



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 (続報)
Author(s)	坂牛, 栄治; SAKAUSHI, Eiji
Citation	低温科学. 生物篇, 16, 83-90
Issue Date	1958-12-05
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/17611
Type	departmental bulletin paper
File Information	16_p83-90.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 (続報)

坂 牛 栄 治
(低温科学研究所 医学部門)
(昭和 33 年 7 月受理)

I. 緒 言

さきに筆者は保存による赤血球の形態変化をみるために電子顕微鏡的に観察を試みたところ¹⁾, 5°C 保存のものでは3週位では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変化が認められる程度のものであることがわかった。このときの実験では, おもに保存血球をそのまま固定した場合に僅かにみられる ghost か, 或いは蒸溜水溶血させた ghost について観察したのであるが, 今回は有機溶媒や酸・アルカリ処理によつて血球膜構成を変えてみた場合に保存による膜微細構造の変化が現われてこないか, また血球内容物を除いて血球膜のみを保存した場合にはどんな変化が起るだろうかという吟味を行つた。要するに前報での実験であまり著明にはみとめられなかつた保存による微細構造の変化をもつとはつきりつかむために, 化学的処理を行つて新鮮血球との差をより仔細に検討し, また通常, 血球を観察するためには滲透圧的溶血を行つて試料を作るのであるが, 新鮮血と保存血とでこの溶血による影響に差がないかどうかの吟味も行つたのである。

II. 実験方法

1. 有機溶媒を用いる場合

実験材料や保存方法は総て前報に準じた。即ち, 家兎の血液に1/4量のACD液を加えたものを材料として, 5°Cと37°Cにそれぞれ保存した。

有機溶媒には, Hillier が試みた方法に大体準じて²⁾ 96% アルコール, クロロホルム, エーテルをそれぞれ3:1:1の割合になるように混合したものを用いた。

試料作製法は下記の通りであるが, その主要点は蒸溜水溶血後の ghost に前記有機溶媒を作用させたことにある。即ち

血液 1 滴を蒸溜水 3.0 cc に滴下し混和

↓

* 北海道大学低温科学研究所業績 第 443 号

1,000 r.p.m., 5分間遠心し上清をすてる
 ↓
 沈澱に蒸留水 3.0 cc を加え静かに混和
 ↓
 1,000 r.p.m., 5分間遠心し上清をすてる
 ↓
 沈澱にアルコール・クロロホルム・エーテル混合液を1滴ずつ静かに振盪しながら合計
 1.0 cc を加えて10分放置
 ↓
 1,000 r.p.m., 5分間遠心し上清をすてる
 ↓
 沈澱に蒸留水を加えて静かに振盪
 1,000 r.p.m., 5分間遠心し上清をすてる } 2回繰返す
 ↓
 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. 酸, アルカリの影響

材料ならびに保存方法は前記実験と同様である。

酸, アルカリ液には蒸留水に N/10 HCl 或いは N/10 NaOH を加え, それぞれ pH を 4.0 と 9.0 に調整したものを用いた。

試料作製法は下記の通りであるが, その要点は蒸留水溶血後の ghost に前記の酸或いはアルカリ液を作用させたことにある。即ち

血液 1 滴を蒸留水 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 pH 4.0 の酸液或いは pH 9.0 のアルカリ液 3.0 cc を加え静かに振盪
 ↓
 1,000 r.p.m., 5分間遠心し上清をすてる
 ↓
 僅か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

なお予備実験として, 新鮮な ghost に pH 3.0 から 1.0 の間隔をおいて pH 10.0 までの pH 域の一系列の蒸留水 (N/10 HCl, N/10 NaOH を用いて調整したもの) を作用させたところ, pH 4.0 から 9.0 の間では, ほぼ正常の形態を整えたものが大多数を占めていたが, その範囲外の pH のものでは破壊像がかなり多くみられた。そこで新鮮な血球膜の形態を維持しながら, できるだけ酸性乃至アルカリ性にするための pH の限界として pH 4.0 と 9.0 とを採用したものである。

