



Title	血液の保存に関する研究 : 特に保存による赤血球の形態変化に就いて
Author(s)	坂牛, 栄治; SAKAUSHI, Eiji
Citation	低温科学. 生物篇, 15, 57-70
Issue Date	1957-11-05
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/17599
Type	departmental bulletin paper
File Information	15_p57-70.pdf



血液の保存に関する研究

特に保存による赤血球の形態変化に就いて*

坂 牛 栄 治

(低温科学研究所 医学部門)

(昭和 32 年 7 月受理)

I. 緒 言

近來輸血の目的に保存血液が多く利用されるようになり、一般の関心も深くなるにつれて保存血液に関する研究は、いろいろの分野に亘る問題として非常にさかんになつてきた。保存によつて血液がどのような変化をおこすかを検討するに当つては、血液諸成分のうちでも先づ第一に赤血球の変化をよく調べる必要があると思う。それには機能的或いは形態的な立場からいろいろの調べ方があるが、筆者はとくに形態的にその変化を追究しようと考えて本実験を行なつた。

既に光学顕微鏡的に保存赤血球の形態的变化を追求した業績はいくつかみられ¹⁻⁴⁾、所謂赤血球の退行性変化のあることが認められている。しかし電子顕微鏡的に研究されたものとしては赤血球に関する 2~3 の研究報告中に極めて僅かな記載があるだけで詳細な検討を加えたものはない。即ち Bessis 等⁵⁾は 3~4 日保存したもの (保存条件未記載) のレプリカ標本では“crater”が増加すると述べており、Latta⁶⁾は羊血液を 10 週間 Alsever's solution に保存したもののレプリカ標本では細かい不規則面となつたといつている。Sundharagati⁷⁾は ACD 液で 4°C に 20 週保存したものを、蒸溜水溶血させてその儘乾燥鏡検したところでは新鮮血のと大差がなかつたが、一部の試料中に血球膜の周辺部がうすくなつたものがあつたと述べている。また Hillier⁸⁾は、数カ月保存したもので溶血させて固定した標本では、1 例が突然変化があるのをみたといつているが、どのような変化があつたのか、また他の試料はどのようなものであつたのか具体的な記載がない。

このように保存赤血球の電子顕微鏡的研究はまだ基だ不十分なので、筆者は光学顕微鏡並びに電子顕微鏡の両者の観察方法と共に、保存による自然溶血度との関係について検討を試みたのである。

* 北海道大学低温科学研究所業績 第 384 号

II. 保存方法

保存血液の材料としては家兎血液を用いた。

予め注射筒内に ACD 液* を入れておき、家兎を心臓穿刺によつて採血し、血液と ACD 液とは 4:1 の割合になるようにした。採取した血液を 2.5 cc ずつ小試験管に分注、密栓し、8~10 本ずつ 5°C と 37°C の恒温槽内にそれぞれ静置保存した。

使用器具及び採血・分注の操作は総て無菌的であることはいふまでもない。

5°C 保存のものでは 1~3 週毎に、37°C 保存のものでは 1~2 日毎に保存血液をとり出し溶血度を測定すると同時に光学並びに電子顕微鏡的に観察した。

III. 溶血度の測定法と測定結果

保存の結果おこる自然溶血の程度は次のように測定した。即ち全血液の全ヘモグロビン量に対する血漿中に遊離されたヘモグロビン量の比を溶血率とし、%をもつて表わすことにした。

まず全ヘモグロビン量を求めるには、10 ml の N/10 HCl 中に全血液 0.02 ml を加えてよく混和し、光電分光光度計を用い 372.5 m μ の波長¹⁰⁾ で吸光度を測定した。

次に血漿に遊離されたヘモグロビン量を求めるには、保存血を 2,000 r.p.m. 20 分遠心し上清から分離した血漿 0.02 ml に N/10 HCl の適当量 (溶血度に応じて増減する) を加えて、40°C の温浴槽に 30 分浸して colour development¹¹⁾ を行い、光電分光光度計で同じようにして吸光度を測定した。

このときの溶血率 (%) は次のようにして求められる。

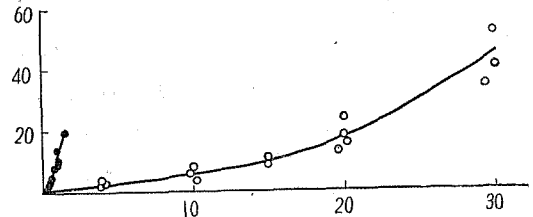
$$\frac{x'}{x} \times \frac{a}{10} \times \frac{1}{100} = \text{溶血率 (\%)}$$

x = 全血液のヘモグロビンの吸光度の読みの値

x' = 血漿のヘモグロビンの吸光度の読みの値

a = 血漿を加えるときの N/10 HCl 量

測定結果 37°C と 5°C での保存日数と溶血度との関係を第 1 図に示した。即



第 1 図 保存経過に伴う血球の自然溶血度

● 37°C 保存 ○ 5°C 保存
縦軸 溶血率 (%) 横軸 保存期間 (週)

* 動物の血液を保存する際、人血に用いられるのと同じ処方⁹⁾の ACD 液では、保存 2~3 週でフィブリンが析出して凝固することがあるが、クエン酸ソーダを増量すればこれを防ぐことが出来るので⁹⁾、次の処方⁹⁾の ACD 液を用いた。

クエン酸 3 ソーダ	4.0 gr	} 蒸留水を加えて総量を 100 cc とする
ク エ ン 酸	0.48 gr	
グ ル コ ー ゼ	3.0 gr	

ち 37°C のものは 5°C のものに較べて溶血は急激に増した。例えば溶血率が 5~15% に達するには 37°C で保存期間が 1 週間位であるが 5°C では 10~20 週を要することがわかった。

IV. 光学顕微鏡的観察

1. 実験方法 血液をそのまま、オブジェクトグラスに載せて観察すると血球数が多過ぎる為観察困難なので、同一保存条件下にある血液から分離された血漿で 100 倍稀釈し、位相差顕微鏡 (暗視野) を用いて観察した。

2. 実験結果 採血直後から保存経過に従つて観察をつづけていくと、赤血球はいろいろな形態変化をすることがわかった。それらの形態を仮りにいくつかの型に分類し、それぞれの特徴を一括表示してみると第 1 表のようになる。即ち正常の円盤型から各種の不正形のもの迄の種々の形態のものがみられる。

第 1 表 赤血球の各種変化の型とその特徴

分類型	特徴
正常円盤型	中央部に輝度の弱い凹陷部があり、表面、辺縁の滑らかで円形なもの、一般に正常赤血球として考えられているもので、新鮮血に多い。
不正形円盤様型	中央部の凹陷部を認めるが、若干盛り上がつて来ている傾向で、輝度も多少強くなっている。 周辺部に強輝度の顆粒様突起が 1~数箇あり、辺縁不正形となる。
金平糖型	中央部の凹陷部消失して全体的に球型化して、直径は前二者より小となつている。表面は多数の強輝度の顆粒様突起を認めるが、不正円盤様型のそれより小さく、全体の感じとして輝度が強い。
針状型	表面の突起が尖鋭化の傾向となり針状様のもの。
球型	表面が滑らかで球型化の完全なもの、直径も小さく、全体として輝度が強い。
部分溶血型	球型の儘、輝度の弱くなつているもの。 直径は更に減少。

