



Title	赤血球の凍結障害の機序：特に融解後溶血に及ぼす細胞濃度の影響
Author(s)	根井, 外喜男; NEI, Tokio
Citation	低温科学. 生物篇, 34, 9-17
Issue Date	1977-03-15
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/17823
Type	departmental bulletin paper
File Information	34_p9-17.pdf



赤血球の凍結障害の機序

特に融解後溶血に及ぼす細胞濃度の影響*

根井外喜男

(低温科学研究所)

(昭和51年8月受理)

I. 緒言

凍結による赤血球の溶血は、凍結条件とくに冷却速度に支配されるところが大きい。著者らが行ってきたこれまでの実験結果から冷却速度によって細胞の凍結像が異り、それに対応して溶血度も異なること¹⁾、さらに凍害防止剤としてグリセリンを加えれば、その濃度に応じて、凍結像も溶血度も変わることが²⁾、知られている。

これらの一連の実験の過程で、使用材料中の赤血球の濃度によって、溶血度の異なることがみとめられたので、その影響の機序を検討した。-10°C くらいまでの緩慢凍結のばあいには、細胞濃度の影響については、すでに報告したが³⁾、今回はさらに広い範囲にわたる冷却速度と、種々の濃度のグリセリンを加えたばあいについても検討し、とくに、それぞれの条件下での凍結像と対比して、溶血の機序の説明を試みたのである。

なお、赤血球の凍結融解実験において、細胞濃度が溶血度に影響することに関し、各種の物質を添加したばあいについていくつかの報告⁴⁻⁷⁾があるが、その機構はまだ明らかにされていない。

II. 材料と方法

材料: 血液銀行で採取された ACD 加ヒト全血液を生理食塩水で3回洗い、最後に 3,000 rpm 10分遠心沈澱し上清を棄てた沈渣を原液とし、それを順次倍数希釈したものを用いた。

凍結方法: 目的によって凍結の方法をいろいろと変えた。まずグリセリンを加えないばあいは、冷却速度と溶血度との関係で、冷却速度は大きくても小さくても完全溶血をおこすので、最適条件の 10°C/min のところだけをしらべた外、冷却速度を一定にして -10°C までの凍結融解についてしらべた。グリセリンを加えたばあいは、さらに広い範囲の冷却速度について吟味した。

-10°C までの緩慢凍結のばあいは、径 10 mm の小試験管に試料を 0.2 ml とり、Haake 製の冷却槽に浸し、-2°C 付近で植氷した後は 1°C/min の速度で冷却し、-10°C までの各温度に達したところで数分おいてからとり出し、室温におかれた生理食塩水の 3.8 ml を加えて急速に融解した。

* 北海道大学低温科学研究所業績 第 1811 号

広い範囲の冷却速度に亘っての吟味のためには、凍結像の形態的観察と溶血度の測定を同一条件のもとで行なえるように、特殊な凍結方法を行なった。すなわち厚さ 0.3 mm 大きさ 10×10 mm の銅板に試料を 0.01 ml とり、次のような条件で凍結した後、室温におかれた 4 ml の生理食塩水（ビーカー中）に銅板のまま投入して急速融解した。まず 10^4 °C/min としては、液体窒素で冷却したフロン 22 中への直接投入、 10^3 °C/min としては、液体窒素中直接浸漬、 10^2 °C/min としては、ジュワー瓶中の液体窒素面より上の空気層（ -100 °C くらい）中での保持、 10 °C/min としては、 -20 °C、 -80 °C のディープ・フリーザー及び液体窒素の段階的冷却によるもので、いずれも最終到達温度は -196 °C である。冷却速度は、熱電対によって測定した温度変化から求めたが、試料の関係上正確を期することがむずかしいので、比較的大まかな目やすを示しているにすぎない。

