

Rouleaux formation に関する知見補遺

第一編 文献的考察

昭和34年4月13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 1 Introduction and documentary Studies

Akira Ogihara

Department of Legal Medicine, Faculty of Medicine, Shinshu University

(Director: Prof. Dr. Kinjiro Noda)

血液の有形成分の一つである赤血球については、Swammerdam が1958年に、また Leeuwenhoeck が1673年にそれぞれ蛙や人の血清中に「まるい粒」を発見して以来、人間の赤血球はその血漿或は生理的食塩水などの中に浮遊している時には、両凹み円板状 (biconcave disk) をしているものとして知られて来た。

この独特な形は赤血球の内部や表面で起る物理的な張力に基づくものと長い間考えられていた。併し最近25年間に赤血球の外形や構造の問題は全く別の方向から研究されるようになった。一般にいつて細胞構造、特に赤血球を構成している最も重要な要素は分子の特別な配列によるもので、こうした分子構造を物理化学的な点で特長づけているものは、そのゲル状態の変化であると考えられている。この特有な分子配列が赤血球の表面だけに限られているものか、細胞内部にも存在しているかと言う問題については今のところ未解決に止っている。

Parpart^①は洗滌して Hb. free にした赤血球基質より脂質と蛋白質とを見出した。この蛋白質は明かに赤血球に特有のもので血漿蛋白等とはその構造を異にするものである。脂質は cephalin, lecithin, cholesterol 等で、抽出しえたものゝ約40%を占めている。脂質と蛋白質との重量比は、1:1.7で分子量比は、60:1であるという。赤血球膜の滲透圧を決定する正確な分子配列は解っていないが、脂質は血球膜の外表面に位置しており、trypsin や pepsin などは膜の透過性を変えずことはないが、lipase は水溶性の溶質としてその透過性を変えずことが知られている。

細胞内部の構造についても、いわゆる繊維網の様な構造が想像されているが正確には解っていない。併しそれらは蛋白質、アミノ酸、電解質、酵素代謝による糖質等の濃厚なものであると考えて誤りはない様であ

る。重要な物質は O_2 と CO_2 を運搬する Hb で、その他に炭酸脱水酵素 (carbonic anhydrase) があり、 CO_2 の加水分解に触媒的に働く酵素とされているが、その化学的組成や分子量などは解っていない (Gibson^②)。

生の赤血球の種々の媒体の中に於ける形態の変化は実に多種多様で、最も生理的な状態と考えられる自己血漿中に浮遊している時の両凹み円板状から、ペレー帽状、球状、金米糖状、柳葉状或はコンマ状等と、媒体の滲透圧、pH 粘稠度等の変化に応じて或る程度まで可逆的にその形態を変化する。

これ等の諸点については我国に於ても横井^③の注射液による人血球の形態変化についての研究があり、氷点降下度から理論的に算出された NaCl、ブドウ糖或はリンゲル氏液などの等張液は、実際の人血球の形態上よりみた等張濃度と必ずしも一致しない結果をえており、又舟木^④、大池^⑤等によるコロチオン膜の間に於ける赤血球の形態をみたものでは、生理的食塩水などの等張液浮遊赤血球は、ガラスの間に於て観察したものと比較して、二三の動物の赤血球が特殊の形態変化を来たしたことを明かにしている。

1893年 Humberger は赤血球を食塩水や糖溶液に浮遊させると血漿中と異つて完全な球形になるが、これに血清や血漿を加えると再び元の円板形に戻ると報じた。ところが1920年 Brinkman と Van Dam はその所見を訂正し、食塩水に自由に浮遊している血球は円板状で球形ではなく、たゞガラスの面に触れたところだけ球形になると報じた。この2つの報告を知らずに Goagh (1624) は同じ現象をみたが Humberger と同じ誤った見解を抱いた (Ponder^⑥)。

