



Title	氷点に近い温度での凍結による溶血の機構 I : 凍結及び融解過程での形態的变化
Author(s)	根井, 外喜男; NEI, Tokio
Citation	低温科学. 生物篇, 25, 127-132
Issue Date	1967-12-25
Doc URL	<a href="https://hdl.handle.net/2115/17727">https://hdl.handle.net/2115/17727</a>
Type	departmental bulletin paper
File Information	25_p127-132.pdf



## 氷点に近い温度での凍結による溶血の機構 I\*

凍結及び融解過程での形態的变化

根井 外喜 男

(低温科学研究所 医学部門)

(昭和 42 年 9 月受理)

### I. 緒 言

吾々は、長期研究計画として、生細胞の凍結による障害の機構を種々の角度から検討しており、その一環として赤血球をとり上げ、凍結による溶血の機構を追究してきた。

さきに行なった実験<sup>1)</sup>では、先ず種々の温度で凍結させた血液の融解後にみられる溶血と、それぞれ対応する温度の凍結状態にある赤血球の形態的变化を比較観察した。その結果、氷点から  $-150^{\circ}\text{C}$  に亘る温度範囲では、凍結による溶血の原因と考えられるものに二つの因子のあることがわかった。即ち、氷点に近い比較的高い温度では、細胞外凍結による収縮細胞のみられることから、この温度範囲での凍結による溶血は、濃縮塩溶液にもとづくものと考えられ、また、ごく低い温度での急速凍結では、細胞内氷晶の跡のみとめられることから、この条件での凍結による溶血は、細胞内凍結が主因であろうと想像された。

以上のような所見、即ち二つの山をもった溶血曲線及びそれに相応する形態的所見は、既に Luyet ら<sup>2,3)</sup>によっても認められていた。

今回はこの二つの溶血機構のうち、前者の氷点に近い温度での溶血について更に検討を行なってみたのである。

そもそも、凍結による溶血の機構に関しては、Lovelock<sup>4)</sup>が 1953 年に彼のいわゆる塩害説を発表して以来、塩害が細胞の凍結障害の有力な因子として広く引用されてきた。然も今日に至るまで、殆ど再検討されることもないまま、多くの人に承認された形になっていた。

しかし最近になって、彼の塩害説に対する批判が幾つか目につくようになってきた。しかもその批判を大別すると二つの傾向に分けられるように思う。一つは、塩害説があてはまるのはごく一部の哺乳類の細胞であって、一般に植物細胞や微生物細胞では該当しないことが明らかにされてきたのである<sup>5)</sup>。他の一つは、塩害の機序そのものに関するもので、濃縮塩による細胞障害の機構についての解釈に疑問がもたれるようになってきた<sup>6-8)</sup>。その結果、凍結による細胞の脱水の状態から溶血の機序をしらべようとする試み<sup>9)</sup>も現われている。

前述のように、筆者もまた氷点に近い比較的高い温度での凍結による溶血が、果して塩害

\* 北海道大学低温科学研究所業績 第 853 号

だけで説明できるものかどうかについて、検討を加えようと企てたのである。

そこでまず、完全溶血を起す  $-10^{\circ}\text{C}$  までの温度範囲で、凍結融解の過程では赤血球がどのような形態的变化を示すか、特にこの全過程を通じて溶血の経過を観察できるかどうかを確かめようとして、本実験を進めた。

従来凍結による溶血の機構を形態的な立場から検討しようとの試みは極めて少ない。とりわけ、凍結及び融解の過程に於て、動的観察を続けたものは、技術的困難の故もあるのか殆ど見当らない。僅かに Smith 等<sup>10)</sup> がウサギ血液で  $-10^{\circ}\text{C}$  から  $-20^{\circ}\text{C}$  への冷却過程で溶血がみとめられると述べている外は、Luyet 一門の形態的観察が報告されているに過ぎない。それとて、 $-15^{\circ}\text{C}$  までの凍結過程での細胞の収縮の状況<sup>11)</sup> と、融解過程での溶血の状況が示されている<sup>12)</sup> だけで、凍結過程での溶血は未だ問題であると述べられていた<sup>12)</sup>。

