

低張性溶血に於ける赤血球滲透抵抗力 測定条件の吟味について

溶血度に及ぼす血液濃度並びに温度の影響
と溶血平衡時間

金沢大学医学部生理学教室(主任 齋藤教授)

辻 成 人

Shigeto Tsuji

(昭和28年1月20日受付)

(本論文の要旨は昭和26年11月9日第3回近畿生理学談話会並びに27年3月十全医学会に発表した)

緒 言

赤血球の滲透抵抗力測定に関する報告は極めて多い。従来一般に行われて来た赤血球滲透抵抗力の測定法は、最小・最大抵抗を求める方法である。この方法は両端の極限值を求める事であり、理論的にも実測的にも正確な測定は困難であるのみならず、各測定者によつて挙げる正常値が著しく異なり¹⁻³⁾、又かゝる測定値が赤血球全体の滲透抵抗力をよく代表し得るかどうか甚だ疑問である。

最近は赤血球滲透抵抗力の研究に際して、溶媒濃度と溶血度との関係を表わす曲線(Fragility curve, 仮に赤血球滲透抵抗曲線と呼ぶ)を求めて、その50%溶血度に相当する溶媒濃度(これをMedian Corpuscular Fragilityと呼び略してM.C.F.と記す)を以つて曲線の位置を示す方法が行われている⁴⁻⁶⁾。この方法は前者に較べて、より合理的且正確な点に於て、遙かに優れている。併しながら各測定者が各人各様に赤血球滲透抵抗力の測定条件を選んでいるため、夫々の測定値に相当な違いを見る。即ち今日の所では、赤血球滲透抵抗力の測定条件に関して一定の基準が無く、最適の測定条件を決定

するに足る丈の、系統的な研究も極めて乏しい状態である。

著者は先に山田と共に齋藤⁷⁾の血液カタラーゼ測定法を応用した赤血球滲透抵抗微量測定法(以後「カタラーゼ法と略す」¹⁸⁾を報告したが、その際「カタラーゼ法によつて得たFragility curveの位置、即ちM.C.F.の値は、従来諸家の夫と較べて非常に相違していたので、その原因は測定条件の相違によるものであらうと指摘しておいた。

今「カタラーゼ法によつて得たM.C.F.と、従来報告されている夫とを比較して見ると第1表の如くなる。即ち文献上に見られるM.C.F.値は、総て「カタラーゼ法により求めた値よりも、溶媒濃度(この場合はNaCl%)のより低濃度側に偏在していることが判る。

今Fragility curveを求めるための測定条件の内、重要なものとして被検血液の稀釈濃度、溶媒と血球を平衡させる時間、その時の温度、溶媒の水素イオン濃度、並びに溶質等が考えられるが、前述したM.C.F.値の大差を生ずる原因は、これ等測定条件の相違によるものと考え

第 1 表： 文献に見られる溶見度と「カタラーゼ法との比較

測定者	年代	M.C.F. (NaCl%)	血液稀釈 倍数	溶血 温度・時間
Lord Dawson	1931	0.372	25	室温, 20分
L.E.H. Whitby, M.Hynes	1935	0.42	200	室温, 30分
J.M. Vaughan	1935	0.379	24	氷室(3~5°C), 30分
E.ff. Creed	1938	0.38	25	室温, 20分
J.V. Dacie, J.M. Vaughan	1938	0.366	24	氷室(3~5°C), 30分
寺 本	1940	0.413	100	室温, 2時間
橋 本	1949	0.353	50	氷室, 30分
柴田・大島	1950	0.409	60	室温→氷室
藤 沢	1951	0.404	不明	室温又は解卵器2~3時間
堀 内	1952	0.44	約 170	室温, 60分
「カタラーゼ法	1951	0.545	1000	0°C, 60分

られる。故に著者は赤血球滲透抵抗力を測定する際の種々の測定条件について吟味検討を行

い、各測定条件を決定するための合理的な解明を目的として本研究を企図した。

第 1 章 血液稀釈濃度に関する検討

種々の赤血球滲透抵抗力測定条件は、個々独立して赤血球抵抗に影響を及ぼす訳ではなく、当然各測定条件相互の間に、色々の複雑な関係が存在するものと考えられる。併し実験を進める都合上、測定条件を個別的に取り上げて夫々につき吟味を進めた。

赤血球の滲透抵抗力測定に際し、普通血液と低張性塩溶液を混和平衡させるが、両者の量比は測定者によつて区々であつて、文献に見られる血液稀釈率は 25 乃至 200 倍の広範囲に亘つて

いる⁷⁻¹⁰⁾。吾々の「カタラーゼ法では 1000 倍の稀釈率が測定に適している¹⁸⁾。

この両者の稀釈度の大差が赤血球滲透抵抗力の上に、如何なる影響を及ぼすかについて検討した。そのためには先ず血球が食塩水溶媒中で或る程度溶血し、やがて溶媒と血球が平衡状態に達するに要する時間（以後これを溶血平衡時間と記す）と、血液稀釈濃度との関係を確かめて置かねばならない。

A. 測定方法、実験材料、溶血度の表現法

赤血球滲透抵抗力測定方法としては、主として血液稀釈濃度の稀薄な場合は「カタラーゼ法¹⁸⁾」を用い、濃い場合は光電比色法を用いた。何れの方法を用いても成績に差異のないことは既に¹⁸⁾実証した所である。

「カタラーゼ法

被検血液を各種濃度の食塩水溶液（酵素安定剤として 0.01% に酒精が加えられてある^{17,18)}）の階段系列中で、1000 倍に稀釈し、0°C で 60 分間保存した後、毎分 2500~3000 回転 20 分遠心沈澱し、上澄液の 1cc を予め 25°C の恒温槽中に保存してある $N_7/25 H_2O_2$ 5cc に加

え、正確に 1 分後 10% H_2SO_4 2cc を加えて反応を止める。これより「カタラーゼ」の 1 分子反応としての H_2O_2 分解反応の速度恒数を算出し、0.15~0.20% NaCl 中で完全溶血させた場合の反応速度恒数を 100% として、他の濃度の食塩水中で溶血させた場合の夫々を % で算出し、溶血度として Fragility curve を描いた。若し血液稀釈度の低いものを「カタラーゼ法で測定する場合は、被検液を遠心後、上澄液を 1000 倍稀釈濃度になる如く適当に薄めて行えば良い。尚被検液を 0°C に保存する際は、木製の桶の中に氷を砕いて入れ水を加えて

作つた氷水浴中に静置する。被検液はこの方法で充分 0.1~0.2°C の間に維持出来る。

光電比色法

日立製の光電光度計を使用した。被検液を遠心沈澱する迄は「カタラーゼ法と同様に操作し、遠心後上澄液の血球素による着色度を光電光度計によつて比色定量し溶血度を算出する。この際も完全溶血を 100% とすることは同様である。

実験材料

本実験に使用した血液は総て健康成人男子から採血した。採血方法は、予め注射筒内に、採血後 1/10 量の割合になる如く 3.8% 枸橼酸ソーダ水溶液を吸引して置き、被検者の上膊皮膚静脈より適量採血する。

