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：赤血球浸透圧抵抗からの解析

川 田 高 俊

(東京女子医科大学附属日本心臓血圧研究所理論外科)

(受付：昭和46年5月31日)

EFFECTS OF REDUCED GLUTATHIONE ON THE OXYGENATED AND PRESERVED RED CELLS: ITS ANTI-HEMOLYTIC AND ANTI-OSMOTIC FRAGILITY EFFECTS

by

Takatoshi KAWATA

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

(Director: Prof. Shigeru Sakakibara)

Denaturation of hemoglobin is one of the intracellular factors which disturb red cell metabolism and lead to the hemolysis. Although there are many pathways to reduce methemoglobin to hemoglobin in packed cell, it seems to be most important to keep hemoglobin intact during storage.

Oxydation of hemoglobin to methemoglobin by the oxygen has been shown to occur in reduced hemoglobin rather than the oxygenated hemoglobin by Brooks in 1948.

Sase reported in 1965 that oxygenated hemoglobin decreased methemoglobin products as compared with half to half mixture of oxygenated and reduced hemoglobin.

The red cell membrane is known to possess many sulfhydryl units, especially in the inner layer.

Inhibition of the sulfhydryl units of the red blood cell has been shown to result hemolysis. (H.S. Jacob & J.H. Jandl)

Reduced glutathione is also effective in maintaining sulfhydryl groups of the red blood

cell membrane.

In the present study, the influence of the oxygenation and an addition of reduced glutathione on the red cell fragility and hemolysis was determined.

The experiments consisted of the following four groups.

- 1) Venous blood collected into ACD solution (VA)
- 2) Venous blood collected into ACD solution with reduced glutathione (VAGSH)
- 3) Oxygenated blood in ACD solution (OA)
- 4) Oxygenated blood in ACD solution with reduced glutathione (OAGSH)

Results

- 1) Plasma free hemoglobin during a five week storage

It was least in the OA and OAGSH groups.

- 2) Red cell fragility test

This was tested against a series of 0.9% to 0.2% sodium chloride solution. At the level of 0.8% NaCl, an addition of GSH was effective to

keep weak resistant red cell from destruction.

OAGSH tolerated well at the level of 0.8%, however, damage of the cell membrane of the well resistant young red cell was prominent.

3) Serum lactate and pyruvate levels

On lactate to pyruvate ratio, except control group (VA), the other stored blood groups reached to its maximum value within 2 weeks and reduced gradually to its initial level.

On the contrary, VA reached to its maxi-

mum value after 3 weeks storage. The reduced glutathione increased lactate to pyruvate ratio higher but did not change the time to its maximum value.

Conclusion

Oxygenation and the addition of reduced glutathione have proven to give a veneficial effects on anti-hemolysis and fragility change during a 5 weeks RBC storage.

緒言

現在のA C D液保存血では、赤血球の生存率が、輸血24時間後に70%あることが必要で、この条件にかなうためには、保存期間3週間が限度となっている。したがって、これよりもさらに保存期間を延長するためにも、また輸血の効果を上げるためにも、保存期間中の赤血球の破壊や障害が少なく、ひいては輸血後赤血球生存率を高くすることがのぞまれる。

生体内での赤血球は加齢に伴って種々の変化をきたし、最後には網内皮系に捕捉されて排除されてゆく。Marks ら¹⁾は、老化した赤血球では、低張食塩水浸透圧抵抗が弱いことを認め、一方Gabrio ら²⁾は、その実験の中で、体内で老化した細胞ほど体外保存の環境での老化に抵抗することを示している。また、中尾ら³⁾の研究によれば、長期保存下でも赤血球A T Pレベルが回復すれば輸血後赤血球生存率は増加するという。これらは血液保存に対して多くの示唆を含んでいる。

赤血球の低張食塩水浸透圧抵抗という現象を、その発現する機序から考察すると、赤血球膜にあるNa-K-ATPase^{4,5)}の能動的活性が関与していることがわかる。すなわちNaイオンやKイオンの出納をコントロールする酵素の活性の低下は細胞内にNaイオンのみならず水の自由な侵入を許し赤血球の膨化をもたらす。この膨化による赤血球の破壊が浸透圧抵抗の低下であり、つまり浸透圧抵抗の低下は赤血球膜の酵素活性の低下という生化学的变化を物理的現象で捉えたものといえる。

