血液保存の実験的研究

とくに酸素加赤血球の還元グルタチオン

添加 ACD 液保存について

川 田 高 俊

東京女子医科大学外科 (指導: 榊原 仟教授)

OBSERVATIONS ON THE EFFECTS OF REDUCED GLUTHATION ON OXYGENATED RED-CELL PRESERVATION

by

Takatoshi KAWATA

Department of Surgery of the Heart Institute and Hospital of Tokyo Women's Medical College

(Director: Prof. Shigeru Sakakibara)

At present time, the human ACD blood preservation is ordinarily permitted within 3 weeks in Japan.

The purpose of this experiments are to make the more longer term preservation of blood in liquid state.

In 1965, Sase reported that the denaturation of hemoglobin solution to met-hemoglobin during storage had been minimumed in oxyhemoglobin or reduced hemoglobin more than half-to-half mixture.

This phenomenon might be occurred in hemoglobin in Red Blood Cell during the storage.

Experiment I

Under this hypothesis three kinds of ACD blood groups, first in regular venous state, second in fully oxygenated state, and third in reduced state were stored. After 2 weeks preservation in 4 to 10 centigrade room those blood were transfused in rabbits, the RBC post-transfusion survival was measured with radio-active chromium labeling method.

The results of T1/2 in each oxygenated group, deoxygenated group, and venous group

were 14.3 days, 6.1 days, and 11 days.

Respectively, the most effective one was observed in oxygenated ACD blood group.

Experiment II

Expecting the protective effect of oxydative hemolysis about RBC membrane, reduced glutathione (GSH) (100 mg/dl) was added in each three blood groups in Exp. I. After 2 weeks storage the RBC post-transfusion survival was measured.

The T1/2 of the oxygenated GSH added group was prolonged to 20.3 days.

The T1/2 of venous GSH added group was same to Exp. I. But the T1/2 of deoxygenated GSH added group after 3 weeks storage was prolonged to 15 days.

The remarkable effect was observed in oxygenated GSH added blood group and deoxygenated GSH added blood group.

Experiment III

Oxyphenarsine (0.01 g/dl) which act to block the sulphohydryl compounds in blood was added in oxygenated GSH blood group.

Two weeks later the blood was transfused in rabbit and RBC posttransfusion survival was

measured. The T1/2 was 12 days, which resembles to that of venous blood. The results indicate the fact that SH component acts to pro-

tect the RBC membrane from denaturation. The protection was not recognized in mixed venous state.

I 緒言

4°C ACD保存血の保存期間は3週間とされている。これは、保存中におきる溶血、輸血後生存率の低下が、その限界を阻んでいるからである。この期限切れの血液は、もっぱら血漿製剤として再利用はされているが、やはり全血の要求は大きいといわねばならない状態である。

アメリカでの期限切れの血液量は7%，イギリスでは13.6%が期限切れで返品されてくる。Kevy¹⁾らによれば1週間の期限の延長は12%の期限切れを3%以下に減少させうるといふ。

このように、ACD保存血が簡単に安く期限を延長する事の利益は大きい。このための保存液の改良については幾多の努力がなされ²⁾、わが国でも中尾³⁾らのAdenine, Inosine添加保存の研究がなされているにもかかわらず、その臨床応用をみない事は残念である。

著者も、保存期間の延長を目的として、ACD血液に酸素加を行ない、さらに還元グルタチオンを加えて保存、輸血後赤血球生存率を検討して、従来のACD保存血に比し良好な結果をえた。

この研究のhypothesisは1965年佐瀬⁴⁾らの‘Hb活性に関する研究’でこの中で佐瀬は“Hbを溶血せしめて保存した場合、Hbを酸化または還元の方方に完全に傾けて保存する時、混合で保存した場合よりも、Hb活性が良く保たれる”と発表している。これをACD保存血に応用したのが以下の実験である。

II 実験方法

1) 保存方法

ウサギ血液について以下の7通りの方法を行なった。

- 酸素加赤血球をACD保存液にて2週間保存。
- 脱酸素化赤血球をACD保存液にて2週間保存。
- 静脈採血赤血球をACD保存液にて2週間保存。
- 酸素加赤血球ACD保存液採血に、還元グルタチオン添加2週間保存。

e) 脱酸素化赤血球ACD保存液採血に、還元グルタチオン添加3週間保存。

f) 静脈採血赤血球ACD保存液採血に、還元グルタチオン添加2週間保存。

g) 酸素加赤血球ACD液採血に、還元グルタチオン添加、さらにオキソフェナルシンを添加2週間保存。

2) 輸血後赤血球生存率測定

⁵¹Cr 標識法⁵⁻⁸⁾を用いた。被検保存血液 100cc当り $\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$ 200 μC を注入混和し、24時間放置する。この操作は輸血前日、低温室にて無菌的に行なう。なお $\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$ 5 mC を、 $\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$ 100mg/dl の溶液にて希釈し、100 μC が 0.5cc となるよう調整した。24時間後、被検保存血液 100cc当り、100mgのアスコルビン酸を注入混和し、残存せる $\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$ を非働化した後、2 kg-3 kg のウサギ (♀) 5匹に、それぞれ、20ccずつ耳静脈より輸血を行なう。残った標識保存血液の1部を、生理食塩水で10倍に希釈し、その1ccを⁵¹Cr減衰率測定の目的で γ 線を測定放射能測定ごとに、この測定をあわせて行ない、被検測定値を補正する。24時間後対側耳静脈より2ccを採血、ヘマトクリット値を測定し(Wintrobe管使用3000回転30分) 1ccを井戸型シンチレーション計数器で放射能測定し測定値をヘマトクリット値にて補正する。この補正された放射能値を、前記の希釈標識保存血測定値にて除して減少放射能の補正を行なう。この値を被検血液の放射能比として、24時間値を100%とし、これを基準として、その後の値を%で求める。

