



Title	高張塩溶液に於ける赤血球の溶血現象
Author(s)	根井, 外喜男; NEI, Tokio
Citation	低温科学. 生物篇, 25, 143-147
Issue Date	1967-12-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/17729
Type	departmental bulletin paper
File Information	25_p143-147.pdf



高張塩溶液に於ける赤血球の溶血現象*

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

さきに行なった実験¹⁾の結果、凍結による溶血には二つの主要因子が関与するものと解釈された。即ち、一つは、比較的高い温度での緩慢凍結で、細胞外凍結の結果、濃縮塩溶液にさらされる為の害と考えられるものであり、他は、ごく低い温度での急速凍結で、細胞内凍結をおこしたための機械的障害と考えられるものである。

前者の濃縮塩溶液による溶血については、既に Lovelock²⁾ によって提唱されており、これまで長い間、この塩害が血球に於ける凍害の唯一の原因であるかのように見做されてきた。しかし、その溶血が果して塩害のみで説明されるかどうか、目下種々の角度から検討中である。本実験は、その目的のために行なわれた研究の一環をなすものである。

一般に赤血球が溶血をおこす場合の原因としては、種々の因子があげられ、それらの因子によって、物理的、化学的或いは生物学的溶血などと分けられている。物理的因子のうちでは、滲透圧的溶血が、いろいろの立場から一番詳しく検討されている。しかし、それも殆どすべて低張塩溶液による溶血についてであって、高張塩溶液による溶血は、余りよくしらべられていない。僅かに Lovelock が彼の凍結実験に於いて対照として高張塩溶液の作用を吟味しているにすぎない。

本実験に於いては、凍害機構解明の一助として、高張塩溶液による溶血を種々の立場から検討してみたのである。

II. 実験方法

試料： 蔘酸カリ加家兎血液を 0.15 M 食塩溶液で 3 回洗い、各種濃度の食塩溶液に血球濃度が原血液のその 1/10 になるように加えて、終末食塩濃度が 0.15~3 M となるような血球浮遊液を作った。

溶血度の測定： 各種処理試料の遠沈上清を適宜に稀釈して KCN を加える。これを光電比色計にかけ、540 m μ に於ける吸光度を測定した。対照には蒸留水溶血のものをとり、それに対する百分率を以って溶血度としたので、時には 100% 以上になることがある。

形態的観察： 通常の光学顕微鏡及び特殊な真空装置付顕微鏡を用いて、血球の形態的变化、特に溶血過程の動的变化を観察した。

* 北海道大学低温科学研究所業績 第 855 号

機械的な力による細胞のもろさの測定： 外部からの機械的な力に対して血球がその形、性質、状態等によってどんな抵抗性を示すかを知るための一つの方法として、超音波の影響をしらべた。久保田製超音波発生装置 KMS-250 型を使用し、15 ml 容量の容器に 7 ml の試料を入れ、10 KC、出力 100~180 W の範囲で 30 秒間作用させた後の遠沈上清について溶血度をしらべた。

III. 結 果

食塩濃度と溶血度

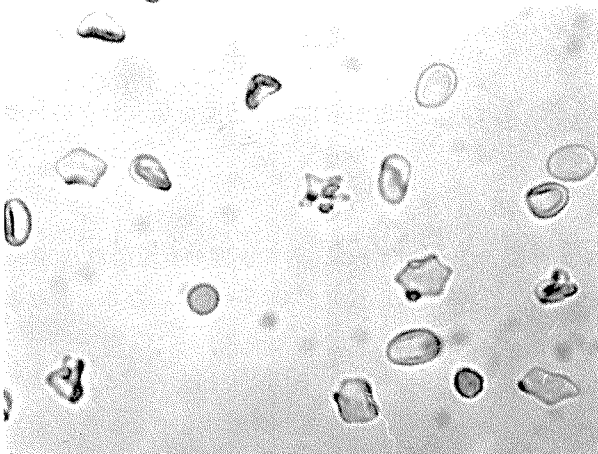
赤血球は高張食塩溶液に浮遊させただけでは、僅かの溶血しかおこさないが、それを 0.15 M の等張まで戻すと溶血は著しく増す。これらの食塩濃度と溶血との関係は第 1 図に示された通りで、食塩濃度が高いほど溶血は強く特有の溶血曲線を書く。

