



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	凍結による赤血球膜の障害 I : コリンエステラーゼ活性におよぼす凍結の影響
Author(s)	根井, 外喜男; NEI, Tokio
Citation	低温科学. 生物篇, 28, 11-19
Issue Date	1971-01-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/17764
Type	departmental bulletin paper
File Information	28_p11-19.pdf



凍結による赤血球膜の障害 I*

コリンエステラーゼ活性におよぼす凍結の影響

根井 外喜男

(低温科学研究所)

(昭和 45 年 7 月受理)

I. 緒 言

凍結によって生細胞がどのような障害をうけるのかについては、近年多くの研究者により種々の角度から検討されるようになってきた。特に微生物に関してはかなり詳細な吟味が行なわれ、幾つかの事実がみとめられた¹⁾。代謝障害や細胞膜障害(選択透過性の変化)などが次第に明らかになってきたのである。

一方、赤血球については、凍結に関する実験は極めて多数にのぼるにかかわらず、そのほとんどが溶血だけをめやすにしてしらべられたものである。哺乳類の赤血球のように核のない細胞では、他の増殖性の細胞のような複雑な細胞内構成物を考慮する必要はなく、凍結障害としては、まず細胞膜の変化だけを考えればよいことになる。溶血即ちヘモグロビンの遊出とは、細胞膜の変化の結果としておこる一つの現象といえよう。しかも溶血の原因としてはいろいろの因子があげられているので、等しく溶血とはいっても、その因子によって細胞膜の変化に質的な差異のあることが想像される。本研究の主題である凍結融解でも溶血をおこすことは早くからわかっているが、それがどのような膜障害によるものかは、まだ充分明らかにされていない。Lovelock の塩害説²⁾も、高張塩溶液での実験結果を凍結にあてはめて推測したにすぎず、最近では塩害説に対する種々の批判^{3,4)}も出ているので、もっとよく検討する必要がある。

凍結による血球膜の機能の変化に関する研究としては、保護物質を加えての保存で正常血球と比較して差の有無を論じたものがほとんどである。凍結融解そのものによる膜の影響としては、僅かに酵素機能の増加⁵⁻⁷⁾、抗原性の低下⁸⁾などが報告されているにすぎない。コリンエステラーゼについては Doebbler ら⁹⁾の学会報告が唯一のもので、彼らは、凍結融解によるコリンエステラーゼの血球膜よりの遊離と ATPase 活性の増加をみとめた。更に竹原は滲透圧溶血をしたゴーストの ATPase が凍結によって活性化する機構について論じている^{10,11)}。

われわれも、凍結による赤血球膜障害の機序を明らかにしたいと考え、かねてから実験を継続中である。特に膜変化に凍結条件による量的あるいは質的な差異があるかどうか、また凍結による膜変化と滲透圧その他関連の因子による膜変化との比較など、種々の角度から検討し

* 北海道大学低温科学研究所業績 第 1111 号

たいと考え、さしあたり酵素機能をとりあげることにしたのである。赤血球には、その機能を維持するための各種の酵素が含まれるが、そのうちで膜の外層にあるといわれているアセチルコリンエステラーゼを、先ず検査の対象としてとりあげることにした。

II. 方 法

試料: ACD 加人血液の 4°C 保存, 3 週間以内のものを用いた。使用に際して, 0.15 M NaCl で 3 回洗い, 3,000 rpm, 10 分間遠心の packed cell を 0.15 M NaCl で 5 倍の浮遊液とした。洗浄血球浮遊液は必ずその日のうちに使用した。

凍結融解: 径 20 mm の試験管に, 血球浮遊液 2 ml を入れ, Haake の低温恒温槽を用いて冷却し, -1.5°C に達したところで植氷して凍結させ, その後ほぼ $1^{\circ}\text{C}/\text{min}$ の冷却速度で -10°C まで冷却した。この温度に 10 分間おいた後, 20°C の水に移して, 振盪しながら融解した。これが緩慢凍結である。別に急速凍結として, 同じような試料を, 液体窒素中に急激に浸し, 管壁に薄層を作らせるように激しく振りながら凍結させた。この時の冷却速度は測定できないが $200\sim 250^{\circ}\text{C}/\text{min}$ と推定された。

