



# HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	家兔血液の凍結による障害 I : 溶血度について
Author(s)	小島, 義夫; KOJIMA, Yoshio
Citation	低温科学. 生物篇, 23, 111-121
Issue Date	1965-12-01
Doc URL	<a href="https://hdl.handle.net/2115/17701">https://hdl.handle.net/2115/17701</a>
Type	departmental bulletin paper
File Information	23_p111-121.pdf



## 家兎血液の凍結による障害 I\*

溶血度について

小島 義夫

(低温科学研究所 医学部門)

(昭和40年7月受理)

### I. 緒言

赤血球の凍結乾燥保存を目的としてこれ迄多くの実験が行なわれたようであるが<sup>1)</sup>、未だ1例<sup>2)</sup>を除き成功したという報告はない。この問題は、先ず凍結による生細胞の障害機序について十分な解答が与えられて後、乾燥の影響を加算して考えられねばならないであろう。

そこで著者は凍結による溶血の機序を明らかにするに当り、その基礎的実験としてより深い定量的な検討を加えることを計画した。即ち、血液の凍結処理による溶血度の再現性、溶血度と残存血球数との関係、更に凍結処理した血球の電子顕微鏡による形態学的変化の追求等を一連の実験とすることを試みた。

先ず最初に、分析可能ないくつかの要因をとり上げ、保護物質を添加しない条件の下で、凍結家兎血液の溶血度についての実験成績の有意性と信頼度を調べてみた。

### II. 材料及び方法

家兎心血 (2% 蔞酸カリを約10% 含む) 0.02 ml をカバーグラス (35 mm×25 mm×150  $\mu$ ) にとり、その上にアルミ箔 (約25 mm×20 mm×25  $\mu$ ) をかぶせて軽く押し、可及的に均一層とした。

この試料を魔法瓶中の液体窒素、及び液体窒素で夫々、-5, -10, -20, -30, -40, -50, -80°C 及び各融点迄冷却したアイソペンタン、エチルアルコール、エチルエーテル及びアセトン中に投入し急速凍結させた。各温度に5分間凍結した後、室温 (+14~17°C) の生理食塩液 (以下生食液と略す) 4 ml 中に移し、振とう融解させ遠沈 (2000回転, 15分間) 後、その上清に1% KCN 溶液を加え、ヘモグロビンの変性を防いだ。上記の試料は4時間以内に、島津光電分光光度計により、540  $m\mu$  の波長でシアンメトヘモグロビンを比色定量した。

各測定値を、無処置の血液に4 ml の蒸留水を加えた際のヘモグロビンの測定値で割りつけ百分率に直し、更にその百分率を

$$\{\log_{10}(\%) \times 100 - 100\}$$

の値に変換して推計分析を行なった。

\* 北海道大学低温科学研究所業績 第740号

第1表 溶血率 (アイソペンタン)

%		$T_1$	$T_2$	$T_3$	$T_4$	$T_5$	$T_6$	$T_7$	$T_{m1}$	$T_n$		
$G_1$	$B_{101}$	$R_1$	103	102	102	100	76	76	72	97	75	$D_1$
		$R_2$	106	103	100	99	71	72	75	95	81	
	$B_{102}$	$R_1$	100	95	98	95	85	74	73	94	61	$D_2$
		$R_2$	98	96	101	96	87	72	71	92	58	
	$B_{103}$	$R_1$	101	104	101	96	76	76	65	96	56	$D_3$
	$R_2$	97	103	100	100	83	77	67	96	56		
	$B_{104}$	$R_1$	94	101	102	97	80	75	78	97	76	$D_4$
		$R_2$	99	97	100	101	82	79	78	101	74	
	$B_{105}$	$R_1$	104	101	98	99	95	83	83	99	79	$D_5$
		$R_2$	97	101	99	96	94	76	79	100	74	
$G_2$	$B_{106}$	$R_1$	102	103	105	94	75	80	67	93	65	$D_1$
		$R_2$	99	98	101	98	75	76	82	92	56	
	$B_{107}$	$R_1$	98	105	107	96	79	70	59	91	57	$D_2$
		$R_2$	103	103	109	92	70	80	70	95	58	
	$B_{108}$	$R_1$	92	100	100	94	76	82	82	94	65	$D_3$
$R_2$		93	97	100	92	79	78	73	96	67		
$B_{109}$	$R_1$	95	101	101	95	82	51	71	93	72	$D_4$	
	$R_2$	98	103	101	95	84	60	70	94	74		
	$B_{110}$	$R_1$	95	99	97	94	91	73	77	97	70	$D_5$
		$R_2$	97	100	98	94	88	76	71	97	65	

