

# エチレンジアミン四酢酸二ナトリウム保存液に 保存中の血液のブドウ糖及び乳酸の消長について

昭和36年2月28日受付

朝鮮大学校薬学大学生化学教室

金 滄 淇

## Effects of Ethylenediamine Tetraacetate on Glucose Disappearance and Lactic Acid Production in Stored Human Blood

N. K. KIM M. D.

From the Department of Biochemistry Pharmaceutical College  
of Chosun University, Kwang Joo, Korea

### 緒 論

EDTA-Na<sub>2</sub><sup>①</sup> (Disodium-ethylene-diamine-tetraacetate) は、その性質から血液中のカルシウムとキレート結合し、血液を非凝固性にする。更に血球膜に対しても良好であり、赤血球血小板の破壊をある程度抑制し、生体にも毒性が少く蓄積作用もなく速かに尿中に排泄される。それで血液の一般検査にテトラート、二重酢酸塩の代りにも使用出来るし、又血液の保存にも用いられている。血液の保存には現在テトラートを主成分とした ACD 液が多く使われ、EDTA-Na<sub>2</sub> はなお実用されていないが、多くの学者によつてその優秀な事が報告されている。そこで私は EDTA-Na<sub>2</sub> 保存血に於けるブドウ糖の消失と生成される乳酸を測定し、これの対照として ACD 液にはブドウ糖が含まれて居るので、其の生理的食塩水に保存した場合のブドウ糖消失、乳酸の生成を比較しさらに赤血球及び酵素系に影響の深い 2, 3 の薬品 (ATP<sup>②</sup>, グルタチオン<sup>③</sup>, ジニトロフェノール<sup>④</sup>) を添加し、ブドウ糖及び乳酸値の変動を検討した。

### 実験材料および方法

#### 1) 材 料

血液 5.0ml 当り Heparine Sodium (Upjohn Co. Z Inc 製) 1.0mg を (1000 units) 入れた注射器を用いて成人健康男子の正中静脈から採血し、良く混和した後  $2 \times 10^{-3}$  M-EDTA と  $2 \times 10^{-3}$  M-EDTA に ATP, グルタチオン (GSH), 2,4-ジニトロフェノール (2,4-DNP) を各々  $2 \times 10^{-3}$  M の濃度に添加したものと、0.9% 食塩溶液と 0.9% 食塩溶液に ATP, GSH, 2,4-ジニトロフェノールを  $2 \times 10^{-3}$  M 濃度に添加した溶液に浮遊し、試験管に各々分注し密封して

4°C 前後の冷蔵庫中に保存した。以上の操作は細菌の影響を避ける為に無菌的に行つた。

#### 2) 方 法

a) ブドウ糖は Somogyi-Nelson 法<sup>⑤</sup>によつて定量した。

b) 乳酸は次のような方法で測定した<sup>⑥</sup>。

血液浮遊液 1.0ml を試験管に取り、蒸溜水 7.0ml と 5% HPO<sub>4</sub> 1.0ml を加へて蛋白質を除去する為に 3000r.p.m., 5分間遠心した後、上層液 4.0ml を共栓付バイレックス試験管に取り、20% CuSO<sub>4</sub> 1.0ml と Ca(OH)<sub>2</sub> 1.0gm を加へて良く混和する。空試験としては水 4.0ml と 20% CuSO<sub>4</sub> 1.0ml, Ca(OH)<sub>2</sub> 1.0gm を加へて良く混和し、被検試験と同じ条件で冷蔵庫に30分間保存しながら、10分毎に振盪混和し、3000r.p.m., 10分間遠心上層液 1.0ml づつを各試験管に取り、冷水で攪拌しながら濃硫酸 3.0ml を加へ更に 0.1ml のヒドロキノン液 (アルコール 5.0ml にヒドロキノン 1.0gm を溶解したもの) を加へて熱水中で30分間加温させた後、冷水中にて20分間冷却し蒸溜水 5.0ml を加へて混和した後空試験を Blank として分光光度計を用いて 420m $\mu$  で optical density を測定し、乳酸量を標準曲線によつて算出した。