特に等張液に戻した時の溶血曲線は、凍結融解による溶血曲線とほぼ一致した(別報³⁾第 1 図と比較)。

形態的観察

(1) 各種食塩濃度浮遊液中の血球の形状

0.15 M 食塩溶液に浮遊したものは、本来の円盤状形態からかなり球形に近くなる。0.6 M のものでは、周縁がややギザギザした金米糖状である。1 M になると、

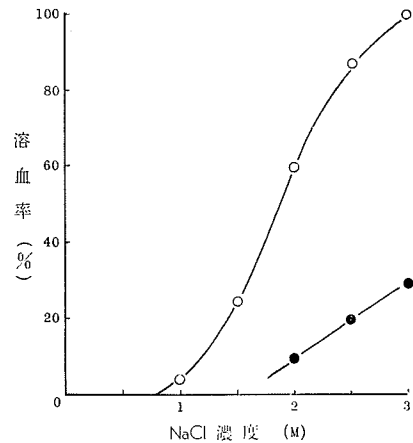


第 2 図 1 M NaCl 溶液に浮遊した赤血球各種の形態を示す。×1,000

個々の血球はかなり収縮しており、幾つかの皺のある細長い形のものが多い。更に濃度が増して 2 M, 3 M となっても、やや程度が強くなるだけで収縮像はほぼ同様であった。

第 1 図 高張塩溶液にさらした赤血球の溶血

●：高張液にさらしただけのもの
○：高張液にさらした後、等張液に戻したもの



個々の血球はかなり収縮しており、幾つかの皺のある細長い形のものが多い。更に濃度が増して 2 M, 3 M となっても、やや程度が強くなるだけで収縮像はほぼ同様であった。

(2) 高張液から等張液に戻したものの

塩濃度の如何にかかわらず、高張液から等張液に戻した後の残存血球は、すべて元の球形に回復する。

(3) 塩溶液の濃縮過程にみられる溶血の状況

上述の高張液中或は等張液に戻した後にみられる血球は、いずれも溶血をおこしたものを除いた残存血

脱水することによって濃縮過程を観察した。先ず顕微鏡下、2枚のガラスに挟まれた薄層試料を減圧すると、周辺部から蒸発脱水されるため、試料の濃縮がおこる。同時に細胞の収縮が始まり、また少数の血球では、次第に褪色し輪郭が不明瞭になってくる。しかし、こういう状況は必ずしも周辺部から中心部に向って進行するとは限らないし、血球の収縮がみられる範囲も僅かの部位に限られていて、それほど広くはない。もちろん、試料中の各部位の脱水の程度、換言すれば、塩の濃縮の度合いなど、定量的に測る方法はない。

乾燥が進むと、液状をなしている試料の境界面が次第に後退し、血球は濃縮部分に押しやられて密集する。特に狭い間隙に多数の血球が挟まれて境界面から圧迫された時には、殆どの

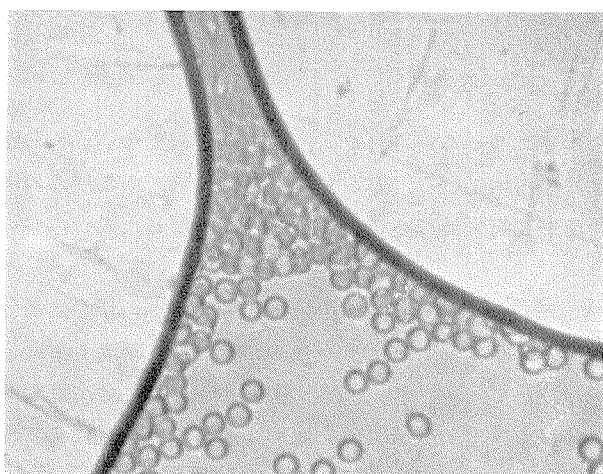
血球が溶血をおこす(第3図参照)。

また極端に濃縮されたため溶液中に NaCl の結晶が析出されるようになって、その結晶に接した血球で intact のまま溶血をおこさず残っているものが多い。これは塩の濃縮だけでは溶血しない血球のあることを示す(第4図参照)。