$$\begin{aligned} \text{被検血液の放射能比} &= \frac{\text{被検血液 1 ml の cpm}}{\text{被検血液の Ht}} \times \frac{1}{\text{基準血液 1 ml の cpm}} \\ &= \frac{\text{cpm} = \text{counts per minute}}{\text{生存率} = \frac{\text{経時的放射能比}}{\text{24時間後放射能比}} \times 100\%} \end{aligned}$$

以上の計算にしたがつて生存率を算出しても必ずしも全例が均一な減衰曲線を描かない。時には間もなく急激に減少するものもある。この理由について抗原抗体反応が考えられる。Schwartz^{9,10)}らによれば蛋白質などの抗原を経静脈注入を行なった場合、つぎの3相にしたがつて消失してゆくという。

第1は注入後にみられる初相分散の相で血管や血管外に均等に分散する相。

第2はその後で対数曲線で減少するが、これは蛋白質そのものの異化作用に基づくものと考えられ、この時期には抗体は出現しない。

第3は個体が感作されて抗体が産生されて抗原が血中より除かれてゆく時期で急速に消失する相である。

保存赤血球輸血の場合には4つの様相が認められた。すなわち第1は Schwartz の第1相、第2相をもつてゆっくり減少してゆくもので普通に認められる減衰曲線と考える(図1のa)。第2は Schwartz の第1相、第2相に引つづき、第3相をもつて急激に減少してゆくもので血液型の適合が不完全なもので抗体力価が初め低く、輸血後に感作により抗体力価が亢まつて後に排除されてゆくと考える(図1のb)。

第3は第1と第2の中間にあり、第2相を認めず抗体産生が早く早期に排除されると考える(図1のc)。第4は早期に多量の破壊を認めるもので、残った血球は正常の相で減少してゆく特異的な形で、初期の破壊は血液型不適合と考えている(図1のd)。統計処理では、第2、第3、第4の様相のものを除外した。また生存率50%の日をもつて赤血球生存率半減期として、 $T_{1/2}$ で表わし、生存率比較のために用いた。

3) 保存液

日常一般に多用されている ACD 液 (厚生省基準 B 液) を用い、平圧採血ビン (200cc 採血用) にて採血した。血液と ACD 液の比率は 4 : 1 とした。

厚生省基準 B 液	クエン酸	0.4 g
	クエン酸ソーダ	1.32 g
	ブドウ糖	1.33 g
	蒸留水	100cc

4) 還元グルタチオン添加

グルタチオンは1921年Hopkins¹¹⁾が酵母より分離した活性SH基を有する tripeptide で、その組成は1935年 Harington¹²⁾により γ -L-glutamyl-L-cysteinyl glycine であることを認められた。構造式は、

で種々の動物組織や血液に存在を認める。生化学的には cysteine 部分が還元型と酸化型の相互移行を行なう。すなわち酸化還元系で NADP や NAD と共転して、電子伝達を促進し過酸化物の産生を防ぐ。

glutathione peroxidase   glutathione reductase   G-6-P dehydrogenase

赤血球の中では、含まれる還元物質の中で、量的に最大の部分を占め主として還元型として存在している^{13,14)}。

その作用機序は、glucose-6-phosphate-dehydrogenase 欠乏症¹⁷⁻²⁰⁾における、急性溶血症状および glutathione reductase 欠乏症^{15,16,20)}における赤血球寿命の短縮、溶血などより、還元グルタチオンが酸化溶血防止作用を有することが分る。

この酸化溶血防止を目的として還元型グルタチオン 200mg を 0.7% NaCl, 1.2% ベンジルアルコール溶液, 4 cc に溶かし、ACD 液 50 cc に添加して使用した。なお添加した場合の赤血球中へのグルタチオンの摂取移行は、比較的迅速で、形をかえずに直接に赤血球膜を透過することは、中尾ら²¹⁾が実験により示している。

図1 輸血後赤血球減衰曲線諸様相

5) 塩酸オキソフェナルシン添加

3-アミノ-4-オキシフェニルアルジジオキソド塩酸塩で、構造式は

で第一製薬製<マフアーセミン>を用いた。

これには塩酸オキソフェナルシン20分に対し無水炭酸 Na 4.5分と精製白糖、75.5分が添加しており、水に極めて溶けやすく、水溶液は殆んど中性で、血液と等張である。

