



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	血液の低温保存に関する研究 : 第3報 保存血液並びに低温処理血液のメトヘモグロビンについて
Author(s)	浅沼, 英一; ASANUMA, Eiichi
Citation	低温科学. 生物篇, 17, 145-157
Issue Date	1959-10-24
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/17630
Type	departmental bulletin paper
File Information	17_p145-157.pdf



血液の低温保存に関する研究*

第3報 保存血液並びに低温処理血液の メトヘモグロビンについて

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

これまで血液を長期保存するためにいろいろな試みがなされたが、血液はその保存中に形態的にも機能的にもいろいろな変化が起り、遂にはその生命力が消失する。しかして、その本質的な原因を Gabrio¹⁾ は血球の metabolic failure に帰している。この赤血球の代謝に関しては多くの学者によつて研究され、かなり明らかにされるに至つた²⁾。赤血球の最も大切な機能の一つは酸素の運搬である。従つて血球の O₂ 結合にあずかる機構が維持されるということが、血液の保存にあつての重要な条件である。

この点に関しては筆者が報告したように、0°C 附近の保存では、O₂ 運搬能力は保存中起る他の変化に比して、あまり障害されないが、これより高い温度即ち 20°C, 37°C の保存に於いては O₂ 受容能は速かに低下する。また血液を凍結融解したもの、或いは凍結融解によつて遊離した Hb 溶液を低温保存、又は凍結乾燥したものは O₂ 受容能が殆んど低下しないことを認めた^{3,4)}。

これらの事実はヘモグロビン (以下 Hb と略記) は低温では比較的安定であり、その O₂ 結合能を保持する機構が、かなりよく保たれているが、温度が高まるに従つて Hb 蛋白の変性が起るためその機能が低下するものと考えられる。衆知のごとく 1 分子の Hb は 4 個のヘムとグロビンからなり、正常では II 価鉄型で酸素と Hb との結合解離の反応は可逆的であるが、さらに酸化されると III 価鉄型のメトヘモグロビン (以下 Met Hb と略記) となり、これは最早や O₂ と結合しない。

赤血球または Hb 溶液を保存しておくと、時日の経つにつれて Hb は大気中の O₂ により自然に酸化されて Met Hb となり、またその他の Hb derivative が出来て、O₂ と結合する能力が漸次低下して行くと考えられる。この変化が低温では緩徐に、温度が高くなると迅速に起るものと思われる。これらのことを実験的に確かめるために、筆者はウサギ及びヒト ACD 加血液

* 北海道大学低温科学研究所業績 第 521 号。

を -5°C , $+5^{\circ}\text{C}$, $+10^{\circ}\text{C}$, $+20^{\circ}\text{C}$, $+37^{\circ}\text{C}$, 及び $+50^{\circ}\text{C}$ の各温度に保存し, 時間の経過に従って Met Hb 量を測定し, また同時にこの変化と関係があると思われる pH の変化を測定した。

その結果について以下に述べる。

II. 実験方法

1) 試験材料

ACD 加ウサギ血液及び血液銀行において採血したヒト血液を用いた。ウサギ血液を採血する場合は第 1 報³⁾ の場合と同様である。さらに血液を凍結融解して得た ACD 加 Hb 溶液を使用した。

2) 保存方法

採血した血液及び Hb 溶液は, 当日一部実験に使用し, 残りは 7.0 ml 容量の小試験管に 2.5 ml ずつ分注し, -5°C , $+5^{\circ}\text{C}$, $+10^{\circ}\text{C}$, $+20^{\circ}\text{C}$, $+37^{\circ}\text{C}$ の恒温槽に静置保存した。保存した血液は大体 3 日乃至 1~2 週間の間隔でとり出し, pH 及び Met Hb 量を測定した。なお, $+50^{\circ}\text{C}$ の場合は血液を分注した小試験管を $+50^{\circ}\text{C}$ の温水槽に浸し, 1 時間ごとにとり出して, Met Hb 量を測定した。

3) 乾燥ヘモグロビン

第 2 報⁴⁾ で述べた方法によりウサギ血液より凍結乾燥法により血漿 Hb の粉末を作製した。これを乾燥機につけたまま真空中で密封し, 一部は当日所要の検査を行い, 他は $+5^{\circ}\text{C}$ 及び室温に保存し, 適当な間隔でとり出し, 所要の検査を行つた。

4) 検査方法

a) pH

島津製硝子電極 pH メータを使用した。その要領は第 2 報の場合と同様である。

b) メトヘモグロビンの測定

島津の光電分光光度計を用い, Horecker and Brackett^{5,6)} の方法に従つて測定した。その方法は次の如くである。

試薬 イ) 0.2 N の NaOH に硼酸を加えて pH 9.4 の硼酸緩衝液を作る。

ロ) 0.3 g のサポニンを 0.2 N 硼酸緩衝液 10 ml に溶解して 100 ml に稀釈する。

この液は実験当日調製する。

実施 被検血液 1.0 ml をとり, 試薬ロ) で正確に 10 倍に稀釈する。1~2 分静止し溶血を完成させる。この溶液を 3,000 r.p.m. 10 分間遠沈して, 血球の礎質を除いた検液を観測槽中に移し, $800\text{ m}\mu$ の吸光度 D_1 を測定する。次に数 mg の結晶 KCN を加えてよく攪拌溶解させ, 同じ波長で D_2 を測定する。

