保存赤血球の機能

横浜市立大学医学部生化学

中 尾 真

赤血球は体外で簡単に生きのびる様にする事ができるだけでなく、孤立した細胞である事、単一に多量にとり得る事、構造が簡単である事、代謝が簡単である事、細胞の寿命を posttransfusional viability と云う形で決定的に判定し得る等の特徴がある。従つて赤血球の保存は実用上の問題であると同時に老化一般の問題としても重要な生物学的材料と云う事ができる。この見地から、代謝と機能が保存中に如何に変動をしていくか、又これをどうすれば control できるかと云う事を述べたい。

赤血球の代謝の概略は表1の通りである。まず構造が単純で核もミトコンドリアもミクロゾームもはつきりしたものは何も観察されてないと云う事に相当して蛋白・脂質の合成がみられず、TCA サイクルも存在していない。しかし図1の様な解糖課程は活潑である。Warburg Dickens 回路は最近になつて全メンバーがたしかめられた。この回路の一般的生理的意義は triphosphopyridine nucleotide (TPN) を還元して TPNH にする事であるが、赤血球では正常時には殆んど回転していないと考えられる証拠がある。

大体赤血球が体内に於てはたす役割を生体全体の立場から考えると、いうまでもなく酸素の運搬と炭酸ガスの運搬である。その点で主要な役割を果たすヘモグロビンは細胞内では比較的安定である。ヘモグロビンの二価の鉄は三価になつてメトヘモグロビンになつてしまうと酸素の結合分離が

行われなくなるから、赤血球にはメトヘモグロビンをヘモグロビンに還元する装置が存在する。これは主として Warburg Dickens 回路で生ずる TPNH を材料として、又一部は解糖によつて生ずる DPNH を材料としてメトヘモグロビンを還元するメトヘモグロビン還元酵素である。これに関与する酵素は比較的安定であるらしく、今まででしらべられたかぎりでは TPNH 或いは還元型 diphosphopyridine nucleotide (DPNH) 生産系のどちらかが無傷に残つていくかぎり、系がうまく回転して、ヘモグロビン量に明らかな変化は観察されないと云う結果である。注意すべき事は解糖の最後の段階でビルビン酸が乳酸になる所は DPNH から H を受けとるのである。保存期間が長くなると保存血中には乳酸がたまつていくのでもし解糖系路の上の方がとまつていても乳酸が逆向きにビルビン酸に戻る事によつて DPNH を生産する事ができるのである。この様にして赤血球は形さえあれば少くとも普通の条件で極めて長期間ヘモグロビンを無傷に保つていくと云つてもよい。但し形がなくなれば、これらの反応に必要な酵素と補酵素の総量はかわらないとしても濃度が減少する結果になるから働かなくなってしまう。

次に炭酸ガスの受授に必要な炭酸脱水酵素はこれも極めて安定な酵素であつて、Keilin と Wang によれば、42年たつたモルモットの血液でも正常の87%の activity があつたと云う程である。以

使用したデータは著者が東京大学栄養学教室・群馬大学生化学教室・横浜大学生化学教室に於て多数の人々とともに共同研究を行つた結果得たものであり特に東大吉川春寿教授、群大山添三郎教授には御指導・御援助をいただいた。又輸血後寿命に関する実験は中尾喜久教授指導の下に中尾内科との共同で行つたものである。共同実験者の氏名は多数にのぼるので割愛させていただいた。それぞれの実験について本文の原著に記されてある。特に東大輸血部の遠山博士（現群馬講師）血漿研究所長宮本正治博士には血液の保存について多大の援助を受けた。記して謝意を表する。

表1 METABOLISM IN MATURE HUMAN ERYTHROCYTE

1	Glycolysis (Embden-Meyerhof)	(+)
2	Pentose phosphate shunt (Warburg-Dickens)	(+)
3	TCA cycle (Krebs)	(-)
4	Protein synthesis	(-)
5	Lipid synthesis	(-)
6	Nucleic acid synthesis	(-)
7	Heme synthesis	(-)
8	Nucleotide metabolism	(limited)
9	Methemoglobin reduction system	(+)

図1 Sugar metabolism in Erythrocytes.

