HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	赤血球の凍結乾燥の試み
Author(s)	根井, 外喜男; 千葉, 重雄; 藤田, 英夫
Citation	低温科學. 生物篇, 18, 71-75
Issue Date	1960-11-04
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/17641
Type	departmental bulletin paper
File Information	18_p71-75.pdf

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

Tokio NEI, Shigeo CHIBA and Hideo HUDITA 1960 Attempts to Freeze-Dry Erythrocytes. *Low Temperature Science, Ser.* ***B, 18,*** (With English résumé p. 75).

赤血球の凍結乾燥の試み*

根井外喜男　千葉重雄　藤田英夫

(低温科学研究所　医学部門)

(昭和 35 年 6 月受理)

I. 緒　　言

著者等はさきに赤血球の液状乾燥を試みたが[1]，再生後すべて溶血したので，失敗であることを知つた。そこで更に凍結乾燥をねらつて種々工夫をかさねてみた。

本実験は 1957 年の 11 月から 12 月にかけて行つたもので，もちろん血球の凍結乾燥については，その当時までに多くの実験がくりかえされていた筈であるが，まだ成功の報告を見るに至らなかつた。

赤血球を凍結融解すれば溶血してしまうことは，従来普通にみとめられていた事実であつた。しかし比較的最近になつて，種々の凍結及び融解の条件によつては赤血球は殆ど破壊されないことがわかつてきた。グリセリン添加とか或いは急速凍結によるものがそれである。

このうち，グリセリンを加えた血液は，乾燥の途中で融解するおそれが多いし，また脱水も困難と思われるので，我々はグリセリンを加えない試料で乾燥を試みたのである。それには Luyet[2] や Meryman[3] の提唱する超低温による急速凍結法が適当であろうと考えた。この場合，もし赤血球内部が硝子化 (vitrify) されて氷結晶が全くできないか，或は氷晶核はできていても結晶に成長するに至らないくらい微細ならば，予備凍結の段階では，まだ赤血球の破壊は考えられない。しかし乾燥の過程で，しかも水分のまだかなり残つている間に，試料の温度が上がればそこで凍結 (Recrystallization 又は Devitrification) の起こるおそれがある。従つて超低温から如何にして速かに水分を蒸発させるかということが問題であつて，本実験では主としてその点についての技術的な工夫を試みたものである。

II. 実験方法及び成績

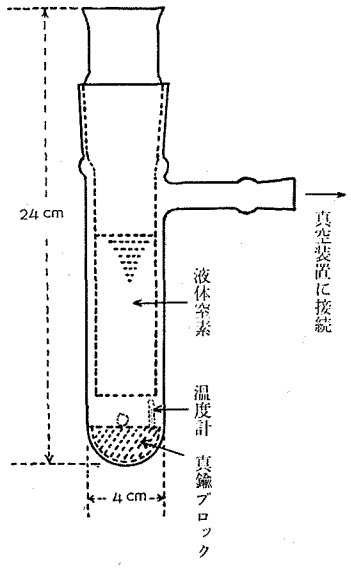
現在我々の実験室等で普通に使用されている多岐管式或いは箱式の凍結乾燥機の能力を以てしてはとうていこの超低温からの昇華は望めない。Devitrification 即ち再結晶化のおこる温度は，物質によつてかなり異り，血液では測られていないが，ブドウ糖加血液の超急速凍結したものが −60°C 以上の保存で凍害の現われるということからも，血液での Devitrification の温度はかなり低いと考えられる。従つてそれ以下の温度で試料から脱水するためには 10^{-5}〜

* 北海道大学低温科学研究所業績　第 555 号

10^{-6} の真空度を必要とする。またこれは油拡散ポンプによつて達せられたとしても，乾燥の効率を上げる条件，例えば試料とコールド・トラップとの距離とか真空路の直径とか，更にはコールド・トラップの温度とか，いろいろの点を考慮しなければならない。

そこで具体的な方法としては，試料を極めて微細な小滴とし，最初超低温で急速に凍結させてから温度を極めて徐々に上昇させ，昇華可能の温度に至れば殆ど瞬間に乾燥が終了するようにとのねらいで行つた。

