

Rouleaux formation に関する知見補遺

第三編 Rouleaux formation の機序について

昭和34年10月29日 受付

信州大学医学部法医学教室 (指導: 野田金次郎教授)

萩 原 昭

Supplementary Studies on the Rouleaux formation

Part III On the Mechanism of the Rouleaux formation

Akira Ogihara

Department of Legal Medicine, Faculty of Medicine, Shenshu University

(Director: Prof. Kninjiro. Noda)

まえがき

第二編^①に於て Rouleaux formation (以下 R. f. と略記) に関する基礎的検討を行つたが、本編に於ては R. f. 生起の原因について赤血球の側及び血漿成分の側について別々にそれを追求し、併せて強い R. f. が抗原抗体反応に基く真の凝集反応とまぎらわしい点があるので、実地上のその対策などについて行つた実験を記述する。

第一章

R. f. の血球の側からの検討

実験方法

赤血球の側からその連鎖形成に関与すると思はれる要素を検討するため、採取した血球を生理的食塩水でよく洗滌した後(数回の洗滌によつて強い形態変化は殆ど起らぬことは第二編で述べた)、Rouleaux forming property を有する媒体中に之を浮遊させる実験を行つた。連鎖形成能の差異を検するため媒体を生理的食塩水で2, 3, 4倍と稀釈したものに各人の赤血球を浮遊させ第二編に於て述べたホールオブエクト法で鏡検する(強さの判定は第二編記載)と同時に Westergren 氏赤血球沈降速度測定用の沈降ピペット(内径2.5mm, 長さ30cm, 目盛mm)を使用し、生理的食塩水でよく洗滌した赤血球泥を20%の濃度になる様ガラス管に浮遊させ、之を沈降用ピペットに目盛迄吸い上げ固定台に立て1, 2, 3, 4時間の沈降状態を観察した。媒体中で R. f. を強く起した血球塊はその半径が大となるので Stoke の法則に従つて沈降速度も速くなると考へられるので、同一媒体中での各個体の赤血球の連鎖形成の強弱を沈降速度によつて間接に知ることができるといふ想定の下に企図したものである。

次に各洗滌血球の NaCl 溶液中に於ける滲透圧抵抗と連鎖形成能との関係を検する目的で、前の二つの実験と平行してメルク製 NaCl での 0.42, 0.44, 0.46,

0.48, 0.50, 0.52 g/dl の濃度の溶液を調整し、その 5.0cc 中に生理的食塩水で2回(3,000r.p.m. 5分間遠沈)洗滌して得た赤血球泥 0.01cc を混じよく振盪混和し 37°C 振盪浴中に60分放置後 3000 r.p.m. 5分の遠心沈澱によりえた上清について分光々電光度計(イトー超短波)を用いて各管の吸光度を求めた。同時に対照として各々の血球泥 0.01cc を 5.0cc の蒸溜水中に入れ同一条件で完全に溶血させたものの吸光度を100して各々の濃度に於ける吸光度の百分率を求め滲透圧抵抗を比較した。尚測定には Hb の吸収曲線より 540m μ のピークの波長を用いた。

実験成績

i) 健康人赤血球のガラス管中に於ける R. f. 表1に示す如く生後4ヶ月より47才までの健康人男女40人についてその赤血球の連鎖形成能をしらべたところ、生理的食塩水で2倍に稀釈したガラス管中に於ては Rouleaux はかなり小さく10倍以下の赤血球よりなるものが大部分で中には Rouleaux をつくりず遊離した血球も混じっている。3倍に稀釈するといづれの赤血球にも R. f. はみられず、すべて遊離の状態に止つている。従つて同一媒体に対して各人の赤血球には年令性別を問はず、Rouleaux を形成する傾向に特に強い差異はないと考へられる。尚附属病院産婦人科よりえた臍帯血について同様の検査を行つたところ一定の Rouleaux forming property を有する媒体に対し成人血球と全く同様の態度をとりその間に特別な差異は認められなかつた。

ii) 滲透圧抵抗及び沈降速度と R. f. との関係

表2(a), (b), に示される如く健康人と種々の疾患時との間に R. f. の上からも又一定媒体中に同一濃度に浮遊させ同じ条件で沈降速度をみた場合にも差異は認められず、赤血球の滲透圧抵抗と沈降速度も、沈降速度の遅いもの(球形化して R. f. を起しに

表1 comparison of rouleaux forming property of each sound person's red blood cell suspended in plasgen

No.	Sex	Age	R. forming property of each red cells			No.	Sex	Age	R. forming property of each red cells		
			×1	×2	×3				×1	×2	×3
1	M	46	++	+	-	21	M	40	++	+	-
2	M	31	++	++	-	22	F	47	++	+	-
3	F	48	++	++	-	23	M	37	+++	+	-
4	F	30	++	++	-	24	M	27	+++	++	-
5	M	46	+	+	-	25	M	35	+++	++	-
6	M	45	++	++	-	26	M	32	+++	+	-
7	F	19	++	++	-	27	M	33	+++	+	-
8	M	30	++	+	-	28	F	42	+++	+	-
9	M	31	++	++	-	29	M	38	+++	+	-
10	F	19	++	+	-	30	F	35	++	+	-
11	M	32	++	+	-	31	M	42	++	+	-
12	M	40	++	+	-	32	M	4 M	++	+	-
13	M	25	++	+	-	33	F	4 M	++	+	-
14	M	37	+++	+	-	34	F	6 M	++	+	-
15	F	32	++	+	-	35	M	6 M	++	+	-
16	M	40	++	+	-	36	M	14	+++	+	-
17	M	41	++	+	-	37	M	14	+++	+	-
18	M	33	++	+	-	38	F	14	++	+	-
19	M	34	+++	+	-	39	F	14	++	+	-
20	F	31	+++	+	-	40	F	14	+++	+	-

くいものと考へられる) 程滲透圧抵抗が小であろうという予想とは必ずしも一致せず、その間に整然とした因果関係をうかがわせる様な結果はえられなかつた。

実験に用いた血球は出来るだけ他の因子の介入を防ぐために同一条件で採血し少くとも採血後4時間以内に処理したが、No 17, 18 (表2, (a)) は特に日時を経過した血球が如何なる態度をとるかを知らるために採血後1日室温・24°C前後) に放置し4°C氷室内に3日置いた後処理したものであるが、この血球は自己血漿中でもすでに殆ど球形化しており、プラスゲン中に於て R. f. を起さず、沈降速度は No 17 は5時間までは浮游血球の境界が全く不明で、6時間以上経過して漸く境界が認められる様になり 104mm であつた。No 18 は1時間値 2mm、2時間値 70mm と他のものに比して非常に遅く、沈降管内でも全く R. f. を起さないものと考へられた。この二者の滲透圧抵抗は前者は最低 NaCl 濃度で 37.4%，後者は 70.2% で他の健康人新鮮血球の変動範囲内であつた。このことから古くなり浮游状態でその殆どが球形化した赤血球は Rouleaux forming property を有する媒体中でも全く Rouleaux を形成せず、従つて沈降用ビベット内での沈

