



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	ヒト赤血球の凍結における細胞外不凍溶液量と溶血との関係 I : 2 Mグリセリン溶液中での凍結による溶血
Author(s)	僧都, 博; SOUZU, Hiroshi; メーカー, ピーター 他
Citation	低温科学. 生物篇, 34, 19-25
Issue Date	1977-03-15
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/17824
Type	departmental bulletin paper
File Information	34_p19-25.pdf



Hiroshi SOUZU and Peter MAZUR 1976 Correlation between the Survival of Slowly Frozen Human Red Cells and the Composition of the Unfrozen Portion of the Extracellular Medium at Various Subzero Temperatures. I. Hemolysis by Freezing in 2 M Glycerol. *Low Temperature Science, Ser. B, 34.* (With English Summary p. 25)

ヒト赤血球の凍結における細胞外 不凍溶液量と溶血との関係

I. 2 M グリセリン溶液中での凍結による溶血*

僧 都 博

(低温科学研究所)

ピーター・メーザー

(オークリッジ国立研究所, 米国)

(昭和 51 年 10 月受理)

I. 緒 言

生細胞をゆっくり凍結するとき、細胞外溶液の凍結にともなって細胞からの脱水がおこることはよく知られたことである。赤血球の凍結による溶血の原因の一つとして今日もひろく受け入れられている塩害説においても、細胞外塩溶液の濃縮とともに、細胞からの脱水によって生じる細胞内での塩濃度の増加が重要な因子と考えられている¹⁾。このことは、グリセリンが溶血防止剤として効力をあらわすためには細胞内に浸透していなければならないという実験事実から支持される²⁾。赤血球浮遊液をゆっくり凍結するとき細胞からの脱水は細胞浮遊液の凍結によっておこされるので³⁾、細胞浮遊液中での不凍部分組成と溶血率との間には密接な関係があるものと考えられる。グリセリンを高濃度に含む水溶液では凍結温度に対して比較的少量の不凍水分を溶液内に残すことができるので、このような検討には好都合である。この実験では 2 M のグリセリン溶液を使うことによって、凍結温度変化による不凍溶液量の変化にはばを持たせ、細胞からの脱水の度合いと溶血率との関係を調べようとした。

II. 材料と方法

材料：ヘパリンを加えて採血したヒト血液を 0.15 M 食塩水またはこれに 0.01 M 磷酸緩衝液 (pH 7.0) を加えた液で 2 度遠心洗滌した。パスツールピペットで上清を除いた遠心沈渣を、それぞれ食塩水または磷酸緩衝液を含む食塩水に、洗滌前の全血と同量になるように浮遊し実験に供した。血液は採血後 5 日以内のもののみを使用し、洗滌した血液は当日の実験にのみ使用した。

グリセリンの添加及び平衡：2 M グリセリンを含む 0.15 M 食塩水、またはこれに 0.01 M 磷酸緩衝液を加えた溶液、それぞれ 4.75 ml に上記の洗滌血球液 0.25 ml を加えて静かに攪拌した。

* 北海道大学低温科学研究所業績 第 1812 号

細胞内外のグリセリン濃度を平衡させるためにこれを20°Cに30分間保持したのちに使用した⁴⁾。

凍結の方法：3本ずつルーサイトホルダーに固定したガラスの凍結チューブ（長さ90 mm，外径及び内径それぞれ7及び5 mm）に，グリセリン平衡後の血球試料0.1 mlをとり，これをあらかじめドライアイスで-7.5°Cに冷却したエタノール槽中に浸した。3分間その温度に置いたのち，先端部に氷を含んだパスツールピペットを試料の表面に軽くふれることによって植氷した。植氷に用いたパスツールピペットは，先端部に含んだ水を液体窒素で凍結し，植氷前に植氷槽に移してその温度にして置いた。植氷後，試料をその温度に4乃至5分間置いて氷の成長が完了したのち，-8°Cにセットされた凍結槽に移し，直ちに槽自体の冷却を開始した。槽の温度は，Northrop Speedmax Type G 記録計に接続した30ゲージ銅-コンスタンタンサーモカップルで連続的に記録し，この槽の温度をもって試料の凍結温度とした。この方法による槽の最低到達温度は-100°Cであった。所定の凍結温度に達した所で試料をホルダーごと槽からとり出し，直ちに下記にするす種々の方法で融解した。

