



Title	血液の低温保存に関する研究 : 第2報 低温処理血液の酸素受容能について
Author(s)	浅沼, 英一; ASANUMA, Eiichi
Citation	低温科学. 生物篇, 17, 137-144
Issue Date	1959-10-24
Doc URL	<a href="https://hdl.handle.net/2115/17629">https://hdl.handle.net/2115/17629</a>
Type	departmental bulletin paper
File Information	17_p137-144.pdf



## 血液の低温保存に関する研究\*

### 第2報 低温処理血液の酸素受容能について

浅沼英一

(低温科学研究所 医学部門)

(昭和34年7月受理)

### I. 緒言

筆者はさきに<sup>1)</sup>ウサギ及びヒト血液を5°C及び-5°Cの過冷却状態で保存して、保存経過中におこる溶血度及びO<sub>2</sub>受容能の変化を追求し、更に血液を凍結融解し、遠沈上清のHb-ACD溶液のO<sub>2</sub>受容能を測定したところ、Hbは低温ではかなり安定なもので変化の少いことを知った。

今回の実験ではウサギ血液に溶血を阻止する働きのある種々の溶液を加えた場合、赤血球の受ける物理化学的变化をpH、Ht値及び溶血を測ることによつて検査した。さらにまた、各種溶液を加えた血液を各種低温で処理し、溶血率及びO<sub>2</sub>受容能を測ることによつて、低温の赤血球に及ぼす影響を吟味検討した。またACD溶液に遊離したHbを凍結乾燥し、O<sub>2</sub>受容能を測定することによつて、Hbの凍結乾燥によつて受ける影響を研究した。

### II. 実験方法

#### 1) 試験材料

ACD加ウサギ血液を使用した。採血方法は第1報<sup>1)</sup>の場合と同様である。

#### 2) 溶液

次の7種類の溶液を使用した。

- a) 0.85%食塩水にグリセリンを加えて30%溶液としたもの。
- b) 同様にして作製したエチレングライコールの30%溶液。
- c) 同じくエタノールの20%溶液。
- d) 同じくメタノールの20%溶液。
- e) 10%ブドウ糖溶液。
- f) 20%ブドウ糖溶液。
- g) 40%ブドウ糖溶液。

\* 北海道大学低温科学研究所業績 第520号

実験に際しては、血液 1.0 ml に之等の溶液を等量に加えたものを使用した。従つて之等溶液の最終濃度は夫々 a) 15%, b) 15%, c) 10%, d) 10%, e) 5%, f) 10%, g) 20% であつた。なおグリセリン溶液の場合は、血液と混合した後充分血球に浸透するように、約 1 時間室温に置いてから実験を行つた。

### 3) 実験温度

実験を行つた温度は、室温約 20°C, -10°C, -30°C, -79°C, -190°C であつた。-79°C までは固形炭酸とアルコールの混合液を用い、-190°C には液体窒素を用いた。そして試料を入れた試験管をこれらの寒剤の中に浸し、試料がそれらの温度まで冷却された時に試験管を取り出し、37°C の温水槽に入れて振盪しながら融解させ、固形物が最早や認められなくなつた時、之を取り出して所要の検査を行つた。

### 4) 乾燥ヘモグロビンの製法

血液を入れた試験管を固形炭酸とアルコールの混合液の中に浸して凍結させ、ついで 37°C の温水槽で融解し、3000 r.p.m., 15 分間遠沈して礎質を落して得られた Hb 溶液を 2.0 ml ずつアンプルに分注した。試料を入れたアンプルを -190°C の液体窒素の中に浸して予備凍結を行い、凍結するや直ちに多岐管式凍結乾燥機に連結し、真空乾燥を行つた。到達真空度はおよそ  $5 \times 10^{-3}$  mm Hg である。約 3 時間で試料は淡紅色の多くの亀裂を有する固体となつた。乾燥重量はもとの重量の約 16% であつた。実験に際しては乾燥機よりアンプルを取りはずすや直ちにもとの容量まで蒸溜水を入れて Hb を完全に溶解させ、暗紅色の溶液となつたものを測定した。