上の様な理由で赤血球は酸素・炭酸ガスの運搬と云う二大機能の保存と云う点から考えても、赤血球を特殊な細胞として考えるよりは一般的な細胞としてみなして、その場合の integrity と云うか代謝と構造の完全さを問題にしなければならぬし、又当面はそれだけで充分と云う事になる。さらにこの代謝と云う問題はさきに説明した様に赤血球にはエネルギー代謝の問題にかぎって考える事ができるわけである。

そこで通常の ACD 保存血について考えてみたい。この方法では、まづ赤血球の燃料として glucose を多量に添加し、しかもその上 glucose の消費を押えるために低温 4℃に保存し、更に pH をあらかじめさげて代謝速度をおそくする。クエン酸ソーダの緩衝液は、凝固阻止作用をかね、更

図2 保存血液中ぶどう糖

に代謝産物によつて pH が酸性にかたむく事を防ぐ役割をもっているのである。

まづぶどう糖は通常の保存期間 3 週間までは何とか直線的に減少するが、それからは頭打ちになつてくる¹⁾。この事は一定時間中の糖消費速度(浮腫)を測定しても全く同様の事がみられ糖消費浮腫が減少してくる²⁾。注意をひく事は糖消費がとまった後でも正常の血糖値よりははるかに高い事である。この事は代謝がおとろえるのは赤血球が食物を喰いつくしたのではない事を示している。消費されたぶどう糖は大部分が乳酸になつている。同時に細胞内に高かつた K⁺ イオンの他にも Na⁺ イオンが入つてくる。K⁺ のとりこみにかわり ⁸⁶Rb の放射活性組み入れを観察するとこれも保存期間とともに低下する¹⁾。滲透圧溶血抵抗も悪くなり、目でみただけで溶血がひどくなつてくるのがわかる。輸血後寿命も悪くなつて 3 週間後には平均 70% と云われるにいたる。これは衆知の様に輸血した赤血球は健全でないものは 24 時間乃至 48 時間以内に補足されて流血中から姿を消し、残りが 70% と云う意味である。その 70% はほぼ新鮮血と同様の減衰曲線を示す。

成熟人赤血球では構造と機能と云つても構造物として唯一のものは細胞膜であるが、ひとまづ能動輸送や機械的抵抗性の様に膜と直接関係あると考えられる機能と又それらの複雑な組み合わせであらう所の輸血後寿命はさておいて、エネルギー代

謝にかぎつて考えをすすめ、後に膜の諸機能との関係を論ずる事に致したい。

解糖活性即ちぶどう糖の消費力の減少の結果、生ずる問題として、すべての細胞について云える事は図1にみられる様に ATP の生産がとまり DPN の還元がおこなわれなくなると云う事である。DPN の還元の方もメトヘモグロビン還元酵素の材料がなくなるのであるから事は重大であるが、ATP の減少の方が更に重大な結果を招くと考えられる。その理由は解糖或いは醗酵と云う内然機関の入口に位する所に、ぶどう糖を活性なリン酸化合物にかえる反応、ヘキソキナーゼの反応は高濃度の ATP を要する反応である云う事である。ATP 濃度が下れば反応速度は急激に低下する。従つて ATP の生産はますます低下する。ここに悪循環が発生する。

細胞の生存においてエネルギーを要する様な反応の大部分が ATP の高エネルギーリン酸結合を介して食物からとられたエネルギーを利用する事はよく知られた事実である。膜の機能・細胞の完全さと云う問題でも、少くとも間接的には ATP が関係しておると云う事は想像に難くない。したがつて ATP レベルの低下をなんとかさまたげ、或いは恢復する事を考えなくてはならない。この ATP の低下と云う事を易水解性リン酸の消長から推定したのが、終戦後來日し、今東独に居る Rapoport である。1953年にはシヤトルの Gabrio 等³⁾がこの問題に極めて面白い方法で接近した。彼等は保存血をセロファンバッグに入れてウサギの胸腔内に入れ、再び易水解性リン酸が増加すると云う事実から出発し、一連の実験によつてヌクレオシドが添加物として有効であると云う事を見出したのである。例えばイノシンは赤血球中には nucleoside phosphorylase と云う酵素が強力なので hypoxanthine と云うプリン部分とリボース-1-リン酸 (R1P) を生ずる。R1P はその後リボース-5-リン酸 (R5P) となり、更に Warburg-Dickens 回路、及び解糖系に入つて代謝されるのである。この nucleoside phosphorylase の反応は無機のリン酸を必要としているが、解糖

系の際の hexokinase 反応の様に ATP の存在は必要でない。従つて ATP のレベルが低下していても、ヌクレオシドの糖部分は見事に代謝されると云う事になる。

