多糖類による赤血球集合現象

一代用血漿の問題点—

清 家 雅 彦

愛媛大学医学部生理学第二 (指導者: 志賀 健)

(昭和63年 3 月23日受付)

EFFECT OF PLASMA SUBSTITUTES ON THE VELOCITY OF ERYTHROCYTE AGGREGATION

Masahiko Seike

Department of Physiology, School of Medicine, Ehime University, Shigenobu, Onsen-gun, Japan 791-02

The effect of plasma substitutes composed of polysaccharides on the velocity of erythrocyte aggregation was examined with a rheoscope combined with a video camera, an image analyser and a computer, and the mechanism of polysaccharide-induced erythrocyte aggregation was studied.

1) Dextran (Mw 40,000 and Mw 70,000) and hydroxyethyl starch (Mw 200,000) in plasma substitutes increased the velocity of erythrocyte aggregation in 60% diluted plasma. The accelerating effect was marked in the high molecular weight dextran. The accelerating effect by dextran was less in glucose than in saline or lactate Ringer's solution.

2) The velocity of erythrocyte aggregation became maximum at an optimal concentration of dextran. The optimal concentration was lower in higher molecular weight dextran, but was not affected by shear rate.

3) The aggregation induced by high molecular weight dextran (Mw 70,400) was inhibited by low molecular weight dextrans (Mw 43,900 and Mw 10,300), disaccharides (sucrose, maltose and isomaltose) and glucose. The aggregation induced by fibrinogen, IgG and plasma was affected by low molecular weight dextrans.

4) The aggregation induced by pullulan (Mw 70,000; linear polysaccharide) was more marked than that induced by dextran (Mw 70,400; branched polysaccharide).

5) The mechanism of polysaccharide-induced erythrocyte aggregation was discussed, and the suitable prescription for plasma substitutes was proposed from the rheological point of view.

I. 序 言

赤血球集合は、血流速度が極度に低下したような領域で赤血球同士が血漿中の高分子タンパク、特に fibrinogen や免疫グロブリンを架橋物質として接着する現象である^{1)~5)}。赤血球の集合形成が著しくなると、sludge を形成したり血液粘度が上昇する⁶⁾ことにより循環障害をひきおこす⁷⁾⁸⁾。しかしこの集合現象は可逆的であり、血流速度が大きくなると離散する⁹⁾¹⁰⁾。したがって、赤血球集合現象の解析には種々の方法があるが¹⁾、単位時間当りどの程度赤血球集合が進行するかが末梢循環の状態を評価する上で重要である。

臨床上赤血球集合に関連して問題になるのは各種のショックにおける低血流状態 (血流の渋滞)、fibrinogen や免疫グロブリンおよび病的グロブリンの増加を伴う疾患⁷⁾⁸⁾、および多糖類 (代用血漿として) や免疫グロブリン製剤の静注などである¹¹⁾¹²⁾。現在、循環血漿量を維持または増量する目的で人血漿製剤が多く使用されているが、血漿製剤の不足、経済的な問題、各種感染症発生の危険といった問題点がある^{13)~15)}。したがって人工的な代用血漿で対応できる場合には、可能な限りこれを使うことがすすめられている。こういった現状から、現在市販されている代用血漿の血液レオロ

ギーに対する影響，特に微小循環に大きな影響を与える赤血球集合現象について十分な検討を加えることは重要である。

本研究では、(1)多糖類から成る各種代用血漿製剤の赤血球集合に対する影響を検討し、さらに糖類による赤血球集合のメカニズムを明らかにする目的で、赤血球の集合現象を画像処理方法を用いて定量的に測定した。そして、(2)多糖類の分子量、濃度および化学構造と赤血球集合との関係、(3)多糖類による赤血球集合とずり速度との関係、(4)赤血球集合形成作用のない低分子の糖類による赤血球集合の抑制効果、(5)fibrinogen および IgG による赤血球集合形成に及ぼす低分子多糖類の影響について調べた。

II. 実験材料と方法

(1) 赤血球の調製

健康な成人男子の肘静脈から採血後ヘパリン処理(血液1ml 当り10単位添加)、4℃で3000rpm、5分間遠心して血球と血漿に分離した。血漿および buffy coat を除外した後、赤血球は等張リン酸緩衝化食塩水 (50mM Na-phosphate, 90mM NaCl, 5mM KCl, pH7.4; 285mOsm) に5mM glucose を加えた液で2回洗浄し、採血後5時間

以内に用いた(この時間内では赤血球形態、ATP 含有量には変化はみられず、集合体形成速度にも有意な差はみられなかった)。

ABO 各種血液型の赤血球について dextran による赤血球集合体形成を検討したが、その速度および形態に差は認められず、以後の実験はすべて O 型 (Rh 陽性) の赤血球を用いて行った。

(2) メディウムの調製

1) 希釈血漿：分離された血漿はさらに4℃で15000rpm、15分間遠心して血小板を除去した。代用血漿製剤の影響をみる実験では、生理食塩水で濃度を変えた代用血漿製剤40%に対して血漿60%の割合で混合し、乳酸によって pH を調節した。他の実験では、低分子多糖類の等張リン酸緩衝化食塩水溶液30%に対して血漿70%の割合で混合した。