### 5) 検査法

#### a) pH

島津製硝子電極 pH メータを使用し、小型蓋付シャーレ (硬質) に取つた約 2.0 ml の試料について pH の測定を行つた。作成された試料を 10~15 分以内に測定を終えるようにし、此の場合は血液温度にたいするメータの補正を行つた。

#### b) ヘマトクリット (Ht) 値

被検血液を毛細管ピペットで Wintrobe のヘマトクリット管に 100 のところまでとり、2000 r.p.m., 15 分間遠沈して Ht 値を測定した。

#### c) O<sub>2</sub> 受容能の測定

由布式微量血液ガス分析器を用いた。その方法は第 1 報<sup>1)</sup>の場合と同様である。

#### d) 溶血率

島津の光電分光光度計を用い、Khalifa and Salah の方法に準拠した。その要領は第 1 報の場合と同様である。

## III. 実験成績

### 1) 各種溶液加血液の pH, Ht 値及び O<sub>2</sub> 受容能

第1表に示す如く、ACDのみの血液に比較して、各種溶液加血液ではpHはあまり大きな差はなく、やや減少の傾向を示したが、大体7.0附近であり、ブドウ糖だけ酸性に傾いた。

Ht値は30%グリセリン、30%エチレングライコール、20%エタノール、20%メタノール加血液では、すべて増大した。20%及び40%高張ブドウ糖加血液では、対照の16.2に比べて12.08、13.05とHt値が大部減少した。

O<sub>2</sub>受容能は、pHやHt値が溶液を加えた場合その溶液の種類によつてかなり変動するのに反し、いずれの溶液に於いても殆んど変化なく、その差は実験誤差の範囲内にとどまり、溶液による差は認められなかつた。

第1表 ウサギ血液に各種溶液を等量加えた場合のpH, Ht値及びO<sub>2</sub>受容能の変動

溶 液	未処置	0.85% NaCl	30%グリ セリン	30%エチ レングラ イコール	20%エタ ノール	20%メタ ノール	10% ブドウ糖	20% ブドウ糖	40% ブドウ糖
pH	7.28	7.34	7.10	7.03	7.06	7.03	6.70	6.72	6.60
Ht 値	32.5	16.2	19.3	19.9	19.1	20.05	14.2	12.08	13.05
O <sub>2</sub> 受容能 Vol%	10.58	10.94	11.01	10.48	10.50	10.48	10.80	11.00	10.76

## 2) 低温処理の各種溶液加血液に及ぼす影響

対照として血液に0.85%の食塩水を等量に加えて凍結せしめた場合は、いずれの温度でも融解後は高度の溶血を起した。

血液に20%エタノールを加えて、各種温度で凍結すると、-10°Cでは13.06%、-30°Cでは36.11%、-79°C、-190°Cでは100%の溶血を示し、温度の低い程溶血率は高かつた。またメタノール、30%エチレングライコールを加えた場合も略同じ傾向を示した。エチレングライコールは特に溶血率が低く、-79°Cでも22.57%であつた。しかし-190°Cでは殆んど溶血した。

次に30%グリセリンを加えた場合には、溶血阻止作用はいずれの温度に対しても、最もよい成績を示した。即ち-10°Cでは、0.97%、-190°Cで4.5%の溶血率であつた。

また10%、20%、40%ブドウ糖を加えた場合には、-10°Cでは40~50%、-30°Cでは50~60%位溶血を起した。特に20%、40%の高張ブドウ糖では-79°C、-190°Cでもかなり赤血球の残存が認められた。

次に凍結融解した血液のO<sub>2</sub>受容能を見るに、対照の室温の場合と各種温度で凍結融解した場合とでは殆んど差はなく、凍結処理によつては、O<sub>2</sub>受容能は短時間内では影響を受けないように思われた。要するにいろいろな溶血阻止物質を用い、いろいろの温度で凍結させて、いろいろの溶血度のものが得られても、すべてO<sub>2</sub>受容能は一様であつた(第2表参照)。