使用した各種濃度の食塩水は凡て 10% 食塩水溶液を原液として、之より稀釈調製した。原液より作つた 1% 食塩水の氷点降下度は -0.63°C である。

溶血度の表現法

被検赤血球を各種濃度の食塩水と平衡させた場合、その溶血度を縦軸にとり、食塩水濃度を横軸に置いて両者の関係を図示した。座標は縦軸に於ては完全溶血の場合を 100% とした各溶血度の % を示し、横軸には食塩水濃度を % で示した。こゝに表現される Fragility curve 上で、50% 溶血度に相応する食塩水濃度、即ち M. C. F. を以つて曲線の位置を示す方法^{7-10), 18), 20)}を採用した。

B. 実験成績と考察

(1) 血液稀釈濃度と溶血平衡時間との関係

各種濃度の食塩水で血液を 10, 50, 100, 500, 1000 倍の稀釈倍率に薄め、「カタラーゼ法により溶血の時間的経過を調べ第 2 表の成績を得た。溶血度の算出基準としては、0.15% NaCl に 1/10, 1/50, 1/100, 1/500, 1/1000 の血液を加えて完全溶血を起させたものの「カタラーゼ能を夫々 100% としてとつた。

第 2 表： 血液濃度と溶血平衡時間との関係 (0°C)

溶血平衡時間(分)		10	30	60	120	180	300
0.445% NaCl (%)	10倍稀釈血液	3.8	4.9	5.6	5.6	—	5.9
	50 "	10.0	12.6	15.1	15.0	—	15.3
	100 "	14.8	20.0	21.3	21.0	—	22.6
	500 "	53.2	70.4	73.0	74.7	—	74.0
	1000 "	69.3	89.2	94.0	94.2	—	95.4
0.491% NaCl (%)	10倍稀釈血液	1.0	1.4	1.7	1.7	1.6	—
	50 "	6.4	8.1	8.8	8.9	8.8	—
	100 "	11.3	17.2	19.0	19.2	19.3	—
	500 "	41.5	55.0	61.8	62.0	62.0	—
	1000 "	64.0	76.4	82.2	82.0	82.0	83.0

0.536% NaCl (%)	50倍稀釈血液	0	0	0	0	0	0
	100 "	0.4	0.6	0.9	0.7	0.9	1.1
	500 "	1.8	2.7	3.2	3.0	3.0	3.2
	1000 "	38.0	46.5	54.8	54.7	55.0	55.2
0.445% NaCl (%)	10倍稀釈血液	7.2	9.9	11.0	11.4	—	—
	50 "	29.8	37.0	41.2	41.1	—	41.5
	100 "	45.8	60.1	67.3	67.7	—	67.0
	500 "	70.0	82.8	88.7	89.0	—	90.1
	1000 "	79.5	88.9	94.9	95.0	—	97.0

その溶血進行状態を見るに、30分迄は何れも比較的急激に溶血が進む。その後溶血の進行は緩徐となるが、血液稀釈濃度の如何に拘らず何れも 60 分で溶血平衡状態に達している。

この際、血液稀釈濃度と溶血度との関係を見るに、血液濃度が稀薄になるにつれて溶血度は大きくなつている。かように溶媒の濃度が一定の際に、血液濃度の変化によつて溶血度に相違を生ずると言うことは、血液濃度が赤血球滲透抵抗力に影響を及ぼすことを類推測させる。

(2) 血液稀釈濃度が Fragility curve に及ぼす影響

血液濃度が赤血球滲透抵抗力に影響を及ぼすことを調べるために次の実験を行つた。

血液を 10, 25, 50, 100, 200, 500, 800, 1000, 1500, 2000 倍の各種の稀釈倍率に薄めて、「カタ

ラーゼ法により夫々の Fragility curve を描き、その M. C. F. を求め第3表の成績を得た。

第3表：血液稀釈濃度と M. C. F. の関係 (0°C, 60分)

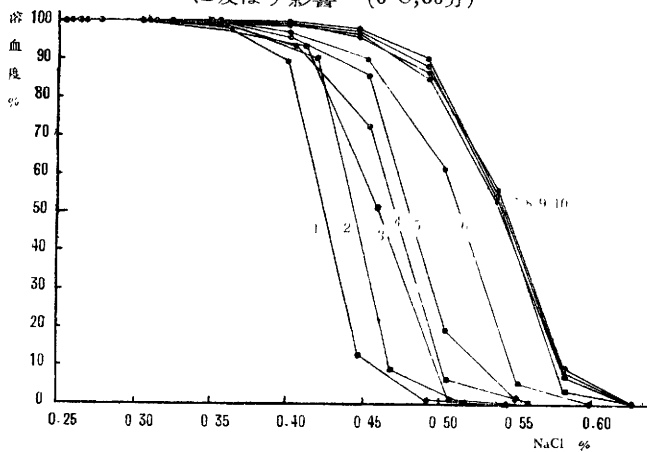
血液稀釈倍率		10	25	50	100	200	500	800	1000	1500	2000
M.	1	0.422	0.443	0.459	0.471	0.479	0.511	0.538	0.540	0.541	0.540
C.	2	0.444	0.450	0.460	0.476	0.498	0.501	0.546	0.546	0.546	0.547
F.	3	0.416	0.433	0.441	0.463	0.482	—	0.547	0.549	0.550	0.547
	4	0.410	—	—	0.427	—	0.436	0.536	0.534	0.537	0.536
NaCl (%)	5	0.409	0.412	0.419	0.430	0.442	0.485	0.544	0.543	0.545	0.545
	平均	0.420	(0.434)	(0.445)	0.453	(0.475)	(0.483)	0.543	0.543	0.544	0.543

その1例を Fragility curve により図示したのが第1図である。

血液の稀釈倍率が大きくなるにつれて、M. C. F. は次第に食塩水濃度の濃い側に移動する。

即ち赤血球渗透抵抗力は弱くなつて行く。併し800倍稀釈以

第1図：血液稀釈濃度が Fragility curve に及ぼす影響 (0°C, 60分)



- 1. : 10倍稀釈血液
- 2. : 25 " "
- 3. : 50 " "
- 4. : 100 " "
- 5. : 200 " "
- 6. : 500倍稀釈血液
- 7. : 800 " "
- 8. : 1000 " "
- 9. : 1500 " "
- 10. : 2000 " "

上の極く稀薄な血液濃度のものでは、M. C. F. の位置の移動は認められない。以上の結果から血液の稀釈濃度が Fragility curve に大きな影響を及ぼすことがわかる。

(3) 血漿が Fragility curve に及ぼす影響

上述の血液濃度が Fragility curve に及ぼす影響は、血漿の存在の量的な関係によるものでは

第4表：血漿が M. C. F. に及ぼす影響 (0°C, 60分)

被検液		正常血液	除血漿血液浮游液	洗滌血球に血漿を加えた	
M.	100	1	0.435	0.470	0.434
	2	2	0.447	0.476	—
	3	3	0.450	0.469	0.451
C.	4	4	0.433	0.446	0.435
	5	5	0.443	0.472	0.440
F.	平均	平均	0.442	0.467	(0.440)

NaCl (%)	1000倍稀釈	1	0.591	0.590	0.591
		2	0.530	0.538	0.535
		3	0.541	0.543	0.542
		4	0.582	0.588	0.586
		平均	0.561	0.565	0.563

ないかと考えられるので次の実験を行つた。

生理食塩水を用いて4回洗滌し、血漿成分を除去した血球に、元の血漿と同量の生理食塩水を加えて調製した血球浮游液(以後除血漿血球浮游液と記す)につき、100倍稀釈と1000倍稀釈の場合について Fragility curve を求めた。こ