2) 人工のメディウム：等張リン酸緩衝化食塩水 (pH7.4) に各種の多糖類, fibrinogen, immunoglobulin G (IgG) を溶解して用いた。glucose や二糖類などの低分子糖類を添加したときのメディウムの浸透圧は NaCl の量によって等張に調節した。なお、測定にあたりレオスコープ装置⁹⁾¹⁰⁾のガラス板に対する赤血球の粘着を防止す

Table 1. Composition of plasma substitutes and their effect on the erythrocyte aggregation in plasma

Preparation No.	Composition of plasma substitutes		Erythrocyte aggregation in diluted plasma ^a		
	Polysaccharide	Medium	V _{max} /V ₀	Volume % of plasma substitute	
				at V _{max}	at V _s /V ₀ =2
1.	Dextran (Mw ^b =70,000, 6 g/dl)	NaCl (0.9 g/dl)	3.2	10	4
2.	Dextran (Mw =70,000, 6 g/dl)	Glucose (5 g/dl)	2.5	10	7
3.	Dextran (Mw =40,000, 10 g/dl)	NaCl (0.9 g/dl)	1.4	10	—
4.	Dextran (Mw =40,000, 10 g/dl)	NaCl (0.6 g/dl) KCl (0.03 g/dl) CaCl ₂ (0.02 g/dl) Na lactate (0.31 g/dl)	1.7	10	—
5.	Dextran (Mw =40,000, 10 g/dl)	Glucose (5 g/dl)	1.4	6	—
6.	Hydroxyethyl starch (HES) (Mw=200,000, 6 g/dl)	NaCl (0.9 g/dl)	3.8	20	3
7.	Hydroxyethyl starch (HES) (Mw=30,000-40,000, 6 g/dl)	NaCl (0.5 g/dl) KCl (0.03 g/dl) CaCl ₂ (0.02 g/dl) Na lactate (0.224 g/dl) Glucose (1 g/dl)	1.0	—	—

a. Measured at pH 7.7 and 25℃: V₀, the velocity of erythrocyte aggregation in 60% autologous plasma+40% 0.9 g/dl NaCl (diluted plasma); V_s, the velocity in the presence of plasma substitute; V_{max}, the maximal velocity in the presence of plasma substitute; All values from Fig. 2.
b. Mw: weight average molecular weight.

るために、メディウムには4.0~5.0g/dlのalbuminを添加した。

(3) 代用血漿製剤および各種高分子化合物

1) 代用血漿製剤：実験に用いた市販のdextran製剤（5種）およびhydroxyethyl starch (HES) 製剤（2種）をTable 1に示す。

2) 高分子試薬：多糖類としてDextran T10 (Mw 10,300), Dextran T40 (Mw 43,900), Dextran T70 (Mw 70,400), Dextran T500 (Mw 494,000)（以上Pharmacia社製, Uppsala Sweden）およびpullulan (Mw 70,000, 林原生物化学研究所)を用いた。fibrinogenはhuman fibrinogen (Grade L, 90% clottable; AB-Kabi社製, Stockholm, Sweden)をlysine-Sepharose 4Bカラムを通し試料中のplasminogenおよびplasminを除去してから用いた¹⁶⁾。IgGはhuman IgG (Miles Lab. 社製, Naperville, USA), albuminはhuman albumin (fatty acid free, Fraction V; Miles Lab. 社製, Naperville, USA)を用いた。

(4) 赤血球集合体形成速度の測定

レオスコープ(0.8°透明円錐—平板型粘度計, 恒温ステージ付¹⁷⁾倒立顕微鏡とを組み合わせたものに画像処理装置(東洋インキ社製, Luzex 450)とコンピューター(Hewlett-Packard社製, HP-85)を接続した装置を用いて解析した(Fig. 1)¹⁰⁾。洗浄赤血球を種々のメディウムに浮遊させ、レオ

スコープ装置の透明円錐とガラス平板間に注入した。この装置では、透明円錐とガラス平板間のどの位置においてもずり速度は一定である（ずり速度：流れの中のある点から流れと垂直方向に微小距離 Δx cm離れた点での流速の変化を Δv cm/secとしたとき、ずり速度は $\Delta v/\Delta x$ sec⁻¹またはs⁻¹となる）。なお、実験の精度および再現性を高めるため最終ヘマトクリット0.26%, 温度25℃でおこなった。一定のずり速度下でおこる赤血球集合体形成の経時的変化を顕微鏡下に約8分間観察する。同時に集合体形成速度を測定するために画像処理装置にて画像を二値化し、顕微鏡下の一定枠(150×200 μm^2)内の粒子(単独の赤血球および集合体)の数と粒子の全投影面積を約1.3秒毎にコンピューターに転送し、20秒間毎(15~16画面)の平均値±S. D.を計算させてその時間経過を記録させた。赤血球の集合体形成速度(v)は粒子の全投影面積/粒子数/時間($\mu\text{m}^2/\text{min}$)、すなわち単位時間あたり粒子1個の平均投影面積の増加で表現した。

(5) 赤血球集合体の形態

赤血球集合体形成速度を測定すると同時に一定ずり速度下、一定時間後に形成された赤血球集合体の光学顕微鏡写真を撮影し比較した。赤血球集合体の走査型電子顕微鏡による形態観察は次のような方法で行った。集合体が形成された時点で1% (v/v) glutaraldehyde 溶液を注入して固定

Fig. 1 Diagram of the apparatus for measuring the velocity of erythrocyte aggregation.