第2表 各種温度で凍結融解した血液の変化 (其の一)

溶 液 温 度 (°C)	0.85% 食塩水		30% グリセリン		30% エチレン グリコール		20% エタノール	
	溶血率	O <sub>2</sub> 受容能	溶血率	O <sub>2</sub> 受容能	溶血率	O <sub>2</sub> 受容能	溶血率	O <sub>2</sub> 受容能
室温	0.30	10.95	0.72	11.98	0.51	11.53	0.49	10.89
-10°C	70.6	10.94	0.97	11.98	2.7	11.53	13.06	10.89
-30°C	78.5	10.96	4.12	11.80	2.8	10.68	36.11	10.74
-79°C	100.0	10.96	5.92	11.85	22.57	10.89	100.0	10.41
-190°C	100.0	10.95	4.7	11.06	94.5	10.68	100.0	10.41

但し、O<sub>2</sub>受容能は Vol % を表わす。

第2表 各種温度で凍結融解した血液の変化 (其の二)

溶 液 温 度 (°C)	0.85% メタノール		10% ブドウ糖		20% ブドウ糖		40% ブドウ糖	
	溶血率	O <sub>2</sub> 受容能	溶血率	O <sub>2</sub> 受容能	溶血率	O <sub>2</sub> 受容能	溶血率	O <sub>2</sub> 受容能
室温	0.54	11.36	0.41	11.36	0.56	11.76	0.60	11.74
-10°C	3.1	11.36	45.8	11.37	40.8	11.24	52.2	11.73
-30°C	9.2	11.37	57.6	11.36	49.8	11.17	61.9	11.32
-79°C	95.7	11.52	63.4	11.36	25.8	11.22	49.1	11.45
-190°C	100.0	11.50	100.0	11.36	47.5	11.07	70.8	11.46

### 3) 乾燥ヘモグロビンの機能

前記実験方法の項で述べたようにして作った乾燥 Hb に水を加えてからその活性を測ると 7 例の実験では、平均 12.31 Vol % の O<sub>2</sub> 受容能の減少が認められた。この実験の結果から Hb の O<sub>2</sub> 受容能は凍結乾燥によつて若干減少するが、低温真空等の物理的条件に対してかなり安定なものであることがわかつた (第3表参照)。

第3表 ウサギ血液ヘモグロビン溶液を凍結乾燥した場合の O<sub>2</sub> 受容能 (Vol %) の変化

実験番号	未処置対照	凍結乾燥	減	低下率
No. 1	16.87	14.10	2.77	16.42
No. 2	20.09	17.60	2.49	12.39
No. 3	13.12	11.28	1.84	14.02
No. 4	17.81	15.74	2.06	11.62
No. 5	18.53	17.18	1.35	7.29
No. 6	19.50	17.37	2.13	10.92
No. 7	18.00	15.57	2.43	13.50
平均	17.70	15.55	2.15	12.15

ただし第1図に示すごとく、乾燥 Hb を室温、空气中に放置した場合には、比較的速かにその  $O_2$  結合力は減少した。即ち凍結乾燥直後 17.88 Vol % のものが、2 時間 15 分後 15.74 Vol %, 3 時間 45 分後 14.69 Vol %, 6 時間 30 分後 13.91 Vol % となつた。

#### IV. 考 察

ウサギ血液にいろいろな溶液を加えた場合に Ht 値は第1表の如く変化するが、それは溶液と赤血球との相互関係によつてきまる。赤血球膜<sup>2),3)</sup>はイオンに対して選択的に透過性を有し、また赤血球は周囲の滲透圧の変化によつてその容積を変える。従つて Ht 値が変化するのは、その溶液の tonicity, イオンの状態及び細胞の透過性に従つて或は膨潤し、或は縮小するためと思われる。

