



Title	氷点に近い温度での凍結による溶血の機構 : 種々の凍結条件による溶血の吟味
Author(s)	根井, 外喜男
Citation	低温科学. 生物篇, 25, 133-142
Issue Date	1967-12-25
Doc URL	http://hdl.handle.net/2115/17728
Type	bulletin (article)
File Information	25_p133-142.pdf



[Instructions for use](#)

氷点に近い温度での凍結による溶血の機構 II*

種々の凍結条件による溶血の吟味

根井外喜男

(低温科学研究所 医学部門)

(昭和42年9月受理)

I. 緒言

第1報¹⁾の緒言で述べたように、 -10°C までの緩慢凍結による溶血は、さきの実験結果²⁾だけからすれば、細胞外凍結による塩溶液の濃縮が主因であろうと推定されるところであるが、更にその機構を掘下げて究明するために、今回の一連の実験が行なわれたのである。

既に第1報及び別報³⁾の成績でもわかるように、この温度範囲の凍結で、単に濃縮塩溶液による塩害だけでは説明できない幾つかの事実が見出された。そこで引き続き、溶血機序の究明のために、種々の凍結条件下での溶血のおこり方がいろいろと吟味された。

II. 方法

試料: 蔘酸カリを加えて採血した家兎血液を0.15 M 食塩溶液で3回洗い、その浮遊液を作った。最初に0.15 M NaCl 単塩浮遊液 (pH 5.6) と0.02 M NaH_2PO_4 , 0.02 M Na_2HPO_4 を含む0.15 M NaCl 緩衝浮遊液 (pH 7.0) の各温度に凍結した場合の溶血を比較した結果、溶血曲線に差をみとめなかったため、本実験に於いては、0.15 M NaCl 単液を血球の媒液として用いた。塩溶液の濃度を吟味する場合は、0.3, 0.6, 1.0, 2.0, 3.0 M 等、各種濃度の塩溶液を用い、血球濃度は原全血のその1/10とした。

凍結融解法: 径12 mmの小試験管に、試料0.2 mlをとった。凍結にはHaakeのKT 62型超恒温器を用いた。本器はメタノール循環式で $\pm 0.05^{\circ}\text{C}$ 以内で一定温度に保持される。試料を入れた試験管を浴槽のメタノール中に浸し、 -1°C ~ -2°C の間で植氷を行なう。それには、別に用意した液体窒素で冷し先端に空気中の水蒸気が凝結してできた霜のついた金属の細い針を、試験管を少し振って管壁に付着した薄い試料層の一部に接触させる。試料は僅かに過冷却しているので、植えつけられた氷の結晶はそのまま試料中に成長を続ける。なお、後述の実験結果からもわかるように、細胞の密度が問題となるので、試料は植氷の直前によく振盪して、均一な血球浮遊液としておくことが肝要である。

植氷した後は、 $1\sim 2^{\circ}\text{C}/\text{min}$ の速度で冷却し、 -10°C までの間の所要温度に達したところ

* 北海道大学低温科学研究所業績 第854号

で10分間その温度に保ち、次に融解に移る。即ち試験管を低温槽よりとり出し、+20°Cの温浴槽中に浸し振盪しながら融解させたのである。

溶血度の測定：凍結融解後の試料を適宜に稀釈し(原全血液の200倍)、遠沈上清にKCNを加え、光電比色計の540mμの波長のところで比色定量した。対照には蒸溜水による完全溶血のものをとり、それに対する百分率で表わした。