機械的な力による細胞の

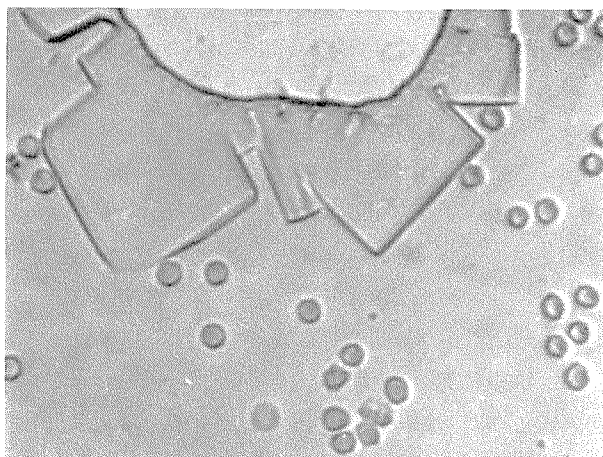
もろさの測定

機械的障害に対する抵抗性を測る一手段として、超音波による溶血度をしらべた。その結果は第5図に示すように、出力が140 W くらいまでは、0.15 M 浮遊液が一番溶血が少くないが、それを越すあたりから急激に溶血を増し、高張のものより逆に



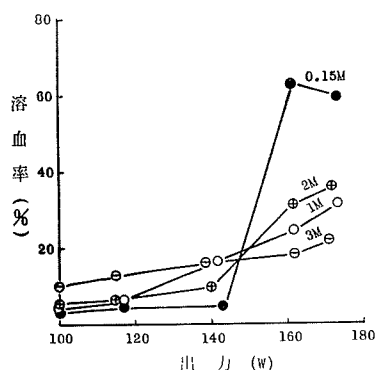
第3図 減圧脱水過程の赤血球の溶血

特に圧縮密集血球にみられる完全溶血の状況を示す
左右の円弧内は乾燥部分。×700



第4図 減圧脱水過程の赤血球

濃縮塩溶液中、析出した NaCl 結晶に接して赤血球の存在を示す
上方の円弧は乾燥部分。×700



第5図 各種塩濃度浮遊液の超音波処理による溶血

高くなる。1, 2, 3 M ではほぼ似たような値で、出力が増すと共に溶血が漸増する。

一旦 1 M にさらした血球でも、これを 0.15 M に戻すと、最初から 0.15 M においたものと同じ値を示した。

以上のように、塩濃度によって溶血曲線に明らかな差はあったが、血球濃度については塩濃度が違っても同様の傾向を示した。

即ち第 1 表にみられるように、血球数が少なくなるほど、溶血度は低下した。

第 1 表 血球濃度と超音波作用による溶血度との関係 (出力 170 W)

浮遊液中の血球濃度*	溶 血 率 (%)	
	0.15 M 浮遊液	1 M 浮遊液
1/3	100	67
1/30	93	42
1/100	54	40

* 全血の血球濃度を 1 とする

IV. 考 察

従来、生理学的な立場から赤血球の溶血についてなされた研究報告は極めて多い。そのうちでも滲透圧的溶血に関するものが大部分を占めている。しかし、それらは殆ど低張液に於ける溶血であって、高張液それ自身、或いは一旦高張液にさらした後等張液に戻した場合についての実験は殆ど見当たらない。

僅かに Lovelock²⁾ が、凍結による溶血の機序の説明に、高張液及び等張液への戻しに於ける溶血を引用し、凍結による溶血は塩害を主因とするものであると述べている。著者もまた、 -10°C くらいまでの温度での凍結による溶血が、果して塩溶液の濃縮ということだけで解釈できるかどうか吟味するため、一方には各種条件での凍結実験を進めながら、他方にはそれと平行し、しかもその裏付けとして本実験を行なったのである。

特に別報^{3,4)} に明らかなように、この温度範囲での凍結では、氷晶形成による血球への機械的障害がかなり重要な役割をすることがみとめられたので、本実験に於いても、高張液にさらされた血球の物理的な外的条件の吟味が主として行なわれた。