降速度も集塊形成がないため遅延すること、いいかえれば Suspension Stability が大であることが理解される。

溶血性貧血、鉄缺乏性貧血、動脈硬化症、肝腎疾患、悪性腫瘍、心疾患などの内科的疾患、及び虫垂炎、胃十二指腸潰瘍、化膿性乳腺炎などの術後3～7日の患者の赤血球について同様の検査を行つたところ(疾患名は表4b参照)、R. f. についてはホールオブエクト法、沈降速度測定法共健康人赤血球と大差が認められず滲透圧抵抗は健康人の場合と比較すると図1及び2に示される如く疾患時の血球の溶血率の変動範囲は健康人のそれに比して幅が広いのが認められた。

第二章

R. f. の血漿及び血清の側からの検討

1) 正常人血清中に於ける同一赤血球の R. f. の態度

実験方法

静脈より採血し自然に凝固した血液より分離した血清を非動化せずに用いた。R. f. を検するには一定のO型健康人赤血球をチトラート加生理的食塩水でよく洗滌し血漿成分を完全にとり除いたものを、被検血清を

表 2 relations to osmotic resistance and sedimentation velocity of sound
(a) person's red blood cells and to it's rouleaux forming property

No.	Sex	Age	R.f. of each red cells sus. in Plasgen	osmotic resistance of each red cells in different concentration of NaCl solution								sedimentation velocity of each red cells in Plasgen (m. m)			
				×1 ×2 ×3	0.42%	0.44%	0.46%	0.48%	0.50%	0.52%	Aq. control	1 Hr	2 Hr	3 Hr	4 Hr
1	M	32	++ + -	0.50 100%	0.48 86%	0.37 74%	0.28 56%	0.11 22%	0.07 1.4%	0.50 100.0%	113	118	121	124	
2	F	25	+++ + -	0.53 88.3%	0.49 81.6%	0.44 73.3%	0.35 58.3%	0.25 43.3%	0.09 1.5%	0.50 100.0%	129	133	139	142	
3	M	31	++ + -	0.44 77.2%	0.35 61.8%	0.33 57.9%	0.22 38.6%	0.21 36.8%	0.05 8.8%	0.57 100.0%	113	117	122	125	
4	M	26	++ + -	0.28 59.6%	0.18 38.4%	0.07 14.4%	0.04 8.5%	0.02 4.3%	0.01 2.2%	0.47 100.6%	117	121	124	128	
5	M	42	++ + -	0.29 67.4%	0.26 60.4%	0.15 34.9%	0.11 25.6%	0.03 6.9%	0.02 4.7%	0.43 100.0%	119	123	126	130	
6	M	34	++ + -	0.46 86.8%	0.43 81.8%	0.25 47.2%	0.25 47.2%	0.02 3.8%	0.02 3.8%	0.53 100.0%	127	131	134	138	
7	F	33	++ + -	0.39 66.1%	0.24 40.6%	0.12 20.4%	0.08 13.6%	0.02 3.4%	0.00 0.0%	0.59 100.0%	100	105	110	114	
8	F	18	++ - -	0.38 70.4%	0.28 51.8%	0.14 25.9%	0.05 9.2%	0.005 0.9%	0.005 0.9%	0.54 100.0%	120	126	129	134	
9	F	18	++ - -	0.46 79.3%	0.37 63.8%	0.24 41.5%	0.12 20.7%	0.03 5.7%	0.005 0.9%	0.58 100.0%	120	128	131	135	
10	F	25	++ + -	0.44 93.6%	0.42 85.8%	0.38 77.4%	0.29 59.2%	0.15 30.6%	0.06 10.4%	0.49 100.0%	126	131	134	136	
11	F	27	++ + -	0.35 67.2%	0.30 57.7%	0.18 34.8%	0.10 19.3%	0.03 5.8%	0.01 1.9%	0.52 100.0%	116	119	121	124	
12	M	23	++ + -	0.47 87.0%	0.38 70.1%	0.11 20.4%	0.06 11.1%	0.01 1.9%	0.00 0%	0.54 100.0%	121	125	128	131	
13	M	34	+++ + -	0.29 54.6%	0.24 45.0%	0.11 20.8%	0.06 11.3%	0.02 3.7%	0.02 3.7%	0.53 100.0%	107	110	115	119	
14	M	32	++ + -	0.36 70.6%	0.28 55.0%	0.20 39.3%	0.18 35.4%	0.08 15.7%	0.01 2.0%	0.51 100.0%	117	120	123	126	
15	F	29	++ + -	0.52 96.4%	0.45 83.5%	0.40 74.0%	0.22 40.8%	0.13 24.1%	0.05 9.3%	0.54 100.0%	116	120	124	126	
16	M	14	++ + -	0.43 79.6%	0.35 64.9%	0.20 37.0%	0.14 25.9%	0.01 1.85%	0.01 1.85%	0.54 100.0%	115	119	123	125	
17	M	75	- - -	0.14 37.4%	0.07 19.0%	0.03 8.1%	0.01 2.7%	0.01 2.7%	0.00 0%	0.37 100.0%	?	?	?	?	
18	M	29	- - -	0.33 70.2%	0.28 59.6%	0.26 55.3%	0.14 29.8%	0.11 23.4%	0.08 17.0%	0.47 100.0%	2	70	73	78	
mean value												117	122	125	129

生理的食塩水で2倍、3倍、4倍と希釈したものの中に2%の濃度に浮遊させホールオブジェクト法で鏡検した。R.f.の強さは第二編記載の規準に依つた。

実験成績

7才から81才までの健康人100名の血清について検した結果は表3に示す如く2倍希釈までR.f.のみとめられるもの23名、原液のみにR.f.がみとめられるもの71名、3倍希釈ではR.f.を起す血清はなかった。

原液でも全くR.f.がみられない血清が100例中5

例にみられた。これらの血清については後述濾紙電気泳動で蛋白分劃について検討する。表から分る通り血清にはR.f.を起す強さに可成り個体差があることが知られた。

2) 血漿 Fibrinogen 値と R.f.との関係

実験方法

二重酢酸塩結晶（血液1ccに1mgの割）により凝固を阻止した血液より3000 r.p.m. 15分間遠沈して得た血漿について松岡氏法^{②③④}によりFibrinogen値を測定し、併せて各血漿を生理的食塩水で1, 2, 3, 4