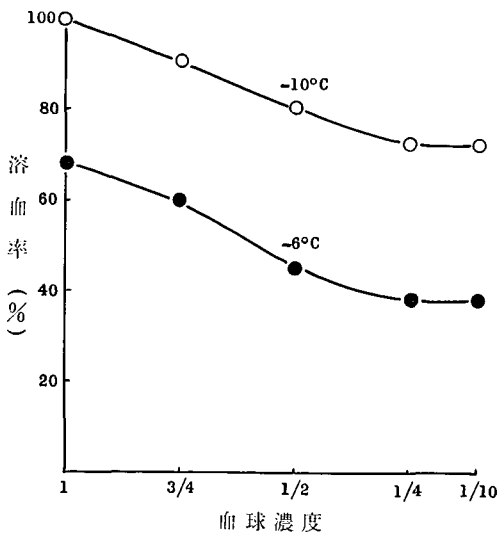
III. 結 果

1. 全血液と食塩水浮遊液との比較

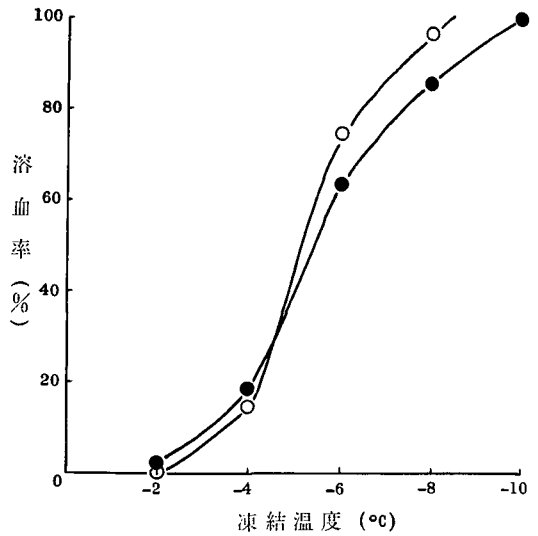
全血液と、それを0.15M食塩水で洗い同じ液に全血液と同じ血球濃度になるよう浮遊させたものを、-2°Cから-10°Cに亘る各温度まで凍結させて、融解後の溶血度をしらべると、第1図に示すように、全血液の方が-5°C以下で僅かながら溶血度が高かった。

2. 血球濃度と凍結による溶血

-6°Cと-10°Cに於いて、浮遊液中の血球濃度が凍結による溶血にどのように影響するかをしらべた。即ち、原全血液中の血球濃度を1とし、0.15M NaCl洗滌浮遊液の1, 3/4, 1/2, 1/4, 1/10の各血球濃度のものを比較してみると、第2図に示すように、1/4あたりまでは血球濃度が低くなるにつれて、溶血度が低下した。



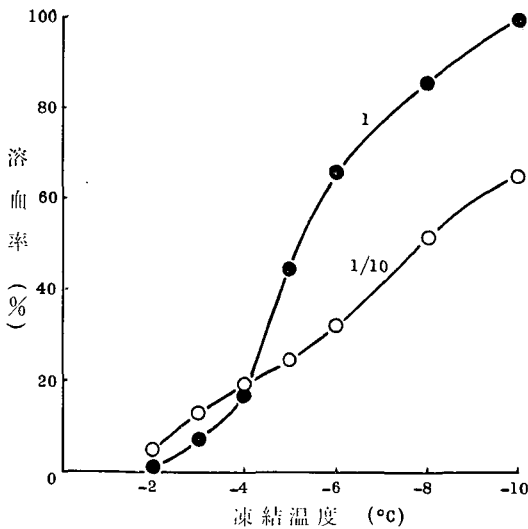
第2図 浮遊液中の血球濃度と溶血率との関係
凍結温度 -6°C 及び -10°C に於ける溶血曲線
全血液中の血球濃度に等しいものを1とし以下1/10まで稀釈したものの比較



第1図 -10°Cまでの凍結融解による溶血曲線
●, 0.15M NaCl 浮遊液; ○, 全血液

次に血球濃度1と1/10のものを各凍結温度について比較してみると、第3図に示す如く、-4°C付近で交叉する溶血曲線が得られた。-4°C以下では明らかに1/10のものの溶血が低かった。

以上の結果から、血球浮遊液では、血球濃度の高いものが、凍結によって障害を受けやすいということがわかれたので、この点を確認するため更に次のような幾つかの実験を行なった。



第3図 血球濃度の違う浮遊液での溶血曲線
全血液中の血球濃度に等しいもの(1とする)
とその1/10のものとの比較

えて、凍結融解を行なうと、原1濃度浮遊液の場合とほぼ同様の溶血曲線が得られた。

更に9/10の血球容積に等しい酵母細胞を用い、一方は生細胞のまま、他方は加熱死細胞として(いずれも0.15M食塩水で十分に洗って、比色定量の際に問題になるような物質が残らぬよう予めよく除いておく)、1/10血球浮遊液に加え、型の如く凍結融解を行なうと、この場合にも、ほぼ1濃度浮遊液に一致する溶血曲線を示した。