しかしながらヌクレオシドが或る程度 ATP レベルの維持に役立つと云う事は私共も含めて多くの追試者が認めるには認めはしたが、Gabrio 等がはじめに発表した様なはなばなしい輸血後寿命の成績には後に彼女のボスである Finch も含めた4教室合同の大共同研究により否定されてしまつたのである⁴⁾。我々が保存血の研究を始めたのは最終的に否定される前であつたが、この間の事情を説明するのに次の様に考えた。ヌクレオシドの代謝によつて再び ATP を増加させると云う事のためには、あらかじめ ADP が存在している事が必要である。この ADP かもしくは ATP, ADP と myokinase⁵⁾ による平衡関係のなりたつている AMP が細胞内に不足していれば、如何にヌクレオシドをあたえても解糖系がリン酸化する相手がないために ATP を生じないであろう。事実 ADP も AMP も減少した赤血球ではイノシンは ATP レベルに影響をあたえる事はできない(表2)。

表2 8週間保存血中のヌクレオシド

	ACD,	ACD+イノシン,	ACD+イノシン+アデニン**
AMP	—	—	1.7
ADP	—	—	6.6
ATP	1.5	2.5	27.4
IMP	4.7	15.0	6.8

ACD 保存血 54°C に 8 週間保存した後、イノシンを終濃度 0.025M (*) 及び 0.035M (**), アデニンを 0.020M になる様添加し、37°C に 3 時間おいた後、ギ酸型 Dowex カラムで分析した。単位は $\mu\text{moles}/100\text{ml ACD blood}$ 。

そこで種々のデータをつき合わせて ATP の崩壊経路に関する仮説を提出^{6,7)} したのが図3である。この中に含まれた酵素はすべてその存在が定性的には証明されている。この中最も重要な点は ATP が AMP にかわつた時、AMP の deamination がおこつてイノシンモノリン酸 (IMP) になる所が不可逆で、一たび IMP になつ

図3 保存赤血球崩壊に関する作業仮説

てしまうと容易にはアデニン系ヌクレオチドになり得ない事である(図3)。

この仮説に従って細胞内のATPをたかめる事を試みよう。表2に示す通り、あらかじめ8週間保存した保存血ではアデニン系のヌクレオチドが極めて少なくなっているから、ATP、ADP、AMP、R5P等を直接血漿に加えてみる。これらはリン酸化合物で細胞膜を通過しがたいので細胞内のATPレベルは変化しない。アデノシンは強力なアデノシンデアミナーゼが存在していて、アミノ基をはずしてしまうのでこれも無効である³⁾。イノシンを加えた時は表の様に糖のリン酸エステルやIMPは多くなるがATP、ADPはふえない。次にアデニンだけでも無効であるが、アデニンとイノシンを同時に添加したものでは表の様にATPレベルが2～3時間で10倍以上に増加する^{8,9)}。これは細胞あたりの濃度としては正常値の中に入ってしまう。

この際、解糖が一度とまり、又グリコーゲンの貯えもない組織で再び高エネルギーの供給を必要とするATPの合成が行われる事は一見極めて不思議であるが、一種の positive feedback として説明される¹⁰⁾。簡単に説明すると、

(1) (2) (3) (4) (5)の和：

(但、iPは無機リン酸、R1Pはリボース-1-リン酸)

あらかじめ細胞内に残ったATP3分子がひきがねとなつて最後にATP4分子をだす。つまりこの反応は overall には反応がすすめばすすむほど基質であるATPが増加すると言う事になる。

この反応は細胞の中にATPを温和な条件で入れこむ事ができると言う事で意義があるが、アデニンとイノシンをあらかじめACD中に加えた保存液を伴つて血液を保存したらどう云う結果が得られるであろうか。図4に示した様にこの新添加剤では8週後でも殆んどATPレベルが変化していない^{11,12)}。アデニン、イノシン各々単独でも多少はよいのだが、くらべものにならない。糖の消費もアデニン、イノシン両者添加したものは長い間直線的な消費を示す(図5)。他の生化学的性質も正常に近いが、浸透圧溶血抵抗も図5に示す様に極めてよく維持されている。posttransfusion viability も inosine だけ或いは adenine だけ乃至はACDのみのものより極めてよい値を示している¹³⁾。これらの事実はエネルギー代謝さ

図4 保存血中のATPレベル

CはACD、AはACD+アデニン、IはACD+イノシン、AIはACD+アデニン+イノシン。同一供血者の血液を4種の保存液に分注。4℃で保存。

図5 保存血中のぶどう糖

記号は第2図に同じ。

図6 保存赤血球渗透圧抵抗

Osmotic fragility of erythrocytes, which had been stored for 8 weeks in ACD medium (Curve A), in ACD medium containing inosine 10 g/l (Curve B) and in ACD medium containing inosine 10g/l and adenine sulfate 2.5g/l (Curve C). One tenth milliliter samples of blood were added to 20 ml of NaCl solutions at various concentrations and then, after 60 minutes, the optical density of the supernatant was measured at 540 mμ.

