HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	マイクロチャネルアレイ通過時の白血球濃縮と白血球活性度
Author(s)	菊池, 佑二; 菊池, 裕子
Citation	日本ヘモレオロジー学会誌, 5(2), 63-66
Issue Date	2002
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/28027
Type	journal article
File Information	Hemorheology5-2-63.pdf

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

マイクロチャネルアレイ通過時の白血球濃縮と白血球活性度

菊池佑二[1)]、菊池裕子[2)]

1）食品総合研究所マイクロチャネルアレイ工学チーム、
2）北海道大学大学院歯学研究科口腔病態学

【要約】

全血試料をマイクロチャネルアレイに流した時に観察される通過中の白血球数（濃度）は、全血中の白血球濃度から求めたマイクロチャネルアレイ空間内にある数よりかなり大きいことが明らかになった。すなわち、白血球はマイクロチャネルアレイ通過時に濃縮されることが示された。その濃縮率は赤血球と白血球のマイクロチャネルアレイ通過速度をそれぞれV、Vとした時に、V/Vに比例することが連続の式に基づく計算によって示された。この結果から白血球の濃縮率は白血球活性度の良い指標になることが示唆された。

はじめに

白血球は赤血球と共に循環しながら生体防御活動を行っている。しかし、そのレオロジーが赤血球と大きく異なるため、しばしば赤血球の循環に対して障害となる。特に、刺激を受けて活性化された場合、外力による変形に対する抵抗を示し、さらに粘着性を発現するため、循環障害の程度は増大し、微小血管では障害は特に著しくなると考えられる。さらに、活性化が亢進した場合、活性酸素の産生も加わり、組織傷害を引き起こす結果になる。

一方、白血球が感染を最初に感知するのは勿論、悪性腫瘍化細胞の存在もごく初期から感知している可能性が高い。

循環している白血球の状態ないしレオロジーを正確に知ることができれば、感染症・悪性腫瘍の早期検出や副作用としての循環障害の予知など、その診断学的な意義は極めて大きいと思われる。さらに、その状態を薬剤や食品成分によって変化ないし修飾できれば、生体防御活動の附活および副作用の抑制・緩和も可能になると考えられる。

抹消血中の白血球の状態を見る方法として、これまで、塗布標本顕微鏡観察による白血球像と、蛍光抗体とフローサイトメーターを用いた表面接着分子発現量や細胞内アクチン量の測定が行われてきたが、定量性や感度および簡便性の制約からいずれも上記目的に対して十分に有用な方法にはなり得ていない。

一方、MC-FANによって健常者の全血の流れを観察すると、白血球の通過状態すなわちレオロジーが個人個人で微妙に異なることが観察される。これはMC-FANによって白血球の状態の測定・定量化が可能であることを示唆する。

臨床的には白血球の通過状態にさらに顕著な差が見られる例も少なくない。その場合、マイクロチャネルアレイの閉塞率や、その結果である全血通過時間の延長量により定量化が可能である。しかし、健常者において見られる通過抵抗の変動範囲では全血通過時間の変化も小さく通過時間による定量化は困難であると思われる。

ここでは、我々が観察しているマイクロチャネルアレイ通過中の白血球の数は全血中の数そのものではなく濃縮された後の数であることを示し、前後のテラス部分を含めてマイクロチャネルアレイ内の白血球数が白血球の通過抵抗を定量的に表現するものであることを明らかにする。

マイクロチャネルアレイ部分の空間の体積と濃縮がない場合の白血球数

MC-FAN で通常用いられるマイクロチャネルアレイはBloody 6-7であり、チャネル深さ4.5 μm、深さ中間点でのチャネル幅7 μm、チャネル長30 μm、チャネル本数8,736本並列である。チャネル部分の総空間体積は、（チャネル断面積）x（チャネル長）x（チャネル本数）で与えられる。すなわち、

$7 \times 4.5 \times 30 \times 8{,}736 = 8{,}255{,}520\ \mu m^3$

である。

前後のテラス部分の通過方向の長さはそれぞれ30 μmである。テラス部分の横方向の全長は流路本数に流路間の距離（ピッチ）16 μmを掛けて139,776

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

μm と求まる。実際は、140 mm が正確である。140 mm の長さに 16 μm ピッチで取れる最大数は 140 mm / 16 μm = 8,750 であるが、その全長 140 mm は 5 mm の長さが 28 回折り返される（チップの各辺につき 7 回折り返されている）形で得られているので、5 mm 当たりの最大数 312 の 28 倍で実際の最大数は 8,736 になる。テラス上の空間の高さはチャネルの深さと同じ 4.5 μm である。したがって、前後のテラス部の空間体積が

