



| | |
|------------------|---|
| Title | マイクロチャネル通過による白血球の活性化と活性酸素の産生量 |
| Author(s) | 菊池, 裕子; 菊池, 佑二 |
| Citation | 日本ヘモレオロジー学会誌, 5(2), 107-110 |
| Issue Date | 2002 |
| Doc URL | https://hdl.handle.net/2115/28012 |
| Type | journal article |
| File Information | Hemorheology5-2-107.pdf |



マイクロチャネル通過による白血球の活性化と活性酸素の産生量

菊池裕子¹⁾、菊池佑二²⁾

- 1) 北海道大学大学院歯学研究科口腔医学専攻口腔病態学講座、
- 2) 独立行政法人食品総合研究所マイクロチャネルアレイ工学チーム

要約

我々は、毛細血管モデルとなるマイクロチャネルアレイを通過中ないしそこにトラップされた白血球からのルミノール増感発光を測定することで、白血球の分離や希釈を要せずに全血を用いて活性酸素産生量を測定できることを示してきた。これまで、白血球を活性化させるために *Salmonella typhimurium* LPS 等を添加して測定してきたが、マイクロチャネル通過時の壁との接触および変形だけでも白血球が活性化され、LPS 暴露時と同等に活性酸素が産生されることを見出した。

緒言

白血球による活性酸素の産生は、生体防御、すなわち感染予防に不可欠であるが¹⁾、同時に組織傷害因子としても広く議論されている²⁾。したがって、種々の生理的条件下および病的条件下で白血球の活性酸素産生量を測定することは極めて重要である。その簡便な測定法としてルミノール増感発光法がこれまで広く用いられてきたが、そこでは赤血球による吸収を避けるため、白血球の分離が求められる。そのため手間と時間がかかるだけでなく、分離操作と時間による白血球の状態の大きな変化を避けられない。全血試料を1~5%程度に希釈して測定する方法^{3, 4)}も試みられているが、希釈によっても白血球の状態変化は起きると考えられる。また、細胞間の相互作用は大きく変化する。

それに対して、我々は、マイクロチャネルアレイを通過中ないしそこにトラップされた白血球からのルミノール増感発光を測定することで、分離や希釈を要せずに全血試料を用いて白血球の活性酸素産生量を測定できることを明らかにし、その有用性を示してきた⁵⁻¹⁰⁾。他のグループ^{11, 12)}からもこの方法を用いた成績が報告されるようになってきている。

これまで、我々は白血球を活性化させるために全血試料に LPS を添加して測定してきた。LPS は白血球を刺激する物質として広く研究されてきたモジュリン¹³⁾である。特にグラム陰性菌に特徴的な細胞壁構成成分としてサイトカインの誘導能と白血球の粘着活性の誘発について多くの研究報告がなされている。

ここでは、マイクロチャネル通過時の壁との接触および変形だけでも白血球が活性化され、LPS 暴露時と同等に活性酸素が産生されることを見出したので、その成績を報告する。

方法

採血に同意を得た健常協力者からヘパリン採血（ヘパリン溶液 1000 単位/ml ; 5%量）した新鮮な全血の 500 μ l にルミノール生理食塩水溶液（20 mM）5 μ l を添加し、よく混和した。直ちにそのうちの約 200 μ l を MC-FAN にセットされたマイクロチャネルアレイ Bloody 6-7 に 20 cm 水柱差で流した。100 μ l の通過時間を求めると同時に流れを止め、マイクロチャネルアレイ部分（シリコン基板+ホルダー）を暗箱に移した。マイクロチャネルアレイ全体からの発光をフォトマルと直流増幅器の組み合わせ^{7, 9)}で測定し、発光量の時間的変化を 2 時間から 3 時間まで求めた。さらに、同一全血試料の 500 μ l にこれまでと同様に *Salmonella typhimurium* LPS 生理食塩水溶液（10 μ g/ml）5 μ l を添加した場合の活性酸素産生量を測定し比較した。また、発光の測定とは別に流れを止めた後のマイクロチャネルアレイ内の白血球の挙動を顕微鏡とタイムラプスビデオレコーダー（ビクター、SR-S970）を用いて観察した。

結果

既に報告しているように、発光量は時間と共に増加し、60 分から 120 分でピークに達し、その後激減した。この挙動は LPS を添加しない場合でも基

1) 〒060-0813 札幌市北区北 13 条西 7 丁目
2) 〒305-8642 茨城県つくば市観音台 2-1-12

本的に同じであった。ここではピーク値での比較を行った。図1および2にLPSを添加した場合と添加しなかった場合の多数の測定例について発光のピーク値を横棒で示し、小さい順に下から並べた結果を示す。図1は221例、図2は98例の結果である。発光ピーク値の個人差は極めて大きい。LPSを添加した場合の方が全体にピーク値は増加している。図3には同一試料についてLPSを添加した場合と添加しなかった場合の発光のピーク値の比較を示した。LPS添加により発光量が増加した場合は6例、変わらなかった場合が5例、逆に減少した場合は7例であった。このように同一試料では群間で見られたLPS添加による増加の傾向は認められなかった。