次の式より Met Hb の濃度が M/L で得られる。

$$C^{Hb} = (D_1 - D_2) 16.9 \times 10^{-3}$$

これに 1.67 を乗ずると、g/dl 濃度で表示される。

c) 総ヘモグロビン量の測定

Kalifa and Salah の方法を用いた。全血液 0.02 ml を $\frac{N}{10}$ -HCl 10ml の中に加えてよく混和し、光電分光光度計を用いて 372.5 m μ の波長のところの吸光度 E を測定すると、求める Hb 量 x (g/dl) は次の式から得られる。

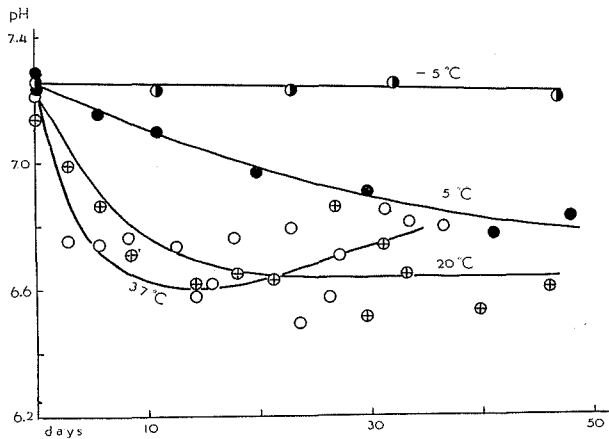
$$x = E_{372.5} \times \frac{10.02}{32.3 \times 0.02} = E_{372.5} \times 15.5 \quad \text{但し } 32.3 \text{ は Hb 量 } 1\% \text{ のときの吸光度である。}$$

III. 実験成績

実験 I. pH の変化

1) ヒト血液

ヒト血液を -5°C , $+5^{\circ}\text{C}$, $+10^{\circ}\text{C}$, $+20^{\circ}\text{C}$, $+37^{\circ}\text{C}$ に保存したときに起る pH の変化は第 1 図に示す如く、日数を経るに従つて pH は低下するが、温度が高くなるにつれてより早く pH は低下し、温度が低い程 pH の変化は小さい。即ち採血時 pH 7.28 のものが -5°C 保存で



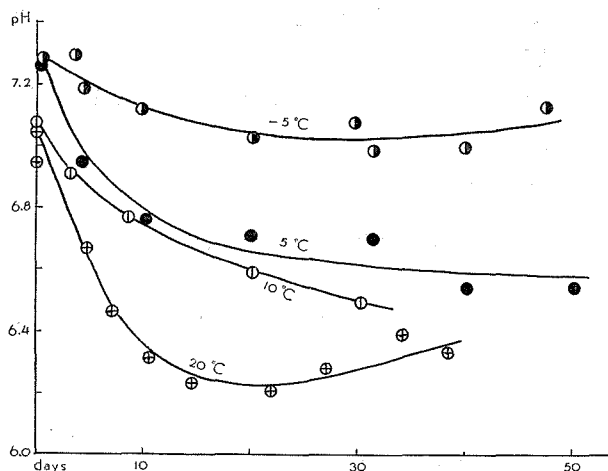
第 1 図 各種温度保存ヒト血液の pH の変化

は、10 日目 7.24, 32 日目 7.22, 47 日目 7.20 極めて僅かに変化するにすぎない。 $+5^{\circ}\text{C}$ では 10 日目 7.10, 30 日目 6.90, 40 日目 6.78 で pH は漸次低下を示した。

$+20^{\circ}\text{C}$ 及び $+37^{\circ}\text{C}$ ではより急速に pH は低下する。即ち $+20^{\circ}\text{C}$ では採血時 7.10, 3 日目 6.95, 6 日目 6.85, 12 日目 6.60, 15 日目 6.61 で 2 週目位で最低となり、それ以後は第 1 図に示す如く殆んど変らないか、或いは上昇する傾向にある。 $+37^{\circ}\text{C}$ では 3 日目 6.76, 6 日目 6.75, 14 日目 6.58 と 20°C に比し 1 週目迄はより急激に低下するが、その後の変化は 20°C と大差なく、保存 3 週以後は 37°C の方が 20°C のものよりも寧ろ pH が高くなる傾向が認められた。

2) ウサギ血液

ウサギ血液では採血時の pH は大体 6.9~7.3 であつたが、これを各種温度に保存した場合



第2図 各種温度保存ウサギ血液のpHの変化

のpHの変化は第2図に示すごとくである。

まず -5°C に保存した場合、あまり変化が見られず、採血時pH7.3のものが大体20日位で最低7.0に低下した。その後はあまり低下が見られず、100日目で7.08であつた。

$+5^{\circ}\text{C}$ 保存では、10~20日目で6.8、40~50日目で6.6位に低下し、それ以後は低下は見られなかつた。

$+10^{\circ}\text{C}$ に保存したのもも略同様の経過でpH降下の傾向を示したが、 $+5^{\circ}\text{C}$ 保存のものよりも少しく酸性に傾いた。