凍結速度：試料を-10°Cから-60°Cに冷却するのに要する時間にもとずく2種の凍結温度を使用した。凍結槽及びその凍結速度は以下に示す通りである。

A. 毎分0.5°C。外径85 mm，深さ280 mmの真空，無メッキのデュワー瓶に500 mlの95%エタノールを入れ，アルコールを攪拌しながらこの槽全体を5 lのデュワー瓶に入れた液体窒素で冷却した。

B. 毎分1.7°C。この速度はAと同じ方法で，ただし，真空にされたデュワー瓶の代りに真空でないデュワー瓶を用いて得られた。

融解の方法と速度：**A. 最も速い融解** 凍結槽から取り出したチューブを35°Cの温湯中で手で振りながら融解した。氷晶のなくなるのが確認されると，すぐに0°Cの氷水中に移しそれ以上に温度が上昇するのを防いだ。この方法で融解するときの温度上昇速度は，-65°Cから-10°Cの間を通過するに要する時間を基準として毎分550°Cと算定された。

B. 比較的速い融解 前記と同様であるが，35°Cの温湯の代りに0°Cの氷水中で振りながら融解した。この方法による温度上昇速度は，上記と同様に測定した場合，毎分130°Cであった。

C. 比較的遅い融解 凍結槽から取り出した試料をそのまま室温に放置して自然に融解するのを待った。この場合の温度上昇速度は同様の基準から算定して毎分33°Cであった。

D. 最も遅い融解 この融解槽は1 lのビーカーに350 mlのエタノールを入れたものを，厚さ5 mmのコルク板を介してマグネチックスターラーの上に置いたものである。あらかじめ試料の凍結温度までドライアイスで冷やしたこのエタノール槽中に凍結槽から取り出した試料を浸し，マグネチックスターラーで静かに攪拌しながら室温で槽の温度が上昇するのを待った。試料の温度はエタノールの温度上昇に一致し，この速度は毎分1°Cであった。

なお，どの融解速度の場合にも，試料は溶血測定のための希釈がおこなわれるまで0°Cに保たれた。この時間は一連の実験のうち，最初に融解されたものでは約3時間，最後に融解されたものでは約15分であった。

溶血率の測定：融解後の試料(0.1 ml)を完全に遠心管に移し，これにその試料を浮遊するのに

使用した溶液 0.9 ml を加えて 10 分の 1 濃度に希釈した。このものを 1,600 × g, 10 分間遠心し、上清から 0.5 ml をピペットで取って、これに 0.5 ml の Drabkin Solution を加えて 10 分間室温に保持した。Cyanomethemoglobin の吸収は、Baush and Lomb Spectronic 20 Photo Electronic Colorimeter を用いて 540 nm で測定した。別に 100 パーセント溶血の試料を作り、これとの吸収の比から溶血率を算定した⁵⁾。100 パーセント溶血の試料は 20 μl の洗滌血液を 4 ml の 0.01 M 磷酸緩衝液 (pH 7.0) で希釈して得た。

III. 結 果

凍結温度と溶血率： 2 M グリセリンを含む溶液に浮遊した血球をゆっくり凍結すると、 -30°C 近辺で溶血が始まり、凍結温度の低下につれて溶血率は除々に大きくなって、 -100°C (本実験での最低到達温度) 近辺でその最高値に達するものと思われた。後述するように、溶血率は凍結速度及び融解速度によって大きな変化が見られたが、溶血のおきる温度範囲には大きな変化は見られなかった。また、凍結速度及び融解速度をかえた総ての実験について、生理食塩水とこれに磷酸緩衝液を加えたものの比較をこころみたが、この場合にも溶血温度範囲には異いが見られなかった。溶血率について見ると、磷酸緩衝液を加えたものの方が、低温度域でやや低い値が見られたが、総体的には、両者の間に大きな差は見られなかった (第 1 表)。

