HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	凍結による赤血球膜の障害　II ： 血球型物質におよぼす凍結の影響
Author(s)	根井, 外喜男
Citation	低温科學. 生物篇, 29, 69-74
Issue Date	1972-02-10
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/17785
Type	departmental bulletin paper
File Information	29_p69-74.pdf

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

Tokio NEI 1971 Freezing Injury of Erythrocyte Membranes. II. Effect of Freezing on Blood-Group Substances. *Low Temperature Science, Ser.* ***B, 29.*** (With English Summary p. 73)

凍結による赤血球膜の障害 II*

血液型物質におよぼす凍結の影響

根井外喜男
(低温科学研究所)

(昭和46年8月受理)

I. 緒　　言

本論文は凍結による赤血球膜の障害に関する一連の研究の一部をなすもので，膜障害の機構を知るために，膜の外層に存在すると考えられる血液型物質，特にABO型物質が凍結によってどのような影響をうけるかを検討したものである。

すでに第1報[1]において述べたごとく，赤血球のように細胞内構造をもたない細胞では，凍結による障害としては細胞膜の変化が主体をなすものと考えられるが，この分野における従来の報告では，溶血だけが変化のめやすとして測られているにすぎず，膜障害の機序をほり下げて検討する目的で膜自身の変化を詳しくしらべたものは少ない。

これまで血液型物質を対象としてとりあげた凍結実験は，いずれもグリセリンや糖などの保護物質を加えた長期保存の試料に関するものであって，液体窒素やドライ・アイスの温度に保存された血球は，多少の溶血をおこしても，型物質の抗原性にはほとんど変化のないことが報告されている[2-6]。

このような保護物質を加えての保存実験ばかりではなく，その対照として保護物質を加えない血球についても凍結融解を行なって，血球膜成分の変化を追究したものにGreiff ら[7]の実験がある。彼らはニワトリの血球を用い，ミクソバイラスの吸着遊離をめやすとして，血球膜のムコポリサッカライドと考えられるレセプターのバイラス吸着性が凍結によって低下すること，更にグリセリンやDMSOの添加によってその低下が阻止されることを報告した。

以上のように，赤血球のABO型物質に注目して赤血球膜の凍害障害を検討する実験はこれまでに行なわれていないので，本研究では，この点についての吟味を行なったのである。

II. 方　　法

材料： ACD加人血液を0.15 M NaCl液で3回洗い，次に述べるような適宜の濃度の浮遊液として用いた。全血液は採血後3週以内のもの，食塩水で洗った血球浮遊液は試料調製当日のものをそれぞれ使用した。

凍結融解： 10倍稀釈の血球浮遊液0.2 mlを20 mmの試験管にとり，低温槽に浸して−1.5°C

* 北海道大学低温科学研究所業績　第1167号

で植氷凍結させ，ほぼ1°C/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の水槽に移して融解した。別に同じ試料を軽く振りながら液体窒素中で急速凍結させた。その冷却速度は正確にはわからないが，およそ30秒くらいで窒素温度に達したものと考えられる。

蒸溜水溶血： packed cellを蒸溜水で10倍にうすめて溶血させた。

超音波処理： 機械的破壊の条件として，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分間処理した。

高張食塩水処理： −10°Cの凍結に相当する塩濃度の3 M NaClに10分間さらした後，もとの0.15 Mになるよう薄めた血球浮遊液についてしらべた。

型物質の抗原抗体反応による定量法： 血球膜に存在する型物質，更に種々の処理によって膜からメジウム中に遊離した型物質をそれぞれ定量的に測定するために，抗原抗体反応特に抗体吸収法と血球凝集反応の組合わせの方法を用いた，即ちA（またはB）型血球とO血清との対応により，被検試料中の型（抗原）物質で血清中の当該抗体を吸収した後，同じ血球で凝集反応を行なった結果求められた残存抗体価から最初の吸収に費された抗原物質の量を逆算しようとしたものである。

実際には，まず予備実験で，反応に適当な抗原抗体の量比をきめた，最初吸収のための抗原試料と血清とをそれぞれ段階的に稀釈して加え合わせ，37°C 1時間反応させた後，10,000 rpmで10分間遠心沈澱した。えられた上清0.5 mlに100倍正常血球液1滴加え，氷室1夜放置後，管底の血球の凝集状態から抗体価をきめた，正常抗体価が64×の血清で，残存抗体価が8×になるようにするには，4倍の血清に500倍正常血球液を等量加えて吸収すればよいことがわかり，以後被検試料はこの量比関係で反応させた。要するに，対照の正常血球における型物質100%を含むものが8×，0%のものが64×となり，その中間のものが8×と64×の間の抗体価を示すように，抗原抗体の量比を調整したわけである。

次に本実験では，10倍血球浮遊液で凍結その他の処理をし，それをそのまま，あるいは10,000 rpm，10分遠心で上清と沈渣にわけたもの（沈渣は元の量の食塩水に浮遊させる）の3種として，それぞれ更に5倍にうすめて（出発材料の500倍稀釈となる）4倍の血清に等量に加えるのである。以下，前記の対照の場合と同一の過程を経て，残存抗体価を求めた。