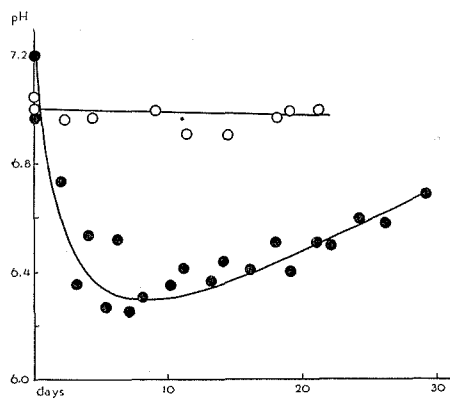
$+20^{\circ}\text{C}$ では保存3週目位迄pHは著しく隆下し、6日目6.42、10日目6.25、20日目6.00と最低を示し、それ以後は漸次上昇の傾向が認められた。

$+37^{\circ}\text{C}$ 保存のものは第3図に見る如く、特異なpHの推移を示した。即ち保存1週目位までpHは急激に下降し、採血時pH6.90のものが、3日目6.35、6日目6.25と下降したが、10日目6.35、16日目6.40、22日目6.50と漸次上昇し30日目には6.70となつた。

またウサギ血液の血漿を取り除いた0.85%食塩水の血球浮游液を 37°C に保存したものは第3図に見る如く、保存経過中pHの変化は認められなかつた。

3) ヘモグロビン溶液

ウサギ及びヒトのACD-Hb溶液を $+5^{\circ}\text{C}$ 、 $+37^{\circ}\text{C}$ に21日間保存した場合のpHの推移は第1表に示す如くである。



第3図 37°C 保存のウサギ血液のpHの変化

第1表 ACD 加保存 Hb 溶液の pH の変化

保存日数	ウサギ Hb		ヒト Hb	
	37°C	5°C	37°C	5°C
(当日)	7.23	7.23	7.15	7.15
2	7.30	7.32	7.30	7.35
4	7.30	7.32	7.45	7.33
7	7.30	7.28	7.43	7.30
11	7.26	7.22	7.45	7.30
14	7.30	7.25	7.43	7.29
18	7.31	7.27	7.48	7.38
21	7.30	7.24	7.45	7.36

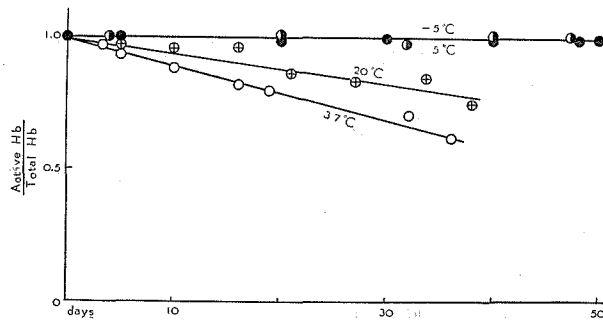
ウサギの Hb 溶液では +5°C, +37°C 保存ともあまり変動はなく, pH は 7.23~7.32 の間であつた。ヒトの Hb 溶液では pH はわずかに上昇の傾向を示し, しかも +5°C 保存のものが +37°C 保存よりも幾分 pH は低かつた。即ちウサギやヒトの保存血の pH の変化については, 全血を用いると, +5°C 保存で徐々に, +37°C 保存で急激にいずれも酸性に傾くのに反して, Hb 溶液では, pH の変化が比較的少く, 常にアルカリ性を呈していた。

実験 II. ACD 加血液及び Hb-ACD 溶液の保存による Hb 活性の変化

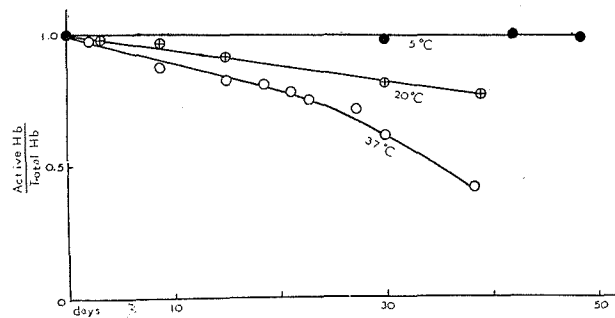
1) 血液の変化

ウサギ及びヒト血液を -5°C, +5°C, +20°C, +37°C に保存した場合, 日数の経過とともに Met Hb が生成され, Hb の活性が減少することは第4図, 第5図に示すとおりである。

ウサギ, ヒト血液ともに採血当日の Met Hb 量は 1% 以下であつた。これを -5°C, +5°C に 50 日間保存した場合, それ以上 Met Hb の生成は殆んど見だされなかつた。20°C, 37°C に保存した場合, ウサギ, ヒト血液ともに温度が高い程日数が経つに従つて漸次 Hb が Met Hb に転換した。6 週間の保存で, ウサギ血液は 20°C で 22%, 37°C では 38%, ヒト血液では 20°C では 24%, 37°C では 60% Met Hb が生成された。しかし 37°C の高温保存では, Met Hb の出



