

血液保存におけるpHと温度の影響

鳥取大学医学部附属病院輸血部 (主任 川崎 寛中教授)
(主任 佐藤 暢教授)

西 川 健 一

The influence of pH and temperature on blood preservation

Ken-ichi NISHIKAWA

*Department of Blood Transfusion Service,
Tottori University Hospital, Yonago, 683, Japan*

ABSTRACT

There are many factors which can affect blood preservation. Among them, pH and temperature are important ones. Their influences on blood preservation were examined by using two types of containers which have different CO₂ permeability, polyvinylchloride (PVC) bag (CO₂ permeability : 2,600 ml/m² · 24hrs · atm) and silicone-ethyl · vinylacetate (S-EVA) bag (CO₂ permeability : 10,000 ml/m² · 24hrs · atm), under two kinds of temperature (1 °C and 5 °C) during preservation, and then by changing pH under the same temperatures.

Exp. I: Whole blood (460ml) collected from 8 healthy donors with CPD solution was preserved under four different conditions for five weeks; i. e. in PVC bag at 5 °C and 1 °C, in S-EVA bag at 5 °C and 1 °C. Results: pH, 2,3-DPG and ATP levels were better maintained at 1 °C than at 5 °C, and also in S-EVA bags than in PVC bags, respectively. But plasma K⁺ levels at 1 °C was higher than that at 5 °C.

Exp. II: Whole blood collected same as in Experiment I from 8 healthy donors was divided into two groups for 1 °C and 5 °C preservation and each group was divided into five different pH groups (from 7.013 to 6.659 at approximately 0.09 interval) according to titration of lactate. They were stored for 1 week. Results: pH decreased during storage. The decrease of pH was larger in the groups with higher initial pH, and was larger at 5 °C than at 1 °C. Lactate and plasma K⁺ increased during storage. On the contrary, 2,3-DPG, glucose and plasma Na⁺ decreased. The changes of all the parameters were larger in the groups with higher initial pH except 2,3-DPG. The changes of 2,3-DPG, lactate and glucose were larger at 5 °C than at 1 °C but the changes of plasma Na⁺ and plasma K⁺ were larger at 1 °C than at 5 °C. Furthermore, different dynamics of plasma Na⁺ and plasma K⁺ transport were observed around 6.8 in pH. ATP was affected by neither pH nor temperature.

Such changes of Na⁺, K⁺ and 2,3-DPG suggest that blood preservation at pH 6.8 or

above is preferable. It seems rational to preserve whole blood at 1 °C rather than at 5 °C allowing to maintain higher pH.

(Accepted on December 24, 1996)

Key words : blood preservation, erythrocyte, pH, temperature, electrolyte

緒 言

血液保存に関する研究の歴史は長く、1914年Hustinらにより抗凝固剤としてクエン酸ナトリウムが発見されて以来、赤血球の機能と保存期間、保存方法との関係が論じられてきた。この事は赤血球の生理学的機能の解明と共に今日でも重要な研究課題である。保存赤血球の機能保持に関する因子はいくつかあるが、温度とpHもその重要因子である。保存温度に関してはFantus⁷⁾が4 °C保存を始めて以来、世界的に5 ± 1 °C保存（以後5 °C保存）が行われているが、その後も検討が続けられ、より低温での保存について再検討した報告²⁰⁾も見られる。我々のpreliminaryな検討でも、1 ± 1 °C保存（以後1 °C保存）がpHの低下防止などいくつかの点で5 °C保存より有利な点があったが、しかし不利な点も観察された。これらの有利な点が低温保存そのものによるものか、または低温保存によってpHが高く保たれたことによる二次的な影響かははっきりしなかった。また不利な面についても、赤血球に対する低温侵襲によるものか、pHが高く保たれたための影響なのかは解明されなかった。そこで実験Iでは5 °C保存と1 °C保存の差をより詳細に検討するとともに、通常の血液バッグ（PVC膜）と、ガス透過性の一層よいバッグ（S-EVA膜）との差を比較することにより、pHの差による保存性の違いを検討した。実験IIではさらにpHの影響の実体を評価するために、作為的にpHを変化させ、保存温度の違いも加味して検討した。

【実験I】

材料と方法

1. サンプル作製

健康成人8人より通常のCPD加血液バッグで400ml（実質はCPD液も含めて約460ml）採血して4等分し、各々を内容量100mlのsilicone-ethyl-vinylacetate(S-EVA)膜製のバッグ（膜厚

0.32mm）、および通常のpolyvinyl-chloride(PVC)膜製のバッグ（膜厚0.4mm）2個ずつに分注した。S-EVA膜バッグは住友ベークライト社の特製品で、PVC膜のCO₂透過性が2,600ml/m²・24hrs・atmであるのに対して10,000ml/m²・24hrs・atmの透過性を持っている。各々のバッグ1個ずつをベアとして5 ± 1 °Cおよび1 ± 1 °Cに調整した保冷库に保存した。5 °C保存には温度可変の保冷库（三洋CFS-1281AA）を、また1 °C保存には特別に1 ± 1 °Cに調整した血液保冷库（三洋MBR-105）を使用した。以後、PVC膜バッグによる5 °C保存をPVC5群、1 °C保存をPVC1群、S-EVA膜バッグによる5 °C保存をEVA5群、1 °C保存をEVA1群とする。PVC5群が、現在日常的に血液保存に用いられている方法に相当する。採血直後、1、2、3、4、5週目に各バッグを均等に攪拌した後15mlずつ採取し、下記の項目につき測定した。

2. 測定項目と測定方法

①pH, PCO₂, PO₂: 血液ガス分析装置「IL-813」(IL社)で測定した。

②血漿電解質: Na, K, Clイオン選択性電極分析装置「ION-3」(常光)で測定した。

③赤血球内2,3-diphosphoglycerate(2,3-DPG), 赤血球内adenosine triphosphate(ATP), 全血中の乳酸および血漿中のブドウ糖: 分光光度計「UVIDEC 340」(日本分光)を用い、UV酵素法で測定した。2,3-DPGおよび乳酸の測定にはベリンガー・マンハイム社の“2,3-DPGテスト”, “F-キット L-乳酸”を用いた。ATPはSIGMA DIAGNOSTICS社測定キット“ATPキット「アスカ・シグマ」”を用いた。糖はヤマトロン社の測定キット“イアトロクロムGLU-L_Q”で測定した。