著者は、さきにウサギ血液を用いて保存期間の

延長を目的とした研究⁶⁾を行ない、酸素加赤血球還元グルタチオン添加A C D液保存血では2週間保存したのちの輸血後赤血球生存率が、従来のA C D保存血に比し、約2倍に延長することを認めた。そして、その理論的根拠として酸素加ヘモグロビンは自酸化され難く、メトヘモグロビンになり難い事実^{7,8)}と、還元グルタチオンによる赤血球膜の酸化防止作用に求めた。

本実験は、血液保存操作および酸素加や、還元グルタチオン添加などの処置が赤血球膜に与える影響を知る目的で採血後6週間までの各保存期間における、赤血球低張食塩水浸透圧抵抗の変化を主とし、その間の代謝および溶血の動向を従として検討した。

実験方法

1) 採血ならびに保存方法

体重約2.5kgのウサギを用いて、頸静脈より右心房に挿入したエラストーチューブより静脈血を、酸素吸入のもとに頸動脈より大動脈に挿入したエラストーチューブより酸素加血を、それぞれ無菌的に、厚生省基準B液(クエン酸0.4g, クエン酸ソーダ1.32g, ブドウ糖1.33g, 蒸留水100ml) 50ml 添加減圧採血ビンに200ml ずつ採血した。

採血時に、採血量をふやす目的で一方の耳静脈より、乳酸加リンゲル糖液を、200ml ずつ輸注した。

これを以下の4通りの方法で4℃低温室に6週間保存した。

1. 静脈採血A C D液保存血(静脈血群)
2. 静脈採血還元グルタチオン添加A C D液保存血(静脈G S H血群)

3. 酸素加赤血球A C D液保存血（酸素加血群）

4. 酸素加赤血球還元グルタチオン添加A C D液保存血（酸素加G S H血群）

なお、還元グルタチオンは 500mgを0.7%NaCl, 1.2%ベンジルアルコール溶液10mlに溶解し、血液 100mlに
対して 4 ml ずつ添加混和した。

2) 血漿遊離ヘモグロビン測定
シアンメトヘモグロビン法⁹⁾を用いた。

血漿 1 ml を加えて比色し、得た濃度を 5 倍して測定値を得た。なお比色には、日立 101光電比色計を用いた。

3) 赤血球抵抗測定⁹⁻¹³⁾

化学用純塩化ナトリウム10.0 gを脱イオン水に溶かし
全量1,000mlとして 1 %食塩溶液を作成、これを15ml容
遠沈管 8 本に10ml容メスピペットを用い、 9 ml, 8 ml,
7 ml, 6 ml, 5 ml, 4 ml, 3 ml, 2 ml ずつ取り、それぞ
れに脱イオン水 1 ml, 2 ml, 3 ml, 4 ml, 5 ml, 6 ml,

表 1 保存血血漿遊離 Hb

保存期間（週）、		1	2	3	4	5	6
静脈採血A C D液保存血	n	5	5	3	5	5	3
	ΣX	70.5	88.4	125.2	253.3	348.2	229.7
	$\bar{X}$	14.1	17.68	41.73	50.66	69.64	76.57
	S	7.23	9.29	16.06	9.94	6.56	4.38
	S $\bar{x}$	3.23	4.16	4.17	4.45	2.94	2.53
静脈採血還元グルタチオン添加A C D液保存血	n	5	5	2	5	5	3
	ΣX	85.5	79.2	44.9	230.9	299.7	151
	$\bar{X}$	17.10	15.84	22.45	46.18	59.94	50.33
	S	12.48	9.22	13.17	20.98	6.81	6.81
	S $\bar{x}$	5.58	4.12	3.89	9.38	3.93	3.93
酸素加赤血球A C D液保存血	n	5	5	3	4	3	3
	ΣX	41.5	42.5	51.7	123.5	22.2	265.8
	$\bar{X}$	8.3	8.5	17.2	30.88	55.5	88.6
	S	1.3	2.96	3.36	12.78	32.13	54.16
	S $\bar{x}$	0.58	1.32	1.94	6.39	16.06	31.27
酸素加赤血球還元グルタチオン添加A C D液保存血	n	5	5	2	5	5	5
	ΣX	63.5	58.4	45.3	185.3	268.5	337.8
	$\bar{X}$	12.7	11.68	22.65	37.06	53.7	67.56
	S	4.10	3.14	10.61	12.60	12.52	12.52
	S $\bar{x}$	1.83	1.40	4.74	5.67	7.39	7.39