凍結状態の観察： -10 °C までの緩慢凍結のばあいには、特殊低温顕微鏡を用い、薄層試料にして各温度での凍結状態を観察した。

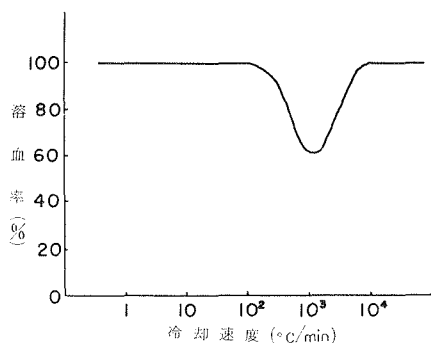
その他の条件での凍結像の観察は、すべて電子顕微鏡によるもので、前記の凍結条件で液体窒素温度まで冷却した試料を、フリーズ・レプリカ法⁸⁾または Cryo-SEM 法⁹⁾によって標本を作り、それぞれ透過型電子顕微鏡 (JEM-100 C) または走査型電子顕微鏡 (JSM-50 A) で観察した。

溶血度の測定： 融解後の試料の遠心上清中に遊離したヘモグロビンを光電比色計 (540 nm) で比色定量し、対照の蒸留水溶血のものに対する百分率で表わした。

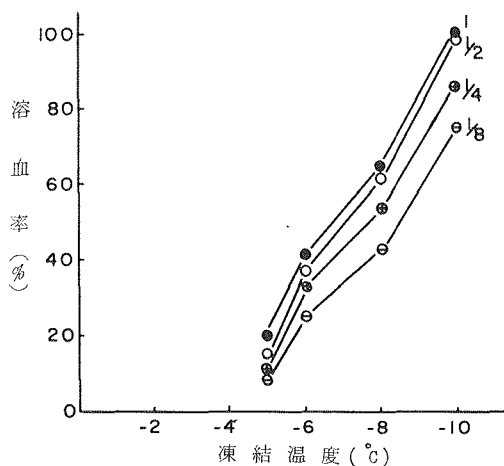
III. 結 果

冷却速度と溶血率： 細胞原液を 2 倍にうすめたものについて、 $10 \sim 10^4$ °C/min の範囲の冷却速度と溶血率との関係をしらべると、第 1 図に示すように、 10^3 °C/min 附近で多少の溶血の少ないところがあるが、他の速度のところではいずれも 100% の溶血を示した。このような結果は、すでに報告したものと同様である。

-10 °C までの緩慢凍結： 前項に示すように、



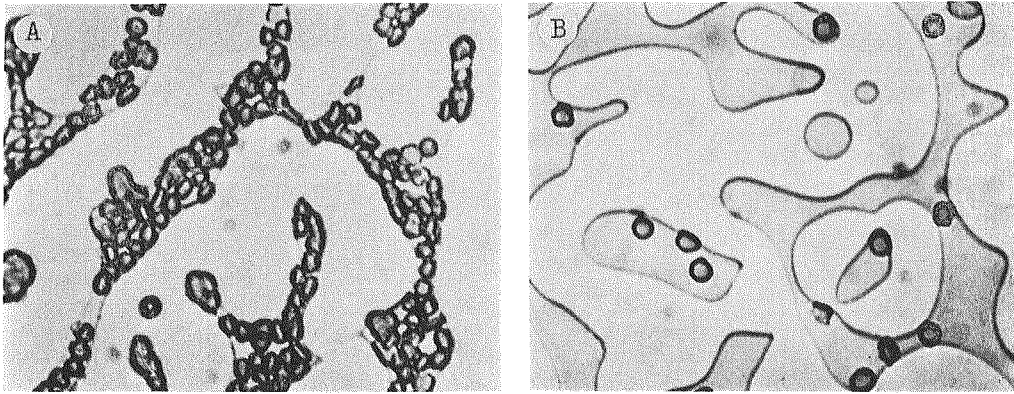
第 1 図 冷却速度と溶血との関係
(2 倍希釈浮遊液)



第 2 図 緩慢冷却 (1 °C/min) のばあいの凍結温度と溶血率の関係に及ぼす細胞濃度の影響
数字はそれぞれ細胞濃度を示す

緩慢凍結でも液体窒素温度まで冷却したのではすべて完全溶血をおこしてしまうので、同一冷却速度で比較的高い温度までの凍結実験を行なった。冷却速度は凡そ $1^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 、到達温度は -10°C までとした。その結果は第2図に示すように、原液から2, 4, 8倍と希釈されて細胞濃度がうすくなるにしたがい、溶血率は減少した。

