Rouleaux formation に関する知見補遺

第二編 Rouleaux formation に関する基礎的検討

昭和34年7月9日受付

信州大学医学部法医学教室（指導：野田金次郎教授）
荻原 昭

Sapplementary Studies on the Rouleaux formation

Part II Rudimentary Articles about Rouleaux formation

Akira Ogihara
Department of Legal Medicine, Faculty of Medicine, Shinshu University
(Director: Prof. Dr. Kinjiro Noda)

はじめに

第1編①に於てふれておいた赤血球の形態と Rouleux formation（以下 R. f. と略記）との関係，即ち赤血球が Rouleaux を作るためにはその前段階として個々の血球が両凹み円板状の基本型を保つていることが必要であるが，これらの点について少しくわしく述べることにする。

先づ浮游する赤血球が何等かの原因で，已に両凹み円板状の基本型から棘形成或は球形化しその形態を変じた場合これを Rouleaux forming properties を有する媒体（例えば血漿や，血清等）中に浮游させるとどうなるかという問題である。この様な場合に Rouleaux を形成するものと，しないものがあるが R.f. を起す場合をよく見ると，浮游せしめた赤血球は，前の棘形成乃至球形化したものが必ず一旦両凹み円板状に戻りその後で R. f. を起すのが認められる。即ち同じように外観上変形して球形化した血球でも媒体を変ずれば元の両凹み円板状に戻る可逆性を有しているものと，最早元の基本型に戻り得ぬものとがある（この両凹み円板状に戻つたものだけが Roueaux forming property を有する媒体中で Rouleaux を形成する）。

後者の様な場合は古くなり溶血が起つている血液より分離した赤血球にみられ，斯かる血球は最早媒体の変化に応じてその形態を変化する可逆性を失つてしまつたものであり，この様な血球は如何に Rouleaux forming property の強い媒体（例えば Fibrinogen 溶液）中に再浮游させても Rouleaux を形成することがない。

無菌的に採血し氷室中に保存した血餅或は二重蓚酸血は，採血後2日以内であれば同一媒体に対する R. f. の傾向に殆ど変化が認められないが，3日以上経過すると多少の個人差はあるが R. f. を起し難くなる。

従つて R. f. の検査を行う場合は血球は全て新鮮なものを使用した。

又一旦 R. f. を起した血球を生理的食塩水をもつてよく洗滌したものゝ形態は写真①の如く概ね biconcave disk 型をとり，Rouleaux はすべて消失しているが，之を再び元の Rouleaux forming property を有する血清に浮游させると写真②の如く再び Rouleaux を形成する。

Rouleaux forming property を有しない血清（第3編参照）中に同一血球を浮游させたもの（写真③）は有棘球状をしているが，これを生理的食塩水でよく洗い（写真④），今度は Rouleaux forming property を有する血清に浮游させると，先づ棘形成，球形化したものが一旦両凹み円板状に戻り（写真⑤），約30分を経過すると Rouleaux を形成してくるのがみられる（写真⑥）。

この様に R. f. の検査をするには形態が一つの問題となつてくるから Rouleaux formation を生起するに必須の形態である両凹み円板状の形を保持するのに最も適した観察法を取上げる必要があり次項に述べるような検討を加えることにした。

第1章 生理的食塩水に浮游させた人赤血球の形態

1） 実験材料の採取

健康人耳朶を穿刺し滴下する血液を生理的食塩水を容れた中試験管（径 1.5cm，長さ 11.0cm）内で混じ2％の濃度の血球浮游液を作つた。

2） 観察方法

第1編に於て述べた如く赤血球はその血漿成分を失うと，接触する容器によつてその形態に変化を来たし，普通行はれているスライドグラスにカバーグラスをかけて行う方法で鏡検すると，棘形成，球形化などの変化を来たし両凹み円板状の基本型を保ち得なくなる。

著者は如何なる方法で観察すればガラス器具による影響が少く形態変化を来たさないかという点について，赤血球が biconcave disk の基本型を保ち爾余の変形を起さぬということを目標にして検討を加えた結果，直径1.5cm，中心部の深さ0.3mmの一穴ホールグラスを使用し，この穴の中に生理的食塩水で内壁を潤した毛細管ピペットで浮游液の適当量（約2滴）を落し気泡のはいらぬ様に注意して1.8×1.8cm四角のカバーグラスで覆つて鏡検（×400）すれば，ホールの中心部では赤血球は自由に浮游する余裕を有しガラスと接触する面も少くなるので，変形を起しにくいことが解つた。微動装置を上下して観察すると赤血球の浮游状態がよく解る。

浮游液の濃度は2％前後が適当で，うすゝぎると一視野に捉えうる血球の数が少く，濃すぎると血球が重り合つて見にくゝなる。

浮游液をホールに滴下してから鏡検するまでの時間は30分以内がよく，それ以上経過すると血球はホールの底に沈下して重り合い浮游状態が観察出来なくなる。

3）実験成績

i）観察法による影響

ホールオブエクトの中心部に浮游する赤血球は写真⑦にみられるように平滑な輪廓を有する biconcave disk の形を保つているが，ホールの凹みの浅い部分や，ホールの外側のカバーグラスで覆われた部分では，写真⑧⑨に示されるように平滑球状，金米糖状，有棘円板状乃至椀状に至る種々の変形血球が認められる。

図1はホールオブエクトにカバーグラスをかぶせた断面を示したもので，①②③の番号は顕微鏡写真撮影時の写真⑦⑧⑨に相当する位置を示したものである。

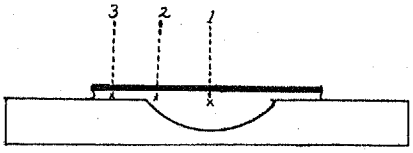


図 1

普通の平板スライドグラス上に浮游液を滴下し，これをカバーグラスでおゝつて鏡検したものは写真⑩の如く円板形に棘の出来たものなど変形がみられるが，自己血漿或は血清，ウシ或はヒトアルブミンなどの蛋白溶液に浮游させると血球はガラスによる影響をうけず両凹み円板状の基本型を保つ（写真⑪）。

ii）温度及び時間による影響

37°C 及び 2°C に於ける生理的食塩水浮游液の形態を経時的に検した。

細菌による血球の変性を除外するために操作はすべて無菌的に行つた。2％血球浮游液をいれた試験管を37°C 及び 2°C に保存し1日，2日，3日と日を追つてその形態と被凝集性をしらべると，37°C に保存したものは1日後に已に可成り著明な形態変化を来たし棘形成，球形化したものと両凹み円板状のものとがほゞ同数にみられるが，上清に溶血は起つて来ない。2日を過ぎると円板型をとるものは全く消失し，大部分が平滑な輪廓を有する球形をとり，中に一部細かい棘を有する球形のものが見られる。上清に溶血はみられない。

