



Title	赤血球の電子顕微鏡的研究
Author(s)	根井, 外喜男; NEI, Tokio; 坂牛, 栄治 他
Citation	低温科学. 生物篇, 15, 51-56
Issue Date	1957-11-05
Doc URL	<a href="https://hdl.handle.net/2115/17598">https://hdl.handle.net/2115/17598</a>
Type	departmental bulletin paper
File Information	15_p51-56.pdf



## 赤血球の電子顕微鏡的研究\*

根井外喜男 坂牛栄治  
浅沼英一 藤田英夫

(低温科学研究所 医学部門)

(昭和32年7月受理)

### I. 緒 言

われわれは現在血液の低温保存に関する研究を行い、主として過冷却保存による赤血球の諸性状の変化をしらべているが、その研究の一環として赤血球の形態的变化の有無をも検討中である。本実験はその基礎研究ともいべきもので、正常赤血球の電子顕微鏡像を種々の角度から吟味してみたのである。

そもそも赤血球を電子顕微鏡的に観察するためには、今日のところ大体3つの手段があるといえる。即ち人為的に溶血させて所謂 ghost の膜構造を知ろうとするもの、レプリカ法によつて赤血球の表面構造をもとめるもの、及び超薄切片法による赤血球断面の観察を行うものの3つである。それぞれ特徴をもち、実験の目的によつていずれかの方法が採用されている。第1の ghost の観察は最も屢々行われる方法で、われわれもまたこの方法によつて検討しようとしているが、しかしなお多くの問題は残されている。

細胞の形態的観察には、細胞のそのままの姿をみるのが理想ではあるが、電子顕微鏡を使用する場合にもそれを望むのはむりである。特に赤血球については、ヘモグロビンの存在が電子線の透過を妨げ膜構造の観察を困難にするので、どうしてもヘモグロビンを除くための溶血操作を行わなければならない。しかしこのような人為的な操作そのものが本来血球のもっている構造——中でも血球膜の微細構造——に影響を及ぼすものと考えられるので、赤血球の生に近い状態の観察にはどのような標本作製条件が最も適当であるか、特に溶血の条件としてはどのような方法が好都合であるか等について、以下述べるような検討を試みたのである。

### II. 実験方法

1. 実験材料　ウサギの血液を材料とし、耳静脈から採血して、その1/4量のACD液を加えた。ACD液の組成は次の通りである。

\* 北海道大学低温科学研究所業績 第382号

クエン酸 3 ソーダ	4.0 g	} 蒸留水を加えて総量を 100 cc とする。
クエン酸	0.48 g	
グルコース	3.0 g	

特にこの液を加えたのは、前述のように、保存血液の研究の基礎として本実験をとり上げているからである。

2. 標本作製法 溶血のさせ方として次のようないくつかの方法を行つた。

1) 急速溶血 赤血球を直接大量の蒸留水中に加えて溶血させるもので、一般に広く行なわれる方法である。われわれは次のようにして試料を作つた。

新鮮血液 1 滴を蒸留水 3.0 cc に加え、よく混和して 1000 r.p.m., 5 分間遠心、上清をすてて再び蒸留水 3.0 cc を加え、同様の操作をくりかえす。上清をすてた後管壁に残つた水分で沈渣をよく混和し、それを試料とした。

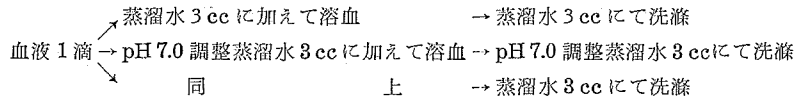
2) 緩慢溶血 次のようにして漸次食塩濃度を下げ、滲透圧的溶血を行なつた。

血液 1 滴を 0.7% 食塩水 1 cc に混和  
 ↓  
 2, 3 分後 0.5% 食塩水 1 cc を加える (食塩濃度は 0.6% となる)  
 ↓  
 更に 0.4% 食塩水 2 cc を加え (食塩濃度は 0.5% となる)  
 ↓  
 1000 r.p.m., 5 分間遠心沈澱後上清をすてる  
 ↓  
 0.5% 食塩水 1 cc 添加  
 ↓  
 0.3% 食塩水 1 cc を更に加える (0.4% となる)  
 ↓  
 蒸留水 2 cc を加え (0.2% となる)  
 ↓  
 遠心し上清をすてる  
 ↓  
 蒸留水 3 cc を加え、沈渣をよく混和し、遠心後、適当量の蒸留水に浮遊して試料とする

