



Title	氷点に近い温度での凍結による溶血の機構 III : 溶血の因子についての一考察
Author(s)	根井, 外喜男; NEI, Tokio; 丹野, 皓三 他
Citation	低温科学. 生物篇, 26, 91-97
Issue Date	1968-11-25
Doc URL	<a href="https://hdl.handle.net/2115/17743">https://hdl.handle.net/2115/17743</a>
Type	departmental bulletin paper
File Information	26_p91-97.pdf



## 氷点に近い温度での凍結による溶血の機構 III\*

溶血の因子についての一考察

根井外喜男・丹野皓三

(低温科学研究所 医学部門・生物学部門)

(昭和43年9月受理)

### I. 緒言

赤血球を凍結融解すると溶血をおこす。しかも、その溶血の機構は、凍結温度や凍結速度によって異なるものと考えられる<sup>1,2)</sup>。特に氷点から $-10^{\circ}\text{C}$ までの比較的高い温度での凍結による溶血は、濃縮された塩溶液によるいわゆる塩害の外に、氷晶形成にともなり機械的障害によることが、幾つかの事実から裏付けられた<sup>3,4)</sup>。そこで、この機械的障害がどんな機序によっておこるかについて、更に追究を続けた。

本論文においては、いろいろの傍証から、凍結による溶血の機序についての考察を進めた。特に試料中の血球濃度によって溶血が異なるという事実に重点をおいて、新しい説明を試みたものである。

### II. 材料と方法

**試料:** 蓚酸カリ加新鮮ウサギ血球を生理食塩水(0.15 M NaCl)で3回洗い、全血液とほぼ同じ濃度(packed cell 40%, NaCl 溶液 60%)の血球浮遊液を作った。これを原液として、その1/10、1/100濃度の血球浮遊液を試料として用いた。

**凍結融解:** 上記の血球浮遊液を0.2 ml ずつ、径12 mmの小試験管にとり、アルコールを冷媒とするHaakeの低温槽に浸して所要の条件で凍結させた。即ち $-1.0\sim-1.5^{\circ}\text{C}$ で植氷し、 $1^{\circ}\text{C}/\text{min}$ の冷却速度で、 $-10^{\circ}\text{C}$ までの各種温度に冷却し、それぞれの温度に10分間おいた後、 $+20^{\circ}\text{C}$ の水浴槽に移して融解させたものである。

**形態的観察:** 血球浮遊液を1滴試料台にとり、カバー・ガラスを載せて薄層試料とし、特殊低温顕微鏡にセットして、冷却を開始する。 $-1\sim-2^{\circ}\text{C}$ の間で植氷し、さらに $-10^{\circ}\text{C}$ まで冷却して、その過程での試料の変化を観察した。

**溶血度測定:** 上記のように試験管内で凍結融解した試料を適當の濃度までうすめ、その遠心上清中に遊離したヘモグロビン量を $540\text{ m}\mu$ の波長で比色定量した。対照には蒸溜水を加えて完全溶血させた試料をとり、その値に対する凍結融解試料の値を百分率で表わした。

\* 北海道大学低温科学研究所業績 第924号

一方、血球濃度を順次低くする実験では、全血液の1/10量の血球濃度の試料までは、上記の比色定量法を用いることができるが、それよりうすいものでは測定値が小さくて判定が困難になるので、血球数の測定をもってこれに代えた。即ち残存血球数から逆算して溶血度をもとめたのである。

**ヘマトクリット値測定：**種々の塩濃度の溶液中での血球の形態と、その時の血球の圧縮による充填の状況をしらべるため、ヘマトクリット法を用いて、遠沈による血球の沈澱量から血球の充填の程度をもとめた。即ち、久保田製ヘマトクリット用特殊遠心器及び沈澱管を用い、ほぼ0.1 mlの試料について測定した。1, 2, 3 M食塩溶液での血球の沈澱量を、0.15 M溶液でのそれと比較したものである。