し、試料を等張リン酸緩衝化食塩水で2回洗浄した後さらに1% (w/v) オスミウム酸溶液で固定して走査型電子顕微鏡 (Hitachi, Model S-500A) で観察した。

(6) 粘度測定

各メディウムの粘度は、円錐平板型粘度計 (東京計器, E 型) を用いて温度25℃で測定した。

(7) 統計学的検定は Student の *t* test により行った。

III. 結 果

1. 代用血漿製剤による赤血球集合体形成

60%希釈血漿中に各種代用血漿製剤を種々の濃度で含むメディウム中での赤血球集合体形成速度を Fig. 2 に示す。また Table 1 には60%希釈血

Fig. 2 Effect of plasma substitutes on the erythrocyte aggregation. The velocity of erythrocyte aggregation was measured in 60% autologous plasma + 40% plasma substitutes and/or 0.9g/dl saline, at a shear rate of $7.5s^{-1}$ at 25℃ (pH7.7, Ht=0.26%). Plasma substitutes used were dextran (Mw 70,000) in 0.9g/dl saline (○), dextran (Mw 70,000) in 5.0g/dl glucose (●), dextran (Mw 40,000) in 0.9g/dl saline (△), dextran (Mw 40,000) in lactate Ringer's solution (△), dextran (Mw 40,000) in 5.0g/dl glucose (▲), hydroxyethyl starch (HES, Mw 200,000) in 0.9g/dl saline (■) and HES (Mw 30,000–40,000) in lactate Ringer's solution containing 1.0g/dl glucose (□). Detailed composition in Table 1. The velocity in 60% plasma (60% autologous plasma + 40% saline; control medium) was $6.0 \pm 0.7 \mu m^2/min$ (mean $\pm$ SD; $n=11$) (—○—).

漿中で集合体形成速度が最大および2倍となるのに要する代用血漿添加量を示した。赤血球集合体形成の促進が分子量3～4万のHES製剤を除く他の代用血漿製剤にみられた。集合体形成速度と添加された多糖類の濃度との関係はすべてベル型を呈し、多糖類の濃度を増すと集合体形成速度が増すが、ある濃度で最大となりそれ以上濃度を増すと速度は低下した。

集合体形成速度が最大となる多糖類の濃度は分子量が大きい多糖類ほどより低濃度であり、分子量20万のHES製剤で $6 \times 10^{-5} M$ (1.2g/dl), 分子量7万のdextran製剤で $9 \times 10^{-5} M$ (0.6g/dl), 分子量4万のdextran製剤で $2 \sim 3 \times 10^{-4} M$ (~ 1.0 g/dl)であった。また集合体形成速度の最大値は分子量の大きいものほど大きかった。しかし、速度が最大値となるときの代用血漿添加量 (Table 1) は60%血漿に対して分子量20万のHES製剤が20%, その他の製剤で6～10%であった。

glucoseを含むものでは単に生理食塩水や乳酸リンゲル液のものとは比べて集合体形成の促進作用は小さく、製剤が高濃度になると60%血漿中での集合体形成速度以下になった。60%血漿中で集合体形成速度が2倍となるときの代用血漿添加量 (Table 1)は、分子量20万のHES製剤で最も少なく集合体を形成しやすいことを示している。

2. 多糖類による赤血球集合

各種代用血漿製剤による赤血球集合の特異な促進作用およびglucoseによる抑制効果についてそのメカニズムを検討する目的で、人工のメディウム (albumin 加リン酸緩衝化食塩水) に各種多糖類ならびに低分子糖類を添加して赤血球集合体形成速度に対する影響を詳細に検討する。

(1) 多糖類の分子量および濃度依存性

分子量1万～50万の各種dextranを用いて種々の濃度で赤血球集合体形成速度を $7.5s^{-1}$ のずり速度下で測定した結果を Fig. 3 に示す。Dextran T10では集合体形成はみられず、Dextran T40, T70およびT500で集合体形成がみられた。集合体形成速度のdextran濃度依存曲線はいずれもベル型を呈し、集合体形成速度が最大となるdextranの濃度は分子量が大きいほど小さく

Fig. 3 Relation of the velocity of erythrocyte aggregation to the concentration of various dextrans with different molecular weight. The velocity (mean $\pm$ SD; $n=3-6$) was measured at a shear rate of 7.5 s^{-1} at 25°C : Dextran T500 ($\square$), Dextran T70 ($\circ$), Dextran T40 ($\triangle$) and Dextran T10 ($\blacktriangle$) in isotonic phosphate-buffered saline containing 4.0 g/dl albumin ($\text{pH}7.4$).