3日後には2日以後のものと大差なく微細棘を有する球形或は平滑球形のものゝみが認められる。4日後には5本の浮游液中2本は完全に溶血し，血球基質を認めるのみで完全乃至変形血球も全く消失している。

他の3本は肉眼的に溶血は認められないが，赤血球基質と思はれるものが僅に混在してくる。形態は3日後のものと大差ない。

2°C 氷室内に保存したものは24時間ではカバーグラスに近い層に僅に粗大な棘を有する金米糖形のものがみられるが，他はすべて基本の円板形をとつており，上清に溶血も認められない。2日後には同様に溶血なく形態も1日目のものと変りない。3日後になると平滑或は有棘球形のものが全体の約$\frac{1}{3}$を占め，他は基本型を保つている。4日を経たものでも溶血を起したものはなく，球形化は更に進んで両凹み円板状のものは1視野に数ケを認めるのみとなる。

上記浮游液の被凝集性を経時的に検すると 37°C に保存したものでは，2日目頃より階段的に低下し4日目で浮游直後の約$\frac{1}{2}$に低下した。2°C 保存のものでは低下の傾向は遙に少く，6日後でも高稀釈の試験管2本の反応の減弱がみられた程度にすぎなかつた。1例についてその関係を示すと表1の如くである。

iii）洗滌による影響

2％浮游液に5倍量の生理的食塩水を加へて振盪混和し 3000 R.P.M. 5分間遠沈し上清を捨て元の濃度に再浮游させ，前記ホールオブエクト法で浮游血球の形態を観察し同時に血球の被凝集性を一定力価の対応抗体によつて検した。

洗滌前の赤血球には変形は全く見られず，平滑な輪廓の両凹み円板状をしているが，洗滌1回ではカバーグラスの直下の部分ではガラスの影響が認められる。即ち棘形成或は球形化したものが混在している。ホー

表 1　一定温度に於ける被凝集性の経時的変化

保存温度	37°C								2°C							
抗体稀釈倍数	×1	×2	×4	×8	×16	×32	×64	×128	×1	×2	×4	×8	×16	×32	×64	×128
浮游直後	⧺	⧺	⧺	⧺	⧺	⧺	+	−	⧺	⧺	⧺	⧺	⧺	⧺	+	−
1 日後	⧺	⧺	⧺	⧺	⧺	+	+	−	⧺	⧺	⧺	⧺	⧺	⧺	+	−
2 日 〃	⧺	⧺	⧺	⧺	⧺	+	+	−	⧺	⧺	⧺	⧺	⧺	⧺	+	−
3 日 〃	⧺	⧺	⧺	⧺	⧺	+	±	−	⧺	⧺	⧺	⧺	⧺	+	+	−
4 日 〃	⧺	⧺	⧺	⧺	+	+	−	−	⧺	⧺	⧺	⧺	⧺	+	+	−
5 日 〃	⧺	⧺	⧺	⧺	+	+	−	−	⧺	⧺	⧺	⧺	⧺	+	±	−
6 日 〃	⧺	⧺	⧺	⧺	+	+	−	−	⧺	⧺	⧺	⧺	⧺	+	±	−

（ホールグラス分判定）

表 2　洗滌回数と被凝集性との関係

洗滌回数＼抗体稀釈	×1	×2	×4	×8	×16	×32	×64	×128	×256	×512
洗滌前	⧺	⧺	⧺	⧺	⧺	⧺	⧺	+	−	−
2 回	⧺	⧺	⧺	⧺	⧺	⧺	⧺	+	−	−
4 回	⧺	⧺	⧺	⧺	⧺	⧺	⧺	+	−	−
6 回	⧺	⧺	⧺	⧺	⧺	⧺	+	±	−	−
8 回	⧺	⧺	⧺	⧺	⧺	⧺	⧺	+	−	−
10 回	⧺	⧺	⧺	⧺	⧺	⧺	⧺	+	+	−
12 回	⧺	⧺	⧺	⧺	⧺	⧺	⧺	+	−	−
14 回	⧺	⧺	⧺	⧺	⧺	⧺	⧺	+	−	−
16 回	⧺	⧺	⧺	⧺	⧺	⧺	+	+	−	−
18 回	⧺	⧺	⧺	⧺	⧺	⧺	⧺	+	+	−
20 回	⧺	⧺	⧺	⧺	⧺	⧺	⧺	+	−	−

（ホールグラス30分判定）

ルの中心部でカバーグラスの裏面から遠ざかつた部分では変形血球は存在せず，両凹み円板状をしたものゝみが浮游している。

以後2回3回と洗滌回数をますに従つて変形血球の層が厚くなり，カバーグラスからかなりはなれた深い部分にも変形した血球が認められるようになる。同時に両凹み円板状の凹みの部分の厚さがまし，両端のまるい桿状のものに変じ，可成り深い部分に於けるその傾向が目立つてくる。

10回以上洗滌したものではこの傾向が一層著明となり，中央が却つて厚くふくらんだ楕円板状となり，或は椀状，ベレー帽状に一方だけくぼんだものが多くなる傾向が認められる。更にくりかえし洗滌を行つていくと球形化してくる傾向が一層明瞭になる。被凝集性は20回の洗滌によつても殆ど変化が認められなかつた。1例を示すと表2の通りである。