第 2 表 赤血型の各種変化型と保存経過に伴う出現状況

	保存期間 (+5°C)				
	採血直後	1 週	3 週	10 週	20 週
正常円盤型	##	±	±		
不正形円盤様型	+	+	±		
金平糖型 (針状型を含む)	±	##	++	±	
球型		±	+	##	##
部分溶血型				±	+

○ トーマ計算板の 16 マス中、斜 4 マスの血球の出現頻度
 大体の傾向を知る意味で、##60% 以上、++30% 以上、+5% 以下、±5% 以下

このような保存による赤血球の形態的变化は、保存期間の経過に伴なつてほぼ一定の傾向をとるようである。その関係を表示したのが第2表である。即ち正常円盤型の赤血球は保存するに従つて直径が短縮して全体として球形化の傾向をとり、表面には顆粒状突起ができて次第にその数が増していく。更に顆粒が小さくなつて尖鋭化し、輝度の強い表面の平滑な球形となるものと考えられる(写真1, 2, 3)。保存が長くなると輝度の弱い球型が現われ一層直径が短くなる傾向がある。これは徐々に溶血のおきている、所謂部分溶血型^{11), 12), 13)}であらうと思われるが、このようなものは実験操作によつて破壊され易い(写真4)。

要するに赤血球は保存によつて、正常円盤型→不正形円盤様型→金平糖型→針状型→球型の過程を通つて溶血に至るものと思われる。

保存温度の5°Cのものとの比較では、血球の形態的变化が早く現われるか遅く現われるかの違いがあるだけで、質的差異は認められなかつた。勿論37°C保存の方が早期に変化がおこつた。

V. 電子顕微鏡的観察

われわれはさきに正常赤血球の電子顕微鏡的観察を行なう場合、試料作製の方法によつて観察結果の所見に差があるか否かを検討したが¹⁴⁾、今回の保存血球の研究に当つては、主として蒸溜水による溶血血球について観察することにした。

既に周知のように赤血球の電子顕微鏡標本作製には慎重な注意を要するので、この点は特に留意して実験操作による血球の変性や破壊を出来るだけ避けるようにつとめた。

実 験 I.

新鮮血並びに保存血の全血で試料をつくり、その変化をしらべた。

実験方法 次のように赤血球を蒸溜水で溶血させた後、そのまま或いはオスミウム酸で固定して鏡検試料とした。

1) 固定しない場合

保存血液1滴を蒸溜水3.0 ccに滴下し混和
↓
1,000 r.p.m. 5分間遠心し上清をすてる
↓
沈澱に蒸溜水3.0 ccを加え、静かに攪拌する
↓
1,000 r.p.m. 5分間遠心し、上清を棄てる
↓
僅かに管壁に残つた水分で沈澱の浮遊液をつくり、これを試料とする

2) 固定する場合

左記に同じ
↓
左記に同じ
↓
僅かに管壁に残つた水分で沈澱を再浮遊し、2% OsO₄ 水溶液1滴を滴下。1分間固定してから蒸溜水3.0 ccを加え、静かに攪拌
↓
左記に同じ
↓
蒸溜水による遠心沈澱を2回繰返す
↓
左記に同じ

このようにして得た材料を0.4% フォルムパール膜を張つたメッシュに載せ、室温乾燥後12~13°Cの角度からクロームを真空蒸着させた。

一般に形態学的な立場から生物材料を観察する場合には、定量的に表現することが難しく、とかく主観的な感じで判断を下し易いものである。特に電子顕微鏡的な観察では光学顕微鏡の場合ほど十分な例数について検討することは難しいので、今回の実験に当つてもその点に留意して結果の判定を行なつた。即ち、予め試料を光学顕微鏡で観察して、メッシュの1ケの格子内に血球数が4~8ケ位の分散状態のものを選び、まず蛍光板で一応全視野に亘つて観察し、その中の代表的なものを4~6ケ撮影した。同一条件の試料については平均5枚の標本をつくり、同様にして観察撮影した。

顕微鏡は日本電子光学製のGEM-IV型をおもに使用し、直接倍率5,200~7,200で写真を撮影した。

実験結果

1) 固定しない血球について 溶血操作を行なつたまま固定しないで乾燥した場合は、一般に赤血球は非常に薄くなりシャドウイングを行なつてもコントラストがつきにくい。

まず採血直後の新鮮血液についてみると、同一試料中でも種々の膜構造のものがみとめられた。そのうち円形で均一な微粒子構造のものが大部分を占め(写真5下)、同様構造に不透過性の斑点様のものがまじつているもの、微粒子構造が不明瞭で一見平滑な膜に見えるもの(写真6)、或いはこのような構造にやや不透過性のむらのまじつているもの(写真7)、大小の多数の孔のあるもの(写真5右)、膜の辺縁が不規則で壊れているように見えるもの(写真5上)などが僅かにみられる。また大きな円形の孔のあるものもみられることがある。

5°C保存の場合 5°Cに血液を保存して、大体3, 5, 10, 20, 30週の時期の形態を観察すると、新鮮血で大多数を占めていた円形で均一な微粒子構造のものが保存と共に減少し、微粒子構造の不明瞭な一見平滑な膜構造のもの、或いはこのような構造にやや不透過性のむらとか斑点のまじつているもの、多孔性のもの、破壊されたように見えるものなど(写真8, 9, 10, 11, 12)が保存期間が長くなるほど多く現われた。しかし新鮮血ではみられないのに保存血にだけ現われるというような特別な変化はないようだった。

以上のようないろいろな血球像の性状と、それが保存のどの時期に現われるかということを第3表に表示した。これでもわかるように保存5週位迄は新鮮血と余り変らないが、溶血のかなり進んだ10週以降になつて漸く傾向が変つてくる。

37°C保存の場合 血液を37°Cに保存して1, 3, 5, 7日目の形態を観察すると、新鮮血で大多数を占めていた円形で均一な微粒子構造のものが保存と共に減少し、微粒子構造の不明瞭で一見平滑な膜構造のもの、或いはこのような構造に不透過性のむらや斑点のあるもの、多孔性のもの、破壊像などが保存日数と共に多くなつてくることは5°Cのものと同様である。保存3~5日になると屢々写真13右と14に示すように電子不透過性が部分的に強くなりはずつきり斑点状に見えるようになる。このものは膜が全体として厚くコントラストが強い。新鮮

第 3 表 各種血球膜の性状と保存経過に伴う出現の傾向
(固定しない血球での観察)

形 態	採 血 直 後	保 存 温 度									
		5°C					37°C				
		保 存 期 間					保 存 期 間				
		3 週	5 週	10週	20週	30週	1 日	3 日	5 日	7 日	
微細な微粒子が比較的規則正しく配列しているもので	不透過部分の殆んどないもの	###	##	++	±			+	±		
	斑点様の不透過性のものがまじっているもの	±	±					±			
微粒子の配列が不明瞭で膜表面が平滑様にみえるもので	不透過部分の殆んどないもの	±	±	+	+	+	+	+	+	±	±
	むらように不透過性のものがまじっているもの	±	±	+	++	+	+	++	++	+	+
	斑点様に不透過性のものがまじっているもの	±	±	±	+	++	++	±	(±)	++	++
	大小の多数の孔のみられるもの	±	+	+	+	+	±	+	+	+	+
膜が破壊しているように見えるもの	±	±	±	±	+	±	±	±	±	±	++
膜が萎縮しているように見えるもの	±	±	±	±	+	+	±	±	±	±	+
大きな破壊孔のあるもの	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