ここで興味のあることは、血球でも酵母でも、生細胞と死細胞とでは溶血曲線が多少異なり、生細胞を加えたものは原1濃度血球液の溶血曲線にほぼ一致するが、死細胞を加えたものでは、 -6°C 付近の溶血率が特に高い。この点の解釈については後に考察の項で論及したい。

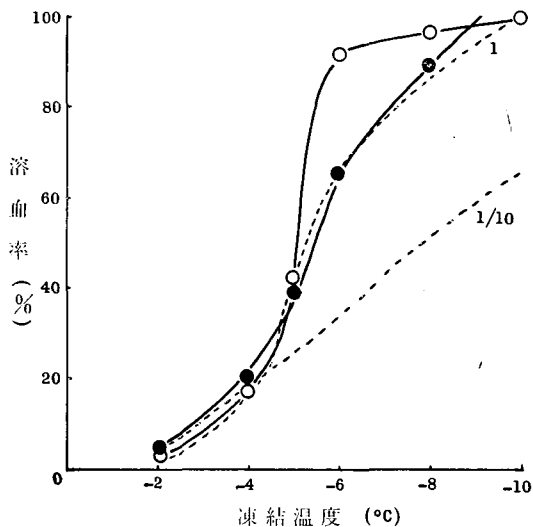
3. 食塩濃度と凍結による溶血

食塩濃度を0.3, 0.6, 1.0Mとし、血球濃度を1/10とした浮遊液を凍結融解すると、第5図に示すような溶血曲線を画く、即ち、0.3, 0.6Mと食塩濃度を増

(1) 1/10血球濃度の浮遊液を作り、これを氷室内に数時間放置したり、2,000 r.p.m., 5分くらい軽く遠心して、それぞれを1/10そのままのもの(よく振盪したもの)と比較してみると、前2者のように血球の沈澱したものでは、明らかに溶血度を増した。

(2) このように、凍結の際には、浮遊液の塩濃度は同じでも、細胞の占める空間或いは細胞相互の位置的関係が問題になるものと思われたので、その点の吟味を続けた。

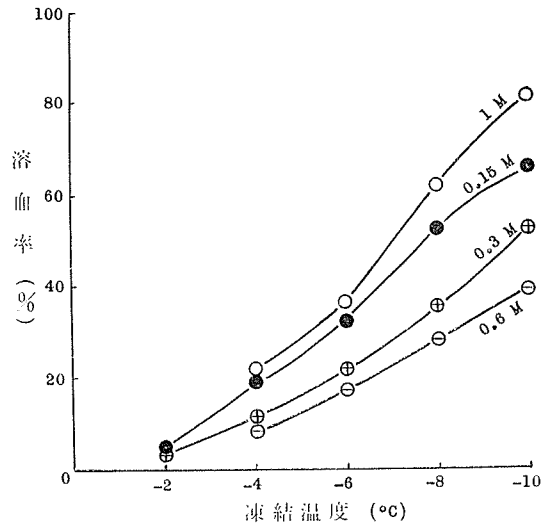
即ち、全血液中の血球濃度の9/10に相当する血球をアルコールで処理したり、 100°C で10分加熱処理をした後、よく洗い、1/10濃度の正常血球浮遊液に加



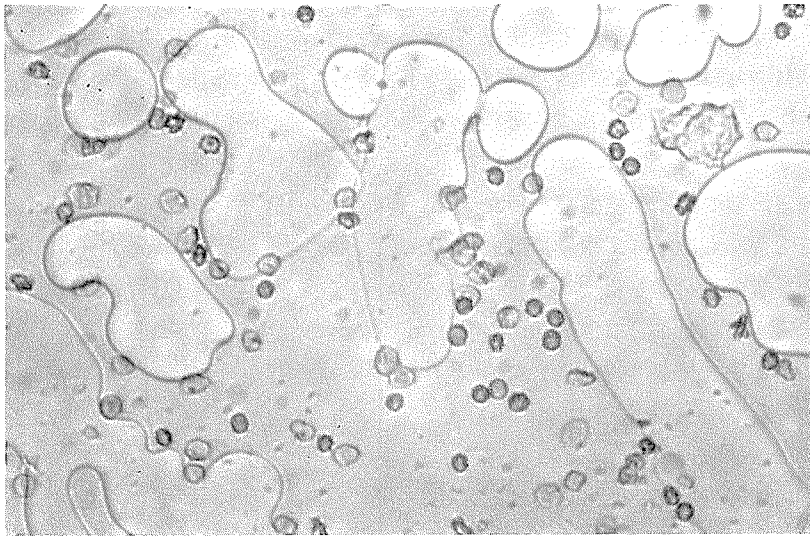
第4図 1/10濃度の血球浮遊液に9/10相当の酵母細胞を添加した場合の溶血度の増加
●, 酵母生細胞; ○, 酵母死細胞; ---, 酵母を含まない血球浮遊液