え充分に維持すれば、赤血球はまだ生命を延長する事が可能であると云う事を示している。

次に赤血球の形態もACDで保存したのでは数日後に金米糖になりだし5～6週以後はピンポン球の様な平滑球になってしまうが、イノシンだけアデニンだけ添加した保存血は8週間後で金米糖である。所がアデニンとイノシンを添加したもの

図7 8週間保存血の輸血後寿命 (Cr^{51}) (K. Nakao et al.)

は8週間後でも殆んど円盤状である事に注意されたい¹¹⁾ (図8, 図9)。

更に一度ピンポン球の様になってしまった8週後のACD血液にアデニンとイノシンをあたえて37°Cに3時間保ちATPレベルを上げると再び円盤に戻る^{8,9)} (図8, 10)。

新鮮な赤血球でも NaF で解糖を停止させて

図8 Shape of Red Cell during Storage

図9 日本ブラッドバンク提供のプラスチックバッグにより、同一人血を4℃9週間保存した。ACDAはアデニン添加ACD, ACDAはアデニン及びイノシン添加ACD (長野・中尾・中尾・神保・未発表)

ACD

ACDA

ACDA

おくとATPレベルが減じピンポン球になるが、生理的食塩水で弗素イオンを洗いさり、アデニンとイノシンを加えた生理的食塩水に浮遊させて37℃におくと再びATPレベルが上り円盤になる(図11)。この様にmediumのpH, 滲透圧, イオン強度, イオン組成を变ずる事なく少くとも数回は可逆的に形を変化させる事ができる。ATPレベルが正常の $\frac{1}{2}$ 以上あれば円盤, $\frac{1}{10}$ から $\frac{1}{2}$ までは金米糖, $\frac{1}{10}$ 以下では平滑球と云う関係がある(14,15)。

この可逆変化の機構に関しては別に追求中であるが、この様に形をもと通りに復した場合、赤血球は実際問題として生きかえるかと云う問題がある。表3は8週間後のACD保存血とあらか

図10 8週間保存血にアデニンイノシン添加37℃3時間おいたもの。形態を見易くするために異った血液型の血漿を少量添加してある。

対 照

アデニンイノシン処理

図11 ATPレベルと赤血球形態

表 3

		ACD	ACD-IA	Rejuvenated
ATP	μ moles/100 ml cells	5.9	89	77
Osmotic fragility	NaCl % at 50 % hemolysis	0.61	0.49	0.66
Hemolysis	Hb mg/100 ml blood	0.60	0.16	0.65
Glucose utilization in hemolysate	γ/40 minutes	124	206	127
Shape		Smooth spheric	Disk	Disk

図12 8週間保存血の輸血後寿命 (Cr⁵¹法)

じめアデニンとイノシンを添加した保存液で8週間保存したものと、ACDで8週間保存した後、アデニンとイノシンを加えて37℃で3時間おいたものの三者のいろいろな性質を比較した。ATPレベルは若かがえりをさせたものでももとに戻っているが、滲透圧溶血抵抗や hexokinase 活性はもとに戻っていない。これを Cr⁵¹ でラベルして再び人体に戻した後、流血中からの消失速度をみたのが図12である。ACDで保存しただけのもの

はたちまち流血中から消失するが、アデニンとイノシンを加えて保存したものは消失が極めておそい事は前にのべた通りである。所が驚くべき事に8週間後にアデニンとイノシンで処理した赤血球が正常に近い活性を示すのである¹⁶⁾。この事は第一に8週後のACD保存血でさえも本質的にはまだ不可逆な老衰過程が進行していない事を示す。第二には、又、体内で赤血球が破壊されるのは一恐らく補足されるのは滲透圧溶血抵抗の様な機械的な抵抗で区別されるのでなく、恐らくATPレベルによつて区別されるのであろう事である。この際、ATPレベルが形状を媒介として作用するのは問題であるが、赤血球の形態と云うものは、円盤であろうと、球であろうと極めて flexible な性質を有しているので、マクロな赤血球形状と云うよりは表面の微細構造が問題になるのであろうと考えられる。

