



Title	赤血球の凍結融解による溶血について : ウサギ血液の薄層標本を用いた実験
Author(s)	根井, 外喜男; NEI, Tokio; 花房, 尚史 他
Citation	低温科学. 生物篇, 22, 101-107
Issue Date	1964-10-20
Doc URL	<a href="https://hdl.handle.net/2115/17685">https://hdl.handle.net/2115/17685</a>
Type	departmental bulletin paper
File Information	22_p101-107.pdf



## 赤血球の凍結融解による溶血について\*

ウサギ血液の薄層標本を用いた実験

根井外喜男・花房尚史

(低温科学研究所 医学部門)

(昭和39年7月受理)

### I. 緒 言

血液の凍結実験は、これまでにたくさん行なわれている<sup>1)</sup>。このように試料として血液がよく用いられるのは、多くの動物性遊離細胞のうちで赤血球は、溶血という比較的容易でしかも定量性の高い判定基準で、細胞障害の程度をしらべることができる利点があることと、また、臨床上或は基礎的な研究の上でも血液の低温保存の要望が強いことなどによるものと思われる。

ところが、赤血球は一般に凍結に対して抵抗が弱く、抗凝固剤を加えただけの血液では、 $-10^{\circ}\text{C}$  以下の凍結で殆んど完全に溶血することが古くから知られていた。そこで溶血を防止するための保護物質の添加が工夫され、Glycerol がその目的にそうことが唱えられてからは、Glycerol 加血液の凍結保存法が広く用いられるようになった。最近ではまたこれに代るものとして Dimethyl sulfoxide の有効性がとり上げられている。

一方、凍結に弱い赤血球であっても、これを急速凍結し且つ急速融解すれば、溶血の非常に少ないことが知られており、Glycerol を加えない血液の凍結保存法として実際に利用されている。

血液ではこのように多くの凍結実験があるが、凍結乾燥の企てもまた少なくない。周知のように、微生物の生細胞保存法として極めて優れた成績をあげている凍結乾燥法も、それよりも分化した動物性のしかも哺乳類の細胞については、その多くの試みにも拘らず、まだ成功するに至らない。赤血球もまたその例に洩れず、特に医学的な立場での重要性から数多くの工夫が重ねられた筈であるが、Meryman の報文<sup>2)</sup> 以外には、まだ成功したという報告をきかない。著者の1人根井は曾つて Meryman から PVP ブドウ糖液の贈与をうけ、その追試を行なってみたほか、他の共同実験者とともに、多少の工夫を試みたが<sup>3)</sup>、すべて失敗に終わった。

我々は再びこの血球の凍結乾燥をもくろむに当り、まずその第一段階として、凍結乾燥の全過程に亘り、それらのうちのどの段階で細胞にどのような影響を及ぼすものであるかを、できるだけ仔細に検討したいと考えた。特に細胞の形態と機能を関連づけて考察するために、形

\* 北海道大学低温科学研究所業績 第685号  
本研究は文部省科学研究費(総合研究)によって行なわれた。

態的観察に便宜な薄層試料を用いることとした。しかも凍結乾燥では Glycerol を用いると乾燥を難しくするので、この種の添加物を含まないとすれば、当然凍結過程での急速冷却をねらうこととなり、それには少量の薄層試料をつかうことはむしろ好都合ともいえるわけである。

本実験では、別に述べるところ<sup>4)</sup>の凍結による細胞の形態的变化に対応して、同じ条件で溶血の程度をしらべるのを目的としているが、凍結状態のまま溶血度を測ることは不可能なので、やむを得ず融解の条件をなるべく同一にして融解後の溶血をしらべた。実際には、後述のようにカバーガラスとアルミ箔に挟んだ薄膜試料を用いたわけであるが、このような特殊条件での凍結実験の前例は殆んどないものと思われる。

ただ全血のままの急速凍結では、Luyet 等の報告<sup>5)</sup>に、毛細管中の少量の血液を各種温度のアルコール槽中に入れた後、一定温度で加温融解し溶血度を測ったものがある。それによれば、各凍結温度に相応して一定の溶血曲線を描くという。