1)  $T_1: -5^\circ, T_2: -10^\circ, T_3: -20^\circ, T_4: -30^\circ, T_5: -40^\circ, T_6: -50^\circ, T_7: -80^\circ,$  $T_{m1}$ : アイソペンタンの融点 ( $-160^\circ\text{C}$ ) 付近の温度,  $T_n$ : 液体窒素 ( $-196^\circ\text{C}$ )2)  $G_1: \delta, G_2: \text{♀}$ 3)  $B$ : 家兎の個体4)  $R$ : 繰り返し5)  $D$ : 測定時

第2表 溶血率 (エチルアルコール)

%		$T_1$	$T_2$	$T_3$	$T_4$	$T_5$	$T_6$	$T_7$	$T_{m2}$	$T_n$	
$G_1$	$B_{201}$	$R_1$	29	54	74	97	81	84	58	81	51
		$R_2$	22	61	68	83	75	83	60	71	57
	$B_{202}$	$R_1$	48	34	99	93	81	91	77	67	71
$R_2$		57	30	97	96	85	90	81	64	69	
	$B_{203}$	$R_1$	40	65	98	89	102	93	73	89	78
		$R_2$	31	90	98	91	104	90	82	83	79
$G_2$	$B_{204}$	$R_1$	30	67	88	86	93	82	60	108	57
		$R_2$	43	43	92	94	95	95	65	95	58
	$B_{205}$	$R_1$	31	42	95	98	100	72	78	104	63
$R_2$		28	46	94	92	112	71	73	96	63	
	$B_{206}$	$R_1$	37	27	72	96	85	75	71	72	75
		$R_2$	39	15	69	94	86	77	73	70	79

 $T_{m2}$ : アルコールの融点 ( $-130^\circ\text{C}$ ) 付近の温度

他の記号は第1表に準ずる

III. 結 果

1. 実験成績

各温度に冷却した各冷媒による薄層血液の溶血率は第1~4表に示す如くである。

本実験の成績の反復測定値についてはあらかじめ符号度の検定を行ない、各反復測定値間に有意差を認めなかったため、そのバラツキを分析上  $\sigma^2$  としてとり扱った。

とり上げた要因は温度、性別、個体、冷媒、測定時（これはアイソペンタンの場合のみ）で、その他の種々な要因はここではとり上げなかった。即ち、第5表、アイソペンタンを寒剤とし

第3表 溶血率 (アセトン)

%		$T_1$	$T_2$	$T_3$	$T_4$	$T_5$	$T_6$	$T_7$	$T_{m3}$	$T_n$	
$G_1$	$B_{301}$	$R_1$ $R_2$	65 46	62 64	105 92	74 89	84 84	78 88	77 80	77 90	68 73
	$B_{302}$	$R_1$ $R_2$	63 61	59 42	93 90	87 90	81 86	75 66	77 75	82 82	68 64
	$B_{303}$	$R_1$ $R_2$	59 62	76 78	108 110	89 89	89 87	78 80	92 96	100 103	92 90
$G_2$	$B_{204}$	$R_1$ $R_2$	50 45	57 54	100 100	85 91	86 86	69 71	84 92	88 89	71 76
	$B_{205}$	$R_1$ $R_2$	52 52	70 54	92 91	102 100	97 89	84 84	72 72	96 101	62 69
	$B_{206}$	$R_1$ $R_2$	51 50	49 50	84 91	98 96	84 93	72 83	73 88	81 100	59 67

$T_{m3}$ : アセトンの融点 ( $-94^\circ\text{C}$ ) 付近の温度  
他の記号は第1表に準ずる

第4表 溶血率 (エチルエーテル)

%		$T_1$	$T_2$	$T_3$	$T_4$	$T_5$	$T_6$	$T_7$	$T_{m4}$	$T_n$	
$G_1$	$B_{401}$	$R_1$ $R_2$	25 29	101 98	103 100	95 102	87 84	83 85	76 71	78 76	87 84
	$B_{402}$	$R_1$ $R_2$	52 47	102 107	107 107	101 103	84 83	84 88	67 67	90 87	80 83
	$B_{403}$	$R_1$ $R_2$	39 85	102 89	100 99	95 95	85 89	85 86	74 75	93 85	78 71
$G_2$	$B_{404}$	$R_1$ $R_2$	51 49	33 45	107 106	99 101	84 86	75 80	80 77	90 91	69 71
	$B_{405}$	$R_1$ $R_2$	44 44	96 98	97 96	95 95	96 94	85 83	81 76	95 95	73 71
	$B_{406}$	$R_1$ $R_2$	56 71	71 75	98 102	99 97	91 90	93 86	39 42	94 98	84 84