凍結速度と溶血率の関係： 磷酸緩衝液を加えた試料をそれぞれ毎分 1.7°C 及び 0.5°C の速度で凍結し、所定の温度に到達した所で毎分 550°C の速度で融解したときの最低凍結温度と溶血率の関係を第 1 図に点線で示した。毎分 1.7°C の凍結では、溶血率は温度の低下につれて一様に増加したが、毎分 0.5°C 凍結のものでは、 -35°C 位から溶血の増加がやや急になり、 -60°C 位から再びゆるやかになってゆくのが見られた。このような差が、真に凍結速度の差による氷晶の生成状態の差によるものか、あるいは単に凍結状態に置かれた時間の差によるものかを確かめる目的で更に次の実験をおこなった。

試料を毎分 1.7°C の速さで凍結し、一定の温度に達した所でそれ以上の冷却を止め、毎分

第 1 表 凍結融解の条件と溶血温度、溶血率

凍結速度 ($^{\circ}\text{C}/\text{分}$)	融解速度 ($^{\circ}\text{C}/\text{分}$)	10% 溶血温度		-80 度での溶血率	
		生 食* ($^{\circ}\text{C}$)	緩衝液** ($^{\circ}\text{C}$)	生 食* (%)	緩衝液** (%)
0.5	1	-44	-44	40	36
	33	-28	-28	63	59
	130	-24	-24	82	72
	550	-28	-30	52	44
1.7	1	-64	-68	20	14
	33	-32	-34	37	36
	150	-28	-28	66	58
	550	-26	-30	42	33

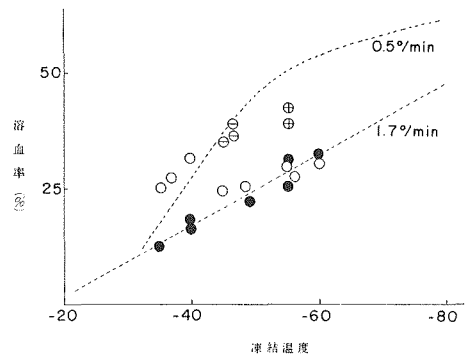
* 生理食塩水及び 2 M グリセリンからなる溶液

** 0.01 M 磷酸緩衝液 (pH 7.0), 生理食塩水及び 2 M グリセリンを含む溶液

0.5°C凍結の試料がその温度に達するのに要する時間までその温度に保ったのち融解した。この場合の溶血率は凍結温度によって異なり-35乃至-40°Cまで凍結した試料ではその温度に保持することによって、毎分0.5°C凍結の場合よりやや高い溶血を示した。しかし凍結温度が-45°C以下の場合には保持時間の影響は見られず、その凍結温度に到達後直ちに融解した場合の溶血率と等しかった。一方、同じ凍結温度でも試料の温度保持を-35°C及び-45°Cの2度に、更に同様にして3度にかけて-55°Cまで凍結した場合には、その処理による効果は減少しながらも、一律に毎分1.7°Cの速さで凍結した試料に比べて明らかに高い溶血率を示した(第1図)。

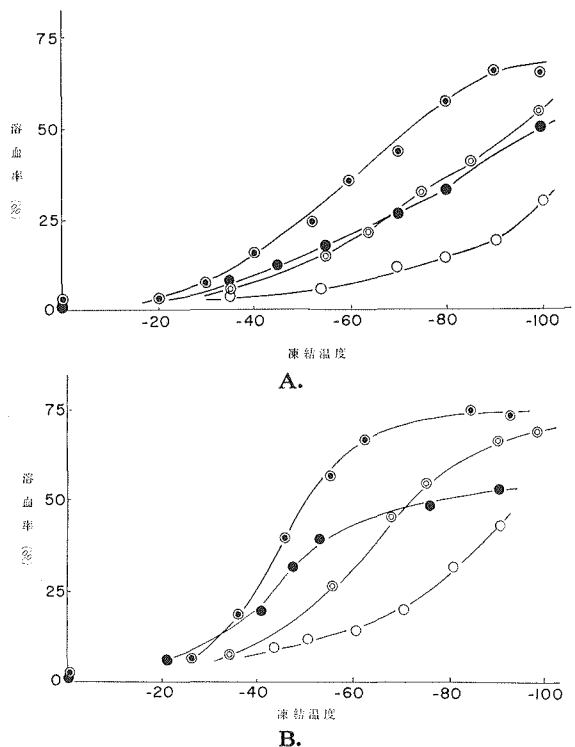
融解速度の溶血率に与える影響：同一条件で凍結した試料を異なる速度で融解すると、溶血率は融解速度及び最低到達温度にしたがって大きく変