3. 溶血させた血球 (ghost) の保存

保存方法 蒸留水溶血させた血球を新鮮血漿に浮遊させて無菌的に保存したものである。

それには, まず家兎の ACD 加新鮮血液 2.5 cc をそのまま 3,000 r.p.m., 30分遠心して血漿と血球を分離し, ついで分離血球に蒸留水 25.0 cc を混和して静かに振盪し, 1,000 r.p.m., 5分遠心し上清をすてて ghost を分離した。これにさきに分離した血漿を加えて再浮遊液をつくり, 5°C と 37°C の恒温箱内に静置保存した。

試料作製法 保存した ghost を鏡検するには次のようにして試料を作った。

ghost 浮遊血漿を等倍以上の蒸留水で稀釈
↓
1,000 r.p.m., 5 分間遠心し上清をすてる
↓
残った沈澱に蒸留水 3.0 cc を加え静かに振盪
↓
1,000 r.p.m., 5 分間遠心し上清をすてる
↓
残った沈澱に蒸留水 3.0 cc を加えたものを試料とする

以上いろいろな方法で得た試料を 0.4% フォルムバル膜を張ったメッシュに載せ、室温乾燥後 12 度の角度からクロームを真空蒸着させたものを標本とした。

試料の観察や撮影は、前報に大体準じて行い日本電子光学製 V-L 型電子顕微鏡を用いた。

III. 実験成績

1. 脂質溶剤を作用させた場合

血球を溶血させて得た ghost にアルコール・クロロホルム・エーテル混合液を作用させると、血球膜の蛋白を固定するが脂肪は抽出されるので、それを水洗乾燥させると、一般にコントラストのよい血球像が得られる。

まず、採血直後の新鮮血球でこの処理をしたものについてみると、緻密な微粒子構造はもっているが、全体として収縮しているため変形した電子密度の大きな像がみられた。通常の方法で作った標本のように同一試料中に種々の膜構造のものが認められるようなことはなく、殆んど全部の血球が同様の所見でいずれも電子密度が大であった (図版 I-1)

5°C 保存の場合 全血液を 5°C に保存して大体 3, 5, 10 週の時期の形態を観察したところ、新鮮血でみられた緻密な微粒子構造をもつものの数は保存期間が長くなるに従って減少し、その代り種々の血球像が現われるようになった。即ち、保存 3, 5 週のものでは、ほぼ形態の整ったやや粗い微粒子構造をもち直径も多少大きくなっているもの (図版 I-2)、或いは多数の小孔をもつて網状にみえるもの (図版 I-3) が屢々みられた。また保存 10 週のものでは殆んど大部分の血球は破壊像を示していた (図版 II-4)。

前報で、血球を溶血させて得た ghost をそのまま、或いは固定したものの観察で、いずれの場合も保存経過に従って血球直径の平均値が減少してみられたが、このような有機溶媒を用いたものでは逆に直径の増大の傾向がみられることと、上記のような粗粒の構造をもつものが保存の初期にも現われること、更に保存 10 週では殆んどが破壊像を示し形態の変化の現われ方が早いことなどが異なる。

37°C 保存の場合 全血液を 37°C に保存して 3, 5 日目の形態を観察したが、5°C のものと同じような変化がみられた。ただ温度が高いだけに変化の現われ方が早かつたことは、前報での実験結果と同様である (図版 II-5)。

2. 酸, およびアルカリの影響

保存血球を酸或いはアルカリで処理しておいてからサンプリングしたものについては

(1) 酸 (pH 4.0) で処理した場合

まず対照の採血直後の新鮮血球では、ほぼ形態の整った微粒子構造のものが殆んど大部分を占めているが(図版 II-6)、そのほかに同じ試料中に多数の小円状に分離融合された特徴のある破壊像も僅かみられた(図版 III-7)。このようなものは酸, アルカリ処理をうけないものではみられなかつた。

5°C 保存の場合 新鮮血では殆んどすべての血球はほぼ形態の整った微粒子構造のものから成るが、その数は保存と共に減少し、多数の小円状に分離融合された破壊像が保存経過に従つて増加してみられた(図版 III-8)。このような形態の変化は、保存の初期では認めにくいのが保存 10 週のものでは明らかであつた。

37°C 保存の場合 5°C のものと大体同じような変化がみられた。即ち、保存 5 日のものでは既に 5°C にみられると同様の多数の小円状に分離した破壊像が殆んど大部分を占めていた。その上前報でも述べた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現われることが 5°C のものとやや異なる点であつた(図版 III-9)。