(T40が $7 \times 10^{-4}\text{ M}$ ($\sim 3.0\text{ g/dl}$), T70が $3 \times 10^{-4}\text{ M}$ ($\sim 2.0\text{ g/dl}$), T500が $3 \times 10^{-5}\text{ M}$ ($\sim 1.5\text{ g/dl}$)), 速度の最大値は分子量が大きい dextran ほど大であった。

形態学的には、赤血球集合は一次元的集合体に

始まり続いて三次元的集合体に移行するが、その時間的経過は多糖類の濃度と分子量に依存していた。dextran の分子量が大きくなるにつれて三次元的集合体への移行が速く、Dextran T70では一次元的集合体形成の期間が Dextran T500 よりもより長かった。集合体の走査型電子顕微鏡写真では、Dextran T500 の場合は三次元的集合体が球状に圧縮されたような形態であった (Fig. 4)。

(2) ずり速度依存性

多糖類による赤血球集合体形成速度のずり速度依存性を Fig. 5 に示す。いずれの多糖類においてもずり速度を増すと集合体形成速度は低下した。ずり速度を増すとずり応力 (= ずり速度 $\times$ 粘度) すなわち解離力が増加するので赤血球集合は抑制される。

さらにベル型の特徴的な濃度依存性パターン、特に集合体形成速度が最大値を示す濃度のずり速度依存性について調べた。その結果集合体形成速度が最大となる dextran の濃度はずり速度を変えても変化しなかった (Fig. 6)。

(3) 化学構造依存性

glucose を構造単位とし化学構造の異なる分子量 7 万の dextran と pullulan を用いて赤血球集合体形成速度を比較した (Fig. 7)。pullulan の場合も dextran と同様に濃度に依存したベル型パターンを呈し、集合体形成速度が最大となる濃度

Fig. 4 Scanning electron micrographs of the erythrocyte aggregation formed by various macromolecules: (a) formed in 70% autologous plasma + 30% isotonic phosphate-buffered saline; (b) formed by Dextran T500 (Mw 494,000); (c) formed by Dextran T70 (Mw 70,400).

Fig. 5 Shear rate dependency of the velocity of dextran-induced erythrocyte aggregation. Measured in isotonic phosphate-buffered saline containing 4.0g/dl albumin (pH7.4). Dextrans used: 1.5g/dl Dextran T500 (□), 1.5g/dl Dextran T70 (○) and 3.0g/dl Dextran T40 (△).

Fig. 6 Concentration dependency of the velocity of dextran-induced erythrocyte aggregation at various shear rates. Measured in isotonic phosphate-buffered saline containing 4.0g/dl albumin at 25°C at the shear rate of 5.0s⁻¹ (---), 7.5s⁻¹ (—), 11.2s⁻¹ (---) and 15.0s⁻¹ (—·—); Dextran T500 (□), Dextran T70 (○), Dextran T40 (△) and Dextran T10 (▲).

は dextran の場合とほぼ同じであった。しかし集合体形成速度はいずれの濃度においても dextran に比べて有意に大きかった ($p < 0.001$)。

Fig. 7 Effect of dextran and pullulan on the velocity of erythrocyte aggregation. The velocities (mean $\pm$ SD; $n=3-5$) were measured in phosphate-buffered saline containing 4.0g/dl albumin at a shear rate of 7.5s⁻¹ at 25°C (pH7.4): Dextran T70 (Mw70,400) (○), pullulan (Mw 70,000) (●).

(4) 低分子糖類の抑制作用

Dextran T70 (1.5g/dl) による集合体形成に及ぼす単糖類 (glucose), 二糖類 (sucrose, maltose, isomaltose) および低分子多糖類 (Dextran T10, T40) の影響を Fig. 8 に示す。いずれの低分子糖類も Dextran T70 による集合体形成を抑制した (実線)。しかし、これら糖類の添加はメディウムの粘度を上昇させ、ずり応力 (= ずり速度 $\times$ 粘度) を増すことによって集合形成に抑制的に作用する。そこで糖類添加によって粘度を上昇させるかわりにそれにあった分だけずり速度を増して (したがってずり応力は同じ) 集合体形成速度を測定した結果も示した (Fig. 8, 点線)。Dextran T70 による著明な集合体形成 (三次元的集合体) は Dextran T40 の添加によって明らかに抑制され、集合体は小さくなっている (Fig. 9)。

3. 血漿タンパクによる赤血球集合に及ぼす低分子多糖類の影響

fibrinogen, IgG および 70% 希釈血漿による赤血球集合に対して、高分子多糖類による赤血球集合を抑制した低分子多糖類 (Dextran T40, Dex-

Fig. 8 Inhibitory effect of low molecular weight saccharides on the erythrocyte aggregation induced by 1.5g/dl Dextran T70. The low molecular weight saccharides used: Dextran T40 (●), Dextran T10 (○), sucrose (△), maltose (▲), isomaltose (▴) and glucose (■). The velocities (mean±SD, n=3-6; except n=1 for isomaltose) were measured in isotonic phosphate-buffered saline containing 4.0g/dl albumin at a shear rate of $7.5s^{-1}$ at 25°C (pH7.4). The osmolality of disaccharide and glucose-containing medium was adjusted by the concentration of NaCl. Dotted line shows the degree of inhibition due to the increased shear stress by added saccharides, which is determined from Fig. 5.