流れを止めた状態にあるので白血球はマイクロチャンネルアレイ内で静止しているものと考えていたが、タイムラプスビデオを用いた微速度撮影の結果、流れを止めた後、十分から数十分経過すると白血球特に顆粒球が活発に遊走を開始することが観察された。この白血球の遊走と活性酸素産生量の増加は平行するようにみえたが、ピークを過ぎて活性酸素産生量を示す発光が減少しても遊走状態は変わらなかった。

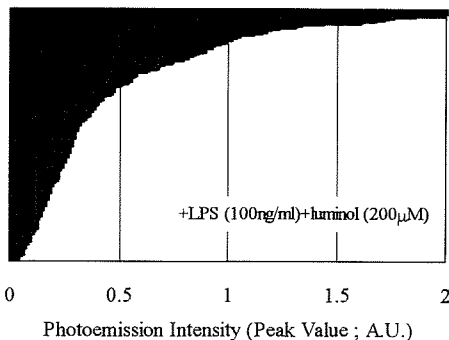


図1 LPSを添加した場合の発光量の個人差（ピーク値）

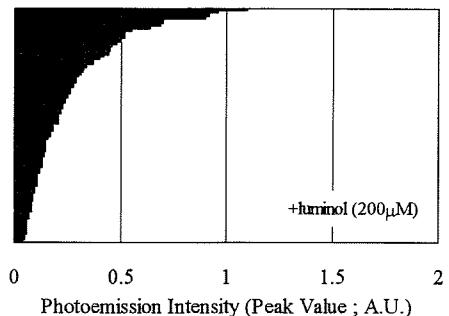


図2 LPSを添加しなかった場合の発光量（ピーク値）の個人差

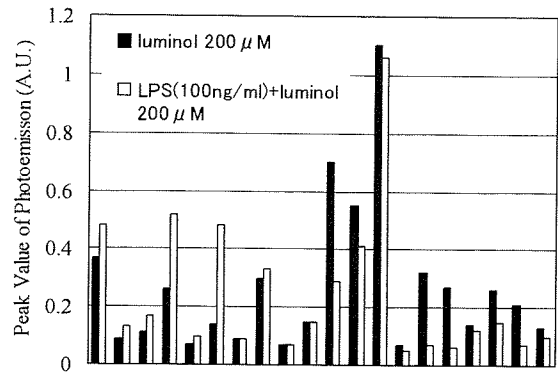


図3 同一血液試料についてのLPS添加時と非添加時の発光量（ピーク値）の比較

考察

これまで示して来たように、分離や希釈を要せずに全血中の白血球からの発光を測定できる利点は小さくない。しかし、マイクロチャンネルアレイ中であつ希釈されていない全血中という従来法にない条件下であるため、そこで示される白血球の活性酸素産生挙動を理解し、測定意義を明確にすることはこれからの課題である。また、従来法による知見も我々の方法による結果から見直される必要が出てくると思われる。

これまでの方法では白血球を活性化する物質の添加が必要であった。我々も、当然のこととして、当初、生菌 *Salmonella typhimurium* を添加して測定を行い、生菌の取り扱いが容易でないことから、そのLPSに切り替えて測定を行うようになった。生菌添加とLPS添加とで基本的な差がなかったため、生菌暴露とLPS暴露は活性酸素の産生においても同等の刺激・活性化になるものと考えてきた。

しかし、今回、LPSを添加しないでもほぼ同等の発光が得られることが分かり、マイクロチャンネルアレイ通過時の壁との接触および変形によって白血球が活性化されることが明らかになった。これまでの測定においても、壁との接触と変形が白血球活性化の主役であり、生菌暴露およびLPS暴露は修飾因子に過ぎなかった可能性も推定される。

LPS添加群と非添加群との比較ではLPSは確かに活性酸素の産生を増強する方向に働いていることが分かる。しかし、同一試料を用いた比較では、LPS暴露によって発光量すなわち活性酸素産生量が低下した例が18例中7例あり、単純に解釈でき

ないことが明らかである。

二つの可能性が推定される。まず、LPS 刺激と接触刺激とでは、情報伝達経路が異なり、一つの伝達経路の活性化が、もう一つの伝達経路を抑制する可能性である。全例で抑制が起こらないことおよび群間での比較の結果から、抑制が起こり得るのは伝達経路の一部であり、他の部分では相互に強め合っていることも推定される。次ぎに刺激は接触刺激が主であり、現在のマイクロチャネルアレイ通過条件では毎回の接触刺激が一定にならないことも考えられる。特に白血球が LPS を含む別の因子で活性化されていると接触刺激条件が余計に一定しなくなることも推定される。