またこの条件での細胞の凍結状態を特殊低温顕微鏡下で観察すると、第3図にみられるように、温度が低下するにしたがい、氷は増大し、それだけ塩溶液の未凍結部分は狭くなり、細胞はこの濃縮塩溶液の中に閉じこめられ変形していく。この観察をするのに、濃厚細胞浮遊液では凍結状態が見にくいので、とくに薄めた細胞液を用いた。その中でも、細胞の少ないときは濃縮液中に遊離して散在しているが(第3図-B)、細胞の多いときは、狭い空間に圧縮充填される様子がよくわかる(第3図-A)。

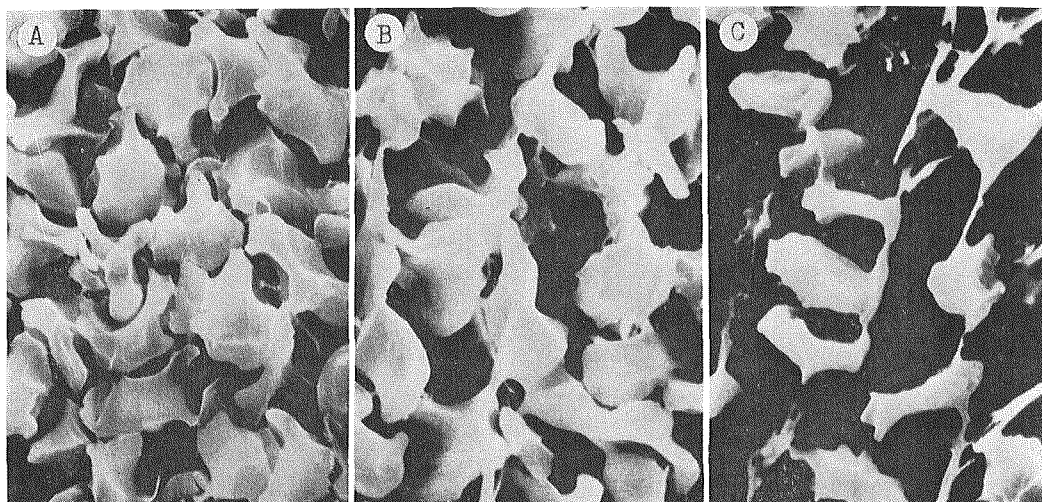


第3図 細胞濃度の異なる浮遊液の凍結像。特殊低温顕微鏡による観察。
2枚のガラスに挟んだ薄層試料に -1°C で植氷し -4°C まで冷却した時の凍結状態
A: 細胞の多いとき, B: 細胞の極端に少ないとき

$10^3^{\circ}\text{C}/\text{min}$ の冷却速度のばあい: 細胞浮遊液原液, 2倍, 及び4倍希釈浮遊液をほぼ $10^3^{\circ}\text{C}/\text{min}$ の冷却速度で凍結させたときの溶血率は、それぞれ90.0%, 77.3% 及び59.5% で、やはり細胞濃度が低くなるにしたがい、溶血率が低下した。

この条件での細胞の凍結像をCryo-SEM法で作った標本について電子顕微鏡で観察すると、第4図に示すように、原液では細胞は相互に密着しているが、4倍希釈になると細胞は個々に遊離し、相互間の空隙はかなり広い、しかしいずれにしても各細胞は相当に変形収縮しているのが目につく。

細胞充填状態の吟味: これまでの実験の結果から、細胞濃度の高いものほど細胞の細密充填による機械的影響の大きいことが推定されるので、その点をさらに吟味する目的で、新鮮血球と固定処理血球や他種細胞の混合によるモデル実験を試みた、すなわち、新鮮血球1容量に対し、2% グルタル・アルデヒド30分処理血球または新鮮酵母細胞菌体(いずれも生理食塩水で3回洗ったもの)3容量加えたものを試料とした。すなわち、溶血をおこしヘモグロビンを遊離できる細胞は全体の1/4で、他の3/4は溶血をおこすことのないものであるが、試料全体と



第4図 細胞濃度の異なる浮遊液(原液, 2倍, 4倍希釈液)の 10^3 °C/minの冷却速度での凍結像 Cryo-SEM法による観察
A: 原液, B: 2倍希釈液, C: 4倍希釈液 2,500×