目的は、SH基をブロックすることで、酸素加赤血球 ACD 保存液採血還元グルタチオン添加血液に 100cc 当り 0.01 g の割合で添加した。

6) 乳酸および焦性ブドウ酸測定

乳酸の測定には、Barker, Summerson 法²²⁾の変法：石井法²³⁾で比色定量した。

焦性ブドウ酸は Friedemann, Haugen 法²⁴⁾の変法：
清水法²⁵⁻²⁷⁾で比色定量した。

7) 保存血血漿遊離ヘモグロビン測定

シアンメトヘモグロビン法²⁸⁾を用いた。フェリシアン
化カリウム 0.2 g, シアン化カリウム 0.05 g および重
炭酸ナトリウム 1 g を水で溶解し全量 1000 ml とする。
この試薬として Aculute 錠 (三光純薬) を用いた。こ
の場合 1 錠で 250 ml の水に溶解する。

表 1 酸素加赤血球 ACD 保存液採血
2 週間保存血

	24時間	48時間	3 日	7 日	10 日	14 日
No. 3	100%	95.4	89.9	77.2	70.1	57.8
	100	95.6	89.2	76.9	64.4	57.4
	100	99.2	85.9	67.2	56.1	43.6
	100	98.8	90.3	80.8	88.7	59.5
	100	62.2	38.6	25.4	23.12	20.1
No. 5	100		93.6	85.4	73.3	60.5
	100		87.2	69.4	64.7	45.8
	100		119.5	85.7	71.6	42.0
	100		64.4	52.8	47.0	37.3
	100		89.4	70.4	60.4	50.2
No. 6	100		87.4	37.7		
	100		31.7	35.2	45.2	
	100		59.7	46.0	42.2	27.7
	100		58.1	48.7	43.5	31.8
	100		96.5	97.7	55.7	42.0
n			9	9	9	9
Σ.X			811.8	712.7	605	458.8
$\bar{X}$			90.2	79.2	67.22	51.0
Σ(X- $\bar{X}$) ²			520.84	830.27	84302	439.38
S			8.068	10.185	10.265	7.41
S $\bar{x}$			2.69	3.395	3.421	2.47

$\bar{X}$ 平均値   S 標準誤差 $\sqrt{\frac{\Sigma(X-\bar{X})^2}{n-1}}$

S $\bar{x}$ 標準偏差 $\sqrt{\frac{S}{n}}$

検量線：Acuglobin (60 mg/dl シアンメトヘモグロ
ビン溶液) を用い作成した。

実施：被検血清の溶血の少ない時には希釈液 1cc に対
し、被検血清 3 cc として波長 545m μ で比色測定する。
測定値を 1/3 倍し濃度をうる。溶血の多い場合、希釈液 4 cc
に対し被検血清 1 cc を加え比色し、その値を 5 倍する。

III 実験結果

1) 酸素加赤血球 ACD 保存液採血 2 週間保存血
体重 3 kg 以上のウサギ (♀) に、ネムブタール
0.5mg/kg を静注麻酔し、頸動脈を露出して後、
滅菌エラストーチューブを大動脈起始部まで挿入
する。つぎに滅菌ずみ点滴セットチューブを接続
ACD 液 50 cc 添加非減圧滅菌採血ビンに 200 cc
採血する。この動脈採血前より採血終了まで経鼻
カテーテルにて純酸素の吸入を行なった。採血後
さらに血中に酸素送入を行ない、ビン中の空気を
酸素と置換して後、低温室 (4℃-10℃) にて保存
した。2 週後、保存血液の赤血球を Na₂⁵¹CrO₄
で標識して後、輸血を行ない ((2) を参照) 輸血後
赤血球生存率を調べた。

結果は表 1 に示すごとくで、T_{1/2} は 14.3 日 (図
2 の a) であった。

2) 脱酸素化赤血球 ACD 保存液採血、2 週間
保存血

体重 3 kg 以上のウサギ (♀) に、ネムブタール
0.5mg/kg を静注麻酔し、内頸静脈を露出して後、
滅菌エラストーチューブを右房内まで挿入する。
つぎに滅菌ずみ点滴 セットチューブ を接続し、
ACD 液 50 cc 添加非減圧滅菌採血ビンに 200 cc
採血する。この場合は窒素ガスを採血中吸入させ
た。また十分採血がえられぬ場合は採血時にネオ
シネジンを筋注することにより必要量をうること
ができる。採血後さらに血中に窒素ガス送入をお
こない、ビン中の空気を窒素ガスと置換して後、
低温室に保存した。2 週後、保存血液の赤血球
を Na₂⁵¹CrO₄ で標識して後、ウサギに輸血、その
輸血後赤血球生存率を調べた。結果は表 2 に示す
ごとくで、T_{1/2} は 6.3 日 (図 2 の b) であった。

3) 静脈採血赤血球 ACD 保存液採血、2 週間
保存血

体重 3 kg 以上のウサギ (♀) に、ネムブタール
0.5 mg/kg を静注麻酔し内頸静脈を露出して後、
滅菌エラストーチューブを右房まで挿入する。つ
ぎに滅菌ずみ輸血セットを接続し、ACD 保存液
50cc 添加非減圧滅菌採血ビンに 200 cc 採血する。
この場合は、吸入などの操作は行なわない。その

