HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	家兎血液の凍結による障害　II ： 残存赤血球数について
Author(s)	小島, 義夫
Citation	低温科學. 生物篇, 23, 123-127
Issue Date	1965-12-01
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/17702
Type	departmental bulletin paper
File Information	23_p123-127.pdf

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

Yoshio KOJIMA 1965 Freezing Injury in Rabbit Erythrocytes II. Cell Number. *Low Temperature Science, Ser.* ***B, 23.*** (With English Summary p. 127)

家兎血液の凍結による障害 II*

残存血球数について

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

従来，血液の凍結実験は数多く行なわれているが[1]，それらの実験では溶血度を細胞障害の基準としてとり上げ，溶血によって赤血球から放出されるヘモグロビン量で溶血率を現わしたものが殆んどである。これまでに，凍結処理された血液での残存血球数及びそれと溶出ヘモグロビン量との関係について検討されたものは非常に少ない[2]。

著者は，先に家兎血液の凍結処理による溶血率についてその再現性等の問題をとり上げて報告したが[3]，今回はそれに引き続き，急速凍結処理後の残存血球数について幾つかの要因をとり上げて分析し，更に，その溶血率と残存血球数との関係を調べてみることを計画した。

II. 材料及び方法

家兎心血 (2% 蓚酸カリを約 10% 含む) 0.02 ml をカバーグラス (約 35 mm × 25 mm × 150 μ) にとり，アルミ箔 (約 25 mm × 20 mm × 25 μ) で覆い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各々−30, −50, −100, −160°C に冷却したアイソペンタン中に投入し，5分間の凍結処理後，室温 (+14〜12°C) の生食液 4 ml 中に迅速に移し，振とう融解し，5分後充分均等に混和したものとして血球計算に用いた。1試料について2枚の Thoma 氏血球計算板を用い，夫々対角線上に異なった計算室を5個とり，これらの値を反復測定値とした。血液の稀釈倍数は近似値として ×200 として扱かった。

ここで用いた個体 10 例について，別の日に−30, −50, −160 及び −196°C の温度で急速凍結した溶血率を組み合わせて，残存率と溶血率との間の相関関係を検定した。

III. 結　　果

薄層試料による家兎血液の凍結処理後の残存率は第1表に示す如くであった。この百分率を計算の都合上，各値について $\{\log_{10}(\%)\times 100-100\}$ に変換して推計分析を行なった。但し，1% 以下の場合は 1% にきり上げて，−5 の値に修正して扱かった。

反復測定 (R) 間及び血球計算板 (P) 間については，符号度の検定を行なったが，何れも有

* 北海道大学低温科学研究所業績　第741号

意な傾向がみられなかった。第1表の実験成績の P と R を単なる繰り返しとみて，4回の反復測定値の三元配置型分析を行なった結果は第2表に示す如くであった。即ち，用いた凍結温度 (T) 間と個体 (B) 間にみられる差は推計学的に有意なものであり (P<0.01)，両者の交互作用も有意であった (P<0.01) が，性別 (G) 間及び性別と温度との交互作用については差がみられなかった。

これらの12個体の中，10個体についての溶血率を計った成績は第3表に示す如くであった。残存率 (B_1～B_5, B_7～B_{11} の10個体についての各 R_1 の値) と第3表の溶血率についての相関関係の有無を調べたところ，負の相関 ($r=-0.774$) が認められ，これは推計学的に意味のある値であった (P<0.01)。

第1表 血球の残存率

%		T_4				T_6				T_8				T_{m1}				T_n			
		R_1		R_2		R_1		R_2		R_1		R_2		R_1		R_2		R_1		R_2	
		P_1	P_2	P_1	P_2	P_1	P_2	P_1	P_2	P_1	P_2	P_1	P_2	P_1	P_2	P_1	P_2	P_1	P_2	P_1	P_2
G_1	B_1	8	7	13	12	34	28	44	36	19	20	26	24	2	4	5	6	35	35	44	49
	B_2	6	7	9	7	41	42	39	38	31	34	33	27	4	3	7	5	40	34	37	37
	B_3	4	3	6	6	31	35	31	32	18	17	16	18	3	4	1	2	38	40	39	41
	B_4	3	4	4	4	40	42	42	41	31	34	32	34	2	1	1	1	40	46	43	42
	B_5	9	12	9	9	52	55	40	37	15	15	10	11	1	1	1	1	40	36	38	35
	B_6	4	7	5	5	36	34	35	40	13	22	22	27	4	4	1	2	46	46	39	44
G_2	B_7	12	11	11	12	27	28	31	29	16	17	22	21	3	3	3	4	28	27	31	29
	B_8	8	6	4	3	37	39	39	38	20	19	19	23	9	7	5	6	46	41	36	33
	B_9	6	8	4	2	43	46	35	34	15	15	14	13	8	8	5	5	37	39	43	45
	B_{10}	5	5	7	6	34	35	31	34	18	19	16	17	1	1	4	5	25	26	31	27
	B_{11}	8	10	8	8	34	34	33	31	16	16	26	28	2	2	4	5	36	41	46	49
	B_{12}	4	3	8	7	32	40	31	29	24	22	13	11	1	1	2	2	41	47	46	44