非常に多い + 多少 ± 殆んどない ()内は写真 18 のような特異なものの出現傾向を表わす。

血や 5°C 保存のものには認められないのでかなり特異なものといえよう。

以上のような種々の血球像が出現する傾向も第 3 表に一括表示した。それによれば、保存 1~3 日でむらのあるものが相当数みられ、5 日目では不透過性の斑点が多くみられるようになり、7 日目では破壊像が増している。また同じ溶血度のものならば 37°C の方が 5°C より形態の変化の現われ方が早い。

2) 固定した血球について オスミウム酸で固定した標本では固定しないものに較べて一般にコントラストの明瞭な血球像が得られる。

採血直後の新鮮血球では、円形で概して均一な微細な微粒子が規則正しく配列した構造のものが大部分を占め(写真 15)、不透過性の縞模様のもがまじってやや微粒子構造が不規則にみえるもの(写真 17 左)、或いは種々の大きさの不透過性のものが多くまじって、かなり微粒子構造が不規則にみえるもの(写真 16, 17 右)などが多少認められる。

5°C に保存した場合 保存によつて新鮮血で大部分を占めている均一な微粒子構造のものが減少し、いろいろの大きさの斑点のような不透過性のものが多数まじって、かなり微粒子

構造が不規則にみえるものが (写真 17, 18, 19, 20) 増加する傾向があるが、このような変化も保存 10 週位迄はあまりあきらかでない。

しかし不透過性の縞模様のもがまじつたものは (写真 17 左), 新鮮血ではその数が少ない上に像もあまりはつきりしないが, 保存 3 週になると数は増し像も明瞭になる。保存 10 週以降では再び縞模様が不明瞭となりこのような血球の数も極めて少くなる。これらの点が多少保存に特異的な変化のように思われる。

保存 20 週以降になると, 写真 21 のように多数の小孔のあるもの, 写真 22 のように破壊されたようにみられるもの, また写真 23 のように血球が萎縮したようなものが多くみられるようになる。これらのものは新鮮血では認められない。

37°C に保存した場合 5°C に保存した場合と大体同じような形態の変化があるようである。即ち均一な微粒子構造のものが減少し, いろいろの大きさの不透過性のものの多数まじつているものが増加する傾向がある。ただ, 不透過性の縞模様のまじつているものは保存期間を通じて殆んど認められなかった。

なお写真 24 に示すような特異な斑点構造のものが保存 3~5 日で認められた。この種のもの数は多くないが新鮮血や 5°C 保存ではみられないもので, 高温保存による特殊な変化と思われる。

固定標本でも未固定のものと同様, 溶血度から比較して 37°C 保存の方が 5°C 保存のものより形態の変化は早く現われた。

第 4 表 各種血球膜の性状と保存経過に伴う出現の傾向
(固定した血球での観察)

形 態	採 血 直 後	保 存 温 度							
		5°C				37°C			
		保 存 期 間							
		3 週	10 週	20 週	30 週	1 日	3 日	5 日	7 日
電子不透過部分が比較的少く, 均一な微細微粒子構造をもつもの	##	+	++	±		++	+	±	
電子不透過部分が多く, 不均一な微細構造をもつもの	縞模様に不透過部分をもつもの (写真 17 左)	±	##	±		±			
	多数の斑点様の不透過部分がある (写真 17 右)	±	±	+	++	±	++	++	++
	大小の微細な不透過部分が一面にまじつている (写真 16, 20)	+	+	+	+	+	+	+	+
多数の小孔をもつもの				±	+				+
破壊或いは萎縮したようにみえるもの				±	++				++

非常に多い + 多少 ± 非常に少い ()内は写真 28 のような特異のもの出現傾向。

以上述べたところの5°Cと37°Cの保存で、保存に伴つてどのような血球膜の変化が現われるかは第4表に一括表示した。

3) 赤血球の直径 各保存時期に於ける赤血球の直径を電子顕微鏡写真から測定してみると第5表の通りである。この結果からみて固定血球は未固定血球に比較してごく僅かながら小さいように思われる。また保存経過と共に直径は次第に短縮して20週までに凡そ1.1~1.2 μ 縮少することがわかる。

第5表 赤血球の直径の保存による変化
破壊されていない円形な血球像 10~20ヶに
ついての平均値 (M)

保存期間 (5°C)	0	3 週	10 週	20 週
非固定血球	6.73	6.59	6.05	5.62
固定血球	6.66	6.44	5.82	5.40

実 験 II.

これまで述べた実験では保存血液中の赤血球の全部を溶血させて、所謂ghostについて観察したものであるから、もしも保存の結果自然溶血でghostができそれがまじっていたとしても、区別ができないわけである。そこで保存によつてghostができるとすればその形態的な特徴をつかみたいと考えて、このようなghostだけを別に集めて観察することを試みた。

実験方法 保存血液を1,000 r.p.m. 5分、遠心操作すると溶血していないと思われる血球は下層に沈澱し、溶血血球はその上層に残るので¹²⁾、この2層を別々に分離し、各1滴をそれぞれ蒸溜水3.0 ccに加え、以下実験I.と同じ要領で試料をつくつた。即ち固定するものは3回、固定しないものは1回蒸溜水で血球を洗滌した。

なお判定を容易にするために、自然溶血のかなり進んだ試料、即ち5°C保存では20週、37°C保存では5日目のものについて試料をつくつた。

実験結果 上層からとつて作つた試料中の血球について観察してみると、血球の破壊像或いは萎縮像(写真25)が大部分を占めていた。

ところが下層に沈澱した方の血球では、円形で不透過性部分が斑点様にまじつたものが血球の大多数を占め、破壊像などは極めて少なかった。

これらの形態は血球膜の固定、非固定を問わず殆んど同じ傾向であつた。

以上の所見から、保存中の自然溶血によつてできたghostと試料作製のため蒸溜水を加えて溶血させた時にできたghostとは大体区別できるように思う。

実 験 III.