表 2 relations to osmotic resistance and sedimentation velocity of diseased
(b) person's red blood cells and to its rouleaux forming property

No.	Sex	Age	R. f. of each red cells sus. in Plasgen			osmotic resistance of each red cells in different concentration of NaCl solution						sedimentation velocity of each red calls in Plasgen (m. m)				
			×1	×2	×3	0.42%	0.44%	0.46%	0.48%	0.50%	0.52%	Aq. control	1 Hr	2 Hr	3 Hr	4 Hr
1	F	32	卅	+	-	0.47 85.4%	0.47 85.4%	0.47 85.4%	0.45 81.7%	0.21 38.2%	0.13 23.6%	0.55 100.0%	123	127	129	130
2	M	48	卅	+	-	0.41 82.0%	0.38 76.0%	0.31 62.0%	0.27 54.0%	0.06 12.0%	0.02 4.0%	0.05 100.0%	123	127	132	134
3	M	62	卅	-	-	0.28 52.8%	0.17 32.0%	0.05 9.4%	0.02 3.8%	0.00 0%	0.00 0%	0.53 100.0%	120	121	124	126
4	M	27	卅	-	-	0.11 26.2%	0.08 19.1%	0.07 16.7%	0.05 11.9%	0.03 7.2%	0.02 4.8%	0.42 100.0%	100	105	105	107
5	F	14	卅	+	-	0.37 87.8%	0.33 78.4%	0.37 87.8%	0.30 71.5%	0.28 66.6%	0.12 28.6%	0.42 100.0%	121	124	129	130
6	F	28	卅	+	-	0.13 26.0%	0.09 18.0%	0.07 14.0%	0.01 2.0%	0.00 0%	0.00 0%	0.50 100.0%	102	102	103	104
7	M	46	卅	+	-	0.31 73.7%	0.26 61.8%	0.26 61.8%	0.15 35.7%	0.13 31.0%	0.02 4.8%	0.42 100.0%	131	128	129	131
8	F	48	卅	卅	-	0.42 80.6%	0.39 75.0%	0.35 67.4%	0.31 59.6%	0.27 52.0%	0.14 26.8%	0.52 100.0%	125	129	132	134
9	M	61	卅	-	-	0.52 100%	0.34 65.4%	0.34 65.4%	0.30 57.6%	0.28 53.8%	0.15 28.8%	0.52 100.0%	125	129	133	134
10	M	63	卅	+	-	0.04 8.4%	0.03 6.3%	0.02 4.2%	0.01 2.1%	0.00 0%	0.00 0%	0.48 100.0%	110	128	115	117
11	F	29	卅	+	-	0.42 80.0%	0.38 76.0%	0.36 71.2%	0.20 40.0%	0.15 30.0%	0.02 4.0%	0.50 100.0%	118	113	117	119
12	F	57	卅	+	-	0.60 99.0%	0.56 92.0%	0.55 90.2%	0.50 82.0%	0.50 82.0%	0.08 13.2%	0.61 100.0%	119	116	127	129
13	F	46	卅	+	-	0.40 89.0%	0.38 84.5%	0.32 71.0%	0.18 40.0%	0.02 4.5%	0.02 4.5%	0.45 100.0%	120	125	125	127
14	M	32	卅	+	-	0.35 72.9%	0.24 50.0%	0.03 6.3%	0.03 6.3%	0.01 2.1%	0.01 2.1%	0.48 100.0%	117	122	128	131
15	M	48	卅	+	-	0.35 83.4%	0.18 42.9%	0.03 7.2%	0.03 6.3%	0.01 2.4%	0.00 0%	0.42 100.0%	117	121	127	131
16	M	22	卅	+	-	0.32 66.5%	0.18 37.6%	0.03 6.3%	0.01 2.4%	0.01 2.1%	0.01 2.1%	0.48 100.0%	116	121	124	129
17	F	11	卅	+	-	0.29 70.7%	0.16 39.0%	0.02 4.9%	0.01 2.1%	0.01 2.5%	0.01 2.5%	0.41 100.0%	115	118	121	128
18	M	19	卅	+	-	0.29 76.1%	0.16 43.1%	0.07 18.8%	0.02 4.9%	0.02 5.3%	0.00 0%	0.38 100.0%	122	114	132	136
19	M	50	卅	+	-	0.37 88.0%	0.20 47.6%	0.08 21.4%	0.03 7.9%	0.03 7.2%	0.01 2.4%	0.42 100.0%	115	129	123	128
20	M	47	+	+	-	0.23 50.0%	0.14 30.4%	0.04 8.7%	0.02 4.8%	0.00 0%	0.00 0%	0.46 100.0%	100	119	112	117
21	M	39	卅	卅	-	0.43 89.6%	0.20 41.7%	0.03 6.3%	0.02 4.4%	0.01 2.1%	0.01 2.1%	0.48 100.0%	104	105	115	118
22	F	45	卅	卅	+	0.29 78.5%	0.18 48.7%	0.02 5.4%	0.02 5.4%	0.01 2.7%	0.00 0%	0.37 100.0%	107	108	116	120
23	F	26	卅	卅	-	0.35 81.5%	0.27 62.8%	0.20 46.5%	0.35 11.6%	0.05 11.6%	0.01 2.3%	0.43 100.0%	110	112	116	119
24	M	36	卅	卅	+	0.32 78.0%	0.30 75.0%	0.10 25.0%	0.03 7.5%	0.01 2.5%	0.01 2.5%	0.04 100.0%	116	113	125	127
25	M	40	卅	+	-	0.41 85.4%	0.19 39.8%	0.04 8.3%	0.02 4.2%	0.01 2.1%	0.01 2.1%	0.48 100.0%	109	119	115	119
26	M	52	卅	+	-	0.37 95.0%	0.21 54.0%	0.05 12.8%	0.05 12.8%	0.02 5.1%	0.02 5.1%	0.39 100.0%	116	113	125	128
27	F	20	卅	卅	-	0.28 61.0%	0.15 32.6%	0.04 8.7%	0.03 6.5%	0.01 2.2%	0.01 2.2%	0.46 100.0%	114	120	122	127
mean value													115	119	122	125