すほど溶血率は低くなるが、1 M ではかえって 0.15 M より溶血は強くなる。

一方、同様の食塩濃度の血球浮遊液の凍結像を顕微鏡で観察すると、例えば第 6 図に示すように、0.6 M 溶液の -8°C の凍結像では、未凍結溶液部分の占める容積は、0.15 M 溶液の同じ温度での溶液部分に比較してはるかに大きい (別報¹⁾ 図版 III-8 と比較)。これは理論的にも推定されるように、 -8°C での溶液部分は、いずれも同一濃度の 2.2 M まで濃縮されているが、容積は 0.6 M の方が 4 倍を占める筈である。従って、同じ血球濃度ならば、溶液部分の大きい 0.6 M の方が、血球の密集度は低いことになる。



第 5 図 塩濃度の異なる血球浮遊液の溶血曲線 (1/10 血球濃度)



第 6 図 0.6 M 溶液の血球浮遊液の -8°C に於ける凍結像. $\times 600$

4. 凍結溶血及び滲透圧的溶血に対する脱水速度の影響

前実験²⁾の電子顕微鏡的観察で、 -30°C までの緩慢凍結では、殆んどすべての血球は細胞外凍結の結果、収縮していることがみとめられている。

本実験の凍結温度 -10°C までの範囲では、試料を入れた試験管のアルコール槽への直接投入による急速凍結でも、精々 $10^{\circ}\text{C}/\text{min}$ くらいの冷却速度しか得られない。従って、 $1^{\circ}\text{C}/\text{min}$ と $10^{\circ}\text{C}/\text{min}$ との冷却速度の差では、溶血曲線の上で殆んど差はみとめられなかった。

一方対照実験として、3 M までの各種濃度の食塩溶液に血球を浮遊し、更に 0.15 M の等張液に戻した時の溶血曲線が得られているが (別報³⁾ 中第 1 図)、この際の細胞よりの脱水及び復水の速度が吟味された。即ち、0°C に於いて、血球沈渣に高張液の瞬間的注加、或いは滴加によって漸次濃度を高め 10 分を要して所要濃度に達する緩慢注加、更に同様の方法で 0.15 M の等張液まで戻す急速注加法及び緩慢滴加法の比較を行なった結果、いずれの組合せに於いても得られた溶血曲線の上で差違のないことがみとめられ、凍結でも滲透圧でも、この範囲内の脱水・復水の速度では、溶血度に影響のないことがわかった。

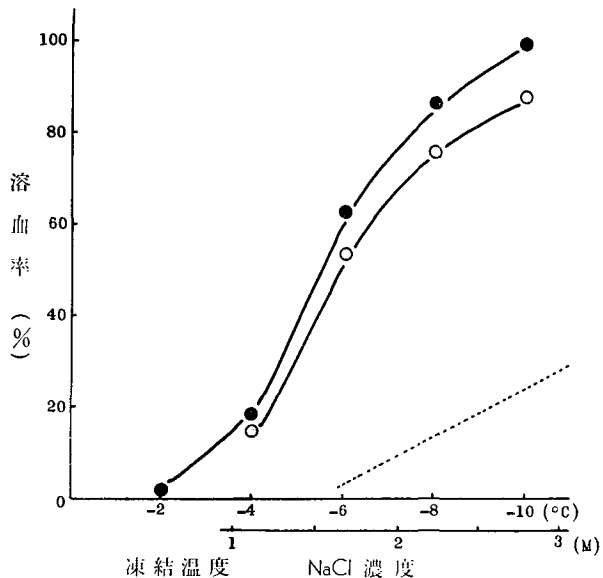
5. 凍結過程での溶血の吟味 (凍結状態のまま濃縮溶液で置換融解する法)