従って本実験に於ては、凍結及び融解の全過程に亘って、個々の細胞の溶血現象を経時的に動的観察することを目的として、顕微鏡による詳細な観察が行なわれた。

## II. 方 法

試料： 蔞酸カリ加家兎血液を 0.15 M 食塩溶液で 3 回洗い、その浮遊液を作った。原血液及び食塩水浮遊液は  $5^{\circ}\text{C}$  の冷蔵庫に保存し、前者は 5 日以内、後者は 1 日以内に使用した。

形態的観察法： 形態的観察のために 2 種の光学顕微鏡が用いられた。

(1) 真空断熱式低温顕微鏡 倒立反射型顕微鏡に特殊な試料冷却装置をとりつけたものである。本装置の構造及び操作法の詳細については別報にゆずる<sup>13)</sup>。

(2) 簡易冷却装置付低温顕微鏡 正立透過型顕微鏡のステージに簡易冷却装置を載せたもので、液体窒素の循環量を加減することによって温度制御ができる。

凍結融解法： 試料を 1 滴、鏡面又はカバー・ガラスに載せ、更に小さなカバー・ガラスをかぶせて薄層の試料を作る。試料の厚さを一定にしたい時は、厚さ  $25\mu$  のアルミ箔の細片にグリースをつけて 2 枚のガラスの間に挟み、上から押さえる。これを顕微鏡にとりつけ、徐々に冷却を開始する。 $-1^{\circ}\text{C}$  と  $-2^{\circ}\text{C}$  との中間で、予め液体窒素で冷した金属線の先端を試料の辺縁に接触させると、そこに氷が植えつけられる。以後  $1\sim 2^{\circ}\text{C}/\text{min}$  の冷却速度で温度を下げて行くと、この氷は次第に成長する。 $-10^{\circ}\text{C}$  に達した後は再び温度を徐々に上昇させ試料が完全に融解するまで続けた。以上の凍結及び融解の全過程に亘って、経時的に写真撮影を行なった。

## III. 結 果

### 血球濃度の低い場合

個々の細胞の形態的变化を詳細に観察するためには、全血液と同じ濃度の血球浮遊液では細胞が多すぎて観察が困難である。そこで適当に (1/10 乃至 1/100) 含有血球数を少なくした浮遊液を用いた。

#### 1. 緩慢凍結

まず  $-1^{\circ}\text{C}$  乃至  $-2^{\circ}\text{C}$  で試料に氷を植えつけると、いろいろな形をとりながら氷は次第に

伸びて行き、その氷に囲まれた溶液の中に血球が幾つかづつとりこまれる。温度が下がるにつれて、氷は成長し溶液部分は狭くなり、やがて血球はあちらで一つ、こちらで一つという具合に、徐々に溶血を起こし始める。それは決してある温度で一せいに起こるというものではなく、 $-10^{\circ}\text{C}$ に至るまでの各温度で順次にみられるのである。その様子を写真についてももう少し詳しく観察してみると、最初の凍結で氷にとり囲まれた血球は少しく収縮してみえるが、そのうち溶血を起こすものはその直前にやや膨大し、間もなく輪郭がうすくなり、やがて見えなくなって、僅かに残った跡も程なく消えてしまう。

最初の凍結時に、氷の成長に伴う血球の位置の変動があるため、対照との血球数の比較は正確にはできないが、 $-10^{\circ}\text{C}$ まで冷却する間に、ほぼ半数くらいの血球が溶血するようである。

$-10^{\circ}\text{C}$ に達した後、再び同じくらいの速度で加温すると、温度が上るに従って引続いて同様の溶血がみられる。 $0^{\circ}\text{C}$ 付近に近づいて氷が全部融解する頃には殆どの血球が溶血してしまうのである。

以上の凍結融解過程での溶血の状況は図版 I-VI に示す通りである。

## 2. 急速凍結

$-3^{\circ}\text{C}$ とか $-4^{\circ}\text{C}$ とかやや低い温度で過冷却が破れて凍結が始まると、全視野に亘って瞬間的に氷が伸びる。血球はほぼ原形を保ったまま個々に散在して直接氷にとり囲まれており、溶液部分は殆どみとめられない。このような凍り方をした場合は、冷却の過程では氷の状態は変わらないし、溶血もみられない。 $-10^{\circ}\text{C}$ に達した後加温しても、暫くは氷のパターンは変わらず、細胞にも変化はない。 $-4^{\circ}\text{C}$ 乃至 $-3^{\circ}\text{C}$ まで温度が上がると、個々の氷晶の境界線或いは細胞の周辺が漸く融解し始め、細胞もその中にとけこむようにならなくなって消失して行く。