$\bar{X}$: 平均値 S : 標準偏差 $\sqrt{\frac{\sum (x-\bar{x})^2}{n-1}}$ S $\bar{x}$: 標準誤差 $\frac{S}{\sqrt{n}}$

試薬は Aculute 錠（三光純薬）を用いた。内容はフェ
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 1.0 g（4錠中）で、全量を水
で 1,000ml として用いる。

検量線はAcuglobin（60mg/dl シアンメトヘモグロビン
溶液）（三光純薬）を用い作成した。

実施 被検血漿の溶血が少ない時には希釈液 1 ml に
対し、被検血漿 3 ml として波長 545mμ で比色測定す
る。この測定で得たmg/dl濃度に 4/3 倍して、測定値を
得る。溶血が少し多い時には、希釈液 4 ml に対し被検

7 ml, 8 ml を加え混和、0.9%, 0.8%, 0.7%, 0.6%,
0.5%, 0.4%, 0.3%, 0.2% の濃度の食塩水を作る。
こうして準備された各濃度食塩水に 1 ml オストワルド
ピペットを用い 1 滴（約0.05ml）ずつ血液を滴下し、
振盪混和して1時間室温放置後 1,000 rpm 5分で遠沈
する。各試験管の上清を、0.9%濃度食塩水に混和した
ものの上清を、盲検として、日立 101光電比色計にて、
フィルター 545 mμ で吸光度を測定した。

4) 乳酸およびビルビン酸測定
乳酸の測定¹⁴⁻¹⁸⁾は、Barker, Summerson 法の変法の

石井法で、フィルター 565 mμ で比色定量した。

遊離ヘモグロビン量を表 1 に示す。遊離ヘモグロ

ビルビン酸の測定¹⁹⁻²⁴⁾は Friedemann, Haugen 法の

ビン値は、保存 1 週から 4 週までは酸素加血群で

変法の清水法でフィルター 446 mμ で比色定量した。

最も低く、ついで酸素加 G S H 血群、静脈 G S H

表 2 赤血球浸透圧抵抗

保存期間 (週)		1	2	3	4	5	6
静脈採血 A C D 液 保存血	0.9% NaCl	0	0	0	0	0	0
	0.8%	29	22.4	21.3	21.9	43.7	37.5
	0.7%	38	36.5	47.1	57.2	76.1	78.8
	0.6%	64	52.3	61.5	75.1	87.4	95.8
	0.5%	93	80.0	85.5	77.0	94.1	104.7
	0.4%	81	89.0	85.9	88.1	101.0	112.1
	0.3%	98	100.3	98.7	90.6	10.30	98.3
	0.2%	100	100	100	100	100	100
静脈採血還元グル タチオン添加 A C D 液保存血	0.9% NaCl	0	0	0	0	0	0
	0.8%	14.5	15.3	19.9	14.3	25.1	24.9
	0.7%	42.5	59.2	64.2	49.3	54.3	55.8
	0.6%	85	82.0	82.4	74.6	70.9	69.5
	0.5%	102	92.1	81.8	82.1	84.7	84.1
	0.4%	95.5	91.7	95.1	88.9	91.2	89.6
	0.3%	96.5	98.4	100	97.0	93.8	100
	0.2%	100	100	100	100	100	100
酸素加赤血球 A C D 液保存血	0.9% NaCl	0	0	0	0	0	0
	0.8%	14.5	34.5	21.9	24.9	25.7	26.3
	0.7%	67.5	70.2	57.4	58.0	53.9	56.5
	0.6%	85.5	80.2	78.1	77.7	75.0	79.4
	0.5%	86.5	82.5	89.1	88.1	86.5	80.1
	0.4%	96.0	92.6	96.4	96.3	95.0	90.5
	0.3%	94.5	91.6	100	99.7	96.1	96.0
	0.2%	100	100	100	100	100	100
酸素加赤血球還元 グルタチオン添加 A C D 液保存血	0.9% NaCl	0	0	0	0	0	0
	0.8%	2.0	10.8	20.1	27.3	36.8	33.5
	0.7%	26.5	58.6	59.6	69.0	70.1	64.5
	0.6%	78.0	80.0	82.0	84.7	89.4	81.6
	0.5%	88.0	88.7	82.4	88.4	94.3	91.2
	0.4%	95.0	95.7	89.8	94.6	98.6	93.8
	0.3%	100.5	94.5	92.6	100	97.4	98.8
	0.2%	100	100	100	100	100	100