$T_{m4}$ : エーテルの融点 ( $-117^\circ\text{C}$ ) 付近の温度  
他の記号は第1表に準ずる

て用いた場合、反復測定値の三元配置型分析による凍結温度と家兔個体については推計学的に有意な差が認められた ( $P < 0.01$ )。更に温度と個体間の交互作用についても有意な差が認められた ( $P < 0.01$ )。しかし性別による相違と、性別と温度間の交互作用については差がなかった。

このことは第7表に示す如く、アルコール、アセトン及びエーテルについてもあてはまる ( $P < 0.01$ )。

第5表 要因分析表 (アイソペンタン)

要因	SS	DF	MS	E (MS)
G	76.05	1	76.05	$\sigma^2 + rt\sigma^2 B(G) + rtb\sigma^2 G$
T	7935.48	8	991.94**	$\sigma^2 + rbq\sigma^2 T$
G×T	54.70	8	6.84	$\sigma^2 + r\sigma^2 TB(G) + rb\sigma^2 GT$
B(G)	212.67	8	26.58**	$\sigma^2 + rt\sigma^2 B(G)$
B(G)×T	1080.93	64	16.89**	$\sigma^2 + r\sigma^2 TB(G)$
R(BGT)	304.50	90	3.38	$\sigma^2$
BGTR	9664.33	179		

\*\*  $P < 0.01$

第6表 要因分析表 (アイソペンタン)

要因	SS	DF	MS	E (MS)
D	149.91	4	37.48	$\sigma^2 + rt\sigma^2 B(D) + rtb\sigma^2 D$
T	7935.48	8	991.94**	$\sigma^2 + rdb\sigma^2 T$
D×T	629.69	32	16.68	$\sigma^2 + r\sigma^2 TB(D) + rb\sigma^2 DT$
B(D)	138.81	5	27.76**	$\sigma^2 + rt\sigma^2 B(D)$
B(D)×T	505.94	40	12.65**	$\sigma^2 + r\sigma^2 TB(D)$
R(BDT)	304.50	90	3.38	$\sigma^2$
BDTR	9664.33	179		

第7表 要因分析表 (アルコール、アセトン及びエーテル)

要因	DF	MS			E (MS)
		M <sub>2</sub>	M <sub>3</sub>	M <sub>4</sub>	
G	1	88.93	54.90	63.79	$\sigma^2 + rt\sigma^2 B(G) + rtb\sigma^2 G$
T	8	2698.93**	896.13**	1243.96**	$\sigma^2 + rbq\sigma^2 T$
G×T	8	120.43	42.54	175.71	$\sigma^2 + r\sigma^2 TB(G) + rb\sigma^2 GT$
B(G)	4	316.37**	140.66**	83.30**	$\sigma^2 + rt\sigma^2 B(G)$
B(G)×T	32	167.07**	24.22**	133.36**	$\sigma^2 + r\sigma^2 TB(G)$
R(BGT)	54	20.74	11.29	15.49	$\sigma^2$

M<sub>2</sub>: アルコール

M<sub>3</sub>: アセトン

M<sub>4</sub>: エーテル

アイソペンタンの例で性別を消去し、測定日の差の検定を行なってみたが、第6表に示す如く有意差は認められなかった。更に、個体別と性別とを消去して、単なる反復測定としてとり扱った。反復測定値の二元配置型分析でも測定日間の差は有意ではなかった。

各冷媒間の差をみるために、アイソペンタン ( $M_1$ ) の個体  $B_{103}, B_{104}, B_{105}$  ( $\delta$ ),  $B_{108}, B_{109}, B_{110}$  ( $\varphi$ ) の6例をとり、他の冷媒を用いた場合と例数をそろえて反復測定値の三元配置型で分析した。その結果は第8表に示す如く、 $-20^\circ\text{C}$  以下の温度となると各冷媒間に差がないことが明らかとなった。

第8表 要因分析表 (4種の冷媒について)

要 因	DF	MS		E (MS)
		$C_1$	$C_2$	
$M$	3	2921.20**	16.04	$\sigma^2 + r\tau\sigma^2 B(M) + r\tau\sigma^2 M$
$T$	4	4497.73**	1195.60**	$\sigma^2 + rmb\sigma^2 T$
$M \times T$	12	1130.24	27.41	$\sigma^2 + r\sigma^2 TB(M) + rb\sigma^2 MT$
$B(M)$	20	138.00**	48.55**	$\sigma^2 + r\tau\sigma^2 B(M)$
$T \times B(M)$	80	146.19**	43.18**	$\sigma + r\sigma^2 TB(M)$
$R(BMT)$	120	10.47	4.07	$\sigma^2$
$BMT \cdot R$	239			