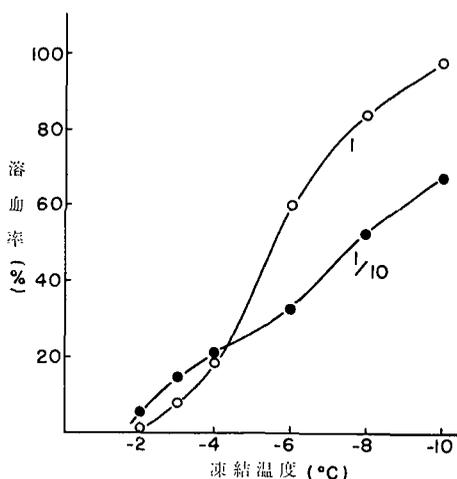
### III. 結果並びに考察

#### 血球濃度と凍結による溶血度との関係

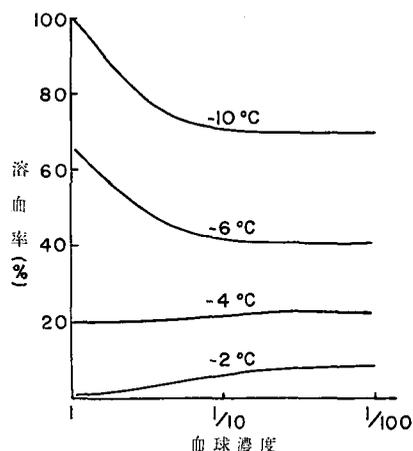
第1図の溶血曲線は、血球の食塩浮遊液の原液と、その1/10濃度の浮遊液についての比較である。その結果は既に報告したように、両曲線はほぼ $-4^{\circ}\text{C}$ 付近で交叉し、それより温度の高いところでは1/10濃度のほうが、また温度の低いところでは原濃度のほうが、それぞれ溶血が強かった。今回は特に $-1\sim-4^{\circ}\text{C}$ 間について反覆吟味し、この事実を確認した。

更に残存血球数を測定する方法によって、血球濃度の少ない1/10のものについても、原液及び1/10のものと比較検討した結果、各種凍結温度において第2図のような溶血曲線を得た。即ちこの場合にも、温度の高いところと低いところで、血球濃度によって逆の関係がみられた。なお1/10と1/100の間では大差はみとめられなかった。

いま、この条件での溶血の機序を考えてみる。前報でも述べたように、このような緩慢凍



第1図 血球濃度による溶血曲線の差違  
 $-10^{\circ}\text{C}$ までの凍結における血球浮遊液の原液と1/10濃度のものの比較  
(ヘモグロビンの比色定量による)



第2図 各種凍結温度での血球濃度と溶血率との関係  
(残存血球数の測定による)

結の条件では、試料は細胞外凍結をおこす結果、細胞はみな脱水収縮し、細胞内に氷晶を形成するものはない<sup>5)</sup>。細胞内凍結をおこすものがないとすれば、この場合の凍結による溶血については、Lovelock のような塩害<sup>6)</sup>を先ず考えねばならないであろう。塩害を考えるとすれば、塩濃度は凍結温度によってきまるものであるから、凍結温度が異なると溶血度も当然異なる筈である。しかし血球濃度は変わっても、塩濃度は変わるとは思われぬから溶血度に影響はない筈である。ところが本実験でもみられるように、実際には血球濃度によって溶血曲線に明らかな差ができていたので、その原因は塩害以外に求められねばならない。いま、凍結による溶血の原因を、細胞内凍結や塩害などの外にもとめるとして、一体どのようなことが考えられるであろうか。

従来、各種の細胞の凍結障害の機序を論ずるに当って、いくつかの原因があげられ、機械的障害もその1つに数えられていた。しかしいろいろの反証から、この機械的障害説はしばしば否定され、特に血球のような動物性細胞では、ほぼ塩害説一辺倒の感があった。ところが、その塩害説もあてはまらないとすれば、この辺でもう一度、機械的障害の可能性を検討し直してみる必要はないだろうか。

そこで、第1図の所見について再び考えをめぐらしてみる。特に、血球濃度によって溶血曲線が平行移動するのではなく、温度の高低に従って互に逆転するというこの事実を、機械的障害の面からとり上げるとすれば、どう説明すべきかが問題である。この点の本論文における重要な論点であって、いろいろの立場からこれを検討してみたい。