しての細胞濃度は原液に相当している。これを前項の条件と同じ 10^3 °C/minの冷却速度で凍結すると、融解後の溶血は第1表に示すような結果となった。原液では90.0%, 4倍希釈液では53.6%であるのに対し、固定血球添加で91.0% 酵母細胞添加で100.0%となり、結局、細胞濃度(ある意味では試料中の固形物の密度)が増せば、溶血も増すということが、このような条件でも実証された。

その凍結状態を前実験同様 Cryo-SEM法

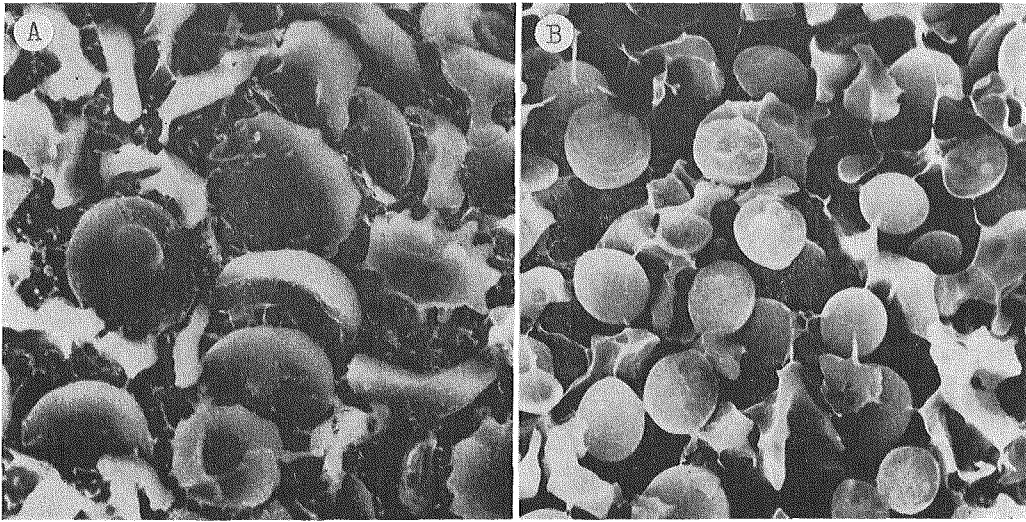
によって観察すると、第5図に示すように、 10^3 °C/minの冷却速度では、固定赤血球や酵母細胞は正常形態を保持しているのに対し、新鮮血球だけが収縮像を示すので、両者は明らかに区別がつく。このばあいの新鮮血球の収縮像や混在する他の細胞との相互関係は、新鮮血球だけの高濃度のばあいと本質的な差はない。要するに細胞の性状や種類を問わず、互に相い接触するほど密に充填していることが、溶血を増す原因と推定される。

グリセリン添加のばあい: 最終濃度が5, 10, 20% (v/v)になるようにグリセリンを加えた食塩水で洗った試料について、各種の冷却速度で凍結させ、融解液の溶血を測ると、第6図のような溶血曲線を示す、それによれば、グリセリン濃度が5%のところでは細胞濃度による差が最も大きく、10%, 20%となるにしたがって、その差が次第に小さくなっている。また溶血の最も少ない最適冷却速度も、グリセリン濃度が大きくなるにしたがい冷却速度の小さい側に移っている。