$C_1$ :  $T_1, T_2, T_3, T_5, T_7$  を含む

$C_2$ :  $T_3, T_4, T_5, T_6, T_7$  を含む

$M_1$  における個体は  $B_{103}, B_{104}, B_{105}, B_{108}, B_{109}, B_{110}$  よりなる

## 2. 実験成績から求めた曲線の式

第1~4表に示す各測定値(百分率)を  $\{\log_{10}(\%) \times 100 - 100\}$  の値に変換し、直交多公係数により5次又は4次の各実験式を求めた。

但し、ここで得られた式の  $x$  はすべて、計算の都合上

$$x = \frac{\log T(\text{凍結温度}) - \log 5}{\log 2} - 25$$

に変換した形で示されている。

### A. $M_1$ (アイソペンタン) の場合

凍結温度の点を対数尺でとるため、 $T_1, T_2, T_3, T_5, T_7, T_{m1}$  を用い、 $T_{m1} = -160^\circ\text{C}$  として計算した。

個体 ( $B$ )、性別 ( $G$ ) 及び繰り返し ( $R$ ) をすべて反復測定値として20回の反復測定の場合の5次式は

$$Y_S = 96.17 - 10.18x - 2.29x^2 + 2.99x^3 + 0.43x^4 - 0.22x^5$$

となった。

各個体について、各々2回の反復測定のある場合の5次式は下記の如く求められた。

$$\begin{array}{l}
 x \quad x^2 \quad x^3 \quad x^4 \quad x^5 \\
 B_{101} \quad y_1 = 93.61 - 15.54x - 0.50x^2 + 6.33x^3 + 0.25x^4 - 0.63x^5 \\
 B_{102} \quad y_2 = 97.27 - 6.10x - 3.20x^2 + 0.39x^3 + 0.53x^4 + 0.08x^5 \\
 B_{103} \quad y_3 = 98.87 - 10.55x - 3.64x^2 + 2.24x^3 + 0.66x^4 - 0.10x^5 \\
 B_{104} \quad y_4 = 95.83 - 11.03x - 1.38x^2 + 4.22x^3 + 0.30x^4 - 0.39x^5 \\
 B_{105} \quad y_5 = 99.08 - 2.12x - 2.42x^2 - 1.15x^3 + 0.42x^4 + 0.23x^5 \\
 B_{106} \quad y_6 = 94.79 - 14.41x - 1.23x^2 + 5.77x^3 + 0.29x^4 - 0.58x^5 \\
 B_{107} \quad y_7 = 96.39 - 17.43x - 3.74x^2 + 5.85x^3 + 0.65x^4 - 0.51x^5 \\
 B_{108} \quad y_8 = 94.66 - 12.17x - 0.67x^2 + 4.79x^3 + 0.17x^4 - 0.45x^5 \\
 B_{109} \quad y_9 = 96.43 - 8.99x - 2.85x^2 + 1.99x^3 + 0.49x^4 - 0.10x^5 \\
 B_{110} \quad y_{10} = 97.77 - 3.87x - 3.23x^2 - 0.56x^3 + 0.54x^4 + 0.19x^5
 \end{array}$$

## B. 各冷媒における4次式

アイソペンタン ( $M_1$ ) による溶血度から6個体を取り出した場合(第8表の  $C_1$ ) 及びその他の同例の冷媒における4次の実験式は、下記の如く求められた。

$$\begin{array}{l}
 x \quad x^2 \quad x^3 \quad x^4 \\
 y_{M1} = 99.83 - 4.09x - 4.48x^2 + 0.30x^3 + 0.68x^4 \\
 y_{M2} = 93.50 + 19.05x + 16.23x^2 - 2.88x^3 + 2.56x^4 \\
 y_{M3} = 98.08 + 9.90x - 15.67x^2 - 1.40x^3 + 2.92x^4 \\
 y_{M4} = 100.83 + 1.08x - 9.23x^2 + 0.71x^3 + 0.69x^4
 \end{array}$$

## IV. 考 察

### 1. 実験成績について

実験成績第1~4表の示す如く、凍結処理後の溶血率は屢々100%を越える値を示している。しかも平均値ですら100%を上回る温度の点がみられる。

このように、血液を低温処理することによって起る溶血が、蒸留水による溶血を上回ると考えて妥当であるかどうかを検討してみた。即ち、本実験で用いたと同じ方法で0.02 mlの血液をとり、蒸留水に入れた場合、 $-20^\circ\text{C}$  アイソペンタンで凍結後蒸留水に入れた場合及び $-20^\circ\text{C}$  凍結後生食液にもどした場合の3通りの条件について、各々20例ずつの繰り返し実験を行なって測定値のまま推計分析を試みた。その溶血度は