$$\frac{I_n}{I_{0.2}} \times 100\%$$

In : 0.9% NaCl での上清を盲検とした時の各濃度 NaCl の上清の吸光度の読み

I_{0.2} : 0.2% NaCl の上清の吸光度の読み

実験結果

1) 保存血血漿遊離ヘモグロビン

血群の順で高くなり、静脈血群で最も高い。保存

保存第 1 週より第 6 週までの保存血液中の血漿

6 週では、酸素加血群が最も高値を示し、ついで

静脈血群、酸素加 G S H 血群、静脈 G S H 血群の

順で低くなる。

還元グルタチオン添加血と非添加血と比較すると、静脈GSH血群では、保存第3週でなお対照の静脈血群より遊離ヘモグロビン量が低く、明らかに差を認めるが、酸素加GSH血群では、酸素加群との差を認めない。

静脈血群と酸素加血群を比較すると、還元グルタチオン添加の有無には関係なく、酸素加血群で遊離ヘモグロビン量が低い。

2) 低張食塩水赤血球浸透圧抵抗

0.9%濃度食塩水と混じた血液を1時間室温に放置後、遠沈して得た上清を盲検として、各濃度食塩水での溶血上清の吸光度 I_n を、0.2%濃度食塩水で完全溶血した時の、上清の吸光度 $I_{0.2}$ で除した値を、各実験群ごとに平均値で示した(表2)。

この赤血球浸透圧抵抗の分析を容易にするために、さらにこれをつぎの2つに分けて検討した。

i) 0.8%濃度食塩水赤血球浸透圧抵抗と理論的赤血球寿命の関係

ii) 各濃度食塩水赤血球浸透圧抵抗溶血分画

i) 0.8%濃度食塩水赤血球浸透圧抵抗と理論的赤血球寿命の関係

Marks らの老化した赤血球は食塩水浸透圧抵抗が弱い、という結論にもとづき、0.8%濃度食塩水での、赤血球抵抗値(溶血した赤血球量の全赤血球量に対する百分率)を一応老化または赤血球障害のあった赤血球量と考えて、各週ごとに示し、これと保存しないで生体内にあった場合に、各週ごとに排除される量とを対比させ、その差を比較した(図1, 2)。

この場合ウサギ赤血球寿命を60日³⁴⁾とし、直線的に排除されてゆくものとする(点線部分)。

保存第1週での障害をうけた赤血球量は酸素加GSH血群を除く他の群で、理論的排除量より大きい。殊に静脈血群で最も著しく、ついで酸素加血群と静脈GSH血群がほぼ同程度であった。

保存第2週では、酸素加血群、酸素加GSH血群で、さらに障害をうけたものの量が進行するが、後者ではその程度は軽度である。静脈血群で

は幾分その量が少なくなり、以後保存4週までの変化はない。静脈GSH血群も同様に4週まで著しい増減はない。酸素加血群では保存3週で回復してから以後の変化はない。酸素加GSH血群では、障害赤血球量の増加が保存5週まで続くのを認めた。

ii) 各濃度食塩水赤血球浸透圧抵抗溶血分画
前項の赤血球浸透圧抵抗値を各濃度食塩水ごと

図1 0.8% NaCl 抵抗残存赤血球率と残存赤血球加今日数(その1)

図2 0.8% NaCl 抵抗残存赤血球率と残存赤血球加今日数(その2)

に破壊されてゆく分画に分けてどの濃度食塩水で最も破壊されるかを見た(図3, 4, 5, 6)。

静脈血群では破壊は、保存第3週まではほぼ均等におこるが、保存第4週以後では0.8%濃度食塩水に向かって最高値が移動する。

酸素加血群では保存第1週よりこの傾向を認め赤血球膜抵抗の変化を思わせる。

静脈GSH血群では0.6%から0.7%濃度食塩

水のところに、その最高値が分布し静脈血群より赤血球膜抵抗の変化を認める。酸素加GSH血群でも同様の变化を認めた。

3) 乳酸およびピルビン酸値

乳酸、ピルビン酸値は、mg/mlで測定し、さらにmMole/Lに換算した。

図3 溶血分画—静脈採血A C D液保存血(その1)

図4 溶血分画—静脈採血還元グルタチオン添加A C D液保存血(その2)

