



Title	ヒト赤血球の凍結融解及び高張塩溶液による溶血と磷脂質の遊離
Author(s)	僧都, 博; SOUZU, Hiroshi; 根井, 外喜男 他
Citation	低温科学. 生物篇, 29, 75-82
Issue Date	1972-02-10
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/17786
Type	departmental bulletin paper
File Information	29_p75-82.pdf



ヒト赤血球の凍結融解及び高張塩溶液による 溶血と磷脂質の遊離*

僧 都 博・根井外喜男

(低温科学研究所)

佐藤 知義

(北大医学部第一外科)

(昭和46年10月受理)

I. 緒 言

赤血球の凍結による溶血に関する研究は、古くから多数行なわれているが¹⁾、そのうちのすぐれた業績の一つとして Lovelock の研究^{2,3)} があげられる。彼はその一連の実験の結果、いわゆる塩害説を提唱した。即ち、各種温度まで凍結したのち融解したときの溶血曲線と、それぞれの温度に相当する高張塩溶液にさらしてから等張にもどしたときの溶血曲線が一致することから、試料中の水分の凍結によって濃縮された塩溶液が細胞膜に障害をおこして溶血をきたすのであろうと結論した。彼はまた高張塩溶液にさらした血液から磷脂質とコレステロールの遊離する事実を示して、凍結による溶血の原因としての塩害とは、濃縮塩によって細胞膜のリポ蛋白質が変成し、膜の透過性が増すことであると説明した。しかし、彼の実験は実際に凍結融解した血液について脂質の変化を調べたものではなく、高張塩溶液での実験結果から凍結融解の結果を推論したものである。このような解釈に対しては、最近いくつかの批判が提出されるようになってきている⁴⁻⁶⁾。

一方細胞の凍結障害に関する研究については細胞の膜系に関するものが多くなりつつあり、僧都⁷⁾も酵母細胞を用いて、細胞膜リポ蛋白質が、凍結融解によって大きな影響を受けることを示した。膜系の材料として赤血球はその細胞構成が簡単であること、脂質、蛋白質組成等が比較的良好に知られていること等の利点がある。このような点に注目して、凍結融解処理が細胞の膜系に与える障害の機構を調べるための材料として赤血球を選び、前記塩害説に対して再検討を加えた。本実験では赤血球を凍結融解、または高張塩処理することによっておこる溶血と、それに伴う血球膜磷脂質の遊離との関係を調べたので、その結果を報告したい。

II. 材料と方法

材料： ACD 加ヒト保存血液を氷冷した 0.15 M NaCl 溶液で3度洗ってできるだけ白血球を除き、最後に遠沈して集めた血球沈渣に、5 mlにつき約1 mlの0.15 M NaCl 溶液を加えて用いた。用いた血液はすべて採血後7日以内のもので、洗滌後は1日以内に使用した。

* 北海道大学低温科学研究所業績 第1168号

凍結融解： 上記の血球浮遊液を1 ml 宛径1.5 cm のガラス試験管にとり、数本を同時に -2°C に設定した自動温度調節式恒温槽 (Haake の装置) のアルコール中で冷却し、植氷して更に20 分間凍らせたのち1 分間 0.2°C の速さで1~2 度宛槽の温度を下げ、設定温度に到達してから更に15 分間その温度に置いてから1 本をとり出すという方法で、順次 -10°C まで凍結した。とり出した試料は直ちに温湯中で融解し、これに2 ml の0.15 M NaCl 溶液を加えて総量3 ml として $20,000\times g$ で15 分間遠沈した。この遠沈上清から2 ml を静かにピペットでとって、この中の磷脂質を抽出定量した。血球及び溶血したゴーストを含む沈渣部分全体からも同様に脂質を抽出し、上清から抽出した分と合わせたものを細胞の総磷脂質量とした。この沈渣部分には細胞外液が残っているので、全体の容積から外液部分を概算でもとめ、この値を上清量 (2 ml) に加えて、上清に遊離した全磷脂質量を算出した。急速凍結の場合は、同じ試料を直接液体窒素で3 度凍結する方法を用いた以外は上の方法に準じた。