生理的食塩水の中でどうして血球が球状に変化するのかがよく判っていない。又円板形をとる原因についても論議はつきない。

Ponder^⑦は internal solidity があるためと考えている様であり、円板形を保つのに必要なものとして anti-spheric protein という物質を分離した。このものは血清アルブミン分劃であり、血球からはガラス等と接触することによって容易に吸着し去られるという。

洗滌により血漿成分を失った赤血球はガラスの影響を受け易くなり正常の円板形から球形或は金米糖形に変ずると報告されているが、このことは赤血球の形態を観察する時、その観察法の如何によつては、己にそれだけでも血球形態に変化を来たすので、in vitro で実験を行う際には常にこれ等の影響が、浮游する媒体の性質による影響の他に加味されることを考慮に入れる必要のあることを示唆している。一度変化した赤血球の形態を非可逆的に固定するには 0.2mol の NaCl 溶液に 10% の濃度に浮游したものを 10cc にタンニン酸溶液 (0.02~0.03mol) を加えると赤血球は他の濃度の媒体に再浮游してもその形態に変化を来たさないという (大山^⑧)。

赤血球はこの様に浮游している媒体の性質に依て、実に千変万化に形態を変ずるが、中でも興味深いことは血漿、血清、アラビアゴム、ゲラチン、カゼイン、マクレーン酸の Na 塩、或は最近代用血漿として盛に用いられているデキストラン、ペリントン、プラスゲン等の高分子溶液の中では強く集合 (aggregate) する傾向があり、互にその平坦面を接着し合つていわゆる連鎖形成 (Rouleaux formation, Geldrollenbildung) をする事実である。

この 'Rouleaux formation' (以下 R. f. と略記) という特異な現象に関しては今世紀の初頃から一般の興味を惹いてその機序についても色々の説が立てられていたが、この問題に最も広範な検討を加えたのはスウェーデンの R. Fahraeus^⑨ (1921) である。Fahraeus^⑨ は赤血球沈降速度促進の直接の原因として R. f. をとりあげ、種々の観点からその機序についての検討を行っている。

溶液中に浮游する粒子の沈降速度を決定する Stoke の法則

$$V = \frac{2}{9} \cdot g \cdot \frac{D-d}{y} r^2 = K \frac{D-d}{y} r^2$$

$$\left(\begin{array}{ll} r: \text{粒子の半径} & d: \text{液体の密度} \\ D: \text{粒子の密度} & y: \text{液体の粘度} \end{array} \right)$$

に従つて集合した赤血球もその沈降速度が決められることを彼は説いているが、赤血球が集合せず個々の粒子として浮游している時はその suspension stability は大であるが、何等かの原因で血球が集合して大きな

凝集塊を作る時には suspension stability は悪くなり (Stoke の法則の r の二乗に比例して V が増加する) 速かに沈降する。この事は我々が免疫抗体中の非特異性凝集素を吸収除去する際に毎回経験している事実——即ち非特異性抗体と反応した吸収血球の凝集塊は速かに沈降して液は明澄となり、吸収操作をくりかへしていくに縦つて凝集血球塊の形成が弱くなり、吸収血球の浮游懸濁状態は長く続くのがみられる——よりも容易に類推し得る。

妊娠や或る種の疾患 (例えば急性肺炎等) の際に赤血球沈降速度が著明に増加する事実からそれらの患者血球の R. f. の状態に着目した彼は、かゝる患者の血漿中では正常人の場合に比して赤血球が集合する傾向が著しく強く、R. f. の様相についても特異な状態の観察されることを記載している。即ち正常人血漿中でみられる R. f. は血球が互に平坦面を接着し合い一本の細長い Rouleaux を形成するに止まるのに反して、肺炎等の患者血漿中で起る R. f. は遙かに強い力によつて血球が癒着し合い、一つ一つの Rouleaux がまた相互に癒着し合つて大きな集塊を作りその一つの集塊中に含まれている血球の数も非常に多い。正常の場合には形成された Rouleaux はカバーガラスを動かして液を流動させる操作で容易に分断され血球がバラバラにほぐれるが、病的に強い集合が起つたものではこの様な操作で血球をときほぐすことは困難であるという。