従来不明であった凍結過程での溶血が顕微鏡的観察によって確認された¹⁾。しかし、遊離ヘモグロビン量を定量する測定法では、融解後の試料でなければしらべることはできないので、これまで、凍結過程だけの溶血度の測定法はなかった。そこで、この目的のために特別に次のような工夫を行なった。先ず試料の各凍結温度を氷点とする高張塩溶液を作り、それぞれの温度に冷しておく。氷点では容易に凍結を開始しないから、いずれも液状のままである。一方通常の凍結条件で凍結させそれぞれの温度に充分おいた血球浮遊液の試料に、この準備した高張液を加えて、その温度に保ち時々振盪する。しかしこの温度では高張液でも凍結するおそれがあるし、また試料中の氷の置換には時間がかかるので、僅かに温度を上げる。このようにして、かなり時間はかかっても、1~2°C 温度が上昇するだけで試料は完全に融解する。

融解後は通常の場合と同様にして溶血度を測定した。その結果は第 7 図に表わされるように、高張塩溶液にさらしただけのものよりはるかに強く溶血し、普通の凍結融解をしたものに近い溶血曲線を示した。

6. 凍結過程での未凍結溶液部分中の濃度分布について

実験 3 のような場合、食塩濃度が高いほど凍結過程で凍らずに残る溶液部分が多いから、溶液の中心部と、氷に接する周辺部とでは、塩の濃度に差ができるのではないかと想像される。特に本実験のように、比較的高い温度で緩慢凍結する場合は、このような溶液部分内部に塩濃度の勾配のできる事が気づかれる。もし中心部ほど濃縮されず薄いまま残っているとすれ



第 7 図 凍結血液を高張塩溶液で置換融解した場合の溶血曲線

●, そのまま凍結融解した場合 (対照); ○, 高張液で置換融解した場合; ---, 高張塩溶液にさらしただけでおきる溶血

ば、それだけ溶血が少ないことになるので、塩濃度と溶血度の関係を明らかにするためには、この点の吟味が必要となる。

そこで、顕微鏡的な形態検査を行なった結果、凍結過程で溶血が起こる場合、溶液部分の内部では、周辺部分であろうと中心部であろうと、別に部位的な差はなく起きていることを確認した(別報¹⁾Iの実験に於いて)。また試験管内の凍結融解による溶血の定量的試験で、 -10°C までの間の最終到達温度で長時間(1~2時間)保持しても、溶血度を増さないことをみとめたので上記のような濃度勾配は殆んど考慮する必要がないものと思われる。

IV. 考 察

-10°C までの比較的高い温度で緩慢な凍結を行なった場合の溶血の機構を、これまでに試みたいろいろな角度よりの検討(別報^{1,3)}をも含めて)の結果から、総合的に考察を進めてみたい。ただ、溶血度の定量的測定のために試験管内で凍結させたものと、形態的観察のために2枚のガラスに挟んで顕微鏡下で凍結させたものとは、量的にもまた方法的にも同一条件とはいえないが、得られた結果はほぼ同様の傾向を示したので、これらを一括して論議することはさしつかえないものと思う。

さて、この条件での試料の凍結状態を考えてみるのに、本実験並びに前実験の低温顕微鏡及び電子顕微鏡による観察の結果からもわかるように、植氷された氷晶は細胞周囲の溶液中で成長し、血球はその濃縮溶液にとり囲まれるために脱水収縮をきたす。従って細胞内凍結を起こしているものはまず見当らない。次に試料の温度を上げると、氷は次第に融解し、やがて完全に消失すれば、濃縮溶液は元の等張の濃度に戻るのである。

こうした凍結融解が行なわれた結果、それぞれの到達温度に対応した溶血度を示した。その溶血の機構については、細胞内凍結による細胞障害を考える必要はないので、まず濃液塩溶液による塩害を考えるのが妥当であろうと思われた。Lovelock⁴⁾も報告したように、凍結融解による溶血曲線と、高張塩溶液にさらした後、等張液に戻した時に見られる溶血曲線とがほぼ一致したことも、それを支持する大きな理由となる。