化することが見られた。第2図A, Bに、前章と同じ条件で凍結した試料をそれぞれ異なる速度で融解したときの溶血率を示した。いずれの凍結速度においても毎分1°Cの融解速度のとき最も低い溶血率を示し、毎分130°C融解のときに溶血率が最も高かった。毎分550°Cで融解した場合には溶血率は再び低くなって、毎分33°C融解のものと同値を示したが、両者の関係は凍結速度及び最低到達温度によって多少異なるようであった。凍結速度の違いによる溶血率の差は、いずれの場合にも毎分0.5°C凍結のものの溶血率が毎分1.7°C凍結のものよりも高く、前章で示したのと同じ関係にあった。この両者の溶血率の差が大きくなる温度範囲は融解速度に従って2つのグループにわかれているようであった。すなわち、毎分550°C及び130°Cで融解した場合



第1図 グリセリン及び磷酸緩衝液を含む生理食塩水に浮遊した試料の凍結速度及び凍結後の時間経過による溶血率の変化(融解速度毎分550°C)

点線は図中記載の速度で凍結し直ちに融解した時の溶血率を示す。●, 試料を毎分1.7°Cで一律に凍結し直ちに融解したもの; ○, 同様に凍結した試料を、毎分0.5°Cで凍結するのと同じ時間まで置いた後融解したもの; ⊕, 同上試料を-35°C及び-45°Cと2段にかけて凍結、保持したのち融解したもの; ⊕, 同上試料を-35°C, -45°C及び-55°Cの3段に分けて凍結、保持したのち融解したもの



第2図 融解速度と溶血率の関係(溶液組成は第1図と同じ)
A. 凍結速度毎分1.7°C, B. 同0.5°C, 融解速度: ○, 毎分1°C; ⊙, 毎分33°C; ⊕, 毎分130°C; ●, 毎分550°C

には -40°C から -60°C にかけて凍結された場合に大きな差が見られるのに対して、毎分 33°C 及び 1°C で融解された場合には、 -60°C 乃至 -80°C まで凍結された試料でその差の大きくなっているのが見られた。

IV. 考 察

2 M グリセリン溶液を凍結するとき、 -30°C では溶液内の水分の 68 パーセントが凍結しているものと考えられる (僧都未発表) ので、溶血に関係があるのは、その温度以下で凍る少量の水分と関係していることが示唆される。また、このように高濃度になったグリセリン溶液の凍結の際にはグリセリンの影響で溶液内の水の動きは不活潑になっているため、試料中に残った水分の凍結が凍結温度と平衡に達するには、水溶液或いは、低濃度のグリセリン溶液の凍結に比べて非常にながい時間を要することが知られている⁶⁾。凍結速度と溶血率の関係を調べた実験で、毎分 0.5°C の速さで凍結した試料において、毎分 1.7°C の速さで凍結した試料よりも高い溶血率が見られたが、これは上記のような理由によって毎分 0.5°C の凍結では、毎分 1.7°C の凍結に比べて氷晶の生成がより多く進行し、いわゆる過冷却状態の水が少なくなるために高い溶血率を示したものと思われる。第 1 図に示したように、毎分 1.7°C の速さで凍結した試料を一定温度に保持することによって溶血率が増加するのは、氷晶生成に遅れがあるとの推測をうらずけるものであろう。この図はまた、水の動きが凍結温度の低下 (グリセリン濃度の増加も伴ならう) とともに更に遅くなることをも示唆している。この実験で、毎分 1.7°C の速さで一律に凍結した試料が -40°C より高い温度では保持時間の効果があらわれるのに対して、 -50°C より低い温度では、時間を置いてもその効果は見られなくなっている。このことは -40°C より高い温度では過冷却された水はまだかなり速く凍り得るのに対して、 -50°C まで過冷却された場合には、このような動きが非常に小さくなっていることを示すものであろう。以上の結果から、比較的ゆっくりと凍結したときの溶血は溶液内での氷の生成量、逆にいえば細胞からの水のとられ方に比例して増加するものと推察される。