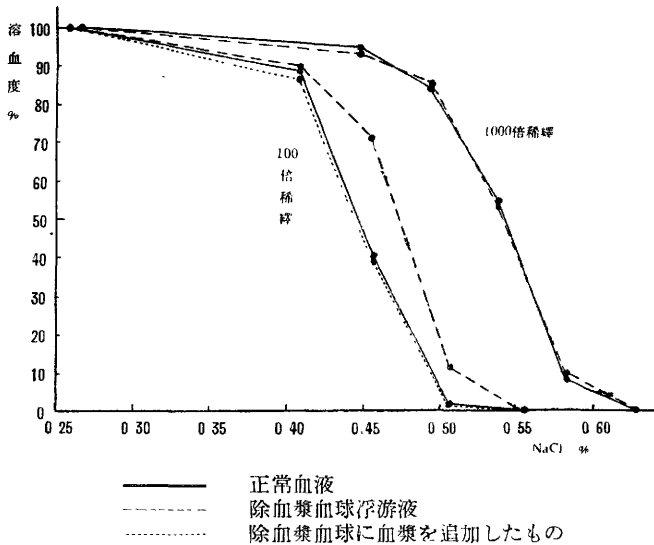
れを同一人の正常血液、及び血漿を一度除去した赤血球に再び元の血漿を加えたものと比較した。その M. C. F. を求めた成績が第4表である。1例を Fragility curve で示すと第2図となる。

血液の稀釈倍率が大い場合(1000倍稀釈血液)では、正常血

赤血球滲透抵抗力が弱くなることを示している。又血漿を一度除去した赤血球に、再び血漿を加えて M. C. F. を求めると、元の正常血球の M. C. F. と同じ値を示す。

以上の成績より次の所見が得られる。血漿は

第2図：血漿が Fragility curve に及ぼす影響 (0°C, 60分)



液も除血漿血球浮游液も同じ M. C. F. を示し、血漿による Fragility curve の影響を認めることが出来ない。これに対し稀釈倍率が小さい場合(100倍稀釈血液)では、除血漿血球浮游液の方が正常血液に比較して、M. C. F. が食塩水濃度のより濃い側に移動する。即ち

赤血球の低張性溶血に対して保護的に作用し、その程度は血漿の濃度と平行する。併し800倍以上の稀釈では、その作用は無視し得る程度に小さくなる。又この保護作用には可逆性が認められる。

(4) 血漿蛋白質が Fragility curve に及ぼす影響

血液濃度の濃い場合に血漿が Fragility curve に及ぼす影響は、血漿成分中の何に由来するものであるかを更に追及するため、先ず血漿蛋白質につき調べた。

被検血液を遠心分離して、得られた血漿を重湯煎上で加熱し、蛋白質成分を凝固させると所謂卵白を加熱凝固させた様な凝固物体を得る。それを Homogenizer により粉碎して、今一度毎分7000回転で30分遠心沈澱して固形成分と液状成分とに分離する。かくして得た上澄液を元の血漿の代りに血球に加え、血球浮游液(以後脱血漿蛋白質血球浮游液と記す)を調製して Fragility curve を求め、正常血液の夫と比較した値が第5表である。被検液の濃度は100倍稀釈である。(第4図参照)

第5表：血漿蛋白質が M. C. F. に及ぼす影響

被検液	正常血液	除血漿血球浮游液	脱血漿蛋白質血球浮游液
M.	1 0.442	0.469	0.461
C.	2 0.448	0.465	0.460
	3 0.404	0.441	0.425
F.	4 0.462	—	0.462
NaCl	5 0.432	0.452	0.444
(%) 平均	0.439	(0.457)	0.450

上述の方法で一応血漿蛋白質を除去した場合の M. C. F. は、血漿全部を除いた場合の M. C. F. に極めて近くなる。併し完全に一致するには到らない。

以上の成績から次の事が推察される。血液濃度が濃い場合は、血漿蛋白質は低張性溶血に対

して抑制的に作用する。但し血漿の溶血抑制作用は、血漿蛋白質によるもの以外にも、何らか

の原因が存在するものの如くである。

(5) 「ゼラチン」、「アラビア・ゴム」を用いた場合の Fragility curve.

血漿蛋白質による溶血抑制的作用は、血漿蛋白質の「コロイド」としての赤血球に対する物理化学的保護作用によるものと考えられるので、今度は「コロイド溶液として血漿の代りに、等張な「ゼラチン」並びに「アラビア・ゴム」の水溶液を以て置き換えた血球浮游液を使用して Fragility curve を求めた。

使用した等張「コロイド溶液は、0.9%食塩水に「ゼラチン」を5%、「アラビア・ゴム」を6

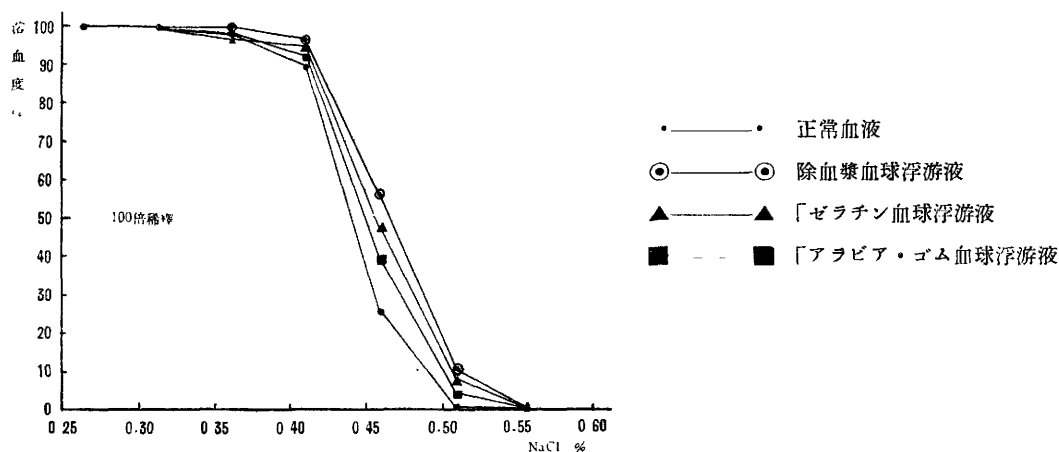
%に夫々溶解させたものを、更にその氷点降下度を測りながら「ゼラチン溶液では -0.57°C 、「アラビア・ゴム溶液では -0.56°C に水を加えて調製したものを使用した。

これ等「コロイド溶液は血漿程ではないが、血漿に良く似た作用を現わし、溶血に対して赤血球に多少の保護作用を及ぼすことを第6表に示す。1例を Fragility curve で示すと第3図となる。夫々の被検液の濃度は100倍稀釈である。

第6表：血漿の代りに「アラビア・ゴム」、「ゼラチン」を用いた時の M. C. F. (0°C ,60分)

被 検 液	正 常 血 液	「ゼラチン」 血 球 浮 游 液	「アラビア・ゴム」 血 球 浮 游 液	除 血 漿 血 球 浮 游 液
M.	1	0.440	0.457	0.466
C.	2	0.436	0.460	0.475
F.	3	0.434	0.460	0.463
	4	0.448	0.467	0.484
NaCl	5	0.437	0.456	0.465
(%)	平均	0.439	0.460	0.471

第3図：血漿の代りに「ゼラチン」、「アラビア・ゴム」を用いた時の Fragility curve, (0°C ,60分)



(6) Ringer-Locke 氏液を用いた場合の Fragility curve.