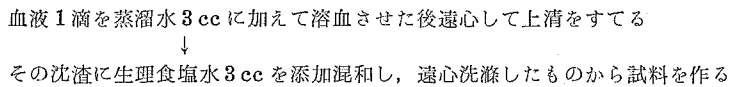
別に、蒸留水の量を漸次増すことによつて溶血させる方法も行なつた。

血液 1 滴に蒸留水 1 滴を加えて静かに混和  
 ↓  
 引続き蒸留水を毎分 1 滴宛の割合で滴下、総量 3 cc になるまで連続的に加える  
 ↓  
 遠心操作 1000 r.p.m., 5 分  
 ↓  
 再び蒸留水でよく洗つて試料とする

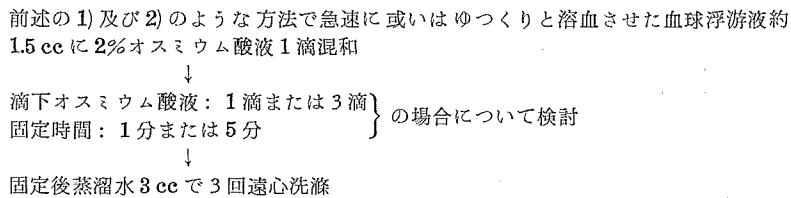
3) 溶血時の pH の影響 赤血球膜の構造が媒液の pH によつて影響をうけることは、既に知られているところで、pH 3.0 とか 10.0 とかではかなりはつきりした変化のあることが報告されている。われわれは pH 5.6 の蒸留水そのままと 1/15N  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  で pH 7.0 に修正した蒸留水との比較を行つた。



4) 溶血血球を生理食塩水に浮遊させた場合 蒸溜水で溶血させた血球は、蒸溜水での洗滌をくりかえすと、固い凝塊を作つて沈澱しやすくなる。しかしこれを生理食塩水に浮遊すると全く均等に混濁する。また溶血血球中には滲透圧の活性を有するものがあるともいわれている。そこで、なるべく血球の生に近い状態をみたいという目的で、食塩水浮游液にした ghost の形態をしらべてみた。



5) 溶血後オスミウム酸で固定した場合 赤血球膜は繊細な性質をもっているため、溶血後の遠心洗滌乾燥などの操作によつて、機械的に破壊される危険性が多い。従つて血球膜を固定する目的にオスミウム酸が用いられているが、固定の時間、固定剤の濃度などについて多少の検討を試みた。



6) 溶血させないで血球を生理食塩水で洗つたままみた場合 溶血操作を行わないでなるべく生のままの状態をみたい目的があつたのと、別に行つている保存血液と比較対照する必要があつて、正常新鮮血液を生理食塩水で 3 回洗い、そのまま標本を作つた。

前記のようないろいろの方法で作つた血球浮游液をフォルムパールを張つたメッシュ上に 1 滴とり、3~4 分後に血球が沈澱して支持膜上に固着したと考えられる頃に、濾紙の先端を液滴の上端にふれさせ、水分を殆んど吸いとつた。この操作はきれいな試料を作るために必要なことと思われる。特に食塩水浮游液では、乾燥による食塩の結晶の析出を少なくするためにも重要なことである。

室温乾燥後、12 度の傾斜で Cr の真空蒸着を行つた。電子顕微鏡は日本電子光学製 GEM-IV 型を用いた。

### III. 観 察 結 果

1. 溶血のさせ方の吟味 蒸溜水で急速に溶血させても、また食塩濃度を次第に低張にしたり蒸溜水の量を漸次増したりしてゆつくり溶血させても、大体同じような所見で、両者の

間に特別な差違はみとめられなかつた。即ち鏡検の結果は、微粒子構造を有する正円形像が殆んど大部分を占めているが(写真1下), その他にも多孔性のもの(写真1右), 斑紋様又は斑点様のもの(写真2, 3左), 大破壊孔(写真4), 膜破壊像(写真1上)などが, 数は非常に少ないが同一試料中にみとめられた。しかし, このような未固定標本では一般にコントラストが弱いので, 微粒子の状態を仔細に検討するのは困難である。しかも, 種々の操作によつて機械的に破壊されやすいので, できるだけおだやかな取扱いをしなければ, 人工的な障害の加わるおそれが多いようである。

2. メジウムの pH の影響 溶血のために用いる蒸溜水として, pH 5.6 のままのものとして  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  で pH 7.0 にしたものとしてそれぞれ使つて, pH による影響を比較してみると, この程度の pH の差では, 鏡検像の上に殆んど相違がみとめられなかつた。