$140{,}000 \times 30 \times 4.5 \times 2 = 37{,}800{,}000\ \mu m^3$

と求まる。マイクロチャネルアレイ部分の総空間体積は

$46{,}055{,}520\ \mu m^3$

で、$1\ mm^3 = 1 \times 10^9\ \mu m^3$ であるから約 0.046 mm^3 である。

全血中の白血球数を 6,000/mm^3 とすると、この空間にある白血球数は 276 個と計算される。チャネル 10 本当たり約 0.3 個である。モニター上で 10 本程度チャネルが観察される倍率での使用が多いので、流れをもし瞬間に止めることができれば、白血球は 3 回に 1 度画面内に 1 個観察される程度の濃度である。

実際には明らかにそれより多くの白血球が観察される。すなわち、白血球が濃縮されていることが分かる。

白血球濃縮率の計算

マイクロチャネルアレイに対する赤血球の通過については連続の式ないし連続の条件が成り立つと考えられる。連続の式は、各流路部分での流速と流路断面積の積すなわちフラックスがそれぞれ等しくなることを意味する。したがって、流路抵抗の最も大きな部分で流速が決まり、それ以外の部分の流速は断面積比に逆比例する関係で決まってくる。例えばチャネル内での流速を V とすれば、テラス部分での流速は V・(7/16) である。以下簡単のためテラス部分での赤血球の流速を V とする。

テラス部分の断面積とその前の大きい（深い）流路の断面積の比は、深さの比すなわち 1:10 である。したがって大きい流路での赤血球の流速は V/10 である。また、そこでは白血球も赤血球と同じ速度で流れているはずで、白血球の流速も V/10 である。さらに、そこでの白血球濃度は全血中の白血球濃度 C である。

それに対して、テラス部分での白血球の流速と濃度をそれぞれ V'、C' とすれば、平衡状態では

$C \cdot (V/10) = C' \cdot V'$

が成り立つ。左辺はテラスに入ってくる数、右辺は出ていく数であり、両者は等しくなければならない。これも、白血球が消滅したり生成されたりしないことを意味する連続の条件である。したがって、

$C' = C \cdot V/(10V')$

となる。V' が V の 100 分の 1 であれば C' は 10C、すなわち 10 倍濃縮されることになる。

以上から、白血球の活性度の指標として 1/V' すなわち C'、より正確には C'/C を用い得ることが示唆される。

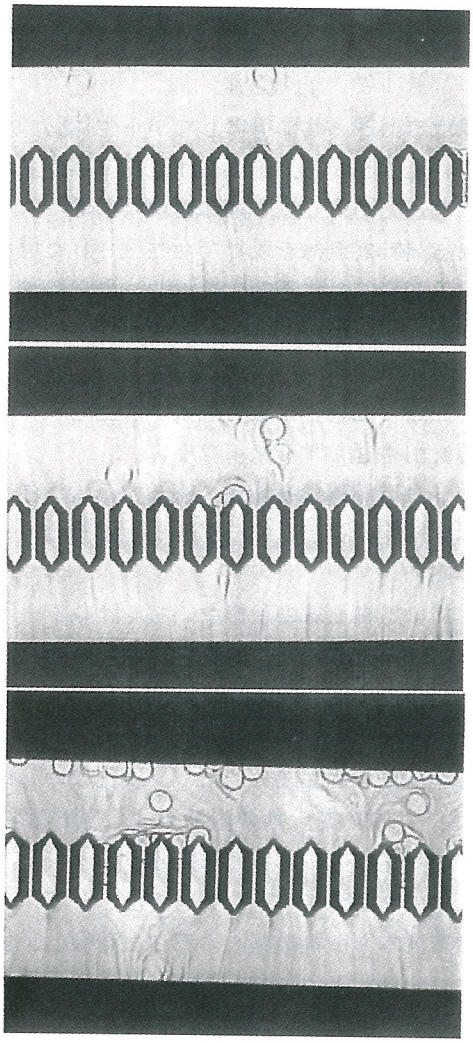

図 1　白血球の濃縮率が異なる 3 例

観察例

マイクロチャネルアレイを通過する血液の流れを瞬時に止めることは困難である。流れの動画から 1/60 秒の静止画を得て、白血球数を求めることがで

きる。静止画での観察例を図1に示した。通常画面上に 1〜2 個の白血球を認めるのが普通である。すなわち、白血球の濃縮率は5前後である。あるいは、白血球の通過速度は赤血球の 1/50 程度である。画面上に白血球を 10 個程度認める場合もあるが、その場合は、濃縮率 30、通過速度が赤血球の 1/300 程度である。