高張食塩水処理： 上記の血球浮遊液1 ml 宛を試験管にとり、攪拌しながら最終塩濃度に応じて1.25, 2.5 または5.0 M の NaCl 溶液を加えて、0.4~2.5 M NaCl 溶液浮遊液とした。 0°C で2 時間または室温で一晩この状態に置いたのち、これに蒸留水を加えて塩濃度を0.15 M までもどし、 $20,000\times g$ で15 分間遠沈した。遠沈上清の60~90% 量をしずかにピペットで測り採り、これから磷脂質を抽出定量した。血球及び溶血したゴーストを含む残りの部分についても磷脂質を抽出定量し、凍結融解の項で述べたのと同様のとり扱いをして、細胞総磷脂質量及び遊離磷脂質量をもとめた。

低張塩処理による溶血及びゴーストの処理： 同じ血球浮遊液1 ml に、最終容積1.5~20 倍になるように蒸留水を加えて溶血したのち、これに5.0 M NaCl 溶液を加えて塩濃度を0.15 M までもどし、30 分間置いたのち $20,000\sim 15,000\times g$ で15 分間遠沈した。この上清及び沈渣部分について、それぞれ上記と同様にして磷脂質を抽出し、遊離磷脂質量を算定した。蒸留水溶血で得られたゴーストに対する凍結融解または高張塩の影響をみるためには、同じ血球浮遊液を蒸留水で10 倍量にうすめて溶血したものについて、そのままの塩濃度のもの及びこれを0.15 M 塩濃度にもどしたものを、 $15,000\times g$ で15 分間遠沈し、上清を捨てた沈渣部分2 ml を、それぞれ毎分 0.2°C の速度で -9.5°C まで凍結するか、あるいは5 M NaCl 溶液を加えて最終塩濃度を2.5 M とし、 0°C で2 時間置いたのちに、それぞれ上記と同様の操作で磷脂質を抽出し定量した。

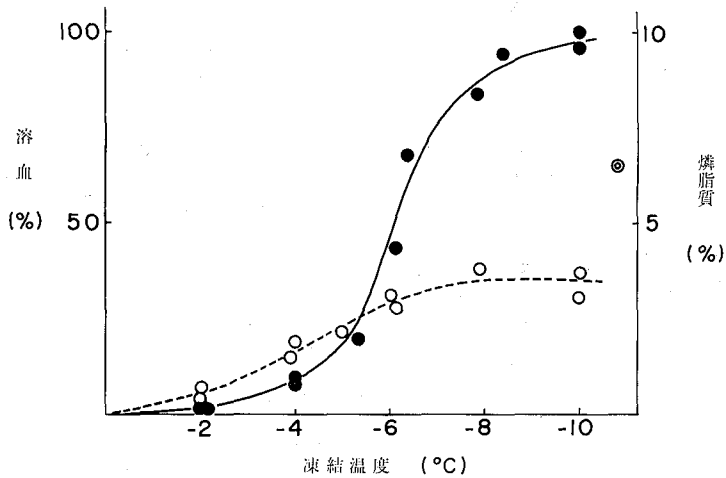
脂質の抽出及び定量： 上述の各処理後の試料から得た遠沈上清のうち容積5 ml 以下のもの、及び沈渣部分については、これに7 倍量のメタノール、ついで14 倍量のクロロホルムを加えて攪拌し、沈澱を濾過して捨てたのちに、溶液の5 分の1 容の0.1 M KCl 溶液を加えて振盪し、下層の溶媒をとって蒸発乾固した⁹⁾。遠心上清5 ml 以上のものについては、これに1.3 倍量のメタノール、ついで2.6 倍量のクロロホルムを加えて振盪し、沈澱を濾過して除いたのち下層の溶媒をとって蒸発乾固した。蒸発乾固した残渣は再び2:1 クロロホルム-メタノール液に溶かし、渋谷らの方法⁹⁾ に従って燐量を測り磷脂質量をもとめた。