なおこのような凍結のパターンを示すものでは、 $-10^{\circ}\text{C}$ まで達しなくても、 $-4^{\circ}\text{C}$ 或いは $-5^{\circ}\text{C}$ まで冷却した後融解しても、殆ど完全に近い溶血を起こした。これらの経過は図版 VII に示されている。

### 血球濃度の高い場合

全般的な傾向としては、先に述べた血球濃度の低い場合と同じような形態の変化を示す。ただ凍結の過程では、氷に囲まれた溶液部分には血球が密閉充満し、温度の低下に伴い溶液部分が縮少するに従って、殆どの血球が溶血を起こした(図版 VIII-IX)。

## IV. 考 察

凍結融解によって溶血が起こることは、かなり古くからわかっていたに拘らず、それが凍結の過程で起こるものか、融解の過程で起こるものかは、はっきりしていなかった。

溶血度を知るためには、通常遊離ヘモグロビン量を定量的に測定するのであるが、凍結と融解の両過程を分けてそれぞれ測定することは不可能であった。

一方、形態的観察でも、凍結及び融解の全過程の観察が不充分であったように思われる。特に特殊な低温顕微鏡の不備、或は実験上の工夫の不足から、この点を明らかにすることがで

きなかったものと考えられる。即ち、氷晶の成長と溶液の濃縮をできるだけ徐々に進行させるためには、なるべく凍結点に近い比較的高い温度で凍結を開始させた上で、ゆっくりと冷却して行く必要がある。かつて、Rapatz and Luyet<sup>11)</sup> があれほど精細な血球の凍結状態の観察を行ないながら、その過程での溶血を見逃していたということは、余りに各時点での形態的所見(特に細胞の収縮像)にのみとられて、動的立場での観察をおこたったからであろうと思われる。実際に顕微鏡を覗いていただけでは、なかなか溶血の過程の実態をつかむことは難しい。むしろ経時的に撮影された写真を後でよく観察することによつて、溶血の様子を知ることができるのである。

Smith 等<sup>10)</sup> は、その論文の付図の説明中に、 $-10^{\circ}\text{C}$  から  $-20^{\circ}\text{C}$  への冷却の過程で、血球中のあるものが溶血したと記載しているが、実際に掲載された写真では個々の血球の溶血状態が余りはっきりしていない。

この凍結の過程に比較すれば、融解過程の方が観察し易いので、融解過程での溶血についての詳しい報告はある。Luyet and Pribor<sup>12)</sup> は、 $-10^{\circ}\text{C}$  及び  $-20^{\circ}\text{C}$  まで凍結した試料では、融解過程での溶血の始まる温度が異なると述べている。

いずれにせよ、本実験では、 $-10^{\circ}\text{C}$  くらいまでの比較的緩慢な速度での凍結と融解では、両過程で溶血の起こることが明らかにされたわけである。この溶血の機構については別に詳細に検討するが<sup>14)</sup>、今、形態的観察で得られた結果からだけ考えても次のような特徴があげられる。

- 1) 凍結過程だけで、血球総数の半分くらい(低濃度浮遊液)又は殆ど(高濃度浮遊液)が溶血をおこす。
- 2) 上記のように細胞濃度の高い方が、凍結過程での溶血が強い。
- 3) 急速凍結のものが、比較的高い温度でしかも強い溶血度を示す。

これらの事実から溶血の機序を考えてみるのに、融解過程は別としても、少なくとも凍結過程では、細胞はいずれも細胞外凍結で細胞内凍結はおこしていないものと考えられる<sup>1)</sup>ので、塩の濃縮による塩害ばかりでなく、更にその上に、細胞のうける機械的障害が溶血の大きな因子をなしているものと思われる。

## V. 摘 要

凍結点から  $-10^{\circ}\text{C}$  くらいまでの温度範囲での凍結融解の過程を、特殊低温顕微鏡によって詳細に観察した結果、赤血球は凍結及び融解の両過程に於て溶血を起こすことをみとめた。

その溶血の機構に関しては、形態的な観察だけからしても、凍結による溶血には、細胞外氷晶の成長に伴なう機械的障害が重要な因子をなすものと思われた。

## 文 献

- 1) Nei, T., Kojima, Y. and Hanafusa, N. 1964 Hemolysis and morphological changes of erythrocytes with freezing. *Contr. Inst. Low Temp. Sci.*, **B13**, 1-6.