蒸溜水溶血: packed cell を蒸溜水で 5 倍にうすめて溶血させた。このくらいの量の蒸溜水では完全溶血せず血球が多少残る。

超音波処理: 細胞膜破壊の目的で, 血球浮遊液を超音波で処理した, クボタ製 ultrasonic generator KMS-250 を使用し, 10 KC, 出力 160 W で 5 分間の処理を行なった。

高張食塩水処理: 塩害説の検討を行なうため, 高張食塩水に packed cell を浮遊させて最終濃度を 1, 2, 3 M になるようにした。例えば 3 M にするには, 3.7 M NaCl 4 に packed cell 1 を加えた。10 分おいた後, 遠心して上清の活性をはかった。沈澱した血球は再浮遊し難いので, しらべなかった。凍結融解に対応させるため, 高張溶液にさらした血球を更に 0.15 M になるよう蒸溜水で適宜にうすめた。遠心後の上清はうすくて活性は測れないので, この場合は沈澱のゴーストだけをしらべた。これらの一連の操作は 0°C において行なった。特に -10°C までの凍結融解に対応させる意味で, 3 M NaCl 血球浮遊液は -10°C に保持して, 温度に対する検討を行なった。

遠心沈澱: 細胞膜破壊の状態を考慮して, 各処理後の遠心沈澱には, 特に留意した。即ち後でも述べるように, 細胞膜よりの酵素の遊離を吟味する場合に問題になるので, 3,000, 10,000 rpm 各 10 分間および超遠心機による 40,000 rpm, 30 分間の遠心を行ない, 上清及び沈澱 (ゴースト) の活性を測ったのである。その結果, 特別の比較を論ずる場合の外, 通常の活性の測定のためには, すべて 10,000 rpm, 10 分間の遠心を行ない, 上清は上部 1/3 を静かにピペットで分けてとり, 沈澱は上清を除いた後もとの量まで食塩水でうすめたものを用いた。

コリンエステラーゼ活性の測定: 血清コリンエステラーゼ活性測定法にならい柴田・高橋法¹²⁾を用いた。ただ血清の場合とちがい, 血球浮遊液では処理によってほとんど溶血し試料中にヘモグロビンが遊出するので, フェノールレッドによる比色は不適當である。そこで Michel¹³⁾の用いた pH 変化測定法をこれに併用することにした。

測定方法の詳細は次の通りである。

試料	0.5 ml
バルビタール緩衝液 (pH 8.3)	1.5 ml
水	3.0 ml
アセチルコリン (第一製薬製 オピソート 0.1 g を 水 2.0 ml にとかしたもの)	0.5 ml

以上を試験管にとりよく混和して 37°C の恒温槽におく、1 時間後とり出してエゼリン液 1 滴を加えて反応を停止させる。試料温度が室温に戻ったところで、日立堀場の pH 計を用いて pH を測定した。

対照には、最初からエゼリンを加えてコリンエステラーゼの活性を障害したものをおきその対照と処理試料との pH の差 (Δ pH) を求め、更に無処理正常血液についてのその対照との pH 差に対する百分率をもって、コリンエステラーゼの活性度として表わすことにした。なお活性を知るための実験は、同じ条件のものそれぞれ少なくとも 5 例以上行なった。

ゴーストの蛋白定量：遠心沈渣のゴーストの酵素活性を測定する時、凍結融解とか滲透圧とか処理の方法によって沈澱量が一定であるとは限らないので、ゴーストの定量をする必要がある。そこで蛋白の定量を行なったが、この場合、試料中にヘモグロビンが残っていると測定値に大きく影響するので、できるだけ除去しなければならない。そのためくりかえし蒸留水で洗った沈渣を測定に用いたが、処理によってヘモグロビンのとれかたがまちまちなので、凍結融解と 3 M 高張液との比較しかできなかつた。蛋白の定量は次のような Lowry 法によつた。即ち試料を適度にうすめ (大体 10~20 倍)、その 1 ml に試薬 (0.2% Na_2CO_3 の 0.1 N NaOH 溶液 50 ml に 0.5% $\text{CuSO}_4 \cdot 1\%$ 酒石酸カリまたはナトリウム溶液 1 ml を加えたもの) 3 ml を加えて室温に 10 分間おき、更に Folin 試薬を 0.3 ml 加えて室温に 30 分間おいた後 660 m μ で比色定量した。予め血清アルブミンを用いて作った較正曲線から蛋白量を求めた。