これまでには溶血させた血球について観察してきた。次に溶血させないで保存血をそのままオスミウム酸で固定したものについて検討した。

実験方法 全血液の1滴に2% OsO₄溶液を1滴加えて充分混和させ、5分間固定する。その固定された血球を蒸溜水で3回、洗滌したものを試料として鏡検した。

実験結果 先ず、新鮮血を観察すると、円形でしかも電子線を殆んど通過させず全体に真黒にみえる血球が殆んど全部を占めるが、極めて稀に ghost がみえる。このものは写真 26 に示すように、比較的形が整っており微粒子構造もよくみられる。新鮮血でこのような ghost が現われるのは実験操作によるものかどうかは明らかでない。

保存血球では、真黒にみえる電子不透過性の血球は針状の突起をもつものが多くみられる。また新鮮血でも極めて稀にみられた ghost は、保存血の場合にもつとその数が多く、微細構造も多少変つてきている。即ち 5°C 保存で 3 週までのものは新鮮血とくらべ、微細構造その他の点であまり差はないが、10 週になると微細構造の不明瞭なものがみられるようになり、20 週では形の壊れたものが非常に多くなる (写真 27, 28, 29)。

考 察

生物材料の形態的観察を行なうにあつては、人工的变化の加わらない試料自身のありのままの姿をみるのが望ましいことは申す迄もない。赤血球の形態的研究に於いて、光学顕微鏡を用いれば生の試料を観察することは可能であるが、その反面顕微鏡の倍率が低いために血球構造の微細な変化を知ることは困難である。また電子顕微鏡を用いる場合は、高倍率に拡大されるので微細構造の観察はある程度可能となるが、一方には種々の欠陥が伴つてくる。例えば乾燥操作による試料の変形がある。特に血球では電子透過性が低いので溶血操作を行なつて、所謂 ghost の観察をするか、或いは超薄切片法やレプリカ法によらなければ、微細構造の観察を行なうことができない。これらの方法によれば、溶血操作や固定操作による変化はさけられないので、何れも血球の“生”の状態をみることに適しないが、現在の技術ではやむを得ない。従つて血球の形態的变化を電子顕微鏡によつて追求する場合には、試料の作製条件を同一にして正常血球との比較を行なうことが必要になつてくる。

本研究では、主として蒸溜水によつて溶血させた所謂赤血球の ghost についてしらべたが、これは特に赤血球の膜構造について検討したためであつた。そのうちで溶血後固定せずにそのまま乾燥した試料では、血球膜がもろい為か試料作製の過程でおきる人工的な変化と思われるものが現われ易く、また視野全体に血球や血漿の成分が残るためか血球膜の微細構造の観察の困難なことが多かつた。しかし溶血後オスミウム酸で固定した試料では、蛋白質などの凝固するためと思われるが¹⁰⁾、固定後の実験操作での機械的障碍とか、乾燥の際の水の表面張力による破壊の影響などが少ないようにみられた。従つて固定標本は固定しない標本に比較して、写真の映像はコントラストが強く、血球膜の微細構造は鮮鋭に現われるが、一般に変化の程度が弱く、非固定標本のように同一標本中に種々雑多の膜構造をみるという事は余りない。

以上のような方法については、既に吾々は正常赤血球について吟味している¹¹⁾。今回の保存赤血球の実験に当つては、固定しない標本の方が種々の形態がみられるので、保存による変化もあらわれ易いように予想されたが、実際には 37°C 保存のものではとも角、5°C 保存のも

のでは長期に保存したものでもはつきりした変化をみとめにくかつた。むしろ固定標本の方が保存による変化をみとめ易いように思われたので、この両方法を併用し観察を行なつた。

赤血球はその生活限からみて^{16,17)}個々の赤血球に機能の差のあることが考えられるが、形態的にもやはり個体差があつて、同一試料中の赤血球でもそれぞれ微細構造上多少の相違のあることがみとめられている。^{7),8),14),18),19),20)}このように新鮮正常血球の間で既に種々の像が認められる場合、保存による変化を見出すためには、正常赤血球の個体差以上の大きな変化を確認しなければならない。そこで果して保存によつて質的に差のある異常像が現われるものか、或いは単に出現の時期や数が変わるに過ぎないものかというような点に注目して検討をすすめたのである。その結果は、保存による特異的な血球の出現は保存10~20週以上の長期になつて始めてわずかに認められる程度に過ぎなかつた。即ち新鮮血球で多数を占める均一な微粒子構造をもつ血球は保存と共に減少し、新鮮血球では余りみられないもの、例えば固定しないものでは微粒子構造の不明瞭なもの、斑点やむらのあるものなど、固定したものでは多数の斑点様の電子不透過性のもによつて微細構造が不均一となつたものが保存によつて増加する傾向にあつた。しかし溶血の殆んどみられない保存初期に縞模様のもが相当数現われたが、保存が長くなると再び減少した。保存時期によつて現われたり消えたりするのはこの種の像だけであつて、このような消長をとることの理由はわからない。

保存期間が長く溶血のかなり進んだものでは、新鮮血でみられない血球の破壊像、萎縮像或いは多数の小孔像などが特に固定標本に於いてよくみとめられるが、これらは自然に溶血してghost化したものと考えられる。即ち保存血からghostだけを分離したものがこの種の像を呈することでもわかる。

保存各時期に認められる各種の形態を総括しその消長を考えると、本来均一な微粒子構造のものが、保存によつて電子不透過部分の多い不均一な微細構造となり、最後に破壊像となつてghost化するものと思われる。

次に保存温度による形態の差については、37°Cのものと5°Cのもので質的なちがいは余りみとめられないが、ただ37°C保存では3~5日で写真14, 24のように斑点様の不透過性が非常に強く、しかも血球全体のコントラストのよい特異な構造のものが屢々みられる。このような特異の血球像は恐らく比較的高温による膜変性の結果だろうと思われる。また37°Cに保存したものは5°Cのものに較べて、溶血度と同じ割合でも形態的变化が早く現われるようである。特に保存温度と保存期間に対し溶血度と形態変化の関係をしらべてみると第6表に一括表示したように、保存温度が異なると溶血の程度は同じ位であつても赤血球の形態的所見は一致しないことがわかる。例えば37°C, 7日保存のものでは溶血度5~15%位

第6表 血液の保存温度及び保存期間と溶血度及び形態的变化との関係

保 存 期 間	溶 血 度 (%)		
	1~3	5~15	30~50
37°C 保 存 (日)	3	7	—
5°C 保 存 (週)	3	10~20	30

— は形態的にほぼ同じ所見であることを示す。

で既に半数以上の血球が破壊或いは萎縮したように見える。それに反し5°Cのものでは保存30週位、溶血度30~50%位のときでなければこれと同じ程度の破壊或いは萎縮像をみることはない。

以上述べたようなことは、保存血球をすべて蒸留水で溶血させてみた結果であるが、溶血操作の加わらない状態のものをみるために、血球をそのまま固定して観察したところ、新鮮血球でも極めて稀に電子透過性のよいghostがみられた。これは実験操作によつて人為的にできたものかどうかはわからないが、これらのものをこれと同様にして作った保存血のghostと比較したとき、わずかながら差がみられた。即ち新鮮血液のものでは比較的形態が整っているにも拘わらず、保存長期のものではかなりこわれているようなものがみられ、また微細構造も不明瞭となつているので、この点が保存による変化であらうと推定される。

最後に光学顕微鏡による赤血球の形態をとり上げてみれば、保存の経過によつて正常円盤型→不正形円盤様型→金平糖型→針状型→球型という変化を示すことは、既に周知の事実であつて¹⁾、著者の得た所見もほぼそれに一致している。ただこのような生の試料の光学顕微鏡的形態と、乾燥標本での電子顕微鏡的微細構造との間を直接に結びつけて何らかの説明を下そうとすることはまだ困難なように思われる。