血漿の低張性溶血に対する抑制作用は、血漿蛋白質によるもの以外に何物かが関与していると考えられるので次の実験を行った。

被検血液より前述の方法で血球を採取する。これに Ringer-Locke 氏液を血漿の代りに加えて血球浮游液 (以後 R・L 血球浮游液と記す) を

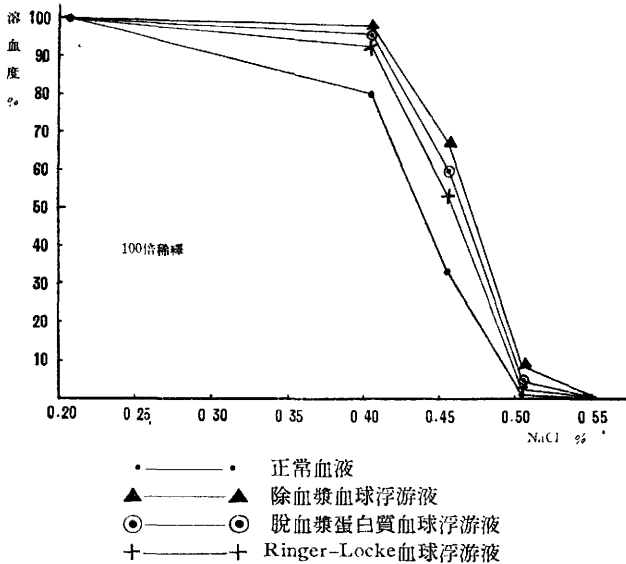
調製する。それと先述の除血漿血球浮游液や、脱血漿蛋白質血球浮游液及び正常血液との M. C. F. を比較した。得られた成績は第 7 表に示す如くである。その 1 例を Fragility curve で示すと第 4 図となる。尙夫々の被検液の濃度は 100 倍稀釈である。

第 7 表：血漿の代りに Ringer-Locke 氏液を用いた時の M. C. F. (0°C, 60分)

被 検 液	正 常 血 液	除 血 漿 血 球 浮 游 液	Ringer-Locke 血 球 浮 游 液	脱 血 漿 蛋 白 質 血 球 浮 游 液	
M.	1	0.435	0.473	0.458	0.466
C.	2	0.429	0.457	0.450	0.448
F.	3	0.430	0.453	0.442	0.443
	4	0.442	0.469	0.458	0.453
NaCl	5	0.438	0.456	0.445	0.449
(%)	平均	0.435	0.462	0.451	0.452

R・L 血球浮游液により得た M. C. F. は、正常血液の夫と比較して大きく、除血漿血球浮游液の夫よりは小さい。而も脱血漿蛋白質血球浮游液の M. C. F. に近い値を示した。これを換言すれば同一被検者の赤血球が R・L 血球浮游液では正常血液より抵抗力の減弱を來すが、除血

第 4 図：血漿の代りに Ringer-Locke 氏液を用いた時、及び血漿蛋白質が Fragility curve に及ぼす影響 (0°C, 60分)



漿血球浮游液よりは抵抗の増強することを示している。

この結果から血漿が低張性溶血に対して示す保護作用は、血漿蛋白質によるもの外に血漿中の諸種の組成成分、例えば塩類や糖類等によるものも存在すると考えられる。

(7) 溶血時に溶媒中に現われる赤血球内容及び Ghost cell が Fragility curve に及ぼす影響

以上は血漿に関する吟味であつたが、今度は赤血球側について考えて見る。

溶血が起つた際に溶媒中に現われてくる赤血

球の内容物を、仮りに血球素で代表させると、血液稀釈倍率が異なる場合は夫々同じ%丈溶血したとしても、溶媒中に混じてくる血球素の絶

対量には大きな相違がある筈である。

又、溶血操作中に遠心沈澱後、血液濃度が濃い場合には多量の乳白色の沈澱物 (Ghost cell) を見るが、これについても血球素の場合と同様のことが考えられる。故に血球素や Ghost cell の濃度の相違が赤血球滲透抵抗力に如何なる影響を及ぼすかについて検討した。

洗滌により血漿を除去した赤血球を、蒸溜水に $\frac{1}{5}$ 容量に混じて 0°C で 120 分保存することにより完全溶血を起させ、遠心沈澱して得た上

澄液の血球素水溶液の一定量を、各種濃度の食塩水に加えて血球素加食塩水溶液を調製する。一方沈澱物を生理食塩水で 2 回洗滌し、その一定量を加えて Ghost cell 加食塩水溶液を調製する。この両者の溶媒を用いて夫々 Fragility curve を描き、普通の食塩水で求めた夫と比較した。この結果を M. C. F. で表わすと第 8 表の如くである。その 1 例を Fragility curve により示すと第 5 図となる。

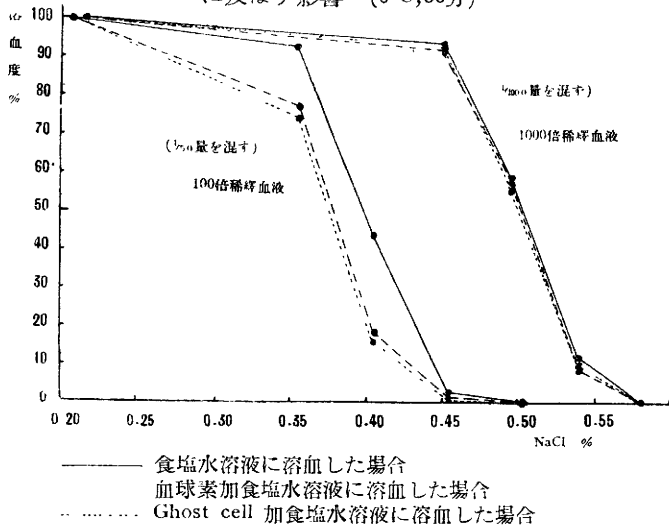
第 8 表：血球内容物及び Ghaat cell が M. C. F. に及ぼす影響 (0°C , 60 分)

溶 媒		食 塩 水		$\frac{1}{5}$ 量血球素 加 食 塩 水	$\frac{1}{5}$ 量 Ghost cell 加 食 塩 水
M. C. F. NaCl (%)	100 倍 稀 釈 血 液	1	0.447	0.427	0.425
		2	0.457	0.438	0.436
		3	0.459	0.440	0.449
		4	0.467	0.442	0.447
		5	0.438	0.419	0.422
	平均	0.454	0.433	0.436	

溶 媒		食 塩 水		$\frac{1}{1000}$ 量血球素 加 食 塩 水	$\frac{1}{1000}$ 量 (Ghost cell) 加 食 塩 水
M. C. F. NaCl (%)	1000 倍 稀 釈 血 液	1	0.552	0.551	0.550
		2	0.559	0.561	0.560
		3	0.545	0.543	0.541
		4	0.544	0.546	—
		平均	0.550	0.550	(0.550)

100 倍稀釈血液に於て、今 $\frac{1}{10}$ 容量の血球素水溶液を混じて作った血球素加食塩水で溶血させた場合は、混じてないものに較べて M. C. F. はより低濃度側に移動する。明らかに赤血球滲透抵抗力は増強することを示す。一方同じ量の