Synder^⑩ (1929) も R. f. はリウマチ熱、結核、肺炎、心疾患或は月経、妊娠時等の様な生理的条件下でも増大する傾向のあることを報告している。

R. f. の傾向が増大する原因については、血球の浮游する媒体の性質が問題とされることは当然であるが、Fahraeus は R. f. の病的に増大する傾向は血漿蛋白中の Fibrinogen, Globulin 分劃の増加、殊に前者の増加が原因であると主張している。肺炎などの炎症性疾患の際には血漿フィブリノーゲンの著明に増加する傾向はこの事を裏書きするものとし、Lewinski, Kroesing 等の妊娠時に血漿中のフィブリノーゲンの増加するという報告を引用している。血漿 Fibrinogen 量の増加と血球の集合する傾向の増加、赤沈値の促進という事との間には完全な平行関係が成立つとしている。

杉山^⑪も R. f. の傾向と赤沈値とは著明な関連性のあることを報告している。

山田^⑫は血球と血漿を交換する実験を行い赤沈値を促進する原因は主として血漿の側にあると報告している。

又塩析法によつて分離精製した Fibrinogen 溶液, Globulin 及び Albumin 溶液に生理的食塩水で洗滌した血球を浮游させて沈降速度と血球集合の状態をみると, Fibrinogen 溶液中では最も集合の度が強く沈降速度は1時間110mm, Globulin 溶液中では集合の度は Fibrinogen よりも弱いながらも尚可成り強く沈降速度は50mm, Albumin 溶液中では殆ど集合がみられず沈降速度も僅に1時間1mmであつた (Fahraeus¹⁰)。

Fahraeus¹⁰は又物理化学的而より R. f. を考える時第一に赤血球とその浮游する媒体との間の界面張力, 第二に赤血球表層の荷電の問題, 第三に赤血球の表層をとりまく親水膠質の問題が赤血球の集合能と因果関係ある最も重要な要素であると考えた。界面張力は血球を互に集合せんとする如くに働き, 表層の荷電(負に荷電しているという)は血球を互に反撥しあう如く働き集合をさまたげ, 表層の親水膠質による被覆は同様に血球の集合をさまたげ, 懸濁安定性を助長するという。

その後第二次世界大戦中盛に用いられた代用血漿のうち gelatin や glutamyl peptide も R. f. を起すことが知られ, その原因としてやはりこれらの蛋白中の非対称性 Fibrinogen 分子や, 繊維性蛋白質或は異なった型の重合体が赤血球を可逆的に集合させる作用を有していると推定され (Mollison¹¹), その集塊は血清アルブミンや glycine, その他の薬品により分離されると記載されている (Cohn¹²)。

又単に生理的食塩水などで血漿を稀積することによつて R. f. が防止されることは已に1900年に Shattock¹³ が報告している。

R. f. は in vitro に於てのみ観察される現象ではなく, in vivo に於ても生起していることが定推されている。流血中に於て赤血球が aggregate して血管中を通過していくことは1920年 Ploman¹⁴ が網膜血管の観察時に認めている。赤沈値の促進している患者では眼球的指圧による網膜血管の拡張は著明で, その中をあたかも赤い豆が数珠状に繋つて走る如く, 集合した赤血球の塊が通るのが見られたという。Fahraeus¹⁰ は馬の腸間膜毛細血管を観察しているが, 馬は正常でも非常に赤沈値が速く in vitro でも自己血漿中で赤血球の集合する傾向が大であるが, 毛細血管中でも血球は強く集合して恰も一連の緻密な棒の様になつて血管の中心部を流れているのが観察された。又人間で上腕二ヶ所を臍血帯で緊縛し15分間表在静脈の血行を停止させたまま上腕を垂直に立てゝおいて, 緊縛部の上端より穿刺採血した血液をしらべてみると, 健康人ではその中に赤血球が多数認められるが, 赤沈値の促進