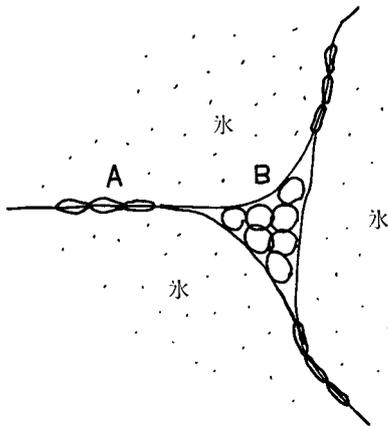
#### 凍結試料の形態的観察

-1°C 付近で植氷して徐々に試料温度を下げると、氷晶は樹枝状に伸びて相接し、その中に溶液部分を閉じこめる。凍結しうる水分中の80%くらいが-3°Cまでに、また90%くらいが-5°Cまでに氷となる筈であるから、-4~-5°Cくらいの温度までの冷却で、試料の凍結のパターンはほぼきまってしまう、あとは温度の低下に伴って僅かに溶液部分が縮少するにすぎない。この凍結過程を実際の薄層試料について更に詳しく顕微鏡的観察をすると、氷の伸びるに従って大部分の血球は溶液部分の中に押しやられるが、少数の血球は個々に散在したまま直接氷に閉じこめられてしまうのがわかる。これは恐らく薄層試料中にできた氷の上面或いは下面に当たるところで、隣同志の氷晶の間、或いは氷晶とカバー・ガラスとの間に挟まれたものと思われる。試料の凍結のしかたはこれで大体きまり、その後は温度が下がるに従って、氷晶は成長し、溶液部分は縮少するので、その中に押しこめられた血球は次第に密に充填し、やがて溶血をおこして視野から消えるものもできてくる<sup>3)</sup>。

さて、こうした凍結のパターンを、前記の特徴ある溶血曲線と結びつけて、次のような推定を試みた。

血球の食塩水浮遊液を凍結させる場合、氷点より僅かに低いところで植氷し徐々に冷却すると、血球は2つの形式の凍り方をする。1つは凍結の初期に大部分の水が氷晶に変わる時、試料中に散在していた個々の血球がそのまま氷晶の間に挟まれて直接氷に接するという場合である。他は氷晶の成長に伴い氷晶の間に濃縮溶液がとじこめられ、血球がその中におしやられ

る場合である。前者は個々の細胞で一層にしかならないが、後者は多数の細胞集団からできている。この集団の最外層は水に接するが、内部の細胞は相互に接触している。温度が下がり氷晶が成長すると溶液部分は縮小しその中の細胞はますます密に充填するようになる。



第3図 緩慢凍結の場合の試料中血球の凍結状態 (模式図)

−4〜−5°Cの凍結で殆んどきまってしまう。大部分の血球は濃縮溶液の中に押しこめられるが、このくらいまでの温度では、塩濃度はまだあまり高くないし、細胞もそれほど充填しないので、塩害や機械的障害で溶血をおこすものは少ない。しかし少数ながら、溶液内に押しやられずに、始めから直接水に閉じこめられた血球は水の圧縮による機械的障害で溶血をおこすものと考えられる。但しこの種の凍り方をする血球の割合は、氷晶のパターンによってきまるので、一定数を越えることはない。いま、使用した試料中の総血球数を  $T$ 、水の圧縮によって溶血をおこした細胞数を  $A$  とすれば、溶血率は  $A/T \times 100$  で表わされる。もし出発材料の血球濃度が違っても、冷却の条件が一定である限り、できる氷のパターンが一定であるとするならば、 $A$  は一定限界を越えることはできない筈である。従って血球濃度が変わった場合、例えば濃度が低いと  $T$  は小さくなり、溶血率  $A/T$  は大きくなるわけである。

実際に実験結果として原液よりも 1/10, 1/100 濃度のものが、−1〜−4°C の範囲で溶血率が大きいという事実に対しては、以上のような説明が妥当であろうと思われる。