糖代謝の終産物の総量を代謝活性の指標と考え、乳酸+ピルビン酸 mMole/Lを図7に示した。

静脈血群では解糖は早くより進行し保存第2週で最高値を示した。以後は全体としてはゆるやか

な減少を示した。

静脈GSH血群では、保存初期には著明な解糖の抑制を認め、その後次第に上昇し、保存第5週でその最高値に達した。

酸素加血群では、静脈血群と同様に第2週で著しい増加を認めるが、以後は減少するが再び第5

図5 溶血分画—酸素加赤血球A C D液保存血(その3)

図6 溶血分画—酸素加赤血球還元グルタチオン添加A C D液保存血(その4)

週で増加の山を認めた。

酸素加GSH血群では、酸素加血群と同様の型を認めたが、その増減の振幅は大きい。

また乳酸、ピルビン酸は乳酸脱水素酵素の介在

と NAD, NADH₂ との共軛のもとに互に変化し得る。この変化を見る目的で、乳酸対ピルビン酸比を求め図8に示した。

静脈血群と酸素加血群とは全く推移が異なり、酸素加血群では乳酸が少なく、ピルビン酸からの移行の少ないことを示している。

これに還元グルタチオンを添加すると、静脈 GSH 血群では、ピルビン酸の増加は2週以後で認めるのに反し、酸素加 GSH 血群では4週以後で乳酸が増加していた。

考察

赤血球膜成分は脂質、蛋白質、糖質より成り構造は3層をなし、これを貫通して種々の酵素が存在すると考えられている^{26, 32)}。さらに、最近では蛋白質骨格に subunit が嵌入されているなどの仮説も出されている³⁵⁾。この赤血球膜の構造維持には、膜がポテンシャルエネルギーをもつことが必要で、このエネルギーは主として、糖代謝にもとづく ATP によって供給されていると考えられている²⁶⁻²⁸⁾。膜にある ATPase は ATP を ADP とし、同時に、細胞内 Na イオンの汲み出し、および細胞外 K イオンの汲み入れと共軛する^{28, 29)}。ATP レベルの低下は、したがってこれらイオン濃度の失調をもたらし、細胞内 Na イオンの蓄積と細胞内水貯溜を起し、遂には細胞の膨化による溶血をきたす。

以上は保存による代謝活性の低下、ATP レベル低下で起る赤血球膜の障害機序であるが、このほかに膜に直接障害を起す原因として、酸素加の目的で加えられた酸素や酸化物による赤血球膜の-SH 基の酸化²⁸⁾がある。

血漿遊離ヘモグロビン量はこれらの原因による膜の障害の1つの指標と考えられるが、本実験では、酸素加血群の溶血が最も少なく、酸化物による膜の障害はみとめられないようであった。この結果は前記の概念とは反するし、また、以前に行なった同様の実験⁹⁾で、酸素加血群の溶血が多く認められたこととも矛盾する。

手技について異なる点は、以前の実験の採血時に血中に酸素送入を行なっていることで、酸素の

過飽和やガス送入操作による影響が、この差をもたらしたと考えている。

Marks らの述べた“老化した赤血球は、浸透圧抵抗が弱い”^α ということは、すでに緒言でふれた如く低張食塩水の赤血球浸透圧抵抗の最少抵抗値が一番物理的影響を受けやすい赤血球群を示すということで、脆弱性の1つの指標として考えられる。

著者は、0.8%濃度食塩水赤血球浸透圧抵抗を

図7 乳酸+ピルビン酸値 (mMole/L)

図8 乳酸/ピルビン酸比 (L/P 比)

用いて赤血球の保存による影響の指標とした。これによると、静脈血群の保存第1週で、赤血球の障害が大きく、全赤血球量の29%におよぶことがわかった。これは生理的に体内で、起るであろう老化に基づく排除赤血球量を凌ぐもので、採血および保存環境の変化(保存液および温度がその主なものと考えられる)が重大な影響をおよぼしていると思われる。

保存第2週では、この溶血量は22%となり、むしろ減少を示す。これは前記の諸原因にもとづく障害が、すべて非可逆的なものではなく、自力で回復し得る可逆的部分を含むことを示している。同時に糖代謝の指標としての乳酸+ピルビン酸値は、著しい増加を示し、糖代謝が活発に働いてATPを産生し、細胞膜の障害を修復して^{28,29)}、赤血球の浸透圧抵抗を強めていることが予想される。