温度およびバッグの違いによる各群間の有意差検定には2元分散分析を用い、各週におけるそれぞれの値の比較にはunpaired t-testを用いた。両者ともp < 0.05を有意な差と判定した。

結 果

1. pH(図1)

各群とも経時的に低下したが、同一バッグでは1℃保存群の方が、同一温度ではEVA群の方がいずれも有意に高値を保っていた(各群間とも $p<0.001$)。5週目では最低値のPVC5が平均値で6.539まで低下したのに対し、最高値のEVA1は6.787で、その差は0.248であった。

2. PCO₂ (図2), PO₂

PCO₂は、PVC5群、PVC1群ではそれぞれ3週目、4週目に最高値を示した後、減少した。またEVA5群、EVA1群は経時的に低下した。5℃保

存群、1℃保存群ともPVC群がEVA群より有意に($p<0.001$)高値を示した。また両バッグとも1, 2, 3週目では5℃保存群がやや高値を示したが、4, 5週目では差は認めなかった。PO₂はEVA5群、EVA1群とも4週目にそれぞれ 226.9 ± 6.5 mmHg(mean±S.D.以下同様)、 251.4 ± 13.1 mmHgと最高値を示した後、やや減少した。またPVC5群、PVC1群は共に経時的に増加し、5週目にそれぞれ最高値 120.7 ± 8.5 mmHg、 223.6 ± 6.0 mmHgとなった。PCO₂とは逆にEVA群がPVC群より、また1℃保存群が5℃保存群より有意に(いずれも $p<0.001$)高値を示した。

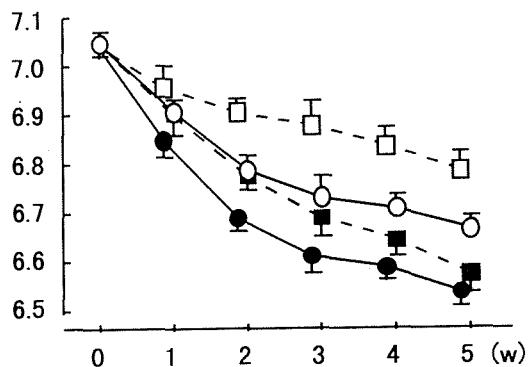
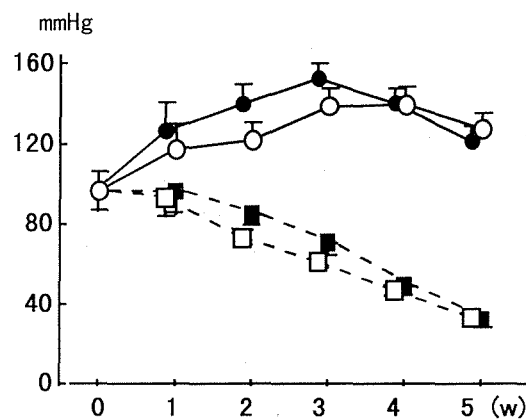


図1. 保存期間中のpHの変化

● 5℃ PVCbag ○ 1℃ PVCbag
■ 5℃ S-EVAbag □ 1℃ S-EVAbag
mean±S.D. (n=8)

図2. 保存期間中のPCO₂の変化

● 5℃ PVCbag ○ 1℃ PVCbag
■ 5℃ S-EVAbag □ 1℃ S-EVAbag
mean±S.D. (n=8)

3. 血漿電解質

1) 血漿ナトリウム (Na⁺)(図3)

Na⁺は全群低下した。低下の程度は最初の1週間がやや大きく、以後緩やかに下降した。同一バッグでは1℃保存群の方が、同一温度ではEVA群の方が有意に(各群間とも $p<0.001$)低下していた。また、PVC5群とEVA5群およびPVC1群とEVA1群の平均値の差はそれぞれ1.2~2.5mEq/l, 1.4~3.9mEq/lであったのに対し、PVC5群とPVC1群, EVA5群とEVA1群の差は3.6~9.2mEq/lおよび2.5~11.9mEq/lであり、温度による差の方がより大きかった。

2) 血漿カリウム (K⁺)(図4)

K⁺はNa⁺とは逆に経時的に増加した。増加の

割合は初期ほど大きく、時間の経過とともに小さくなった。両バッグとも1℃保存群の方が5℃保存群より有意に($p<0.001$)増加したが、バッグ間の差は認めなかった。5週目にはEVA1群は平均値で32.08mEq/lまで上昇し、PVC5群の24.61mEq/lよりも7.47mEq/l高値を示した。

4. 2,3-DPG(図5)

赤血球内2,3-DPGは1℃保存と5℃保存では異なった動きを示した。5℃保存群では経時的に低下したが、1℃保存群では1週間目に一旦増加した後、次第に低下した。PVC5群がもっとも低下が早く、3週目にはほぼプラトーになった。ついでEVA5群、PVC1群の順で低下し、5週目には3者とも平均値が $0.5 \mu\text{mol/mlRBC}$ 以下になっ

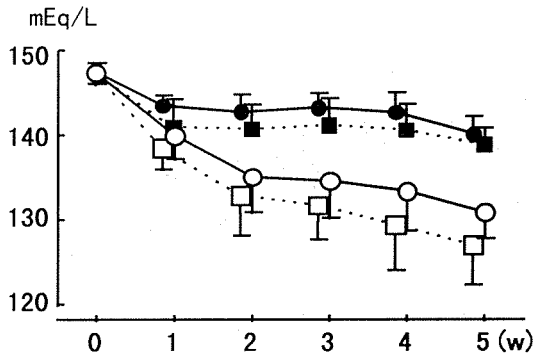


図3. 保存期間中のNa⁺の変化
 ● 5℃ PVCbag ○ 1℃ PVCbag
 ■ 5℃ S-EVAbag □ 1℃ S-EVAbag
 mean±S.D. (n=8)