本実験は前述のように、別報の形態的観察による所見と対比して、凍結による細胞障害の機構を考察するとともに、この段階までの過程で最も少ない溶血度を示す条件をみつけることを目的として行なわれたものである。

## II. 材料および方法

### 1. 材 料

磷酸カリ加ウサギ全血液を材料として用いた。その 0.02 ml を微量メスピペットでとり、厚さ 150  $\mu$ 、大きさ 35×25 mm のカバーガラス上にのせ、同じ大きさの厚さ 25  $\mu$  のアルミ箔で覆い密着させた。アルミ箔は予めできるだけ平らに伸ばしておき、それをのせた時、試料がなるべく均一な層になるようにするのであるが、多少厚みの違いのできることはさけられなかった。

単に凍結融解だけの実験ならば、2枚のカバーガラスを用いて、その間に試料をはさめば、厚みを均一にすることは出来るが、緒言でも述べたように、形態的観察をするためには乾燥をせねばならず、乾燥のために凍結した試料の2枚のガラスを剥がすことは難かしいので、一面をアルミ箔にしたのである。アルミ箔ならば、冷却速度はガラスよりも大きいし、しかも容易に引剥がすことができる上に、試料は殆ど全てガラス面に残るといふ都合のよい点がある。

### 2. 凍 結 方 法

魔法瓶中に iso-pentane を入れ、それを予め液体窒素で冷して -10, -20, -30, -40, -50, -80, -150°C の各種温度の浴槽を作っておく。また液体窒素だけのものも準備しておく。これらの浴槽に、前記の材料をそのまま投入すると、それぞれの温度に対応した冷却速度で凍結する。この試料の冷却速度を、ガラスとアルミ箔の間に挿入した熱電対と温度の自記記録装置から測定すると、-150°C での凍結速度は凡そ 300°C/sec であった。

このようにして凍結した試料を各温度に5分間おいた後、アルミ箔を剥がした上でガラスと一緒に、予め室温 (20°C) においた 5 ml の生理食塩水にすばやく移し、よく振りながら速かに融解させた。

### 3. 溶血度の測定

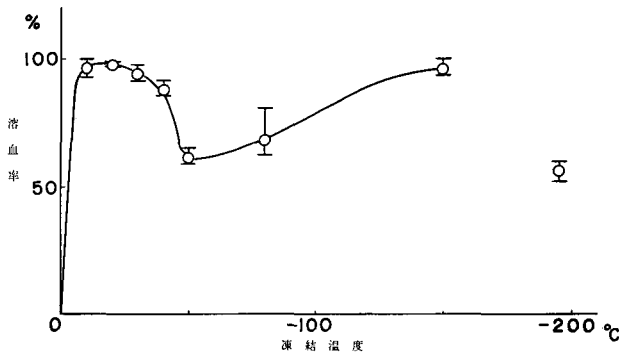
凍結融解試料を遠心沈澱して血球を除き、その上清に1% KCN 3滴を加え、生じたCyanmethemoglobinを光電分光光度計で540m $\mu$ の波長で比色定量した。対照として5m $\ell$ 蒸留水に全血液0.02m $\ell$ を加えたものを完全溶血として、その値に対するそれぞれの試料の比率をもって溶血率とした。

## III. 結 果

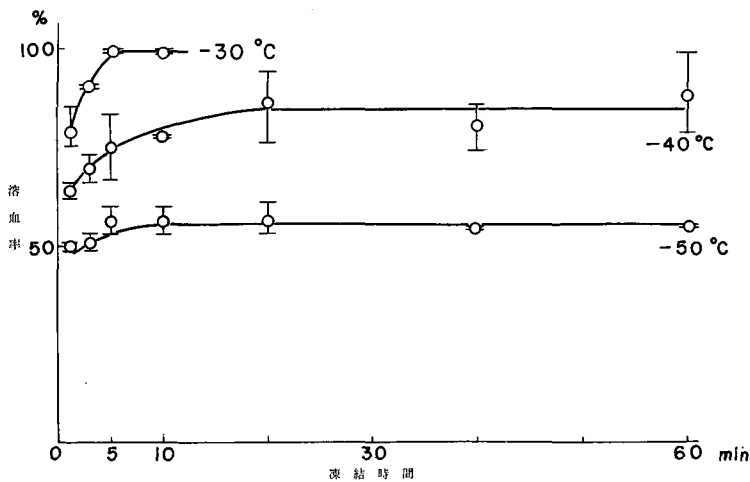
### 1. 凍結温度と溶血度

-10, -20, -30, -40, -50, -80 $^{\circ}$ C及び-150 $^{\circ}$ Cのiso-pentane浴槽並びに液体窒素中で凍結させた試料の溶血率をプロットすると、第1図のような溶血曲線を示す。