考察

ここでは、顆粒球とリンパ球を区別することなく取り扱ったが、両者の通過特性がかなり異なることも普通に観察される。リンパ球は顆粒球に比べて小さく、マイクロチャネルアレイ通過時に観察される大きさの違いから両者は容易に識別し得る。しかしながらテラス部分およびその入口部分にトラップされているのはリンパ球の方が多い。したがって、リンパ球の方が顆粒球に比べて粘着性が高いか変形性が低いことが推定される。

一方、リンパ球の中でも通過性が異なるものがあることも普通に観察される。その差がBリンパ球とTリンパ球の違いなのかは明らかではない。また、リンパ循環から戻ってきたばかりの細胞とこれからリンパ循環に入って行く細胞の違いである可能性も考えられる。

顆粒球に関しては、細胞内の構造物がクリアに見えるものが時々観察されるが、それらは好酸球か好塩基球と思われる。希に好中球よりかなり大きい細胞が見られるが、恐らく単球であると思われる。

FMLP や LPS で刺激した白血球が形態の変化と強い粘着性を示すことがこれまでに報告されてきている。

臨床的には白血球の通過状態に顕著な差が見られることも少なくない。例えば、田中・西野らは、救急治療や集中治療が求められる患者特に敗血症患者において、活性化した白血球によるマイクロチャネルアレイの閉塞を認め、さらにその閉塞率と予後の良否との間に関係があることを見出している[1, 2]。出口・栗原らは、強力な生理活性物質であるインターフェロン投与後の白血球通過抵抗の増加と副作用との関係を議論している[3]。飯島らは人工透析時の一過性の白血球数の減少とマイクロチャネル通過抵抗との関係を検討した[4]。さららに、佐藤ら[5]、平松ら[6]は体外循環時の白血球レオロジーの変化を白血球浮遊液のマイクロチャネルアレイ通過を観察することでより明瞭にしている。安・池田ら[7]は虚血ー再環流時の白血球の in vivo 動態とマイクロチャネル通過能との関係を検討している。長岡ら[8]は好中球機能の評価指標にマイクロチャネル通過能を加え、さらにグルコサミンの好中球機能抑制（抗炎症）効果を明らかにしている。

以上のように、MC-FAN が白血球の状態（レオロジー）を測定するのに有用であることが示されてきており、今後この面の研究が進展していくと期待される。

文献

1）田中裕、西野正人、中森靖、小倉祐司、杉本壽：敗血症患者に対する rhG-CSF 投与後の白血球変形能の変化について　第8回ヘモレオロジー研究会抄録集 27, 2001.

2）西野正人、田中裕、中森靖、杉本壽：SIRS における白血球変形能・血液レオロジーに対するステロイド・蛋白分解酵素阻害薬の効果の検討　第8回ヘモレオロジー研究会抄録集 43, 2001.

3）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.

4）Iijima, S. Otsuka F., Hasegawa, Y., and Koyama, A. Hemodialysis neutropenia correlates with a decreased filterability and an increase in the number of cytoplasmic actin filaments in peripheral blood neutrophils, which is preceded by a decrease in the number of surface expression of *L*-selectin. Nephron 82, 214-220, 1999.

5）佐藤幸夫、佐藤祥子、山本達生、石川成美、鬼塚正孝：選択的 Phosphodiesterase type 4 阻害剤を用いた好中球活性化抑制の検討　ヘモレオロジー研究会誌 3, 31-36, 2000.

6）平松祐司、佐藤幸夫、本間覚、菊池佑二：MC-FAN による in vitro 体外循環中の好中球流動性の評価　ヘモレオロジー研究会誌 3, 25-30, 2000.

7）Yasu, T., Ikeda, N., and Saito, M. Suppressive effect of human Atrial Natriuretic Peptide on leukocyte activation in microvessels subjected to ischemia/reperfusion. Microcirc. Ann. 18, 63-64, 2002.

8）長岡功、華見、菊池佑二、坂本廣司：グルコサミンの好中球機能と血流速度におよぼす影響　日本

ヘモレオロジー学会誌 5(1), 23-30, 2002.

Concentration of leukocytes by passage through a microchannel array and leukocyte activity

Yuji Kikuchi and Hiroko E. Kikuchi*

Microchannel Array Technology Team, National Food Research Institute, Tsukuba, 305-8642, and *Department of Oral Pathobiological Science, Graduate School of Dental Medicine, Hokkaido University, Sapporo, 060-0813, Japan

Abstract

We have found that the number of leukocytes passing through microchannels observed under a microscope is not the number expected from the cell concentration in whole blood and the volume of the space in the microchannel array. The actual cell number in the microchannel array is from several to several tens times concentrated compared with the expected cell number. We analyzed the phenomenon by considering a great difference in the passing velocity between red cells and leukocytes and taking into account the continuous condition of flow or cell flux. It was shown that the cell number in the microchannel array is inversely proportional to the cell velocity at the terrace portion of the microchannel array and, hence, is a useful measure of their activity.