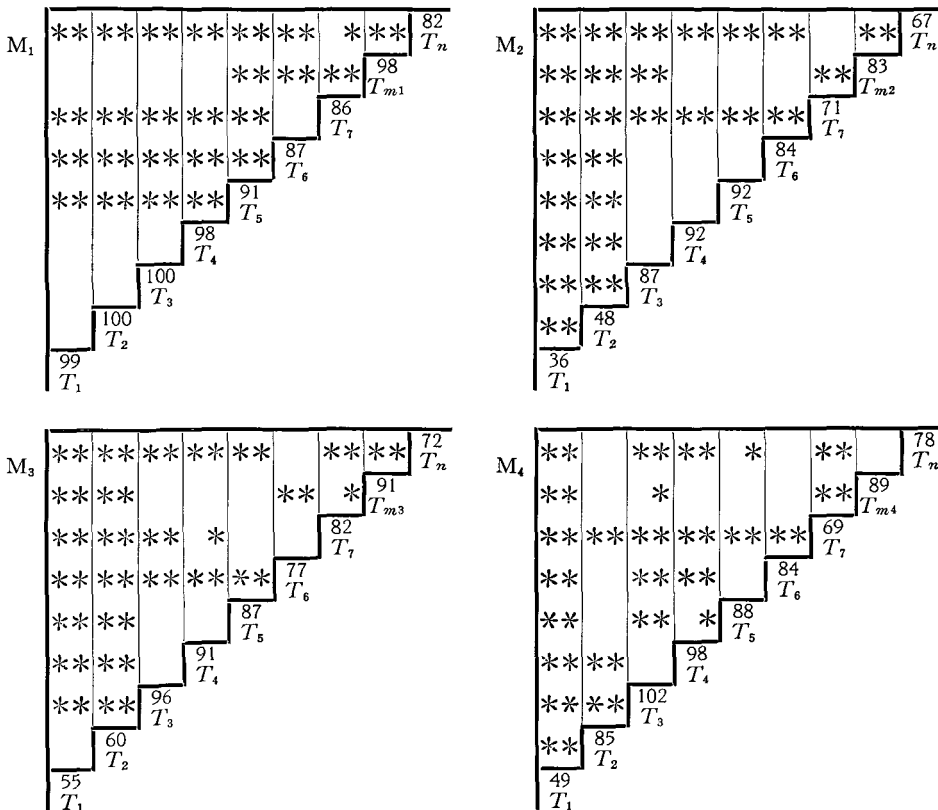
$$\begin{array}{c}
 \text{蒸 留 水} < \text{凍結後蒸留水} < \text{凍結後生食液} \\
 \left. \begin{array}{l} \text{---} P < 0.05 \text{---} \\ \text{---} P < 0.01 \text{---} \end{array} \right\}
 \end{array}$$

の順となり、 $-20^\circ\text{C}$  凍結後蒸留水にもどした場合と生食液にもどした場合の間以外に、夫々推計学的に有意な差が認められた。

この所見から凍結処理した場合、蒸留水溶血に較べて確かにヘモグロビンの放出量が多くなっていることが分る。この問題について、既に Ponder<sup>3)</sup> は $+50^\circ\text{C}$  加温による溶血の際に、若

干の残余ヘモグロビンが ghost 側に残ることを報告しているし、中村<sup>4)</sup>は赤血球の溶血が蒸溜水中よりもむしろ、それより多少濃度の高い媒液中で最大となることを見出し、最大溶血現象 (pleolysis) と呼んでいる。これらとは条件は異なるが、凍結処理後、生食液に復水した本実験の成績がある温度では 100% を越える値を示すことも可能であろうと考えられる。この推論の下に、溶血率を従来考えられていたような出現率として扱わずに、増減率と考えて測定値を角変換せずに対数値に変換して分析を行なったのである。

本実験で選んだ要因は、温度、性別、個体、冷媒及び測定時日の 5 つである。反復測定については符号度の検定により有意差を認めなかった。即ち、2 回の繰り返し実験で、特に 1 回目の値が大きいとか小さいとかいう一定の傾向がないことを意味する。選んだ要因の中、最も強い有意差を示したのは温度であり、各水準についての検定成績は第 1 図に示す如くである。これらの図から、各冷媒全般にあてはまる一つの傾向として、何れの冷媒を用いても  $-50^{\circ}\text{C} \sim -80^{\circ}\text{C}$  の間に溶血度の低い一つの谷が存在することが明らかである。



第 1 図 各温度間の有意差

M<sub>1</sub>: アイソペンタン

各数字は T 級内の平均値を示す。

$$|T\alpha| = \sqrt{rbg} \times \sqrt{R(BGT)} \times Q_{\frac{\alpha}{2}}^2(\alpha)$$