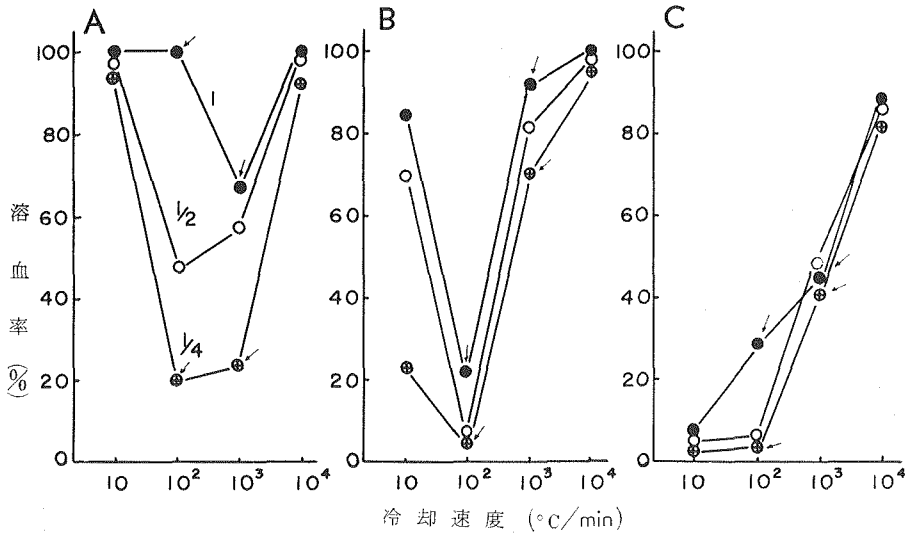
これらの溶血曲線の上で、比較的細胞濃度による影響の大きい条件のところ、実際の細

第1表 異種細胞混合浮遊液の凍結による溶血
冷却速度: 10^3 °C/min

	溶血 %
血球原液	90.0
混合浮遊液	
グルタール・アルデヒド固定血球 3容	91.0
新鮮血球 1容	
酵母細胞 3容	100.0
新鮮血球 1容	
4倍希釈血球液	53.6

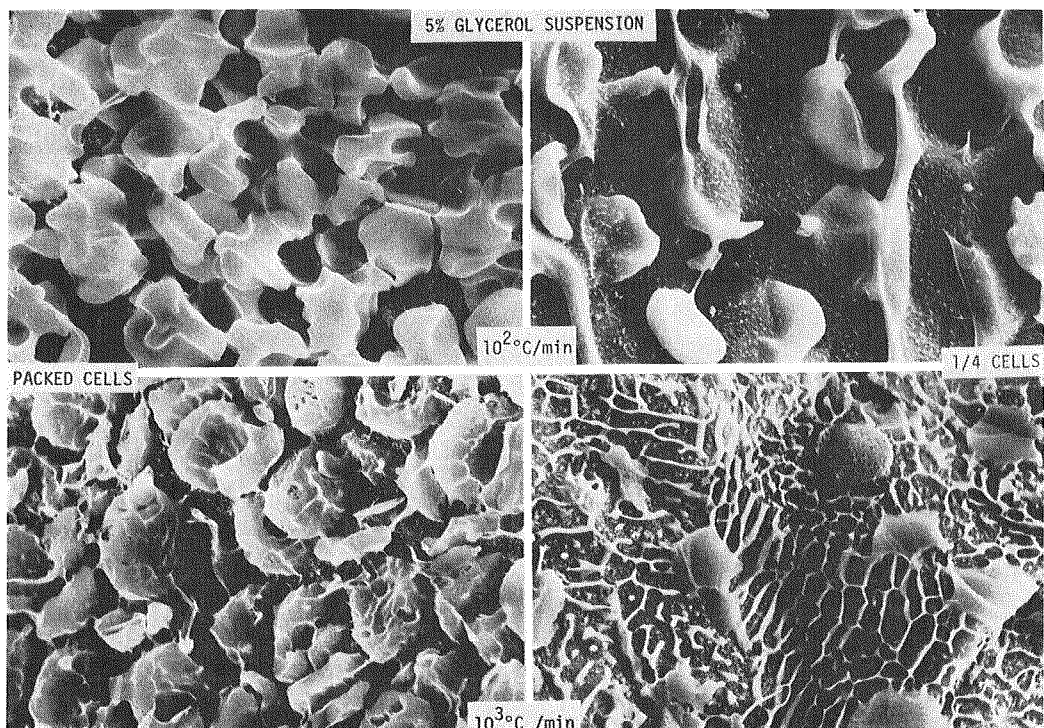


第5図 異種細胞混合浮遊液の凍結像 (冷却速度: 10³°C/min)
 A: グルタル・アルデヒド固定血球3容, 新鮮血球1容混合
 B: 酵母細3胞容, 新鮮血球2容混合 2,500×