表3 comparison of rouleaux forming property of each sound person's Sera

No.	Sex	Age	R. forming property of each plasma			No.	Sex	Age	R. forming property of each plasma		
			×1	×2	×3				×1	×2	×3
1	M	58	-	-	-	45	M	18	+	-	-
2	M	54	+	+	-	46	M	15	+	+	-
3	M	9	+	-	-	47	F	49	+	+	-
4	M	9	+	-	-	48	M	51	+	-	-
5	M	9	+	-	-	49	M	28	-	-	-
6	M	9	+	-	-	50	F	21	-	-	-
7	M	9	+	+	-	51	M	67	+	+	-
8	M	9	+	+	-	52	F	63	+	+	-
9	M	9	+	-	-	53	F	53	+	+	-
10	M	9	+	-	-	54	M	22	+	-	-
11	F	70	+	-	-	55	M	33	+	-	-
12	F	66	+	-	-	56	F	28	+	-	-
13	M	43	+	-	-	57	M	52	+	-	-
14	M	49	+	-	-	58	F	52	+	+	-
15	F	11	+	+	-	59	F	24	+	+	-
16	F	9	+	-	-	60	F	41	+	-	-
17	F	9	+	-	-	61	F	53	+	-	-
18	F	9	+	-	-	62	F	66	+	-	-
19	F	9	+	-	-	63	F	72	+	+	-
20	F	9	+	-	-	64	M	24	+	-	-
21	M	7	+	-	-	65	M	12	+	-	-
22	M	7	+	+	-	66	M	12	+	-	-
23	M	7	+	-	-	67	M	12	+	+	-
24	F	7	+	-	-	68	F	49	+	-	-
25	F	7	+	-	-	69	F	46	+	-	-
26	F	7	+	+	-	70	F	40	+	+	-
27	M	10	+	-	-	71	M	60	+	-	-
28	M	10	+	-	-	72	M	12	+	+	-
29	F	10	+	-	-	73	F	19	+	-	-
30	F	10	+	-	-	74	M	39	+	-	-
31	F	10	+	-	-	75	M	39	+	-	-
32	F	10	+	-	-	76	F	57	+	-	-
33	F	10	+	-	-	77	M	10	+	-	-
34	F	10	+	+	-	78	M	10	+	-	-
35	F	42	+	+	-	79	M	10	+	-	-
36	F	7	+	-	-	80	M	10	+	-	-
37	M	49	+	-	-	81	M	10	+	-	-
38	F	74	+	-	-	82	M	10	+	-	-
39	F	79	+	+	-	83	F	81	-	-	-
40	F	49	+	-	-	84	F	78	+	-	-
41	F	53	+	-	-	85	F	53	+	-	-
42	F	55	+	+	-	86	F	68	+	-	-
43	F	58	+	+	-	87	F	10	+	-	-
44	M	61	+	-	-	88	F	10	-	-	-

89	F	10	+	+	-	95	F	8	+	+	-
90	F	10	+	-	-	96	F	8	+	-	-
91	F	10	+	-	-	97	F	9	+	-	-
92	M	8	h	h	h	98	M	7	+	-	-
93	M	8	+	-	-	99	M	7	+	-	-
94	M	8	+	-	-	100	F	7	+	-	-

図1 健康人赤血球の滲透圧抵抗

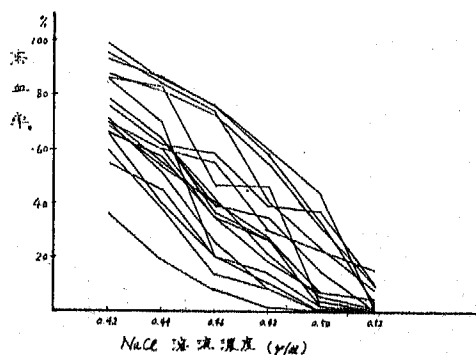
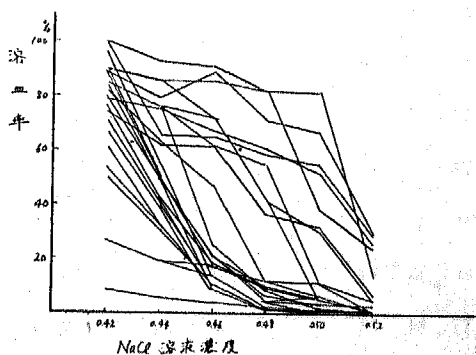


図2 疾患時赤血球の滲透圧抵抗



倍と稀釈したものについて、同一O型健康人洗滌赤血球によつて R.f. の程度を比較しその間の平行関係の有無を検討してみた。

松岡氏法と同時に血漿 Fbrinogen の血清学的定量法として抗ヒト血漿フィブリノーゲン沈降素血清（第二編^④参照）を用いた。

沈降反応は重層法に依り、沈降輪の生じた抗体原液に対する抗原の最高稀釈倍数を以て沈降価とし、抗原々液に対する抗体の最高稀釈倍数を以て沈降量とした。

反応の記載は15分以内で沈降輪を生じたものを(卅), 30分以内で生じたものを(卅), 60分以内で生じた

表 4 (a) Relations to plasma fibrinogen content and it's Rouleaux forming property

No.	Sex	Age	Diagnosis	R.f. of standard red cell sus. in each plasma	plasma fibrinogen (mg./dl)	Precipitin titre against each plasma										
				1 2 3 4 5 × × × × ×		Content of precipitin against each plasma										
						1	2	4	8	16	32	64	128	256	512	1024
1	M	32	sound	++ + - - -	240.4	++ ++ ++ ++ ++ ++ ++ - - - - -	++ ++ ++ ++ ++ ++ ++ - - - - -									
2	F	25	"	++ ++ + - - -	428.0	++ ++ ++ ++ ++ ++ ++ + - - -	++ ++ ++ ++ ++ ++ ++ + - - -									
3	M	31	"	++ + - - - -	278.2	++ ++ ++ ++ ++ ++ ++ - - - -	++ ++ ++ ++ ++ ++ ++ - - - -									
4	M	26	"	++ + - - - -	259.8	++ ++ ++ ++ ++ ++ ++ - - - -	++ ++ ++ ++ ++ ++ ++ - - - -									
5	M	42	"	++ ++ + - - -	401.3	++ ++ ++ ++ ++ ++ ++ - - - -	++ ++ ++ ++ ++ ++ ++ - - - -									
6	M	34	"	++ ++ ++ + - -	337.5	++ ++ ++ ++ ++ ++ ++ - - - -	++ ++ ++ ++ ++ ++ ++ - - - -									
7	F	33	"	++ ++ + - - -	337.1	++ ++ ++ ++ ++ ++ ++ - - - -	++ ++ ++ ++ ++ ++ ++ - - - -									
8	F	18	"	++ ++ + - - -	385.2	++ ++ ++ ++ ++ ++ ++ - - - -	++ ++ ++ ++ ++ ++ ++ - - - -									
9	F	18	"	++ + - - - -	267.5	++ ++ ++ ++ ++ ++ ++ - - - -	++ ++ ++ ++ ++ ++ ++ - - - -									
10	F	25	"	++ ++ + - - -	321.0	++ ++ ++ ++ ++ ++ ++ - - - -	++ ++ ++ ++ ++ ++ ++ - - - -									
11	M	27	"	++ ++ + - - -	265.6	++ ++ ++ ++ ++ ++ ++ - - - -	++ ++ ++ ++ ++ ++ ++ - - - -									
12	M	23	"	++ + + - - -	280.1	++ ++ ++ ++ ++ ++ ++ - - - -	++ ++ ++ ++ ++ ++ ++ - - - -									
13	F	34	"	++ + - - - -	227.6	++ ++ ++ ++ ++ ++ ++ - - - -	++ ++ ++ ++ ++ ++ ++ - - - -									
14	M	32	"	++ ++ + - - -	325.8	++ ++ ++ ++ ++ ++ ++ - - - -	++ ++ ++ ++ ++ ++ ++ - - - -									
15	F	29	"	++ ++ - - - -	243.8	++ ++ ++ ++ ++ ++ ++ - - - -	++ ++ ++ ++ ++ ++ ++ - - - -									
16	M	14	"	++ + - - - -	204.6	++ ++ ++ ++ ++ ++ ++ - - - -	++ ++ ++ ++ ++ ++ ++ - - - -									
17	M	75	"	++ ++ + - - -	321.0	++ ++ ++ ++ ++ ++ ++ - - - -	++ ++ ++ ++ ++ ++ ++ - - - -									
18	M	29	"	++ + - - - -	256.8	++ ++ ++ ++ ++ ++ ++ - - - -	++ ++ ++ ++ ++ ++ ++ - - - -									
mean value					300.3											