\* P<0.05 \*\* P<0.01

性別については差が認められなかった。堀内<sup>5)</sup>は人赤血球の稀釈塩溶液に対する抵抗性を調べ、女性の場合の溶血度(比色)が男性のそれに比べて大きい( $P < 0.01$ )ことを報告している。家兎についてこのような傾向が全く認められないのは、多分、両種間の生理的な相違に基づくものと考えられる。

一方、個体差については何れの場合にも差は有意となっており、しかも温度との交互作用即ち、ある特定の個体がある温度の点に対して特異的な抵抗性乃至は感受性を有することが示されている。この問題について種々な面から検討してみたが、日差、測定時(午前と午後)、測定時の室温(+14°~18°C: この温度は復水の際の生食液の温度と考えられる)及び家兎の体重(2.0~2.4 kg)についての特別な関係は見い出せなかった。しかし、用いた家兎の正確な年齢については不明であり、更に、心臓穿針による採血の際に動脈血と静脈血の別を選択出来ない問題等もあつて、これらは今後解決されねばならない問題を提示している。これらの点を考慮すれば、相互比較のために用いる材料は出来るかぎり同一個体から採取することが望ましい。

アイソペンタンを用いた際の日差の検定からみても、復水の際の生食液の温度範囲(+14°~18°C)が溶血率を大きく左右することは認められなかった。

用いた4種の寒剤については、-5, -10, -20, -40, -80°Cの点(第8表中の $C_1$ )で、繰り返しの要因( $R$ )以外はすべての要因について有意な差が認められる。従つて、寒剤間の差は有意であり( $P < 0.01$ )、第2図に示す如く、各水準での有意差はアセトンとエーテル間以外のすべての間に強く認められる(各々 $P < 0.01$ )。これに対して、-20°C以下の温度(-20, -30, -40, -50, -80°C)による成績では差は認められない。即ち、-20°C以下の温度範囲でこの種の実験を行なう場合、アイソペンタン、アルコール、アセトン及びエーテルの何れの寒剤を用いても溶血度に大きな相違は現われないことから、一連の実験内で、これらの寒剤を併用してもさしつかえないことが示されてる。

-20°C以上の温度範囲にみられる溶血率は、アルコール、エーテル、アセトン及びアイソペンタンの順に高くなっている。特にアイソペンタンの場合、殆んど全溶血に近い。本実験のように、試料の一部が直接寒剤に接するような実験条件で、しかも冷却温度の高いところでは凍結完了前に寒剤である溶媒自身の作用がかなり現われるものと考えられる。従つて、-20°C以上での凍結実験にはこのような実験方法は不適當である。

## 2. 曲線の式について

実験成績に基づく曲線の式を求めた目的は、将来、各種動物の血液の凍結処理による変化の比較と、溶血現象の起る機構の解明のための確実な基盤をつくることにあつた。

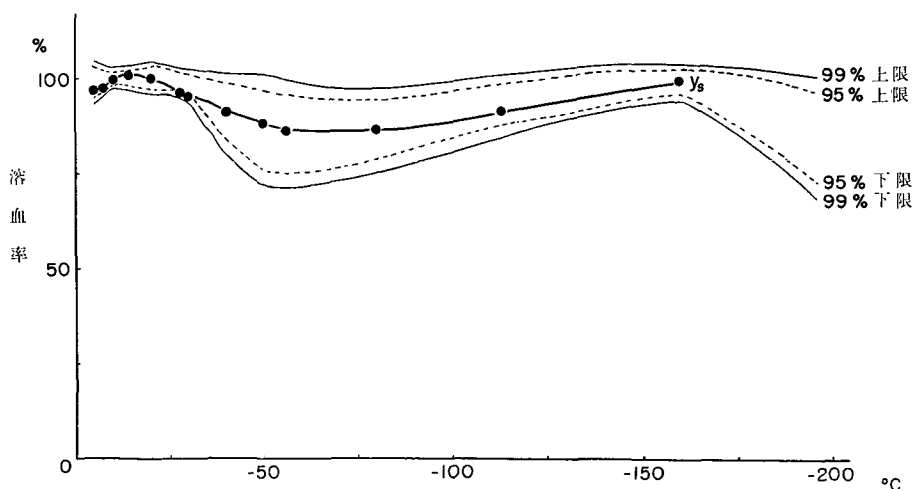
アイソペンタンを寒剤として用いた場合の溶血度(20例)の5次式について、この曲線の式が用い得るかどうかの検定として、各温度の点と計算に用いながつた-30°Cと-50°Cの点を加えて95%と99%の棄却限界を求めた(第3図)。この結果は図に示す如く、曲線の式によ