先ず、食塩濃度と溶血の関係をしらべた結果は、家兎血液に於いても、Lovelock が人血液に於いてみとめたとはほぼ同様の溶血曲線が得られ、高張溶液にさらすだけ、或いは更に等張液に戻すことによって溶血を起こすことがみとめられた。

一方、顕微鏡のもとで濃縮過程を観察するのに、濃縮だけでは譬え塩溶液が飽和に達しても(結晶の析出)溶血に至らない血球が多い。しかし、溶液中に血球が密閉圧縮されたような状態になった場合は、殆んど完全溶血を起こすことがみとめられた。このことは、機械的な力が溶血に作用していることを思わせる。

更に、形態的な観察で、1 M 溶液での血球は、かなり高度の収縮像を示すに拘らず、それだけでは溶血を起こさず、0.15 M に戻せば、完全に元の球形に戻るし、溶血も殆どおきない。

従って 1 M 浮遊液では、血球の膜透過性には余り障害はおきていないものと考えられる。ところが、0.15 M 浮遊液と 1 M 浮遊液との超音波による溶血を比較してみると明らかな差がみとめられる。しかも、この場合にも 1 M 浮遊血球を 0.15 M に戻せば、0.15 M のものと同じ傾向を示すのである。超音波の細胞破壊作用の機序が必ずしも明らかでないし、また本実験の結果

として、0.15 M と 1 M とで、出力と溶血度の関係が交叉する事実など、どのように説明してよいかかわからないが、両者の膜機能は滲透圧的溶血性について殆んど差がないことからすれば、形態的の差違 (球形と紡錘形) が、溶血の差をもたらすのであろうか。ここでもまた、凍結実験の結果³⁾ と同じように、血球濃度が溶血度に影響を及ぼしていることから推論すれば、高張浮遊液での超音波作用でも機械的因子が大きな役割をしているものといえよう。

もし想像が許されるならば、高張溶液中での収縮細胞に見られるような不規則な形態が、相互の接触、或いは外部よりの機械的な作用による障害をうけ易くしているのではあるまいか。或いは、これがまた凍結の際の血球障害の一因になるのではないかとさえ想像される。

V. 摘 要

高張食塩溶液での赤血球の溶血の状況及び超音波による作用を検討した結果

- 1) 高張塩溶液にさらしただけでは僅かの溶血しかおきないが、等張溶液に戻すと溶血は著しく増した。塩濃度に相応し、特有の溶血曲線画いた。
- 2) 食塩水浮遊液の濃縮過程、特に細胞の密集状態に於いて、血球の強い溶血がみられた。
- 3) 等張浮遊液と高張浮遊液とでは、超音波による障害作用は異なるが、いずれも細胞濃度が大きい程溶血は強かった。

文 献

- 1) Nei, T. Kojima, Y. and Hanafusa, N. 1964 Hemolysis and morphological changes of erythrocytes with freezing. *Contr. Inst. Low Temp. Sci.*, **B 13**, 1-6.
- 2) Lovelock, J. E. 1953 The haemolysis of human red blood-cells by freezing and thawing. *Biochim. Biophys. Acta*, **10**, 414-426.
- 3) 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.
- 4) 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. I. 凍結及び融解過程での形態的变化. *低温科学, 生物篇*, **25**, 127-132.

Summary

As a control experiment for elucidating the mechanism of hemolysis of erythrocytes by freezing at near-zero temperatures, the effect of hypertonic salt solution upon hemolysis was investigated.

- 1) While exposure of erythrocytes to hypertonic solution resulted in a slight hemolysis, a transfer from hypertonic to isotonic solution produced an intense hemolysis corresponding to the salt concentration.
- 2) The hemolysing process of erythrocytes was observed during the concentration process of suspending salt solution. Dense packing of erythrocytes in a narrow space resulted in complete hemolysis.
- 3) Erythrocytes suspended in isotonic solutions showed different hemolysis curves as a result of mechanical damage by ultrasonic effect. Highly concentrated cell suspensions indicated a higher rate of hemolysis.