溶血率の測定： 蒸留水溶血、凍結融解処理及び高張食塩処理をした試料について、それぞれ遠沈上清の一部をとり、シアン-メトヘモグロビン法でヘモグロビン量を測定し、蒸留水で完全に溶血したときのヘモグロビン量を基準として溶血量を算定した。

III. 結 果

1. 凍結融解による溶血と脂質の遊離

血球浮遊液を毎分 0.2°C の速さでゆっくり凍結してから融解すると、 -4°C 付近の凍結で溶血が始まり、凍結温度の低下とともに -8°C 付近まで急速に増加し、 -10°C 付近で全部溶血する（第1図実線）。このとき血球浮遊液上清中に遊離した磷脂質量を、血球総磷脂質量に対する百分率で示したのが第1図点線である。磷脂質の遊離は凍結開始と同時に始まり、凍結温度 -3°C 付近からやや急に増加するが、 $-6\sim-7^{\circ}\text{C}$ で増加はとまりその後 -10°C までの凍結で



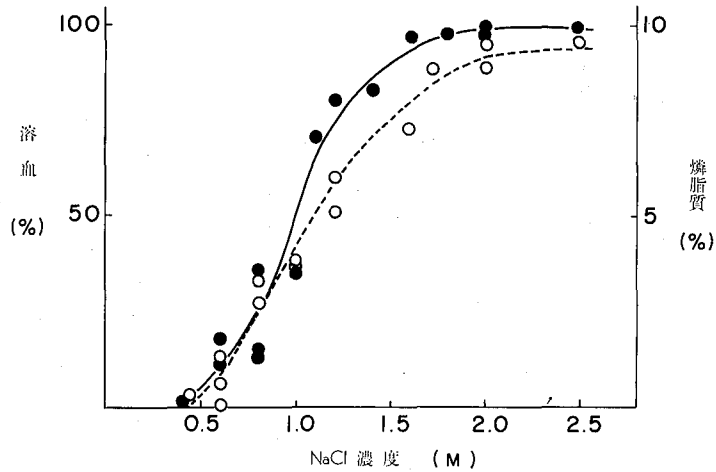
第1図 0.15 M NaCl 溶液に浮遊したヒト赤血球の凍結温度と溶血及び磷脂質遊離との関係。凍結速度: $2.0^{\circ}\text{C}/\text{分}$

—●—, 溶血; - - -○- - -, 遊離磷脂質; ⊙, 液体窒素凍結による遊離磷脂質

は全く変化は見られない。このときの遊離磷脂質量は血球総磷脂質量の約 3.5% であった。しかし同じ試料を液体窒素で急激に凍結融解したものでは（溶血率 100%）磷脂質の遊離は 7% と、ゆっくり凍結融解した試料の 2 倍量に達した。