### 実験結果

#### a) ブドウ糖量測定

$2 \times 10^{-3}$  M-EDTA に保存した血液中のブドウ糖量は、保存1時間後には  $0.89 \pm 0.41$ , 1日後には  $0.908 \pm 0.142$  に多少増加したが、2日後には  $0.592 \pm 0.118$ , 4日後には  $0.49 \pm 0$  に急激に減少してから、6日後には  $0.584 \pm 0.15$  に増加した。EDTA に ATP を添加した保存血液では1時間後には  $0.653 \pm 0.25$  を示し、EDTA 単独の場合に比して減少している。1日後に

は  $0.89 \pm 0.195$  で1時間後に比し増加して居り、EDTA 単独の場合に比すれば別に差がない。2日後には  $0.418 \pm 0.22$  で1日後のものに比すれば、顕著に減少を見せているし、EDTA 単独の場合に比しても減少して居り、4日後には  $0.34 \pm 0.035$  に減少して居るし、6日後には  $0.605 \pm 0.18$  に増加しており、EDTA 単独の場合に比すれば減少している。又 EDTA に GSH を添加したものは、1時間後には  $1.01 \pm 0.34$  を示し、EDTA 単独の場合に比し顕著に増加して居り、1日後には  $0.83 \pm 0.365$  にて減少して居り、2日後には  $0.472 \pm 0.23$  に急激な減少を見せており、4日後には  $0.356 \pm 0.09$ 、6日後には  $0.735 \pm 0.12$  に増加したが、EDTA 単独の場合に比すれば矢張り減少して居る。

EDTA に 2,4-ジニトロフェノールを添加した保存血液のブドウ糖は1時間後には  $1.01 \pm 0.455$  で EDTA 単独の場合より増加して居るが、1日後には  $0.522 \pm 0.09$  に減少して居り、2日後には  $0.546 \pm 0.039$ 、4日後には  $0.455 \pm 0.045$  に著しく減少したが、6日後には  $0.855 \pm 0.22$  に増加して居る。大体保存4日後に於て最も高い減少率を見せている。(第1表参照)

食塩液に浮游した血液中のブドウ糖量は、1時間後には  $1.06 \pm 0.26$  で EDTA に浮游したものより増加し1日後には  $0.535 \pm 0.24$  に減少したが、2日後には

$1.107 \pm 0.36$  に増加した。

4日、6日後には全部零(0)になつたが食塩に ATP を添加した浮游液中のブドウ糖は、1時間後には  $0.731 \pm 0.34$  に食塩単独の時より顕著に減少を見せて居り、1日後には  $0.59 \pm 0.26$  に多少減少したが2日後には  $1.035 \pm 0.43$  に増加し、4日後には零(0)になつたが、6日後には更に  $0.474 \pm 0.23$  増加した。

又食塩に GSH を添加したものは、1時間後には  $0.731 \pm 0.14$  となり食塩単独の時よりも相当に減少して居るが、1日後には  $0.47 \pm 0.17$  に減少して居り更に2日後には  $0.997 \pm 0.118$  に増加、4日後には零(0)になり、6日後には  $0.616 \pm 0.09$  に増加した。食塩に 2,4-ジニトロフェノールを添加させたものでは1時間後には  $0.808 \pm 0.26$  になり、食塩単独の時にくらべれば減少したが、ATP 若しくは GSH を加へた者にくらべれば増加して居る。1日後には  $0.695 \pm 0.31$  2日後には  $0.96 \pm 0.15$  に1日後のものより増加して居るが、食塩単独の時よりは減少して居る。4日後のは零(0)に減少し、6日後には  $0.48 \pm 0.06$  に減少して居る。