装置は Glick and Malmstrom[4] に倣い，試料とコールド・トラップの距離の近いものをえらんだ，その略図は第1図に示す通りである。



第1図 乾燥装置略図

先ず容器の底を液体窒素中に浸して，中に納めた真鍮ブロックを予めできるだけ冷しておく。次にガラスで作つた通常の噴霧器を用い，試料の血液を中に吹き込むと，霧粒は容器中を落下して真鍮面に衝突し急速に凍結する。噴霧器と入れかえに図のような磨合せになつたコンデンサーを挿入し，液体窒素を満す。充分に冷えた頃，減圧を開始して真空にし，外から冷している魔法瓶の液体窒素を除けば，やがて次第に試料よりの乾燥が進行する。大体乾燥が終了したと思う頃に，装置よりとり外し，生理食塩水又は血清で復水させた上，溶血度をしらべた。但し，本実験では，少量の試料をとり扱い，しかも定量的に正確にもとの量まで復水させることが困難なので，ヘモグロビン量の測定は行わず，主として顕微鏡による赤血球数の測定並に形態の観察を行つた。

実験 1

血液は ACD を加えて採血したものを生理食塩水で3回洗い，血球濃度は全血の 1/2 くらいとした。これを噴霧によつて真鍮ブロック上に急速凍結させ，乾燥容器は特に冷却することをせず室温にさらしたまま乾燥を進めた。凡そ3時間半でブロックに附着していた霜が消失し始め，30分で完全に消失した。その後+40°C の温浴槽に浸して1時間加温し，乾燥終了とした。乾燥器からブロックをとり出し，生理食塩水で洗い落とそうとしたところ，食塩水がブロックに氷着する有様で，まず実験は失敗であつた。この実験の結果から，乾燥は終了しても，近接しているコールド・トラップから輻射冷却のために，ブロックは外より暖めてもなかなか温度は上らないことがわかつた。従つて乾燥の終了したと思われる時期に，コールド・トラップ中の液体窒素を出し，充分ブロックの温度の上昇したことを確かめてから，取出す必要があるものと感じた。

実験 2

血球濃度を全血の 1/4 にしたものを用い，前と同じ方法で噴霧凍結し室温で乾燥した。3

時間半ほどでブロックに附着していた霜が消え始め1時間で消失したので，コールド・トラップ中の液体窒素を取出したところ，ブロックに再び霜が附着し始めた。慌てて再び液体窒素を入れ，乾燥容器を40°Cの温浴槽に入れて3時間半，更に30°Cの浴槽で1時間半乾燥して後ブロックを取り出した。これでもなお極めて僅かに霜が附着した。再生にはシャーレに満たした生理食塩水を用い，その中に洗い落し遠沈して沈渣をしらべると，殆どクシャクシャに破壊された赤血球がみとめられた。

真鍮ブロックを室温まで温度を高める為にコールド・トラップ中の液体窒素を取除くと，霜が逆転して再びブロックに附着するから，ブロックが室温になるまではコールド・トラップ中の液体窒素を除くわけにはいかない。そうするとブロックはそのコールド・トラップによつて冷却され，外部からの熱供給は僅かの輻射のみに頼らねばならず，従つて極めて長時間を要することになる。この時間を短縮するために，外部からの熱伝導を促進するように，ブロックと乾燥容器内壁との間にグリースを塗つてその間隙を塞いでみた。しかしそうすると今度は乾燥過程でのブロックの温度上昇が速かになるので再結晶のおそれが出てくる。従つてこの場合には，乾燥は−70°Cくらいの恒温槽中で行われねばならないことになる。

実験 3

実験材料や凍結の方法はいずれも前実験と同様で，血球濃度は全血の1/5とした。予め乾燥容器の底にシリコン・グリースを多量に入れてブロック底に密着させておき，試料を噴霧凍結させた後，ドライ・アイスとアルコールで−70°Cに保つたジュワー瓶に浸したまま乾燥を進めると，3時間半くらいでブロック上の霜が消え始める。そのまま1時間乾燥を続行した後，40°Cの温浴槽にとりかえて1時間半加温すると乾燥器底に手を触れても冷たさを感じなくなる。そこでブロックをとり出し，のせガラス上に生理食塩水をとり，その上に乾燥した血球をパラパラと落して復水させた。