#### 低い温度での凍結による溶血の機序

##### (1) 凍結による試料中の生成水量

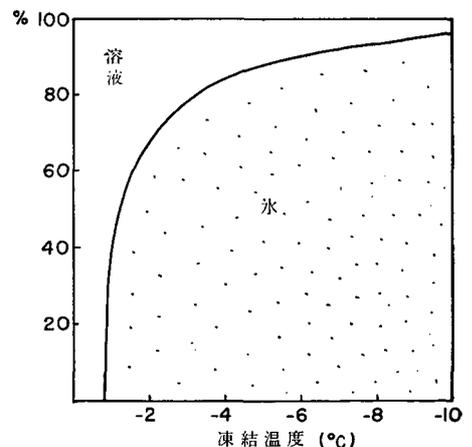
0.15 M NaCl 溶液について、その氷点降下度

以上のような凍結状態を想定するとき、この種の条件では、試料中の細胞はこれら2種のうちいずれかの凍り方をするものと考えられる。第3図はそれを模式的に表現したもので、最終的には1つの試料の中に両者が混在しているが、どちらが凍結過程のどの段階で多く現われるかが問題なのである。

#### 高い温度での凍結による溶血の機序

前記溶血曲線のうち、両曲線が交叉する点を境にして、それより温度の高い部分と低い部分に分けて考えることとし、先ず氷点から −4°C くらいまでについて考察してみる。

この種の試料でできる氷晶のパターンは、



第4図 凍結温度と水量との関係  
0.15 M NaCl についての計算値

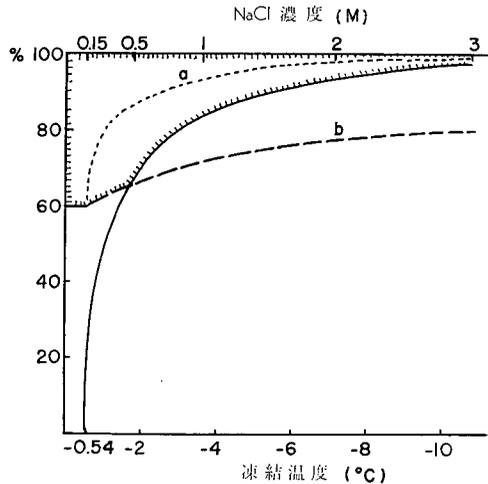
から、各温度における生成水量を計算すると、第4図に示すような曲線が得られる。それによれば、 $-4^{\circ}\text{C}$  では含有水分中の凡そ85%が氷になっていることがわかる。

## (2) 血球の充填度

本実験においては、血球濃度がほぼ全血液のそれに等しい血球浮遊液 (packed cell 40, 0.15 M NaCl 溶液 60 の割合) を原液として用いた。この試料が冷却されて、0.15 M NaCl の氷点  $-0.54^{\circ}\text{C}$  以下のところで植氷され、さらに温度が低くなると、次第に水量は増し塩溶液は濃縮される。いま、種々の濃度の溶液中での血球の総容積と充填度とを考えてみると、血球は塩濃度に対応して滲透圧的に脱水収縮するものであるから、血球の総容積としては、出発材料で40%のものなら、血球の固形成分を除外すれば終始40%のままの筈である。従って、凍結温度が下がり溶液部分の容積が縮小しても、それに相応して血球がよく充填するものならば、溶液中に血球が充満することはなく、いつも余裕があっていいことになる。

ところが実際に、各種塩濃度の溶液について packed cell の充填度をしらべてみると、必ずしも容積減少に比例しないことがわかった。即ち種々の塩濃度の溶液で血球浮遊液を作り、ヘマトクリット法で血球の沈澱量を測ると、第5図のbのような曲線を画く。これは各濃度での沈澱量が、理論値の総容積(a曲線)よりかなり大きく、血球が理想的には最密充填しないことを示す。従って、凍結過程においても、各温度での細胞の占めるかさは、溶液部分の容積より大きい、つまり、氷晶の成長に伴って溶液部分の容積が縮小するのに、血球はそれほど充填しないということになる。血球が理想的に最密充填しないのは、さきにも形態的所見で報告した<sup>7)</sup>ように、高張塩溶液中の血球は極めて多種多様の不規則な形態(主として収縮像)をとるからであると考えられる。こうした結果としては、血球は溶液に入りきらずにみ出すことになるので、両者が等しくなるまで、血球のかさべりが行なわれねばならないわけである。そのためには、周囲からの氷の圧縮による血球の変形もあろうし溶血による ghost 化もおこることになる。