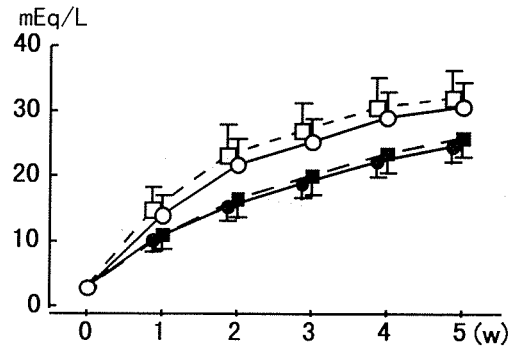


図4. 保存期間中のK⁺の変化
 ● 5℃ PVCbag ○ 1℃ PVCbag
 ■ 5℃ S-EVAbag □ 1℃ S-EVAbag
 mean±S.D. (n=8)

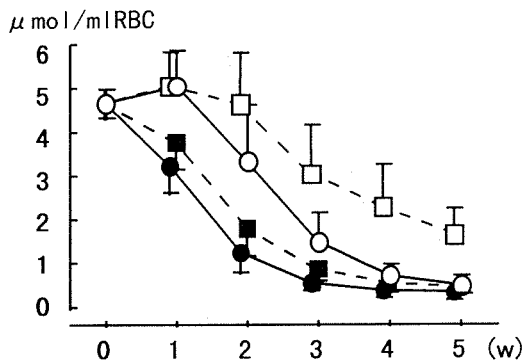


図5. 保存期間中の2, 3-DPG の変化
 ● 5℃ PVCbag ○ 1℃ PVCbag
 ■ 5℃ S-EVAbag □ 1℃ S-EVAbag
 mean±S.D. (n=8)

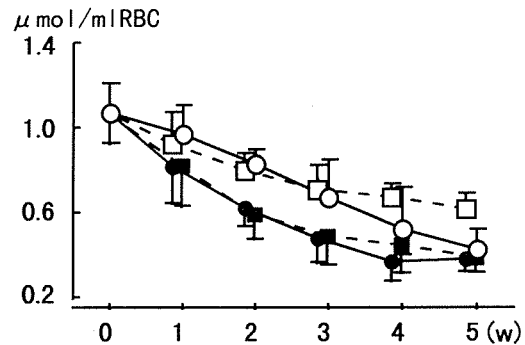


図6. 保存期間中のATPの変化
 ● 5℃ PVCbag ○ 1℃ PVCbag
 ■ 5℃ S-EVAbag □ 1℃ S-EVAbag
 mean±S.D. (n=8)

たが、EVA1群のみは1.64 μ mol/mlRBCと採血直後の約35%を保っていた。群間比較では同一バッグでは温度間で、同一温度ではバッグ間で有意差を認めた ($p<0.001$)。

5. ATP(図6)

赤血球内ATPも経時的に低下したが、両バッグとも1℃保存群の方が5℃保存群より有意に ($p<0.001$) 高値を保っていた。バッグ間の差は認めなかったが、5週目のみは他の3群の平均値がほぼ0.4 μ mol/mlRBCに収束したのに対し、EVA1群のみが0.62 μ mol/mlRBCと有意 ($p<0.01$) に高値を保っていた。

6. 乳酸(図7)

全血中の乳酸は経時的に増加した。1週目はほ

んど差はなかったが、2週目よりバッグ、温度による差が生じた。5℃保存群、1℃保存群ともPVC群よりEVA群が(各々 $p<0.001$)、また両バッグとも1℃保存群より5℃保存群の方が(EVA群： $p<0.05$, PVC群： $p<0.01$)より増加した。

7. ブドウ糖(図8)

血漿中のブドウ糖は2週目までは、4群ともほぼ同程度の低下を示したが、3週目以後は温度およびバッグによる差が生じた。PVC群よりEVA群が(1℃保存群： $p<0.001$, 5℃保存群： $p<0.05$)、また1℃保存群より5℃保存群の方が(EVA群： $p<0.05$, PVC群： $p<0.001$)より低下した。5週目では最高値のPVC1群が平均で

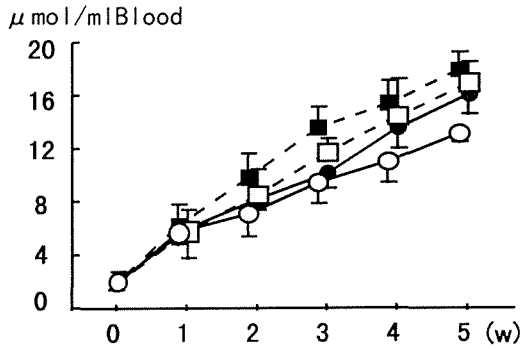


図7. 保存期間中の乳酸の変化

● 5°C PVCbag ○ 1°C PVCbag
 ■ 5°C S-EVAbag □ 1°C S-EVAbag
 mean ± S.D. (n=8)

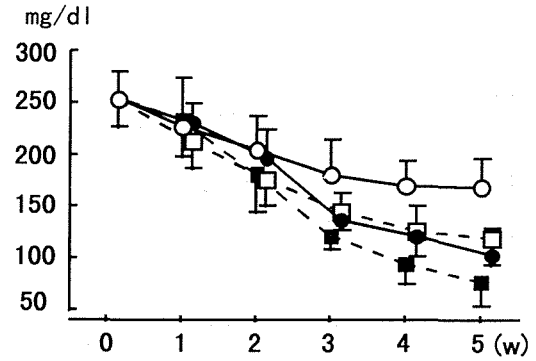


図8. 保存期間中のブドウ糖の変化

● 5°C PVCbag ○ 1°C PVCbag
 ■ 5°C S-EVAbag □ 1°C S-EVAbag
 mean ± S.D. (n=8)

168.7mg/dl残っていたのに対し、最低値のEVA5群は76.9mg/dlまで低下していた。

験Iに準じた。

結 果

1. pH(表1, 図10)