繰返して述べるように、吾々は血液の低温保存に関する研究を行なつているが、この保存による赤血球の変化は溶血その他種々の点で定量的にはつきりと認められている。しかし著者が今回行つた範囲の形態的な観察では、保存の早い時期では殆んど変化がみとめられず5°C保存で10~20週のかかなり遅い時期になつて漸くわずかな変化がみとめられる程度であるから、保存による赤血球の変化を追求するための手段として、もし形態的観察をとり上げようとしても、それは不適當であるといわざるを得ない。

なお、微細構造を論ずるためには、今後さらに蒸着金属の吟味、高分解能電子顕微鏡の使用等、いろいろ工夫しなければならぬ点が多いと考えている。

結 言

赤血球の保存による形態変化をしらべる目的で、自然溶血の程度を基準にしながら光学顕微鏡と電子顕微鏡による観察を試みた。

光学顕微鏡で観察すると、正常円盤型の赤血球が保存と共に不正形円盤様型→金平糖型→針状型→球型という形態的变化をとることが認められた。

電子顕微鏡による観察の結果は、

1) 5°C保存のものでは、一般に3週間位まで保存による特別な変化は認めにくく、10~20週という長期の保存で漸く認められる程度であつた。即ち(i)蒸留水溶血血球の非固定標本では、大多数の血球にみられる均一な微粒子構造のものは保存の経過と共に次第に数が減少しその代り、不均一配列の微粒子構造や電子不透過性のむらや斑点の混在するもの、及び膜の破壊したものなどは元来非常に少ないのであるが、それが僅かながら増加する傾向にあつた。(ii)

固定標本では、電子不透過性の縞模様のものが保存3週頃に一時的に増加するが、その後更に斑点の多い不均一な微細構造のものが多くなり、保存20週頃には多数の小孔のあるものや破壊像、萎縮像など(これらのものは新鮮血ではみられないものである)が現われた。このようなものは自然溶血によつてできた ghost と考えられる。(iii) 血液を溶血させないでそのまま固定した標本中にも、極く少数に ghost がみられた。新鮮血のものでは形のほぼ整つた微粒子構造が認められるが、長期の保存のものでは形がかなりこわれており、微細構造も不明瞭であつた。

2) 37°Cに保存したものは、5°Cのものと同様傾向の変化を示したが、溶血度が同じものでは形態的变化は早く現われた。特に斑点様のもので不透過性が極めて強く、しかも血球全体のコントラストのよい特異な構造のものが現われたことが5°Cのものと同様であつた。

最後に、終始御懇篤な御指導を賜りました根井教授に心から御礼の言葉を申し上げます。

又、電子顕微鏡撮影に種々の便宜を計つていただいた札幌医大中村三義、北大結核研究所高橋昭一郎、北大病院太田礼の諸氏に深く感謝の意を表します。

文 献

- 1) 木口直二 1935 保存血輸血の研究. 京都府立医大雑誌, **13**, 1097.
- 2) 右馬文治 1951 保存赤血球の退行性変性に関する形態学的研究. 日本血液学雑誌, **14**, 73.
- 3) 大村泰男 1954 保存血球の吟味. 東京医事新誌, **71**, 397.
- 4) 佐藤 功 1955 保存血液の変化について. 日本外科学会雑誌, **56**, 1070.
- 5) Bessis, M., M. Bricka et A. Dupuy 1951 Examen au microscope électronique de la surface des globules rouges. Origine des hématexodies. Compt. rend. Soc. Biol., **145**, 1509.
- 6) Latta, H. 1952 The surface of the mammalian erythrocyte. Blood, **7**, 508.
- 7) 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.
- 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) 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.
- 10) Khalifa, A. A. & M. K. Salah 1951 Spectrophotometric determination of haemoglobin in blood. Nature, **168**, 915.
- 11) 河内虎男 1954 血色素の測定について. 血液討論会報告, **6**輯, 336.
- 12) 坂牛栄治 1957 赤血球の部分溶血について. 未発表.
- 13) Florio, L., M. Stewart & E. R. Mugarage 1943 The effect of freezing on erythrocytes. J. Lab. Clin. Med., **28**, 1486.
- 14) 根井外喜男・坂牛栄治・浅沼英一・藤田英夫 1957 赤血球の電子顕微鏡的研究. 低温科学, Ser. B, **15**, 51.
- 15) Porter, K. R. & F. Kallman 1952 The properties and effects of osmium tetroxide as a tissue fixative with special reference to its use for electron microscopy. Exp. Cell. Res., **4**, 109.
- 16) Ashby, W. 1919 The determination of the length of life of transfused blood corpuscles in man. J. Exp. Med., **29**, 267.
- 17) Eadie, G. S. & I. W. Brown 1953 Red blood cell survival studies. Blood, **8**, 1110.

- 18) Lindemann, B. 1949 Zur Feinstruktur der Erythrocytenmembran. Arch. Exp. Path. Pharm., **206**, 439.
- 19) Bessis, M. 1950 Studies in electron microscopy of blood cells. Blood, **5**, 1083.
- 20) Hoffman, J. F. 1956 On the reproducibility in the observed ultrastructure of the normal mammalian red cell plasma membrane. J. Cell. & Comp. Physiol., **47**, 261.

Résumé

As a part of studies on the preservation of blood the morphological change of erythrocytes in stored blood was investigated by the use of electron- as well as photo-microscope. The degree of change was compared with the intensity of the hemolysis which occurred spontaneously in the stored blood. Rabbit blood was used as experimental material and ACD solution was added to it as preservative.

According to the photo-microscope examination in the unfixed specimens of erythrocytes stored at 5°C and 37°C the following five stages of change in the shape of erythrocytes were distinguished: smooth disk (normal)→crenated disk→crenated spheroid→finely crenated spheroid→smooth sphere.

The electron-microscope examination was carried out for two sorts of specimens: erythrocytes completely hemolyzed with distilled water, i.e., ghost cells, and unhemolyzed erythrocytes.

The results obtained may be briefly summarized as in the following:

1) Any noticeable change was not observed in the ghost-cell specimens derived from the blood stored at 5°C for 3 weeks, the approved period of storage for transfusion, while, when the period of storage was prolonged beyond this limit, the degree of change proceeded gradually. In the specimens derived from the blood stored for 10-20 weeks, the decrease in number of ghost cells having normal fine granular structure and the increase in number of those having inhomogeneous structure with many spot-like, dense areas which scarcely admitted of electron transmission were clearly observed.

In the specimens derived from the blood stored for more than 20 weeks, destructed or shrunken ghost cells, which are absent in the specimens derived from normal fresh blood or from that stored for a short period, were detected. It is supposed that these degenerated ghost cells had already been formed in the stored blood before the hemolyzing procedure was applied.

The results obtained from the examination of the specimens derived from the blood stored at 37°C showed that the morphological change of erythrocytes stored at this temperature seems to be produced more rapidly than that of erythrocytes stored at 5°C, and when the comparison was performed between the samples of blood stored at 37° and 5°C which showed the same intensity of spontaneous hemolysis the degree of morphological change of the former was greater than that of the latter. The qualitative nature of the change, however, manifested no essential difference between the ghost cells derived from the bloods stored at 37° and 5°C, but sometimes abnormal ghost cells having spot-like, dense areas completely opaque to electrons were detected in the former case.