第 5 図：赤血球内容物や Ghost cell が Fragility curve に及ぼす影響 (0°C , 60 分)



Ghost cell を浮遊させた食塩水に於ても、同程度の抵抗力の増強を見ることが出来る。

これに反して $\frac{1}{1000}$ 容量に血球素や Ghost cell を混じた場合は、それ等の存在の有無に拘らず M. C. F. の変化を示さない。即ちこれ位稀薄

な濃度では、それ等の存在は溶血に対して影響が及ばないと言えよう。

併し Ghost cell が保護的に作用する機転に

関しては、血漿蛋白質や血球素の夫と同一視することは出来難い。唯前述の如き現象を認めたことを報告するに止める。

第2章 溶媒の温度並びに溶血平衡時間に関する検討

第1表に於ても見られる如く、赤血球滲透抵抗力測定の際の温度に関して、測定者は各人各様の温度を採用している。併しそれ等を大約して見ると次の四者に區別出来る。即ち室温中で溶血平衡を行行場合^{7-10, 12, 14}、氷室中で行行場合^{11, 13, 15}、室温と氷室を両者併用する場合²⁰及び孵卵器を使う場合¹⁶である。

溶血平衡時間について従來の報告を見るに、

20分位から2時間、若しくは氷室で翌日迄放置しておく等種々の溶血平衡時間を採つている。

^{1-10, 20, 20} 而もそれ等の測定条件を採用する理由については、大多数の報告では單に先人の方法による温度を踏襲している場合が多い。

著者は溶血平衡時間とその時の温度との関係、及び温度と赤血球滲透抵抗力との関係について総合的に吟味を行つた。

A. 実験方法

溶血度並びに赤血球滲透抵抗力測定方法として「カタラーゼ法¹⁷」を用いた。溶血平衡時間中の温度は恒

温槽を使用して所要の一定温度を維持した。その他の点は血液稀釈濃度に関する検討の際と同様である。

B. 実験成績並びに考察

(1) 温度と溶血平衡時間との関係

温度に関する吟味を進める際に、先ず溶血平衡時間を定める必要がある。でなければ、Fragility curve を求めるための至適平衡時間が決定されない。故に各種濃度の食塩水について、種々の温度に於ける溶血の時間的経過を調べた。溶血度の算出基準としては、0.20% NaCl に $\frac{1}{1000}$ の血液を加え完全溶血を起させたもの

第9表：温度と溶血平衡時間との関係

(「カタラーゼ法、1000倍稀釈血液」)

溶血平衡時間 (分)		5	10	30	60	120	180	300	
0.491% NaCl	溶血度 (%)	0°C	40.4	48.2	64.0	70.0	70.2	69.9	71.1
		4°C	38.8	44.7	61.4	63.1	63.0	62.4	62.8
		15°C	31.0	42.4	42.8	42.6	42.5	43.0	42.9
		25°C	19.1	20.3	22.6	21.8	22.0	22.4	24.0
		35°C	14.0	16.0	16.4	16.5	16.2	16.5	16.6
		45°C	35.4	46.0	49.5	52.0	52.4	53.6	94.0
		55°C	58.0	65.5	74.2	97.8	99.4	99.8	99.8

0.445% NaCl	溶血度 (%)	0°C	71.2	84.5	88.9	93.0	93.2	93.0	—
		3~3.3°C	67.4	78.9	86.5	89.2	89.0	89.1	—
		4°C	47.8	66.9	74.8	76.0	76.2	76.1	—
		15°C	42.0	49.8	53.5	54.0	53.7	53.4	—
		25°C	32.2	40.8	41.0	40.9	41.4	40.8	—
		35°C	19.7	28.0	28.4	28.2	29.0	28.4	—
		40°C	17.4	25.2	26.0	25.7	25.3	25.4	—
		45°C	38.5	47.8	49.9	50.2	50.1	52.8	—
55°C	62.0	78.4	89.2	94.0	97.5	—	—		
0.536% NaCl	溶血度 (%)	0°C	20.2	37.0	45.4	43.4	46.8	44.4	48.0
		4°C	14.5	32.4	38.0	39.1	38.0	38.5	38.2
		15°C	12.4	19.8	21.0	21.2	20.8	20.4	21.9
		25°C	4.8	5.2	5.0	4.8	5.0	4.9	4.8
		35°C	2.0	2.5	2.8	2.2	2.5	2.5	2.6
		45°C	11.8	24.0	26.3	29.0	29.2	29.1	30.5
		55°C	50.4	82.3	94.2	95.5	97.4	94.8	—

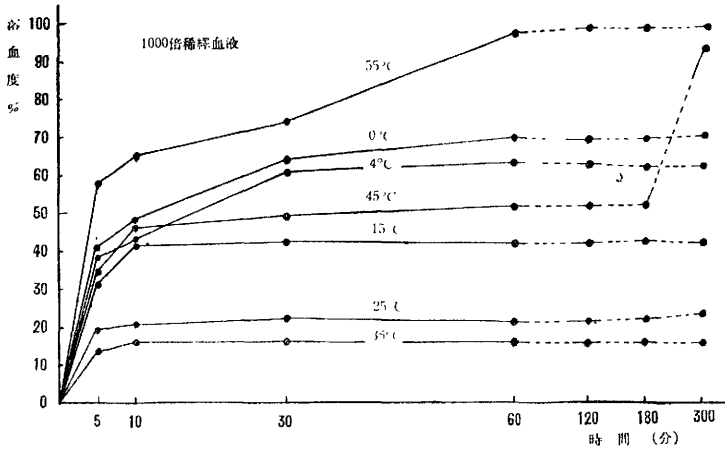
の「カタラーゼ能を100%としてとつた。

血液を1000倍稀釈とし、0°, 4°, 15°, 25°, 35°, 40°, 45°, 55°Cの各種温度に於て溶血の

進行状態を見た。第9表がその成績である。
0.491% NaCl の場合を図示すると第6図とな

る。
即ち溶血平衡時間は各温度によつて夫々異な

第6図：温度と溶血平衡時間との関係 (0.491% NaCl に於ける)



つている。溶血は各温度共に5~10分迄は急速に進行するが、その後15°~40°Cに於てはそのまま平衡状態に達する。これに対し0°~15°Cの間では緩徐に溶血の進行が続き、60分に到つて一定の溶血度となり、平衡状態に達する。而も一定濃度の食塩水溶媒中に於ては、0°Cより温度が上昇するにつれて溶血度は低くなり、45°Cを越すと再

び溶血度は増加し、55°C以上になると30分以後に急激に溶血が進行する。これは直接に熱のために溶血を起すものと考えられる。尙溶血平衡状態に達した後は約5時間はそのままの状態

を保つ。
以上の所見から今後の実験を行う際の溶血平衡時間を一様に60分と定めた。

(2) 温度が Fragility curve に及ぼす影響

次に溶血平衡時の温度が赤血球滲透抵抗力に如何なる影響を及ぼすかについて調べた。

0°C から 45°C の間に於て溶媒を種々の温度に恒温状態を維持し、夫々の温度に於て1000倍稀釈血液の M. C. F. を求めた。第10表の成績

がそれである。その1例を Fragility curve を以て示すと第7図の如くなる。又第10表に於ける各温度に対する M. C. F. の平均値と温度との関係を図示すると第8図となる。