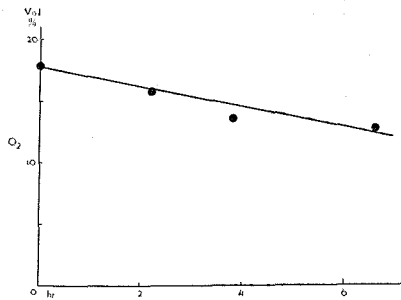
混合液の pH の変化は第1表に示す如くであるが、勿論加えた溶液の pH の相違による変動と思われる。

次に各種溶液加血液の  $O_2$  受容能についてみるに、Hb の  $O_2$  親和性は、水素イオン濃度、イオン強度、温度および活性 Hb の濃度に左右される<sup>4)</sup>ということが知られている。第1表に示すごとく、血液に各種溶液を加えた場合、pH の変動が見られるが、その範囲は 6.6 から 7.3 であり、この pH の間では  $O_2$  受容能の差は認められなかつた。また ACD 加血液そのままの  $O_2$  受容能を測つた場合と、等量の溶液を混ぜて測つた場合とを比較すると、混合液の方がすべて  $O_2$  受容能が大きい、これは Hb はその濃度が低い方が相対的に親和力大きいという性質によるためであろう。

さて、血液を氷点下に保存する研究に関しては、これまで Smith<sup>5)</sup>, Sloviter<sup>6),7),8)</sup> を始めとして、幾多の業績<sup>9)-17)</sup> が発表された。それはいずれも血液を低温におくことによつて、物質代謝をできるだけ小さくして細胞の変化を防ごうというのがねらいである。Chaplin ら<sup>11)</sup> は低温保存血の物質代謝は、 $-2^{\circ}C$  ではブドウ糖の消費が著しく減少し、 $-79^{\circ}C$  では殆んど停止すると云つてゐる。しかして血球は凍結すると溶血を起すので、この溶血を阻止するような medium につについて研究され、また凍結温度や、融解速度などについて至適条件を見出すために種々検討された。

medium としては、Lorant ら<sup>18)</sup>, Strumia ら<sup>14)</sup> は 21% エタノールについて、Smith 及び Polge<sup>19)</sup> はエチレングライコールについてその溶血阻止作用を報じている。

グリセリンについては、最も多く研究され、その有効濃度は 15~30% と報ぜられている<sup>5),12),20)</sup>。また、その保護作用の機序については、Smith<sup>21)</sup> 及び Lovelock<sup>20),22)</sup> は実験の結果より、グリセリンは塩の濃縮を減じ、間接に凍結による破壊作用を保護すると云つて、その緩衝作用を強調している。



第1図 凍結乾燥ヘモグロビンを室温中に放置した場合の  $O_2$  受容能の変化

ブドウ糖については、Woodcock ら<sup>23)</sup>、Florio ら<sup>24)</sup>の研究があり、高張で急速凍結した場合がよいと云っている。Woodcock は急速凍結は Vitrification を起し、高張ブドウ糖は相対的に含水量を減少し、氷結晶生成を阻止することによつて血液の低温保存を助けると云っている。また、Florio ら<sup>24)</sup>はヒト血液に 20% ブドウ糖を加えて  $-75^{\circ}\text{C}$  に凍結し、急速融解した結果  $\text{O}_2$  運搬能力は、凍結前と凍結後では変らなかつたと報じている。

筆者の実験及びこれまでの文献に徴するに、血液に各種溶液を加えて凍結融解した場合の溶血阻止効果は、主として溶液の濃度、凍結融解の温度ならびに速度等によつてきまり、また動物の種類によつても異なり、その因子は複雑なものがあると思われる。

このように、各種溶液加血液を低温処理した場合に、溶血の程度はそれに関与する条件によつて左右されるにも拘らず、 $\text{O}_2$  受容能の変らないのは、Hb は低温では安定であり<sup>1), 27)</sup>、容易に酸化されてメトヘモグロビンになることがないためであろう。