第4図 保存温度と ACD 加ウサギ血液の Hb-Activity 減少との関係



第5図 保存温度とACD加ヒト血液のHb-Activity減少との関係

来る割合はヒト血液よりウサギ血液の方がやや低かつた。

2) ヘモグロビン溶液の変化

ウサギ及びヒトのHbのACD溶液を+5°C, +20°C, +37°Cに保存した場合に起る活性の減少については、第6図、第7図に示すとおりである。

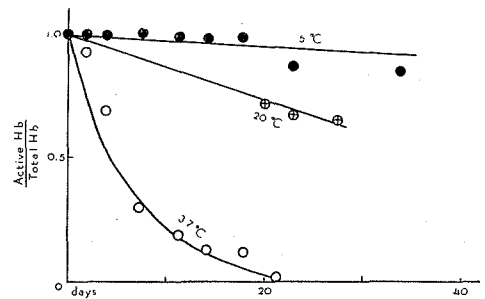
ウサギ及びヒトのHb溶液は、保存日数のたつにつれて、温度が高い程活性は減少した。しかも全血保存の場合に比して活性減少の速度はより急速であつた。

凍結融解によつて作られたHb溶液は作成当日はMet Hbが1%以下であつた。+5°Cに保存した場合、約5週間で、ウサギでは5%, ヒトでは15% Met Hbが見出された。即ち+5°C保存ではMet Hbの生成はあまり著しくはなかつた。

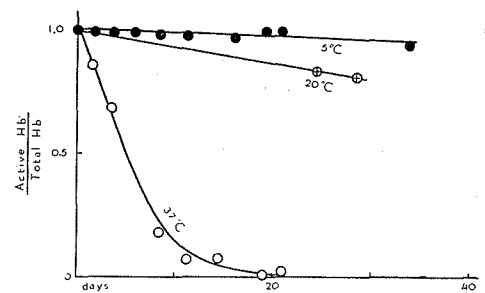
しかるに+20°C, 4週間保存でウサギでは18%, ヒトでは35% Met Hbが生成された。37°C保存ではウサギ、ヒトともに急速にMet Hbが生成され、1週目で70~80% Met Hbが生成され、3週目にはHbは全部Met Hbに変わり活性度は0となつた。

3) 50°Cにincubateしたウサギ血液の変化

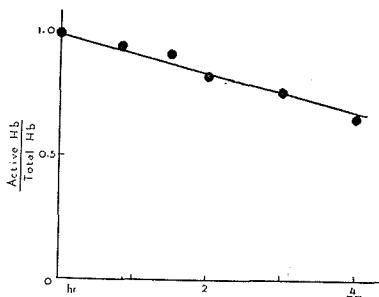
第8図に示すとおり、50°Cにウサギ血液をincubateすると、急速にHbの活性は減少した。即ち2時間目には18%, 3時間目には22%, 4時間目には36%, Met Hbが生成された。



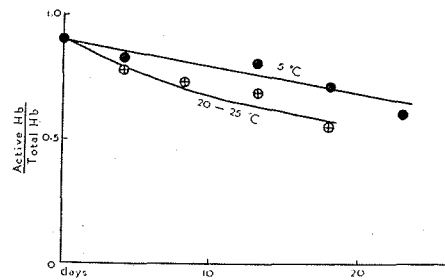
第6図 保存温度とACD加ヒトHb溶液のActivity減少との関係



第7図 保存温度とACD加ウサギHb溶液のActivity減少との関係



第8図 50°Cに incubate したウサギ血液の Hb-Activity の減少



第9図 ウサギ乾燥ヘモグロビンの保存による Activity の減少

実験 III. 乾燥ヘモグロビンの活性

乾燥直後の材料について Met Hb を測定したところ 8.8% であった。これをアンプルのまま +5°C 及び室温に保存した場合の活性の変化は第9図に示すとおりである。即ち +5°C, 室温ともに保存日数のたつに従つて幾分活性は減少するように思われた。活性の減少する割合は 5°C 保存の方が、室温保存のものよりも少なかった。

実験 IV. 各種溶液加血液を凍結融解した場合

ACD 液加ウサギ血液に溶血阻止作用のあると云われる物質、即ち 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% ブドウ糖を等量加えて Met Hb を測定し、さらに -79°C, -190°C で凍結融解して Met Hb を測定した。コントロールとして 0.85% 食塩水を等量加えて同様に処理して Met Hb を測定した。その結果はいずれも一様に Met Hb は生成されなかつた。

IV. 総括及び考察

血液保存経過中におこる pH の変化に関しては、既に森⁷⁾ がヒト及びウサギ血液で -5°C, +5°C の実験を行い、いずれも保存とともに次第に pH が低下し酸性側に傾くことを示しており、筆者の実験もこれと一致した。また各種保存温度についてなされた今迄の多くの研究^{8,9,10,11)} (主としてヒト血液について) も、保存とともにいずれも pH が低下する傾向を示している。