それによれば、-10, -20, -30 $^{\circ}$ Cあたりまではほぼ100%の溶血率を示すが、それより凍結温度が低くなるに従って溶血率がやや減少して-50 $^{\circ}$ Cでは凡そ60%くらいになった。更



第1図 凍結温度と溶血率との関係



第2図 凍結保持時間と溶血率の推移

に温度が低くなると、逆に溶血率は再び増して、 $-150^{\circ}\text{C}$ では100%に達した。液体窒素で凍結させたものは、ほぼ60%で、 $-50^{\circ}\text{C}$ 凍結のものに近い値を示した。

## 2. 凍結後の保持時間と溶血度

上記の結果は、各温度に3分間おいてから融解した試料について得られたものであるが、それぞれの温度での保存時間で溶血度に影響があるかどうかを検討してみた。その結果は第2図に示すように、いずれも5分くらいでほぼ最大値に達し、それ以後は殆んど変化がなかった。

## 3. 二次凍結

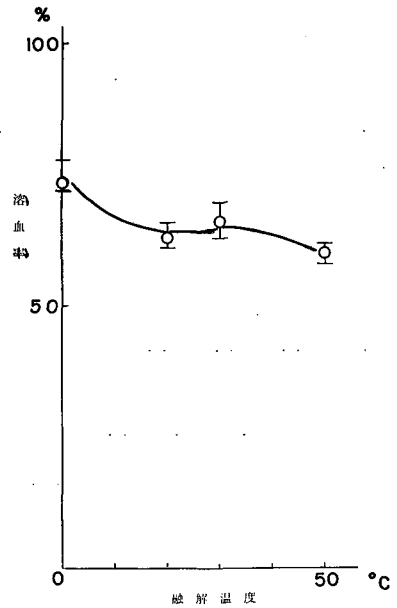
上記のようにして最初 $-50^{\circ}\text{C}$ まで凍結したものは、5分後にこれを $-150^{\circ}\text{C}$ に移しても、溶血度はもはや変わらなかった。即ち $-150^{\circ}\text{C}$ に直接投入したものは、ほぼ100%の溶血率を示したのに一旦 $-50^{\circ}\text{C}$ で凍結させた後 $-150^{\circ}\text{C}$ まで冷却したものは、最初の凡そ60%の溶血率そのままであった。

## 4. 融解温度と溶血度

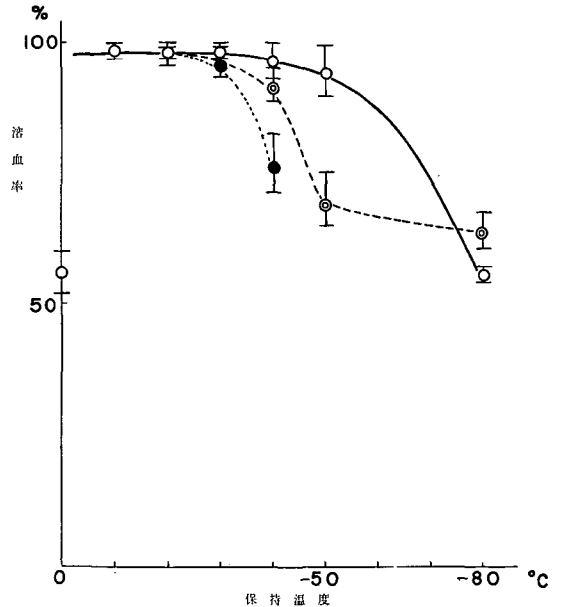
これまでの実験はすべて融解温度を $20^{\circ}\text{C}$ にしたものであるが、次に液体窒素中の直接投入で凍結させたものを、予め0, 20, 30,  $50^{\circ}\text{C}$ に保温した生理食塩水に戻して融解させた場合の溶血度をしらべた。その結果は、第3図に示すように、比較的僅かの差しかみとめられなかった。