血球は ghost になれば、ヘマトクリット量は intact の時の凡そ1/10くらいまで減少することが対照実験で確かめられたので、一部の血球の溶血によって、残存血球は容易に溶液部分に納まることになるだろう。既報の観察結果<sup>3)</sup>のように、 $-10^{\circ}\text{C}$  までの凍結の過程で溶血のおこるというのは、このような想定からも説明されよう。実際に溶血をおこす直接の原因には、



第5図 凍結試料中の溶液部分の容積と血球の占める容積との関係

各凍結温度に相当する塩濃度の溶液中で占める血球の容積について、滲透圧の上から推定されたものを a、実際にヘマトクリット法で測定されたものを b とする

氷そのもの及び細胞相互の圧縮の両方が考えられるのであろう。こうした機械的な力のために、細胞膜に障害をきたし、溶血をひきおこすものと思われる。

-10°C までの冷却過程では、温度が低下するに従い、溶液部分の容積が縮少し血球が圧縮されると、それだけ溶血を増して行くことになる。この密に充填するための細胞の機械的障害を考えるならば、出発材料中の細胞数が多いほど、細胞障害が大きくなることは当然考えられるところであろう。

以上の実験結果並びに考察を要約すれば、-10°C までの凍結実験において、血球の凍り方に2つの形式が考えられる。即ち、少数の血球で個々に直接氷に圧縮されるものと、多数の血球で濃縮溶液中に閉じこめられるものとのである。前者による溶血は比較的温度の高いところで現われはじめ、しかも血球数は一定限度を越すことはないと考えられるので、血球濃度が大きくなるほど溶血度は小さくなるわけである。次に更に温度が低くなると、溶液の中の多数の血球は、塩濃度の増加と密な充填による機械的障害で溶血をおこすものと考えられるから、今度は逆に、血球濃度の大きいほうが充填度が大きく、それだけ機械的障害がひどくなって、溶血度も大きくなるものと思われる。

前の報告<sup>4)</sup>でも述べたように、血球の凍結による細胞障害の機序については、塩害或いは細胞内凍結による障害と並んで、細胞外氷晶形成に伴う機械的障害が溶血の主要原因の1つとなることを重ねて強調したい。

#### IV. 摘 要

前報並びに今回の実験結果から、氷点以下 -10°C の範囲での緩慢凍結による溶血は、塩害の外、氷晶形成に伴う機械的障害が原因と考えられる。特に血球濃度が違うと、凍結による溶血曲線も変わるということは、機械的障害を支持する有力な事実と思われる。また凍結温度の高いところと低いところで、血球濃度に対して溶血曲線が逆転することについては、前者では直接氷に圧縮された少数血球の溶血、後者では溶液中に充填された細胞の相互の機械的圧縮による溶血が、それぞれ主役をなすためと解釈された。

#### 文 献

- 1) 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.
- 2) Nei, T., Kojima, Y. and Hanafusa, N. 1964 Hemolysis and morphological changes of erythrocytes with freezing. *Contr. Inst. Low Temp.*, **B, 13**, 1-6.
- 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. 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.
- 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. 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.
- 5) 小島義夫 1965 家兎血液の凍結による障害. III. 電子顕微鏡による形態的観察. 低温科学, 生物篇, **23**, 129-148.
- 6) Levelock, J. E. 1953 The haemolysis of human red blood-cells by freezing and thawing. *Biochim.*

*Biophys. Acta*, **10**, 414-426.

7) 根井外喜男 1967 高張塩溶液における赤血球の溶血現象. 低温科学, 生物篇, **25**, 143-147.

### Summary

Results obtained previously suggested that mechanical injury, other than salt injury, may be one of the main factors responsible for lysis of blood frozen at temperatures ranging from the freezing point to  $-10^{\circ}\text{C}$ .

In the present experiments, an attempt was made to correlate hemolysis with cell concentration. The relationship between the formation of ice and the packing of cells in the liquid channels was subjected to quantitative study with reference to decreasing temperature.