2) In unhemolyzed fixed specimens of erythrocytes stored at 5°C a large number of cells containing dense material completely opaque to electrons and a small number of ghost cells lacking in fine granular structure and of degenerated ghost cells were observed. The ghost cells detected in the specimen of normal fresh blood had more fine granular structure.

写真 1. 新鮮赤血球

円盤型が殆んど大部分で不正形
円盤様型が少数みられる

× 2,700

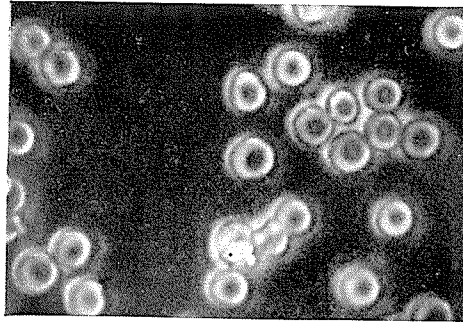


写真 2. 保存 3 週 (5°C)

金平糖型, 針状型が殆んど大部
分を占める

× 2,700

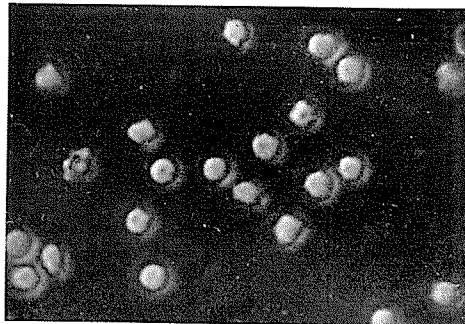


写真 3. 保存 10 週 (5°C)

球型が殆んど大部分を占める

× 2,700

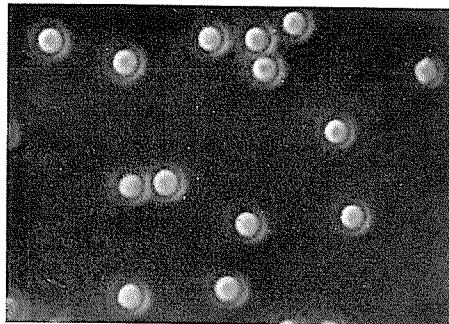


写真 4. 保存 20 週 (5°C)

部分溶血型が散在してみられる

× 2,700

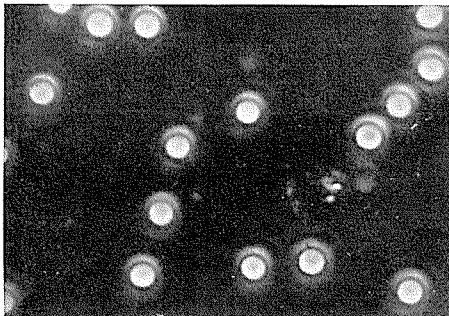




写真 5. 新鮮赤血球

均一な微粒子構造，多孔性のも
の，破壊像が同一試料にみられ
る

× 10,800



写真 6. 新鮮赤血球

平滑に見えるもの

× 11,700

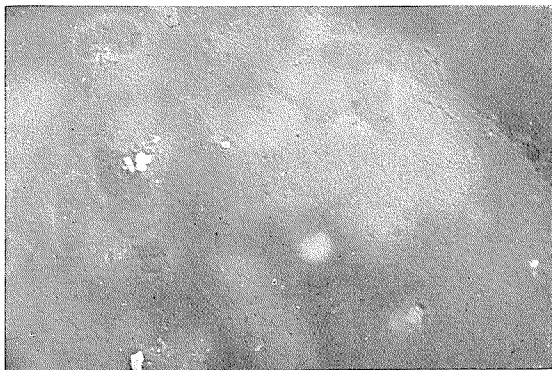


写真 7. 新鮮赤血球

むらのあるもの

× 12,600

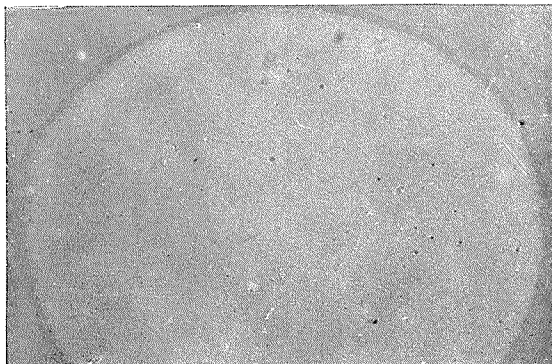


写真 8. 保存 10 週 (5°C)

微粒子の不明瞭なもの

× 11,700

写真 9. 保存 10 週 (5°C)
むらのあるもの
× 12,600

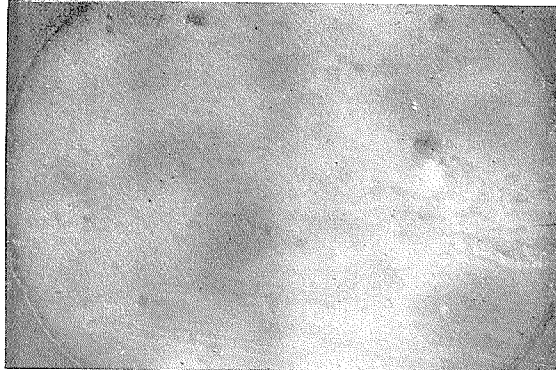


写真 10. 保存 20 週 (5°C)
斑点のあるもの
× 11,700

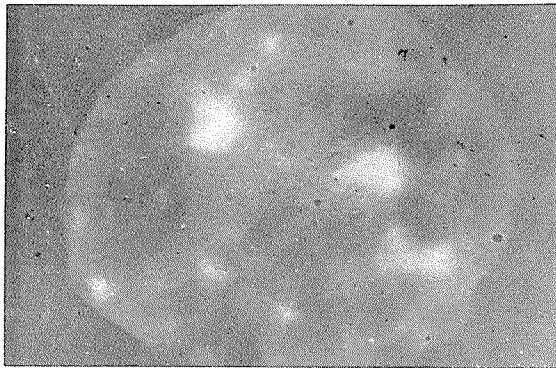


写真 11. 保存 10 週 (5°C)
多孔性のもの
× 11,700

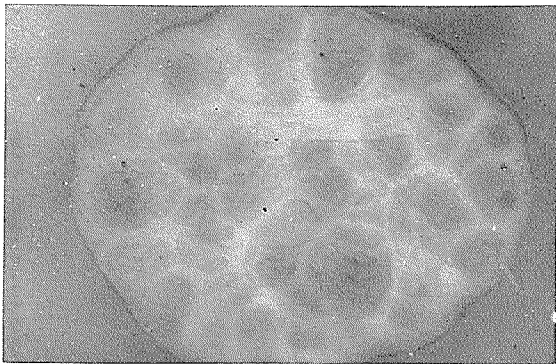
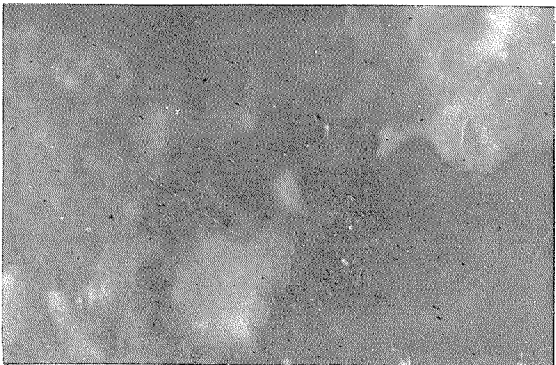


