



Title	赤血球の不完全溶血について
Author(s)	坂牛, 栄治; SAKAUSHI, Eiji; 浅沼, 英一 他
Citation	低温科学. 生物篇, 17, 71-77
Issue Date	1959-10-24
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/17624
Type	departmental bulletin paper
File Information	17_p71-77.pdf



赤血球の不完全溶血について*

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34年7月受理)

I. 緒言

溶血とは赤血球から主としてヘモグロビンが遊離して出る現象をいう。その遊出する機構については諸説があつてまだよくわかつていない。ただ結果として、ヘモグロビンのすべてが血球から脱出して後に ghost だけが残るものと、ghost の中に多少なりとヘモグロビンの残存するものがある。

例えば、滲透圧的な作用で溶血する場合でも Baron¹⁾, Wilbrandt²⁾, Lindeman³⁾などは赤血球内容物が徐々に遊離されて不完全溶血がみられるといい、また Saslow⁴⁾, Parpart⁵⁾などは全血球内容物が一度に遊離する形式をとるといつている。

血液を凍結融解したときに溶血がおこるが、この場合にも Saslow⁴⁾は所謂、all or noneの溶血過程をとるといい、Florio⁶⁾は部分溶血がみられるといつている。

また、血液を保存したときにおこる自然溶血では Maizels⁷⁾が部分溶血がみられるといつている。

このように溶血の過程について、いろいろと見解が異なつているが、われわれも保存血液に関する実験を行うに当り、この点を明らかにしたいと考えて、次のような検討を行つた。

II. 溶血時の遊離ヘモグロビン量と消失血球数との関係について

A. 実験方法

血液はいろいろの原因によつて溶血をおこすものであるが、そのうちで低張食塩水への浮遊、長期保存、凍結融解による溶血の問題をとりあげることとし、これらの溶血に際し溶血度のいろいろな段階で血球数の消失割合とそのときの血漿中に遊離したヘモグロビン量の割合を同時に測定した。

1. 実験材料

家兎の心臓穿刺によつて採血したが、このときに予め注射筒に ACD 液を入れておき、血液との割合が4:1になるように混和した。ACD液は、クエン酸ソーダ4.0 gr., クエン酸0.48 gr., グルコース3.0 gr. に蒸留水を加えて総量を100 mlとしたものである。

* 北海道大学低温科学研究所業績 第514号

2. 溶血のさせ方

1) 保存による自然溶血

血液を 2.5 ml ずつ、5~6 本の均一な試験管に無菌的に分注し 37°C (或いは 5°C) の恒温箱に静置保存した。保存の経過に従って徐々に溶血が進むので、37°C のものでは主として保存 5, 7, 10, 14 日目位のを相次いで取り出して実験を試みた。

2) 凍結融解によるもの

血液を 0.5 ml ずつ、5~6 本の均一な試験管に分注し、これを -5°C の恒温箱内に 20 分位放置すると血液は過冷却の状態になる。このものに氷の微細小片を投入すると、血液の過冷却状態が破れて凍結が始まるので直ちに -10°C の低温室に移した。凍結した血液は、徐々に温度がさがって遂には -10°C の環境温度と同じ温度になる。凡そ 40 分くらい放置した後にとり出して 37°C 温浴槽で融解させると殆んど完全溶血の状態となる。しかし血液がこの -10°C に達しない前に逐次取り出して融解させると、いろいろな溶血度のものが得られたので、この実験では血液を凍結させてから 20 分放置してからあと、3 分毎に 1 本ずつ低温室からとり出し 37°C の温浴槽で融解させた。

3) 低張食塩水で溶血させる方法

あらかじめ 0.85, 0.7, 0.6, 0.5, 0.4, 0% といろいろな濃度の NaCl 水溶液を 5.0 ml ずつ試験管に置いておく。血液を 0.05 ml ずつ、これら各種濃度の食塩水に混和し攪拌すると、100 倍稀釈血球浮遊液でいろいろな溶血度のものが得られる。

3. 消失血球数割合測定法

以上の方法で溶血させたいろいろな溶血度のものの赤血球数を算定し、対照の未処理の血液の血球数から差引いたものが、溶血によつて消失した血球数ということになるので、この百分率を求めれば溶血による消失血球数の割合がわかる訳である。