2. 高張塩溶液処理による溶血と脂質の遊離

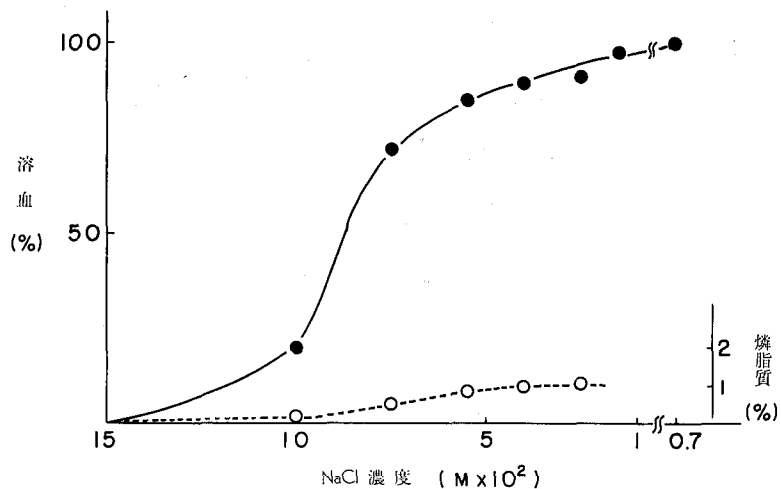
NaCl 濃度 0.15 M の血球浮遊液に高濃度の NaCl 溶液を加えて塩濃度をたかめ、これに再び蒸留水を加えて等張にもどすと溶血がおきる。第2図には、このときの塩濃度と溶血率を実線で、またそのとき遊離する磷脂質の総磷脂質に対する百分率を点線で、それぞれ示した。溶血は 0.6 M 付近から始まり、塩濃度の増加につれて急激に増し、2.0 M 付近で 100% に達する。磷脂質の遊離は溶血と同様に 0.6 M 付近から始まり、2.0 M 付近で 9% に達する。このときの溶血率と脂質遊離率の間には良好な比例関係が見られる。高張食塩水にさらす時間及び温度は、 0°C 、2 時間のもの及び室温で一夜放置するものの二つの方法について比較したが、溶血、脂質遊離ともに両者の間に大きな差は見られなかった。また高濃度 NaCl 溶液及び蒸留水を加える速さについても、全量を一度に加えてから攪伴するものと、攪伴しながらピペットで静かに加えるものと比較したが、実験に使った範囲では溶血、脂質遊離ともほとんど差はみとめられなかった。



第2図 ヒト赤血球の高張 NaCl 溶液処理による溶血と磷脂質の遊離。処理条件: 0°C, 2 時間
 —●—, 溶血;○....., 遊離磷脂質

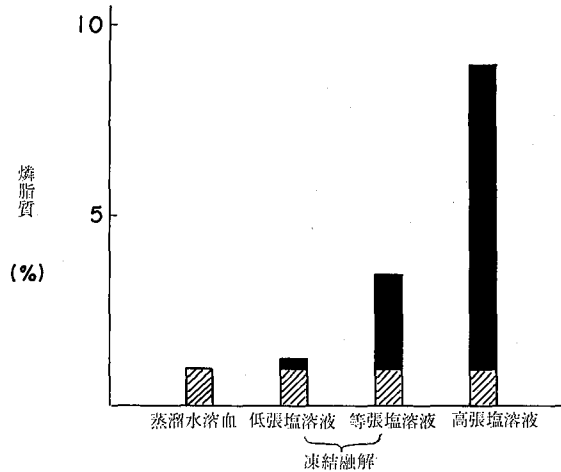
3. 蒸溜水稀釈による溶血と脂質遊離及びゴーストの凍結融解または高張塩溶液処理による脂質の遊離

血球を 0.15 M NaCl 溶液に浮遊した試料を蒸溜水で稀釈すると 1.5 倍 (0.1 M) くらいから溶血が始まり 4 倍稀釈 (0.038 M) で約 90% が溶血する。その稀釈範囲で同時に磷脂質の遊離が見られるがその量は非常に少なく、それより稀釈倍率を増すと溶血は増加して約 20 倍の稀釈 (0.007 M) で 100% に達するが、脂質遊離は変わらず最終的な値は約 1% にとどまった (第 3 図)。一方蒸溜水 10 倍稀釈 (0.015 M) で溶血した血球ゴーストでも、凍結融解または高張塩処理によ



第3図 ヒト赤血球を浮遊した 0.15 M NaCl 溶液に蒸溜水を加えて稀釈したときの最終塩濃度と溶血及び磷脂質遊離。処理条件: 0°C, 2 時間
 —●—, 溶血;○....., 遊離磷脂質