大体食塩に薬物を添加した浮游液中のブドウ糖は、4日後には凡て零(0)となる。(第2表参照)

#### b) 乳酸量測定

EDTA に浮游した血液中の乳酸は、保存1時間後

第1表 EDTAを加えて保存した血液およびそれに薬物を添加した場合の糖量の時間的变化

保存日数	例数	EDTA 及び EDTA に薬物を添加させた溶液の血糖量 (mg/ml)			
		EDTA	EDTA+ATP	EDTA+GSH	EDTA+2,4-DNP
1時間		$0.89 \pm 0.41$	$0.653 \pm 0.26$	$1.01 \pm 0.43$	$1.01 \pm 0.455$
1日		$0.908 \pm 0.142$	$0.89 \pm 0.195$	$0.83 \pm 0.365$	$0.522 \pm 0.09$
2日		$0.592 \pm 0.118$	$0.418 \pm 0.22$	$0.472 \pm 0.23$	$0.546 \pm 0.39$
4日		$0.49 \pm 0.0$	$0.34 \pm 0.036$	$0.356 \pm 0.45$	$0.455 \pm 0.45$
6日		$0.854 \pm 0.15$	$0.605 \pm 0.18$	$0.735 \pm 0.12$	$0.855 \pm 0.22$

第2表 生理的食塩水を加えて保存した血液およびそれに薬物を添加した場合の糖量の時間的变化

保存日数	例数	NaCl 及び NaCl に薬物を添加させた溶液の血糖量 (mg/ml)			
		NaCl	NaCl+ATP	NaCl+GSH	NaCl+2,4-DNP
1時間	4	$1.06 \pm 0.26$	$0.731 \pm 0.34$	$0.731 \pm 0.14$	$0.808 \pm 0.25$
1日	4	$0.536 \pm 9.24$	$0.59 \pm 0.26$	$0.47 \pm 0.17$	$0.695 \pm 0.35$
2日	4	$1.107 \pm 0.36$	$1.035 \pm 0.43$	$0.997 \pm 0.118$	$0.96 \pm 0.15$
4日	4	0	0	0	0
6日	4	0	$0.474 \pm 0.23$	$0.616 \pm 0.09$	$0.48 \pm 0.06$

には  $43.36 \pm 15.14$ , 1日後には  $7.08 \pm 1.56$  に減少し, 2日後には  $116.37 \pm 2.835$  に著るしく増加を見せ, 4日後には  $28.65 \pm 6.05$  に減少し, 6日後には零(0)となった。EDTA に ATP を添加したものでは1時間後では  $24.52 \pm 1.96$  となり, EDTA 単独の場合に比しほぼ半分は減少して居る。1日後には  $9.14 \pm 1.43$  となり著しく減少し, 2日後には  $73.25 \pm 3.89$  に増加, 4日後には  $1.77 \pm 0.04$  に著るしく減少し, 6日後には零(0)となった。

EDTA に GSH を添加した血液では, 1時間後には  $23.4 \pm 6.96$  となり, EDTA 単独の場合に比し著るしく減少しているが, 1日後には  $33.01 \pm 8.79$  に増加, 2日後には  $101.04 \pm 1.96$  に著るしく増加し, 4日後には  $2.508 \pm 1.9$  に減少したが, 6日後には零(0)となった。

又 EDTA に 2,4-ジニトロフェノールを添加したものでは1時間後では  $34.07 \pm 1.36$ , 1日後には  $6.79 \pm 0.85$  に減少して居り, 2日後には  $26.93 \pm 1.12$  に増加したが, 再び4日後には  $20.45 \pm 1.46$  に減少し, 6日後には零(0)になった。殆んど薬物を添加させた浮游液に於ては EDTA のみを使用したものに比べて減少して居り, 6日後には全部乳酸の存在を証明し得ない。(第3表)