ところが、本実験で得られた幾つかの新しい事実はまた塩濃度だけでは解釈できないことを物語っている。従って、凍結による溶血の機構に関しては、更に新たな見地から検討考察を加えなければならないものと思われた。

さてここでもう一度、塩溶液による溶血を考えてみるのに、高張塩溶液にさらされただけで僅かながら溶血がおきる。塩濃度によって溶血度に差はあるが、とにかくこの溶血の原因は、塩の血球膜に対する lyotropic な作用と考えられていた。更に高張溶液から等張液に戻した時、強い溶血がおきるが、これは滲透圧的な溶血とみなされていた⁴⁾。

こうした塩溶液による溶血の過程を、凍結及び融解の過程にあてはめてみると、凍結の過程では塩の濃縮がおこるから、前者に相当し、融解の過程では濃縮された塩溶液がもとの等張液に戻るから、後者に相当すると考えてよいわけである。この両者を合せたものが、凍結融解後の溶血度ということになる。

ところが、実際に血球は凍結過程で溶血するのか融解過程であるのか、これまではっきりしていなかった。Luyet 等⁵⁾の報告によって、融解過程の溶血は明らかにされたが、凍結過程については依然疑問のままだった。しかし、上記のように塩溶血による溶血だけから考えても、これら両過程でそれぞれおきてよい筈である。事実、本実験に於いて、凍結過程の溶血が形態的にはっきりとみとめられたわけである。

但し、凍結過程の溶血を、塩の lyotropic な作用による溶血だけと解釈するには、次のような事実がこれに反するのである。

1) 2 M 以上の濃度に相当する、つまり -7°C 付近より低い温度まで試料が冷却されなければ、溶血はおきない筈なのに、実際にはかなり高い温度 (-2°C から既にみとめられた) で血球の溶血が始まった。

2) 凍結過程でみられる溶血の割合が、高張塩溶液にさらしただけでおきる溶血度よりもはるかに高かった。例えば -10°C での溶血血球数 (顕微鏡的観察であるから定量性はやや低い) は 50% を越し、2.5~3 M での溶血度 20~30% に比較してかなり高い。

3) 凍結過程だけでおきる溶血が塩の lyotropic な作用のみによるものならば、凍結血液を高張溶液で置換融解したものは、高張液にさらしただけのものと同じ低い溶血度を示してよい筈なのに、実際には通常の凍結融解に近い強い溶血度を示したのである。

以上の三つの事実から考えても、凍結過程にみられる溶血は、単に濃縮塩による障害というだけでなく、更に別な因子が加わっているものと解釈せざるを得ない。

ところで、溶血の機構の説明にあたっては、これらの問題ばかりでなく、次にあげるようなお多くの新事実が、重要な役割を演ずることがわかってきた。そのうちでも特に顕著なのは血液試料中の血球濃度の問題であった。つまり一定容量の試料中に占める細胞の容量が、凍結融解による溶血度に対し大きく影響するということである。実際に本実験に於いて得られた事実として

- 1) 凍結融解の結果は、血球濃度の低いものほど (ある範囲内で)、溶血が少ない。
- 2) 顕微鏡下の凍結実験で、血球濃度の大きいものに強い溶血がみられる。
- 3) 対照実験の非凍結試料で、血球が狭い場所に圧縮され密集した時に溶血がみられる (顕微鏡的観察)。
- 4) 血球を沈澱させると、分散浮遊液より溶血が強くなる。
- 5) 1) のように血球濃度を低くすると、溶血は少なくなるが、これに細胞を加えて、細胞全体の占める容積を原液のそれと同じにすれば、溶血も原液と同じまで強くなる。

以上の場合の実験条件を考えてみるのに、いずれも血球濃度が多いか少ないかの違いだけで、塩濃度はすべて等しいのであるから、結果として得られた溶血度の差は、結局試料中の血球濃度の差に基づくものと考えねばならない。しかも、ある濃度以下では差は出ないこと、またある温度以下まで凍結するのでなければはっきりした差の出ないことなどから、細胞と周囲の溶液との量的な割合が問題になるものと思われる。つまり、ある限度以上に細胞が密集した場合に溶血が増すということは、氷による圧力か、細胞相互の圧縮或いは接触による細胞障害