III. 結 果

1. 予備実験

1) 実験誤差：本実験で用いた pH-meter では測定器の読みの誤差は ± 0.02 , 同一試料を別々に反応させた場合の実験誤差が ± 0.05 であった。対照の正常血球では大体 1 pH 単位の変化があった。

2) 反応時の pH：本試験ではすべて pH 8.3 のバルビタール緩衝液を用いたが、予備試験で pH 6~8 の範囲内では活性度に差のないことを確かめた。

3) 試料濃度と活性度との関係：正常血液の濃度を変えて、その活性度との関係をしらべてみると、試料濃度で原液 (packed cell の 5 倍) からその 5 倍までの間では、両者の間にはほぼ直線的な比例関係があった。

4) endogenous 基質に対する酵素活性：アセチルコリンを加えないものでは pH の変動がみられないことから、endogenous 基質の分解はないものと考えられた。

2. 凍結融解処理

以下各種条件下のコリンエステラーゼ活性値をしらべるにあたっては、処理を行なった浮遊

液全体そのまま更にそれを遠心 (10,000 rpm, 10分) して上清と沈渣 (ゴースト) に分けたものの三者について測定した。いずれも対照である正常血球液の活性値に対する百分率で表わしたもので、これは上清と沈澱の割合を知ると同時に、並

行して行なっている血球の形態的観察や物理的性状 (沈降性) の検討と関連づけて考えるための便宜的な扱い方である。従って遠心力の差による上清への活性物質の遊離の違いや、沈澱したゴーストの単位量当りの活性値などは、別に検討したので、後でまとめて述べる。

凍結融解をしたものでは、全体としての酵素活性は変わらないが、そのうち約10%が膜から離れて上清に移ったような結果を示している。緩慢凍結と急速凍結との間にほとんど差はみとめられなかった。ただ一般に緩慢凍結では測定値のふれが大きかった (第1表)。

緩慢凍結で -10°C に達したものは、通常その温度に10分間おいてから融解し測定したが特に凍結時間の影響を吟味するため30分、1、2時間と長時間おいてしらべても、凍結時間による影響はみとめられなかった。

急速凍結融解を反覆5回まで行なった結果でも、上清活性値にほとんど変化はみとめられ

第2表 蒸溜水溶血とコリンエステラーゼ活性度 (%)

処 理 法	試料全体	遠心上清	遠心沈渣 (ゴースト)
蒸 溜 水 溶 血	102±9	2±2	105±13

なかった。上清への遊離もみとめられない (第2表)。

2) 高張塩溶液

-10°C までの緩慢凍結における濃縮塩溶液の影響を検討する目的で、packed cell を高張塩溶液に浮遊させたもの、更にそれを等張まで戻したものについて活性をしらべた。

特に高張液にさらしたものの全体および上清をそのまま測定するときは、媒液中の塩濃度が高くなるのでインキュベーションの間の酵素反応への影響が問題になる。この点を吟味するために、試料と同量に1M、2M、3M NaCl 溶液を予め0.5ml ずつ加えた媒液で正常血球の活性をしらべたところ、基質と反応するときの塩濃度が活性値に影響することを知った。即ち塩濃度が増すに従ってほぼ直線的に活性値が増し、3Mでは0.15Mのときの凡そ125%となった。そこで高張塩溶液を用いるときの実験には、インキュベーションの時に、それに相当する塩溶液を加えた正常血球の対照をおき、その対照に対する比率で活性度を表わした。

実際の実験では、1、2、3Mと高張塩の血球浮遊液を作り、これを 0°C に10乃至30分間おいた後そのままのものと遠心上清をとった。それとは別に高張溶液に水を加えて0.15Mの等張まで戻したものについてゴーストを集め、これら三者について活性を測った。その結果は第3表に示す通りである。