表2 脱酸素加赤血球ACD保存液2週間保存血

	24時間	7日	9日	15日
No. 7	100%	42.6	39.2	19.1
	100	30*	24.6*	8.5*
	100	48	44.9	27.0
	100	24.9*	23.1*	0.96*
	100	46.4	35.6	24.2
No. 8	100	44.1	40.4	28.0
	100	52.3	46.6	29.4
	100	44.7	35.1	12.7
	100	10.0*	5.1*	0.74*
	100	37.9	37.4	28.4
n		7	7	7
ΣX		316.0	279.2	168.8
$\bar{X}$		45.14	39.9	24.1
$\Sigma (X-\bar{X})^2$		120.24	118.41	225.17
S		4.47	4.44	6.12
$S\bar{x}$		1.67	1.68	2.31

図2 輸血後赤血球生存率

まま低温室に保存する．2週後， $\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$ にて標識しウサギに輸血，その輸血後赤血球生存率を調べた．結果は表3に示す如くで， $T^{1/2}$ は11日(図2のc)であった．

4) 酸素加赤血球 ACD 保存液採血還元グルタチオン添加，2週間保存血

ACD保存液50ccに還元グルタチオン 200mgを

表3 静脈採血赤血球ACD保存液採血2週間保存血

	24時間	4日	9日	12日	15日
No. 9	100%	41.5	32.8	25.8	16.8
	100	60.9	45.4	16.5	22.6
	100	25.2	18.6	14.4	10.2
	100	33.8	18.25	9.1	5.97
	100	3.06			
n		4	4	4	4
ΣX		161.4	115.1	81.4	54.6
$\bar{X}$		40.3	28.7	20.3	13.7
$\Sigma (X-\bar{X})^2$					
S					
$S\bar{x}$					

	24時間	3日	7日	10日	14日	18日	21日
No. 16	100%	62.5	55.9	44.3	28.9	19.0	10.6
	100	98.0	85.7	79.5	18.3	3.7	1.55
	100	86.4	57.9	49.9	32.4	25	19.3
	100	93.2	68.2	60.6	39.4	28.6	22.4
	100	96.5	74.0	50.7			
n		5	5	5	3	3	3
ΣX		436.6	341.7	284.7	100.7	72.6	52.3
$\bar{X}$		87.3	68.3	57	33.5	24.2	17.4
$\Sigma (X-\bar{X})^2$		849.79	597.18	770.6	288.22	47.04	74.85
S		14.7	12.11	13.7	9.8	4.82	6.1
$S\bar{x}$		6.57	5.37	6.17	4.9	2.78	3.5

添加した採血ビンに酸素加赤血球ACD液採血と同様の方法で採血保存する．2週間後 $\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$ で標識後，ウサギに輸血，その輸血後赤血球生存率を調べた．結果は表4に示すごとくで， $T^{1/2}$ は20.5日(図3のa)であった．

5) 脱酸素化赤血球 ACD 保存液採血還元グル

表4 酸素加赤血球ACD保存液採血還元グルタチオン添加2週間保存血

	24時間	3日	7日	10日	14日	18日	20日
No. 11	100%	88.1	80.7	85.8	75.7	58.8	51.2
	100	87.1	74.6	67.4	56.1	40.2	35.4
	100	87.9	74.2	75.1	64.5	52.8	47.7
	100	88.1	73.8	70.1	61.5	56	45.2
	100	86.6	69.9	59.2	3.91		
No. 12	100	90.1	75.9	65.0	63.7	53.2	49.2
	100	95	70.9	52.5	14.6		
	100	90.8	79.2	76.2	65.6	54.5	52.1
	100	93.7	79.8	70.5	1.1		
	100	87.5	75	78	70.6	63	56.5
n		10	10	10	7	7	7
ΣX		894.9	754	699.8	457.7	378.5	337.3
$\bar{X}$		89.49	75.4	69.98	65.4	54.07	48.2
$\Sigma (X-\bar{X})^2$		74.49	117.34	871.41	238.57	300.77	267.19
S		2.876	3.61	9.84	6.30	7.08	6.67
$S\bar{x}$		0.91	1.14	3.11	2.38	2.68	2.52

表5 脱酸素化赤血球ACD保存液採血還元グルタチオン添加3週間保存血

	24時間	3日	7日	10日	14日	17日	21日
No. 13	100%	95.5	81.1				
	100	95.1	78.0	13.9			
	100	82.3	81.8	76.6	70.5	61.5	52.4
	100	88.2	85.1	86.7	43.6	59.1	52.2
	100	85	63.7	69.5	49.8	41.3	35.8
No. 14	100	85.5	58.6	44.4		52.3	20.3
	100	85.7	60.6	26.9			
	100	95.9	60.6	54.5	43.6	29.6	23.4
	100	93.5	67.4	58.5	47.5	39.1	34
	100	92.5	76.6	68.4	57.8	45.3	34.2
n		10	10	7	6	7	7
ΣX		880.0	713.5	458.6	312.8	328.2	252.3
$\bar{X}$		88.0	71.4	65.5	52.1	46.9	36.04
$\Sigma (X-\bar{X})^2$		272.64	932.95	1212.27	542	785.21	947.89
S		5.50	10.17	14.40	10.82	11.41	12.57
$S\bar{x}$		1.74	3.21	5.37	4.25	4.32	4.74

タチオン添加, 3週間保存血

ACD保存液50ccに還元グルタチオン 200mgを添加した採血ビンに, 脱酸素化赤血球ACD保存

液採血と同様の方法で, 採血保存する. 3週後 $\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$ で標識後ウサギに輸血, その輸血後赤血球生存率を調べた. 結果は表5に示す如くで