4）小　括

i）観察方法の如何によつて，生理的食塩水浮游赤血球はその形態に著明な変化を来たすが，ホールグラスにカバーグラスをかぶせて鏡検すると球形化する傾向を防ぎうる。

ii）無菌的に保存しておいた場合でも37°Cの比較的高温中よりも，2°Cの低温中においたものゝ方がはるかに形態変化を来たしにくゝ，被凝集性も2°C保存では6日後でも高稀釈域に於ける僅かな反応の減弱がみられるに過ぎない。

iii）浮游液に5倍量の生理的食塩水を加へて洗滌をくりかへすと，10回目位から除々に中央の厚みが増してふくらんで来て，球形に変じていく傾向が認められた。被凝集性は20回程度の洗滌では殆ど低下しないことが知られた。

第2章　各種媒体に浮游させた赤血球の形態

1）まえがき

赤血球は自己血漿或は血清中に於て Rouleaux formatien という興味ある現象を起すことが知られているが，この現象は血漿や血清だけでなく代用血漿等の高分子溶液の或るものや[2][3][4]，結核性胸膜炎の滲出液[5]等の中でも生起することが記載されている。

著者は人血漿蛋白中 R. f. 発現に関係のあると思はれる分劃，二三の代用血漿中での連銭形成現象について検討を行つた。

2）実験材料

i）健康人血漿（二重蓚酸塩を血液 1cc に 1mg の割に加へ 3000 R.P.M. 10分間遠心沈澱してえたもの）。

ii）健康人O型枸橼酸血漿より Cohn の冷エタノー

ル法⑥⑦⑧により分離し，生理的食塩水に対して透析した各蛋白分劃。

iii) プラスゲン (P.V.P. 3.5%, NaCl 0.9%, KCl 0.042%, $MgCl_2$ 0.0005%, $CaCl_2$ 0.025%), プラスゲン・L (低分子 P.V.P. 6%, NaCl 0.55%, KCl 0.042%, $MgCl_2$ 0.0005%, $CaCl_2$ 0.025%, $NaHCO_3$ 0.023%), 注入用プラスゲン (第1外科教室に於て腹腔内癒着防止剤として試作させたもの)⑨以上杏林製薬，及びデキストラン (デキストランを6%に生理的食塩水に溶解させたもの) 名糖産業，等の代用血漿。

iv) 健康人O型血球，i) と同様採血した血球泥を使用。

3) 実験方法並に実験成績

i) 正常人血漿中の Rouleaux formation

新鮮な蓚酸血漿を三つに分け，一つは無処置のまゝ (a)，一つを 56°C 温浴中で1時間加温後遠沈して析出物を除き (b)，一つを血漿 1cc について10単位の割でトロンビン溶液を加へ 37°C 温浴中に1時間放置しフイブリン塊を形成させた後これを圧縮して得た血清 (c) について連銭形成の強さに変化があるかどうか検した。R.f. の強さを比較するには検する媒体を生理的食塩水で2倍，3倍，4倍，5倍と稀釈しその各々へ2%の濃度になるように洗滌血球泥を混じ浮游液を作り，ホールオブエクトのホールに滴下しカバーグラスで覆い，30分後に倍率400倍で鏡検した。強さの記載は，血球が数10ケ以上連銭状につらなつて癒合し視野中に個々の赤血球として遊離しているものが全く認められないものを (卌)，1つの Rouleaux が10～20ケの血球よりなり中に2～3ケの小さい Rouleaux の混じているものを (卄)，1つの Rouleaux が10ケ以内の血球からなり，遊離した血球も多数認められるものを (+)，全く Rouleaux をつくつていないものを (－) とした。(卌) と (卄) の中間程度のものを (卌)，(卄) と (+) の中間を (卄)，(+) と (－) の中間程度のものを (+) と記載した。

未処置血漿 (a) では蛋白濃度 7.5% で R.f. の強さは原液 (卌)，2倍稀釈 (+)，3倍稀釈以上はすべて (－) であつた。

56°C 1時間加温の (b) では R.f. は (a) と変りなく蛋白濃度も同様 7.5% であつた。

(c) では R.f. の程度は幾分弱くなり原液で (卄)，2倍稀釈以上すべて (－) であつた。蛋白濃度は 6.4% と低下している。(b) に於て蛋白濃度の低下がみられないのは，加温によつて析出した繊維性蛋白質の量と蒸発によつて起つた濃縮とがほゞ等しいためと考へられる (後述参照)。

R.f. の傾向と平行して検体を生理的食塩水で倍数稀釈したものについて凝集素価，トロンビン溶液に対する clottability (1cc＝100単位のものを等量加へ 37°C 1時間で判定) 及び抗ヒトフイブリノーゲン沈降素血清に対する沈降素価を表3に示した。該沈降素血清は人血漿の Cohn の F.I. を家兎に免疫し，人血清で吸収し健康人血漿に対し沈降素価 64～128 倍，沈降素量 4～8 倍の力価を有するものを用いた。

表 3　繊維性蛋白除去による影響

稀釈倍数		×1	×2	×3	×4
R.f.の強さ	a (蛋白濃度7.5%)	卌	+	－	－
	b (蛋白濃度7.5%)	卌	+	－	－
	c (蛋白濃度6.8%)	卌	－	－	－

稀釈倍数		×1	×2	×4	×8	×16	×32	×64	×128	×256
凝集素価	a	卌	卌	卌	卌	卌	卄	卄	+	+
	b	卌	卌	卌	卌	卄	卄	+	+	－
	c	卌	卌	卌	卌	卄	卄	+	+	－
トロンビンに対するClottability	a	卌	卌	卌	卌	卄	卄	+	－	－
	b	－	－	－	－	－	－	－	－	－
	c	－	－	－	－	－	－	－	－	－
抗フイブリノーゲン抗体に対する沈降素価	a	卌	卌	卌	卌	卌	卌	卌	卌	－
	b	卌	卌	卌	－	－	－	－	－	－
	c	卌	－	－	－	－	－	－	－	－

凝集素価は (a) に比して (b) では僅に低下し (c) は試験管1本の低下がみられた。1cc＝100 単位のトロンビン溶液に対する clottability は (a) では 64倍までフイブリンの析出を認めたが，(b)，(c) では全くフイブリン塊形成を認めなかつた。

抗フイブリノーゲン抗体に対する沈降素価は (a) が128倍，(b) では4倍，(c) では原液のみに沈降輪が認められた。以上の事から血漿中の clottable protein は 56°C 60分，或は 1cc＝10 単位の割でトロンビン溶液を加へた場合完全に消失するが，抗フイブリノーゲン沈降素に対しては尚僅かながら反応する部分が残り，又連銭形成を起す分劃は殆ど変化せずに残存することが推定される。

ii) ヒト血漿蛋白分劃中で R.f.