竹原¹²⁾ はウサギ血液の -5°C, +5°C に保存した後 37°C に incubate したものは、保存温度が低い程生ずる乳酸及び焦性ブドウ酸の量が少なく、焦性ブドウ酸と関係ある diphosphoglycerate の低下もまた小さいことを明らかにした。Pappius^{13,14)} もまたヒト血液について同様の成績を報告している。之らの事実から保存血では日数のたつにつれて解糖作用によつて乳酸及び焦性ブドウ酸が蓄積するために酸性に傾き、その結果として pH が漸次低下して行くのであると思われる。

つぎに 20°C, 37°C に保存した場合、ヒト及びウサギ血液ともに pH は急激に低下し、20°C では大体 15~20日, 37°C では 1週目に最低の値を示し、その後は殆んど変わらないか、或いは

上昇する傾向にあることは既に述べた通りであるが、このことは温度が上るに従つて解糖作用がより急速に進む為に pH は下がるが、遂にはブドウ糖を消費する能力もなくなり、乳酸の蓄積量がある限度に達すると pH の降下もそれ以上進まなくなると思われる。その後の経過に於いて pH が上昇する傾向にあるのは血液に何か別の化学的変化が起るためと考えねばならぬ。

Fairley⁹⁾ は Hb の自然変性として次の 3 つの段階があると述べている。

1) 酸化 Hb が還元 Hb となり、自然酸化によつて中性 Met Hb が出来る。この中性 Met Hb はアルカリ側に推移するためにアルカリ性 Met Hb になる傾向にある。

2) Met Hb がグロビンとヘマチンに分解する。

3) ヘマチンが血漿中のアルブミンと結合してメトヘムアルブミンを形成する。

そして尿酸加ヒト血液を 40°C に保存すると、5~6 日目にアルカリ性メトヘモグロビンが現われることを示している。しかして血球内では Hb はアルカリ性 Met Hb になる傾向はなく、一度溶血して血漿の中に拡散すると血球の外でアルカリ性 Met Hb とメトヘムアルブミンが出来る。また Hb だけではアルカリ性 Met Hb は出来ないと述べている。

筆者の実験で、37°C 保存血液で、保存 7 日後 pH が上昇するのは、溶血が進み血漿の中にアルカリ性 Met Hb の量が増すためと思われる。対照として血漿を除いた血球 +0.85% 食塩水を保存した場合には、第 3 図に見るとおり、pH はあまり変化がなかつた。以上の事実より血液を 37°C に保存した場合の pH の変化は、血球の物質代謝並びに Met Hb と血漿との interaction が関与しているものと考えられる。

一方 Hb を血球から遊離させて 37°C に保存した場合には、pH は保存期間中 7.25~7.48 の間にあり、全血に見られるような保存初期に於ける pH の急激な低下は認められない。これは血球が既に取り除かれている為に血球の代謝はなく、Hb 自身の変化と Hb と血漿蛋白との相互作用によつて pH がきめられるのであり、全血保存の場合とは異なる状態にあると考えられる。

Fairley は Hb+plasma を 40°C に incubate すると約 1 週間で pH 7.7 が 8.9 となり、20 時間でアルカリ性 Met Hb が見出されたと報じている。要するに、Hb-plasma 溶液を 37°C に保存した場合の pH が全血の変化と異なるのは、赤血球代謝による乳酸の蓄積がないことと、早期にアルカリ性 Met Hb が生ずるためであると思われる。

次に血液保存中に生成される Met Hb の変化について見るに、先ず緒言で触れたように、Hb は保存日数の経つにつれて自己酸化により Met Hb を形成し、そのために O₂ 受容能が低下する。この事は多くの学者¹⁴⁻¹⁹⁾ により認められている。しかしこの反応は生体内では reversible であつて特別な場合^{20,21)} を除いては、そう一方的に Met Hb 形成の方向に反応が進むわけではない。これは何か血液の中に Met Hb の形成を阻止するか、Met Hb を active の Hb に還元するものがあるためである。Brooks²²⁾ はブドウ糖の阻止作用を報じており、Drabkin²³⁾ は血球内で Met Hb が Hb に還元されると、ブドウ糖が減少することを示し、ブドウ糖が Met Hb の還元利用されていることを証明した。また Met Hb の還元因子としては酵素の作用が

知られており、この酵素に関しては Kiese¹⁷⁾, Gibson と Harrison²⁰⁾, Gibson²¹⁾, Gutmann²⁴⁾, Granick²⁵⁾, Denstedt²⁶⁾ 等多くの研究があり、これらの酵素作用により生体内では生産された Met Hb が再び active Hb に還元され Met Hb の量の増加を抑制していると考えられている。

さてウサギ及びヒト血液を -5°C , $+5^{\circ}\text{C}$ に保存した場合の Met Hb の生成は第 4 図, 第 5 図に示す如く極めて少なかった。この事はガス分析器で測定した O_2 受容能が、低温保存ではあまり障害されない事と一致している。しかしながら、 -5°C と $+5^{\circ}\text{C}$ との差はこの実験では見出されなかつた。また ACD ヒト血液とウサギ血液では、 $+5^{\circ}\text{C}$ 保存でヒト血液の方が Met Hb の生成が僅かに多かつた。

また実験 IV で述べた如く、ACD 加ウサギ血液にいろいろな溶液を加えて -79°C , -190°C の低温で処理しても、Met Hb が生成されなかつた。これは第 2 報⁴⁾ で報告したように、低温処理で O_2 受容能が低下しない事と一致している。