第1表 凍結融解とコリンエステラーゼ活性度 (%)

処 理 法	試料全体	遠心上清	遠心沈渣 (ゴースト)
緩慢凍結 (-10°C)	100±7	9±7	88±22
急速凍結 (-196°C)	98±2	10±3	91±2

3. 滲透圧の溶血

1) 低張液

packed cell を蒸溜水で5倍の浮遊液にしたのでは、完全溶血には至らず血球が少し残る。しかし、試料全体としての

即ち試料全体としては、3 Mの高濃度にさらしたもので、活性は殆ど変わらない。しかし、上清の活性値は塩濃度が増すとともに急激に増加している。また上清に対応して沈渣のゴーストの活性は逆に低下しているという結果が得られた。3 Mのものでは、上清とゴーストの活性値の和が100%を上廻ったが、これは、後でも述べるように、遠心時の試料条件によるものかもしれない。

高濃度塩溶液の影響についての実験

は、凍結のそれに対比して行なわれるものであるから、実験の際の温度については慎重な吟味が必要である。本実験では、操作の過程を通じ試料はすべて0°Cに保持したが、3 M塩溶液の実験では特に-10°C、0°C及び室温にそれぞれ30分おいたものについて、温度の影響を検討した。その結果、これらの温度の間では、活性値に差がないことを確かめたので、実験の便宜上その後はすべて0°Cを用いた。

4. 超音波処理

凍結融解による細胞障害を考える場合、特に赤血球においては、塩害の外に機械的障害も無視することはできない¹⁴⁾。そこで血球膜を機械的に破壊する一つの方法として超音波処理をとりあげてみた。出力を160 Wとしたのは、かつて行なった溶血の実験¹⁵⁾で、この出力が高度の溶血をおこすことをみとめたからである。超音波処理の結果は、第4表に示すように、試料全体としての活性はこの場合においてもほとんど変りはなかった

第4表 超音波処理とコリンエステラーゼ活性度 (%)

処 理 法	試料全体	遠心上清	遠心沈渣 (ゴースト)
超 音 波 (10 KC, 160 W 5分)	94±3	78±9	18±12

しかし予想通り上清の活性は非常に増大し、それに対応してゴーストの活性は低かった。なお顕微鏡の観察で大小種々でしかも不規則な形態のゴーストをみとめたことから上清には破壊されたゴーストの破片がかなり多く残っているものと想像された。超音波処理の上清は急速凍結融解を5回反覆しても、活性値は変わらなかった。

5. ゴーストの比活性度

ゴーストの活性を測る場合、試料はすべて packed cell の5倍量浮遊液で、蒸溜水溶血、凍結融解、超音波処理では、そのまま遠心した沈渣の活性を測ったが、高張塩溶液では0.15 Mまで戻した(3 Mならば水で20倍にうすめることになる)後の遠心沈渣を元の量までうすめて活性を測っているので、遠心の時の試料条件はかなり異なることになる。例えば、処理によってゴーストの形態はかなり異なっているし、メジウムの量、比重も異なることになるので、なるべく条件をそろえる意味で、処理後はいずれも20倍に(3 M→0.15 Mにそろえるために)うすめた上、最終試料のメジウムをすべて0.15 Mにして、遠心した。それらの沈渣について酵素

第3表 高張塩処理とコリンエステラーゼ活性度 (%)

処 理 法	試料全体	遠心上清	遠心沈渣 (ゴースト)
1 M NaCl	100	12	—
1 M→0.15 M NaCl	—	—	83
2 M NaCl	96±6	24±2	—
2 M→0.15 M NaCl	—	—	76±5
3 M NaCl	104±7	51±4	—
3 M→0.15 M NaCl	—	—	69±17

—: 測定せず

第5表 ゴースト単位量(蛋白量)当りのコリンエステラーゼ活性値

処 理 法	20倍試料中ゴースト活性値 (Δ pH)	更に蒸溜水で3回洗ったゴースト		
		活 性 値 (Δ pH)	蛋 白 量 (mg)	単位量当り活性値 (Δ pH/mg)
急速凍結融解	0.83	0.88	0.93	0.94
3M \rightarrow 0.15M	0.58	0.48	0.72	0.66