写真 12. 保存 30 週 (5°C)
こわれているもの
× 12,600



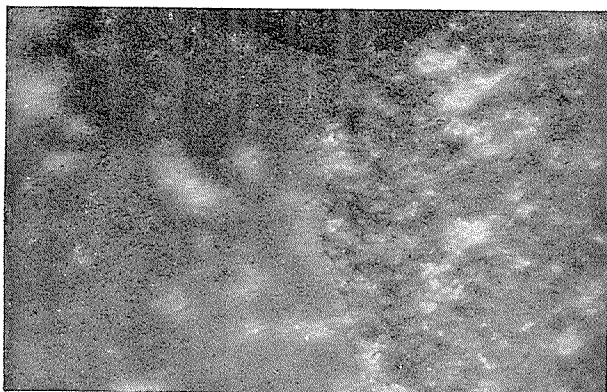


写真 13. 保存 3 日 (37°C)
斑点のあるもの、左のものはやや特異的

× 13,000

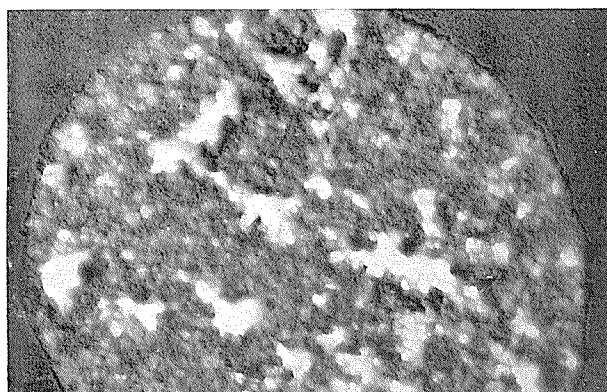


写真 14. 保存 3 日 (37°C)
特異な血球像

× 13,000

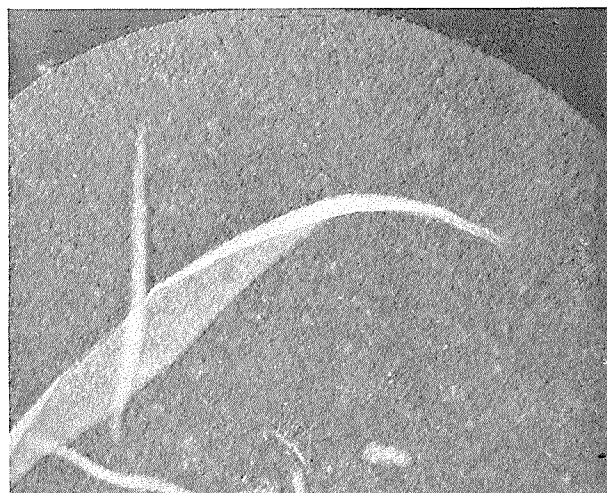


写真 15. 新鮮赤血球
固定したもの
均一な微細微粒子構造

× 18,000

写真 16. 新鮮赤血球
固定したもの

× 18,000

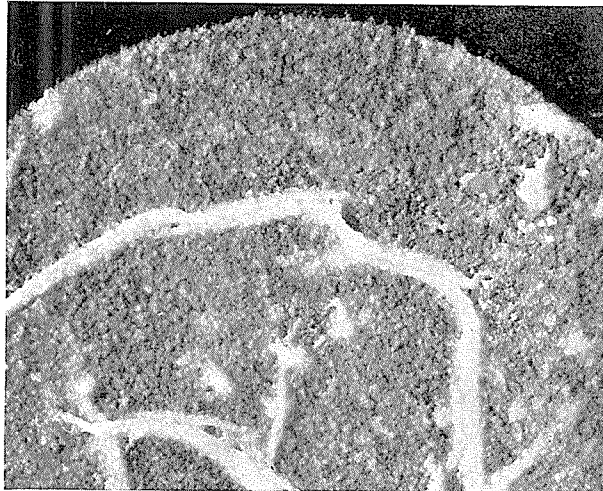


写真 17. 保存3週 (5°C)
固定したもの

右: 斑点のあるもの
左: 縞模様の不透過性
のものがあるもの

× 18,000

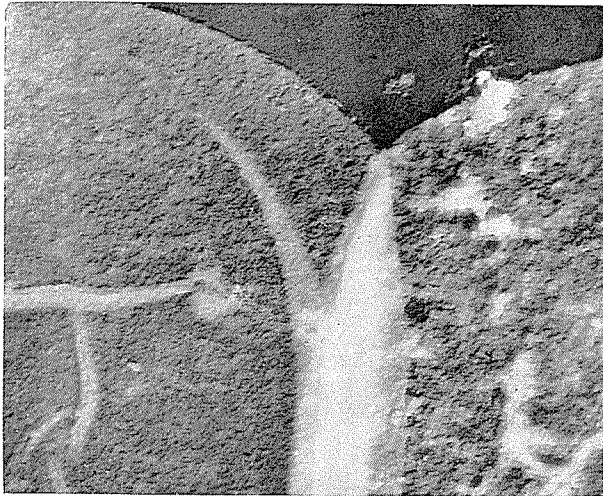


写真 18. 保存10週 (5°C)
固定したもの

× 18,000





写真 19. 保存 10 週 (5°C)
固定したもの

× 18,000

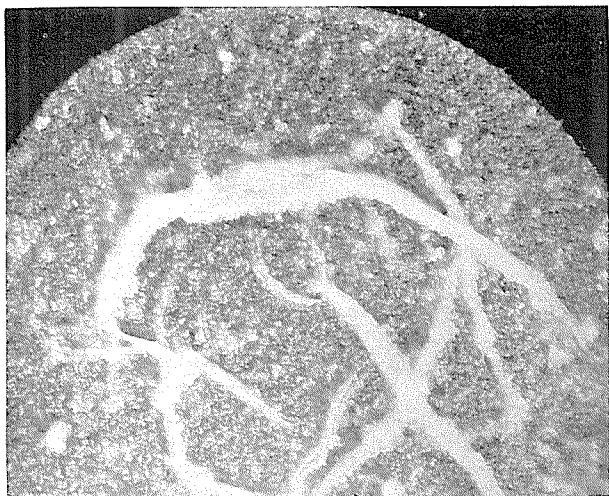


写真 20. 保存 10 週 (5°C)
固定したもの

× 18,000



写真 21. 保存 30 週 (5°C)
固定したもの