tran T10) がどのような影響を与えるかを調べた。結果を Table 2 に示す。

(1) fibrinogen による赤血球集合は Dextran T40 (1.0g/dl) の添加によって促進された ($p < 0.001$)。また, Dextran T10 (1.0g/dl) の添加によって赤血球集合は抑制された ($p < 0.001$)。

(2) IgG による赤血球集合は Dextran T40 (1.0g/dl) の添加によって促進された。しかし, fibrinogen の場合と異り Dextran T10 (1.0g/dl) の添加は IgG による赤血球集合にほとんど影響を与えなかった。

(3) 70%希釈血漿中での集合体形成は Dextran T40 (1.0g/dl) の添加によって促進され ($p < 0.001$)、450秒後に形成された集合体(連鎖, rouleau)は70%希釈血漿中のものに比べて長くなっていた (Fig. 10)。Dextran T10 (1.0g/dl) を添加すると集合体形成は抑制された ($p <$

0.001)。

IV. 考 察

人工の代用血漿は出血に対する応急的処置, ショックの治療, 末梢循環改善などを目的として現在用いられている。人工の代用血漿は血液製剤に比べて経済的に安価であること, 感染症の危険がないことなど利点があるが¹³⁾¹⁴⁾, 注意して使用しなければ循環不全をひきおこす可能性がある。すなわち低血流域とくに血流が滞っている領域でおこる赤血球集合現象が問題であり¹¹⁾¹⁸⁾¹⁹⁾, これが著しくなると sludge を形成したり血液粘度が上昇して循環障害が生じる。本研究では, 現在市販されている代用血漿 (dextran および HES 製剤) の赤血球集合に及ぼす影響を定量的に測定し, これら多糖類による赤血球集合のメカニズムについて詳細な検討を加えた。

1. 多糖類による赤血球集合の特徴

Fig. 9 Inhibitory effect of low molecular weight dextran on the erythrocyte aggregation induced by high molecular weight dextran. (a) Microphotograph of aggregates induced by 1.5g/dl Dextran T70 (at a shear rate of 7.5s^{-1} at 25°C , pH7.4) after 300s. (b) Microphotograph of aggregates induced by 1.5g/dl Dextran T70 in the presence of 4.0g/dl Dextran T40 after 450s under the same condition.

Fig. 10 Accelerating effect of low molecular weight dextran on the rouleau formation in plasma. (a) Rouleaux in 70% autologous plasma + 30% isotonic phosphate-buffered saline. (b) Rouleaux in 70% plasma containing 1.0g/dl Dextran T40. Microphotographs are taken after 450s at a shear rate of 7.5s^{-1} , at 25°C and at pH7.7.

Table 2 Effect of low molecular weight polysaccharides on the erythrocyte aggregation

Medium	Velocity of erythrocyte aggregation ($\mu\text{m}^2/\text{min}$) ^a		
	without dextran	with 1.0 g/dl Dextran T40	with 1.0 g/dl Dextran T10
0.2 g/dl fibrinogen+5 g/dl albumin	$3.3\pm0.7(n=10)$	$9.9\pm1.5(n=4)^*$	—
0.4 g/dl fibrinogen+5 g/dl albumin	$19.4\pm1.1(n=10)$	$25.5\pm1.2(n=4)^*$	$14.5\pm1.9(n=3)^*$
0.2 g/dl IgG+5 g/dl albumin	1.0 (n=2)	6.6 (n=2)	—
0.4 g/dl IgG+5 g/dl albumin	10.9 (n=2)	29.6 (n=2)	11.0 (n=1)
70% plasma+30% isotonic phosphate-buffered saline	$17.1\pm0.3(n=6)$	$27.4\pm1.2(n=5)^*$	$12.8\pm0.2(n=3)^*$

a. The velocity was measured at a shear rate of 7.5s^{-1} at 25°C (in isotonic phosphate-buffered saline, except for 70% plasma). Values are mean $\pm$ SD (except for those in the experiments of IgG).

b. The velocities of erythrocyte aggregation by low molecular weight polysaccharides were $0.7\pm0.1\mu\text{m}^2/\text{min}$ (n=4) and $0\mu\text{m}^2/\text{min}$ in 1.0 g/dl Dextran T40 and 1.0 g/dl Dextran T10, respectively

* Statistically significant ($p<0.001$, Student's t test), when the velocity was compared with that without dextran.

