われていたと同様の操作で乾燥したのでは復水の過程で全溶血に近い結果となつた。従つて本実験のような方法ではアルコールを用いてもなお凍結乾燥に成功するに至らなかつた。

従つて今後アルコール添加による凍結融解乃至凍結乾燥を成功させるためには、先ず第一に赤血球膜を庇護し強固にする工夫をすべきであると思われる。それには多くの先人が試みた単なる赤血球の洗滌等にとどまらず、より適切な前処置を考えなければならないであろう。

以上述べたように著者は本論文に於いて諸種の媒質を家兎の血液に添加してその凍結融解及び凍結乾燥を観察したのであるが、与えられた条件によつて差はあるとしても赤血球が或る程度の障害をうけることは免れなかつた。こうした凍結による障害については従来から氷晶形成の状態が重大な因子として採りあげられているが、著者は実験1~8を通じて先人の諸説と比較対照した結果、氷晶形成特に氷の量では説明出来ない因子のあることを認めた。

なお本実験を通じてグリセリンが赤血球の保護を最もよく行うことが改めて確認されたわけであるが、アルコールの添加によつてもかなりの好結果が得られることが分つた。特に乾燥に当つては、グリセリンが乾燥極めて困難であるのに反しメタノールやエタノールは氷の昇華と同時にそれらの蒸発が容易に期待出来るので乾燥に適していた。しかし実際に凍結乾燥を実施した結果は予期の通りにいかず失敗に終つた。

そもそも凍結乾燥の過程をその結果から分析して考えてみると、凍結と乾燥と再生の3段階に分けることが出来る。アルコール加血液の凍結乾燥による溶血は、果してこれら3段階のうちどこで起つているのかは明らかでないが、それらの過程を更によく吟味することが必要である。

本実験を殆んど完了した頃、たまたま文献<sup>32)</sup>に於いて Parkes が 1958 年の London の Symposium で組織の凍結乾燥にはメタノールを使用するのがよいであろうと示唆していることを知つた。著者の意図するところと一致するものがあるので今後更に検討の歩を進めたいものと思う。

## V. 結 言

著者はアルコール(主としてエタノール)の物理化学的性質に着目して、これを添加することによる血液の凍結融解乃至凍結乾燥の成果を検討するため各種の実験を試みた。実験に当つては、これまで凍結による溶血の阻止に有効と認められているグリセリン及びエチレングリコールを比較観察の対照とした結果、次の成績が得られた。

- 1) 凍結実験に供せられるアルコールは10~20%が適当で、それ以下では溶血阻止の作

用が少なくそれ以上では血液の凝固を来し易い。

2) アルコール添加血液を種々の条件で凍結融解を行つた場合かなりよく溶血が阻止されることを知つた。しかしその程度はグリセリン添加のものに及ばない。エチレングライコールはほぼその中間に位する結果を示した。

3) 各種媒質添加血液の凍結融解による溶血度は凍結によつて生じた氷の量に必ずしも比例しない。

4) アルコール加血液の凍結乾燥を試みたが、従来の方法では再生後の溶血が甚だしくて成功するに至らなかつた。

稿を終るに臨んで、終始御懇篤な御指導と御鞭撻を賜りました根井外喜男教授に心から厚く御礼申し上げます。

また種々の御教示を頂きました林喬義助教授並びに二瓶泰一博士に感謝の意を表すると共に多大の御援助を頂いた浅田実君に感謝いたします。

#### 文 献

- 1) 根井外喜男 1954 凍結乾燥法とその応用の現況. 日本医事新報, **1589**, 4208.
- 2) Woodcock, A. H., M. W. Thistle, W. H. Cook and N. E. Gibbons 1941 The ability of sheep erythrocytes to survive freezing. *Canad. J. Res., Sect. D.*, **19**, 206.
- 3) Florio, L., M. Stewart and E. R. Murgage 1943 The effect of freezing on erythrocytes. *J. Lab. Clin. Med.*, **28**, 1486.
- 4) Griffiths, J. J., J. W. Hornibrook and J. J. Downs 1949 Freezing and thawing red blood cells. The preservation of the formed elements and of the proteins of the blood.
- 5) Smith, A. U. 1950 Prevention of hemolysis during freezing and thawing of red blood cells. *Lancet*, **259**, 910.
- 6) Smith, A. U., C. Polge and J. Smiles 1950 Microscopic observation of living cells during freezing and thawing. *J. Roy. Micr. Soc.*, **71**, 186.
- 7) Mollison, P. L. and H. A. Sloviter 1951 Successful transfusion of previously frozen human red cells. *Lancet*, **261**, 862.
- 8) Sloviter, H. A. 1951 Recovery of human red blood cells after freezing. *Lancet*, **260**, 823.
- 9) Lovelock, J. E. 1952 Resuspension in plasma of human red blood-cells frozen in glycerol. *Lancet*, **262**, 1238.
- 10) Lorant, A., G. J. Lorant, A. Angrist and R. Korpman 1953 Strage of blood below 0°C in liquid state. *J. Clin. Invest.*, **32**, 1005.
- 11) Strumia, M. M. 1954 The preservation of blood for transfusion. *Blood*, **9**, 1105.
- 12) 大村泰男 1954 保存血液の製法. 東京医事新誌, **71**, 277.
- 13) 森 玄治 1956 血液の低温保存に関する研究. 低温科学, Ser. B, **14**, 47.
- 14) Blanchaer, M. C. and C. I. Mayman 1952 Glucose utilization in blood-cell surviving strage at -79°C. *Canad. J. Med. Sci.*, **30**, 360.
- 15) Luyet, B. J. and P. M. Gehenio 1954 Effect of the rewarming velocity on the preservation of rapidly frozen blood. *Biodynamica*, **7**, 151.
- 16) Lovelock, J. E. 1953 The hemolysis of human red blood-cells by freezing and thawing. *Biochim. Biophys. Acta*, **10**, 414.