即ち、保存血液、凍結融解血液では、血球算定用メランジュールを用いて、自家血漿または Hayem 氏液で 100 倍稀釈して赤血球数を計算した。この場合新鮮血で溶血操作の加えないものの赤血球数が対照の血球となる。Hayem 氏液による稀釈では、保存血液の溶血度 40~50% 以上のもの、凍結融解させた血液ではその殆んどに血球の凝集現象がみられ、血球算定に不適當のように思われたが、自家血漿による稀釈では比較的凝集現象が少なかった。

血球の計算には、Thoma 氏計算板を用い、普通一般に行われているように 80 区割内血球を算定した。

なお、これらの処理血液では、正常血液に見られる輝度の大きい正常血球の外に輝度の小さい血球がそれぞれ多少みとめられた。本実験ではこのような血球を重要視したのであるが、鏡検に熟練すると、正常血球とはかなりはつきり区別できるようになった。

4. 遊離ヘモグロビン量の測定法

全血液の全ヘモグロビン量に対する血漿又は食塩水に遊離されたヘモグロビン量の比をもつて遊離ヘモグロビン量の割合とした。

即ち、さきに述べた方法で溶血操作を加えたものをそのまま遠心操作 (2,000 r. p. m., 20 分) して上清を分離し、この上清を N/10 HCl で適宜稀釈して塩酸ヘマチンに変え、Colour development⁹⁾ を行つてから Beckman type の分光光度計で 372.5 m μ の波長で吸光度を測定したものの値を遊離ヘモグロビン量とした。

対照としての全ヘモグロビン値を求めるには、採血直後の全血液 2.5 ml を -10°C に 60 分間おき完全に凍結させてから 37°C の温浴槽で融解させたもので完全溶血の状態にあると考えられる。このものを遠心操作 (2,000 r. p. m., 20 分) して得られた上清の 0.02 ml を N/10 HCl 10 ml に加えてよく混和し、その吸光度の測定値をもつて全ヘモグロビン量とみなした。

ただし低張性溶血のものでは、血液を 100 倍量の蒸溜水に加えて完全溶血させたものを対照とした。

以上のようにして測定した値から、遊離ヘモグロビン量の百分率は次のようにしてもとめた。

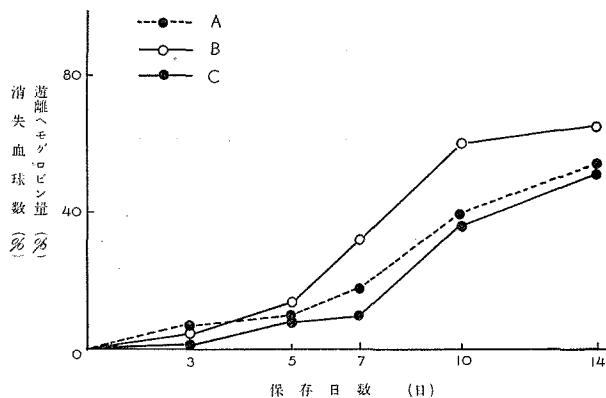
$$\frac{\text{上清のヘモグロビンの吸光度値}}{\text{全ヘモグロビンの吸光度値}} \times \frac{\text{上清を稀釈した HCl 量 (ml)}}{10}$$

但し、低張食塩水の場合は完全溶血させたものも、多少の溶血させたものも一様に N/10 HCl で等倍に稀釈したので、上式中、右方の分数の値は 1 に相当する。

B. 実験成績

1. 血液の保存による溶血の場合

血液を保存すると、その経過に伴ない溶血の進むのが認められたが、この保存経過に従つて適宜取り出した保存血液の血球数の減少と遊離ヘモグロビン量の増加を測定した結果の代表的な 1 例を第 1 図で示した。以下数値はいずれも百分率で表わしたものである。また多数例の



第 1 図 保存経過と消失血球数ならびに遊離ヘモグロビン量との関係

- A 遊離ヘモグロビン量
- B 正常赤血球のものだけを数えた時の消失血球数 (%)
- C 正常赤血球+輝度の少いものを数えた時の消失血球数 (%)