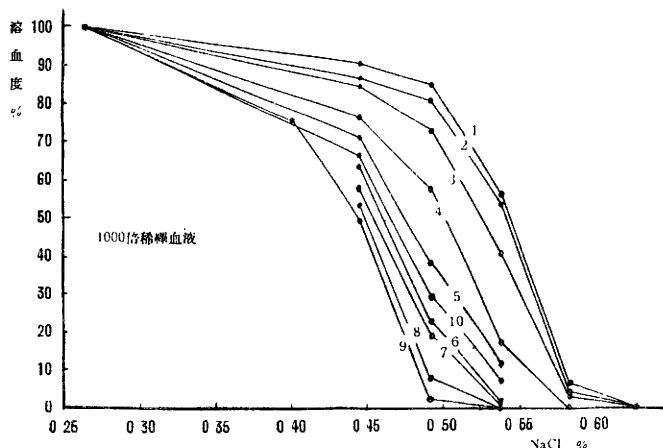
第10表：温度が M. C. F. に及ぼす影響 (1000倍稀釈血液, 60分, 「カタラーゼ法」)

温度 (°C)	0	2	3	4	15	25	30	35	40	45	
M.	1	0.542	0.539	0.523	0.500	0.474	0.459	0.452	0.448	0.442	0.462
C.	2	0.525	0.518	0.506	0.501	0.476	0.464	0.458	0.451	0.449	0.495
F.	3	0.549	0.541	0.524	0.499	0.470	0.452	—	0.446	—	0.474
NaCl	4	0.546	0.535	0.521	0.504	0.478	0.475	—	0.460	0.454	0.485
(%)	5	0.548	0.538	0.526	0.518	0.509	0.482	0.473	0.459	—	0.499
平均		0.542	0.534	0.520	0.504	0.481	0.466	(0.461)	0.453	(0.448)	0.483

溶媒の温度が低温より上昇するにつれて、M. C. F. は小さくなり、45°C に到ると逆に大きく

なる。この際15°C から40°C迄は、0°Cより15°Cの間に較べて M. C. F. の変動は比較的

第7図：温度が Fragility curve に及ぼす影響 (60分)



- 1. : 0°C
- 2. : 2°C
- 3. : 3°C
- 4. : 4°C
- 5. : 15°C
- 6. : 25°C
- 7. : 30°C
- 8. : 35°C
- 9. : 40°C
- 10. : 45°C

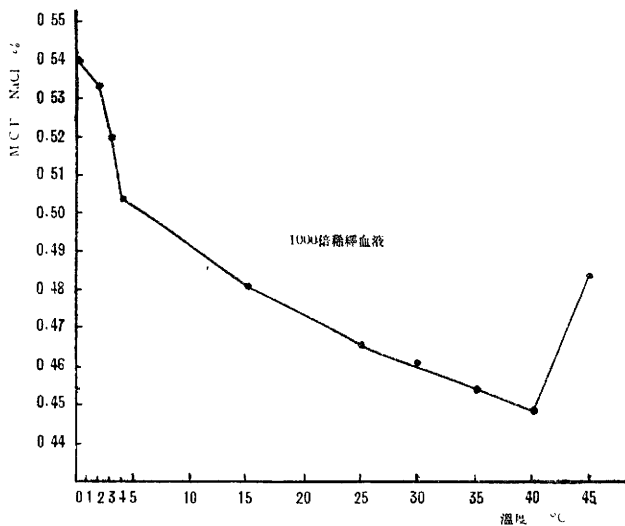
緩徐である。即ち 15°C より 40°C の間は、それより低温度にくらべて赤血球滲透抵抗力に及ぼす温度の影響が小さいことを示す。

かくして赤血球滲透抵抗力は 40°C に於て最も安定された状態になり、更に温度が上昇すると却つて逆に滲透抵抗力は減弱を見る。

以上の結果から溶血平衡時の温度は、Fragility curve に大きな影響を及ぼすことが分る。

(3) 温度の変化が Fragility curve に及ぼす影響

第8図：第10表の各温度に対する M. C. F. の平均値と温度との関係曲線 (60分)



今度は一端溶血平衡状態に達した後で、温度が変化した場合 M. C. F. に如何なる影響を見るか調べた。

25°C で60分保存したものを更に続けて 0°C に於て 60~120分保存した場合の M. C. F. を、最初から 0°C で保存したものや、25°C で保存したものと比較した。その結果は第11表の如くである。

即ち途中で温度を変化させたものでは、最初から 0°C で平衡させた場合の M. C. F. に非常に近づいてくる。併し完全には一

第11表：温度の変化が M. C. F. に及ぼす影響 (1000倍稀釈血液、「カタラーゼ法」)

温度の変化		0°C, 60分	0°C, 120分	25°C, 60分	25°C, 120分	25°C, 60分 →0°C, 60分
M.	1	0.542	0.544	0.504	0.502	0.534
C.	2	0.550	0.550	0.502	0.500	0.541
F.	3	0.533	0.532	0.505	0.507	0.526
NaCl	4	0.549	0.545	0.500	0.504	0.540
(%)	5	0.540	0.539	0.511	0.509	0.531
	平均	0.543	0.542	0.504	0.504	0.534

致しない。

この結果から次のことが推察される。比較的高温に於て溶血平衡状態に達した赤血球は、よ

り低温に移して続けて維持することにより、最初の平衡状態が破れてより溶血度の進んだ平衡状態に達する。

第3章 文献に見る赤血球滲透抵抗力測定条件による「カタラーゼ法の追試

緒言に於ても述べた如く、1000倍稀釈血液を使用し、0°Cで60分間保存した時に、「カタラーゼ法」により得られたM.C.F.の平均値は0.545% NaClである。これに比較して従来諸家の報告するM.C.F.は総て低濃度側に偏在する。

著者は赤血球滲透抵抗力測定条件として、血液稀釈濃度、溶血平衡時間及びその時の温度を採り上げ、三者が赤血球のFragilityに大きな影響を及ぼすことを実証した。

そこで、これ等の測定条件を従来報告されている夫と相等しくして、カタラーゼ法によりFragility curveを求めるならば、そのM.C.F.は文献上に見られるM.C.F.の値と如何なる

関係を示すかにつき調べた。その結果は第12表の如くである。

従来報告に見るM.C.F.の正常変動限界の中に、「カタラーゼ法」により得たM.C.F.が入っている。この結果から既報の「カタラーゼ法」¹⁹⁾により得られたFragility curveが、文献上に見られる夫より偏在している原因は、主として測定条件、特に血液稀釈濃度や溶血平衡時間並びにその時の温度等の相違に由来するものであることを知る。換言すれば、従来各報告に見られるM.C.F.値の変動は、主として諸家が各人各様の測定条件を用いていることが原因である。

第12表：文献に見る測定条件によつた「カタラーゼ法のM.C.F.