活性の測定を行なうと同時に試料の一部を更に蒸溜水で3回洗い、できるだけヘモグロビンを除去してから、Lowryの方法で膜蛋白の定量を行なった。この場合、凍結融解と高張塩処理のものとは大体似ているが、蒸溜水溶血のものは形態がかなり異なり、しかもヘモグロビンの除去が困難で、Lowry法での測定値が異常に高かった(これらの点に関しては、別に報告する)。そこで、凍結融解と高張塩処理のものとの比較だけを行なった。その結果は、ゴースト蛋白の単位量あたりにしても、3M NaClのものがはるかに低い活性値を示した。なお、蒸溜水で洗う前の活性値に対しても、3Mのほうが低かった。

IV. 考 察

本実験の目的は、緒言においても述べたように、これまで凍結による赤血球の変化としては溶血のほかあまりしらべられていなかったことから、細胞膜の変化をもう少し詳しく検討したいと考えたことにある。

血球膜の凍結障害について、その機序を明らかにするためには、多角的に各方面から追究する必要がある。われわれは形態的機能的な追究として、あるいは電子顕微鏡を用いて膜の微細構造を、あるいは生化学的方法で膜の構成成分をしらべつつあるが、本実験では、特に膜の外層にあるといわれているコリンエステラーゼ¹⁶⁾をとりあげてみた。

まず溶血と酵素活性との関係をみるのに、本実験で行なった諸処置では、いずれもほぼ完全溶血を起すにかかわらず、試料全体としての活性度は同じであることから、酵素活性そのものはこれらの処置では活性化も不活化もしないものと思われる。即ち、超音波のような膜に対しはげしい機械的破壊をおこすような処置であっても酵素活性の変わらないことから、その活性はかなり安定なものであることがわかる。それに比較すれば、溶血という現象は、はるかに穏やかな因子によっても容易におこるものであることがわかる。例えば多くの膜実験に供試されているように、適当な滲透濃度をもった塩溶液で処理した場合、ほぼ完全溶血をおこしても生理的な膜機能はほとんどおかさねずに保持されるという。要するに、ヘモグロビンの脱失は膜の透過性の変化によるものであるから、それほど重大な膜障害がなくても溶血はおこりうるだろう。従って、膜障害の原因が異なっても、あるいはそれによっておこる膜障害の機構が違っていても、結果として同じ程度の溶血のおこることがありうる。いいかえれば、溶血は膜変化の結果であるから、溶血だけを見て逆に膜障害の実態をつかもうとするのは難しいと思われる。本実験で溶血以外に、膜の種々の性質を追究しようと考えた根拠はこの点にある。

以上のように、酵素活性そのものは安定であるとしても、種々の処置によって、膜構成蛋白特に外層部にあると考えられる酵素蛋白が遊離することがないかどうかを吟味する必要がある

った。そのために遠心分離の方法がとられたが、遠心後の上清といい沈渣といい、その活性を測る場合に問題になるのは、それらが果して完全に分離されているかどうかということである。もし完全に分離されているものならば、上清中の活性は細胞膜からメジウム中に遊離溶解した酵素によるものといえよう。完全に沈澱しない場合は、上清に残った一部の細胞膜又はその破片中の酵素が反応にあずかることになる。しかし完全に沈澱するかどうかは、遠心力や試料の性状に関連する問題で、はっきりした限界があるわけではない。むしろ、種々の処理によって細胞の変形や破壊などに質的量的な差ができるとすれば、遠心操作を工夫することによってその傷害の様子を知ることができ、ひいては細胞障害の機構を多角的に検索するための一助ともなるであろう。この意味での検討は、本実験と並行して行なわれているが、今その一部の成績を引用すると、各種処理血球浮遊液に対し 3,000 rpm, 10,000 rpm 各 10 分間、および 40,000 rpm, 30 分間の 3 種の遠心による上清の活性の比較で、遠心力の増加によって活性値の低下がみとめられた。膜自身あるいはその破片が遠心の条件によっては上清に残ることがわかるわけである。実際の実験結果として、凍結融解のものは、10,000 rpm でも 40,000 rpm でもともに活性は 10% で差がないことから、この条件では上清の活性物質はほとんど溶液状態にあることが想像されたが、超音波処理のものでは、10,000 rpm での 78% に対し 40,000 rpm では 20% とかなり沈澱するものがあることから、細胞膜が破壊されて小さな粒子になっていることが推定された。3 M NaCl 処理のものでは 10,000 rpm の 51% に比較して、40,000 rpm でも依然として 48% という高い値を示したのは、メジウムの比重が高いために沈澱しにくいということもあろうが、他方ゴーストの活性が落ちたという結果と合せて考えると、高濃度の塩にさらされたことによってかなりの量の活性物質が膜から遊離したことが想定される。特に凍結融解による遊離に比較してはるかに高度である点に注目すれば、凍結融解における塩害の役割については再考を要するものと思われる。