した人では赤血球は下方に沈下して血漿成分のみしか認められなかつたという。

しかし乍ら生体内で赤血球が集合して R. f. をしていることは, 異型輸血を行つて生じた血管内凝集などと異り, そのこと自体が生体に有害な影響を与えるものではないと考えられ, 臨床的意義は少いとも考えられている (Schiff & Boyd¹⁵)。

連鎖形成は抗原抗体反応によつて起る赤血球凝集反応 (haemagglutination) とは本質的に異なるもので, 吸収される様な抗体は関与していないといわれている (Meyer & Zyskoven¹⁶)。

Rouleaux formation に関する研究は, 1921年 Fahraeus が広範な検討を行つて以来, これに二三の研究者による補足が加えられたに止まり特に見るべき成果は挙げられていないようである。R. f. の起る原因についても, 現在のところ血球が何故 biconcave disk の形状を呈するかということが解明されていないと同様に, その本態については不明のままに止つて

いる。Fahraeus の云う如く R. f. の原因が赤血球とその媒体との界面張力によるものならば, 個々に浮游する赤血球はすべてその形状を球形に変ずる筈である。併し乍ら生理的状态では赤血球は両凹み円板状をして居り, 球形化するのは他の何等かの原因が作用した結果である。又 R. f. を起す第一の要件は個々の赤血球が両凹み円板状の基本形を保つていることで, 球形乃至は金米糖形に変じたものは決して Rouleaux を形成することがない。赤血球を円板形を保つためには或は Ponder 等の云うように, 血漿蛋白中の或る成分が関与しているのかも知れない。確に洗滌によつて血漿成分を失つた血球は生理的食塩水等の等張液の中でも時間の経過と共に球形化し円板形を保ち難くなるのは多くの人の認めるところである。

人血漿中で R. f. の傾向の増加は Fibrinogen の増量と平行関係があるようであるが, R. f. は血漿蛋白以外でも粘稠度の高い高分子溶液 (例えばプラスゲン等の polyvinyl-pyrrolidone 溶液) の中等で生起するので, Fibrinogen 分子のみが必ずしもこの現象を生起させる唯一の原因とは考えられない。

R. f. が臨床的に問題となるのは第一に Fahraeus が追求したように赤沈値促進の直接の原因であると推定されることゝ, 第二に血液型判定を行う時に凝集反応と見誤る可能性があることである。この問題に関しては血液型をとり扱つた成書には必ず触れてあり, 強い R. f. は之を真の凝集反応と判別することは難かしい場合があるとされている (Schiff & Boyd¹⁵, Mollison¹¹).

son¹⁴⁾。

赤血球は型的凝集素によつて特異的に凝集反応を起すだけでなく、或る種の化学薬品²⁰⁾²¹⁾²²⁾、或は植物性蛋白より抽出したいわゆる植物性凝集素 (Phytagglutinine²³⁾²⁴⁾²⁵⁾²⁶⁾²⁷⁾²⁸⁾²⁹⁾³⁰⁾ 等によつても凝集反応を起すことが知られている。

又 Csiky¹⁴⁾によれば1%のタンニン溶液によつても凝集反応の起ることが報告されているがこの凝集反応は眞の抗原抗体反応による凝集反応とちがい一旦生じた凝集塊も強く機械的に振盪することによりバラバラにときほぐすことが出来るのが特長であり、顕微鏡でみると特に凝集塊の周辺附近では連鎖形成がよくみられ、血球の輪郭も15~20分は破壊されずにいるが、眞の凝集反応の如く時間と共に益々血球の集合が強くなるという傾向はないと述べている。Coca²²⁾の観察にもみられる様に眞の凝集反応では血球は不規則に且つその輪郭はひどく破壊されて、時の経つにつれてこの程度が増大する。

むすび

細かく観察すれば R. f. と眞の凝集反応とは種々の相違点が見出されるが、漠然と観ている時には強い R. f. と眞の凝集反応とを見誤ることがないとはいえない。著者は赤血球の形態上特異な現象である R. f. を中心としてその成因の機序について従来業績と比較検討を加え文献的考察を行つた結果、