次に Hb 溶液を凍結乾燥した場合の Hb の活性については、Smith 及び Pennel<sup>25)</sup> は食塩水 Hb 溶液は、乾燥前 Met Hb が全量の 6.02% であつたものが、48 時間乾燥後には 58.2% 生成されたと報じている。これに対し Amberson<sup>26)</sup> は 2~5% のサッカロース或はグルコースを加えて、凍結乾燥し再溶解したら、80~90% の活性をもつた Hb を得たと報じている。筆者の場合は、ウサギの Hb-ACD 溶液を凍結乾燥したのであり、そのブドウ糖含有量は血糖量を加算して大体 0.9% であるが、約 3 時間の真空乾燥後  $\text{O}_2$  受容能を測つたところ、その不活性化は約 12% であり、略先人と同じ成績を得た。即ち Hb-ACD 溶液は、凍結乾燥しても、かなり活性は保持されているように思われる。

しかし、乾燥 Hb でも、これを大気中に放置すると急速に活性が減ずることは、第 1 図に示すとおりである。これは乾燥 Hb が容易に酸化されて Met Hb が生成されるためであろう。Farr ら<sup>27)</sup> は Hb 溶液を凍結乾燥したのも、真空では 1% 以内、空気に接した場合は 20~30% Met Hb に変つたと報じている。

## V. 要 約

ACD 加ウサギ血液に溶血阻止作用のあると云われる種々の溶液を加えて、各種の低温で凍結融解した場合の溶血と  $\text{O}_2$  受容能についてしらべた。さらに凍結乾燥 Hb 溶液の  $\text{O}_2$  受容能を測つた。その結果は次の如くであつた。

1) 各種溶液を加えた血液の pH は大体 7.0 附近であまり変化がなく、ブドウ糖を加えたもののみ酸性に傾いた。Ht 値はブドウ糖を加えた場合に減少し、他は増大した。 $\text{O}_2$  受容能は変化なく、溶液の種類によつて影響されることはなかつた。

2) 各種溶液加血液を  $-10^{\circ}\text{C}$ 、 $-30^{\circ}\text{C}$ 、 $-79^{\circ}\text{C}$ 、 $-190^{\circ}\text{C}$  で凍結させると、之らの低温処理によつて溶血の程度には種々の差はあつても、 $\text{O}_2$  受容能には殆んど変化が認められなかつた。