Cohn のの冷エタノール法 (第6法)⑥⑦⑧により分

離凍結乾燥した各分劃即ちF.I.（Fibrinogen 分劃），F.II+III（γ，及び β-Grobulin），F.IV－1（α-Grobulin+Lipoprotein），F.IV－4（α，β-Grobulin+Albumin 少量），F.V.（Albumin）を溜水を以て8%の蛋白濃度になる様に溶解し，セロフアン膜で生理的食塩水に対して4°C 氷室内で透析したものについて，これに洗滌血球泥を2%の濃度になる様に浮游させホールグラス法で R.f.の有無を検した。

結果は表4の如くF.I.では8倍稀釈まで Rouleaux の形成がみられたが F.II+III では2倍稀釈まで，他の F.IV.－1，F.IV.－4，F.V.分劃中では全く R.f.は認められなかつた。殊に F.IV.－4，F.IV.－1 では血球がすべて球形乃至金米糖形に変じ，両凹み円板形を保つものが全くみられなかつた。

表 4　　Cohn－分劃中での R.f.

分劃＼稀釈倍数	×1	×2	×3	×4	×5	×6	×7	×8	×9	×10
F. I.	⧺	⧺	⧺	⧺	⧺	⧺	+	+	－	－
F. II＋III	⧺	⧺	－	－	－	－	－	－	－	－
F. IV－1.	－	－	－	－	－	－	－	－	－	－
F. IV－4.	－	－	－	－	－	－	－	－	－	－
F. V.	－	－	－	－	－	－	－	－	－	－

F.V.では血球はやゝ膨化して椀状をとつたものもみられたが大部分は両凹み円板状の基本型を保つており，R.f.は全く起らなかつた。

F.I.について松岡氏法⑩によりフイブリノーゲン量を測定すると 2,140mg/dl であつた（人血漿正常値 200～300mg/dl）。

iii）代用血漿中の R.f.

使用した4種のものゝうち人赤血球に対しプラスゲン，注入用プラスゲンの2つは R.f.を起すが，デキストラン及びプラスゲン・Lは R.f.を起さなかつた。その組成からいうと P.V.P.のうちではプラスゲン，注入用プラスゲンは平均分子量がそれぞれ26,000，40,000でプラスゲン・Lは12,600で R.f.を起す前二者よりも平均分子量が小さい。デキストランは平均分子量75,000であるが R.f.を起さなかつた。

プラスゲン・L，デキストラン中に浮游させたものは血漿中のそれと形態に大差なく，両凹み円板状の基本型を保つている。写真⑫，⑬，⑭はプラスゲン・L原液，2倍，3倍稀釈液中の血球の形態を示したもので，R.f.はみられずデキストランの場合もほゞ同様であつた。

写真⑮，⑯，⑰はプラスゲンに浮游させたもので原液では血球が10～15ヶ位集つて1つの Rouleaux を作つているが（写真⑮），2倍稀釈では5ヶ以下の血球による Rouleaux がみられるのみで（写真⑯），3倍稀釈では R.f.は認められない（写真⑰）。

写真⑱～㉒は7% P.V.P.（注入用プラスゲン）に浮游させたもので原液には著明な R.f.がみられ1つ1つの Rouleaux が相互に集合凝着し合つて大きな集塊を作つているのがみられる。この様なものは肉眼では弱い凝集反応と非常にまぎらわしく之を普通のホールグラス法で比較した場合一寸判別がつかない。2倍，3倍に稀釈したものでも尚著明な Rouleaux の形成がみられ5倍稀釈でも5ヶ以下の小さい Rouleaux が作られているのが認められる。

赤血球の性状によつて同一媒体でも R.f.の傾向に差異があるかどうかを健康人10人について検したところ表5に示される如く有意の個人差は認められなかつた。

表 5　　同一媒体中での健康人赤血球の R.f.

被検血球＼媒体＼稀釈倍数		注入用プラスゲン ×1	×2	×3	×4	×5	×6	プラスゲン ×1	×2	×3	×4
○	田	⧺	⧺	⧺	+	±	－	⧺	±	－	－
若	○	⧺	⧺	⧺	+	+	－	⧺	+	－	－
○	原	⧺	⧺	⧺	+	+	－	⧺	⧺	－	－
金	○	⧺	⧺	⧺	+	+	－	⧺	⧺	－	－
○	木	⧺	⧺	⧺	+	+	－	⧺	⧺	－	－
宮	○	⧺	⧺	⧺	+	±	－	⧺	⧺	－	－
○	藤	⧺	⧺	⧺	+	±	－	⧺	⧺	－	－
大	○	⧺	⧺	⧺	+	+	－	⧺	⧺	－	－
○	野	⧺	⧺	⧺	+	+	－	⧺	±	－	－
宮	○	⧺	⧺	⧺	+	+	－	⧺	±	－	－

7% P.V.P.（注入用プラスゲン）に浮游させて生じた強い R.f.と真の凝集反応の（＋）程度の弱い反応とは外見上殆ど見別けがつかない類似性を有しているが，ホールグラス上の両者を写真㉓，㉔に示した。

人以外の哺乳類赤血球について同様のことを検したところ，家兎では注入用プラスゲン及びデキストランが強い R.f.を起し，肉眼的にも真の凝集反応とまぎらわしい凝集現象がみられた。各個体血球による差異は認められなかつた。