表6 静脈採血ACD保存液採血還元グルタチオン添加2週間保存血

	24時間	3日	7日	10日	14日	18日	21日
No. 17	100%	85.1	65.1	55.4	40	27.7	18.3
	100	93.1	66.6	58.4	31.3	21.4	14.6
	100	83.7	19.3				
	100	95.1	60.3	32.4			
	100	79.5	65.7	45.8	23.7	11.7	6.9
No. 18	100	97.2	78	60.4	36.8	28.0	24.2
	100	88.6	84.4	78.5	40.6	14.4	4.4
	100	96.4	72.5	60.7	41.5		
	100	99.5	70.5	60.8	37.4	33.7	30.4
	100	96.8	86.6	61.6	33.7	29.8	25.1
n		10	9	9	8	7	7
ΣX		915.1	649.7	514.0	285.0	166.7	123.9
$\bar{X}$		91.5	72.2	57.1	35.6	23.8	17.7
$\Sigma (X-\bar{X})^2$		414.76	658.45	1258.11	247.56	407.39	561.80
S		6.78	9.06	12.20	5.92	8.22	9.64
$S\bar{x}$		2.14	3.02	4.05	2.09	3.11	3.64

表7 酸素加赤血球ACD液採血還元グルタチオン添加・オキシフェナルジン添加

	24時間	3日	8日	10日	15日
No. 19	100%	103	65.7	31.6*	
	100	89.2	75	62.5	43.1
	100	94.5	75	69.8	20.4*
	100	88.1			
No. 20	100	85.4	69.1	65.5	48.5
	100	90	61.5	54.5	38.9
	100	95.4	62.9	37.8*	
	100	89.5	66.1	58.3	
No. 21	100	97.4	74.8	78.4	44.8
	100	96.0	57.7	55.7	35.2
	100	94.5	67.2	59.2	48
	100	86.1	61	44.4	31.2
n		12	11	9	7
ΣX		1109.1	736.0	548	289.7
$\bar{X}$		92.4	66.91	60.9	41.4
$\Sigma (X-\bar{X})^2$		299.73	365.25	769.07	257.15
S		5.22	6.04	9.80	6.54
$S\bar{x}$		1.503	1.82	3.268	2.47

図3 輸血後赤血球生存率

$T_{1/2}$ は15日（図3のb）であった。

6) 静脈採血赤血球 ACD 保存液採血還元グルタチオン添加, 2週間保存血

ACD保存液に還元グルタチオン 200 mgを添加した採血ビンに, 静脈採血と同様の方法で採血, 保存する. 2週後 $\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$ で標識後ウサギに輸血, その輸血後赤血球生存率を調べた. 結果は表6に示す如くで, $T_{1/2}$ は11日であった（図3のc）.

7) 酸素加赤血球 ACD 保存液採血還元グルタチオン添加, オキシフェナルシン添加, 2週間保存血

酸素加赤血球 ACD 保存液採血還元グルタチオン添加血に, さらにオキシフェナルシン 0.01mg/dl を添加保存した. 2週間後 $\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$ で標識後,

図4 輸血後赤血球生存率

ウサギに輸血, その輸血後赤血球生存率を調べた. 結果は表7に示すごとくで, $T_{1/2}$ は12.5日（図4）であった.

8) 乳酸および焦性ブドウ酸値測定

静脈 ACD 保存血, および酸素加赤血球 ACD 保存血の採血保存後の乳酸および焦性ブドウ酸の経時的变化を測定した. 結果は, 表 8, 9, 10, 11のごとくで, 乳酸においては, 保存 2 週までの増加が著しい. 酸素加赤血球 ACD 保存血では, 静脈採血 ACD 液保存血に比しその増加は, やや少ない. 焦性ブドウ酸値では酸素加赤血球 ACD 液採血保存血で, ほとんど直線的に増加している（図5）.

9) 保存血血漿遊離ヘモグロビン測定

採血時より6週まで各週ごとに, 保存血液中の

血漿遊離ヘモグロビンを測定した. 結果は図6のごとくで, 2週以後より急速に増加を認める. 最

表 8 静脈採血 ACD 液保存血 乳酸値

	0 週 mg/dl	1 週 mg/dl	2 週 mg/dl	3 週 mg/dl	4 週 mg/dl	5 週 mg/dl
No. 101	78	93.6	130	150	131.0	143.5
No. 102	70	86.4	128	158.5	140	158.0
No. 103	108	77.4	236	245	250	252.0
No. 104	69.6	148.8	122	137.5	128.5	140
ΣX	325.6	406.2	616	691.0	649.5	693.5
$\bar{X}$	81.4	101.5	154	172.7	162.4	173.4

表 9 酸素加赤血球 ACD 液採血保存血 乳酸値

	0 週 mg/dl	1 週 mg/dl	2 週 mg/dl	3 週 mg/dl	4 週 mg/dl	5 週 mg/dl
No. 106	64.4	92.4	142.5	152	135	143
No. 107	57.6	94.8	134	140	140	137
No. 108	92.4	121.8	177.5	174	165	186
ΣX	214.4	309.0	454.0	466	440	466
$\bar{X}$	71.4	103	151.3	155.3	146.6	155.3