(2) アルカリ (pH 9.0) で処理した場合

対照の採血直後の新鮮血球では、写真, 10 左でみられるようなほぼ形態の整った微粒子構造のものが殆んど大部分を占めた。このようなものは pH を調整しない蒸溜水, 或いは pH 4.0 の酸液に浮遊させたものと異なつて、一般に直径が小さく辺縁がやや肥厚し中央部の微粒子構造は粗となつている。このほか同じ試料の中に多数の小円形に分離された破壊像も僅かみられた。このようなものは酸処理でみられた破壊像と同じような形態であるが、分離した小円形の大きさは、アルカリ処理のものの方が一般に大きい点が異なる(図版 IV-10)。

5°C 保存の場合 新鮮血球の殆んど大多数を占めていたほぼ形態の整った微粒子構造のものは、保存 3 週になるとかなり減つて、その代り多数の小円形に分離した破壊像が大多数を占めるようになった(図版 IV-11)。なお前報記載の諸種の実験条件のものは勿論、酸処理のものでも、このように保存のかなり早期で既に変化が認められることがない。

37°C 保存の場合 前報で述べた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見られることのほかは、5°C のものと大体同じような変化がみられた。勿論、変化の現われ方は極めて早く、保存 3 日のものでは殆んど全部が多数の小円形の分離融合した破壊像として認められた。

3. 溶血させた血球を保存した場合

新鮮な血漿中に溶血させた血球, 即ち ghort を浮遊させて保存したときの変化を観察した。

まず、保存を始めたばかりの新鮮なものでは、円形で均一な微粒子構造をもつもの、むらのあるものなどが殆んど大部分を占め、多孔性のもの、破壊像などが僅かにみられた。このようなものは前報での標本作製の条件, 即ち、血球を蒸溜水で溶血させて引続き蒸溜水で洗滌し

たものと同様な所見であつた。

5°Cに保存した場合 前報のように保存血球を溶血させて標本にしたものと大体同じような形態の変化がみられたが、変化の現われ方が時期的にやや早いようにみえた。即ち、保存3週のものでは形態の整つた微粒子構造のものが減少し、**図版 V-12**のような血球の萎縮破壊像がやや多く、保存5週のものでは破壊の程度の更に著しいものがかなり多くみられるようになった。

37°Cに保存した場合 5°Cのものと同様な形態の変化がみられた。しかし血球のまま37°Cに保存した場合の斑点様の不透透性が非常に強く、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(前報記載)はこの場合全く認められなかつた。なお、5°Cのものより形態の変化が早く現われたことは勿論である。

IV. 総括, ならびに考察

さきに、筆者は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、溶血度と血球膜の形態の変化との関係をしらべたが、血球の微細構造の変化についてはあまりはつきりした結果は得られず、長期の保存で漸く僅かの変化が認められるにすぎなかつた¹⁾。そこでひきつづき電子顕微鏡的に、いろいろな角度から保存による血球の微細構造の変化を検討してみたのである。

そもそも赤血球膜構造の主要な構成成分は蛋白と類脂肪であるといわれており²⁾、自然溶血をおこすくらいの期間保存された血球であれば、これらの成分に何らかの変化があつてもよい筈である。そこでこれらの変化を明らかにする為の手段として種々の処理を加え、その結果得た標本について観察した。もちろんこのような処理を行つて得られた膜構造の所見は、保存による変化のそのままの姿を表わすとはいえないであろう。しかし本実験は敢えてこのような artifact を加えることにより、対照の新鮮血とは異なつた保存血の変化をできるだけ早期に発見することを目標として行つたのである。

なお、一般に行われている血球の標本作製による観察では蛋白と類脂肪の区別をつけることが出来ないので、アルコール・クロロホルム・エーテルの混合液を用いて蛋白を固定するとともに類脂肪の抽出をして観察の便宜を計つた。その結果、新鮮なものでは収縮して変形のある厚い緻密な微粒子構造としてみられたが、保存したものではほぼ形態のよく整い直径も大きく、新鮮なものに較べて粗い微粒子構造をもつたものとか、このような膜構造に多孔性を帯びて網状となつたものなどが屢々みられ、更に保存10週ではバラバラになつた破壊像がかなり多く認められた。このようなものは新鮮血で全く認められないので保存による特異な変化と思われ、血球膜成分の構成の状態に変化がおこつたことを意味するものであろう。