3. 溶血血球を生理食塩水に浮游させた試料 この試料では, 血球像はコントラストが強く観察が容易である。血球は一般に正円形で膜は微細微粒子構造を示し, その他に, 辺縁の少し厚くなつたもの, 粒子のやや大きいもの, 一見無構造平滑に見えるもの, 辺縁の凹凸しているもの等がみうけられた(写真5, 6, 7)。要するに蒸溜水に浮游した場合はほぼ同様の傾向で, 膜の微細構造のいろいろと違つたものがみとめられたわけである。ただし蒸溜水浮游液のような多孔性や大破壊孔のものなどは殆んどみとめられなかつた。なお乾燥の結果, 視野の中に食塩の結晶が析出されるので, 観察の妨げとなるが, 標本作製時の工夫によつては, きれいな標本の得られることも多い。

4. オスミウム酸による固定の場合 固定しないものに比較すると, 血球像はコントラストが強く, シェドウが鮮明である。膜構造については, 均一な微粒子構造のものが殆んど大多数を占め(写真8), 稀に不規則な粗い粒子のものがみられた(写真9)。しかし, 未固定標本に現われた多孔像や大破壊孔像は全くみとめられない。

固定時間の1分のもものと5分のもものでは大差はないが, 試料によつては5分の方の血球膜がやや不透過性で表面構造も多少不規則なものが多いようにみえた。更に固定に用いたオスミウム酸の濃度については, 濃い方が不透過性でしかも不規則構造を示すものが多い。固定前の溶血条件については, 急速溶血と緩慢溶血との間に殆んど差はなかつた。

5. 最初から生理食塩水だけで洗滌した血球浮游液 このような試料では殆どすべての血球が全く電子不透過性であるが, その血球100個か200個に対し1個くらいの割合に ghost が混在するのをみとめた。このものは蒸溜水で溶血させた後生理食塩水に再浮游させたものとほぼ同様の構造のように思われた(写真10)。ただ血球膜辺縁の肥厚は殆んどみられなかつた。

## 考 察

電子顕微鏡で赤血球の形態的観察を行う場合, 試料作製の方法に注意しなければならぬことは既に周知のことである。もちろん, この点についてこれまでに検討されたいくつかの報告はある。われわれもまた, 血球の本来の形態や構造をなるべくそのままの姿でながめたいと考

えて、標本作製時の条件について2, 3の検討を行ったわけであるが、従来諸家の報告された所見と必ずしも一致しなかつた。例えば、これまでは、赤血球は無構造の均質の膜から成るとか、或いは、均一な微粒子の構造であるとか、更にはもつと大きな多数の孔状構造をもつた膜であるとかいろいろにいられている。しかしそれらの研究内容をよくみれば、実験方法に相違があるようだし、また観察に当つての顕微鏡の分解能の程度の差もあることだから、得られた所見が一致しなくてもよいのかもしれない。実際にわれわれの見たところでは、赤血球には粒子状構造の比較的均一微細なものから不均一粗大なものまで種々の段階のものがあつた。特にわれわれの得た結果として、溶血の条件による差違よりも、むしろ同一条件の試料中に血球の個体差のみとめられたことの方が、重要な事実のように思われる。しかしこのような正常血球での形態的種々相は、果して血球の生命や年齢などに関連して本来存在するものであるか、或いは標本作製時の人工的な操作の結果としてできるものであるかについては、まだ明らかでない。

いずれにしても、種々の条件におかれた血球の形態的研究を行う場合、まづもつて正常血球についての観察を充分に行つておかねばならぬことはいうまでもない。その意味で行つた本実験の結果として、正常血球間にも種々の形態的差違がみとめられた以上、今後更に各種の処置をした血球について観察するには、必ず正常血球にみられない特殊な形態のものが現われるかどうかをはつきり確かめる必要がある。なお固定剤を用いた場合は、未固定の場合ほど広範囲な種々相をみとめないで観察に便ではあるが、しかし一方にはオスミウム酸そのものによる化学的変性などの障害が考えられるので、恐らく真の姿にはまだほど遠いものであろう。生理食塩水を用いて等張浮游液とすることも、やはり他方に乾燥過程での食塩の濃縮が考えられるので、決して合理的な方法とはいえない。

生理食塩水で最初から洗滌をくりかえして溶血操作を全然行わないものでも、極めて少数のghostをみとめたことは注目に値する。但し、このようなghostが健康生体の血液中に常時存在することは考え難いので、やはり標本作製操作中の人工的所産物であろうか。