各群のpH調整直後の値は乳酸1~4単位の添加ではほぼ計算通り約0.09づつ低下した。1週間後の値は1°C保存, 5°C保存とも全ての群で調整直後の値より有意に低下したが ($p < 0.01$), その低下幅 (Δ pH)は各群 (G0~G4)で異なっていた。1週間後には1°C保存で平均値で0.116~0.039, 5°C保存では0.136~0.050低下し, その変化はほぼ直線的で初期pHが高いほど低下幅が大きかった (図10-b)。1°C保存, 5°C保存とも各々隣合う群, すなわちpHの差が約0.09では低下幅に有意差はなかったが, G0とG2, G1とG3, G2とG4との間, すなわちpHの差が約0.18になると有意差 ($p < 0.01$)を認めた。1°C保存群と5°C保存群の温度差による比較 (以下温度差比較と略す)では, 1°C保存群の方が5°C保存群より低下幅が小さかった ($p < 0.001$)。

2. PCO₂, PO₂

PCO₂は乳酸添加によりG0の84.2±9.2mmHgからG4の147.6±16.4mmHgへと上昇した。1週間保存によりG0とG1は初期値よりやや上昇, G3とG4はやや低下傾向があったが, 初期値, 1°C保存群, 5°C保存群のいずれの間にも有意差は認めなかった。PO₂もG0の38.4±13.8mmHgからG4の51.1±17.3mmHgへと上昇した。1週間保存により各群とも50~60mmHg上昇したが, 1°C

【実験II】

材料と方法

1. サンプル作製

健康成人8人より通常のCPD加血液バッグで400ml(実質はCPD液も含めて約460ml)採血し, 45mlづつ10等分して内容量50mlのPVC膜製バッグ(川澄化学の特注品, 材質は市販の血液バッグと同じ)に分注し, 2バッグを一对として5群に分けた (図9)。pH調整には赤血球代謝の最終産物であるL-乳酸を用いた。予備実験により, 乳酸1mmolは全血1lのpHを約0.1下げることがわかったので, 市販の乳酸原液 (L-乳酸)を蒸留水で50倍に希釈し, 血液45mlに対して1mmolに相当する0.675mlを1単位とした。先の5群の内, 乳酸無添加群をコントロール群 (G0)とし, 残り4群に乳酸1, 2, 3, 4単位を添加し, それぞれ第1群 (G1), 第2群 (G2), 第3群 (G3), 第4群 (G4)とした。その後, 各対のバッグを実験Iと同様に各々5±1°Cおよび1±1°Cに調整した保冷庫に分けて保存した。測定時期は上記処理直後と1週間後の2回とした。

2. 測定項目と測定方法

①pH, PCO₂, PO₂ ②血漿電解質 (Na⁺, K⁺) ③2,3-DPG ④ATP ⑤乳酸および ⑥ブドウ糖について測定した。測定方法および有意差検定は実

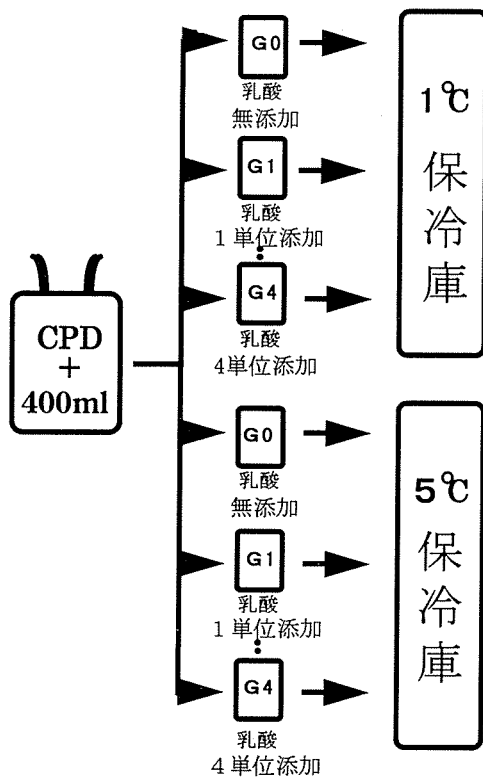


図9. 実験用血液の準備
分注と乳酸添加によるpH調整

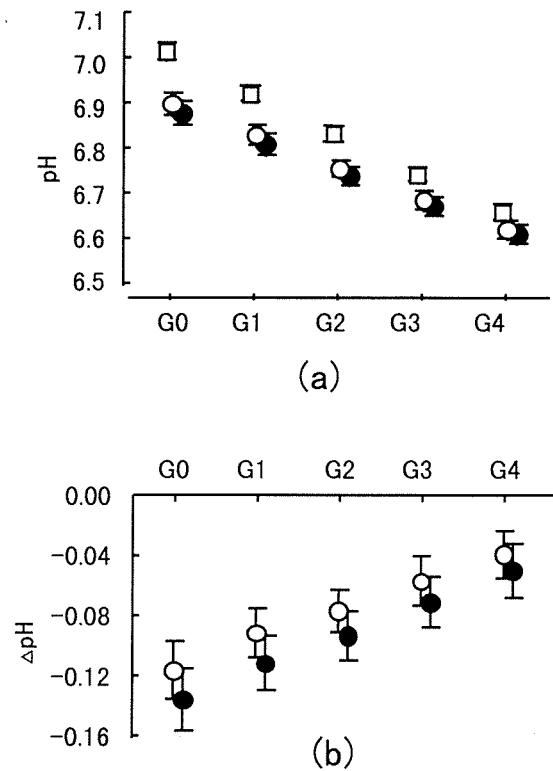


図10. pHの変化

(a)に乳酸添加直後および1週間保存後のpHを、
(b)に1週間保存におけるpHの変化の幅 (Δ pH)を示す。

□ 乳酸添加直後 ○ 1週間保存後 (1℃)
● 1週間保存後 (5℃) mean \pm S.D. (n=8)

表1. 乳酸添加直後および1週間保存後のpH値

	mean \pm S.D.				
	G0	G1	G2	G3	G4
乳酸 添加直後	7.013 \pm 0.020	6.920 \pm 0.019	6.831 \pm 0.018	6.741 \pm 0.017	6.659 \pm 0.019
1℃保存 1週間後	6.897 \pm 0.027	6.828 \pm 0.024	6.754 \pm 0.020	6.684 \pm 0.022	6.620 \pm 0.021
5℃保存 1週間後	6.877 \pm 0.028	6.808 \pm 0.025	6.737 \pm 0.022	6.670 \pm 0.022	6.609 \pm 0.023