つぎに、赤血球はそのメヂウムの pH によつて形態的機能的に影響を受け易いことが知られており³⁾、電子顕微鏡的观察では pH のかなり低いメヂウムの時には血球はゲル化し、また pH の高いメヂウムの時はゾル化すると報告されている^{4), 5)}。

筆者の予備実験で HCl, NaOH で各種の pH の蒸溜水溶液をつくり、これに新鮮血球膜を浮遊させたものでは、pH 4.0 と 9.0 の間では微粒子構造にそれぞれ僅かな差異があるが形態のほぼ整つたものが殆んど大部分を占めてみられ、pH の値のそれより高い或いは低いものでは血球の破壊像がかなり多くみられることがわかつた。このことから保存血球の膜構造に関連してその性質をもしらべる一つの方法として新鮮血球の形態を大体維持する pH の限界点、即ち pH 4.0 と 9.0 の両極端のメヂウムを用いて保存血球を検討してみたのである。

その結果、それぞれの pH のものでは、新鮮血で極めて少ない多数の小円形に分離融合像のある破壊像が保存によつてかなり多くみられるようになり、特に pH 9.0 のものでは溶血の少ない時期、例えば 5°C のもので 3 週という保存のかなり早い時期にすでに相当の変化が認められることが特徴であつた。なお、前述のように、このような変化は保存した血球の微細構造の本来の変化をそのまま現わしているとはいえないにしても、保存によつて血球膜組成成分の性質とか構成の状態に変化があつたことを意味するものであろう。

前報では、標本作製に通常行われる方法つまり保存血球を蒸溜水で溶血させてから作る方法を用い、その膜構造の変化を観察したのである。これは既に知られているように、赤血球を観察するには、そのままでは電子密度が大きく血球膜の微細構造をしらべることができないからであつた。しかし蒸溜水による溶血の機序が所謂滲透圧的な作用によるものとすれば、このような蒸溜水溶血によつて作つた標本では、その物理的な作用による変化が本来の血球の微細構造に重なつてあらわれるのではないか、或いはまたこの作用が新鮮血球と保存血球とではちがつて働くのではないかということが問題になる。

そこで実験条件を前報のものとは逆にして始めに新鮮血球を蒸溜水溶血させて得た ghost を血漿中に保存したものの形態変化をも検討してみた。即ち、滲透圧溶血という機械的な影響を始めに一樣に与えておいてから保存することにした。この結果、5°C 保存では血球保存と ghost 保存の両者の間に質的な差は認めにくかつたが、37°C 保存では ghost 保存に斑点様の不透過性が非常に強く、しかもコントラストのよい血球像（前報記載）は全く認められなかつた。即ち、新鮮血球と保存血球との滲透圧溶血によつて受ける響影のちがいは、5°C のものでは余りはつきりしないが、37°C のものでは血球の 1 部にやや差があるものと思われた。また、時期的には血球のまま保存したものより ghost 保存の方に破壊像が早く多く現われたが、これは溶血操作をうけたために、保存による変化をうけ易くなつたものであろう。

さて、以上の諸実験から総合的に考えると、赤血球の保存による形態的変化は、保存 10 ~ 20 週という長期のものでは勿論であるが、溶血の少ない保存初期においても血球膜成分の構成の状態に変化がおこるものと推察される。しかし血球膜構造の変化の本来の姿を知るには、これではまだ不充分で更に実験方法の吟味、とくに高度の分解能の顕微鏡を用いての観察が必要であらうと考えられる。

V. 結 論

赤血球の保存による形態変化をより詳しくしらべる目的で、次のような処置を行つたものについて観察した。

1. 赤血球膜に脂質溶媒を作用させて血球膜成分の構成の状態の変化をしらべようとしたものでは、新鮮血でみられる緻密な微粒子構造のものが保存によつて減少し、粗雑な微粒子構造のもの、多孔性のものなどが比較的保存の初期に現われるようになった。

2. 赤血球膜にアルカリ (pH 9.0) 又は酸 (pH 4.0) を作用させると、新鮮血球ではほぼ形態の整つた微粒子構造のものが大部分を占めてみられたが、保存したものではそれぞれ多数の小円形に分離融合した破壊像が多くみられた。とくにアルカリを作用させたものは保存のかなり早い時期でも変化がみられることは特異的であつた。