って脂質の遊離することが確かめられた。第4図の黒くぬった部分は、このゴーストを0.015 M及び0.15 M NaCl 溶液に浮遊して -9.5°C まで前述の条件でゆっくり凍結したのち融解したとき、及び同じゴーストを2.5 M NaCl 溶液に 0°C で2時間さらしたのち蒸溜水で0.15 Mまでもどしたときにおける脂質遊離率を示したものである。0.15 M NaCl 溶液に浮遊して凍結したもの及び2.5 M NaCl 溶液にさらしたものでは、これらの値に蒸溜水溶血の際に遊離した脂質量を加えると、正常な血球浮遊液をそれぞれ凍結融解または高張塩処理したときの脂質遊離率と等しくなっている。しかし、0.015 M NaCl 溶液に浮遊して凍結融解した試料では、それによる脂質の遊離はごく僅かであった。



第4図 蒸溜水稀釈によって溶血したゴーストの凍結融解及び高張塩処理による磷脂質遊離。斜線部は蒸溜水溶血による遊離、黒くぬった部分がその後の処理によるもの

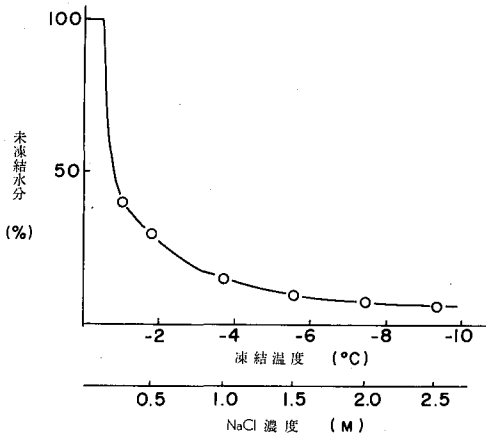
凍結温度： -9.5°C , ($0.2^{\circ}\text{C}/\text{分}$)；
 低張塩溶液, 0.015 M NaCl
 等張塩溶液, 0.15 M NaCl
 高張塩処理: 2.5 M NaCl, 0°C , 2時間

IV. 考 察

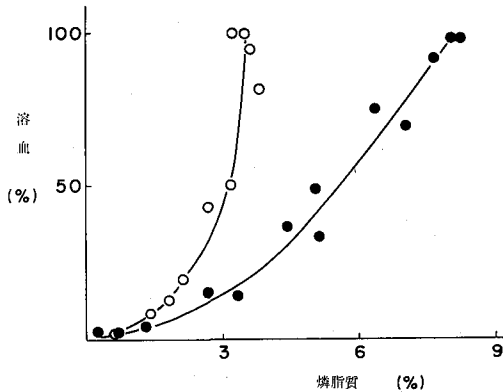
この実験の結果は、高張塩溶液処理の血球において、塩濃度に対する磷脂質の遊離率と溶血率との間ではかなり良い一致を示した。したがって、Lovelock のいうように、高濃度の塩溶液によって脂質の遊離をきたすような変化がおこり、その結果として溶血がおきたものと考えてよいであろう。

一方、凍結融解処理試料においては、溶血率と磷脂質遊離率との関係が、高張塩溶液処理のものにくらべて明らかに異なっていることがみとめられた。特に重要な点は、磷脂質の遊離が -6°C 付近の凍結で一定値となり、これより低い温度での凍結では溶血は急激に増加するに、磷脂質は全く増加しないことである。理論的には、凍結温度の低下につれて氷の量が増し塩濃度は増加するのであるから、高張塩溶液にさらしたのと同じ現象がおきてよい筈である。しかし実際にはこのような違いを生じており、その原因として考えられるのは、凍結による残溜水分の減少であろう。0.15 M NaCl 溶液を凍結すると -6°C 付近では90%以上の水分が凍結して氷になってしまう(第5図)ので、溶液部分は極めて僅かになり、それ以下の温度ではもはや個々の血球全部をとりかこんで細胞膜に作用するに足るだけの十分な溶液量がなくなるのではないかと考えられる。この実験結果は、試料を人為的に高張塩溶液にさらす場合と、凍結によって塩溶液が濃縮される場合とでは、両者の塩濃度は等しいとしても、これが膜の脂質に与える影響においては明らかに異なることを示すものであろう。