時間の都合上エネルギー代謝の他の問題、或いは極低温保存血液については全然ふれる余裕がなかったが、今後の問題として、赤血球が保存の際、ATPレベル低下の直接の原因は何かと云う事と、更に赤血球膜の微細化学構造と機能の変化について明らかにする事をあげたい。

文 献

- 1) 吉川春寿, 米山良昌, 中尾真, 橘正道, 水上茂樹, 田中聖英, 鈴木奈智子, 中尾順子, 森本茂子, 香川喜子, 杉田良樹, 関口豊三, 宮本侃治, 柳沢勇, 峰島靖代, 鈴木治, 衣笠恵士, 遠山博, 茂手木皓喜, 石渡和男, 高久史麿, 安部英, 佐藤智: 保存血液の生化学的变化について: 医学の歩み, **29**, 204, 1959.
- 2) 峰島靖代: 血液保存と糖消費系の安定性 (I) (II): 生化学, **31**: 475, 686, 1959.
- 3) B.W. Gabrio, C.A. Finch and F.M. Hunnens: Erythrocyte preservation, a topic in molecular biochemistry. Blood, **11**: 103, 1956.
- 4) R.D. Lange, V.H. Crosby, D.M. Donohue, C.A. Finch, J.G. Gibson II, T.J. McManus and M.M. Strumia: Effect of inosine on red cell preservation. J. Clin. Invest., **37**: 1485, 1958.
- 5) M. Tatibana, M. Nakao and H. Yoshikawa: Adenylate kinase in human erythrocytes. J. Biochem., **45**: 1037, 1958.
- 6) 中尾真, 橘正道, 中尾順子, 杉野信博, 吉川

- 春寿：赤血球のリン酸代謝（Ⅶ）保存赤血球の A T P 崩壊系路に関する作業仮説，*生化*，**31**：526, 1959.
- 7) M. Nakao, T. Nakao, M. Tatibana and H. Yoshikawa: Phosphorus metabolism in human erythrocytes. IV Destruction of adenine nucleotides. *J. Biochem.*, **48**：672, 1960.
- 8) M. Nakao, T. Nakao, M. Tatibana, H. Yoshikawa and H. Abe: Effect of inosine and adenine on adenosine triphosphate regeneration and shape transformation in long stored erythrocyte. *Biochim. Biophys. A.*, **32**：564, 1959.
- 9) M. Nakao, T. Nakao, M. Tatibana and H. Yoshikawa: Phosphorus metabolism in human erythrocytes. III Regeneration of adenosine triphosphate in long-stored erythrocyte by incubation with inosine and adenine. *J. Biochem.*, **47**, 661, 1960.
- 10) M. Nakao, T. Motegi, S. Nakao, S. Yamazoe and H. Yoshikawa: A positive feedback mechanism of adenosine triphosphate in erythrocytes. *Nature*, **191**：283, 1961.
- 11) M. Nakao, T. Nakao, Y. Arimatsu and H. Yoshikawa: A new preservative medium maintaining the level of adenosine triphosphate and the osmotic resistance of erythrocyte. *Proc. Japan Acad.*, **36**：43, 1960.
- 12) 島宗昭夫：赤血球の保存に関する生化学的研究，*生化学*，**33**，13, 1961.
- 13) T. Wada, H. Takaku, K. Nakao and H. Yoshikawa: Posttransfusion survival of the red blood cells stored in a medium containing adenine and inosine. *Proc. Japan Acad.*, **36**：618, 1960. 及び中尾喜久，和田武久，神山昭秋，中尾真：長期保存赤血球の輸血後寿命に関する研究，*内科学会誌*（印刷中）.
- 14) M. Nakao, T. Nakao and S. Yamazoe: adenosine triphosphate and maintenance of shape of the human red cells. *Nature*, **187**：945, 1960.
- 15) M. Nakao, T. Nakao, S. Yamazoe and H. Yoshikawa: Adenosine triphosphate and shape of erythrocytes. *J. Biochem.*, **49**：487, 1961.
- 16) K. Nakao, T. Wada, M. Nakao and K. Nagano: *Nature in press*
-