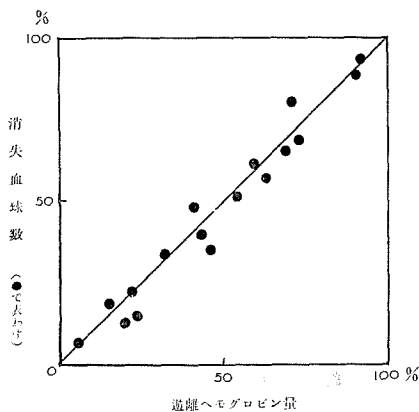
結果から、とくにこの両者の相互関係を示したのが第2図である。

即ち、保存血液では、正常と思われる血球だけを数えることにすると、遊離ヘモグロビン量の割合に消失血球数が多いことになり、しかもこのような差は溶血が進むにつれて大きくなる。しかし余り保存期間が長くなると血球の凝集が強くなつて、血球の算定は困難であつた。

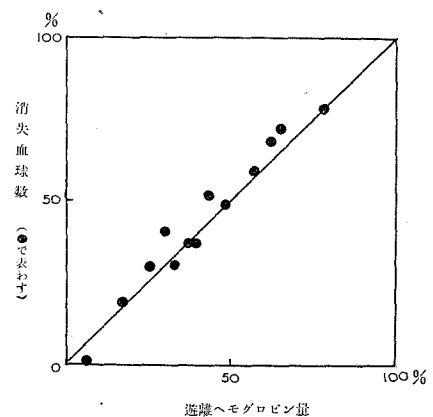
なお、この保存血液では、図版Iで見られるような、形態は正常と同様だが輝度の小さい血球が多く認められ、ことに保存経過に伴なつて溶血が進む程、それらの数が増すようにみられた。もしこれらの輝度の小さい血球をも併せ含めて血球数を算定するとすれば、第2図に示すように消失血球数は遊離ヘモグロビン量の割合より僅かながら少ないような結果となつた。即ち、この輝度の小さい血球も正常血球と同じにみなして数えるとすれば、遊離ヘモグロビンは割合に多いことになり、数えないとすれば少なすぎることになる。

2. 凍結融解による溶血の場合

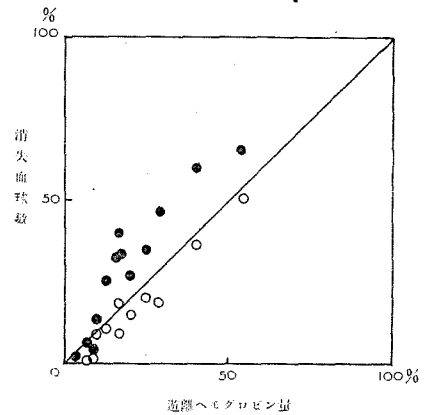
凍結融解によつて消失する血球数の割合と血漿に遊離するヘモグロビン量の割合との相互関係は第3図に示した。それによると両者の関係は溶血の強さに関せず大体一致したが、この場合にも消失血球数の割合にして遊離ヘモグロビン量がやや少ない傾向を示していた。



第3図 凍結融解血液における消失血球数と遊離ヘモグロビン量との相関関係



第4図 滲透圧溶血における消失血球数と遊離ヘモグロビン量との相関関係



第2図 保存血液に於ける消失血球数と遊離ヘモグロビン量との相関関係

- 正常血球のみを数えたときの消失血球数(%)
- 正常血球+輝度の小さい血球を数えたときの消失血球数(%)

なお、この場合も輝度の小さい血球は、各例にみられたが、保存血溶血の場合に比較してかなり少なく1~5% くらいのものであつた。

3. 低張性溶血の場合

各種低張食塩水に浮遊させた時にみられる溶血では第4図に示すように血球の消失率とヘモグロビンの増加率とは殆んど一致した。なお、前述の1, および2の実験で問題となつた輝度の少ない血球は、生理的食塩水浮遊液の場合は殆んど認められないが、溶血をおこす程度の低張な食塩水に浮遊させたときには現われるようになるが、その出現率は極めて小さく0.5~1% 位であつた。