多孔性のも

× 18,000

写真 22. 保存 30 週 (5°C)
固定したもの
破壊像

× 18,000

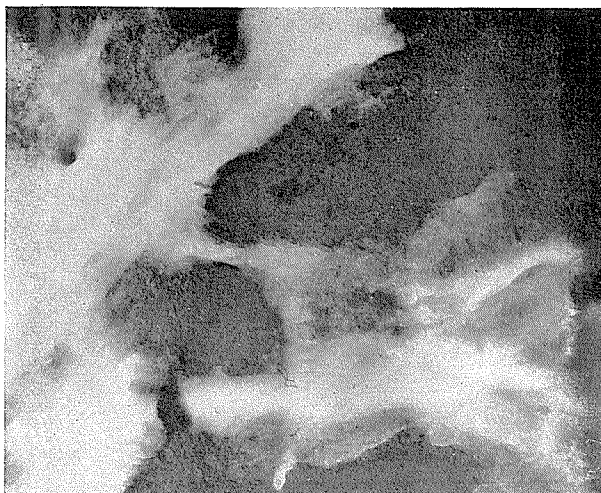


写真 23. 保存 30 週 (5°C)
固定したもの
萎縮像

× 18,000

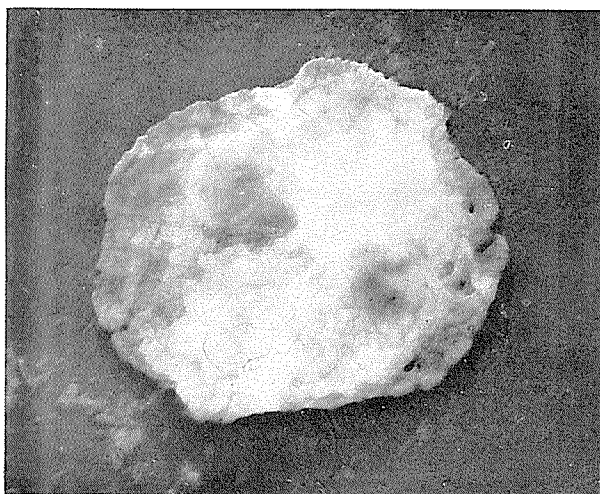
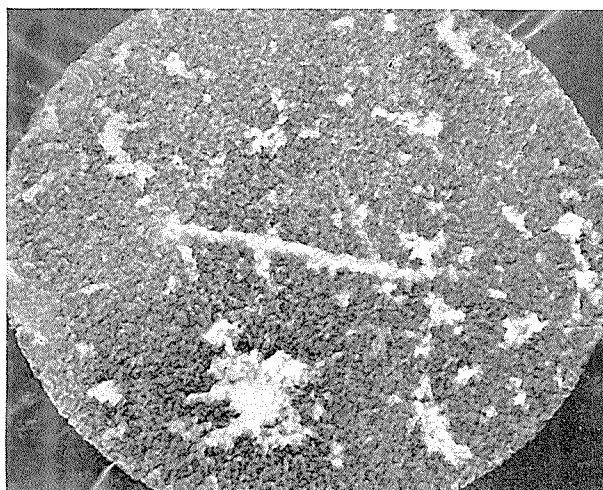


写真 24. 保存 3 週 (37°C)
固定したもの
特異な血球像

× 13,000



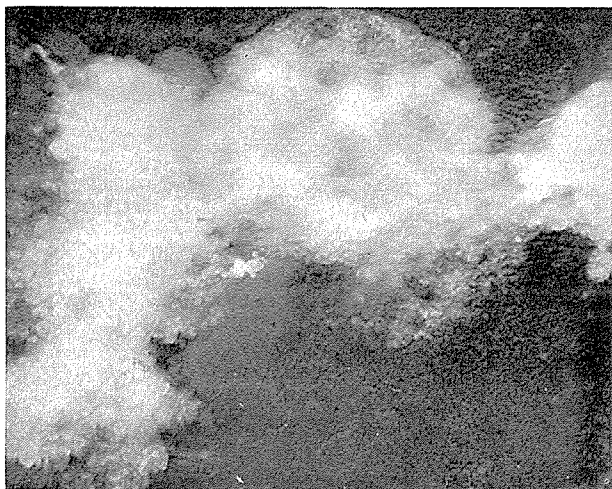


写真 25. 保存 5 日 (37°C)
遠心上層
× 13,000

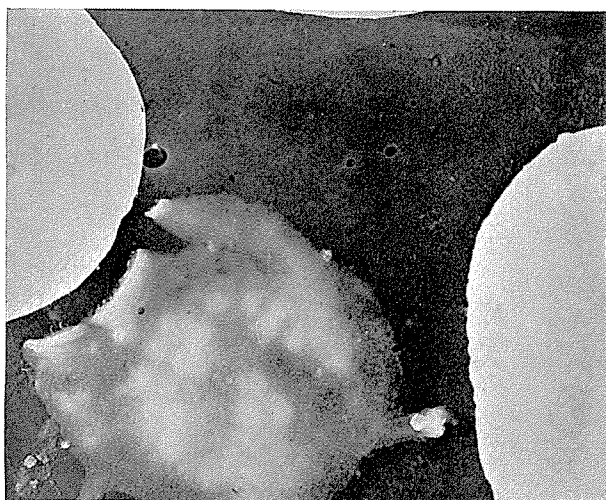


写真 26. 新鮮赤血球
溶血操作を行わずに
固定したもの
(不透過性細胞と ghost)
× 13,000

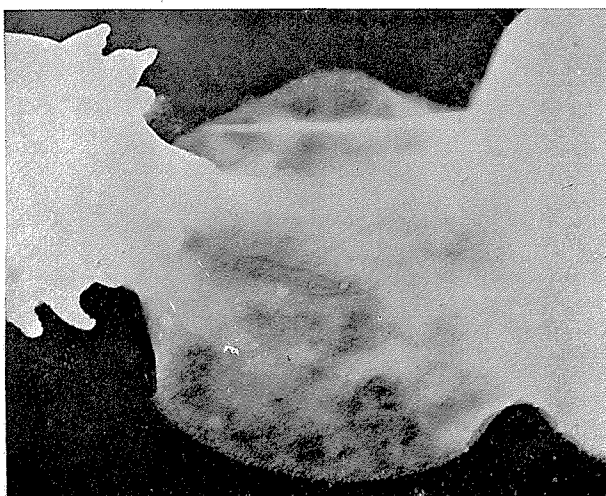


写真 27. 保存 3 週 (5°C)
溶血操作を行わずに
固定したもの
× 13,000

写真 28. 保存 10 週 (5°C)
溶血せず固定したもの

× 13,000

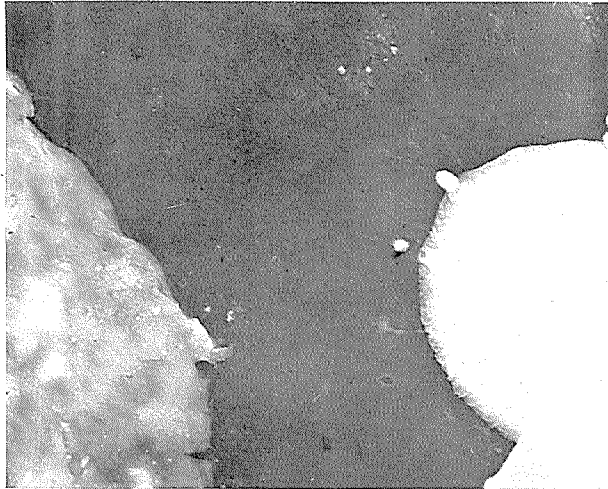


写真 29. 保存 20 週 (5°C)
溶血せず固定したもの

× 13,000