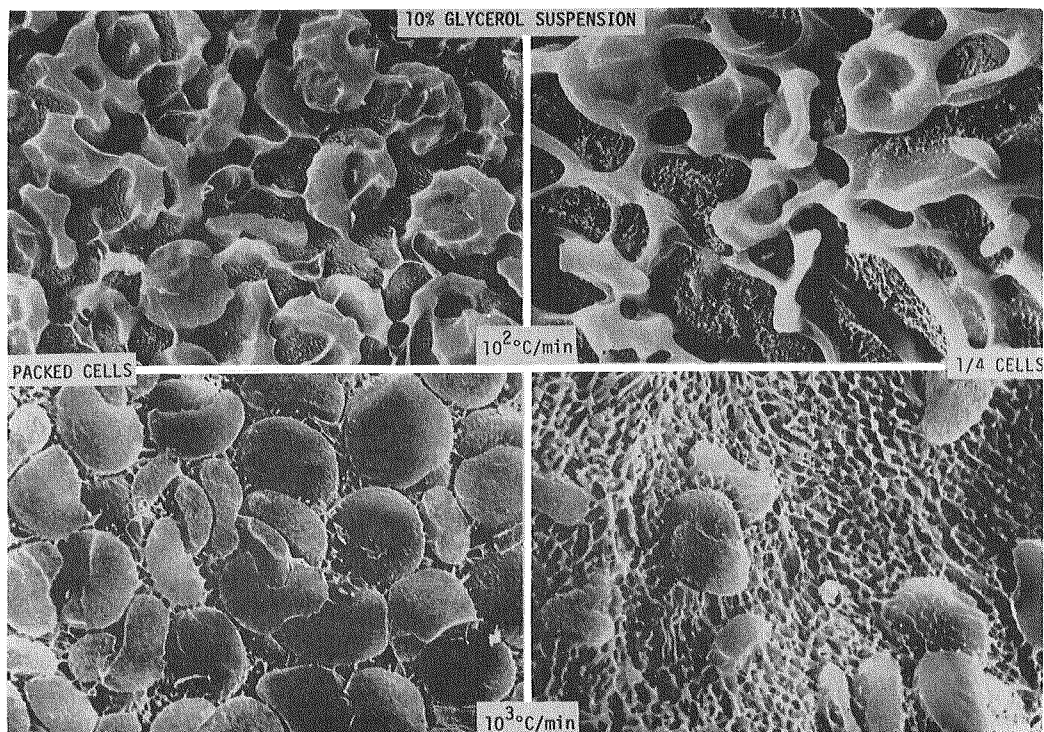


第6図 細胞濃度, グリセリン濃度, 冷却速度と溶血との関係
 A, 5% グリセリン; B, 10% グリセリン; C, 20% グリセリン
 ●, 原液; ○, 2倍希釈液; ⊕, 4倍希釈液
 矢印は凍結像を観察したところを示す (第7, 8, 9図)

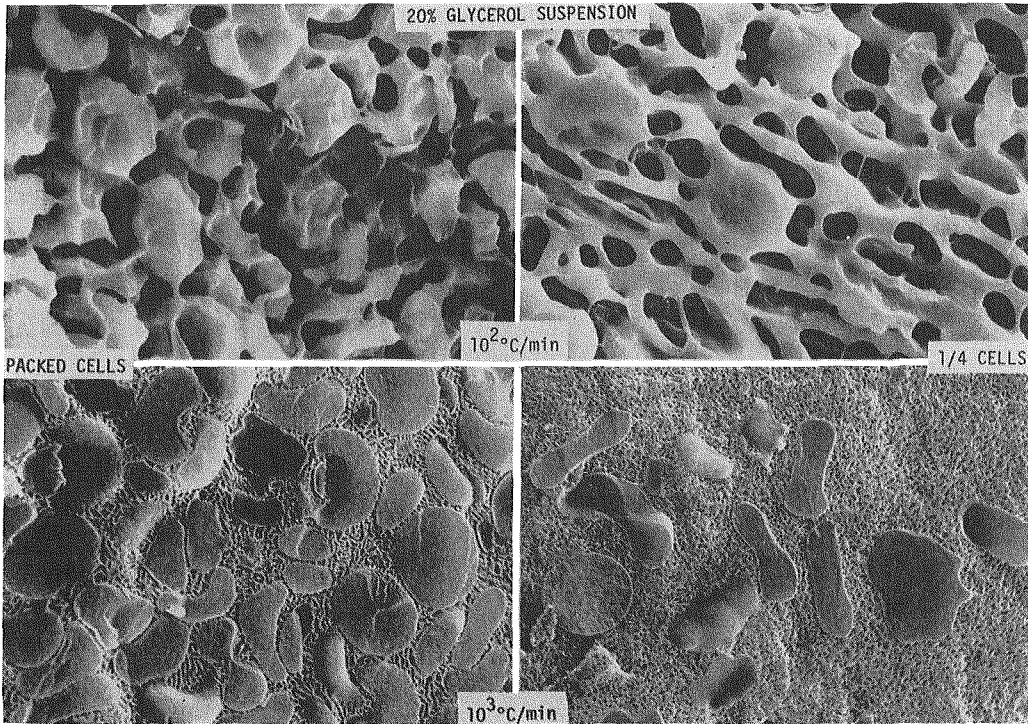
胞の凍結像をしらべてみると, 先ず5% グリセリン浮遊液では, 10²°C/min で前項のグリセリンのない対照浮遊液の 10³°C/min とほぼ似たような収縮像の所見を呈してはいるものの個々の細胞の輪郭はやや円味を帯びている。これは媒液中のグリセリンが細胞周辺を包んでいることによるのであろう。10³°C/min では, 収縮の程度はやや少なく正常形に近いが, 大部分または一部の細胞に細胞内氷晶形成がみられる。10% グリセリン浮遊液では, 10²°C/min で収縮度はさ