3. 新鮮な ghost を血漿中に保存したものでは、全血のまま保存し観察の際に溶血させた ghost に較べて、5°C のものでは質的な差を見つけにくかつたが、37°C のものでは斑点様の不透過性が非常に強く、コントラストのよい血球像が全く認められなかつた点が異なつていた。即ち、保存血と新鮮血では滲透圧溶血という機械的因子による影響のうけ方が多少異なるのではないかと思われた。

要するに、これらの処理をすることによつて、通常の標本作製法では殆んど変化を認めることのできないくらいの保存の初期にも、多少の血球膜構造の変化のあることを認めた。

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北大結核研究所高橋昭一郎氏に深く感謝の意を表します。

文 献

- 1) 坂牛栄治 1957 血液の保存に関する研究. 低温科学, Ser. B, **15**, 57.
- 2) Hillier, J. and J. F. Hoffman 1953 On the ultrastructure of the plasma membrane as determined by the electron microscope. J. Cell. Comp. Physiol., **42**, 203.
- 3) Ponder, E. 1948 Hemolysis and Related Phenomen.
- 4) Teorell, T. 1952 Permeability properties of erythrocyte ghosts. J. Gen. Physiol., **35**, 669.
- 5) Jacobs, M. H., & A. K. Parpart 1931 Osmotic Properties of the erythrocytes. II. The influence of pH, temperature, and oxygen tension on hemolysis by hypotonic solutions. Biol. Bull., **60**, 5.
- 6) 丹野栢彦 1954 赤血球膜の物理化学的性質に就いて. 細胞化学シンポジウム, **3**, 93.
- 7) Sundharagati, B. & C. S. Wright 1953 A clinical and experimental study on the erythrocyte ultrastructure membrane with the electron microscope. J. Clin. Inv., **32**, 979.

Résumé

In previous paper it was reported that any noticeable change was not electron-microscopically recognized in ghost-cell specimens derived from the blood stored at 5°C for three weeks, while by other methods morphological and functional destruction of cells was definitely observed under such a condition. In order to investigate the matter more precisely by the use of several treatments, further experiments were undertaken.

When the specimens for electron-microscopical observation were preliminarily treated with lipid solvents, such as alcohol, ether and chloroform, or with acid (pH 4.0) and alkali (pH 9.0), fresh cells remained unaffected, whereas the stored cell revealed some microstructural change of cell membrane or some morphological destruction of cell, which had not been observed in the case of no treatment.

The ghost cells previously hemolysed with distilled water and then stored in plasma were found to be more fragile than the ghost cells derived from the stored whole blood.