表10 静脈採血 ACD 液保存血 焦性ブドウ酸値

	0 週	1 週	2 週	3 週	4 週	5 週
No. 101	1.4	2.45	3.2	5.4	7.8	10.5
No. 102	2.1	2.65	3.5	3.1	5.1	4.2
No. 103	1.8	2.35	3.6	2.5	4.0	5.2
No. 104	1.2	2.67	2.3	2.1	3.0	4.1
ΣX	6.5	10.12	12.6	13.1	19.9	24.0
$\bar{X}$	1.62	2.53	3.15	3.27	4.97	6.0

表11 酸素加赤血球 ACD 液採血保存血 焦性ブドウ酸値

	0 週	1 週	2 週	3 週	4 週	5 週
No. 106	1.2	2.5	2.0	5.4	6.6	8.8
No. 107	1.1	2.2	5.4	7.2	11.4	14.6
No. 108	1.3	2.6	5.2	5.0	7.2	11.3
ΣX	3.6	7.3	12.6	17.6	25.2	34.7
$\bar{X}$	1.2	2.4	4.2	5.9	8.4	11.6

も増加の多い保存血は酸素加赤血球 ACD 液採血で, 最も少ないものは静脈採血赤血球 ACD 保存液採血還元グルタチオン添加保存血であった.

図 5

図 6 各種 ACD 保存血血漿中遊離 Hb 濃度

IV 考案

血液の保存、殊に赤血球の保存についての研究は1900年の Landsteiner の血液型発見 이래多数なされている。その初めは、Hustin (1914年)²⁹⁾ Lewisohn³⁰⁾, Agote (1915年)³¹⁾ によるクエン酸

の凝固阻止作用の発見である。ついで Rous と Turner³²⁾ は1916年にグルコース添加が保存に良いことを示した。以後の20年間はこの至適条件をみつけるための多くの努力が行なわれたが、十分なものは見つかっていない。1940年から1943年における Maizels^{33,34)} および Loutit (1943年)^{35,36)} らによる ACD 液の発見は、それまでの保存血の保存期間を2倍に延長させる偉業であった。その後の研究では赤血球分離保存や、プリン添加保存³⁷⁻⁴²⁾ などの研究も行なわれてきた。プリン添加保存は、その副作用のために用いられていない⁴³⁾。また今までの考え方とは全く別に、種々の冷凍阻止剤を用いて血液を冷凍する研究が Smith, Lovelock^{44,45)} らによって開かれ、ultra-long preservation が行なわれるようになり、稀有な血液型の血液の保存に重要な役割を果している。しかしこの方法は、操作が繁雑で、効率の問題もあるので、日常の輸血には用い難い、という点で仲々普及しない。

現在 ACD 液で保存される血液の保存期間は4週間、日本では1週間の安全域をとって3週間とされている。これ以後の血液については輸血後赤血球寿命が短かく、また溶血も多い。しかし血液不足の現在、さらに長期保存によって期限切れとして、排棄処分されている血液を救助することは献血推進キャンペーンと同じく、大きな意味をもつと考える。

赤血球の保存を考える場合、その構成成分より、第1に Hb 活性、第2に赤血球膜、第3に代謝を考慮すべきと考える。代謝については赤血球のエネルギー源が糖代謝により供給されており、この意味でグルコース添加が必要になってくる。赤血球膜について中尾⁴⁶⁾ は、膜構造維持に ATP が必要であり、この ATP は前記代謝に由来するという。Hb 活性については、溶血せしめた Hb 溶液による佐瀬⁴⁷⁾ の実験がある。この中で佐瀬は混合 Hb と酸素化 Hb および脱酸素化 Hb とを保存する時、Met Hb の産生は酸素化 Hb 脱酸素化 Hb で少なく、O₂ 授受によりグロビンの変化がくことを示している。

著者は、この Hypothese にもとづき、前記の保存実験を行なった。

結果は図2に示すように、酸素加保存血の2週間保存後輸血後赤血球寿命は、 $T^1_2=14.3$ 日で静脈採血保存血の $T^1_2=11$ 日より3.3日すぐれている。この差は、Hypotheseの正しさを示すものであろうか。代謝面で調べてみると、乳酸と焦性ブドウ酸の保存期間中の変化は図5で明らかなように、2週間保存では著明な差を認めていない。しかし2週間以上保存した場合、乳酸量は、酸素加血で少なく、また焦性ブドウ酸は逆に増加を認めている。

Löhr¹⁵⁾ らによれば、グルコース6磷酸脱水素酵素 (G-6-PD) 欠乏症では、NADPH 低下に伴いNADHが低下する結果、乳酸/焦性ブドウ酸比が平常時でも低下している。これはプリマキンなどの薬剤投与により、高度となり、解糖が焦性ブドウ酸→乳酸の段階で障害され、ATP低下をまねき、溶血を結果するという。このことは保存血の溶血度を調べてみると、同様の事実があり (図6) 酸素加血では静脈血に比して、2週以後で増加している。ということも、酸素加血が、G-6-PD 欠乏症に似た状態であることを示している。