- 2) 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**, 95-124.
- 3) Rapatz, G., Nath, J. and Luyet, B. 1963 Electron microscope study of erythrocytes in rapidly frozen mammalian blood. *Biodynamica*, **9**, 83-94.
- 4) Lovelock, J. E. 1953 The haemolysis of human red blood-cells by freezing and thawing. *Biochim. Biophys. Acta*, **10**, 414-426.
- 5) Meryman, H. T. (ed.) 1966 Cryobiology, Academic Press, London, 775 pp.
- 6) Meryman, H. T. 1966 Review of biological freezing. In *Cryobiology* (H. T. Meryman, ed.), Academic Press, London, 50-58.
- 7) Mazur, P. 1966 Physical and chemical basis of injury in single-celled microorganisms subjected to freezing and thawing. In *Cryobiology* (H. T. Meryman, ed.), Academic Press, London, 301-304.
- 8) Doebbler, G. F., Rowe, A. W. and Rinfret, A. P. 1966 Freezing of mammalian blood and its constituents. In *Cryobiology* (H. T. Meryman, ed.), Academic Press, London, 412-414.
- 9) Meryman, H. T. 1967 The relationship between dehydration and freezing injury in the human erythrocyte. In *Cellular Injury and Resistance in Freezing Organisms* (E. Asahina, ed.), *Inst. Low Temp. Sci.*, Sapporo, 231-244.
- 10) Smith, A. U., Polge, C. and Smiles, J. 1951 Microscopic observation of living cells during freezing and thawing. *J. Roy. Microscop. Soc.*, **71**, 186-195.
- 11) Rapatz, G. and Luyet, B. 1960 Microscopic observations on the development of the ice phase in the freezing of blood. *Biodynamica*, **8**, 195-239.
- 12) Luyet, B. and Pribor, D. 1965 Direct observations of hemolysis during the rewarming and the thawing of frozen blood. *Biodynamica*, **9**, 319-332.
- 13) 根井外喜男・岡田次郎 1967 低温顕微鏡の試作. 低温科学, 生物篇, **25**, 149-153.
- 14) 根井外喜男 1967 氷点に近い温度での凍結による溶血の機構. II. 種々の凍結条件による溶血の吟味. 低温科学, 生物篇, **25**, 133-142.

### Summary

In order to elucidate the mechanism of hemolysis of erythrocytes by freezing at temperatures ranging from freezing point to  $-10^{\circ}\text{C}$ , a morphological study with a cryo-microscope was made throughout the entire process of freezing and thawing.

Observations revealed that some of the erythrocytes were hemolysed as the temperature decreased during the freezing process, while others were hemolysed during the thawing process upon rewarming.

It was noted that concentrated cell suspensions gave rise to a higher degree of hemolysis during the freezing process.

Rates of cooling likewise showed some influence upon the freezing pattern and hemolysing process in the samples.

## 図版説明

## 図版 I-VI

0.15M NaCl 溶液の血球浮遊液を、 $-1.5^{\circ}\text{C}$  付近で植氷し、 $1^{\circ}\text{C}/\text{min}$  の速度で  $-10^{\circ}\text{C}$  まで冷却し、更に温度を上げて融解する全過程に亘ってみられる溶血の状況を示す。矢印の実線は溶血開始直前の血球、点線は溶血直後の ghost を示す。× 600

## 図版 VII

同じ試料を  $-3^{\circ}\text{C}$  で植氷し、 $-6^{\circ}\text{C}$  まで冷却した凍結融解過程の凍結の pattern と溶血の状況を示す。× 1000

## 図版 VIII-IX

やや血球濃度の大きい試料の凍結融解過程の溶血の状況、 $-10^{\circ}\text{C}$  までの凍結の過程で大部分の血球が溶血することを示す。× 1000

