1) T_4: −30°C, T_6: −50°C, T_8: −100°C, T_{m1}: −160°C, T_n: −196°C
2) R: 計算室 P: Thoma 氏血球計算板
3) G_1: ♂, G_2: ♀, B: 家兎個体

第2表 要因分析表 (残存率)

要 因	SS	DF	MS	E (MS)
G	5.71	1	5.71	$\sigma^2+rt\sigma^2B(G)+rt\sigma^2G$
T	497,795.11	4	124,448.77**	$\sigma^2+rtg\sigma^2T$
$G\times T$	5,208.85	4	1,302.21	$\sigma^2+r\sigma^2TB(G)+rb\sigma^2GT$
$B(G)$	10,706.24	10	1,070.24**	$\sigma^2+rt\sigma^2B(G)$
$T\times B(G)$	40,588.14	40	1,040.70**	$\sigma^2+r\sigma^2TB(G)$
$R(BGT)$	27,200.25	180	151.11	σ^2
$BGT\cdot R$	581,504.30	239		

$R=R_1(P_1+P_2)+R_2(P_1+P_2)$

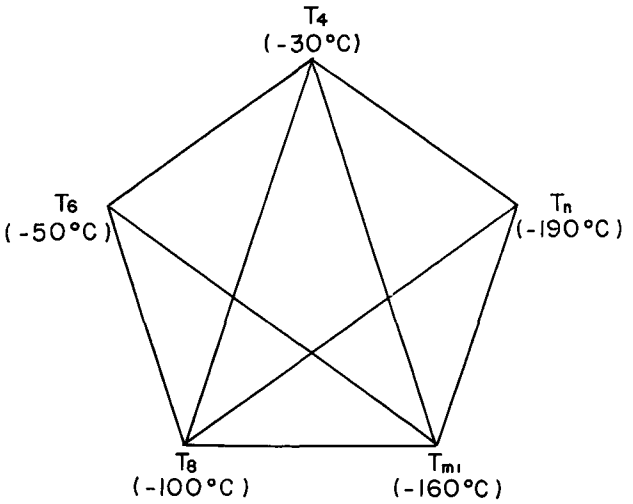
第3表 溶 血 率

		T_4		T_6		T_{m1}		T_n	
		R_1	R_2	R_1	R_2	R_1	R_2	R_1	R_2
G_1	B_1	100	99	76	72	97	95	75	81
	B_2	95	96	74	72	94	92	61	58
	B_3	96	100	76	77	96	96	56	56
	B_4	97	101	75	79	97	101	76	74
	B_5	99	96	83	76	99	100	79	74
G_2	B_7	94	98	80	76	93	92	65	56
	B_8	96	92	70	80	91	95	57	58
	B_9	94	92	82	78	94	96	65	67
	B_{10}	95	95	51	60	93	94	72	74
	B_{11}	94	94	73	76	97	97	70	65

IV. 考 察

家兎血液の薄層試料を用いて，−30，−50，−100，−160°C 及び−196°C の各温度で急速凍結した残存率について種々の要因を選んで検討してみた。血球計算板間と計算室間に一定の傾向がないので，これらを単なる繰り返しとみて，家兎個体，性別，処理温度の各要因について分析したところ，個体間，温度間及び個体と温度間の交互作用に有意差が認められた（各々 $P<0.01$）。この成績は，同じ条件で処理した際の溶血度の分析結果と同じ傾向を示している[3]。しかも溶血度と同じく反復測定間及び性別間には差がない点で一致した所見を示している。