参照食塩に浮游した血液に於ては, 1時間後には

$52.29 \pm 4.35$ , 1日後には  $51.92 \pm 2.99$  に減少, 2日後には  $41.1 \pm 3.1$  に減少し, 4日後には  $42.77 \pm 3.38$  に増加し, 6日後には  $101.28 \pm 8.85$  に急激な増加を見せる。

食塩に ATP を添加したものでは1時間後には  $27.9 \pm 2.17$  となり, 食塩単独の場合に比し著るしく減少したが, 1日後には  $26.4 \pm 6.06$  となり, 2日後には  $20.06 \pm 0$  に減少し, 4日後には  $51.13 \pm 2.81$  に増加し, 6日後には  $35.4 \pm 1.02$  に減少した。

食塩に GSH を添加したものでは1時間後には  $51.9 \pm 3.36$  となり食塩単独の場合と似ており, 1日後には  $26.01 \pm 0.09$  に著るしく減少し, 2日後には  $7.9 \pm 2.7$  に減少し, 4日後には  $33.23 \pm 5.28$  に増加し, 6日後には  $62.68 \pm 8.78$  に急激に増加した。

食塩に 2,4-ジニトロフェノールを添加したものでは, 1時間後では  $20.53 \pm 8.02$  となり, 1日後には  $24.04 \pm 1.69$  となり, 1時間後より増加しており, 2日後には  $29.5 \pm 4.3$  に増加し, 4日後には  $17.7 \pm 1.56$  となり著るしく減少する。更に6日後には  $67.11 \pm 6.5$  に増加する。(第4表参照)

#### 考 察

EDTA-Na<sub>2</sub> (Disodium-ethylene-diamine-tetraacetate) は血液中の Ca とキレート結合し, 血液を非

第3表 EDTAを加えて保存した血液およびそれに薬物を添加した場合の乳酸量の時間的变化

保存日数	例数	乳 酸 量 (γ/ml)			
		EDTA	EDTA+ATP	EDTA+GSH	EDTA+2,4-DNP
1時間	4	$43.36 \pm 1.541$	$24.52 \pm 1.96$	$23.4 \pm 6.96$	$34.07 \pm 1.36$
1日	4	$7.08 \pm 1.56$	$9.14 \pm 1.48$	$33.01 \pm 8.74$	$6.786 \pm 0.85$
2日	4	$116.37 \pm 2.8$	$73.25 \pm 3.89$	$101.04 \pm 1.99$	$26.93 \pm 1.27$
4日	4	$28.67 \pm 6.05$	$1.77 \pm 0.04$	$2.508 \pm 1.9$	$20.45 \pm 1.27$
6日	4	0	0	0	0

第4表 生理的食塩水を加えて保存した血液およびそれに薬物を添加した場合の乳酸量の時間的变化

保存日数	例数	乳 酸 量 (γ/ml)			
		NaCl	NaCl+ATP	NaCl+GSH	NaCl+2,4-DNP
1時間	4	$52.39 \pm 4.35$	$27.9 \pm 2.17$	$51.9 \pm 3.36$	$20.53 \pm 8.02$
1日	4	$51.92 \pm 2.99$	$26.4 \pm 6.06$	$26.01 \pm 0.09$	$24.04 \pm 1.69$
2日	4	$41.1 \pm 3.98$	$20.06 \pm 0.0$	$7.9 \pm 2.7$	$29.5 \pm 4.0$
4日	4	$42.77 \pm 3.98$	$51.13 \pm 2.81$	$33.23 \pm 5.28$	$17.7 \pm 1.56$
6日	4	$101.28 \pm 8.85$	$35.4 \pm 1.02$	$62.68 \pm 8.78$	$67.11 \pm 6.5$