保存群と5℃保存群の間に有意差は認めなかった。

3. 電解質

1) 血漿ナトリウム (Na^+) (図11)

Na^+ はpH調整後測定までの間 (約1時間) に

すでに変動が見られ、pHの低下に伴い減少していた。1週間保存後、全群でさらに減少したが、その減少幅はG0で最大で、G4で最小であった。

しかし、各群間における減少幅の違いは小さく、1℃保存ではG0とG4との間で有意差 ($p < 0.05$)

を認めたが、5℃保存では有意差は認めなかった。温度差比較では1℃保存群の方が5℃保存群より減少幅が大きかった ($p < 0.01$)。

2) 血漿カリウム (K^+) (図12)

K^+ は1週間後には全ての群で増加した。増加幅は1℃保存、5℃保存ともG0で最も大きく、保存前pHが下がるに従って小さくなったが、G2 (pH6.831) を境としてそれ以下のpH、すなわちG2、G3、G4群では増加幅はほとんど同程度であった。この増加幅は1℃保存、5℃保存ともG0がG2より有意に ($p < 0.05$) 大きかった。また、温度差比較では1℃保存群の方が5℃保存群より増加幅が大きかった ($p < 0.001$)。

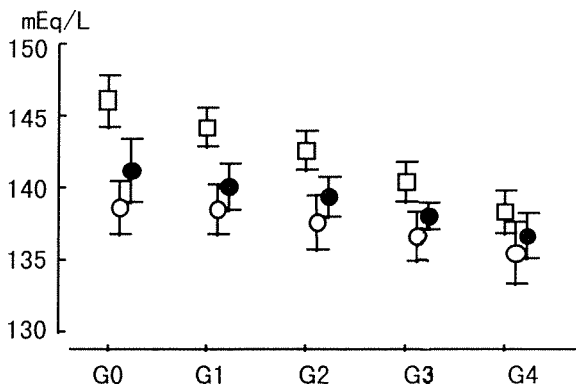


図11. 乳酸添加直後および1週間保存後の Na^+ の変化

□ 乳酸添加直後 ○ 1週間保存後 (1℃)
● 1週間保存後 (5℃) mean±S.D. (n=8)

4. 2,3-DPG (図13)

赤血球内2,3-DPGは、pH調整直後の各群間の差はほとんど見られなかった。1週間保存後の値はG0では5℃保存のみでやや低下したが、G1からG5すなわち初期pHが6.920以下の群では1℃保存、5℃保存とも全群低下した。1週間後の値に対する初期pHの影響は大きく、1℃保存ではG0とG1、G1とG3、G2とG4との間で、5℃保存では各群間で初期pHの高い方が有意に ($p < 0.05$) 高値を保っていた。また、隣り合う群間の差はG0とG1との間が最も大きく、初期pHが低くなるに従って次第に小さくなり、G3-G4間が最も小さかった。また温度差比較では1℃保存群の方が5℃保存群より高値を保っていた ($p < 0.01$)。

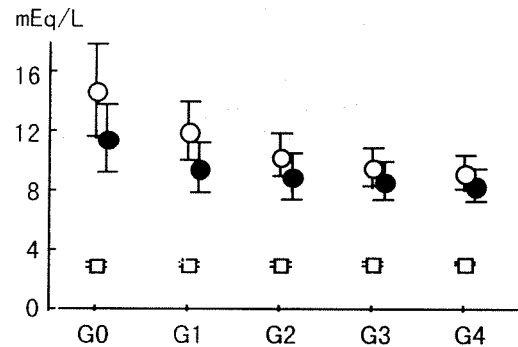


図12. 乳酸添加直後および1週間保存後の K^+ の変化

□ 乳酸添加直後 ○ 1週間保存後 (1℃)
● 1週間保存後 (5℃) mean±S.D. (n=8)

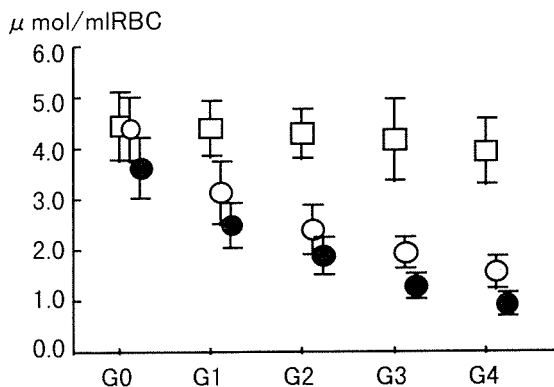


図13. 乳酸添加直後および1週間保存後の2,3-DPGの変化

□ 乳酸添加直後 ○ 1週間保存後 (1℃)
● 1週間保存後 (5℃) mean±S.D. (n=8)

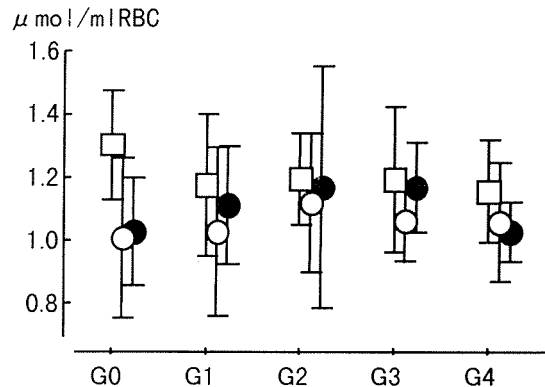


図14. 乳酸添加直後および1週間保存後のATPの変化

□ 乳酸添加直後 ○ 1週間保存後 (1℃)
● 1週間保存後 (5℃) mean±S.D. (n=8)

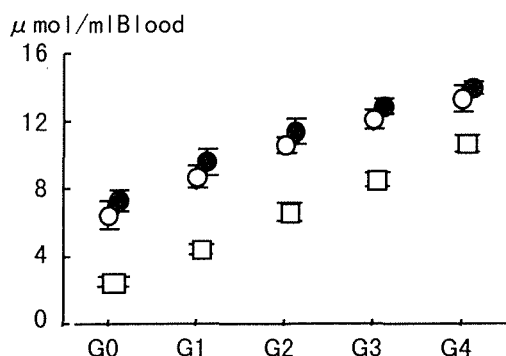


図15. 乳酸添加直後および1週間保存後の乳酸の変化

□ 乳酸添加直後 ○ 1週間保存後 (1°C)
● 1週間保存後 (5°C) mean±S.D. (n=8)