III. 結　　果

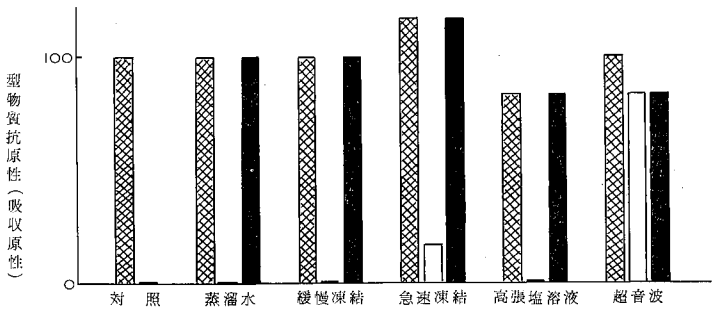
対照の正常血球液，蒸溜水溶血のもの，−10°Cまで緩慢凍結したもの，液体窒素中で急速凍結したもの，3 M NaClにさらした後0.15 M NaClに戻したもの，および超音波処理の計6種の試料について行なった測定の結果は，第1表に示す通りである。各条件での例数は多少まちまちであり，しかも凝集反応の結果は，同一条件のもの必ずしも常に同一成績とは限らないので，平均化した結果の総括的な表現になっている。

これを更に逆算して各種条件で処理した試料中に残存する抗原性（吸収原性）として表わしたのが第1図である。

今，正常血球の抗原性を100とし，その上清の抗原性を0として表わせば，蒸溜水溶血の

第1表　各種処理試料中に含まれる型物質で吸収したO血清のA（またはB）型血球に対する凝集価

処理条件	実験例数	吸収原	凝集反応（O血清の稀釈倍数）					
			4×	8×	16×	32×	64×	128×
対照（無処理）	18	なし（上清に相当）	ㅐ	ㅐ	ㅐ	ㅓ	+	−
	（各例1毎）	正常血球（沈渣に相当）	ㅓ	+	−			
蒸溜水溶血	4	全体	ㅓ	+	−			
		上清	ㅐ	ㅐ	ㅐ	ㅓ	+	−
		沈渣	ㅓ	+	−			
−10°C緩慢凍結	3	全体	ㅓ	+	−			
		上清	ㅐ	ㅐ	ㅐ	ㅓ	+	−
		沈渣	ㅓ	+	−			
液体窒素急速凍結	5	全体	+	−				
		上清	ㅐ	ㅐ	ㅓ	+	−	
		沈渣	+	−				
3 M NaCl ↓ 0.15 M NaCl	4	全体	ㅐ	ㅓ	+	−		
		上清	ㅐ	ㅐ	ㅐ	ㅓ	+	−
		沈渣	+	−				
超音波	2	全体	ㅓ	+	−			
		上清	ㅐ	ㅓ	+	−		
		沈渣	ㅐ	ㅓ	+	−		



第1図　各種処理試料の型物質抗原性

▩：試料全体としてそのまま
□：遠沈上清
■：遠沈沈渣（ゴースト）

ものは，全体として100，上清0，沈渣100となり，低張溶血では膜からの型物質の遊離はみとめられないわけである。同じように，−10°Cまでの緩慢凍結でも，凍結による影響はほとんどないものといえる，しかし，液体窒素での急速凍結では，上清への型物質の移行が少しみとめられるばかりでなく，試料全体としても，また遠心沈渣だけでも，対照無処置のものよりそれ

ぞれすこし反応性が増したような結果を示した。一方，−10°C までの凍結で濃縮される塩濃度にほぼ相当するところの 3 M NaCl という高張塩処理では，上清に出ないばかりか，かえって全体および沈渣の反応性が低下したような傾向を示した。更に超音波処理のものでは全体としては変わらないのに，沈渣で低下し上清で増加するという成績であった，要するに，滲透圧溶血や緩慢凍結ではほとんど変化なく，急速凍結，高張塩溶液，超音波処理のものが，それぞれ特有の変化を呈したことになる。

IV. 考　　察

本研究シリーズの共通の目的である凍結による細胞障害を検討する実験の 1 つとして，血液型物質の反応性という立場からしらべた結果，溶血では同じように 100% 溶血をおこすところの 2 つの条件，即ち，−10°C までの緩慢凍結と，窒素温度までの急速凍結とは，型物質に対する影響という点では差異があるものと思われる。前者ではほとんど影響がないのに，後者ではその反応性や所在に変動がみとめられたからである。

さきに報告した溶血と凍結状態の形態的所見との比較実験の結果からは，−10°C までの緩慢凍結は塩害が，また −150°C までの急速凍結は細胞内凍結が，それぞれ溶血の原因と推定されていた[8]。従ってもし緩慢凍結では塩害がきくものとすれば，今回の実験での緩慢凍結（−10°C まで）と高張塩溶液処理（3 M NaCl）とは，同じ影響をおよぼしてよいはずであるのに，塩溶液にさらされたものでは型物質の反応性が低下しているにかかわらず，それに相当する凍結では全然変化がみられなかった。このことは，塩害説に対する一つの反証と思われる。