## 5. 凍結状態で種々温度を加減した場合

凍結乾燥の場合の乾燥過程での保持温度を考慮して、一旦凍結したものを融解しない範囲で種々の温度まで上げ、その温度に保持することによって、溶血度



第3図 融解温度による溶血率の比較



第4図 凍結状態で種々の温度に保持した場合の溶血度の変化

- $-50^{\circ}\text{C}$ で凍結したもの。
- ◎---  $-50^{\circ}\text{C}$ で凍結した後 $-196^{\circ}\text{C}$ まで二次凍結したもの。
- 液体窒素で凍結したもの。

にどのような影響を及ぼすかをしらべてみた。即ち、 $-50^{\circ}\text{C}$  で凍結したものを、 $-50^{\circ}\text{C}$  凍結後液体窒素に移して  $-196^{\circ}\text{C}$  まで二次冷却したもの、及び液体窒素に直接投入して  $-196^{\circ}\text{C}$  まで凍結したものの3種の試料を、それぞれ  $-80$ 、 $-50$ 、 $-40$ 、 $-30$ 、 $-20$ 、 $-10^{\circ}\text{C}$  の各温度の *isopentane* の浴槽に移し、いずれも5分間おいた後、 $20^{\circ}\text{C}$  の生理食塩水中で融解した結果は、第4図に示す通りであった。

即ち、3種の試料のいずれに於ても、加温温度が高くなるほど、溶血度が増し、 $-30^{\circ}\text{C}$  以上では殆んどすべて100%の溶血を示した。ただ、これら3種の試料は、直接  $20^{\circ}\text{C}$  で融解した場合は、ほぼ60%の同じくらいの溶血率であるのに反し、加温温度による溶血曲線はそれぞれ多少異なり、例えば、液体窒素直接凍結のものは、 $-50^{\circ}\text{C}$  までの加温で既に100%に近く、他の条件のものよりはるかに溶血率が高かった。

#### IV. 考 察

緒言でも述べたように、本実験は、今日なお成功をみるに至らない血球の凍結乾燥において、細胞の障害が凍結乾燥のどの過程でどのような形で現われるものであるかを検討することを目的としたもので、一方には同一条件の試料について形態的観察ができるよう特殊な方法のもとで実験が行なわれた。しかし、このような形態と機能とを直接結びつけてしらべることは必ずしも容易ではなく、特に凍結とか乾燥の実験では、凍結状態或は乾燥状態のまま機能測定することは困難で、今のところ融解とか復水とかの過程を経たものについてでなければ、しらべることができない。本実験に於ても、同様の問題が残されており、まず第一段階の凍結による血球の障害の状況を知るために、一方には融解した試料について溶血度を測り、他方乾燥した試料で形態をしらべ、両者の結果を総合して凍結状態での細胞の障害の状況を推定するという方法によらねばならなかった。

この実験で特別な方法が用いられた理由はここにあるが、多くの血球の凍結実験の報告例のうち、本実験のように比較的少量の材料を直接各温度の冷却槽に入れて凍結させ、温度による溶血度の差異を検討したものに、Luyet 等の報告<sup>5)</sup>がある。その結果は、ほぼ我々のそれと同じ傾向の溶血曲線を描いている。

さて、本実験と平行して行なった形態的観察の所見を総合すると次のようにいえる。 $-30^{\circ}\text{C}$  凍結のものは、無処理の対照に比較すると多形態で収縮像が多いが、細胞内は均一である。 $-150^{\circ}\text{C}$  凍結のものでは、細胞内の氷晶の抜け孔と思われるものが多く、 $-50^{\circ}\text{C}$  で凍結のものではその中間の両者の混合した状態がみられる。また液体窒素凍結のものはやや複雑であるが、かなり  $-50^{\circ}\text{C}$  凍結のものに似た所見である。これらの形態的観察は、その定量性を増すために更に詳細に検討中であるが、これまでに得られた以上の大体の傾向を、本実験による溶血曲線にあてはめて、凍結による溶血の機構を推論するならば、次のように云えるであろう。