III. 所謂、低輝度の血球について

これまでの実験によつて、不完全溶血をおこした血液中には正常血球に比べて輝度の小さい血球が現われること、ことに凍結融解による溶血や低張性溶血では極めて僅かであるが、保存血液の自然溶血ではかなり多数出現することがわかつたので、血球計算にあつてこのものを算入するかしないかによつて実験成績に大きな影響があるわけである。

しかしこの輝度の小さい血球は、新鮮な血液で溶血のみられないものでは全く見当たらないところから考えると、少なくとも正常な赤血球としてとり上げるのは不適當と思われる。

今、仮りに輝度の小さいということはヘモグロビン量の少ないことを意味するものと考え、これらの血球は他の正常血球より比重が小さい筈であるから、次のようにしてその点を検討してみた。

実験方法

実験材料は既に述べたものと同じでとくに37°Cに5日保存したものをを用いた。

保存血液を充分攪拌した後、多数の試験管にとり、それぞれ500, 1000, 2000 r. p. m. の3通りの速度で3, 5, 10分間遠心操作を行い、分離された上清を血球算定用メランジユールで取り、Hayem氏液で100倍稀釈して鏡検した。

実験結果

第1表に示した実験成績でわかるように、保存血液では、遠心回転の速度が速くなる程、

第1表 新鮮血液と保存血液の遠心操作による沈降血球差違

遠心操作時間(分)	新鮮血液			保存血液(37°C 5日)		
	3	5	10	3	5	10
500	—	卍	+	—	卍 ++	十 ##
1,000	+			十 ##	##	++
2,000					++	+

太字で示したものは輝度の強い正常な血球とみられるもの、細字は輝度の弱い血球の出現頻度をあらわす。

+……少数。++……多少。##……相当数。

また回転時間が長くなるにしたがい、上清に浮遊している血球数が減つていく。しかも輝度の小さいものは大きいものよりその減り方がおそく、遠心では沈澱し難いことがわかつた。

新鮮血液で同じように試みた実験では、もちろん輝度の小さい血球は全く認められず、正常血球は、保存血での輝度の大きい球化型と大体同じような減り方を示した。

このような実験結果から、これら輝度の小さいものは輝度の大きいものより比重の小さいことが確認された。

IV. 考 察

従来、赤血球が種々の条件によつて溶血する場合、個々の血球が完全溶血するか、不完全(部分)溶血するかは議論のあるところで、既に緒言においても述べたように、まだ確定されていない。

著者等はこの点を検討するために、種々の溶血条件の試料を、とくに血球数の算定と遊離ヘモグロビン量の測定という立場からしらべてみた。

ところが形態観察に当つて、溶血血液中には新鮮正常血液ではみられないような輝度の小さい血球の出現することがわかり、しかも一方遊離ヘモグロビン量から考えても、この種の血球をすべて完全溶血とみなすとすれば、ヘモグロビン量が少なすぎるし、正常血球と同様にみなすと、ヘモグロビン量は多過ぎるとという結果になり、このものとり扱い方が問題になつてきたのである。

そこで分劃遠心法を利用して、いろいろ検討してみると正常血球よりも比重の小さいことがわかつたので、結局このような輝度の小さい血球とは、ヘモグロビンの一部脱出した所謂不完全(部分)溶血血球であろうと推察された。

このように考えれば、消失血球数と遊離ヘモグロビン量との不釣合も合理的に説明されるわけである。

なお、従来血球計算に当つては測定誤差がかなりあるといわれているので^{10,11)}、もしそうとすれば、今回の実験での血球数とヘモグロビン量の相関関係でのそれは、すべて意味がないことになるが、著者等の行つた範囲内では、この測定誤差と思われるものは極めて小さく2~3%に止まつていたので、前掲のデータによる論議は充分意義があるものと考えている。

V. 結 論

赤血球が溶血するとき、完全溶血であるか不完全溶血であるかを検討するため、保存血液の自然溶血、凍結融解溶血、滲透圧的溶血について血球数と遊離ヘモグロビン量とをしらべた結果、