**	**		87 M <sub>4</sub>
**	**		87 M <sub>3</sub>
**	78 M <sub>2</sub>		
96 M <sub>1</sub>			

第2図 各冷媒間の有意差( $C_1$ )

各数字はM級内の平均値を示す

$$|M\alpha| = \sqrt{rtb} \times \sqrt{B(M) \times Q_{\alpha}^2(a)}$$



第3図 実験公式と棄却限界 (アイソペンタン, 20例)

$$y_s = 96.17 - 10.18x - 2.29x^2 + 2.99x^3 + 0.43x^4 - 0.22x_5$$

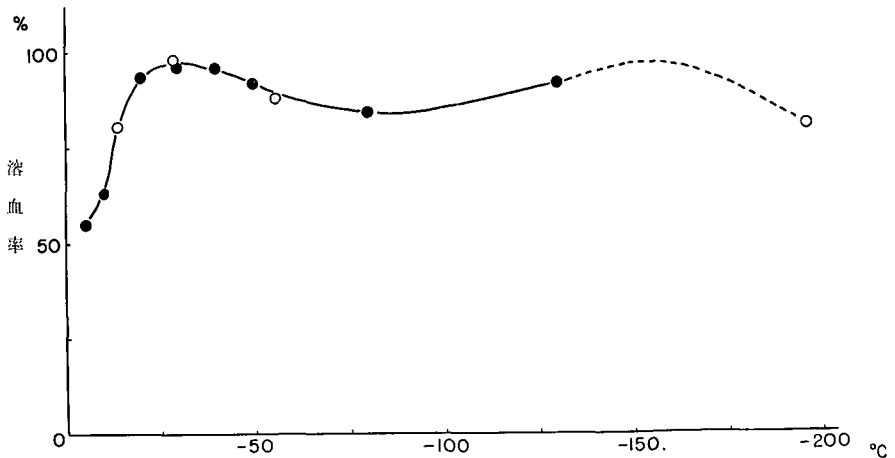
$$\text{但し } x = \frac{\log T(\text{処理温度}) - \log 5}{\log 2} - 2.5$$

る何れの計算値も 99% 棄却限界内に収まることが明らかである。これらの曲線について考えてみると、溶血度の低い温度の部位 ( $-50^{\circ}\text{C}$  から  $-80^{\circ}\text{C}$  にかけての一つの谷と、 $-196^{\circ}\text{C}$  の点) にあつてはその上限と下限の幅が大きい。このことは、アルミ箔をはがして生食液に復水した場合 50% に近い溶血率しか示さなかつた Nei 等<sup>5)</sup> の報告と照らし合わせてみて、実験操作上に溶血率を低下させる余地のあることを暗示している。

更に、 $-60$ 、 $-70$ 、 $-90$ 、 $-100^{\circ}\text{C}$  の各温度について急速凍結処理による夫々 4 回の反復測定を行なつてみたが、何れの成績もこの 95% 棄却限界内に収まつた。同様にして各個体別の 10 本の 5 次式についてみると、3 次項と 5 次項に符号の一致しない点が 2、3 あるにもかかわらず、何れの曲線もこの 20 例の成績から導いた 99% 棄却限界内に入ることが確かめられた。これらのことは、この曲線式がこの実験の公式として充分適用し得ることを示しており、家兎血液について類似の実験を行なう場合には、この式からの計算値で予測出来る値が得られることを示している。

4 次式についてみると、アイソペンタンの場合 5 次式とほぼ同型の曲線を示し、99% 棄却限界内に収まるが、アルコール、アセトン及びエーテルの場合はアイソペンタンの場合と多少異なつた曲線を示す。これらの寒剤の代表として第 4 図にアルコールの例を示すと、比較的高い温度の側 ( $-5^{\circ}$ 、 $-10^{\circ}\text{C}$ ) で溶血率は低い値を示しているのがみられる。これらの寒剤ではアイソペンタンに比べて比較的溶血作用が少ないのではないかと考えられる。

凍結による溶血現象については、各処理温度に対して特徴的な溶血曲線の傾向が報告されている<sup>6-9)</sup>。しかし、その溶血現象の起る再現性や定量の問題については必ずしも十分な資料が得られていないし、更にその機序についても未解決の点が多い。本実験ではこの種の実験にともなう数多くの要因の中、我々の選択出来る要因を出来るだけ多くとりあげて検討し、更



第4図 実測と計算値の比較 (アルコール)

- 実測値  
 —○—  $y_{Ar2} = 93.50 + 19.05x + 16.23x^2 - 2.88x^3 + 2.56x^4$  の  
 実験公式から求めた計算値