ものを(+), 60分で全く沈降輪の認められぬものを(-)とした。

実験成績

表 4 (a) は健康人血漿の Rouleaux forming property をホールオブジェクト法により検しあわせて血漿 Fibrinogen 値及び抗ヒト Fibrinogen 沈降素血清により沈降素価沈降素量を表はしたものであり, Fibrinogen 値の平均は 300.3mg/dl. 沈降素価 32 倍~128 倍, 沈降素量 4 倍~8 倍である。血漿の Rouleaux forming Property と Fibrinogen 値とは略平行関係

にあり Fibrinogen 値の高いもの程 Rouleaux を強く形成する傾向がうかがわれる。沈降素価, 沈降素量も二三の例外はあるがほぼ平行関係が認められた。この傾向は表 4 (b) に於ては更に明瞭であり, 658.1mg/dl の血漿はその沈降素価及び沈降素量共 200mg/dl のものに比して明かに高値を示している。一般に血漿 Fibrinogen の増加を来す疾患時にはその血漿の Rouleaux forming property も強いことが認められた。

3) 血清蛋白分割と Rouleaux formation

表5 正常人血清の濾紙電気泳動による蛋白分割比

No. age Sex	Alb. + α_1 - Gl.		α_2 - Gl.		β - Gl.		γ - Gl.	
	Ext.	%	Ext.	%	Ext.	%	Ext.	%
1 14 M	2×0.54	62.0	0.11	6.3	0.14	8.1	0.41	23.6
2 14 M	2×0.55	59.0	0.16	8.6	0.18	9.7	0.42	22.6
3 14 M	2×0.44	64.3	0.12	8.8	0.15	10.9	0.22	16.0
4 14 M	2×0.54	60.0	0.14	7.8	0.16	8.9	0.42	23.2
5 14 M	4×0.30	50.6	0.20	8.4	0.30	12.6	0.67	28.3
6 14 F	4×0.31	62.0	0.14	7.0	0.28	14.0	0.34	17.0
7 14 F	4×0.37	62.7	0.19	8.1	0.30	12.7	0.39	16.5
8 14 F	4×0.38	63.0	0.14	5.8	0.30	12.9	0.45	18.7
9 31 M	2×0.37	59.6	0.09	7.3	0.16	12.9	0.25	20.7
10 28 M	2×0.38	63.3	0.09	7.5	0.16	13.7	0.19	15.7
11 44 M	2×0.37	57.4	0.08	6.2	0.17	13.4	0.30	23.2
12 45 F	2×0.42	64.0	0.08	6.1	0.12	9.2	0.27	20.6
13 18 F	4×0.33	57.5	0.17	7.4	0.21	9.1	0.60	26.0
14 18 F	4×0.40	56.8	0.29	10.4	0.30	10.6	0.65	22.9
15 43 M	4×0.45	57.5	0.21	6.7	0.41	13.0	0.72	22.9
16 14 M	4×0.44	65.0	0.19	7.0	0.26	9.6	0.50	18.5
17 28 M	4×0.34	60.0	0.14	6.2	0.22	9.7	0.54	23.9
18 14 M	4×0.31	59.5	0.15	7.2	0.19	9.1	0.50	24.0
19 14 M	4×0.35	61.0	0.17	7.4	0.21	9.2	0.51	22.3
20 41 M	4×0.32	61.0	0.15	7.1	0.19	9.1	0.48	22.8
mean value		60.3		7.4		10.9		21.5

図3 分割別抽出法の図解

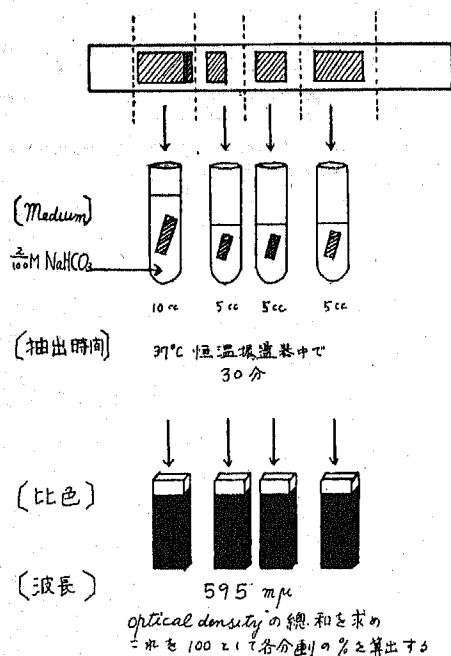
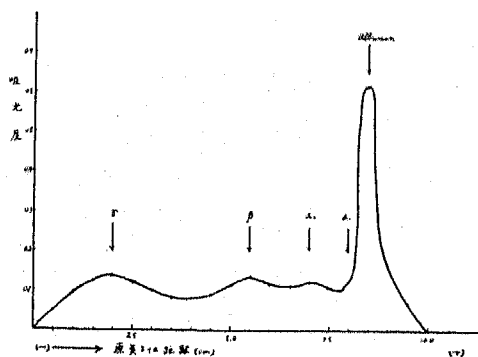