高分子化合物によって赤血球同士が接着する過程について、Chien and Jan は次のように説明している²⁰⁾。すなわち 2 個の赤血球はその表面のシアル酸を主とする陰性荷電によって互いに反発しあっているが、この 2 個の赤血球間を架橋する高分子が十分に大きくてこの静電反発力の影響を受けないか、あるいは打ち勝つときに赤血球間に部分的な接着が成立する。このような限られた部分の接着は次の高分子による架橋をうながし、赤血球の柔軟性がこの架橋を助け、2 個の赤血球間に最大接触面積を得るように接着が進むという。したがって新鮮な赤血球を用いる限りにおいては、赤血球集合は高分子化合物による赤血球間の架橋力とこれを切り離そうとする力（赤血球間の静電反発力と物理的なずり応力）とのバランスの上に成り立つ。

(1) 多糖類の分子量：多糖類による赤血球集合は分子量が大きくなるにつれて著しくなる。分子量 4 万の多糖類でも赤血球集合はみられるが、それ以下の分子量のものでは赤血球集合はおこらず、分子のサイズとして架橋の限界と考えられる。dextran 分子の長さは分子量 1 万、4 万、7 万、50 万のものでそれぞれ 160 Å, 350 Å, 500 Å, 1600 Å であり¹¹⁾²¹⁾、分子量が大きいほど長い。透過型電子顕微鏡によって観察された分子量 4 万、7 万、50 万の dextran によって架橋された赤血球間距離は、それぞれ 190 Å, 220 Å, 300 Å である²⁰⁾。すなわち、分子量の大きい dextran は赤血球表面との相互作用面積を増す（結合力を増す）だけでなく、赤血球面間の距離が長くなるので赤血球面間に働く静電反発力の影響が小さくなっている。

(2) 多糖類の濃度：多糖類の濃度を増すにつれて赤血球集合体形成速度は増すが、分子量に依存してある濃度で速度は最大となり、それ以上の濃度で速度は減少する。集合体形成速度が最大となる dextran の濃度は必ず速度を変えても変化しなかった。すなわち赤血球間の最大の架橋力は架橋分子の分子量に依存して一定の分子数（濃度）で得られ、ずり速度には依存しない。このことから集合体形成速度の濃度依存性曲線がベル型を呈する理由として次のような機序が考えられる

Fig. 11 A model of erythrocyte aggregation by polysaccharide in relation to their concentration. The aggregation increases, as the concentration of polysaccharide increases (left). At a certain optimal concentration of polysaccharide the aggregation becomes maximum, in where the number of bridging molecules between erythrocytes is maximum (middle). In high concentration of polysaccharide the number of binding molecules to the erythrocyte surface increases, but the number of bridging molecules between erythrocytes decreases, thus the aggregation decreases (right).

(Fig. 11). 多糖類の濃度を増すと赤血球表面に結合する多糖類の分子数が増加して²²⁾²³⁾架橋力が増大する。さらに濃度が増えると架橋する分子の一端の赤血球表面の結合部位に他の分子が結合し、このため赤血球表面に結合する分子数は増加するが架橋する分子数は減少して架橋力は低下する。

集合体形成速度の濃度依存性曲線がベル型を呈する他の原因として次のような機序も考えられる。すなわち、多糖類が高濃度になると赤血球表面に結合した多糖類分子によって占められる容積により溶液中のイオンが排除され（容積排除効果）、赤血球表面近くの局所におけるイオン強度が小さくなる。イオン強度が小さくなると赤血球表面の電気 2 重層の ζ 電位（ ζ 電位が大きいときはおよそ赤血球間の静電反発力が大きいと考えてよい）が大きくなって赤血球間に働く静電反発力が増大する²⁴⁾²⁵⁾。

以上のことから dextran による赤血球集合の

濃度依存性は、(i) 架橋分子数、(ii) 容積排除効果による赤血球間の静電反発力、(iii) メディウムの粘度（ずり応力）の変化によって解釈しなければならない。

(3) 多糖類の化学構造：糖類分子の化学構造、特に立体構造の異なる2種類の高分子、dextranとpullulanについて赤血球集合を比較した。dextranはglucoseが α -1.6 glycoside結合で連結された主鎖と α -1.4、 α -1.3、 α -1.2結合による側鎖とからなる枝分かれ構造をとっている²¹⁾²⁶⁾。他方pullulanは α -1.4および α -1.6結合からなりmaltotrioseが α -1.6結合で連結された直鎖構造をとり分枝はない²⁶⁾。同一分子量の場合、dextranのような分枝状分子よりもpullulanのような直鎖状の長い分子の方が赤血球集合をおこしやすい。この原因としては、pullulanの方が赤血球表面との相互作用面積が大きくて結合力が大きいこと、あるいは架橋する赤血球面間の距離が長くて静電反発力の影響が小さいことが考えられる。

(4) 低分子糖類による抑制

高分子の糖類による赤血球集合が低分子の糖類によって抑制される¹¹⁾²⁷⁾ことは臨床的には代用血漿をとり扱う上で興味深く、また多糖類による赤血球集合のメカニズムを調べる上でも有益な知見である。

低分子糖類は分子サイズが小さいために赤血球間の静電反発力に打ち勝って赤血球間を架橋することはできないが、高分子糖類と共通した性質をもっている。すなわち(i) 赤血球表面への結合部位：高分子および低分子糖類の基本単位はglucoseであり赤血球表面の結合様式は同じと考えられる。低分子糖類は赤血球表面に結合することによって、高分子糖類の架橋を障害し赤血球集合を抑制する（競合的結合障害）。(ii) 赤血球間静電反発力の増強作用：Dextran T10あるいはT40の場合は、容積排除効果による赤血球面間の局所有効イオン強度の減少により、静電反発力を増して赤血球集合を抑制する。また二糖類や単糖類の場合は、メディウムの浸透圧を等張にするため電解質濃度すなわちイオン強度を減少させているから赤血球間の静電反発力は増している²⁸⁾²⁹⁾。