検鏡すると，前実験にみられたような始どクシャクシャに破壊されたような血球に混つて比較的破壊度の少いものがあり，又少数ではあるがやや円形に近いものも認められた。

実験 4

ACD加全血をそのままブロックに噴霧凍結し，前実験と同様にドライ・アイス・アルコールで冷却しながら乾燥を行つた。

血清で復水させた結果は，破壊度の大きい不整形の血球でしかも凝集したものが多い中に，稀にほぼ円形又は金平糖状のものがみとめられた。

実験 5

実験時間を短縮するために，真鍮ブロックを外部にむき出しにし，ガラスの乾燥容器とすり合せてグリースで密着するよう工夫してみたが，ブロックの冷却によりグリースは固化し，しかも真鍮とガラスとの膨張係数の相違のためか，ガラス容器は破壊してしまつたので，この試みは失敗に終つた。

III. 考　　察

血球の凍結乾燥を企てるに当つては，凍結乾燥，復水の各段階に亘つて，特に注意を要すると考えられる条件が幾つかある。本実験では，その中の最初の凍結に於ける条件として，急速凍結をとり上げ，特に Vitrification をねらつたものである。従つて引続いておこる乾燥過程での試料の温度及び乾燥速度とからみて当然 Devitrification という問題がおきてくる。Devitrification 即ち 温度上昇過程での結晶化を防止しながら，しかも乾燥を進行させるためには，極めて乾燥効率のよい装置を必要とし，本実験ではこの点での多少の吟味を行つたにすぎない。また 血液試料についての Devitrification の温度がはつきりしなければ 乾燥過程の保持温度もきまらないことになる。その上，冷却速度や乾燥速度をあげるため，試料は噴霧によつて微細粒子にしているので，全部集めても僅かな量であり，復水後の残存血球についての定量的な測定はできなかつた。またその血球の性状が正常のものと変わりがないかどうかの検討もできなかつた。

なお，血球のような凍結乾燥によつて壊れ易い性質の細胞では，復水の際の条件に特に慎重な考慮を要することは，他の実験の経験上からも考えられたところであるが，本実験では，前述のような過程に重点をおいたので，復水には生理食塩水と血清を用いたにすぎなかつた。最近 Meryman[5] が発表したところによれば，血球の乾燥度によつて復水のメジウムを加減する必要があり，残水量が 8% くらいまでのものなら生理食塩水でも回復しうるが，それ以上に脱水されたものでは，デキストランか PVP の溶液を用いないと再生できないという。われわれの実験で，極めて僅かながら溶血していない血球と思われるものがみとめられたのは，ちようどこの条件に適合したものであつたのかもしれない。

いずれにしても，血球の凍結乾燥は相当困難な方法であつて，充分の検討を要することが知られた。

IV. 結　　論

赤血球の凍結乾燥を試み，噴霧法による超急速凍結と低温での急速乾燥を行つた。それを生理食塩水又は血清で復水させると，大部分は溶血するが，中には僅かながら溶血しない血球もみとめられた。なお乾燥の装置並に操作について，2, 3 の検討を行つた。

文　　献

1) 根井外喜男，千葉重雄，藤田英夫 1960 赤血球の液状乾燥の試み．低温科学，生物篇，***18***，67–70.
2) Luyet, B. J. 1949 Ultra-rapid freezing as a possible method of blood preservation. The Preservation of the Formed Elements and of the Proteins of the Blood. Harvard Med. Sch.
3) Meryman, H. T. and Kafig, E. 1955 The freezing and thawing of whole blood. Naval Med. Res. Inst., Rept. Proj. NM 000 018, 01, 10.
4) Glick, D. and Malmstrom, B. G. 1952 Simple and efficient freezing-drying apparatus for the preparation of embedded tissue. Exp. Cell Res., ***3***, 125–135.
5) Meryman, H. T. 1960 Drying of living mammalian cells. Ann. New York Acad. Sci., ***85***, 729–734.

Résumé

When the ordinary method of freeze-drying is used on blood, red blood cells are completely hemolysed. In order to achieve success in drying erythrocytes from the frozen state, careful re-examination should be made at each stage of the whole procedure.

First of all the authors scrutinized on the cooling and drying rates and tried to cause vitrification and to avoid the recrystallization which may occur during the drying process.

The freeze-drying method for this study was as follows: the whole blood or red cell suspensions washed with physiological saline was extremely rapidly frozen by spraying onto metal block precooled down to −190°C; the material was dried keeping it at −70°C. A fairly long time was required to finish drying under such condition. Immediately after the drying the desiccated material was reconstituted by immersing them in physiological saline or serum.

As the results of such attempts, it was ascertained that almost all the erythrocytes in dried material were hemolysed with very few cells remaining unhemolysed. But there is no proof that they are intact and normal.