第7図 5%グリセリン加血球浮遊液の凍結像
 上段は 10^2 °C/min, 下段は 10^3 °C/min の冷却速度
 左側は原液, 右側は4倍希釈液を示す以下第8, 9図も同様



第8図 10%グリセリン加血球浮遊液の凍結像



第9図 20%グリセリン加血球浮遊液の凍結像

らに少なく、とくに4倍希釈液で正常形に近い、このときの溶血度は極めて低い。ところが 10^3 °C/minでは大部分の細胞が細胞内凍結をおこしており、溶血度も80%前後と高い。さらに20%グリセリン浮遊液では、 10^2 °C/minの細胞原液でまだ多少の収縮像がみとめられるが、4倍希釈液では細胞は網状構造のグリセリンに完全に包まれたような感じである。 10^3 °C/minでは細胞濃度にかかわらずほぼ正常形を示すが、高倍率ではごく微細な細胞内氷晶がみとめられ、溶血も40%くらいになっている。

IV. 考 察

赤血球浮遊液を凍結融解するとき、試料中の細胞濃度によって溶血度の異なることをみとめたので、細胞濃度による影響のおこる条件を吟味し、その機構を検討した。

赤血球の生理食塩水浮遊液の凍結では、冷却速度 10^3 °C/min付近に多少溶血の少ないところがある外は、それより冷却速度が大きくても小さくてもすべて100%の溶血を示す、この付近での凍結、および 1 °C/minで -10 °Cまでの緩慢凍結では、いずれも細胞濃度の大きいものに高い溶血度がみられ、しかもそれらの条件での細胞の凍結像はすべて変形収縮を示し、細胞濃度が大きいほど各細胞は複雑な形態をとり、かつ相互に密着充填していることがよくみとめられた。なお 10^3 °C/minより大きい冷却速度では、細胞内凍結がみられ100%に溶血することはすでに報告^{1,2)}した通りである。

細胞濃度と溶血との関係は、赤血球を性質や種類の異なる他の細胞で置きかえたばあいにも

同じようにみとめられることから、凍結融解の過程で、収縮変形かつ固化した細胞が密に充満して相互接触の機会が多くなるほど、機械的に障害される可能性が大きくなるものと考えられる。

さらにグリセリンを加えての検討では、グリセリンが増すほど、最適冷却速度は小さい方にずれるが、それより冷却速度の大きいところでみられる溶血は、ほとんど細胞内凍結によるものと思われる。細胞濃度による影響は最適冷却速度の付近で比較的是っきりみられるが、この条件での凍結状態をよく観察すると、細胞の少ないものほど変形収縮は少なく、しかも濃縮されたグリセリンの網状構造に覆い包まれているのがわかる。また細胞濃度の大きいものでも、グリセリン濃度が増すほど、変形収縮は少ないようにみえる。このようにグリセリンの添加は、細胞の脱水による変化を軽減し、しかも細胞の周囲を覆って機械的障害を少なくすることに役立っているものと思われる。