研究者名	測定条件	諸家のM.C.F.平均値	正常変動限界	「カタラーゼ法のM.C.F.
E. ff. Creed	25倍, 室温, 20分	0.38	0.36 ~ 0.40	0.395 0.377 0.390
Dacie, Vaughan	24倍, 3~5°C, 30分	0.366	0.344~0.398	0.370 0.397 0.381
Whitby, Hynes	200倍, 室温, 30分	0.42	0.40 ~ 0.44	0.402 0.430 0.411
柴田・大島	60倍, 室温→氷室	0.409	0.34 ~ 0.48	0.390 0.435 0.419

第4章 総括的考察

A. 血液濃度

著者は以上の実験によつて、赤血球滲透抵抗力を測定する際に、血液濃度が極めて大きな影響を及ぼすことを確認した。

数多い赤血球滲透抵抗力に関する従来報告の中で、血液濃度の影響について言及しているものは極めて少く、多くは唯先人の血液稀釈濃度を踏襲しているに過ぎない。

今血球の滲透抵抗に対する血漿の影響を取り上げている業績を求めると、古くはGross¹⁹⁾が熱性溶血の際に血漿の存在が溶血開始時間に

遅延的に作用することを報告している。本邦では高木・宮崎²⁰⁾、等が同様の現象を報告している。Creed¹²⁾やDacie and Vaughan¹³⁾、等は血漿の持つ緩衝能を重要視し、溶媒の酸性度が赤血球のFragilityに大きく影響するから、その意味で全血を使用し、約25倍稀釈血液程度の血液濃度を使用すべきであると言つている。併しながら彼等は未だ血液濃度自体の影響については触れていない。中村²¹⁾は彼の言う「最小溶血濃度下」の食塩水溶媒中では、赤血球濃度が増す

に従つて溶血率が低下することを認め、その理由については不明であると言つている。これと全く反対の結論に於て藤沢¹⁶⁾は、血球浮游液の濃度により溶血度は変化せず、却つて血漿成分の存在により幾分溶血が促進されると報告している。

以上の様に未だ血液濃度の影響に関して定説が無い所以は、従來の比色法や血球計算法や「ヘマトクリット法」等による所謂赤血球抵抗力測定方法では、血液稀釈濃度の稀薄な場合に測定が不可能であつたため、広範囲の濃度の変域に於ける吟味が出来なかつたためと考えられる。

一方「カタラーゼ法」では1000倍稀釈血液に於ても充分正確に Fragility curve を描くことが出来る。故にこの方法によつて始めて血液濃度の影響を明確に把握することが出来た。

血液濃度が赤血球滲透抵抗力に大きな影響を及ぼす原因については、従來の報告ではほとんど見るべきものが無い。

著者はその原因を追及するため血漿側と血球側より吟味を進めた。先ず血漿に溶血を抑制する作用が存在することを確認し、更に血漿の有する溶血抑制作用の主要な原因が、血漿蛋白質

と其の他の血漿組成成分によるものであることを実証した。

血球側に関しては溶血時に溶媒中に出て来る血球内容物が、溶血を抑制する作用のあることを確かめ、溶血時に生ずる Ghost cell にも同様の作用があることを認めた。以上の現象は總て血液濃度の濃い場合に著しく、濃度が極く稀薄になれば無視し得る程度に小さくなる。即ち血液濃度が稀薄になるに従つて赤血球滲透抵抗力が減弱する所以を明らかにした。

著者のこの成績は、先述の第1表に示した諸家の成績の上からも窺うことが出来る。即ち血液濃度が比較的稀薄なものでは、M. C. F. は一般に溶媒の高濃度側に存在しているのを見ることが出来、この傾向は著者の成績を裏書きするものと言えよう。

赤血球自体の眞の抵抗力を測定しようとするならば、血漿及び赤血球内容物等の影響を無視し得る稀薄な血液稀釈濃度を使用することが望ましく、若しそれより濃い血液濃度を使用する場合は、各種の測定条件を明確にしておくことが必要である。

B. 温 度

溶血に関する研究に於て、熱が溶血因子の一つであることは広く知られる所であり、温度の影響について吟味を行つた報告は少くない。

今温度が滲透抵抗力に及ぼす影響を報告せる業績を求めると、何れも温度の上昇と共に赤血球滲透抵抗力が増強すると報告している。¹³⁾, ¹⁵⁾, ²¹⁾, ²³⁾。この点に関しては著者の成績と同様である。Dacie and Vaughan¹³⁾ は 2°C 上昇する毎に 0.002% NaCl、堀内²³⁾ は 1°C 毎に 0.0022% NaCl の割合で M. C. F. が移動すると報告している。著者の成績 (第10表、第8図参照) に於ても 4°C より 40°C 迄の間は、一見同様の成績に見えるが、赤血球は体温に近い温度に於て、比較的安定した状態に保たれると考えら

れるから、夫程に規則的に温度の影響が及ぶと定めることは危険である。

著者の成績で 15°C から 40°C 迄の間ではそれより低温・高温の何れの温度領域よりも、温度の影響が少い。これは中村²¹⁾の所謂「最小溶血温度」の存在と言うことと似ている。併し中村の報告する程「最小溶血温度」の範囲内に於ける温度の変化が、赤血球抵抗力に無影響な訳では決してない。又寺本²²⁾は健康成人の赤血球抵抗力は季節的変動を示し、この原因が体外に於ける血液が実験中の温度によつて影響を受けるのではないかとの疑念から温度に関する吟味を行つたが、実験中寒冷に曝されてもその影響は大したものではないと言つている。これは著者

の成績と全く相反しているが、具体的な実験条件が不明であるため比較検討出来ない。堀内²³⁾は季節により変化のあることを認め、この原因は大体測定温度によるものと思うと述べているが、著者もこれが正しいと思う。

次に溶媒と血球を平衡させる方法として、従来多くの報告に見られる様に唯漠然と室温に於て測定したのでは、大きな誤差を生ずるものと考えられる。又氷室中に保存するとしても、普通の氷室中では $2^{\circ}\sim 5^{\circ}\text{C}$ の動搖は珍らしくない。低温領域に於ては、この程度の温度差でも M. C. F. に相当大きな変化をもたらすから、更に厳密な温度の調整が必要である。

著者は簡便に且つ正確に一定時間一定温度を維持する方法として、氷水中で平衡させることにした。この際見られる温度の動搖は 0.2°C 程度に止まる。

一方孵卵器を用いて恒温状態を保つことは、その一般に使用する温度領域から見ても良い方法である。唯、その後には於て氷室中に移動させ続けて翌日迄静置しておくことが普通に行われているが、これは無意味で且宜しくない。なぜならば孵卵器の温度で一定の溶血平衡状態に達したならば、そのまま測定すれば良く、改めて氷室中に移動し保存することは、赤血球の Fragility に変化を起させることであり、且氷室温度の変化することによる Fragility の変化をも

惹起させる恐れがあるからである。通常氷室中に被検物を一晝夜放置する理由は、溶血しなかつた赤血球を沈澱させると同時に腐敗を防ぐためと考えられている。併し溶血平衡時間を必要以上に延長することは、溶血平衡に他の影響が加わる危険があるので避けた方がよい。

次に溶血平衡時間について按ずるに、普通一般には低張性溶血は極めて短時間で溶血が完了するものと信じられている。Creed¹²⁾は5分間で溶血が完了すると言っている。其の他の研究者に於てもこの点については特別に注意している者は少い。

著者の成績では、溶血平衡時間は温度と関連して大きな相違を示し、従来報告に見る如く単純且短時間ではない。

一定温度に於ては血液濃度の如何に拘らず、溶血平衡時間はほぼ一定であるが、温度が変化すれば溶血平衡時間は夫々違ってくる。即ち $15^{\circ}\sim 45^{\circ}\text{C}$ では10分を要し、それより低温では約60分を要する。 55°C 以上の高温領域では漸次溶血が進み、常に30~60分で熱性溶血を起すから平衡状態を得ることは出来ない。