凝固性にする。更に血球膜に対しても良好であり、赤血球、血小板の破壊もある程度抑制し、生体にも毒性が少なく蓄積作用もなく、速かに尿中に排泄され、大量に生体内に注入すると、生体内のカルシウムを奪つてテタニー、血圧下降、ショックなどの危険も考へられるし、又血液の凝固機序に対しても可成り強く障害を及ぼしている。故に保存液として色々な難点もあるが、本実験は只 EDTA 保存血液中の糖消費系の安定性を生理的食塩水保存血液と比較して見た。

1)  $2 \times 10^{-3}$  M EDTA に浮遊させた血液の血糖を Nelson-Somogyi 法で測定してみたところ、保存1日後最高値に達し、4日目最低値 0.49mg/ml に達し、6日目には更に上昇して 0.854mg/ml に達している。0.9%食塩水に保存した血糖を同じ方法にて測定したところ、2日目に最高値 1.107mg/ml に達し、4日目以後は零に達して上昇していない。又 EDTA に比し屈曲が甚だしい曲線に表はれたように EDTA に浮遊させた方が血糖消耗が緩慢で、且つ4日になつても零には達しない。4日後に於て両方共に血糖値が上昇しているのは、赤血球の保存中に漸次的溶血に伴う高分子、含糖、物質の破壊に由来するブドウ糖値ではないかと思はれる。EDTA +  $2 \times 10^{-3}$  M-ATP および 0.9% 食塩水 +  $2 \times 10^{-3}$  M-ATP 両方に血液を保存して比較した。ATP は解糖を最高度に保持するに役立つのは既知の事実である。ところが本実験に於ける所見は EDTA 単独の場合と大差なく、食塩水に保存したものに比して4日目に零になるのが、EDTA + ATP の方は4日目の零が6日目には上昇して 0.474 mg/ml に達している。

GSH は  $3 \times 10^{-3}$  M で保存血の Hexokinase の活性を促進するといはれ<sup>①</sup>本実験に於ても EDTA +  $2 \times 10^{-3}$  M GSH と 0.9% 食塩水 +  $2 \times 10^{-3}$  M GSH とに血液を浮遊させて見た所、糖消費系には EDTA 単独の場合に比して大差を見ないが、0.9% 食塩水に浮遊した場合に比して 0.9% 食塩水 +  $2 \times 10^{-3}$  M GSH の方が 0.9% 食塩水の場合と同じ曲線を描いている。2,4-ジニトロフェノール<sup>②</sup>(2,4-DNP) は酸化的リン酸化の非共軛性を有する代表的な薬品で、EDTA +  $2 \times 10^{-3}$  M 2,4-DNP および 0.9% 食塩水 +  $2 \times 10^{-3}$  M 2,4-DNP に血液を浮遊させ血糖の変動を見たが、血糖曲線は EDTA + ATP 又は EDTA + GSH 又は 0.9% 食塩水 + ATP, 0.9% 食塩水 + GSH などと大した変化を見ない。以上の諸成績より1週間位の保存では添加した薬物によつてそれ程影響がなかつたといえる。

2) EDTA および食塩水に血液を保存し生成され

る乳酸を見ると EDTA の場合には2日目に最高値を呈し6日目には零となつた。すなわち、ブドウ糖の消耗と共に1日ぐらゐおくれで乳酸の上昇を見ているが、6日目に完全に乳酸の消失を来すのは解糖の Embden-Meyerhof 経路が終結されて乳酸の生成がなくなつたものと思はれる。

EDTA + GSH, EDTA + ATP の場合にも曲線は EDTA 単独の場合と同一であるが、ただ2日目の最高値が EDTA だけの場合は  $116.37 \pm 2.8$ , EDTA + ATP の場合には  $73.25 \pm 3.89$ , EDTA + GSH の場合は  $101.04 \pm 1.66$  を示して居り、EDTA + 2,4-DNP のみは比較的平坦な曲線を描きながら低下している。