モルモット赤血球では兎と同様注入用プラスゲン及びデキストランで R.f.がみられたが，個々の赤血球の変形が兎より強く R.f.を起したものも不規則に膨化したものが互に平坦面で接し合つて Rouleaux を形

つた結果生ずる False agglutination は増強されることが解る。False agglutination と真の凝集反応との鑑別は実際上非常に困難で，R. f. を防止するために Glycine や Sodium salicylate を用いた Mollison[3] によれば両者共実用化されるのぞみはうすいと記載されている。これ等の点に関しては第3編に於て検討を加へることにする。

4) 小　括

i) 注入用プラスゲンが血清に 5, 10, 20, 40, 80 %の割合で混じている時10%の濃度まで False agglutination が生起するが5%以下では該反応が認められなかつた。

ii) 健康人血球では個体による False agglutination の差異は認められなかつた。

iii) それぞれが Rouleaux forming property を有する2つの媒体の混合は，食塩水のように全くその能力を有たないものと混じた場合に比して，R.f. による False agglutination が強くなるのが知られた。

iv) R. f. に起因する偽凝集と抗原抗体反応に基づく凝集反応とは，肉眼的にも顕微鏡的にもその形態上からの区別は非常に困難であり，殊に適合試験を行う受血者血清が強い Rouleaux forming property を有する時にはその判定を迷う可能性が大である。

第4章　考　按

生理的食塩水中に浮游させた赤血球は，その母地である血漿蛋白質溶液中に浮游している時と異つて，種々の条件によつて変形を来たし易い状態にあるといへる。従つて観察方法の撰択はその形態を追求する上で最も重要なことゝ考へられる。

著者は種々の観察法を検討した結果，径1.5cm，中心部の深さ 0.3mm の一穴ホールグラスにカバーグラスをかぶせて鏡検する方法が最も血球形態に変化が起りにくゝ，且つ多数標本を検するにも簡便であることから実験にはすべてこの方法をい用た。

生理的食塩水浮游血球の時間及び温度による形態の変化は，37°C の比較的高温に保存したものでは低温(2°C)保存のものに較べて早く球形化していく傾向が認められた。血漿中に浮游している場合でも長時間放置されたものは biconcave disk の基本型から平滑な球形へ移行しやがて溶血するという段階を辿るものと考へられる。

洗滌による影響を検すると10回目位から金米糖状，椀状のものが認められ，中央のくぼみの厚みを増し両端の丸い桿状になつたものがホールの中心部にも増えてくるのが認められる。これ等の変化は球形化する前段階と考へられる。

牛赤血球について等張食塩水中に於けるアルカリによる形態変化を検した三代[10]等の最近の報告でも溶血に至る直前には血球が平滑球形をとると述べられている。

被凝集性と赤血球の形態は直接関係はなく，新鮮浮游血球の両凹み円板型のものゝ被凝集性と 2°C に5日間保存し，殆ど球形血球のみしか認められない浮游血球の被凝集性の間に有意の差は認められない。併し R.f. を起すためには基本の biconcave disk の形をとることが必要で，球形化したものはそのまゝでは決して Rouleaux を形成することがない。

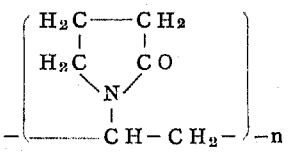
正常人血漿中の連銭形成因子は 56°C 60分の加熱或はトロンビンを加へて，フイブリノーゲンをフイブリンに転化させた後の血清中にも殆ど変化なく残存することが知られた。

Cohn の分劃中では R. f. を最も強く生起するものは F. I. に含まれ，ついで F. II+III. がその $\frac{1}{4}$ の効力を有するが，他の分劃中での Rouleaux の生起は全くみられず，F. IV. では却つて血球の球形化が著明でこれに浮游させた血球は biconcave disk 型を保ち得ず悉く球形化した。

併しながら Fahraeus[12] のいう如く R. f. 生起の原因を Fibrinogen と断定することは危険であり，全くトロンビンに対する clottability を有しない血清中に於てもよく著明な R. f. をみることはこれを裏書きしている。

代用血漿中の或るものが R. f. を著明に惹起しこれが輸血時の適合試験に際してまぎらわしい凝集反応を起すことは Mollison[3], Stratton[4] 等の著書にも記載されており，Dextran 等でもその分子量の差異によつて R f. を起すものと起さぬものとがあるとされている。Dextran 分子は Glueose 分子の長い鎖状構造から成り（平均分子量 75,000－200,000）水解によつて分子量の低いものへ転化する。Mollison の記載によれば分子量の大なものは Rouleaux forming property を有し，小なものは有しないとされている。

著者は杏林製薬の種々なプラスゲン (polyovinylpyrrolidone) について R.f. 生起の状態を観察したが，健康人血球の間には個人差は認められず，他哺乳類血球では人と異つた態度をとることが知られた。