(5) 各種血漿タンパクによる赤血球集合に対する低分子多糖類の影響：血漿タンパク特にfibrinogenやIgGは赤血球集合をひきおこす¹⁾²⁾⁴⁾⁵⁾。fibrinogenやIgGによる赤血球集合に対するDextran T40およびT10（これらは高分子多糖類による赤血球集合を抑制する）の影響を調べた結果、Dextran T10 (1.0g/dl) では抑制がみられたがDextran T40 (1.0g/dl) は逆に促進作用を示した。これらのメカニズムは不明であるが、fibrinogenやIgGの赤血球表面への結合部位と糖の結合部位とが異なるために、Dextran T40を添加した場合に赤血球間の架橋形成が強まって集合の促進がおこるのかもしれない。あるいは、血漿タンパクと多糖類が相互作用して複合体を形成し³⁰⁾³¹⁾、より大きい分子となることによってより強い赤血球集合をひきおこすことも考えられる¹⁸⁾。今回の実験で集合体形成速度が最大となる分子量4万のdextranの濃度が、dextran単独の場合（Fig. 3および6）に比べて血漿に添加した場合（Fig. 2）に低濃度側へ移動していることは、このことを示唆するものかもしれない。

2. 代用血漿の問題点

高分子多糖類の静注によって赤血球集合が著しくなることが知られている¹¹⁾¹⁸⁾¹⁹⁾。今回の実験でも、分子量7万以上の多糖類に著しい赤血球集合作用があることが示された。今回の実験結果から、代用血漿の使用あるいは将来の製剤について次のような点が指摘される。

(i) 多糖類の分子量と濃度：分子量7万以上の多糖類による赤血球集合は著しく、また分子量に応じて使用量には注意する必要がある。多糖類の濃度がある濃度以上になると赤血球集合作用は低下してくるが、血液粘度は上昇するので注意を要する。

(ii) 組成：メディウム中にglucoseなどの赤血球集合抑制効果をもつ低分子糖類が入っているものが好ましい。

(iii) 多糖類の化学構造：将来の代用血漿用の多糖類としては、同一分子量のものでも側鎖が多くて立体構造上より球形に近い分子が好ましい。

V. ま と め

多糖類を成分とする各種代用血漿製剤による赤血球集合現象を画像処理法を用いて定量的に測定するとともに、多糖類による赤血球集合のメカニズムについて検討した。

1) 代用血漿製剤に関しては分子量4万および7万の dextran 製剤、分子量20万の hydroxyethyl starch (HES) 製剤は60%希釈血漿中における赤血球集合体形成を促進した。この促進作用は分子量が大きい多糖類ほど著しかった。分子量3万～4万の HES 製剤は赤血球集合を促進しなかった。glucoseを含む代用血漿製剤では生理食塩水や乳酸リンゲル液の製剤と比べて集合体形成の促進作用が小さかった。

2) Dextran による集合体形成では、dextran の濃度を増すと集合体形成速度も増すが、ある濃度以上では速度は減少した。集合体形成速度が最大となる dextran の濃度は分子量の大きい dextran ほど小さかったが、ずり速度を変えても変化しなかった。

3) 高分子 dextran (Mw 70,400) による赤血球集合は低分子 dextran (Mw 43,900 および 10,300)、二糖類 (sucrose, maltose, isomaltose) および単糖類 (glucose) によって抑制された。低分子 dextran (Mw 43,900 : 1.0g/dl) は fibrinogen, IgG および70%希釈血漿による赤血球集合を促進した。

4) 分子量7万の dextran (分枝状構造) に比べて同一分子量の pullulan (直鎖状構造) の方が集合体形成が著しかった。

5) 以上の結果にもとづいて多糖類による赤血球集合のメカニズムについて考察するとともに、赤血球集合の点からみた適切な代用血漿について検討した。

謝辞：稿を終えるにあたり、御指導・御校閲を賜りました志賀 健教授ならびに本研究の機会を与えていただきました第1外科学教室河川謙吾教授に深甚なる感謝の意を表します。また終始適切な御指導・御助力をいただきました前田信治助教授、昆和典講師、関谷美鈴薬学士に深く感謝します。本研究の一部は文部省科学研究費補助金および愛媛県保健医療財団よりの助成金によって行われた。