先ず  $-30^{\circ}\text{C}$  までの100%に近い溶血は、比較的ゆっくりした冷却による細胞外凍結で、Lovelock の唱えるような濃縮塩溶液による障害をきたしたものと考えられるであろうし、 $-150^{\circ}\text{C}$  での100%溶血は、急速冷却の結果の細胞内凍結が主因をなすものと思われる。その

中間の $-50^{\circ}\text{C}$ 凍結では、かなり溶血度が低く、しかも細胞内凍結と細胞外凍結(収縮細胞)の混在した所見であることから、細胞内氷晶のできない細胞のうちの一部のものは適当な冷却速度で臨界温度を急速に通過するために塩害をうけないのであろうと想像される。液体窒素での凍結は、冷却速度がむしろ $-50^{\circ}\text{C}$ の iso-pentane での凍結のそれに近いのかも知れないが、その速度だけで規制されるものかどうか明らかでない。

いずれにせよ、以上のような溶血の機構についての説明は、これまでの所見に基く推定であって、その実証をかためるには、更に今後の実験にまたねばならない。

また、二次凍結の結果も、上記の推論を支持するもので、一旦細胞外凍結で脱水収縮した細胞は、ある温度以下に達すれば、もはや二次凍結で超低温まで冷却しても、新たな細胞内凍結はおこらぬものと思われる。

凍結後の加温保存実験は、凍結乾燥過程での乾燥温度による試料の状態変化を検討するねらいで行なったものであるが、 $-30^{\circ}\text{C}$ 以上で溶血が100%に達することは、塩害或は再結晶による障害などが想像されるが、 $-50^{\circ}\text{C}$ あたりから既に溶血度が漸次増してゆく事実に対しては、それを説明するだけの十分な根拠はない。しかし、とにかく凍結保持温度が、 $-50^{\circ}\text{C}$ より高くなると溶血度を増すことは、将来の凍結乾燥の試みに於て、その乾燥保持温度の点で注意すべきことであらうと思われる。

### 摘 要

1. 凍結乾燥に於ける細胞障害の機構を知るために、カバーガラスとアルミ箔との間に挟んだ少量のウサギ血液を、 $-10^{\circ}\text{C}$ から $-150^{\circ}\text{C}$ までの種々の温度の iso-pentane bath 及び液体窒素中に直接投入して凍結させた後、室温の生理食塩水で急速に融解して溶血度を測った。
2. その結果、凍結温度によって溶血度が異なり、特有の溶血曲線を描いた。
3. これを同一条件の試料について観察した形態的所見とてらし合せて、凍結による溶血の機構を考察した。
4. 融解過程での2, 3の条件をも検討した。

### 文 献

- 1) Smith, A. U. 1961 Biological Effects of Freezing and Supercooling. Edward Arnold Ltd. London. 462 pp.
- 2) Meryman, H. T. 1960 Drying of living mammalian cells. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **85**, 729-734.
- 3) 根井外喜男・千葉重雄・藤田英夫 1960 赤血球の凍結乾燥の試み. 低温科学, 生物篇, **18**, 71-75.
- 4) Nei, T., Kojima, Y. and Hanafusa, N. 1964 Hemolysis and morphological changes of erythrocytes with freezing. *Contrib. Low Temp. Sci.*, **13**,
- 5) Rapatz, G. and Luyet, B. Effect of cooling velocity on the preservation of rapidly frozen frog's blood. Unpublished.

### Summary

This paper reports the first step in investigations of the cause of the hemolysis which results from freezing and drying.

In order to compare the extent of hemolysis resulting from freeze-thawing with the morphological changes in frozen erythrocytes, a thin-layer of rabbit blood was placed between a cover glass and a sheet of aluminum foil. These specimens were frozen in isopentane baths at temperatures ranging from  $-10$  to  $-150^{\circ}\text{C}$  or in liquid nitrogen and then thawed in physiological saline at room temperature. The extent of hemolysis was determined by measuring the amount of hemoglobin liberated in the supernatant and a characteristic hemolysis curve was drawn as a function of the freezing temperatures.

The mechanism of hemolysis is discussed in comparison with morphological findings in specimens prepared under the same experimental conditions.

Some aspects of the rewarming of frozen materials were also investigated.