連銭形成が強く起ると顕微鏡的にも20～30ケの血球

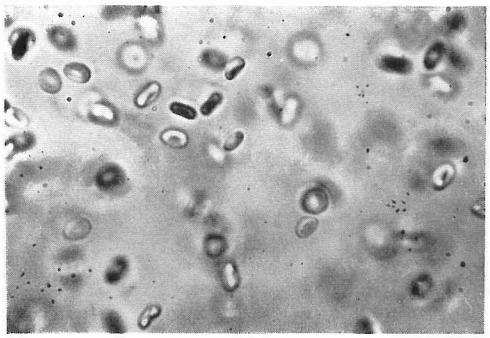


写真 1

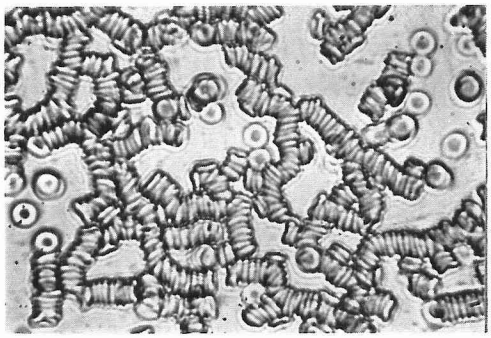


写真 2

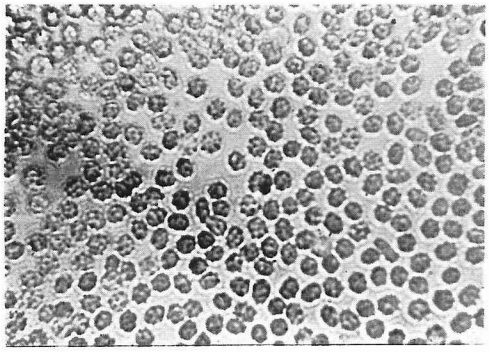


写真 3

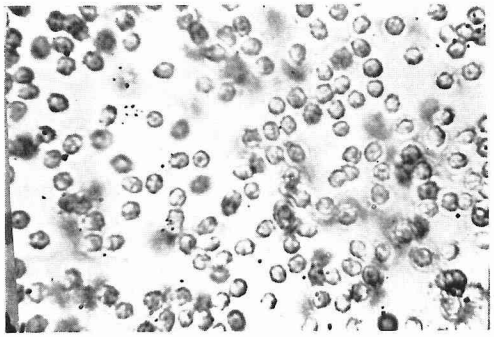


写真 4

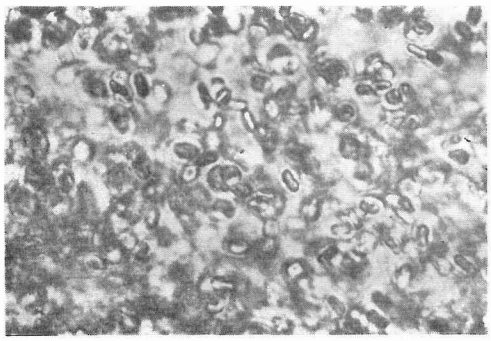


写真 5

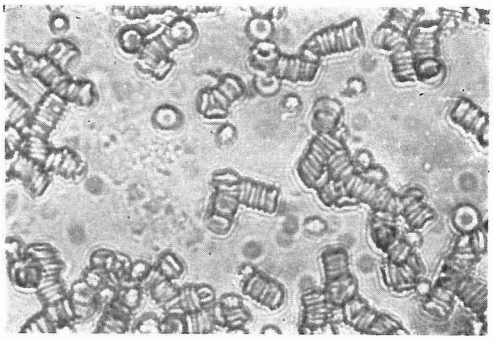


写真 6

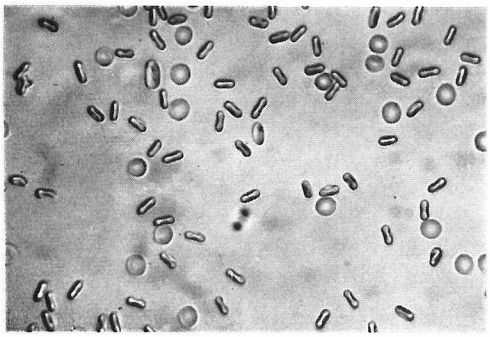


写真 7

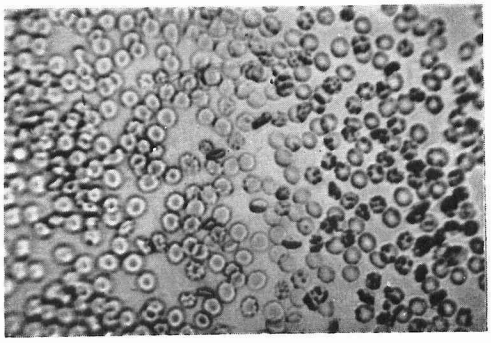


写真 8

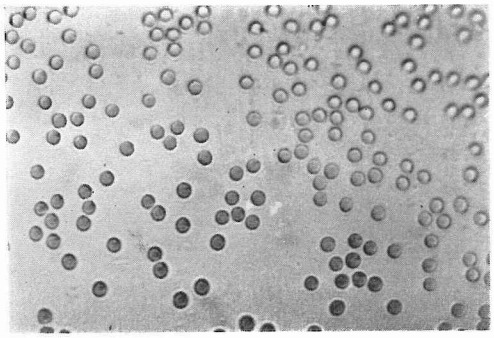


写真　9

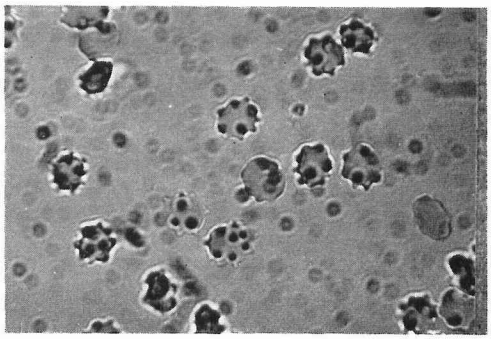


写真 10

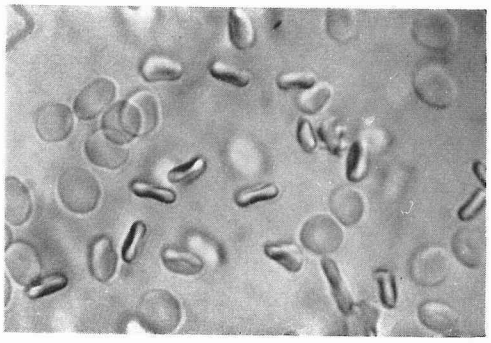


写真 11

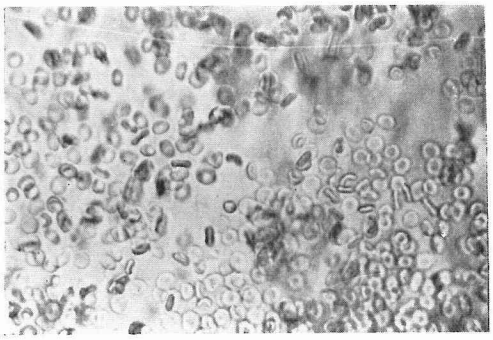


写真 12

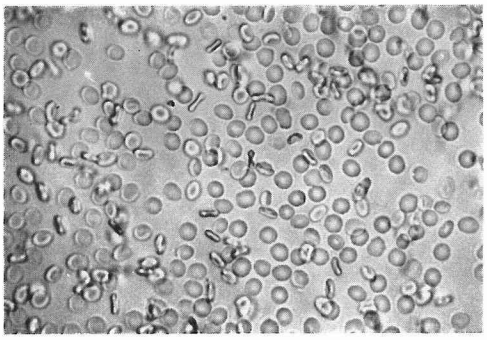


写真 13

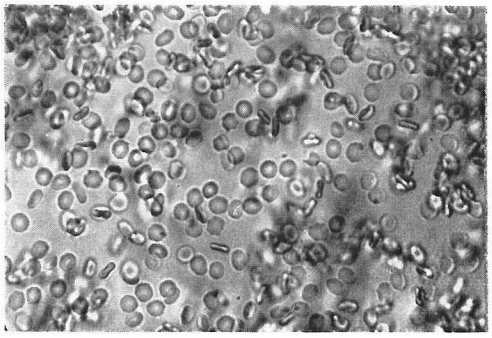


写真 14

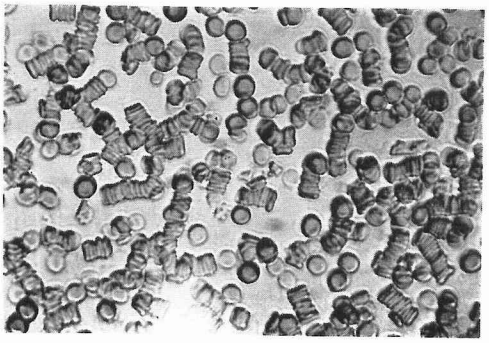


写真 15

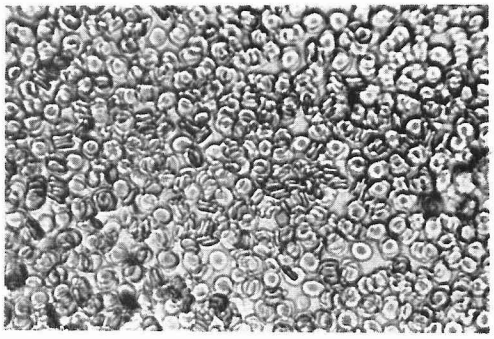


写真 16

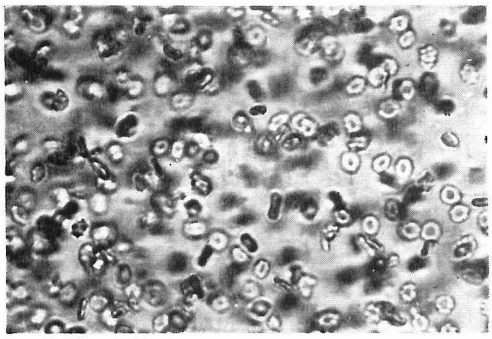


写真 17

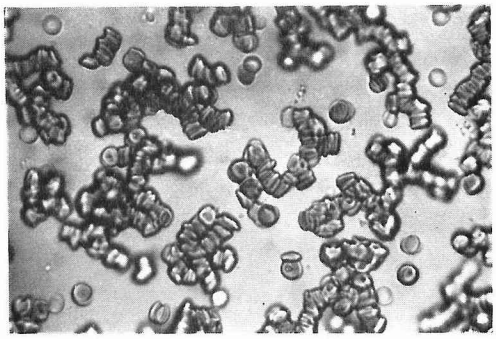


写真 18

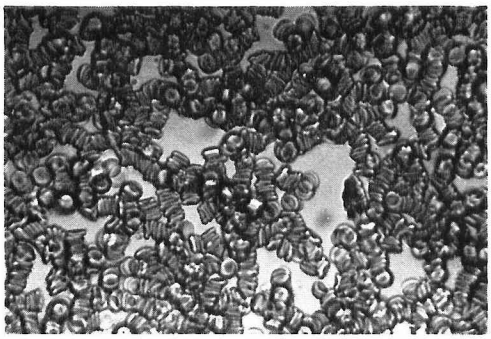


写真 19

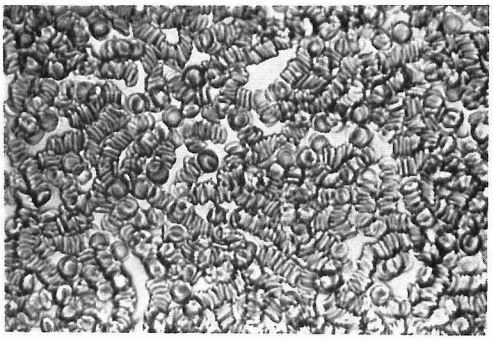


写真 20

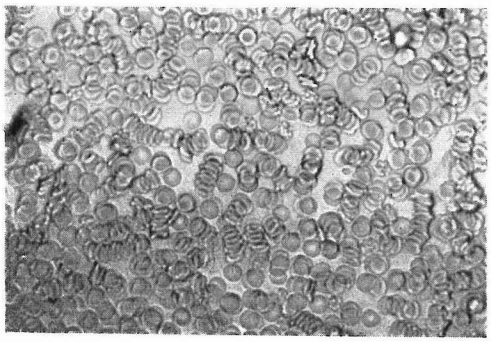


写真 21

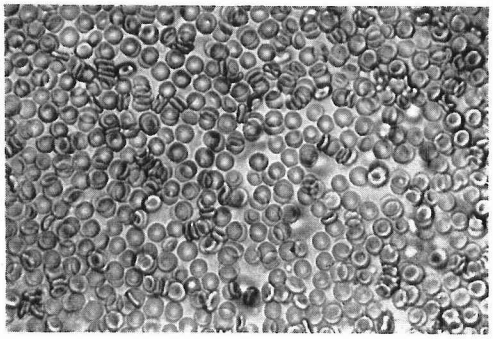


写真 22

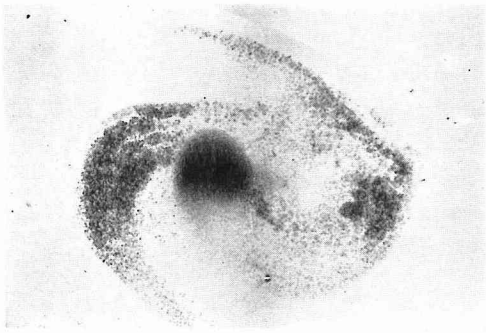


写真 23

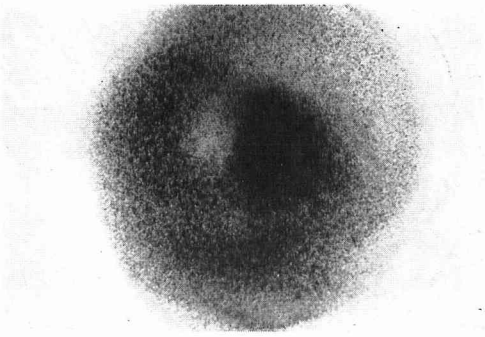