保存第3週と第4週では、0.8%浸透圧抵抗は第2週と変化はない。しかし、その内容は決して静止状態ではなく、各濃度食塩水での溶血分画を見ると脆弱赤血球量が増加しているのを認める。この間の糖代謝は第1週に比べて不活発であるが(図7)、乳酸対ピルビン酸比(図8)では保存第3週で最も大きく乳酸の蓄積を示すが、保存第4週では急激に下降して逆に乳酸よりピルビン酸への移行が想像される。乳酸よりピルビン酸への移行は、乳酸脱水素酵素の存在のもとで $\text{NAD} \rightarrow \text{NADH}_2$ と共転して NADH_2 を増加させる。 NADH_2 は MetHb 還元酵素 I と共転して、MetHb をヘモグロビンに還元する³¹⁾ので、このピルビン酸の増加からは、ヘモグロビンが NADH_2 を必要とする状態にあるのではないと思われる。

さらに、保存第3、4週では、乳酸+ピルビン酸値がわずかながら低下していることを認める。この嫌気性解糖の終産物の減少は、好気性解糖系での消費も考えられ、これは白血球や血小板での消費も関係があると考えられる。

保存第5週では、乳酸対ピルビン酸比は、なお低値ながらピルビン酸は増加して乳酸+ピルビン酸値の増加を認める。

保存第6週では、乳酸+ピルビン酸値の減少と乳酸対ピルビン酸比の増加がある。ピルビン酸量は減少しているが、それに見合った乳酸の増加がなく、他の系での消費が考えられる。以上が静脈血群の保存中の変化である。

つまり、静脈血群では採血による赤血球の障害が大きく、またヘモグロビンの変性が起りやすいため還元系が動員されると考えた。

つぎに酸素加血群について見ると、0.8%濃度食塩水赤血球浸透圧抵抗は静脈血群をコントロールとして、比較した場合、保存第1週で14%と低く障害が少ないことを示すが、保存第2週で35%となり、障害が遅れて増加してゆくのが認められる。しかし、保存第3週では22%とまた減少しており、障害の回復を思わせる。以後保存第6週までは著変を認めない。

糖代謝の面からの変化は、乳酸+ピルビン酸値では、保存第2週までの急増のあと第4週までは減少し、ついで第5週で増加のあと再び第6週で減少するなど増減がはげしい。

一方、乳酸対ピルビン酸比を見ると、保存第2週以後の低下があり、これはピルビン酸の蓄積によるものである。

また赤血球の各濃度食塩水に対する溶血分画は、コントロールに比し脆弱赤血球が増加している。これは赤血球膜の抵抗減弱で明らかに酸素加が原因と考えられる。

つまり酸素加血群では、静脈血群に比して、赤血球膜の障害が大きく同時にピルビン酸の蓄積を認めた。しかし、膜の障害があるにもかかわらず血漿遊離ヘモグロビン量が少なかった。この原因が酸素加にある事は明かでヘモグロビンの変性が起り難いという利益を求めて酸素加を行なったのが反面膜の障害という不利益をもたらしたといえよう。

ここで赤血球膜の酸化による障害について調べて見ることにする。

Jandl ら³⁰⁾は1962年に赤血球の—SH 基の酸化の影響について発表し、膜の—SH 基がその細胞の寿命に重要な意味をもつことを述べ、さらに赤血球形態と寿命は原則的に赤血球膜の—SH 基に依存し赤血球内部の—SH 基や細胞の代謝によるものでないことを、PMD (p-mercuri benzoate) と NEM (N-ethyl-maleimide) で細胞内外の—SH 基を阻止した実験で示している。

著者は赤血球膜の—SH 基だけが赤血球寿命に関与しているものでないことを、赤血球膜の障害の認められた酸素加血や、—SH 基をブロックし

て保存した塩オキソフェナルシン添加酸素加血での輸血後赤血球寿命が、静脈血のそれと差がなく、むしろ酸素加血ではやや延長していたことにより認めている⁶⁾。

また Kann ら⁸⁶⁾は、1968年に発作性夜間血尿症患者の赤血球の溶血が、還元グルタチオン添加により減少することや、形態変化も正常に保ちメトヘモグロビン形成時間も延長することを認めている。