1) 赤血球が集合して特異な構築を示す現象である Rouleaux formation は正常人血漿中でも観察されるが、その傾向の増大は赤沈値の促進を来す直接の原因と考えられる。

2) Fahraeus 等によれば R. f. 増加の傾向は血漿 Fibrinogen の増加と平行関係がある。

3) R. f. 血は漿のみならず他の粘稠性の溶液 (例えばアラビアゴム、ゲラチン、カゼイン、その他種々の代用血漿) 中に血球を浮遊させた時にも観察される。

4) R. f. の生起する眞の原因については不明である。

等の問題について、再検討を加えると共に血液型判定上何の程度の誤認の本になるかという実際面についても検討を加え、特に各種疾患時の血漿 Fibrinogen の消長と R. f. の傾向との関連性等について検討を加えることはあながち意義のない事ではないと信じ次報に述べる如き実験を行つた。

稿を終るにあたり、終始御懇篤な指導と鞭撻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

- ①Parpart, A. K. and Dziemian, A. J.: Cold Spring Harbor Symposia Quant. Biol. 3, 17, (1940).
 ②Gibson, J. G.: Cited in "Blood Cells and Plasma Proteins" edited by Tullis, J. L. 203, Academic Press Inc. New York (1953). ③横井秀雄: 十全会雑誌 42, 4, 1107, (1937). ④舟木 広 他: 京都府立医大誌 62, 441 (1927). ⑤大池 寛: 京都府立医大誌 62, 1, (1957). ⑥Ponder, E.: The Mammalian Red Cell and the Properties of Haemolytic Systems Berlin (1934). ⑦Ponder, E.: J. Exp. Biol. 17, 117, (1940). ⑧大山純夫: 日本血液学会雑誌 19, 3, 301, (1956).
 ⑨Fahraeus, R.: Acta Med. Scand. IV, 1, (1921).
 ⑩Fahraeus, R.: Physiol. Rev. IX, 241, (1929).
 ⑪Synder.: Cited in "Immunology" by Scherwood, N. P., 167, (1935). ⑫杉山繁輝: 日本血液学会雑誌 總會号 (S.17) 97, (1942). ⑬山田正徳: 日本病理学会雑誌 33, 399, (1944). ⑭Mollison, P. L.: Blood Transfusion in Clinical Medicine, 259 Blackwell Scientific Public. Oxford. (1956).
 ⑮Cohn, E. J.: Cited in "Blood Cells and Plasma proteins" edited by Tullis, J. L. 53, Academic press Inc. New York (1953). ⑯Shattock.; Cited in "Immunology" by Scherwood, N. P., 167, (1935). ⑰Ploman.: Anales d' Oculistique el vii (1920). ⑱Schiff, F., Boyd W. C.: Blood Grouping Technic 35-36 Interscience Publishers, Inc. N. Y. (1942). ⑲Meyer, K., Zyskoven, H.: Med. Klin. Wchnschr. 19, 87, (1923). ⑳守山英雄: 実験医学雑誌 17, 943, (1933). ㉑久保忠夫: 社会医学雑誌 494, 197, (1928). ㉒山田幸太郎: 広島医学 (原著) 5, 5, 391, (1956). ㉓小松原謙三: 東京医誌 36, 1340, (1921). ㉔金子喜雄: 千葉医誌 16 (下) 2095, 2613, (1938). ㉕三木敏行: 日法医誌 2, (5~6) 154, (1948). ㉖渡辺宏: 日法医誌 9, 4, 302 (1955). ㉗松山 明: 日法医誌 9, 3, 262 (1955). ㉘山内峻呉 他: 日法医誌 10, 3, 293, (1956). ㉙Tobiska, J. and Wiedrmann, D.: Ztschr. f. Immunitätforsch. 117, 114, (1959). ㉚Tobiska, J.: Ztschr. f. Immunitätforsch. 117, 156, (1959). ㉛Csisky, Th.: Ztschr. f. Immunitätforsch. 116, 329, (1958).
 ㉜Coca, A. F.: J. Immunol. 20, 263, (1931).