この様に低温で Met Hb が生成され難いのは、Hb の酸化による Hb \rightarrow Met Hb の反応が容易に進まないためと考えられる。また上に述べた如く血液中のブドウ糖も Met Hb 形成を阻止しているかもしれない。

さらに之等の血液を $+20^{\circ}\text{C}$, $+37^{\circ}\text{C}$, $+50^{\circ}\text{C}$ に保存した場合の Met Hb の変化は第 4 図, 第 5 図, 第 8 図に示す如く、温度が高い程 Met Hb 量が増加した。即ちヒト血液では 2 週目に Met Hb が 20°C 保存では 10%, 37°C 保存では 20% であつた。之れを第 1 報で報告した O_2 受容能の変化と比較すると、 20°C 保存では 12%, 37°C 保存では 35% O_2 受容能が低下した。両者の間に差があるが、これは Hb が変性すると Met Hb 以外の inactive の Hb-derivative を少し含んでいるためと思われる。要するに Hb \rightarrow Met Hb の変化は温度が高い程進行する。Hb の変性速度と温度との関係については Brooks⁸⁾ や Haurowitz²⁷⁾ の業績があり、いずれも温度が高くなるに従つて速度恒数は著しく増加することを明らかにした。

次にヒト血液とウサギ血液の Met Hb の差について見るに、各温度保存とも、ウサギ血液ではヒト血液よりも Met Hb 生成量は少なかった。これは加えられた ACD 液の組成がウサギとヒトでは異なり、ウサギの方が高いためかもしれない。またウサギとヒトの赤血球の滲透圧的抵抗性の差によっても考えられる。Jung²⁸⁾ は実験的研究の結果 Met Hb は赤血球の抵抗性を若干減少させるが根本的には互に関連をもっていないと述べている。しかし森⁷⁾ はウサギ血では -5°C で保存のものは抵抗性の増加する場合のあることを強調している。このことはウサギ血の Met Hb 形成がヒトより少なく、第 1 報で示した如く -5°C 保存のウサギ血では特に O_2 受容能が長期にわたつて低下しないこととも関連があるかもしれない。

凍結融解により遊離した血漿 Hb-ACD 溶液を $+5^{\circ}\text{C}$, $+20^{\circ}\text{C}$, $+37^{\circ}\text{C}$ に保存した場合の Met Hb の変化については第 6 図, 第 7 図に示すとおりである。即ち全血の場合と同様に Hb 溶液は高温では Met Hb 生成量が多い。しかも全血と比べてより急速に生成される。この事は Hb \rightarrow Met Hb の変化が高温では急速に進むとともに、還元酵素が赤血球外ではその活性を失う^{17,24)} ためと思われる。

次に Hb 溶液保存に関する研究としては、Eder²⁹⁾、Chase et al³⁰⁾、Pennel et al^{31,32)} Hamilton et al³³⁾、Fairley et al¹⁵⁾ 等がある。いずれもヒト血液より分離した Hb について研究を行っている。Eder²⁹⁾ は室温では 5 日で完全に Met Hb に転換したといい、Hamilton³³⁾ は 4°C では完全に安定であるが、20~25°C では Met Hb は相当に生成され、38°C では 2 週間で完全に Met Hb になつたと報じている。

先人の研究並びに筆者のさきの実験^{3,4)} 及び今回の実験の示すとおり、Hb 溶液は低温ではかなり安定であり、Met Hb の生成は殆んどなく、従つて O₂ 受容能は低下しないが、温度が高い程急速に Met Hb が生成され、O₂ 受容能が低下することが認められた。さらに Pennel^{31,32)} は Hb 溶液の保存に際して、Met Hb の生成を阻止し、安定に保つにはブドウ糖、ニコチン酸及び水酸化アンモニウムを加えると有効であると報じている。

本実験の乾燥 Hb についてみるに、乾燥直後 Met Hb は 8.8% であつた。これはガス分圧器で酸素受容能を測定した結果、活性が約 88% 保たれていたのと略近い数値を示している。

第 2 報で報告した如く、乾燥 Hb は大氣中に放置すると急速に O₂ 受容能が減少する。これは Met Hb が生成されるためと思われる。Farr³⁴⁾ は乾燥 Hb を真空のまま再溶解した場合、Met Hb は 6.4% であるが、空気にさらしたままで溶解すると、Hb の 20~30% が Met Hb になつたと報じている。第 9 図によれば、乾燥 Hb は真空のままアンプルに保存しても、活性が幾分減少するようである。このように、乾燥後真空保存したものは、酸素が存在しないに拘らず Met Hb が産生されること、しかも溶液のまま保存したものよりも変化しやすいということは、一般に活性物質は乾燥保存がよいということと反する事実であるが、その理由は明らかでない。Smith 及び Pennel³⁵⁾ はブドウ糖、ニコチン酸、アルミニウム等を加えて調製した乾燥 Hb は Met Hb が最初 6.14%、氷点下 2 年保存で 7.6%、室温で 2 ヶ月貯蔵後 11% であつたと報じている。