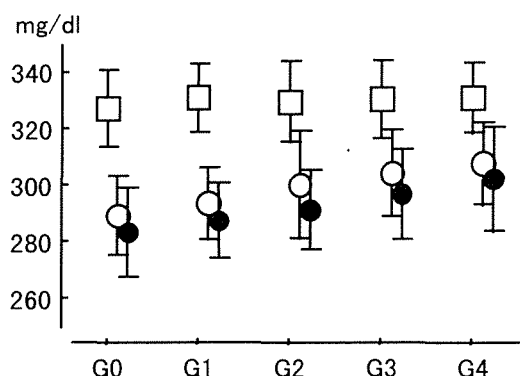


図16. 乳酸添加直後および1週間保存後のブドウ糖の変化

□ 乳酸添加直後 ○ 1週間保存後 (1°C)
● 1週間保存後 (5°C) mean±S.D. (n=8)

5. ATP(図14)

赤血球内ATPは1週間保存後はやや減少傾向が見られたものの、その減少幅は小さく、pHの差、温度差の比較のいずれについても有意な変化は見られなかった。ただ、1°C保存、5°C保存ともむしろpHの低いG2ないしはG3でやや高めに維持される傾向があった。

6. 乳酸(図15)

処理前の全血中乳酸値は $2.40 \pm 0.22 \mu\text{mol/ml Blood}$ であったが、所定の量を加えた値は直線的に増加し、G5では $10.69 \pm 0.52 \mu\text{mol/ml Blood}$ となった。1週間保存後はさらに増加したが、増加幅は1°C保存、5°C保存とも初期pHが高い方が大きく、pHが下がるに従って小さくなった。この増加幅は各群間では有意差はなかったが、G0とG4との間では有意にG0が大きかった ($p < 0.01$)。温度差比較では5°C保存群の方が1°C保存群より増加幅が大きかった ($p < 0.01$)。

7. ブドウ糖(図16)

血漿中のブドウ糖は1週間保存で全群低下した。低下幅は1°C保存、5°C保存とも各群間では差はなかったが、G0とG4との間では有意に ($p < 0.05$) G0の方が大きかった。また、温度差の比較では5°C保存群の方が1°C保存群より低下幅が大きかった ($p < 0.05$)。

考 案

赤血球は生体内では、温度、pHなど全ての面で至適環境下で本来の営みを行っている。しかし、

輸血用血液は閉鎖系の中で非生理的に保存されており、このような環境のもとでいかに長くその機能を果たせるかが大きな課題である。赤血球の保存にはいくつかの因子が関与しているが、中でも問題になるのは温度、pH、保存液の組成であり、これらに関する研究は古くから行われている。保存温度に関しては、1940年に竹岡の報告¹⁷⁾が見られ、その後Parpart¹³⁾、Strumia¹⁶⁾らの検討も見られるが、結局Fantusの始めた4°C~6°C保存に落ち着いている。Yamamura²⁰⁾は5°C、0°C、-2°C、-5°Cでの保存を検討し、pH、2,3-DPGについては-5°C、-2°Cが、ATPについては-2°C、0°Cが優れていたと報告している。著者らの検討¹²⁾でも、1°C保存は2,3-DPGやATPの保持については従来の5°C保存より優れていたが、血清K⁺の増加や溶血の亢進等不利な面も観察された。そこで実験Iでは赤血球の保存状態の変化をさらに詳細に検討するために、温度の違いと、材質の異なる2種類のバッグによるpHの影響を組み合わせた比較を行った。

赤血球はブドウ糖を基質とした嫌気性解糖系であるEmbden-Meyerhof回路を内蔵しており、低温保存中でも代謝はわずかながら進行し、乳酸、ピルビン酸が増加してpHが低下する。また、バッグ内は閉鎖系であるため、CO₂が蓄積する事もpH低下の一因となる。そのため赤血球内の酵素活性が低下し、膜内外の電解質バランスも変化し全体としての機能が低下する。

実験IではpHは5°C保存より1°C保存の方が

表2. 5週間保存後の2,3-DPG, ATP, K⁺の保存状態

	5 °C		1 °C	
	PVCbag	S-EVAbag	PVCbag	S-EVAbag
2,3-DPG	×	△	△	○
ATP	×	×	△	○
K ⁺	○	○	×	×

○ good △ fair × poor

高く保たれたが、これはより低温にする事によって赤血球内の代謝を抑え、そのために乳酸の蓄積量が減少したためと思われた。またガス透過性のよいS-EVA膜バッグではPVC膜バッグよりpHが高く保たれたが、これは容器内のCO₂が膜を通じて外部に排出され、濃度がより低く保たれたためと思われた。

血漿電解質の非生理的な変動は、温度およびpHの変化により膜輸送がアンバランスになったためと思われた。この点に関しては実験Ⅱの結果でさらに考察する。

2,3-DPGは4週目以後ではEVA1群のみが比較的高値を保っていた。このことは、4週以上の長期保存になると温度の影響よりも、pHの影響の方が大きくなることを示唆している。

ATPは温度による差は認めしたが、バッグ間の差は認めず、pHより温度の影響が強いと思われた。

ブドウ糖がPVC1群で最も多く残存していたこと、および解糖系の最終産物である乳酸は逆にPVC1群で産生が最も少なかったことは、温度と、経時的に変化するpHの影響によるものと思われた。

輸血用血液としては、2,3-DPG, ATPが高く保たれ、電解質の変動はできるだけ少ない事が望ましく、その点から実験Ⅰの結果をまとめると、表2のようになる。すなわち、温度やガス透過性膜を利用してpHを高く維持すればするほど、赤血球の基本的な性能を維持する2,3-DPGやATPの保持には有効であるが、一方でK⁺の増加に有意差が見られた。

これらの結果は、当然経時的な環境の変化の影響を受けているが、経時的な変化は一刻一刻の変化の蓄積でもある。そこで実験Ⅱでは、時間の影響をできるだけ少なくしてpHの影響をより詳しく解析することと、温度の関与をさらに解明するために、作為的にpHを変化させて短期間（1週