このように脱水が進行している細胞では、その脱水度にしたがって融解の過程、すなわち凍結によってとられた水が細胞にもどる際の状況が溶血率に大きな影響を与えるものと思われる。第 2 図、A、B の比較から、同じ融解速度ならば、毎分 1.7°C 凍結のものに比べて、毎分 0.5°C 凍結のものの溶血率が常に高いことが知られるが、このことは、脱水の進んだ細胞ほど同一融解速度でもその影響を受け易い状態に置かれていることを示すものである。

融解速度の溶血率に与える影響は非常に大きい、毎分 550°C 融解のものを除けば、融解速度の小さいものほど低い溶血率を示して居り急速な復水に比べてゆっくりした腹水が細胞の障害を低くおさえ得ることを示唆している。第 3 図は融解速度の異なる 4 つの試料について、毎分 1.7°C の速さで凍結したときと、毎分 0.5°C の速さで凍結したときの溶血率の差を凍結温度ごとにもとめたものである。図にみられるとおり、かなり速い融解 (毎分 550°C 及び 130°C) の場合には、凍結速度の違いによる溶血率の差の極大が -60°C 附近にあり、もっと遅い融解速度 (毎分 33°C 及び 1°C) の場合にはこれが -80°C 附近にずれている。凍結過程での細胞からの脱水が、すべての温度範囲で毎分 1.7°C で凍結した場合には毎分 0.5°C で凍結した場合よりも少ない

ながらも、その差は凍結温度の低下につれて次第に小さくなるものと仮定するとこの現象は次のように説明されよう。すなわち、細胞からの脱水が或る程度進んだ段階では、細胞は比較的速い融解による影響を受け易く、影響の大きさは脱水度に依存する。この段階では比較的ゆっくりした融解ならば脱水度に多少の差があってもあまり影響はなく溶血を低くおさえることができる。凍結温度が -80°C 近くなり、もっと脱水が進んだ段階では、脱水度の与える影響は更に大きくなって、ゆっくりした融解によってもその差をう

めることができなくなる。このような段階では、速い融解では多少の脱水度の異いにかかわらず溶血率が大きくなるために、凍結速度による差はあられ難くなってくる。 -80°C よりもっと凍結が進んだ段階では、脱水度は非常に高くなり、凍結速度の異いによる差も小さくなってくるために、ゆっくりした融解によっても溶血率は高くなり、凍結速度による差もまた小さくなってしまふであろう。

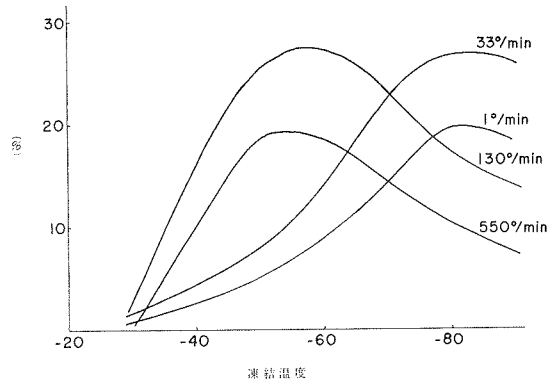
上に論じた3種の融解速度の比較では、遅い融解のものほど低い溶血率を示した。しかし、毎分 550°C の融解速度では、毎分 130°C の融解速度に比べて溶血率は再び低くなっている。このことは以上に論じてきた、融解過程でおこる溶血に対して毎分 550°C の融解では、溶血を起す機構と相反する何かの要素が加わってくることを示唆するものであるが、機構の詳細については明らかでない。また、溶血は細胞からの脱水がかなり進んだ所でおこるものと考えられるので、溶血率に影響を与える融解速度についても、その影響があらわれるのは低い温度域でだけであろうと想像されるが、これらの検討もまた今後に残された問題であろう。