文献に見るものでは20分¹²⁾から翌日迄放置²⁴⁾と言う様に種々の平衡時間を採っているが、溶血平衡時間は温度との関係を考慮する必要があり、唯漠然と決定してはならない。

第5章 要

約

低張性溶血に於ける赤血球滲透抵抗力測定条件を合理的に決定するために、血液稀釈濃度並びに温度の影響について、それが溶血度との関係を吟味した。又既報の「カタラーゼ法¹⁴⁾」によつて得た Fragility curve の位置が、従来諸家¹⁻¹¹⁾の夫よりも遙かに低張性領域に偏位していることの原因を明らかにした。

その実験成績を要約すれば次の如くなる。

(1) 被検血液の稀釈濃度及び溶媒の温度が、赤血球滲透抵抗力に極めて大きな影響を及ぼす

ことを確認した。

(2) 血液濃度が濃くなるに従つて赤血球滲透抵抗力は増強し、反対に稀薄になれば抵抗力は減弱する。併し800倍稀釈以上の高度に稀釈された血液濃度では、も早や滲透抵抗力の変化は起らない。

(3) この原因は血液濃度が濃い場合は赤血球は溶血に対して、血漿、特に血漿蛋白質や血漿中に含まれる塩類、糖類等の物理化学的な保護作用を受けると同時に、溶血時に溶媒中に混

入してくる血球内容物及び Ghost cell 等によつても、溶血に対して抑制作用を受けていることによる。これに較べて血液濃度が稀薄な場合(800倍稀釈以上の血液濃度)は、それ等の影響が無視し得る程度に小さいため、赤血球滲透抵抗力に変化が起らない。

(4) 血漿の溶血抑制作用には可逆性が認められる。又「ゼラチン」や「アラビア・ゴム」等の「コロイド溶液や Ringer-Locke 氏液等の塩類糖溶液で調製した赤血球浮游液では、これ等の物質は溶血に際して血漿に似た抑制作用を現わす。

(5) 温度が赤血球抵抗力に及ぼす影響は、0°C より上昇すると共に次第に滲透抵抗力は増強し、40°C に於て最大となり 40°C を越えると逆に減弱する。この際 15°C~40°C ではそれより低温領域に比較して滲透抵抗力の変動が少い。

(6) 溶血平衡時間は、温度が変化すると同時に変化する。15°C~45°C では約10分、それよ

り低温では60分間を要して平衡状態に達する。尚 55°C 以上の高温になると30~60分後に於て熱性溶血を惹起する。又、溶血平衡時間は温度が一定の際は、血液濃度の如何に拘らず大体一定である。

(7) 比較的高温度に於て一端溶血が平衡状態に達したのも、更により低温度に移して保持する時は、始めの平衡状態は破れて溶血は進行し、最初から当該低温度にて溶血させた場合の溶血度に近づく。

(8) 既報「カタラーゼ法により得られた赤血球滲透抵抗曲線と、従来諸家の報告するそれとが大きな相違を生ずる原因は、主に血液濃度や溶媒の温度及び溶血平衡時間等、実験条件の相違によることを実証した。

稿を終えるに当り終始御懇篤なる御指導御鞭撻を賜わり、且御校閲を賜わりたる恩師齋藤教授に深く感謝し、御援助を賜わりたる生理学教室各位に謝意を捧げます。

文

- 1) **Simmel, H. :** (1923) Die osmotische Resistenz der Erythrocyten. *Deutsch. Arch. f. klin. Med.* **142**, 252.
- 2) **Hamburger, H. G. :** (1927) ABDERHALDEN Abt. IV. Teil3. *Blut. Lymph.* **1**, 263.
- 3) **Daland, G. A. and K. Worthley :** (1934-35) The resistance of red blood cells to hemolysis in hypotonic solution of sodium chloride. *J. Lab. Clin. Med.* **20**, 1122.
- 4) **Giffin, H. Z. and A. H. Sanford :** (1918) Clinical observations concerning the fragility of erythrocytes. *J. Lab. Clin. Med.* **4**, 465.
- 5) **長崎佐武郎**(1929)慢性家族性溶血性黄疸に関する研究。慶応医学, **8**, 1.
- 6) **Kato, K. :** (1940) A simple and accurate microfragility test for measuring erythrocyte resistance. *J. Lab. Clin. Med.* **26**, 703.
- 7) **Brieger, E. :** (1920) Zur Methodik der Resistenzprüfung der Erythrocyten gegen hypo-

献

- tomische Kochsalzlösung. *Deutsch. Arch. f. klin. Med.* **133**, 397.
- 8) **Leak, C. D. and H. Pratt :** (1925) The resistance of normal human erythrocytes to hypotonic saline solution. *J. Amer. Med. Assoc.* **85**, I. 899.
- 9) **Lord Dawson of Penn :** (1931) Haemolytic icterus. *Brit. Med. J.* **1**, 921, 963.
- 10) **Whitby, L.E.H. and M. Hynes :** (1935) The quantitative estimation of the fragility of the red corpuscles. *J. path. Bact.* **40**, 219.
- 11) **Vaughan, J.M. :** (1937) Red cell characteristics in acholuric jaundice. *J. path. Bact.* **45**, 561.
- 12) **Creed, E. ff. :** (1938) The estimation of the fragility of red blood corpuscles. *J. path. Bact.* **46**, 331.
- 13) **Dacie, J.V. and J.M. Vaughan :** (1938) The fragility of the red blood cells: Its measurement and significance. *J. path. Bact.* **46**, 341.
- 14)

寺本明 (1941) 低張食塩水に対する赤血球抵抗力測定法の吟味. 日本血液誌, 5, 357. 15)
 橋本巖 (1949) 赤血球滲透性抵抗に関する研究. 北海道医誌, 24, 223. 16) 藤沢正輝 (1951) 溶血に関する研究. 日本生理誌, 13, 260. 17)
 斎藤幸一郎 (1949) 血液カタラーゼの研究, (2) 血液カタラーゼ微量定量法. 医学と生物学, 14, 26. 18) 山田英明・辻成人 (1951) 「カタラーゼ能測定法による赤血球滲透抵抗微量測定法. 生体の科学, 3, 80. 19) Gross, O. : (1907) Über des Auftreten der Lackfarbe in Blutkörperchensuspensionen unter dem Einflusse der Wärme. Arch. f. experim. pathol. u. pharmakol. 57, 64. 20) 高木八郎・宮崎彰之助 (1914)

熱の赤血球溶解作用について. 東京医誌, 29, 273.
 21) 中村拓 (1938) 赤血球の二・三物理化学的研究. 日新医学, 27, 731. 22) 寺本明 (1948) 赤血球抵抗力の寺本法による再検討 (健康者に於ける季節的変動). 日本内科学会誌, 37, 7.
 23) Jacobs, M.H. and A.K. parpart : (1931). Osmotic properties of erythrocytes II The Influence of pH, Temperature, and Oxygen Tension on Hemolysis by Hypotonic Solutions, Biol. Bull. 60, 95. 24) 柴田進・大島發作 (1950) 赤血球抵抗のはかり方について, 光電比色法の応用. 医学と生物学, 16, 223. 25) 堀内淑彦 (1952) 赤血球抵抗に関する研究. 東京医誌, 60, 2, 1.