間）の変化を1°Cと5°Cの両温度で観察した。

pHが赤血球の保存に関与することは古くから知られている。Parpart¹³⁾は溶血と血漿K⁺の増加を最小限に抑えるにはpHが6.7から7.0が良いと述べている。また、笹川ら¹⁵⁾はpH5.7から7.8の間で検討し、ATPレベルはpH5.7~7.2の間で差はなく、2,3-DPGは1週間および2週間の保存ではpH7.2以上と6.7以下で差が見られると述べている。

本研究ではpHは図10のごとく変化した。

一方、乳酸は保存により増加し、ブドウ糖は、保存によって減少した。解糖系の律速酵素であるphosphofructokinase(PFK)は、至適pHが7.6~8.4であると言われる¹⁹⁾。しかし、1週間後の乳酸の増加量およびブドウ糖の減少量はG4よりG0の方が大きく、また5°C保存の方が1°C保存よりも大きかった事から、今回の実験の範囲でも解糖系が働き、しかも初期pHが高く、温度が高いほど反応がより大きく進むことが確認された。

2,3-DPGはpHの差が0.09という細かい差でも、各群間で有意な差を認めた。この事は、2,3-DPGの保持にpHがいかに大きく関与しているかを示している。

一方、ATPはpH、温度差比較いずれでも差を認めず、実験Ⅰでも1週間の値では両者に差は見られなかった。これまでの報告¹²⁾¹⁵⁾でも同様な結果が出ており、1~2週間の保存ではpHおよび温度による差は少ないものと思われた。しかし、3週間以上の保存では低温保存の方が高く保たれており¹²⁾²⁰⁾、ATPはpHの影響より温度の影響の方が大きいと思われた。

電解質に関しては、Na⁺とK⁺では異なった動きが見られた。赤血球のNa⁺, K⁺の膜輸送は、Na-K-ATPaseに依存するNa-Kポンプの他に、受動輸送であるNa⁺/K⁺cotransport系や、Na⁺/Na⁺交換系、Na⁺/H⁺交換系などの存在もわかっている¹⁾²⁾⁶⁾¹⁰⁾。Na-K-ATPaseは15°C以下で

は機能が低下する⁸⁾と言われるが、1週間の保存で血漿K⁺が増加したのは、低温保存によりNa-Kポンプが失活し、K⁺の流出量が増加したものと思われた。しかし、pHおよび温度により流出量に差があることは、Na-Kポンプの失活だけでは説明できない。電解質の流れとpHとの関係はこれまでも多くの報告があり³⁾⁴⁾¹¹⁾¹⁴⁾、K⁺の流出量はpH値により異なるという事も指摘されている³⁾⁵⁾が、今回の成績でも同様であった。このことはK⁺の増加はNa-Kポンプ以外の、pHおよび温度に左右される輸送系の変化の影響が大きいことを示している。一方、細胞内のpHは細胞外のpHの影響を直接受ける⁵⁾¹⁸⁾ため、乳酸添加直後のNa⁺の変化は乳酸添加による細胞内のH⁺の増加

に対して、Na⁺/H⁺交換系が働いてH⁺を排出し、Na⁺を取り込んだためと考えられる。この調整直後のNa⁺とH⁺との関係を示したのが図17-aである。

ところで、保存によるNa⁺の理論的な変化は、①pHによる(Na⁺/H⁺交換系)の変化(ΔNa^+)、②Na⁺/K⁺cotransport系による変化、③Na-Kポンプによる変化、④Na⁺/Na⁺交換系による変化などの和によると考えられるが、その内、③のNa-Kポンプは1℃ないし5℃ではほとんど働かず⁸⁾、また④は等交換であるとする、主に①と②により構成される。Na⁺の経時的変化量の実測値をmNa⁺とし、理論値と実測値の差をdNa⁺とすると $dNa^+ \approx ① + ② - mNa^+$ となり、dNa⁺はほ

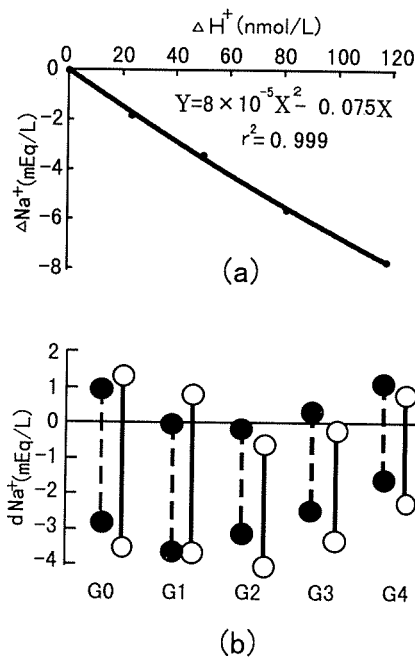


図17. 乳酸添加によるH⁺濃度, Na⁺の変化

(a) 乳酸添加直後のH⁺濃度の変化とNa⁺の変化との関係を示す。横軸にG0に対するG1~G4のH⁺濃度 (pHから換算) の変化量 (ΔH^+)を、縦軸にG0に対するG1~G4のNa⁺の変化量 (ΔNa^+)を示している。図中の式は両者の関係を二次回帰式で表している。

(b) 1週間保存後のNa⁺の理論値と実測値の差 (dNa⁺)

理論値は1週間保存後のpH(H⁺)値を基に図16-aの式から算出した値と、Na⁺/K⁺cotransport系からK⁺を基準として算出した値の和として求めた。

● ----- ● 5℃保存 ○ ----- ○ 1℃保存

上端はNa⁺/K⁺ stoichiometric ratioを1:1で、下端は1:1.5で計算した。

ほぼ0になるはずである。各群における dNa^+ を図17-bに示した。 $Na^+ : K^+$ の比が1:1ないし1:1.5でstoichiometricに移動する⁶⁾⁾事から、両者の幅を持たせて示した。1℃, 5℃ともG2(初期pH 6.831)を境としてグラフの向きが逆転している事から、pH6.8前後で Na^+ の出納のバランスが変化した、つまり赤血球膜を介した輸送機能がこの辺りで変化したものと推測する事ができる。一方、図12の K^+ の変化もG2の前後で変化の角度が変わっており、同様な結果を推測することができた。