写真 1. 新 鮮 血 球
有機溶媒処理したもの

×12,500

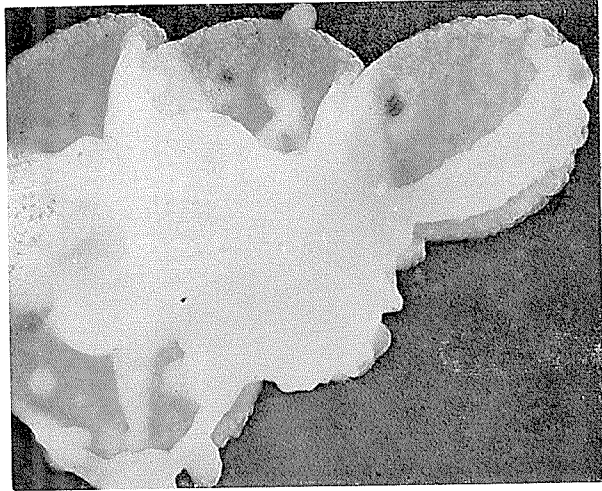


写真 2. 保 存 3 週 (5°C)
有機溶媒処理したもの

×12,500



写真 3. 保 存 3 週 (5°C)
有機溶媒処理したもの

×25,500



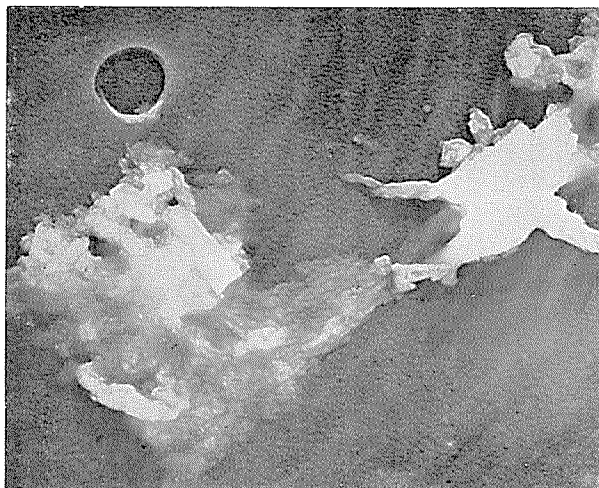


写真 4. 保存 10 週 (5°C)
有機溶媒処理したもの

×12,500



写真 5. 保存 5 日 (37°C)
有機溶媒処理したもの

×12,500

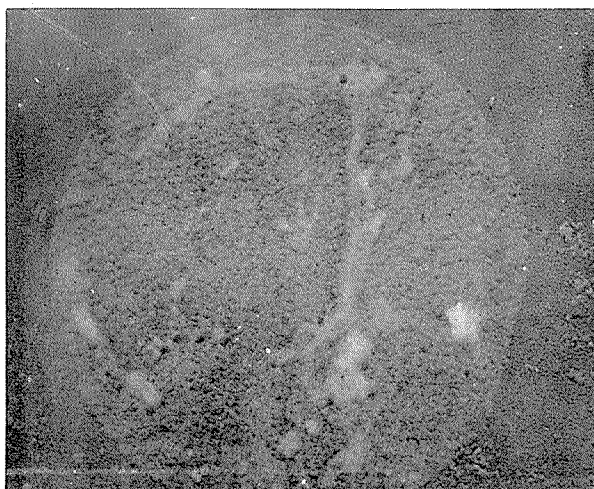


写真 6. 新鮮血球
酸 (pH 4.0) 処理したもの

×12,500

写真 7. 新鮮血球
酸 (pH 4.0) 処理したもの

×12,500

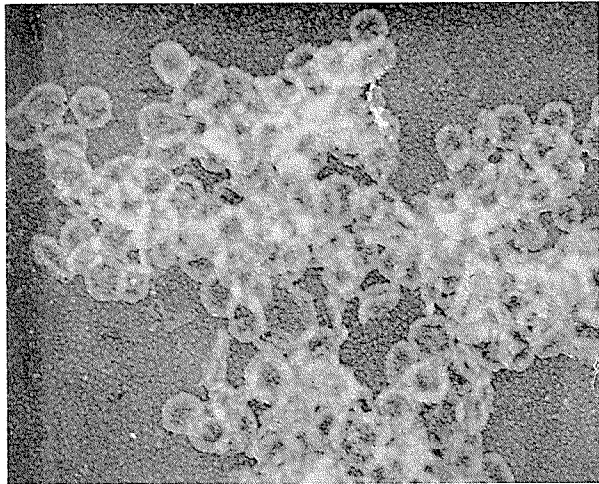


写真 保存 10 週 (5°C)
酸 (pH 4.0) 処理したもの

×12,500

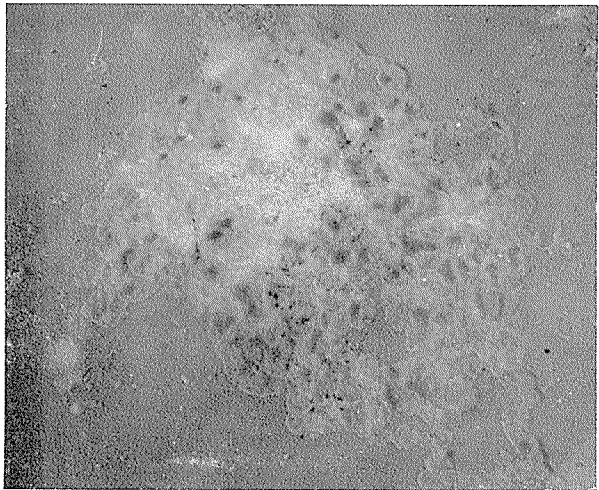
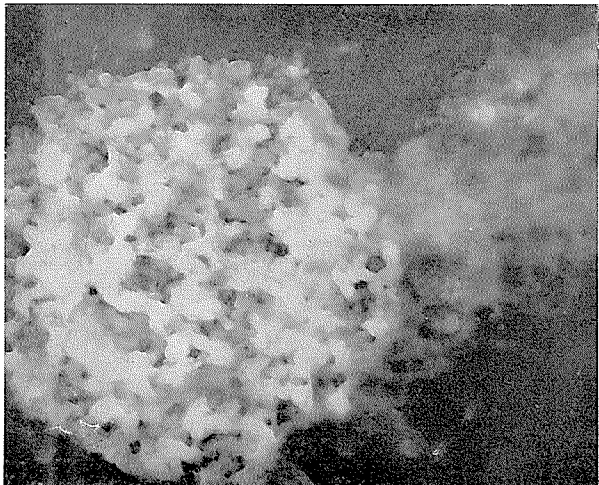