著者も酸素加還元グルタチオン添加 ACD 保存血の輸血後赤血球寿命が、静脈 ACD 保存血に比し、約2倍の延長を認めたことから、還元グルタチオンの保存赤血球膜に与える影響を分析して見た。

結果は静脈 GSH 血群、酸素加 GSH 血群ともに、0.8%濃度食塩水浸透圧抵抗で見ると3週間までは抵抗が強くなっている(図1, 2)。さらに各濃度食塩水に対する溶血分画を見ると、還元グルタチオンの膜保護作用が、酸素加 GSH 血群で著明であることを認める。

糖代謝では、峰島⁸⁸⁾が溶血せしめた血液を用いて、還元グルタチオンがヘキソキナーゼの活性を92.2mg/dl 濃度で15%亢めることを示しているが、本実験では添加還元グルタチオンは、乳酸+ピルビン酸値で見ると、静脈血群ではむしろ抑制している。一方、酸素加 GSH 血群では、糖代謝は亢進している。

この亢進は保存第1週と第5週に認められ、特に第5週で強い。また糖代謝終産物の減少も著明で、これは第3週で認められた。

つまり還元グルタチオンには赤血球膜酸化防止作用としての直接作用の他に、細胞内にも作用して代謝に影響を与えるものも考えられる。

結語

ウサギ血液を用いて静脈 ACD 液保存血、静脈還元グルタチオン添加 ACD 液保存血、酸素加赤血球 ACD 液保存血、酸素加赤血球還元グルタチオン添加 ACD 液保存血を作成して、その6週間保存中の溶血と赤血球抵抗、乳酸およびピルビン酸値の変動を検討した。

1) 溶血は、保存血中に酸素ガスを送入しない状態では酸素加血および酸素加還元グルタチオン添加血で少なく、ついで、静脈還元グルタチオン添加血、静脈血の順であった。

2) 赤血球浸透圧抵抗では、静脈血は経時的に抵抗値が弱まるのに反し、他群では、むしろ初めより抵抗が減弱している。0.8%濃度食塩水抵抗や各濃度食塩水溶血分画で、還元グルタチオンが抵抗の減弱した赤血球を減少させるのを認めた。また酸素加は、赤血球の脆弱性を増加して浸透圧抵抗を弱めた。

3) 糖代謝の動態を知るため代謝終産物である乳酸およびピルビン酸を見た。

還元グルタチオンは静脈 GSH 血群で代謝抑制を示した。また、酸素加 GSH 血群で保存第3週目の代謝終産物の減少を認め、赤血球代謝面で新しい問題を提起した。

本実験の機会を与えて下さった恩師の 楠原仟教授に深謝する。

また、数々のご助言とご校閲を賜った生化学教室の松村義寛教授、教室の林久恵教授ならびに千葉智世教授に感謝する。

文献

- 1) Marks, P.A.: Effect of age on the enzyme activity in erythrocytes, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **44**: 529—536, 1958.
- 2) Gabrio, B.W. & Finch, C.A.: Erythrocyte preservation I The relation of the storage lesion to *in vivo* erythrocyte senescence, *J. Clin. Invest.*, **33**: 242—246, 1954.
- 3) Nakao, K., Nakao, M., et al.: A direct relationship between Adenosine Triphosphate-level and *in vivo* viability of erythrocytes, *Nature*, **194**: 877—878, 1962.
- 4) 中尾 真: 赤血球膜と溶血, 代謝, **4**: 154—161, 1967.
- 5) 水上茂樹: 赤血球の膜透過性, 代謝, **5**: 308—313, 1968.
- 6) 川田高俊: 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, 日本輸血学会雑誌, **17**: 33—44, 1969.
- 7) 佐瀬クララ: ヒトヘモグロビン溶液の酸素化の可逆性について, 東京女子医科大学雑誌, **35**: 302—306, 1965.