図4 血清蛋白分割の抽出曲線



血漿或は血清の Rouleaux forming property と蛋白分割との間に関連性があるかどうかについての検討は古くは Fahraeus^⑥ が塩析法によつて分割したもののについて検した報告があり、著者も Cohn の冷エタノール法によつてえた F.I. に強い Rouleaux forming property の認められることを第二編に於て報告したが、正常人血清にも全く Rouleaux forming

表 6 Rouleaux forming property を有しない血清の濾紙電気泳動による蛋白分割比

No. age sex	Alb. + α_1 -Gl.		α_2 -Gl.		β -Gl.		γ -Gl.	
	Ext.	%	Ext.	%	Ext.	%	Ext.	%
1 28 M	2×0.40	59.2	0.17	12.6	0.18	13.3	0.20	14.8
2 24 F	2×0.51	68.9	0.10	6.8	0.13	8.8	0.23	15.5
3 81 M	2×0.52	65.0	0.14	8.8	0.18	11.2	0.24	15.0
4 10 F	2×0.52	63.4	0.14	8.5	0.19	11.6	0.27	16.5
5 臍帯血清	2×0.60	60.5	0.13	6.6	0.17	8.6	0.48	24.1
mean value		63.4		8.7		10.7		17.2

property を缺くものが認められたので濾紙電気泳動法によりそれらの血清の蛋白分割をしらべ、Rouleaux forming property のある血清のそれと比較しその差異の有無を検討した。

実験方法

測定にはイトー超短波製濾紙電気泳動用装置を用いた。泳動には東洋濾紙 No 52 (2×40cm) を用い、緩衝液は Holt^⑥ 等の処法による Veronal 緩衝液 (pH 8.5, $\mu=0.045$) を用い、泳動条件は濾紙幅 1 cm につき 0.4~0.6mA、試料は毛細管ピペットで 0.01cc を濾紙に線状につけ 6 時間泳動を行つた。

泳動後 100°C で 10 分間乾燥させ分割の定量には阿部^⑦等の提唱する分割別抽出法を行つた。即ち蛋白と結合した色素 (Bromphenol Blue を使用) を分割別に $\frac{2}{100}$ Mol Na HCO₃ 溶液の一定量中で抽出 (37°C 恒温振盪器にかけ 30 分抽出) しその抽出液の吸光度を $\frac{2}{100}$ M. Na HCO₃ を Blank として光電分光々度計 (波長 595m μ) により測定し、各分割の吸光度の総和を 100 として各々の百分率を算出した。その方法の概要を図 3 に示した。

実験成績

正常人血清中より 2 倍稀釈まで Rouleaux formation を起すものを撰び前記条件で泳動させたものについて、泳動方向と垂直に濾紙を 5mm 間隔に切りとつたものを $\frac{2}{100}$ M. Na HCO₃ 溶液の一定量で抽出し、吸光度を縦軸に、原点よりの距離を横軸にとつてプロットしたものをグラフに描くと図 4 の如く左より γ , β , α_2 , α_1 , -Globulin 及び Albumin のピークが認められる。

20 人について分割別抽出法によつてえた分割の百分率の平均値は表 5 に示される如く γ -Gl. 21.5% β -Gl. 10.9%, α_2 -Gl. 7.4% Alb. + α_1 -Gl. 60.3% であつた。

一方 Rouleaux forming property を全く有しない血清について検したところ表 6 の如くであつた。写

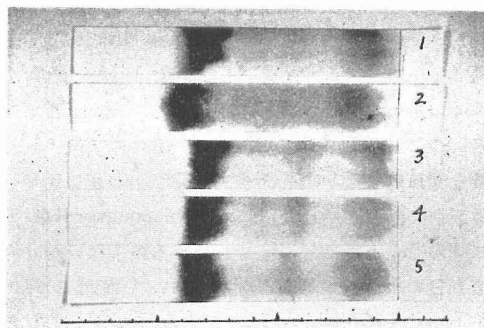


写真 1

Rouleaux forming property を有する血清の泳動

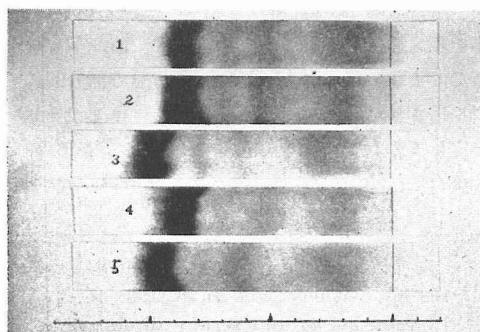


写真 2

Rouleaux forming property を有しない血清の泳動

真 1 は R. f. をおこす血清を前記条件で泳動し B.P.B で染色したものゝ一例で、写真 2 は Rouleaux formation を全く起さない血清の泳動を行つたものである。

Rouleaux forming property を缺く血清の蛋白分割については例数が少いのでこの成績のみから結論を下すことは出来ないが No 1~4 までの血清は R. f. 起す血清に比して γ -Gl. 分割が低い値を示しているが No 5 の如く却つて高値をとつているものもあり、濾

紙泳動による蛋白分割と Rouleaux forming property の強弱との間の因果関係は明瞭にしえなかつた。

第三章

Rouleaux formation 阻止に関する検討

まえがき

第二編に於て述べた通り強い R.f. と抗原抗体反応に基づく(+)程度の凝集反応とは肉眼的にも顕微鏡的にも区別し難い場合が多い。

このことは輸血の適合試験の際には甚だ不都合であるので之に対して、簡易な鑑別法乃至は連鎖形成阻止剤があれば非常に便利である。著者はこれまでに行つた実験の結果連鎖形成を起す主要な Factor は血球自体の側からいへばその形態が biconcave disk の基本型を保っていること、媒体の側からいへば、それが Rouleaux forming property を有していることであるということが判つたので、R.f. 阻止の手段として新鮮な赤血球でもその界面張力に何等かの変化を与える薬剤中に浮遊させれば、基本の biconcave disk 型から球形乃至有棘球形に変せしめうるのではないかと考へて二三の水溶性の界面活性剤を用いて血球の側の Rouleaux forming factor である両凹み円板型の形態を失はせ、而も血球自身の特異的な被凝集性に変化を来さないものゝ有無を検した。

1) 界面活性剤による R.f. の阻止

実験材料

非イオン活性剤の中で水に比較的良好に溶けるものをえらんで実験に用いた。既に長鎖脂肪酸で部分的にエステル化された無水ソルビットのポリオキシエチレンテールである Tween 類の中で最も水溶性の高い Tween 80 (Polyoxyethylene sorbitan monooleat-