そもそも Lovelock²⁾ は、凍結融解による溶血度と、それに相当する塩濃度の溶液での処理による溶血度の一致することから、血球の凍害を塩害で説明しようとした。溶血度を規準としてみる限りでは、確かに両者は平行する関係にある。しかし、だからといって凍結融解と塩害とが全く同じ障害を血球膜に与えているかどうかはわからない。この点についての吟味がわれわれの研究の重要な目標であり、他にもいろいろと関心のよせられているところ^{3,4)} である。

われわれはさきに、凍結温度(凍結速度)例えば -30°C と -150°C では血球の凍結の機構の異なることを報告した¹⁾。しかも溶血度でしらべる限りではどちらも 100% 溶血で差はみとめられなかった。今回もこの点を重視して実験を進めたのだが、緩慢凍結と急速凍結とで差をみとめることができなかった。これは試料を多量に要することから、前回ほどの急速凍結を行なうことができなかったことによるのかもしれない。今後更に検討する必要があると考えている。

一般に細胞に含まれたままの酵素に対する凍結の影響の研究としては、ミトコンドリアやリソゾームに関するものが多い¹⁸⁾。血球に関しては、ATPase、ジグリセリドキナーゼ、グリセロールデヒドリン酸脱水素酵素についてしらべられているが⁵⁻⁷⁾、いずれも凍結融解によって活性の増加することがみとめられている。これらの活性は、処理後のゴーストについて測定された

もので、これらの酵素が血球膜の内部に存在することが想定され、凍結融解によって膜の透過性が増し、基質との接触が容易になったために、活性の増加をきたしたものと考えられている。しかもこれらの酵素は、膜組織との結合が強固で、簡単には周囲に遊離してこないものと思われる。これに反して、本実験でとりあげたコリンエステラーゼは、血球膜の外層にあると考えられるので、凍結融解などで膜の透過性に変化があったとしても、試料全体としての活性には影響を及ぼさないものと思われる。

赤血球のコリンエステラーゼについての研究は保存あるいは年齢に関するものが多い¹⁹⁾。凍結に関連しては、僅かに Doebbler らの報告⁹⁾があるのみで、彼らは凍結によってコリンエステラーゼは遊離するが、滲透圧的溶血または高張塩にさらすことによっては遊離しないと述べている。

本実験の結果とは多少の食い違いはあるが、凍結融解とそれに相当する高張塩処理とが一致しないという点では、両報文の成績に共通の問題があるように感ぜられる。しかし著者の成績同様、高濃度塩によってコリンエステラーゼは遊離するとの報告もある²⁰⁾。Lovelock の塩害説に対する吟味の意味においても、今少し検討を続けたいと思う。

いずれにせよ、これら種々の条件での処理による赤血球膜からの酵素の遊離には機械的あるいは化学的などいろいろの場合が考えられるであろう。これを凍結融解あるいは滲透圧的溶血の機構と関連づけて、膜障害の本態を知るための手がかりにしたいものと思う。

V. 摘 要

凍結融解による赤血球膜の障害を、酵素機能の面から検討したいと考え、コリンエステラーゼの活性をしらべた。その結果、凍結融解、滲透圧、超音波などの処理で完全溶血をおこしたもので、試料全体としての酵素活性は変わらなかった。遠心によって上清とゴーストに分けてしらべると、凍結融解では僅かに、高張溶液と超音波処理ではかなり強度の酵素の遊離がみられた。