V. 摘 要

ヒト赤血球を2 M グリセリンを含む生理食塩水及びこれに0.01 M 磷酸緩衝液(pH 7.0)を加えた溶液に浮遊し、毎分 1.7°C 及び 0.5°C の速度で -7.5°C から -100°C までの間の種々の温度に凍結した。融解はそれぞれ毎分1, 33, 130及び 550°C の一定速度で行ない、これらの条件に対応する溶血率を測定した。

溶血はすべての条件下で -30°C 近辺で始まり -100°C 以下まで徐々に増加した。磷酸緩衝液の存在は、溶血を起す凍結温度範囲には影響を与えなかったが、低い凍結温度域では溶血率をやや低くするようであった。

凍結速度の影響については、毎分 0.5°C の速さで凍結したものの溶血率が毎分 1.7°C の速さで凍結したものに比べて高かった。また毎分 1.7°C の速さで凍結したのち、毎分 0.5°C の速さで凍結した試料がその温度に達するのに要するのと同じ時間だけその温度に保持したのち融解し



第3図 2 M グリセリンを含む生理食塩水浮遊試料の凍結速度による溶血率の差の融解速度依存性 毎分 0.5°C 凍結時の溶血率と毎分 1.7°C 凍結時の溶血率(%)の差であらわす

た試料では、 -40°C までの凍結では溶血率が増加したが、 -50°C 以下まで凍結したものは保持時間による影響は小さかった。

溶血率はまた融解速度にも依存し、遅い融解速度のものが速い融解速度のものに比べて低い溶血率を示した。しかし、更に速い融解速度のものでは溶血率が再び低下することが認められた。

文 献

- 1) Lovelock, J. E. 1953 The haemolysis of human red blood cells by freezing and thawing. *Biochim. Biophys. Acta*, **10**, 414-426.
- 2) Lovelock, J. E. 1953 The mechanism of the protective action of glycerol against haemolysis by freezing and thawing. *Biochim. Biophys. Acta*, **11**, 28-36.
- 3) Meryman, H. T. 1967 The relationship between dehydration and freezing injury in the human erythrocyte. "In" Cellular Injury and Resistance in Freezing Organisms. (É. Asahina, ed.) Inst. Low Temp. Sci., Sapporo, 231-244.
- 4) Mazur, P., Miller, R. H. and Leibo, S. P. 1974 Survival of frozen-thawed bovine red cells as a function of the permeation of glycerol and sucrose. *J. Membrane Biol.*, **15**, 137-158.
- 5) Mazur, P., Leibo, S. P. and Miller, R. H. 1974 Permeability of the bovine red cell to glycerol in hyperosmotic solutions at various temperatures. *J. Membrane Biol.*, **15**, 107-136.
- 6) Lusena, C. V. 1960 Ice propagation in glycerol solutions at temperature below -40°C . *Ann. New York Acad. Sci.*, **85**, 541-548.

Summary

One widely accepted explanation of slow freezing injury is that damage results when the concentration of electrolyte reaches a critical level in partly frozen solutions during freezing. We have conducted experiments on human red cells to further test this hypothesis.

Cells were suspended in saline or phosphate buffered saline containing 2 M glycerol, held for 30 min at 20°C to permit solute permeation, and frozen at 0.5 or $1.7^{\circ}\text{C}/\text{min}$ to various temperatures between -7.5 and -100°C . Upon reaching the desired minimum temperature, the samples were warmed at rates ranging from 1 to $550^{\circ}\text{C}/\text{min}$ and the percent hemolysis was determined. The results for a cooling rate of $1.7^{\circ}\text{C}/\text{min}$ indicate the following: (1) In 2 M glycerol the temperature yielding hemolysis is ranging -30 to -100°C . (2) The hemolysis over this range of temperature is dependent on warming rate. The hemolysis is lower with slow warming than with rapid. With still higher warming rate the hemolysis again becomes lower. Results for cooling at $0.5^{\circ}\text{C}/\text{min}$ were similar except that the hemolysis some 20 to 30 percent higher.