以上のように、赤血球の凍結にあたって、浮遊液中の細胞濃度の大きいほど融解後の溶血が強いという現象の機構について、試料の凍結状態の形態的観察を基盤として考察すると、次のように推定された。赤血球浮遊液が細胞外凍結をおこすような冷却速度（比較的遅い冷却速度）では、細胞は脱水され変形収縮する。しかも低温下にあるので、細胞膜は固化しており、不規則な形態をとることによって機械的に障害を受けやすい状態にあるものと思われる。このような状態の細胞がその密度を増すほど（同じ細胞でなく他の固形物であってもよいわけだが）、細密充填による相互接触などによって、いっそう機械的障害のおきる頻度が増すものと考えられる。

このことは、食塩水浮遊液のようにいわば細胞が裸のまま浮遊している時には顕著にみられるわけで、グリセリンのような粘性のある物質が添加され、しかもその濃度が増すほど、細胞濃度による差がみられなくなることは、グリセリンの細胞に対する保護作用によるのであろうと考えられる。

このような溶血の機序については、今回は主として凍結像から説明を試みたが、さらに種々の角度からみた検討が必要であろう。

なお、この細胞濃度の問題については、他にも多くの報文⁴⁻⁷⁾があるが、いずれも実験事実の報告だけで、その機序について検討されたものはない。ただ Rinfret⁸⁾のみが細胞濃度により試料の熱移動の異なることがきくのではないかと推論しているにすぎない。

V. 摘 要

赤血球浮遊液を凍結融解するとき、細胞濃度が大きいほど溶血度が高いことについて、その機序を検討した。その結果、これらはすべて細胞外凍結による収縮変形細胞にみられることから、細胞が密に充満するほど相互接触など機械的に障害されることが多くなるためであろうと推定された。

本実験を行なうに当たり、Cryo-SEMの観察について、藤川清三博士、浅田実技官の協力を得たことを深謝する。

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) Nei, T. 1976 Freezing injury to erythrocytes. I. Freezing patterns and post-thaw hemolysis. *Cryobiology*, **13**, 278-286.
- 3) Nei, T. 1958 Mechanism of hemolysis of erythrocytes by freezing at near-zero temperatures. II. Investigations of factors affecting hemolysis by freezing. *Cryobiology*, **4**, 303-308.
- 4) Strumia, M. M., Colwell, L. S. and Strumia, P. V. 1960 The preservation of blood for transfusion. IV. *In vitro* recovery after freezing and thawing of red cells modified with sugars. *J. Lab. Clin. Med.*, **56**, 576-586.
- 5) Rinfret, A. P. 1953 Some aspects of preservation of blood by rapid freeze-thaw procedures. *Fed. Proc.* **22**, 94-101.
- 6) Rapatz, G. and Rapatz, L. 1973 Effect of cell concentration on the extent of injury to erythrocytes by freezing (Abstract). *Cryobiology*, **10**, 529.
- 7) Dalglish, R. J. 1976 Effect of an interaction between haematocrit and cryoprotectant concentration on freeze-thaw hemolysis of bovine erythrocytes. *Cryobiology*, **13**, 254-257.
- 8) 根井外喜男, 松坂理夫, 浅田 実 1971 フリーズ・エッチング法における冷却条件の吟味. 低温科学, **B**, **29**, 91-105.
- 9) Nei, T., Yotsumoto, H., Hasegawa, Y. and Hasegawa, M. 1974 Freeze-etching in scanning electron microscopy. *J. Electron Microscopy*, **23**, 137-138.

Summary

It has been reported by several investigators that post-thaw hemolysis of erythrocytes, frozen under various conditions, depends upon initial cell concentration; increasing the cell concentration decreases the proportion of intact cells after freeze-thawing.

In the present study, the effect of cell concentration upon post-thaw hemolysis was examined mainly by morphological observation of freezing pattern of specimens. This effect was markedly revealed only in concentrated cell suspensions, in which cells had become shrunken due to extracellular freezing.

From the results thus obtained, the mechanism of such an effect may be explained by assuming that cells, deformed in the freezing process and rigid at low temperatures, might undergo mechanical damage when subjected to compression and abnormal contact.