また一方，液体窒素での急速凍結は，前報[8]の実験のそれとは多少条件が異なるので，はたして細胞内凍結をおこしているかどうかは明らかでないが，超音波処理にやや似たような結果，即ち，型物質が上清にみとめられやすくなる傾向からみれば，ある程度似たような機械的障害のあったことが想像される。ただし，第 1 報[1]のコリンエステラーゼの実験でも述べたように，用いられた遠心分離の条件が，10,000 rpm，10 分間であるから，上清にみとめられた抗原物質は，完全に膜から離れてメジュゥム中に出たものか，あるいは上清中にまだ膜の微細破片が残っていたためかはわからないが，とにかく緩慢凍結とは違った変化であることは確かなようである。

次に，この実験でとりあげたような型物質の反応原性を定量的にとり扱おうとする場合に，まだ問題が残されている。吸収試験という手段を用い，かなり異なった条件の試料を同一方法で測定してその結果を比較することが妥当かどうか更に検討しなければならない。また対照に対する変化の割合という意味で第 1 図のような表現をしてみたが，これは定量的というよりはむしろ定性的なある傾向の表現といったほうがよいかもしれぬ。血清学領域以外の研究者への理解を容易にするための意図によるものである。

コリンエステラーゼや型物質の血球膜における表在性については，前者は電子顕微鏡による細胞化学的観察の所見から裏付けされているが[9]，後者については，所在や結合状態がまだ充分明確にはなっていないが，生化学的検索によって糖脂質の性状を有することは明らかにされた。[10] 特に糖が型特異性を示すことから，糖部分が表在し，脂質部分が内在するものと推定さ

れている。

凍結による膜障害の機序を論ずるためには更に広い角度からの検討が必要であり，それらの検討が行なわれた上で，より総合的な見地からの考察が試みられるべきであろうと思う。

V. 要　　約

凍結による赤血球膜障害の機序を知るために，膜の表層にあるといわれるABO型物質をめやすにして，種々の条件で処理した試料について抗原性をしらべた。

その結果，蒸溜水溶血や緩慢凍結のものでは，ほとんど変化はないが，窒素温度までの急速凍結，高張塩溶液，超音波処理等では，それぞれ多少異なる変化を示した，即ち，急速凍結では抗原性の増大，高張塩では逆に低下，超音波では上清への遊離などがみとめられた。

文　　献

1) 根井外喜男 1970 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. 低温科学, 生物篇, **28**, 11–19.
2) Huntsman, G. R., Hurn, B. A. L., and Lehman, H. 1960 Storage of red cells for blood grouping after freezing in liquid nitrogen. Use of sucrose to protect against haemolysis. *Brit. Med. J.*, **2**, 118.
3) Huntsman, G. R. Hurn, B. A. L., Ikin, E. W., Lehman, H. and Liddell, J. 1963 Blood groups and enzymes of human red cells after two years' storage in liquid nitrogen. *Brit. Med. J.*, **2**, 1315.
4) Gibbs, M. B., McCord, E. B., Collins, W. S., Schrider, C. T. and Akeroyd, J. H. 1962 Simple methods of storage of human erythrocytes in liquid nitrogen: Comparative study of the agglutinability of erythrocytes of the ABO blood groups preserved by various methods. *Transfusion*, **2**, 100–105.
5) Bronson, W. R. and McGinniss 1962 The preservation of human red blood cell agglutinogens in liquid nitrogen: Study of a technique suitable for routine blood banking. *Blood*, **20**, 478–484.
6) Strumia, P. V., Strumia, M. M., Colwell, L. S. and Torg, B. 1962 Agglutinability of red cells after long-term storage in the frozen state. *Transfusion*, **2**, 31–35.
7) 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.
8) 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.
9) 品川嘉也・小倉光夫 1961 赤血球膜におけるコリンエステラーゼ. 科学, **31**, 554.
10) Yamakawa, T. and Iida, T. 1953 Immunochemical study on the red blood cells. I. Globoside, as the agglutinogen of the ABO system on erythrocytes. *Jap. J. Exp. Med.*, **23**, 327–331.

Summary

The effect of freezing on the antigenicity of ABO blood-group substances, which are presumably located in the superficial layer of erythrocyte membranes, was examined with absorption test.

There was no change in antigenicity of total cell suspensions, supernatant and sediments (ghosts) of specimens completely hemolysed with hypotonic lysis and slow

freezing down to −10°C.

Characteristic changes were, however, found in specimens treated under other different conditions, *i.e.*, increase of antigenicity in the rapid freezing to liquid nitrogen temperature, decrease of antigenicity in the exposure to hypertonic solution and release of group substances into the supernatant following sonication.