写真 24

よりなるRouleauxが10数ヶ集つて凝塊をつくり，肉眼でみても凝集塊と認め得る程度の大きさに達する。斯かる場合には抗原抗体反応による真の凝集と判別する必要が生じてくるのである。強い凝集反応の場合は問題はないが，(＋)程度の弱い凝集反応との区別は殆どつけ難い。両者の鑑別法については後編に於て検討する。

Rouleaux formationが抗原抗体反応と根本的に相異する点は特異性を有しないことであり，吸収操作をくりかへし行つてもR.f.は吸収前後に於いて反応に変化を来たさない。

注入用プラスゲンは兎血球に対しても強いRouleaux forming propertyを有しているが，これを兎腹腔内に5cc宛隔日5回注入し抗体産生の有無を検したが，注入用プラスゲンは全く抗原性を缺き免疫学的に特異な事項は発見されなかつた。尚Schepperとしてヒト血漿アルブミンを10%の濃度に生理的食塩水で稀め0.5cc づゝプラスゲンと共に追加免疫をくりかへしてみたが，プラスゲンに対する何等の抗体も産生されなかつた。因に同家兎血清中にはヒトアルブミンに対する高力価の沈降素が産生されたが，Joó & Csizmás⑬⑭等のDextran-preparationの腹内細菌のVirulenz上昇作用についての報告例と考へ合はせるとプラスゲン等には蛋白質と共に免疫する時にその抗原性を強化する作用があるとも考へられ興味深いが，本論と直接関係がないので省略する。

結　論

媒体中に浮游する赤血球が示す特異な現象である連銭形成について種々の点から検討を加へ次の如き結果を得た。

1) 生理的食塩水に浮游させた赤血球は非常にガラスの影響をうけ易くなり，平板スライドにカバーグラスをかけて鏡検すると棘形成，球形化等の変形が著明で，両凹み円板状の形態を保ち得ない。ホールオブエクト法によりこの変形を最少限度に防ぎうる。

2) 生理的食塩水では連銭形成を起さない。又赤血球の被凝集性は両凹み円板状でも球形でも大差なく形態とは直接関係がない。

3) 血漿のRouleaux forming factorはFibrinogenを除去する操作を行う前後に於て有意の変化が認められない。

4) Cohnの冷エタノール法により分離した各分劃についてRouleaux forming propertyを検したところF.I.が著明に強く次でF.II+III.であり，他の分劃では連銭形成が認められない。

5) 代用血漿の中にもRouleaux forming propertyの強いものがあるが，特定の代用血漿に対しては健康人に於て血球による個人差は著明でない。動物の種類によつてその赤血球にR.f.の起るものと起らないものがあるが，同種動物間では個体差は著明でない。