Lovelock のいうように、凍結融解によっておきる溶血が、濃縮塩によるリポ蛋白質の変



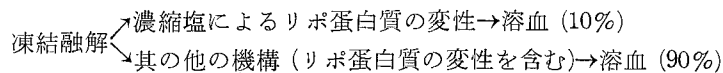
第5図 0.15 M NaCl 溶液を凍結したときの温度と未凍結水分量及び残存塩溶液濃度



第6図 ヒト赤血球の凍結融解及び高張塩処理による磷脂質遊離と溶血の関係

—○—, 凍結融解; —●—, 高張塩処理

せたものを凍結融解した場合には、脂質の遊離はごく僅かしかみられない。0.15 M NaCl 溶液浮遊のゴーストから凍結融解によって遊離する脂質の値と、蒸溜水稀釈の試料から同じ処理で遊離する脂質の値との差 2.5% 弱は、0.15 M NaCl 溶液の凍結の結果生ずる濃縮塩溶液の影響によって遊離する脂質量ということになる。いま、血球を -10°C 付近で凍結融解したとき、凍結の結果の濃縮塩溶液によって遊離される脂質量の量が 2.5% であるとする、これを第6図の塩溶液についての脂質と溶血との関係曲線(黒丸)にあてはめてみれば、濃縮塩による溶血は僅か 10% くらいにしかならない。従って残りの 90% 前後の溶血は、塩害以外の機構でおこるものと考えられ、このときに蒸溜水溶血の際に見られたと同じ約 1% の脂質が遊離することになる。つまり



性の結果とすれば、凍結融解の際の溶血も、高張塩溶液にさらした試料の溶血と同様に、細胞から遊離する脂質の量によってきまる筈である。しかし今回の実験結果は、第6図に見られるように、凍結融解試料では高張塩溶液にさらした試料にくらべて、遊離脂質の量に対する溶血率は非常に大きいので、上記の説明とは矛盾することになる。

次に、溶血という現象を除外して、血球膜脂質に対する塩の作用をみるためと、また低張塩溶液への血球膜浮遊液として扱えるという意味から、血球のゴーストを対象にした実験を行なった。即ち蒸溜水で溶血させて得たゴーストを高張塩溶液にさらすと、正常な血球を同様に処理したものと等しい量の脂質の遊離があった。このことは高張塩溶液が直接膜のリポ蛋白質に作用したことを示し、高張塩溶液処理 → リポ蛋白質の変性 → 溶血という過程は正しいものと推定される。

一方、ゴーストを 0.15 M NaCl 溶液に浮遊して凍結融解すると、その段階で約 2.5% の脂質が遊離し、それにゴーストを得るための蒸溜水溶血の際に遊離する脂質量 1% を加えると、正常な血球を同じ温度 (-9.5°C) で凍結融解した時に遊離する脂質量と等しくなる。しかし 0.015 M と低張の塩溶液に浮遊させ

の図式が成り立つことになろう。塩害以外の障害機構に関しては、本実験ではまだ検討を加えてないが、Meryman のいう minimum cell volume theory¹⁰⁾ の立場からの考え方もあろうし、また根井がさきに報告した比較的高い温度での凍結における機械的障害¹¹⁻¹³⁾ も、その一つとして考慮されてよいであろう。

凍結融解による血球の溶血を考える場合、その一次的な要因としては、塩害其他種々の機構があげられようが、溶血の直接の原因となるものは、やはり膜の透過性の変化、特にリポ蛋白質の構造変化であると思われる。血球膜のリポ蛋白質の構造保持には、疎水結合や分子間水素結合が大きな役割を果していることはよく知られているところであり、凍結や融解による水の脱着がこれらの結合に与える影響は無視できないであろう。そうして変動する水分が多いほど、また水の動きが激しい程、これらの結合に与える影響は大きくなり、その結果として、膜の構造破壊、溶血が大きくなることは容易に考えられる。凍結融解処理に際して、比較的高温での緩慢凍結より、ごく低い温度での急速凍結のほうが(濃縮塩溶液にさらされる時間が短いので塩害による影響は小さいと考えられるのに)脂質の遊離が大きいという事実(第1図中の○)は、これを支持するものと思われる。