表 7 agglutinability of red blood cells using various concentration of Tween-80 as anti-serum diluent

rate of dilution		diluent							
		1	2	4	8	16	32	64	
concentration of Tween-80	saline	+	+	+	+	+	+	+	-
	0.00625%	+	+	+	+	+	+	+	-
	0.0125 %	+	+	+	+	+	+	+	-
	0.025 %	+	+	+	+	+	+	+	-
	0.05 %	+	+	+	+	+	+	+	-
	0.1 %	+	+	+	+	+	+	+	-
	0.2 %	+	+	+	+	+	+	+	-
	0.625 %	+	+	+	+	+	+	+	-
	1.25 %	+	+	+	+	+	+	+	-
	2.5 %	+	+	+	+	+	+	+	-
	5.0 %	+	+	+	+	+	+	+	-

表 8 agglutinability of red blood cells using various concentration of polyethylene-glycol-400 as anti-serum diluent

rate of dilution		diluent							
		1	2	4	8	16	32	64	
concentration of P.E.G.-400	saline	+	+	+	+	+	+	+	-
	0.16 %	+	+	+	+	+	+	+	-
	0.315%	+	+	+	+	+	+	+	-
	0.63 %	+	+	+	+	+	+	+	-
	1.25 %	+	+	+	+	+	+	+	-
	2.5 %	+	+	+	+	+	+	+	-
	5.0 %	+	+	+	+	+	+	+	-
	10.0 %	+	+	+	+	+	+	+	-

e) 及び Ethylenoxide を縮合してつくられた Polyethylene glycol-400 (P.E.G.と略記)を用いた。

実験方法

Tween-80は5% (重量%) の濃度に生理的食塩水に溶解したもの及び、Polyethyleneglycol-400 は10%の濃度に同様に溶解させたものを原液として生理的食塩水で倍数稀釈列をつくる。これに一定人洗滌赤血球を2%の濃度に浮遊させ30分後にホールオブジェクト法でその形態を鏡検する。ついで対応抗体を種々の濃度の Tween-80 及び P.E.G-400 を以て稀釈し生理的食塩水を稀釈液としたものと血球の被凝集性の比較を行つた。

他方注入用プラスゲンの連鎖形成及び False agglutination が界面活性剤によりどの程度阻止されるかを検するため、前記各濃度の Tween-80 及び P.E.G.-400 を稀釈液としての注入用プラスゲンを 2, 3, 4, 5 倍と稀釈し、その各々へ前記洗滌血球泥を2%の濃度に浮遊し R.f. 及び False agglutination の強さに変化を来すかどうかを検した。

実験成績

表 7 に示される如く被凝集性は Tween-80 の場合 5% の濃度のものでも対照の食塩水を稀釈液とした場合に比して却つて僅に増強される位で支障を来たす如き低下を来たさない。

P.E.G-400 を稀釈液とした場合も10%の濃度までは実際上支障を来たす程度の影響は蒙らないことが分る (表 8)。

ホールオブジェクト法による血球の形態の観察でも30分では両者共何の濃度に於ても殆ど対照の生理的食塩水浮遊のものと変化なく両凹み円板で平滑な表面を保っている。Tween-80 では60分を経過する頃から0.625 %以上の高濃度域に於て血球は平滑球状に变じ

180 分たつと 5 % の濃度では完全に溶血してしまい、0.625 % ~ 2.5 % の部分は溶血しているが平滑球形のまま残存している血球も認められた。0.625 % 以下の濃度では溶血は全くないが血球は平滑球状に変じている。P.E.G.-400 では 60 分、180 分共全く形態変化が起らず意図した始き R.f. 阻止は望みえないのではなかと予測された。

表 9 Inhibitory effect of Tween-80 against Rouleaux formation and False agglutination

diluent	rate of dilution	Rouleaux formation					False agglutination				
		2	3	4	5	6	2	3	4	5	6
concentration of Tween-80	saline	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	0.00625%	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	0.0125%	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	0.025%	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	0.05%	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	0.1%	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	0.2%	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	0.625%	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	1.25%	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	2.5%	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	5.0%	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

表10 Inhibitory effect of Polyethylene glycol-400 against Rouleaux formation and False agglutination

diluent	rate of dilution	Rouleaux formation					False agglutination				
		2	3	4	5	6	2	3	4	5	6
concentration of P. E. G.-400	saline	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	0.16%	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	0.315%	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	0.63%	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	1.25%	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	2.5%	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	5.0%	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	10.0%	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

R.f. 阻止の成績は表 9 に示す如く Tween-80 に於て 2.5 及び 5 % の濃度のものゝみが対照に比して阻止効果が可成り強く、False agglutination も消失している。それ以下の濃度では殆ど阻止効果が認められない。

P.E.G.-400 では 10 % の濃度に於てすら対照と比し全く変化を示さず従つて R.f. 並に False agglutination

ion の阻止という目的には沿わないことが解つた (表 10)。

2) 真の凝集反応との簡単な見分け方

R.f. による凝集類似の反応と真の抗原抗体反応による凝集との区別法は色々考へられる。即ち吸収試験を行つて完全に吸収されてしまうかどうかを検すのは最も確実であるが實際上時間もかかり操作もやゝ面倒であるので著者は次の方法が簡単で実用的価値があると思へる。交叉試験には普通小試験管内で行う方法がとられているから、若しザラツク程度の凝集が起つた場合 (反応温度に留意して寒冷凝集を否定しておくことは勿論であるが) にはそのまゝこれを 1500r.p.m. 2~3 分遠心器にかけた後、上清を吸いとり生理的食塩水を加へてよく振盪し再び遠心沈澱を行う。この上清を捨て元の濃度になる様生理的食塩水を加へ軽く振つてみると R.f. による False agglutination であつた場合は凝集塊は消失してしまうが、之に反し真の凝集であつた場合は却つて集塊形成は増強され、軽く振つた位では集塊をほぐすことが出来ないので容易に区別がつけられる。

第四 章

総括並に考按

本編に於ては赤血球の連鎖形成という興味ある現象の機序について種々検討してみた。

個々の赤血球の側からいへば R.f. に関与する最も重要な要素は赤血球のもつ形態と密接な因果関係のあることが知れた。即ち流液中にある時の両凹み円板型を保つということゝ Rouleux を形成するという事実の間には密接な因果関係が認められ、何等かの原因で血球が他の形例へば平滑乃至有棘球形化し Rouleaux forming property のある媒体中に於てもその形のまゝで止つている場合には最早 R.f. という現象は起らなくなる。

著者は健康人男女 40 人の赤血球について同一媒体に対する連鎖形成能の強弱を比較してみたが個体による差異は認められなかつた。又臍帯血々球についても同様のことをしらべたところ成人のそれと比較して差異は認められなかつた。このことから人赤血球には一定の Rouleaux forming property を有する媒体に対し R.f. を起す能力に年齢性別による著明な差異はないと推定される。