3) 凍結乾燥した Hb も乾燥後直ちに結合  $\text{O}_2$  量を測定したのでは、乾燥前の約 88% で、

かなり活性は保たれているが、室温大気中に保存すると急速に低下した。

## 文 献

- 1) 浅沼英一 1959 血液の低温保存に関する研究. I. 酸素受容能の変化に就いて. 日本輸血学会雑誌, **5**, (6), 316. 同上, 低温科学, 生物篇, **17**, 125.
- 2) Moskowitz, M. and M. Calvin 1951 On the components and structure of the human red cell membrane. *Exp. Cell Res.*, **3**, 33.
- 3) 丹野橋彦 1954 赤血球膜の物理化学的性質に就いて. 細胞科学シンポジウム, **3**, 93.
- 4) 上代皓三 1956 酸素供給の機序 生命現象の科学. 朝倉書店, 442.
- 5) Smith, A. U., M. B. Lond 1950 Prevention of haemolysis during freezing and thawing of red blood-cells. *Lancet*, **259**, 910.
- 6) Mollison, P. L. and H. A. Sloviter 1951 Successful transfusion of previously frozen human red cells. *Lancet*, **260**, 862.
- 7) Sloviter, H. A. 1951 In vivo survival of rabbits red cells recovered after freezing. *Lancet*, **260**, 1350.
- 8) Sloviter, H. A. 1951 Recovery of human red blood-cells after freezing. *Lancet*, **260**, 823.
- 9) Sloviter, H. A. 1952 Recovery of human red cells after prolonged storage at  $-79^{\circ}\text{C}$ . *Nature*, **169**, 1013.
- 10) Mollison, P. L., H. A. Sloviter, H. Chaplin 1952 Survival of transfused red cells previously stored for long periods in the frozen state. *Lancet*, **262**, 501.
- 11) Chaplin, H., J. H. Crawford, M. Cutbush, and P. L. Mollison 1954 Post-transfusion survival of red cells stored at  $-20^{\circ}\text{C}$ . *Lancet*, **266**, 852.
- 12) Chaplin, H., H. Crawford, M. Cutbush and P. L. Mollison 1956 Preservation of red cells at  $-19^{\circ}\text{C}$ . *Clin. Sci.*, **15** (2), 27.
- 13) Brown, I. W. and H. F. Hardin, 1953 Recovery and in vivo survival of human red cells. *Arch. Surg.*, **66**, 267.
- 14) Strumia, M. M. 1954 The preservation of blood for transfusion. *Blood*, **9**, 1105.
- 15) Strumia, M. M. 1949 Freezing of whole blood. *Science*, **110**, 398.
- 16) Strumia, M. M., L. S. Colwell, K. Ellenberger 1956 The preservation of blood, for the purpose of transfusion, II. The effect of the rate of cooling on the preservation of erythrocytes. *J. Lab. Clin. Med.*, **48**, 769.
- 17) Smith, A. U., J. E. Lovelock, P. B. Medawar, P. L. Mollison 1954 Discussion on the survival of tissues at low temperatures. *Proc. Roy. Soc. Med.*, **47**, 57.
- 18) Lorant, A., G. J. Lorant, A. Angrist and B. Korpman 1953 Storage of blood below  $0^{\circ}\text{C}$  in liquid state. *J. Clin. Invest.*, **32**, 1005.
- 19) Smith, A. U. and C. Polge 1950 Survival of spermatozoa at low temperature. *Nature*, **166**, 668.
- 20) Lovelock, J. E. 1953 The mechanism of protective action of glycerol against haemolysis by freezing. *Biochim. Biophys. Acta*, **11**, 28.
- 21) Smith, A. U., C. Polge, and J. Smiles 1951 Microscopic observation of living cells during freezing and thawing. *J. Roy. Micr. Soc.*, **71**, 186.
- 22) Lovelock, J. E. 1954 Physical instability and thermal shock in red cells. *Nature*, **173**, 657.
- 23) Woodcock, A. H., M. W. Thistle, W. H. Cook, N. E. Gibson 1941 The ability of sheep's erythrocytes to survive freezing. *Can. J. Research*, **19**, 206.
- 24) Florio, L., M. Stewart, E. R. Murgage 1943 The effect of freezing on erythrocytes. *J. Lab.*

- Clin. Med., **28**, 1486,
- 25) Smith, W. E. and R. B. Pennel 1952 Drying of hemoglobin. *Blood*, **7** (3), 368.
  - 26) Amberson, W. R., J. E. Jacobs, A. Hisey, M. J. Victor 1942 Hemoglobin-saline solution as transfusion media. Mudd and Thalhimer's Blood substitutes and transfusion, Springfield, Charles C. Thomas, p. 160.
  - 27) Farr, L. E., A. Hiller, and D. D. van Slyke 1947 Preparation of dried hemoglobin without loss of activity. *J. Exper. Med.*, **86**, 465.

### Résumé

Hematocrit value and pH value of ACD rabbit blood in the presence of various hemolysis-preventing substances and hemolysis and O<sub>2</sub>-carrying capacity of those samples frozen and thawed were estimated. The O<sub>2</sub>-carrying capacity of freeze-dried hemoglobin was also estimated.

The results were as follows:

- 1) No remarkable change of pH value was observed in any sample. Only pH value of the one to which glucose had been added was shifted to the acid side.
- 2) Hematocrit value of the sample with glucose added was decreased while values of the others were all increased.
- 3) After the process of freeze-thawing differences of grade of hemolysis were observed among the various samples in which different hemolysis-preventing substances were contained. However, O<sub>2</sub>-carrying capacity of the samples was scarcely affected and differences among the samples were not observed.
- 4) O<sub>2</sub>-carrying capacity of hemoglobin was fairly maintained even by freeze-drying but the capacity of the freeze-dried one decreased rapidly during a few hours storage in air at room temperature.