これまで、活性酸素による組織と遺伝子の傷害は各種疾患の原因として広く議論されてきた。しかし、生体が本来備えている活性酸素に対する防御能力を越えて活性酸素が産生される可能性があるのは、放射線を大量に浴びた場合と白血球が大量に産生する場合だけであると思われる。白血球の活性酸素産生量を全血中およびマイクロチャネルアレイ内で測定するという我々の方法は活性酸素傷害と疾患の関係を解明していく上でますます重要になっていくものと思われる。

文献

- 1) 金ヶ崎史郎：感染防御における活性酸素の役割 ライフサイエンス 4(1), 17-22, 1999.
- 2) H. Sies ed. Oxidative Stress. Academic Press, London, 1985 (井上正康監訳「活性酸素種と疾病」、学会出版センター、1987)
- 3) Iwabuchi, K., Nagaoka, I., Someya, A. and Yamasita, T.: Isolation and characterization of the neutrophil-binding proteins for platelet-derived adherence-inhibiting factor. Blood 82, 1884- 1890, 1993.
- 3) 高山房子、江頭亮、中山康光：血液試料のルミノール増感化学発光検出による酸化ストレス測定法の標準化—生体内酸化ストレスの経時変化追跡を目的とした— 日薬理誌 111, 177-186, 1998.
- 4) 菊池佑二、萩原昌司、菊池裕子、曲山幸生、大谷敏郎：マイクロチャネルアレイにトラップされた白血球からのルミノール依存性発光の測定 ヘモレオロジー研究会誌 1, 79-85, 1998.
- 5) Kikuchi, Y. and Kikuchi, H. E. Visual measurement of rheology and oxyradicals for leukocytes in whole blood exposed to bacterial cells and LPS using micromachined channel arrays. Proc. 20th European Conference on Microcirculation 151-155, 1998.
- 6) 菊池佑二、菊池裕子、高橋千栄子、磯野厚子：MC-FAN による酸化ストレスの測定とくろず、イチョウ葉エキスの及ぼす影響 ヘモレオロジー研究会誌 2, 91-96, 1999.
- 7) 菊池佑二、後藤清、森正治：MC-FAN 微弱発光測定装置の開発 ヘモレオロジー研究会誌 2, 109-117, 1999.
- 8) 山本直人、大多和俊彦、菊池佑二：MC-FAN 微弱発光測定装置の活性酸素消去系への応用 ヘモレオロジー研究会誌 3, 133-138, 2000.
- 9) 菊池裕子、菊池佑二：マイクロチャネルアレイ内の全血中白血球の活性酸素産生量の測定 電気学会論文誌 121-E(4), 175-180, 2001.
- 10) Y. Kikuchi, H. E. Kikuchi: Measurement of oxyradicals from leukocytes lodged in a microchannel array. SPIE, 4265, 14-19, 2001.
- 11) 出口祥子、栗原毅、他：インターフェロン投与初期の細血管内皮への白血球接着現象と活性酸素産生能 ヘモレオロジー研究会誌 3, 37-46, 2000.
- 12) 端口佳宏、太井秀行、中川光司、渡邊康光、菊池佑二：海洋深層水ミネラル摂取がヒト白血球のルミノール増感発光に及ぼす影響 日本ヘモレオロジー学会誌 5(1), 47-51, 2002.
- 13) 長谷部晃、柴田健一郎：微生物の有するモジュリン 北海道歯学雑誌 22, 109-122, 2001.

Activation of leukocytes by passage through microchannels and generation of active oxygen.

Hiroko E. Kikuchi¹⁾ and Yuji Kikuchi²⁾

¹⁾Department of Oral Pathobiological Science, Graduate School of Dental Medicine, Hokkaido University, Sapporo, 060-0813, Japan

²⁾Food Engineering Division, National Food Research Institute, Tskuba, 305-8642, Japan

【Abstract】

While the generation of active oxygen by leukocytes is crucial for the defense of an organism against bacterial infection, it is also discussed as a tissue injuring factor. Therefore, it is very important to measure the amount of active oxygen generated by leukocytes under various physiological and pathological conditions. We have so far shown that the measurement can be made for leukocytes in whole blood without separation of cells or dilution of whole blood by letting cells passing through or trapped at microchannels be subjected to the photoemission measurement using luminol or other photoemitting substances. Several other groups have also reported applications of our method.

We initially added bacterial cells to whole blood samples to activate leukocytes and later used lipopolysaccharides (LPS) for the same purpose. No significant differences were obtained between the addition of cells and their LPS. The present report describes that leukocytes are activated only by the contact to the wall and/or deformation that they undergo when they pass through the microchannels, and that the generation of active oxygen takes place to an extent similar to that when cells are activated by bacterial cells or LPS.