6) 強いR.f.は抗原抗体反応による弱い(＋)程度の凝集と形態上からでは全く区別し得ない凝集塊を形成することがある。

7) 血球浮游液作製時からR.f.の完了するまでには室温(15°～22°C)で30分前後を要し，浮游血球の濃度が高いと発現の時間が短縮される。

8) 一旦生起したR.f.も生理的食塩水で洗滌することによつて解きほぐすことが出来，一旦ほぐれたものは生理的食塩水中では長時間放置しても再びRouleauxを作ることはない。しかし元のmediaに戻すと或程度可逆的に再びR.f.を起す。

9) 強いRouleaux forming propertyを有する注入用プラスゲンと血漿を混じた場合False agglutinationが起るのはの10%の濃度までゞそれ以下では凝集塊形成は認められない。

擱筆にあたり，御指導御校閲を賜つた恩師野田教授に心から感謝を捧げる。尚実験に使用した各種プラスゲンは杏林製薬より提供を受けたものである。

文　献

①荻原　昭：信州医学雑誌　8, 5, 931, (1959)　②Tullis, L.: Blood Cells and Plasma Proteins 53, Academic Inc. New York (1953)　③Mollison, P. L.: Blood Transfusion in Clinical Medicine, 259, Blackwell Scientifie Public. Oxford. (1956)　④Stratton, F. & Renton, P. H.: Practical Blood Grouping, 96, Blackwell Scientific Public. Oxfird. (1958)　⑤秋城和人：信州医学雑誌　8, 3, 433, (1959)　⑥Cohn, E. J.: J. Am. Chem. Soc. 62: 3396, (1940)　⑦Cohn, E. J. Am. Chem. Soc. 68: 459, (1946)　⑧Cohn, E. J.: J. Am. Chem. Soc. 72: 465, (1950)　⑨山中　元：信州医学雑誌　8, 1, 115, (1959)　⑩松岡松三・他：臨床検査　2, 1, 61, (1958)　⑪三代幸彦・他：医学と生物学　50, 6, 221, (1959)　⑫Fahraeus, R.: Physiol. Rev. IX, 241, (1929)　⑬Joó, I., & Csizmás, L.: Ztschr. f. Immunitätsforsch. exper. Ther. 115: 215　⑭Joó, I, & Pusztai' S., & Csizmás, L.: Ztschr. f, Immunitätsforsch. exper. Ther. 117: 386, (1959)