- 1) 光学顕微鏡的に正常血球よりも輝度の小さい血球が多かれ少なかれみられること。
- 2) このような血球は正常血球よりも比重が小さいこと。
- 3) 正常血球と同一ヘモグロビン量を有するとすれば、遊離ヘモグロビン量と一致しない

ことなどの事実から、不完全溶血血球ができるものと推定された。

なお、このような不完全溶血血球の出現の頻度は溶血の条件により、また溶血の程度によつて異なるようである。

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あげます。

文 献

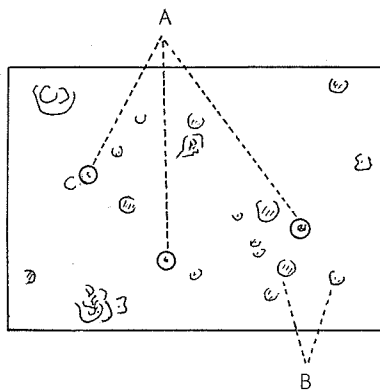
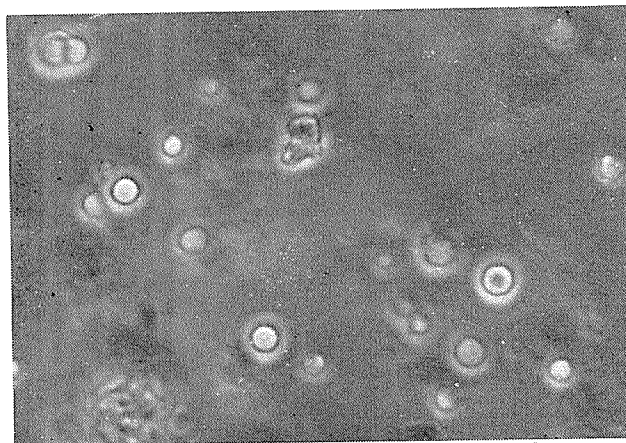
- 1) Baron, J. 1928 Über dem Mechanismus der hypotonischen Haemolyse. *Pflug. Arch Physiol.*, **220**, 243.
- 2) Wilbrandt, W. 1945 Folgt die Hämolyse dem Alles-oder-Nichts-Gesetz? *Experientia*, **1**, 91.
- 3) Lindeman, B. 1949 Alles-od.-Nichts-Gesetz od. partielle Hämolyse? *Arch. Exp. Path. Pharm.*, **206**, 615.
- 4) Saslow, G. 1938 On the supposed partial liberation of haemoglobin from the mammalian erythrocytes. *Quat. J. Exp. Physiol.*, **19**, 329.
- 5) Parpart, A. K. 1931 Is osmotic hemolysis an all or none phenomenon? *Biol. Bull.*, **61**, 500.
- 6) Florio, L., M. Stewart & E. R. Mudge 1943 The effect of freezing on erythrocytes. *J. Lab. Clin. Med.*, **28**, 1486.
- 7) Maizels, M. & N. Whittaker 1940 Effect of storage on human erythrocytes. *Lancet*, **238**, 113.
- 8) 河内虎男 1954 血色素の測定について. 血液討議会報告, **6** 輯, 336.
- 9) Khalifa, A. A. & M. K. Salah 1951 Spectrophotometric determination of haemoglobin in blood. *Nature*, **168**, 915.
- 10) 小泉 明 1954 血球計算の精度について. 日新医学, **41**, 346.
- 11) 羽田幸典 1953 血球計算の誤差に関する研究. 日本血液学誌, **16**, 390.

Résumé

Investigations on spontaneous hemolysis in stored blood and hemolysis by freeze-thawing or osmosis were carried out to examine whether complete or partial hemolysis occurred in those cases.

Results obtained were as follows:

- 1) In the samples used a few cells showed optically less brightness than original cells.
- 2) Specific gravity of such cells was smaller than that of normal cells.
- 3) By clarifying the relationship between numbers of normal cells which could be microscopically determined and amount of hemoglobin liberated from cells into plasm, it was recognized that partial hemolyzed cells appeared in those cases of hemolysis.



図版 I 37°Cに10日保存した赤血球像

A. 正常血球 B. 輝度の小さい血球