以上の実験結果より、Hb は全血、又は分離して溶液中に低温保存した場合は、活性を保つことが出来るが、乾燥した場合は、還元因子を加えない限り、活性を落さないで保存することはかなり難かしいものと思われる。

V. 結 言

ACD 加ウサギ及びヒト血液と凍結融解により分離した Hb-ACD 溶液を -5°C、5°C、20°C、37°C に 3~5 週間保存して pH 及び Met Hb を測定した。またウサギの乾燥 Hb を 5°C 及び 37°C に保存して Met Hb を測定した。其の結果は次のとおりである。

1) ウサギ、ヒト血液ともに保存日数がたつに従つて漸次 pH は低下するが、温度が低い程その変化は小さい。37°C 保存では 1~2 週目で pH は最低を示し、その後は漸次増大の傾向を示した。

血液の保存による Met Hb の生成は温度の高い程著しく、-5°C、+5°C 保存では殆んど Met Hb は生成されなかつた。

2) Hb-ACD 溶液を5°C, 37°C に3週間保存した場合, pHはウサギでは殆んど変化なく, ヒトでは少しく増大した。

保存 Hb 溶液の Met Hb 生成も, 全血の場合と略同様の傾向を示したが, その変化はより著しく, 37°C 保存では約3週間で活性は0となった。

3) ウサギの乾燥 Hb では乾燥直後で8.8%の Met Hb が見出された。真空中で保存しても活性は漸次減少の傾向を示した。

4) ウサギ血液に溶血阻止作用がある色々な物質を加えて, -79°C, -190°C の低温で凍結融解しても Met Hb は生成されなかつた。

以上3編の実験結果を総合すれば, ACD 加ヒト及びウサギ血液は-5°C, +5°C の低温に保存すると, 溶血及び pH の変化が比較的少なく, Met Hb は殆んど生成されず, 従つて O₂ 受容能が障害されないことがわかつた。

そして Hb そのものが低温では極めて安定であり, -190°C の低温でも変化しないが, 20°C, 37°C の高温では容易に酸化されて Met Hb となり O₂ 結合力を失うことが認められた。

稿を終るにあたり, 御指導と御校閲を賜つた恩師根井教授, 並びに林助教授に深謝すると共に, 終始絶大な御助力をいただいた浅田氏に御礼申し上げます。

文 献

- 1) Gabrio, B. W., M. D. Donohue, F. M. Huennkens and C. A. Finch 1956 Erythrocyte preservation VII. Acid-citrate-dextrose-inosine (ACDI), as a preservative for blood during storage at 4°C. *J. Clin. Invest.*, **35**, 657.
- 2) 中尾 真 1959 赤血球の代謝. *医学の歩み*, **28**, (5), 303.
- 3) 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.
- 4) 浅沼英一 同, II. 低温処理血液の酸素受容能に就いて. 未発表.
- 5) Horecker, B. L. 1943 The absorption spectra of hemoglobin and its derivatives in the visible and near infra-red regions. *J. Biol. Chem.*, **148**, 178.
- 6) Horecker, B. L. and F. S. Brackett 1944 A rapid spectrophotometer method for the determination of methemoglobin and carboxyhemoglobin in blood. *J. Biol. Chem.*, **152**, 669.
- 7) 森 玄治 1956 血液の低温保存に関する研究. *低温科学, 生物篇*, **14**, 47.
- 8) Loutit, J. F. 1945 Factors influencing the preservation of stored red cells. *J. Path. Bact.*, **57**, 325.
- 9) Rapoport, R. 1947 Dimensional, osmotic and chemical changes of erythrocytes in stored blood. I. Blood preservation in sodium citrate, and acid citrate-glucose mixture. *J. Clin. Invest.*, **26**, 591.
- 10) Strumia, M. M. and J. J. McGraw 1949 Factors that influence preservation of erythrocytes. *Blood and Plasma Transfusion*, p. 185.
- 11) 松尾正信 1953 血液保存の比較検討. *京都府立医大誌*, **54**, 437.
- 12) 竹原一郎 1956 氷点下におけるウサギ血液の解糖作用. *低温科学, 生物篇* **14**, 37.
- 13) Pappius, H. M., S. R. Andraea, V. R. Woodford, and O. F. Denstedt 1954 Studies of the preservation of blood. I, Glycolytic behavior of blood during storage at 5°C in a medium