- 8) Brooks, J.: Oxydation of haemoglobin to methemoglobin by oxygen, *J. Physiol.*, **107**: 332—335, 1948.
- 9) 金井 泉: 臨床検査法提要, 金原出版, 東京, 1965.
- 10) Creed, E.F.F.: The estimation of the fragility of red blood corpuscles, *J. Path. & Bact.*, **46**: 331—340, 1938.
- 11) Daice, J.V. & Vaughan, J.M.: The fragility of the red blood cells, Its measurement and significance, *J. Path. & Bact.* **46**: 341—356, 1938.
- 12) Cassels, D.A.K.: Red cell fragility in various blood conditions, *J. Path. & Bact.*, **47**: 603—614, 1938.
- 13) Emerson, G.P. Jr., Shen, S.C., Ham, T.H., Fleming, E.M., Castle, W.B.: Studies on the destruction of red blood cells, *Arch. Int. Med.*, **97**: 1—38, 1956.
- 14) 藤井暢三: 生化学実験法 (定量篇). 南山堂, 12版, 1968. 385—387.
- 15) 石井 暢: 乳酸比色定量法, 医学と生物学, **16**: 317, 1950.
- 16) Barker, S.B. & Summerson, W.H.: Colorimetric determination of lactic acid in biological material, *J. Biol. Chem.*, **138**: 535—554, 1941.
- 17) Koenemann, R.H.: Modification of Miller-Muntz method for colorimetric determination of lactic acid, *J. Biol. Chem.*, **135**: 105—109, 1940.
- 18) Miller, B.F. & Muntz, J.A.: Method for estimation of ultramicro quantities of lactic acid. *J. Biol. Chem.*, **126**: 413—421, 1938.
- 19) 藤井暢三: 生化学実験法 (定量篇) 南山堂, 12版 1968, 413—421.
- 20) 清水泰二: 焦性葡萄糖酸比色定量の新改良法, 生化学, **22**: 108, 1950.
- 21) 清水泰二: 血液及び尿中 α -Keto 酸 (1) 焦性葡萄糖酸および α -Ketoglutar 酸定量法, 医学と生物学, **17**: 102, 1950.
- 22) Friedemann, T.E. & Haugen, G.E.: Pyruvic acid; Collection of blood for determination of pyruvic and lactic acids, *J. Biol. Chem.*, **144**: 67—77, 1942.
- 23) Friedemann, T.E. & Haugen, G.E.: Pyruvic acid; Determination of Keto acids in blood and urine, *J. Biol. Chem.*, **147**: 415—442, 1943.
- 24) Lu, G.D.: Studies on metabolism of pyruvic acid in normal and vitamin B-deficient states; Rapid, specific and sensitive method for estimation of blood pyruvate, *Biochem. J.*, **33**: 249—254, 1939.
- 25) Passow, H.: Ion and water permeability of the red blood cell; In the Red Blood Cell, Edited by Bishop, C. & Surgenor, D.M. New York and London, 124—145, 1964 Academic Press.
- 26) Weed, R.I. & Reed, C.F.: Membrane alteration leading to red cell destruction, *Amer. J. Med.* **41**: 681—698, 1966.
- 27) Carson, P.E., Flanagan, C.L., Ickes, C.E. & Alving, A.S.: Enzymatic deficiency in primaquine-sensitive erythrocytes, *Science*, **124**: 484—485, 1956.
- 28) Weed, R.I. & Bowdler, A.J.: Metabolic dependence of the critical hemolytic volume of human erythrocytes; Relationship to osmotic fragility and autohemolysis in hereditary spherocytosis and normal red cells, *J. Clin. Invest.*, **45**: 1137—1149, 1966.
- 29) Tosteson, D.C. & Hoffmann, J.F.: Regulation of cell volume by active cation transport in high and low potassium sheep red cells, *J. Gen. Physiol.*, **44**: 169—194, 1960.
- 30) Jacob, H.S. & Jandl, J.H.: Effects of sulfhydryl inhibition on red blood cells; I Mechanism of hemolysis, *J. Clin. Invest.*, **41**: 779—792, 1962.
- 31) 杉田良樹: 酸化還元, 代謝, **7**: 646—652, 1970.
- 32) 宮地隆興: ヘモグロビンと膜安定性, 代謝, **7**: 660—668, 1970.
- 33) 峰島靖代: 血液保存と糖消費系の安定性 (1). 赤血球ヘキソキナーゼ活性, 生化学, **31**: 475—481, 1959.
- 34) Berlin, N.I.: Life span of the red cell; In the Red Blood Cell, Edited by Bishop, C. & Surgenor, D.M. New York and London, 423—450, 1964 Academic Press.
- 35) 倉科周介: 赤血球膜と溶血, 血液と脈管, **2**: 515—521, 1971.
- 36) Kann, H.E. Jr., Mengel, C.E., Meriwether, W.D. & Ebbert, L.: Production of *in vitro* lytic characteristic of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria erythrocytes in normal erythrocytes, *Blood*, **32**: 49—58, 1968.