文 献

- 1) 森地敏樹 1970 微生物細胞における凍結および乾燥の障害機序. 凍結・乾燥と細胞障害 (根井外喜男編), 東大出版会, 東京, 45-63.
- 2) Lovelock, J. E. 1953 The haemolysis of human red blood-cells by freezing and thawing. *Biochim. Biophys. Acta*, **10**, 414-426.
- 3) Meryman, H. T. 1966 Review of biological freezing. *In Cryobiology* (H. T. Meryman, ed.), Academic Press, London, 52.
- 4) 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, 413-414.
- 5) Hokin, L. E. and Hokin, M. R. 1963 Diglyceride kinase and other pathways for phosphatidic acid synthesis in the erythrocyte membrane. *Biochim. Biophys. Acta*, **67**, 470-484.
- 6) Chapman, R. G., Hennessey, M. A., Waltersdorph, A. M., Huennekens, F. M. and Gabrio, B. W. 1962 Erythrocyte metabolism. V. Levels of glycolytic enzymes and regulation of glycolysis. *J. Clin. Invest.*, **41**, 1249-1256.
- 7) Schrier, S. L. and Doak, L. S. 1963 Studies of the metabolism of human erythrocytes mem-

- branes. *J. Clin. Invest.*, **42**, 756-766.
- 8) Greiff, D. and Seifert, P. 1968 Cryotolerance of selected sites on the surfaces of membranes of cells. I. Mucopolysaccharides of erythrocytes. *Cryobiology*, **4**, 295-302.
 - 9) Doebbler, G. F. and Rinfret, A. P. 1962 A biochemical basis of hemolysis of erythrocytes by freezing and thawing. *Fed. Proc.*, **21**, 67.
 - 10) 竹原一郎 1967 ウサギ血球膜 ATPase に対する凍結の影響. 低温科学, 生物篇, **25**, 155-158.
 - 11) 竹原一郎 1969 ウサギ血球膜の ATPase に対する凍結の影響 II. 低温科学, 生物篇, **27**, 161-164.
 - 12) 高橋 浩・柴田 進 1951 臨床検査に使用できる簡単な血清ヒヨリンエステラーゼ定量法. 医学と生物学, **20**, 96-98.
 - 13) Michel, H. O. 1949 Electrometric method for the determination of red blood cell and plasma cholinesterase activity. *J. Lab. and Clin. Med.*, **34**, 1564-1568.
 - 14) Nei, T. 1970 Mechanism of haemolysis of erythrocytes by freezing, with special reference to freezing at near-zero temperatures. In *The Frozen Cell* (G. E. W. Wolstenholme and M. O'Connor, eds.), J. & A. Churchill, London, 131-147.
 - 15) 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.
 - 16) 品川嘉也・小倉光夫 191 赤血球膜におけるコリンエステラーゼ. 科学, **31**, 554.
 - 17) 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.
 - 18) Tappel, A. L. 1966 Effects of low temperatures and freezing on enzymes and enzyme systems. In *Cryobiology* (H. T. Meryman, ed.), Academic Press, London, 163-177.
 - 19) Bishop, C. 1964 Overall red cell metabolism. In *The Red Blood Cell* (C. Bishop and D. M. Surgenor eds.), Academic Press, New York, 148-188.
 - 20) Mitchel, C. D. and Hanahan, D. J. 1966 Solubilization of certain proteins from the human erythrocyte stroma. *Biochemistry*, **5**, 51-57.

Summary

In order to investigate the mechanism of freezing injury of erythrocyte membranes, cholinesterase activity was examined with specimens treated in several ways.

There was no change in the total activity of cholinesterase in the cell suspensions completely hemolysed with freeze-thawing, hyper- and hypotonic lysis and sonication.

A release of cholinesterase into the supernatant of the specimens tested was found after centrifugation; namely a small amount of cholinesterase was released by freeze-thawing, while a considerable amount was released by exposure to hypertonic salt solution and sonication.