References

- 1) Chien, S.: Biophysical behavior of red cells in suspensions. In: *The Red Blood Cell*, D.M. Surgenor (Ed.), Vol. 2(2nd edn.), Academic Press, New York, 1975, pp. 1031—1133.
- 2) Fåhræus, R.: The suspension-stability of the blood. *Acta Med. Scand.*, 55: 1—228, 1921.
- 3) Brånemark, P.-I. and Bagge, U.: Intravascular rheology of erythrocytes in man. *Blood Cells*, 3: 11—24, 1977.
- 4) Van Haeringen, N.J. and Glasius, E.: The relation between rouleaux formation in blood and fibrinogen content in plasma. *Clin. Chim. Acta*, 29: 55—60, 1970.
- 5) Imaizumi, K. and Shiga, T.: Effect of immunoglobulins and IgG-fragments on the human erythrocyte aggregation, studied by a rhescoscope combined with image analyzer. *Biorheology*, 20: 569—577, 1983.
- 6) Chien, S.: Shear dependence of effective cell volume as a determinant of blood viscosity. *Science*, 168: 977—978, 1970.
- 7) Wells, R.: Syndromes of hyperviscosity. *New Engl. J. Med.*, 283: 183—186, 1970.
- 8) Wintrobe, M.M.: *Clinical Hematology* (8th edn.), Lea & Febiger, Philadelphia, 1981, pp. 1732—1733.
- 9) Schmid-Schönbein, H., Wells, R. and Schildkraut, R.: Microscopy and viscometry of blood flowing under uniform shear rate (rheoscopy). *J. Appl. Physiol.*, 26: 674—678, 1969.
- 10) Shiga, T., Imaizumi, K., Harada, N. and Sekiya, M.: Kinetics of rouleaux formation using TV image analyzer. I. Human erythrocytes. *Am. J. Physiol.*, 245: H252—H258, 1983.
- 11) Thorsén, G. and Hint, H.: Aggregation, sedimentation and intravascular sludging erythrocytes. *Acta Chir. Scand., Suppl.*, 154: 1—50, 1950.
- 12) Maeda, N., Sekiya, M., Kameda, K. and Shiga, T.: Effect of immunoglobulin preparations on the aggregation of human erythrocytes. *Eur. J. Clin. Invest.*, 16: 184—191, 1986.
- 13) Messmer, K.F.W.: The use of plasma substitutes with special attention to their side effects. *World J. Surg.*, 11: 69—74, 1987.
- 14) Lowe, K.C.: Blood transfusion or blood substitution? *Vox Sang.*, 51: 257—263, 1986.
- 15) Wong, Y.Y., Abramowitz, P.W. and Mansur, J. M.: Changing use patterns of plasma volume expanders through educational intervention.

- Am. J. Hosp. Pharm., 44: 102—105, 1987.
- 16) Deutsch, D.G. and Mertz, E.T.: Plasminogen: Purification from human plasma by affinity chromatography. *Science*, 170: 1095—1096, 1970.
- 17) Maeda, N., Seike, M. and Shiga, T.: Effect of temperature on the velocity of erythrocyte aggregation. *Biochim. Biophys. Acta*, 904: 319—329, 1987.
- 18) Swank, R.L.: Suspension stability of blood after injections of dextran. *J. Appl. Physiol.*, 12: 125—128, 1958.
- 19) Ehrly, A.M. and Landgraf, H.: Influence of intravenous infusions of hydroxyethylstarch (HES) (MW40,000 and 450,000) on the blood flow properties of healthy volunteers. *Angiology*, 36: 41—44, 1985.
- 20) Chien, S. and Jan, K.-M.: Ultrastructural basis of the mechanism of rouleaux formation. *Microvasc. Res.*, 5: 155—166, 1973.
- 21) Ingelman, B. and Halling, M.S.: Some physico-chemical experiments on fractions of dextran. *Ark. Kemi.*, 1: 61—80, 1949.
- 22) Brooks, D.E.: The effect of neutral polymers on the electrokinetic potential of cells and other charged particles. III. Experimental studies on the dextran/erythrocyte system. *J. Colloid. Interface Sci.*, 43: 700—713, 1977.
- 23) Chien, S., Simchon, S., Abbott, R.E. and Jan, K.-M.: Surface adsorption of dextrans on human red cell membrane. *J. Colloid. Interface Sci.*, 62: 461—470, 1977.
- 24) Chien, S. and Jan, K.-M.: Red cell aggregation by macromolecules: Roles of surface adsorption and electrostatic repulsion. *J. Supramol. Struct.*, 1: 385—409, 1973.
- 25) Jan, K.-M. and Chien, S.: Role of surface electric charge in red blood cell interactions. *J. Gen. Physiol.*, 61: 638—654, 1973.
- 26) Marshall, J.J.: Application of enzymic methods to the structural analysis of polysaccharides: Part I. *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.*, 30: 332—342, 1974.
- 27) Maeda, N. and Shiga, T.: Inhibition and acceleration of erythrocyte aggregation induced by small macromolecules. *Biochim. Biophys. Acta*, 843: 128—136, 1985.
- 28) Jan, K.-M. and Chien, S.: Influence of the ionic composition of fluid medium on red cell aggregation. *J. Gen. Physiol.*, 61: 655—668, 1973.
- 29) Maeda, N., Imaizumi, K., Sekiya, M. and Shiga, T.: Rheological characteristics of desialylated erythrocytes in relation to fibrinogen-induced aggregation. *Biochim. Biophys. Acta*, 776: 151—158, 1984.
- 30) Ricketts, C.R.: Interaction of dextran and fibrinogen. *Nature*, 169: 970, 1952.
- 31) Kroll, J. and Dybkaer, R.: In vitro Precipitations in plasma by low molecular weight dextran. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, 1: 31—38, 1964.