と考えざるを得ないであろう。今、単純に -6°C での溶血を考えてみても、半分は塩の濃縮による障害、更に残りの半分は前記のような因子による機械的障害と見做してよいように思われる (第2図中、 -6°C での1と1/10との比較)。

なお凍結温度に相応した塩の濃度、溶液部分の容量、血球の濃度、細胞水分の脱水の程度などと溶血度との相互関係については、別に今少し定量性をもった検討を加えてみたいと考えている。

前記の幾つかの事実のうち、顕微鏡標本によるものでは、たとえ見かけの溶液部分の容量が大ききようにみえても、周囲の氷による直接の圧縮、特に上下方向でのその作用を考慮する必要がある。また、細胞の占める容量の問題を検討する手段として、正常血球に処理血球、或いは他細胞の添加実験を行なった。正常血球と明瞭に区別できるようヘモグロビンの遊離しない加熱或いはアルコール処理血球 (充分洗ったもの) を加えたり、形態や大きさが血球にほぼ近く、しかもヘモグロビンの問題のない酵母を用いたりしたのである。その結果は予期の通りであったが、そのうち特に興味のあることは、生細胞と死細胞とで溶血曲線がやや異なることである。

これは、生細胞であれば、温度低下による氷晶の成長に伴い、細胞の脱水収縮がおこるのに対し、死細胞では半透膜性の消失から、このような現象のみられないことによるものではないかと想像される。この点についても更に詳細な検討が必要であると考えている。

次に実験条件の吟味の一つとして、血球浮遊液の塩濃度を変えてみた場合、0.15 M から 0.3 M、0.6 M と塩濃度が増すほど溶血度の低下することを見とめた。この凍結過程での塩濃度の変化を考えてみるのに、最初の濃度が違っていても、氷点以下まで凍結すれば、すべて同一濃度になる筈であるから、溶血度の差は塩濃度の差では説明がつかない。しかし、同じ温度までの凍結では、最初の濃度の高いものは、未凍結溶液部分の占める容積は広い筈である。例えば 0.6 M では 0.15 M の4倍の容量がある筈で、このことは顕微鏡の観察でも実際にみとめられたのである。このように凍結による溶血が、血球容積対溶液容積の比に左右されるとすれば、この場合にも、前記血球濃度を変えた場合と同様、溶血の一因として、血球の氷による障害、或いは血球同志の機械的障害を考えねばならぬことになると思う。なおこの溶液塩濃度の検討に於いて、1 M 浮遊液ではかえって溶血が増したことについては、Lovelock のいう thermal shock⁵⁾ によるものか、或いは冷却速度の大きくないことから単に lyotropic な作用による膜の変化と考えてよいのかはこれだけではわからない。

以上のように凍結過程に於ける細胞の機械的障害が問題となるとすれば、当然、対照実験として、高張塩溶液中の細胞の機械的障害の有無の検討が必要となるであろう。その目的で行なわれたのが、別報の実験³⁾ である。それによれば、高張塩溶液にさらした後、等張液に戻した時の溶血は、ほぼ凍結融解後のそれに一致するという Lovelock と同様の結果を得た。従ってこの結果だけからすれば、一見凍結融解による溶血は塩濃度だけで説明されるかのように思われる。しかし、本実験でみられたように、実際の凍結過程では、高張液にさらしただけで起こる溶血に比較してはるかに強い溶血を示すし、またこの非凍結の対照実験でも、塩濃度だけ

では説明できない結果がみられた。例えば、減圧による塩溶液の濃縮過程では極めて僅かの溶血しかみられないのに、溶液部分が狭少となって血球が圧縮密集したようなところでは、容易に完全溶血を起こすことがみられた。このことは濃縮溶液中（或いは溶液の濃縮がなくても、圧縮だけで血球の破壊があるかもしれないが、その点の確認はない）の血球が、機械的な力で破壊されやすいことを示すものと思われる。

更に機械的障害作用を検討する目的で、各種塩濃度浮遊液に対する超音波作用をしらべたところ、超音波の出力によって特有の溶血曲線を描いた。この場合の超音波作用の機序が明らかでないため、この成績をどう説明してよいか些か判断に苦しむが、とにかく1M以上の濃度のもものでは明らかに0.15Mのものとは違った態度を示した。凍結によって塩濃度が増した場合、機械的な力に対する抵抗性に差ができるであろうことは、こうした事実からも想像される。またこの場合にも、血球濃度の大きいものが強い溶血を示したので、本実験の凍結融解の場合と同様、血球相互間の機械的障害が問題となるものと思う。