処理温度の水準についての有意差は第1図に示す如く，−50°C と−196°C（液体窒素）を除



第1図 温度の各水準の有意差
実線は各温度の点における残存血球数の間の有意差（$P<0.01$）を示す

くすべての組合せについて1%の危険率をともなう高い有意差を示している。即ち，アイソペンタン中における−50℃凍結の残存血球数と，−196℃液体窒素を用いて急速凍結した後に残存する血球数はほぼ同数であると考えてよいが，その他の −30，−100，−160℃及び −196℃ (乃至は−50℃) の間には夫々違いがあり，温度に対応する特徴的な残存率を示すものと考えられる。

赤血球が低温処理によって障害を受ける場合，一般には溶血度と残存血球数は正しく逆比例することが考えられるが，不完全溶血その他の問題もあって，常に一定の関係を示すかどうかについては，必らずしも明らかになっていないようである。特に凍結処理後の両者の関係について当研究室よりの報告[2] があるが，これとても凍結条件が異なり，そのねらいも違っているので直接には本実験の成績との比較にはならない。

本実験の分析結果は，両者の間に逆相関 ($r=-0.774$) の関係があり，推計学的に1%の危険率で有意性があるものと推定されているが，これは特に実験計画において溶血度の曲線での山と谷をなす特定の限られた点を選んだものであり，もしこの種の実験で満足のいく結果を導き出すためには，更にその中間の点を幾つかとり上げて，例数を重ねて検討することが必要と思われる。出来ることなら，溶血度と残存率について各々対応した温度の点を数多くとり，夫々の曲線についての相関関係が追求されねばならない。

しかし，ここで得られた成績から，低温処理後残存する血球が生物学的又は機能的に活性を保持しているかどうかの問題は別としても，残存血球数と放出されるヘモグロビン量 (溶血度) との間に必らずしも完全な逆相関 ($r=-1$) の関係が認められないことは注目に価する。その原因については，時間的要因や溶血度の測定の際には避けられない遠沈操作等多くの要因が考えられるかも知れない。しかし，本実験での最も重要なねらいである凍結による溶血の機序についてのみ考えても，溶血の機構があらゆる温度の点について質的に一定のものであれば，溶血度と残存率との関係もまた常に一定の負の相関を示すであろうが，若し，凍結温度が異なることによって，細胞の障害の機構に相違があるものとすれば，溶血度と残存率との間の関係が完全な逆相関の形を示さない場合が起り得るものと考えられる。この点については更に今後検討を進めたい。

終りに，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。あわせて推計分析について御教示下さっ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

家兎血液の薄層試料について，−30，−50，−100，−160℃に冷却したアイソペンタン及び−196℃液体窒素を用いて急速凍結した後，室温の生食液に融解し，その残存血球数を算出した。

12個体について各4回の反復測定値を推計分析したところ，個体間の差は有意であった ($P<0.01$)。又，−50℃と−196℃以外の用いたすべての温度間には有意差が認められた ($P<$

0.01)。同様に，個体と温度間の交互作用も高度の有意性を示した。一方，性別，性別と温度間の交互作用については差がみられなかった。

更に，この中の10個体について各温度（−30, −50, −160及び−196°C）での溶血度を測定し，残存血球数との間の相関関係の有無を調べた。両者間には推計学的に有意な負の相関（$r=-0.774$）が認められた（$P<0.01$)。しかし，この問題については，将来測定温度の点を増し曲線の逆相関を求めて結論されねばならない 。

文　　献

1) Smith, A. U. 1961 Biological Effects of Freezing and Supercooling. Edward Arnold Ltd. London.
2) 坂牛栄治・浅沼英一・藤田英夫 1959 赤血球の不完全溶血について. 低温科学, Ser. B, ***17***, 71-77.
3) 小島義夫 1965 家兎血液の凍結による障害 I. 溶血度について. 低温科学, Ser. B, ***23***, 111-121
4) 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.

Summary

After thin-layered specimens of rabbit blood were rapidly frozen at various temperatures (−30, −50, −100, −160 and −196°C) and thawed in physiological saline at room temperature, the number of remaining erythrocytes was measured by hemocytometer. The results obtained from the experiments repeated 4 times using 12 rabbits were statistically analysed. There is a highly significant difference between individual rabbits, temperature (with some exception) and the interaction between individuality and temperature ($P<0.01$). But there is no significant sex differentiation and no interaction between temperature and sex distinction.

The correlation between the cell number and the extent of hemolysis was also statistically analysed. A negative correlation ($r=-0.774$) and a highly significant meaning ($P<0.01$) were found between them.