写真 9. 保存 3 日 (37°C)
酸 (pH 4.0) 処理したもの

×12,500



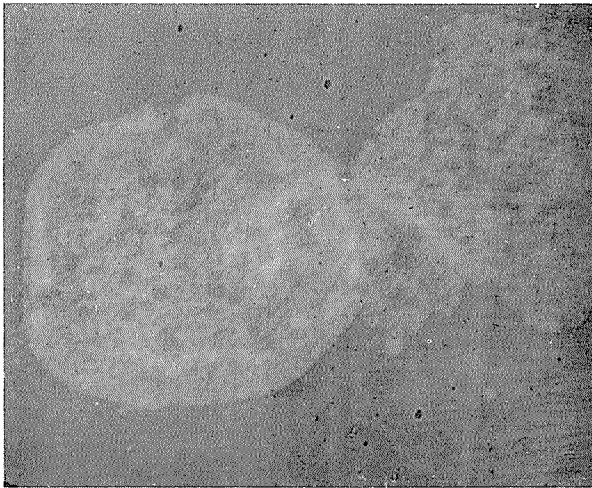


写真 10. 新鮮血球

アルカリ (pH 9.0) 処理した
もの, 特に右側の血球に注
目

×12,500

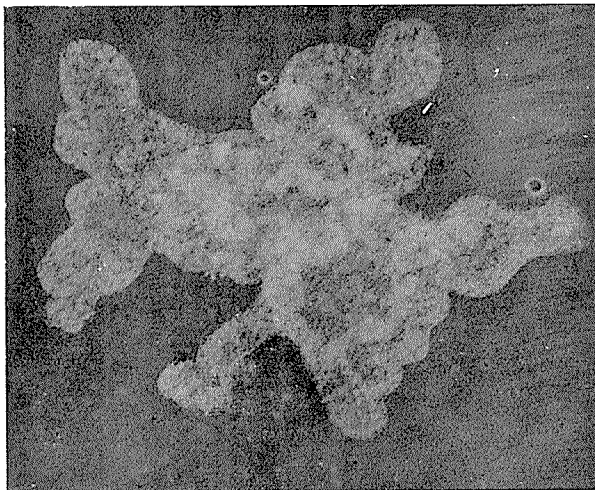


写真 11. 保存3週 (5°C)

アルカリ (pH 9.0) 処理した
もの

×12,500

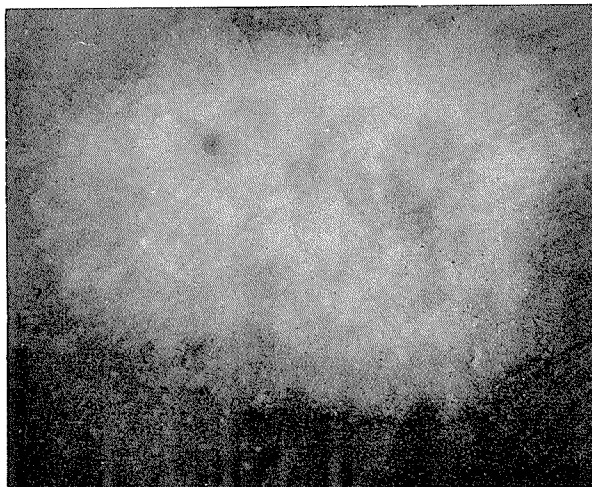


写真 12. 保存3週 (5°C)

ghost を保存したもの

×12,500