又種々の疾患時血球についても同様の検査を行つたが健康人に比して有意の差は認められなかつた。

赤血球の滲透圧抵抗と R.f. との間には整然たる因果関係は認められず球形化した血球の滲透圧抵抗が必ずしも小であるという所見も認められなかつた。

球形化した陳旧赤血球は一定の Rouleaux forming property を有するプラスゲンに浮遊させ Westergren 氏赤沈用ビペット内での沈降速度を検すると Biconcave disk の血球のそれに比し非常に沈降速度が遅く Suspension stability が大であつた。このことから赤沈値促進の直接の原因は赤血球の起す R.f. によるものであることが理解される。

7才から81才までの健康人100名の血清についてその Rouleaux forming property を一定人O型赤血球によつて検したところ可成りの個人差がみられその中5例は原液(稀釈しない血清)でも全く R.f. を起さなかつた。該血清の蛋白分劃を濾紙電気泳動により検定したところ、R.f. を起す血清の平均値と比較して4例は γ -Globulin 分劃が低値を示したが1例は却つてやゝ高い値を示す結果をえた。例が少いのでこの程度の差異をとり上げて云々することは不適当と思はれるが蛋白分劃比の上から両者の間に有意の差を結果づけることは出来なかつた。血漿については松岡氏法による Fibrinogen 定量法と、Cohn の冷エタノール法^{⑧⑨⑩}により分別したヒト血漿の F.I. を抗原として家兎に免疫してえた沈降素血清の両者によつて検した成績共、Fibrinogen 量と連鎖形成能の強さとは略平行していることが知られた。即ち術後1週間以内の患者或は胆嚢炎、化膿性乳腺炎、非定型性肺炎などで血漿 Fibrinogen 値の高かつたものはその Rouleaux forming property も強いという結果がえられた。

これらから血漿に於て R.f. を起す主役を演ずるのは Fibrinogen などの分子量の大なる蛋白分劃にあると考えられる。併し R.f. を起すものは Fibrinogen のみでないことは、大部分の血清中にも R.f. を起す因子が含まれていること、或は蛋白質とは関係のない Polyvinylpyrrolidone の如きものも R.f. を起すことから明かであるが、その本体については未だ推測の域に止つていることは第一編に於て述べた通りである。

著者は第一外科教室で腹腔内癒着防止剤として使用し可成りの好成績を挙げている注入用プラスゲンが強い Rouleaux forming property を有することを知り、又外国文献にも英国製 Dextran (高分子Dextran) が強い Rouleaux forming property を有し血液型適合試験時に血漿中にこれらが混じていると R.f. のため一見凝集反応の如き外観を呈することがあると記載されているのをみて、實際上両者の鑑別の必要性を痛感したので、連鎖形成による偽凝集反応の阻止剤に適當のものがあるか、或は一旦生じてしまつた反応

を如何にして区別したらよいかなどについて検討を行つた。

これまでの実験結果より R.f. を起さない様にするには赤血球を非可逆的に球形の状態に止めておけばよいと考えられたので、凝集反応に悪影響を起さない非イオン界面活性剤を用いて血球の形態変化を起させ R.f. を阻止せんと試みた。その結果 Tween-80 (Polyoxyethylene Sorbitan monooleate) の2.5~5%溶液を稀釈液に使用すると注入用プラスゲンにより4倍稀釈まで生ずる False agglutination が殆ど消失することが解つた。この濃度では血球の被凝集性は全く影響を受けず、溶血も60分以上たつてから現はれる程度なので実用に供しうると考えられる。Polyethylene glycol-400 では10%の濃度でも阻止効果は全くなかつた。

又一旦起つた偽凝集との区別法として、低速遠心沈澱後生理的食塩水で洗滌する方法が簡単で効果があると考えられる。抗原抗体反応による凝集は遠心沈澱によつて凝集塊は相互に粘着し合い却つて反応が増強されるので、生理的食塩水で洗滌しても簡単にときほぐすことが出来ないが、R.f. によるものは遠心沈澱しても集塊形成は増強されず、生理的食塩水で洗滌すれば容易に均一の浮遊液にすることが出来る。

結 論

連鎖形成の機序について検討を加へ次の如き結果をえた。

1) 連鎖形成を起す赤血球側の因子は、赤血球自身の形態であり、それが Biconcave disk の基本型を保っていることが必要である。

2) 健康人赤血球では年令性別を問はず、一定の Rouleaux forming property を有する媒体に対して Rouleaux を形成する性質に差異はないものと考へられる。

3) 種々の疾患時の赤血球についても、一定の媒体に対する連鎖形成能は健康人赤血球のそれと有意の差は認められなかつた。

4) 健康時疾患時共、赤血球の NaCl 溶液に対する滲透圧抵抗と連鎖形成能との間には一定の因果関係は認められなかつた。

5) 健康人血清のうちには5%程度に全く連鎖形成能を有しないものが認められた。2倍稀釈まで R.f. をおこすものが100例中23例稀釈しない原血清のみが R.f. をおこすものが71例みられた。即ち血清の連鎖形成能には個体差が可成りあることが知られた。

6) 濾電気泳動による蛋白分劃比の上では連鎖形成

を起す血清と起さない血清との間に有意の差はないものと推定された。

7) 血漿 Fibrinogen 量と連鎖形成能とはほぼ平行関係があることが知られた。

8) 連鎖形成阻止剤として非イオン界面活性剤のうち Tween-80 が 1.25 ~ 2.5 % の濃度で有効である。

9) 強い連鎖形成による False agglutination と真の凝集反応との簡単な区別法として低速遠心沈澱による方法が有効であると考へる。

稿を終るにあたり終止鞭撻と指導を賜つた恩師野田金次郎教授に心から感謝を捧げます。

参 考 文 献

①荻原昭：信州医誌 8, 8, 1483. (1959) ②松岡松

三他：臨床検査 2, 1, 61. (1958) ③Kautzsch, E., Rauscher, A.: Klin. Wchschr. 30, 991, (1952)

④Quick, A. J.: Am. J. hemorrh. disease, 312, Thomas Springfield (1942) ⑤Fahraeus, R.: Physiol. Rev. 1X, 241, (1929)

⑥Holt, C. V., et al: Biochem. Z., 323, 345, (1952) ⑦阿部正和他：日本臨床 17, 4, 562, (1959)

⑧Cohn, E. J.: J. Am. Chem. Soc., 62, 3396, (1940) ⑨Cohn, E. J.: J. Am. Chem. Soc., 68, 459, (1946)

⑩Cohn, E. J.: J. Am. Chem. Soc., 72, 465, (1950)