0.9% 食塩水に保存した血液の乳酸の変動を見ると、NaCl 単独の場合は4日迄はほぼ直線を描いて平行に進み、6日目には 100 $\gamma$ /ml 迄上昇している。NaCl + GSH の場合は2日目に最低を示し上昇して居り、NaCl + 2,4-DNP の場合には4日目に零に達して更に上昇している。EDTA に保存した場合に比して、すべて最低値に早く到達する事が分るが、之等は EDTA に保存した場合よりも、赤血球の溶血にともなう高分子含糖物質の破壊が NaCl に保存させた場合の方が早く起る事を意味するものと思はれると同時に、乳酸の測定値が増加するのは、乳酸の代謝及び吸収が不十分で蓄積されるのではないかと推測される。

## 結 論

1) 血液を 0.9% 食塩水に保存するよりは  $2 \times 10^{-3}$  M EDTA 液に保存した方が、溶血に供する高分子含糖物質の破壊をより良く防止し血糖の消耗を保護し、且つアデノシン三リン酸、グルタチオン、2,4-ジニトロフェノールなどの薬品添加に由る血糖量の変動は1週間位の短期にはそれ程影響をあたえない。

2) 0.9% 食塩水に浮遊させた赤血球は、約4日目から急激な溶血に伴う高分子含糖物質の破壊を起し、EDTA に保存したものでは、それ程急激な溶血に供する高分子含糖物質の破壊が起らない。

3) EDTA 液に保存した血液の乳酸量は EDTA 単独の場合も、ATP, グルタチオン, 2,4-ジニトロフェノールなどを添加した場合も、何れも数値の差はあるが、保存2日目に最高値を示し、6日目には零(0)になつて完全に消失したが、0.9% 食塩水に保存したものは食塩水 + 2,4-ジニトロフェノールの場合を除いてかえつて低下し、以後4日目よりは急進的に上昇した。これは、乳酸の生成は増加するが、乳酸代謝及び吸収が不十分で、蓄積される現象ではないかと思はれる。

## 文 献

- ①加藤勝治：最新医学 11卷11号 昭和31年。 ②峰島靖代：生化学 31. 8. 1959。 ③進和 健：日薬理誌 55. 5. 1959。 ④赤堀四郎・編：酵素研究法Ⅱ及Ⅲ 昭和35年版。 ⑤Nelson, N.: J. Biol. Chem. 153. 375. 1944。 ⑥Barker, S. B. and Summerson, W. H.: J. Biol. Chem 138. 535. 1941。 ⑦峰島靖代：生代学 31. 6. 1959。

## ABSTRACT

The effects of EDTA added in vitro to stored human blood on glucose disappearance and lactic acid production were compared with those of NaCl added without the supplementation of EDTA. Also the comparisons were made in the presence of ATP, Glutathione and dinitrophenol.

The glucose level of human blood stored in 0.9% saline solution both with and without the supplementation of  $2 \times 10^{-3}$  M EDTA showed the lowest value at the 4th day of storage and then gradually increased again. However, the glucose disappearance was greater when the blood was stored in plain saline solution than when stored in saline plus EDTA solution. It

was also found that the addition of ATP, glutathione or 2,4-dinitrophenol does not alter significantly the pattern of glucose disappearance.

The lactic acid production of human blood stored in plain saline solution gradually decreased until the 2nd day of storage except when stored in saline plus dinitrophenol solution which showed the increased level of lactic acid at the 2nd day of storage. At the 4th day storage, the production of lactic acid increased abruptly in all of ATP, glutathione or dinitrophenol added saline solution as well as in plain saline solution. On the contrary, the lactic acid production, when EDTA was supplemented, reached maximum at the 2nd day of storage and then decreased rapidly to almost Zero throughout the last day of observation, e. g. the 6th day of storage. It was also observed that the addition of ATP and glutathione exerts little effect on the pattern of lactic acid production, whereas the addition of dinitrophenol prevented the abrupt change of lactic acid production in EDTA-supplemented solution.