- containing an excess of glucose. *Can. J. Biochem. Physiol.*, **32**, (3), 271.
- 14) Pappius, H. M. and O. F. Denstedt 1954 Studies on the preservation of blood. II. The glycolytic behavior of blood during storage. *Can. J. Biochem. Physiol.*, **32**, (3), 293.
 - 15) Fairley, N. H. 1940 The spontaneous disintegration of certain blood pigments, with special reference to methaemalbumin formation. *J. Exper. Pathol.*, **21**, 231.
 - 16) Neill, J. M. 1925 Studies on the oxidation-reduction of hemoglobin and methemoglobin. *J. Exper. Med.*, **51**, 561.
 - 17) Kiese, M. 1946 Erhaltung des Blutfarbstoffs in funktionfähigen Zustand. *Klin. Wschr.*, **28**, 81.
 - 18) Brooks, J. 1932 The oxidation of haemoglobin to methaemoglobin by oxygen. *Proc. Roy. Soc., B*, **109**, 35.
 - 19) Brooks, J. 1948 The oxidation of haemoglobin to methaemoglobin by oxygen. *J. Physiol.*, **107**, 332.
 - 20) Gibson, Q. H., D. C. Harrison 1947 Familiar idiopathic methaemoglobinemia, Five cases in one family. *Lancet*, **2**, 941.
 - 21) Gibson, Q. H. 1948 The reduction of methemoglobin in red blood cells and studies on the cause of idiopathic methaemoglobinaemia. *Biochem. J.*, **42**, 13.
 - 22) Brooks, M.M. 1934 Inhibition by glucose of methemoglobin formation. *Proc. Soc. Biol. & Med.*, **32**, 63.
 - 23) Drabkin, D. L. 1946 Maintenance of active hemoglobin. A function of erythrocytes. *Federation Proc.*, **5**, 132.
 - 24) Gutman, H. R. B. J. Jandorf, and O. Bodansky 1947 Role of pyridine nucleotides in reduction of methemoglobin. *J. Biol. Chem.*, **169**, 145.
 - 25) Granick, S. 1949 The chemistry and function of mammalian erythrocyte. *Blood*, **4**, (5), 404.
 - 26) Denstedt, O. F. 1953 The enzymology of the erythrocyte. *Blood Cell and Plasma Proteins*. Academic Press, (New York) p. 223.
 - 27) Haurowitz, F., R. L. Hardin, and M. Dicks 1954 Denaturation of hemoglobin by alkali. *J. Phys. Chem.*, **58** (27), 103.
 - 28) Jung, F. 1940 Methaemoglobinbildung und Blutkörperresistenz. *Klin. Wschr.*, **19**, 1016.
 - 29) Eder, H., C. Finch and R. W. McKee *J. Clin. Invest.* in press. (文献 25) による)
 - 30) Chase, A. M., P. B. Lorenz, A. K. Parpart, and J. R. Gregg 1943 A method for simultaneous determination of methemoglobin-oxyhemoglobin ratio and percent hemolysis in stored blood. *J. Lab. & Clin. Med.*, **28**, 99.
 - 31) Pennell, R. B., W. E. Smith, and W. C. Werkheiser 1947 Preparation of hemoglobin solution containing hemoglobin reducing enzymes. *Proc. Soc. Exp. Biol. & Med.*, **62**, 295.
 - 32) Pennel, R. B. and W. E. Smith 1949 Preparation of stabilized solution of hemoglobin. *Blood*, **4** (4), 380.
 - 33) Hamilton, P. B., L. E. Farr, A. Hiller and D. D. van Slyke 1947 Preparation of haemoglobin solution for intravenous infusion. *J. Exper. Med.*, **86**, 455.
 - 34) Farr, L. E., A. Hiller, and D. D. van Slyke 1947 Preparation of dried hemoglobin without loss of activity. *J. Exper. Med.*, **86**, 465.
 - 35) Smith, W. E. and R. B. Pennel 1952 Drying of hemoglobin. *Blood*, **7** (3), 368.

Résumé

In order to investigate the chemical changes of preserved blood, pH value and quantity of accumulated methemoglobin (Met-Hb) of human and rabbit whole blood samples and hemoglobin (Hb) solution were successively estimated at intervals of 4~7 days when they were stored at various temperatures such as -5° , 5° , 20° and 37°C . The quantity of Met-Hb in the freeze-dried Hb samples was also estimated when it had been stored for several weeks at 5°C and at room temperature.

1) PH of rabbit and human whole blood samples gradually decreased as the periods of storage were extended, and the lower the storage temperature, the smaller the rate of decrease was. In particular, the pH value of the one stored at 37°C rapidly decreased during the first and second week of storage and then ascended again. Met-Hb formation in the stored blood proceeded rapidly at 37°C but very slowly at -5°C or 5°C as the periods of storage were extended.

2) The pH value of Hb-solution stored for three weeks at 5° or 37°C was scarcely changed or was slightly increased. The change of Met-Hb quantity in Hb-solution showed the same tendency as that in the whole blood, but the former was more remarkable than the latter. O_2 -carrying capacity of Hb-solution stored at 37°C was found to have completely disappeared by the end of the third week.

3) In the sample of freeze-dried Hb of rabbit blood the quantity of Met-Hb was 8.8% immediately after the drying process was completed. Even when the material was stored in vacuum its O_2 -carrying capacity decreased gradually.

4) After freeze-thawing with dry ice or liquid nitrogen, Met-Hb was not found in the blood to which various hemolysis-preventing substances had been added.

From the results of the present experiments it was confirmed that the degree of hemolysis and the change of pH value of human and rabbit blood stored at -5°C or 5°C were relatively small also that Met-Hb was formed in small amount. In consequence O_2 -carrying capacity was slightly affected. On the contrary, in the early stage of storage at 20°C or 37°C hemolysis, pH variation and Met-Hb formation were found; O_2 -carrying capacity was remarkably affected.

Parallelism between the decrease of O_2 -carrying capacity and the increase of quantity of Met-Hb in samples were recognized throughout these experiments.