- 17) 坂牛栄治 1957 血液の保存に関する研究. 科温科学, Ser. B, **15**, 57.
- 18) 河内虎男 1954 血色素の測定について. 血液討議会報告, **6**, 336.
- 19) Luyet, B. J. and P. M. Gehenio 1952 Effect of glycerol in limiting ice formation in tissues subjected to low temperature. *Biodynamica*, **7**, 138.
- 20) 篠崎寿太郎 1958 凍結したイラガ前蛹の体内の水の量. 動物学雑誌, **67**, 38.
- 21) 鮫島実三郎 1943 物理化学実験法 (252頁). 裳華房, 東京
- 22) Creed, E. 1938 The estimation of the fragility of red blood corpuscles. *J. Path. Bac.*, **46**, 331.
- 23) Luyet, B. J. and J. Menz 1951 Hemolytic effect of freezing at near-zero temperatures. *Biodynamica*, **7**, 129.
- 24) Lusena, C. V. and D. Rose 1956 Effect of rate of icecrystal on hemolysis of erythrocytes. *Arch. Biochem. Biophys.*, **65**, 534.
- 25) Lovelock, J. E. 1953 The mechanisms of the protective action of glycerol against hemolysis by freezing and thawing. *Biochim. Biophys. Acta*, **11**, 28.
- 26) Chaplin, H. Jr. and N. Veall 1953 Removal of glycerol from previously frozen red cell. *Lancet*, **264**, 218.
- 27) Brown, I. W. and H. F. Hardin 1953 Recovery and in vivo survival of human red cells. *Arch. Surg.*, **66**, 267.
- 28) Luyet, B. J. and Schmidt 1950 Determination of amount of ice formed in blood at various freezing temperature. *Federation Proc.*, **9**, 81.
- 29) Ponder, E. 1957 The red blood cell. 科学, **27**, 243.
- 30) Lovelock, J. E. 1957 The denaturation of lipid-protein complexes as a cause of damage by freezing. *Proc. Roy. Soc., B*, **147**, 427.
- 31) Meryman, H. T. 1956 Mechanics of freezing in living cells and tissues. *Science*, **124**, 515.
- 32) Parkes, A. S. and A. U. Smith 1958 Freezing and drying biological materials. *Nature*, **181**, 1694.
- 33) 根井外喜男 1956 血液の保存. 血液と輸血, **2**, 第5号, 2.

### Résumé

Nowadays it is well known that glycerol is quite useful for preserving the whole blood at very low temperatures without hemolysis, but glycerol is not adequate for freeze-drying on account of liquefying during drying process. Alcohol has previously been used only for keeping blood in the supercooled unfrozen state at low temperatures near 0°C or for fixing erythrocytes at ordinary temperatures. The present experiment may be the first attempt to use alcohol for storage of blood by freezing or freeze-drying.

Rabbit blood was utilized as the original material and ethyl-alcohol or methyl-alcohol was mixed with the blood in various concentrations for comparing with glycerol- or ethylene-glycol-blood. Experiments concerning freeze-thawing were performed with those materials under various rates of cooling or at various low temperatures. Amount of ice formed in the frozen materials or hemolysis after freeze-thawing was calorimetrically or photometrically determined respectively. Freeze-drying was done by the ordinary method. Results obtained by those experiments are summarized:

- 1) By the use of alcohol as a medium within 20% concentration, blood can keep

its normal habit, but if over 20%, alcohol causes hemolysis or coagulation.

- 2) Alcohol proves to be protective for erythrocytes against hemolysis caused by freeze-thawing. Its protective action is strongest in concentrations ranging from 10 to 20%. Generally speaking, glycerol is most protective against hemolysis and alcohol is least.
- 3) Parallelism between amount of ice formed in the frozen state and hemolysis after thawing is hardly found.
- 4) In freeze-drying experiment of blood, it is recognized that alcohol is adequate for drying. However, all of the red cells are hemolyzed when they are reconstituted in saline or alcohol-saline, so that successful results cannot be said to have been obtained.