本考察の最初にも述べたように、比較的高い温度での緩慢凍結では、血球は殆んどすべて細胞外凍結による収縮像を示す。しかも、 -10°C までの温度範囲で、 $1\sim 10^{\circ}\text{C}/\text{min}$ くらいの冷却速度の差では溶血度の差はないし、非対照実験での塩濃度の差による細胞水分の滲透圧的脱水復水試験で、水の移動速度による溶血度の差はみとめられなかった。このことは血球膜の水に対する透過性の大きいことを示すものと思われる。しかし、顕微鏡的観察では、凍結条件によってかなり違った所見が得られた。これは、薄層試料では相当大きな冷却速度のものが得られること、実際凍結の形態的なパターンがかなり違うことなどが起因して、溶血度の差をもたらすのではないかと推定される。ここでも到達温度とそれに対応する塩濃度だけでは説明のできない溶血度の差異を、何によって解釈すべきか問題は依然として残されている。

塩濃度の異なる浮遊液での溶血度の差が、溶液部分の容積の大きいための濃度勾配によるのではないかとの疑いは、本文に述べたような実験事実から否定されたわけである。

以上を要するに、従来、濃縮塩による塩害のみで説明されていた比較的高い温度での血球の溶血には、機械的障害も関与していることが、いろいろの事実から実証せられたものと思う。

V. 摘 要

-10°C までの緩慢凍結によって起こる赤血球の溶血の機構を種々の角度から検討した。その結果、次のような事実が確認された。

- 1) 血球濃度を増すと（ある範囲内で）、溶血度が増す。血球を沈澱させたり、他の細胞を加えたりしても、溶血度が増す。
- 2) 塩濃度を増すと（ある範囲内で）、溶血度が低下する。
- 3) 高張塩溶液による置換融解で、凍結だけでの溶血（凍結溶血）が、高張液にさらしただけで起こる溶血（塩害溶血）に比較して、極めて高いことがみとめられた。

これらの事実を、別の実験で確認された他の多くの事実と総合して考察した結果、この条

件での凍結による溶血には、濃縮塩による塩害の外、機械的障害がかなり重要な役割を演ずるものであることが明らかになった。

文 献

- 1) 根井外喜男 1967 氷点に近い温度での凍結による溶血の機構. I. 凍結及び融解過程での形態的变化. 低温科学, 生物篇, **25**, 127-132.
- 2) Nei, T., Kojima, Y. and Hanafusa, N. 1964 Hemolysis and morphological changes of erythrocytes with freezing. *Contr. Inst. Low Temp. Sci.*, **B 13**, 1-6.
- 3) 根井外喜男 1967 高張塩溶液に於ける赤血球の溶血現象. 低温科学, 生物篇, **25**, 00-00.
- 4) Lovelock, J. E. 1953 The haemolysis of human red blood-cells by freezing and thawing. *Biochim. Biophys. Acta*, **10**, 414-426.
- 5) Luyet, B. and Pribor, D. 1965 Direct observations of hemolysis during the rewarming and the thawing of frozen blood. *Biodynamica*, **9**, 319-332.
- 6) Lovelock, J. E. 1955 Hemolysis by thermal shock. *Brit. J. Haematol.*, **1**, 117-129.

Summary

The mechanism of hemolysis of erythrocytes by freezing at temperatures ranging from freezing point to -10°C was investigated from various points of view.

1) The increase of the concentration of cells, within a certain limit, in saline suspension resulted in an increase of hemolysis. The sedimentation of erythrocytes or an addition of other cells also increased the amount of hemolysis.

2) An increase of salt concentration brought about a reduction of hemolysis.

3) The substitution of ice with hypertonic solution for thawing produced an extremely high amount of hemolysis during the freezing process.

The data obtained in the present experiment and also the evidence from the previous experiments are hardly explainable by the salt injury theory. It is suggested that mechanical damage might be one of the important causes of hemolysis of erythrocytes in the freezing process at near-zero temperatures.