に実験成績から曲線のあてはめを行なってそれらを検定したのである。

最後に、溶血曲線の一般的傾向として、家兎血液の溶血率は $-20^{\circ}\text{C}$ と $-160^{\circ}\text{C}$ 近辺で高く $-50^{\circ}\text{C}$ と $-196^{\circ}\text{C}$  ( $-196^{\circ}\text{C}$ は溶媒を用いず液体窒素に直接試料を投入したものであって、他の温度の場合とは冷却速度が異なるから、同じ曲線で結ぶのは不適當であるが)近辺で低い値を示し、これらの値を連続してグラフに画くと極めて特徴的な二子山状を呈することを述べておきたい。

本実験を通じて御指導、御校閲下さった根井教授に感謝する。推計分析について計算の細部にわたって御指導下され、御鞭撻いただいた本学獣医学部家畜繁殖学講座、石川教授に感謝する。

## V. 摘 要

赤血球の凍結による溶血の機序を知ることを最終目的として、本実験では先ず家兎血液の薄層標本を用いて、種々の温度領域における急速凍結後の溶血率について推計分析を施してみた。

符号度の検定により、繰り返し測定値間には差がみられなかった。反復測定値の三元配置型分析で、処理温度間に高い有意差 ( $P < 0.01$ ) がみられ、家兎個体間の差も有意であった ( $P < 0.01$ )。同時に、温度と個体間の交互作用にも有意差が認められた ( $P < 0.01$ )。性別間、測定時間には有意差がみられなかった。

用いた4種の寒剤 (アイソペンタン、アルコール、アセトン、エーテル)の間には、 $-20^{\circ}\text{C}$ 以上の温度処理では差があった ( $P < 0.01$ ) が、 $-20^{\circ}\text{C}$ 以下の温度処理では有意差がなかった。

得られた成績に基づき、夫々4次又は5次の多項式を求めた。更に、 $-20^{\circ}\text{C}$ より低い温度

の領域では各寒剤を用いた際の溶血曲線の式が、アイソペンタンを用いた実験成績での99%棄却限界内に収まることを確かめた。

## 文 献

- 1) Smith, A. U. 1961 *Biological Effects of Freezing and Supercooling*. Edward Arnold Ltd. London.
- 2) Meryman, H. T. 1960 Drying of living mammalian cells. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **85**, 729-734.
- 3) Ponder, E. 1954 Present concepts of the structure of the mammalian red cell. *Blood*, **9**, 227-235.
- 4) 中村 拓 1941 日本学術協会報告, **16**, 1. [血液化学, 黒田嘉一郎他編(1963), 朝倉書店, p. 224]. による。
- 5) 堀内淑彦 1952 赤血球抵抗に関する研究. *東京医学雑誌*, **60**, 93-104.
- 6) Nei, T., Kojima, Y. and Hanafusa, N. 1964 Hemolysis and morphological changes of erythrocytes with freezing. *Contrib. Low Temp. Sci., Ser. B*, **13**, 1-6.
- 7) Gehenio, P. M., Rapatz, G. L. and Luyet, B. J. 1963 Effects of freezing velocities in causing or preventing hemolysis. *Biodynamica*, **9**, 77-82.
- 8) Luyet, B. J., Rapatz, G. L. and Gehenio, P. M. 1963 On the mode of action of rapid cooling in the preservation of erythrocytes in frozen blood. *Biodynamica*, **9**, 96-124.
- 9) Rapatz, G. L. 1965 Personal communication.

## Summary

Studies on the mechanism of cellular injury resulting from freezing have been made. As one of those investigations, thin-layered specimens of rabbit blood were rapidly frozen at various temperatures ( $-5$ ,  $-10$ ,  $-20$ ,  $-30$ ,  $-40$ ,  $-50$ ,  $-80^{\circ}\text{C}$ , melting point of cooling media and  $-196^{\circ}\text{C}$ ) and thawed in physiological saline at room temperature, and then the extent of hemolysis was determined by measuring the amount of hemoglobin liberated. The results were statistically analysed by means of repeated three-way lay-out methods.

There is no significant difference in value obtained from repeated measurements as a result of matching tests nor in sex distinctions and dates of experiments. But there is significant difference in temperatures and individuals and also in the interaction between them ( $P < 0.01$ ).

As to the four cooling media (isopentane, ethyl alcohol, acetone and ethyl ether), there is a highly significant difference at temperatures ranging from  $-5^{\circ}\text{C}$  to  $-20^{\circ}\text{C}$ , but no difference at temperature below  $-20^{\circ}\text{C}$ .

Several polynominal expressions (4 biquadratic expressions and 11 pentatic expressions) were formularized. All these expressions were ascertained to be in the 99% rejection limit of the experimental data based on the isopentane medium in a temperature range of  $-20^{\circ}\text{C}$  to  $-80^{\circ}\text{C}$ .