この代謝面での欠点を有しながら、なお3.3日の延長を有することは、佐瀬のHypotheseの正しさを証明している。

赤血球の糖質代謝は主としてEmbden-Myerhofの解糖系にそのエネルギー代謝を依存しているがこのほかに、pentose phosphate pathway が、正常の場合、約10%がこの回路を通るとされている²⁰⁾。この回路は、ピリジヌクレオチドのうち、NADP(TPN)が還元される系として重要な意味をもっており、赤血球の必須な蛋白成分 (酵素・グロビンなど) のSH基を外因的な障害作用 (酸化作用) から保護する上に、大切な役割をGSHがもっている。この酸化型グルタチオンGS-SGをGSHに還元するglutathione reductaseの補酵素としてNADPHが必要となる²⁰⁾。NADPHの低下は、G-6-PDの活性の低下にもと

づき、G-6-PDの活性の低下は、赤血球の老化によっておきる。つまり酸素化血では赤血球の老化に等しい変化をきたす。また、NADPHの低下は還元グルタチオン(GSH)の低下を起すという⁴⁹⁾。さらに、赤血球の加齢により、G-3-PDの活性の低下がおこり、この部分は解糖系の中で、NADHの唯一の産生部位でまたATP産生部位はこの部位以下にあるので、ATP産生を障害しかつNADPHを必要とする反応に影響を及ぼすことになる。一方HexokinaseやG-3-PDの反応はGSHを必要とし、このことはG-6-PDの活性に関してくる。

以上を総合すると、G-6-PD活性の低下によるNADPHの低下は、GSHの低下をきたし、さらに、GSH低下によるG-3-PD活性の低下は、ATP産生障害をきたし、このためNADPHの低下をもたらし、この循環を回転させるためにはG-6-PD活性の賦活が必要である。この目的をもつてGSHを添加して赤血球保存に与える影響を調べてみた。

結果は図3のごとくで、酸素加GSH添加保存血にて、輸血後赤血球寿命 $T^1_2=20.5$ 日と静脈保存血に比して、約2倍の延長を認めた。しかし静脈血採血GSH添加保存血では、 $T^1_2=11$ 日と変化を認めない。また、脱酸素化GSH添加保存血では、24日保存にもかかわらず、 $T^1_2=15$ 日で静脈採血GSH添加保存血を凌いでいる。つまりGSH添加は酸素加血、脱酸素化血にて有効であり、静脈血において無効であった。この説明はG-6-PD賦活ではできないが、溶血度ではいずれも減少しているところから、溶血防止作用の点で効果は証明される。また $Hb \rightleftharpoons O_2Hb$ への変換が行なわれないか、または頻度が少ない酸素加血、脱酸素化血でGSHの効果が大きいことは、この変換がHbの活性に大きな影響を与えており、この影響はGSHなどにより補えないほどの量をもっていることが分る。他方同じような条件で、GSHの添加が行なわれていない脱酸素化血では、輸血後赤血球寿命が静脈血よりも短かいことは、GSHとHb活性に密接な関係があることを

示唆する。

V 結論

1) 酸素加ウサギACD保存血2週間保存, 脱酸素化ウサギACD保存血2週間保存, 静脈採血ウサギACD保存血2週間保存, の輸血後赤血球生存率を測定した。T_{1/2}は酸素加血で14.3日, 脱酸素化血で6.3日, 静脈血で11日であり, 酸素加血でわずかに輸血後赤血球生存率の延長を認めた。

2) 膜の酸化溶血防止作用を主目的に還元グルタチオンを, 100mg/dlの割合に添加した同様の保存実験では, 輸血後赤血球生存率は2週間保存酸素加血で, T_{1/2}=20.5日, 3週間保存脱酸素化血で, T_{1/2}=15日とそれぞれ延長を認めた。しかし2週間保存静脈血では, T_{1/2}=11日で変化を認めなかった。

3) SH基ブロックの目的で, オキシフェナルシン 0.1g/dlを添加した酸素化還元グルタチオン添加ACD保存血の2週間保存後の輸血後赤血球生存率はT_{1/2}=12.5日で, 静脈採血ACD保存血, および還元グルタチオン添加静脈採血ACD保存血と, ほぼ等しく還元グルタチオンの赤血球保存における必要性を示した。

4) 溶血では, 酸素化, 脱酸素化などの操作により増加するが, グルタチオン添加により減少させた。

5) 乳酸値は, 経時的増加は酸素加ACD保存血では, 2週保存以後ではみられない。また静脈採血ACD保存血では, 3週保存以後では増加がない。焦性ブドウ酸値は, 酸素加ACD保存血では経時的に増加する。また静脈採血ACD保存血では, その増加はゆるい。

ご指導, ご校閲を賜った恩師榊原仟教授に深謝する。また直接ご指導, ご教示いただいた林久恵教授に感謝する。なお本研究を行なうに当たり, 種々ご助力, ご指導いただいた生化学教室の松村義寛教授, 輸血部の村上省三教授ならびに教室の千葉智世助教授, 堺裕講師に謝意を表する。

文献

1) Kevy, S.V., Gibson, J.G. & Button, L.:

- Transfusion* 5: 427, 1965.
- 2) Hurn, B.A.L.: Storage of Blood (Academic Press London and New York, 1968.
- 3) Nakao, K. et al.: *Nature*, **194**: 878, 1961.
- 4) 佐瀬クララ: 東京女子医科大学雑誌, **35**: 302, 1965.
- 5) 金井泉: 臨床検査法提要, 1965.
- 6) Necheles: *J. Lab. & Clin. Med.*, **42**: 358, 1953.
- 7) 永井輝夫: 最新医学, **13**: 225, 昭33.
- 8) 松村義寛: 臨床検査, **18**: 9, 13, 1964.
- 9) Robert, S. Schwartz & Janine Andre: *Proc. Soc. Exp. Biol. and Med.* **104**: 228, 1960.
- 10) Talmage, D.W., Dixon, F.J., Bukantz, S.C. & Dammin, G.J.: *J. Immunol.*, **67**: 243, 1951.
- 11) F.G. Hopkins: *Biochem. J.* **15**: 286, 1921.
- 12) C.H. Harington, T.H. Mead: *Biochem. J.*, **29**: 1602, 1935.
- 13) Harris, J.W.: The Red Cell, Harvard Univ. Press, Cambridge, Mass., 1963.
- 14) Bishop, C. & Surgenor, D.M., Ed.: The Red Blood Cell, Academic Press, New York and London, 1964.
- 15) Löhr, G.W., Waller, H.D.: *Med. Klinik*, **57**: 1521, 1962.
- 16) Carson, P.E., Brewer, G.J. & Ickes, C.: *J. Lab. Clin. Med.*, **58**: 804, 1961.
- 17) Beutler, E., Dern, R., Flanagan, C.L. & Alving, A.S.: *J. Lab. Clin. Med.*, **45**: 286, 1955.
- 18) Beutler, E., Dern, R., Flanagan, C.L. & Alving, A.S.: *J. Lab. Clin. Med.*, **44**: 439, 1954.
- 19) Löhr, G.W. & Waller, H.D.: *Med. Woch. schr.*, **86**, 27, 87, 1961.
- 20) 三輪史朗: 代謝, **4**, **3**: 168, 1967.
- 21) 中尾喜久, 服部理男, 八幡義人: グルタチオン研究の進歩. 診断と治療社, 94, 1969.
- 22) Barker, Summerson: *J. Biol. Chem.* **138**: 535, 1941.
- 23) 石井: 医学と生物学, **16**: 317, 1950.
- 24) Friedemann, Haugen: *J. Biol. Chem.*, **144**: 67, 1942, **147**: 415, 1943.
- 25) 清水: 医学と生物学, **17**: 102, 1950.
- 26) 清水: *J. Biochem.* **37**: 421, 1950.
- 27) 清水: 生化学, **22**: 108, 1958.
- 28) 金井泉: 臨床検査法提要, 金原出版, 1964.
- 29) Hustin, A.: *J. Méd. Brux.*, **12**: 436, 1914.
- 30) Lewisohn, R.: *Surg. Gynec. Obstet.* **21**: 37, 1915.
- 31) Agote, L.: *Annls Inst. clin. méd.*, 1915.
- 32) Rous, P. & Turner, J.R.: *J. exp. Med.* **23**: 219, 1916.
- 33) Maizels, M. & Whittaken, N.: *Lancet*, **1**:

- 590, 1940.
- 34) Maizels, M.: *Q. J. exp. Physiol.* **32**: 143, 1943.
- 35) Loutit, J.F., Mollison, P.L. & Young, I.M.: *Q. J. exp. Physiol.* **32**: 183, 1943.
- 36) Loutit, J. F. & Mollison, P.L.: *Br. med. J.*, **2**: 744, 1943.
- 37) Gabrio, B.W., Donohue, D.M. & Finch, C.A.: *J. Clin. Invest.*, **34**: 1509, 1955.
- 38) Gabrio, B.W., Henneseg, M., Thomasson, J. & Finch, C.A.: *J. Biol. Chem.* **215**: 357, 1955.
- 39) Nakao, M., Nakao, T., Tatibana, M., Yoshikawa, H. & Abe, T.: *Biochem. biophys. Acta*, **32**: 564, 1959.
- 40) Nakao, M., Nakao, T., Tatibana, M. & Yoshikawa, H.: *J. Biochem.* **47**: 661, 1960.
- 41) Nakao, M., Nakao, T., Tatibana, M. & Yoshikawa, H.: *J. Biochem.* **47**: 694, 1960.
- 42) Gabrio, B.W., Donahue, D.M., Huennekens, F.M. & Finch, C.A.: *J. Clin. Invest.* **35**: 657, 1956.
- 43) Fischer, H., Feber, E., Fritzsche, W., Seidentopf, H.G. & Spielmann, W.: *Proc. Xth Congr. int. soc. Blood Transf., Bibl. Haemat.* **23**: 616, 1965.
- 44) Merymann, H.T. & Kafig, E.: *Proc. Soc. exp. Biol. Med.* **90**: 587, 1955.
- 45) Lovelock, J.E.: *Lancet*, **1**: 1238, 1952.
- 46) Smith, A.U.: *Lancet*, **2**: 910, 1950.
- 47) Huggins, C.E.: *Science*, N.Y. **139**: 504, 1963.
- 48) 中尾真: 代謝, **4**, **3**: 154, 1967.
- 49) 三輪史朗: 代謝, **4**, **3**: 170, 1967.
-
- *   *   *