要するに、前述のような目的で本実験を行つたが、採用された実験方法或いは実験条件は決して満足すべきものではなかつた。今後、更に微細構造の探究をするにあつては、シャドウイングの吟味、高分解能顕微鏡の使用等なお一段の工夫を要する点が多い。

## 結 論

電子顕微鏡を用いて正常赤血球の形態的観察を行い、特に標本作製時の条件について吟味した。

1) 滲透圧的に溶血させた試料では、均一微粒子構造の血球が大部分を占め、その他斑紋様、多孔性、大破壊孔、膜破壊像等種々の膜構造のものが僅かにみとめられた。このような所見は溶血の条件によつては殆んど変らない。

メジウムのpHは5.6と7.0くらいの差では殆んど影響がなかつた。

2) オスミウム酸による固定標本でも、未固定のものと同様の傾向であつたが、一般

に映像のコントラストが強く、しかも破壊像などはみられなかつた。オスミウム酸の濃度や作用時間によつて、所見は多少異なつた。

3) 溶血操作を行なわない標本中にも ghost がみとめられた。

要するに、同一試料中の正常赤血球にも、膜の微細構造の点で多少異なつた種類のあることをみとめたわけである。

## 文 献

- 1) 丹野楯彦 1951 赤血球膜の組織構造と物理化学的性質について. 電子顕微鏡, **2**, 47.
- 2) Sundharagiati, B. & C. S. Wright 1953 A clinical and experimental study of the erythrocyte ultrastructure membrane with the electron microscope. J. Clin. Invest., **32**, 979.
- 3) 東 昇・脇坂行一・水川勇 1950 電子顕微鏡による血液学的研究. 電子顕微鏡, **1**, 32.
- 4) 丹野楯彦・小林芳寿・斎藤源太郎 1950 赤血球膜構造の変化について. 電子顕微鏡, **1**, 92.
- 5) 万井正人 1951 溶血現象の細胞生理学的研究. 電子顕微鏡, **2**, 53.
- 6) Lindeman, B. 1949 Zur Feinstruktur der Erythrozyten Membran. Arch. Exp. Path. Pharm., **206**, 439.
- 7) Latta, H. 1952 The surface of the mammalian erythrocyte. Blood, **7**, 508.
- 8) Hillier, J. & J. F. Hoffman 1953 On the ultrastructure of the plasma membrane as determined by the electron microscope. J. Cell. & Comp. Physiol., **42**, 203.
- 9) Bessis, M. 1955 Phase contrast microscopy and electron microscopy applied to the blood cells. Blood, **10**, 272.

## Résumé

In order to make morphological observations of normal red blood cell of rabbit by employing the electron microscope, various procedures for preparing the specimens were applied.

From the results obtained the following conclusions were drawn:

- 1) In the osmotically hemolyzed specimens, ghost cells consisted of a large number of cells having uniformly fine granular structures and a small number of cells containing spot-like dense areas, larger or smaller holes, or destroyed figures. Variations of some conditions of aqueous agents giving rise to osmotic hemolysis scarcely affected the ultrastructures of ghosts.
- 2) In the specimens fixed by osmic acid, although the cell figures generally appeared with strong contrast, no destructed ones were demonstrated. Concentration of osmic acid solution and time period of its use had some slight influence on the microscopic findings.
- 3) Ghosts, though very few, were found in the non-hemolyzed specimens washed with physiological saline.

It is of interest that various kinds of fine structure of normal red cell membranes as described above were revealed in the same specimen.

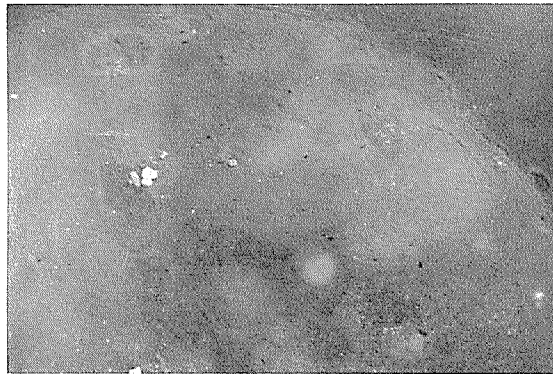
**写真 1.** 蒸溜水溶血，未固定試料  
(微粒子構造のもの，多孔性のもの  
破壊像等の混在しているところ)