V. 摘 要

ヒト赤血球を比較的高い温度でゆっくり凍結融解すると、温度が低くなるに従って溶血を増し、 -10°C で100% 溶血に達した。遊離磷脂質量は -6°C で血球全磷脂質量の3.5% に達するが、それより低い温度ではもはや増加せず、溶血率とは平行しなかった。液体窒素による急速凍結融解のもの遊離磷脂質量は7% であった。

高張食塩溶液にさらした血球では、濃度に従って溶血が増し、2.5 M で100% に達した。このときの磷脂質の遊離は溶血と比例し、2.5 M 溶液で約9% であった。

蒸溜水溶血によって得られたゴーストでも、凍結融解と高張塩溶液による脂質の遊離には同じような関係がみとめられた。

これらの結果から、 -10°C の凍結融解では、溶血の10% 程度が塩害によるもので、90% 前後はその他の原因によるものであろうと推定された。

文 献

- 1) 根井外喜男 1968 血液の低温保存—その歴史的展望. メディヤサークル, **13**, 273-285.
- 2) Lovelock, J. E. 1953 The haemolysis of human red blood-cells by freezing and thawing. *Biochim. Biophys. Acta.* **10**, 414-426.
- 3) Lovelock, J. E. 1957 The denaturation of lipid-protein complexes as a cause of damage by freezing. *Proc. Roy. Soc.*, **B 147**, 427-433.
- 4) Meryman, H. T. 1966 Review of Biological freezing. *In Cryobiology* (H. T. Meryman, ed.), Academic Press, London, 50-58.
- 5) Mazur, P. 1966 Physical and chemical basis of injury in singlecelled microorganisms subjected to freezing and thawing. *In Cryobiology* (H. T. Meryman, ed.), Academic Press, London, 301-304.
- 6) 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.

- 7) 僧 都 博 1969 酵母細胞脂質におよぼす凍結融解及び凍結乾燥の影響. 低温科学, 生物篇, **27**, 23-30.
- 8) Folch, J., Lees, M. and Sloane Stanley, G. H. 1957 A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J. Biol. Chem.*, **226**, 497-509.
- 9) 渋谷 勲・本田弘子・丸尾文治 1966 複合脂質分析法の改良—大腸菌ホスファチドへの応用. 脂質生化学研究, 117-121.
- 10) Meryman, H. T. 1970 The exceeding of a minimum tolerable cell volume in hypertonic suspension as a cause of freezing injury. *In Frozen Cell* (G. E. W. Wolstenholene and M. O'Connor, eds.), J. and A. Churchill, London, 51-67.
- 11) 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. II. 種々の凍結条件による溶血の吟味. 低温科学, 生物篇, **25**, 127-132, 133-142.
- 12) 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.
- 13) 根井外喜男・丹野皓三 1968 氷点に近い温度での凍結による溶血の機構 III. 溶血因子についての一考察. 低温科学, 生物篇, **26**, 91-97.

Summary

Hemolysis and release of phospholipids were examined in human erythrocytes slowly frozen to and thawed from various temperatures ranging from -2°C to -10°C . Hemolysis gradually increased as the freezing temperature was lowered and finally reached 100% at around -10°C . The release of phospholipids also increased with the temperature drop and reached its maximum value at -6°C . No increase was found at lower temperatures.

Similar tests were also done on erythrocytes exposed to various concentrations of NaCl solutions. Hemolysis and the release of phospholipids were both increased in parallel with the concentration of solution up to 2.5 M.

The same results on the release of phospholipids were obtained in experiments using cell ghosts.

It was consequently assumed from the relationship between hemolysis and the release of phospholipids that some factors other than salt injury should be considered as the cause of hemolysis of frozen erythrocytes.