電解質の変動は、これまで保存による赤血球の膜機能の劣化として解釈されてきたが、温度およびpHの影響ができるだけ交錯しないように配慮した本実験から、これらの保存による変化は主にpHが比較的高く保たれている保存初期に生ずるものであり、むしろ膜の生理的な機能による変化であることを示した。従って赤血球機能としては必ずしもマイナス要因としてとらえる必要はないものと考えられた。しかし、Honig⁹⁾⁾は1℃と37℃では Na^+ , K^+ とも流れの方向が逆になると報告しており、より厳密な測定には測定時の血液の温度コントロールも必要になるのかもしれない。

結 語

1) 実験 I

保存血中の2,3-DPGおよびATPをより高く保つという点では、S-EVAバッグによる1℃保存が優れていたが、血漿 K^+ の増加を抑える点では、5℃保存の方が優れていた。

2) 実験 II

①初期pHは1週間保存後のpH, 2,3-DPG, Na^+ , K^+ , 乳酸, 糖に影響を与えたが、ATPにはほとんど影響を与えなかった。

②保存温度の違い(1℃, 5℃)でも、ATP以外の上記全項目について差を認めた。特に2,3-DPGに関しては、高pH, 低温(1℃)の方がよく保持されていた。

③ Na^+ , K^+ の高pH, 低温(1℃)による変化は、赤血球膜ないしは膜輸送機能が保たれているために生じた現象と推測された。

④pH6.8前後を境として赤血球膜機能が変わると考えられることから、保存条件のみから考えると、pHは6.8以上に保つことが好ましく、またその点からはpHを長期間にわたって高値に維持できる1℃保存の方がより合理的であると思われる。

た。

稿を終えるにあたり、懇切なる御指導と御校閲を賜りました鳥取大学医学部麻酔・蘇生学教室佐藤暢教授、また御校閲を賜りました同内科学第二教室川崎寛中教授、同小児科学教室白木和夫教授に深謝いたします。また、終始御指導、御助言をいただきました同麻酔・蘇生学教室岡崎直人助手に心から感謝いたします。

文 献

- 1) Beauge, L. A. and Adragna, N. (1974). pH dependence of rubidium influx in human red blood cells. *Biochimica et Biophys Acta* 352, 441-447
- 2) Beauge, L. and Lew, V. L. (1977). Membrane transport in red cells., pp39-51. Academic press Inc, London
- 3) Brugnara, C., Thuong Van Ha and Tosteson, D. C. (1988). Properties of K^+ transport in resealed human erythrocyte ghosts. *Am J Physiol* 255, c346-c356
- 4) Cala, P. M., Anderson, S. E. and Cragoe, E. J., Jr. (1988). Na/H exchange-dependent cell volume and pH regulation and disturbances. *Comp Biochem Physiol* 90A, 551-555
- 5) Chipperfield, A. R. and Shennan, D. B. (1986). The influence of pH and membrane potential on passive Na^+ and K^+ fluxes in human red blood cells. *Biochimica et Biophys Acta* 886, 373-382
- 6) Duhm, J. (1987). Furosemide-sensitive $K^+(Rb^+)$ transport in human erythrocytes: modes of operation, dependence on extracellular and intracellular Na^+ , kinetics, pH dependency and the effect of cell volume and N-ethylmaleimide. *J Membrane Biol* 98, 15-32
- 7) Fantus, B. (1937). The therapy of the Cook county hospital. *JAMA* 109, 128-131
- 8) 藤田達士. (1980). 外科Mook No.13. pp97-104. 金原出版株式会社. 東京
- 9) Honig, A., Oppermann, H., Budweg, C., Goldbecher, H. and Freyse, E. J.

- (1994). Demonstration of temperature dependence of Na^+ - K^+ pump activity of human blood cells. *Am J Physiol* **266**, s10-s15
- 10) Lijnen, P., Groeseneken, D., Laermans, M., Lommelen, G., Piccart, Y. and Amery, A. (1984). Methodological assessment of assays for intracellular concentration and transmembrane fluxes of sodium and potassium in erythrocytes of man. *Meth and Find Exptl Clin Pharmacol* **6**, 293-301
- 11) Martin, A. M. Zade-Oppen, Adragna, N. C. and Tosteson, D. C. (1988). Effects of pH, potential, chloride and furosemide on passive Na^+ and K^+ effluxes from human red blood cells. *J Membrane Biol* **103**, 217-225
- 12) 西川健一, 佐藤暢, 岡崎直人, 小田貢, 實繁幸男. (1986). 血液低温保存の検討. *日輸会誌* **32**, 313
- 13) Parpart, A. K., Gregg, J. R., Lorenz, P. B., Parpart, E. R. and Chase, A. M. (1947). Whole blood preservation; A problem in general physiology. An in vitro analysis of the problem of blood storage. *J Clin Invest* **26**, 641-654
- 14) Rapoport, S. (1947). Dimensional, osmotic, and chemical changes of erythrocytes in stored blood. I. Blood preserved in sodium citrate, neutral, and acid citrate-glucose (ACD) mixtures. *J Clin Invest* **26**, 591-615
- 15) 笹川滋, 柴雅之, 村徹, 中島隆, 鈴木洋司, 前田信治. (1991). 濃厚赤血球用添加剤MAPについて. *日輸会誌* **37**, 398-403
- 16) Strumia, M. M. (1954). Methods of blood preservation in general and preparation, preservation and use of red cell suspensions. *Am J Clin* **24**, 260-265
- 17) 竹岡友文 (1940). 血液保存に関する実験的研究. *京都府立医大誌* **29**, 933-1049
- 18) Tsuda, S., Tomoda, A. and Minakami, S. (1975). Intracellular pH (pHi) of red cells stored in acid citrate dextrose medium -Effects of temperature and citrate anions-. *J Biochem* **78**, 469-474
- 19) 八幡義人 (1994). 赤血球. pp30-66. 中外医学社. 東京
- 20) Yamamura, H., Miyahara, M. and Kimura, T. (1991). Successful 0 °C liquid preservation of red blood cells. *Int J Hemat* **54**, 189-194