× 10,500



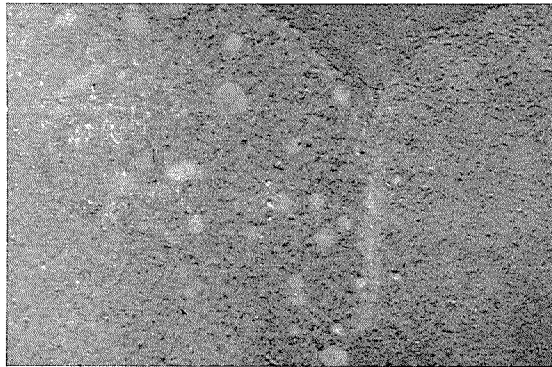
**写真 2.** 蒸溜水溶血，未固定試料  
(斑紋様のもの)

× 12,300



**写真 3.** 蒸溜水溶血，未固定試料  
(微粒子構造とそれに斑点様のまじ  
つたもの)

× 10,500



**写真 4.** 蒸溜水溶血，未固定試料  
(大破壊孔)

× 10,500



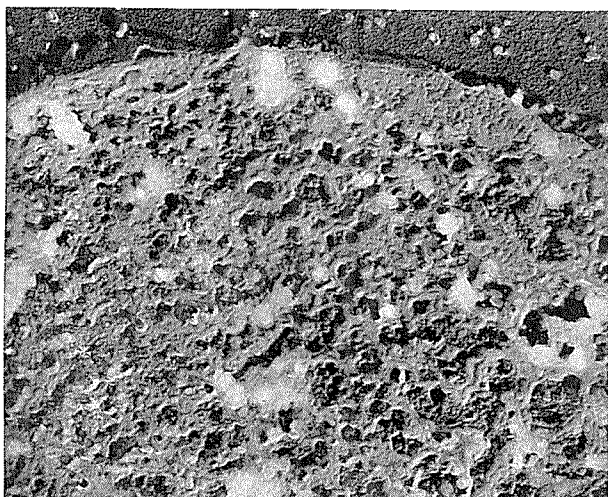


写真 5. 溶血後生理食塩水に  
浮游させた試料

× 14,000

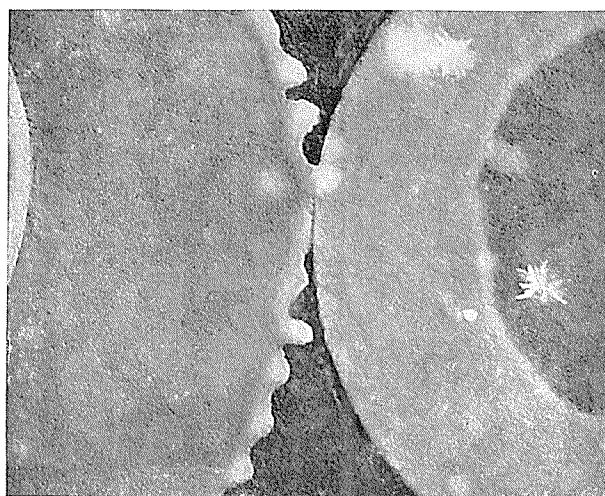


写真 6. 溶血後生理食塩水に  
浮游させた試料

× 14,000

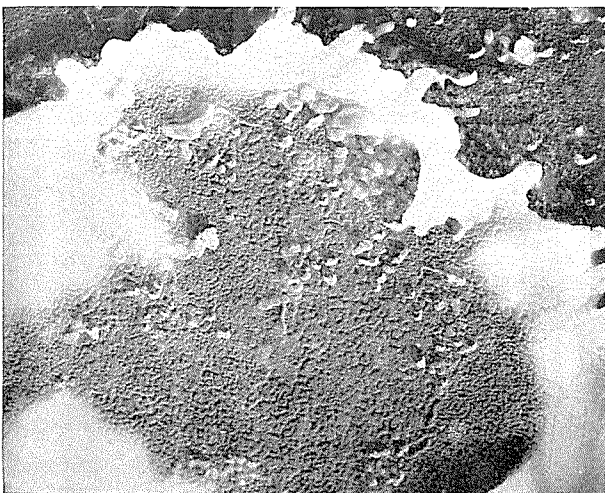


写真 7. 溶血後生理食塩水に  
浮游させた試料

× 14,000

写真 8. オスミウム酸固定試料  
× 18,000



写真 9. オスミウム酸固定試料  
× 18,000



写真 10. 生理食塩水で洗った試料  
(溶血操作を行わぬもの)  
× 17,000

