

様式 C-19

科学研究費補助金研究成果報告書

平成23年 5月23日現在

機関番号：11301
研究種目：若手研究(B)
研究期間：2009～2010
課題番号：21760119
研究課題名(和文) 傾斜遠心顕微鏡を用いた血球の固体壁に対する付着特性の
定量評価に関する研究
研究課題名(英文) Evaluation of adhesivity of blood cells on solid
surfaces using the inclined centrifuge microscope
研究代表者
白井 敦 (SHIRAI ATSUSHI)
東北大学・流体科学研究所・准教授
研究者番号：20302226

研究成果の概要(和文)：

白血球の中で最も多数を占める好中球は、とくに細静脈において血管壁に付着し、転がりながら血液全体よりもゆっくりと移動することが知られている。また、血球径よりも細い毛細血管では、その低い変形能も加わって、血管を閉塞する場合がある。そのため、好中球の付着特性を明らかにすることは、微小循環における血流特性や、免疫反応における好中球の挙動解析に非常に重要である。そこで、傾斜遠心顕微鏡を用いて、種々の固体壁に対する付着特性を定量的に評価した。

研究成果の概要(英文)：

Neutrophils are the most abundant type of leukocytes. It is known that they adhere onto endothelial cells of venules and roll along the vessels slower than the whole blood. In fine capillaries whose inner diameter is smaller than the neutrophils, the cells could plug the vessels to cease blood flow. Therefore, it is essential to understand blood flow characteristics in microvasculature or behavior of neutrophils in immune response that clarifying interaction between the blood cells and the solid surfaces. In this research, we observed motion of HL60 cells, a kind of model cell of neutrophils, on a flat glass plate or cultured endothelial cells using the inclined centrifuge microscope to quantitatively evaluate adhesive characteristics of the blood cells on those solid surfaces.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2010年度	1,800,000	540,000	2,340,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：工学

科研費の分科・細目：機械工学・流体工学

キーワード：好中球, 血管内皮細胞, 傾斜遠心顕微鏡, 付着特性

1. 研究開始当初の背景

血液は、液体成分である血漿と固体成分である血球とに分けられる。血球のうち、主に生体防御に関わる細胞を白血球と呼び、その中で最も多数を占める好中球は、炎症病巣に遊走して病原菌等を捕食する特性を持っている。比較的細い血管内における血液の流動観察において、好中球が血管壁に付着し、転がりながら血液全体よりもゆっくりと移動する様が見られる。とくに細静脈において、赤血球は集軸効果によって血管中心軸に凝集する結果、好中球は血管壁に押しつけられながら移動することになる。

好中球の存在は、血管径が小さくなるほど血流全体に与える影響が大きくなり、血管径が血球と同等かそれ以下の毛細血管では、好中球の低い変形能も加わって、血管を閉塞して血流を阻害する場合もある。また、炎症病巣への遊走に際して、好中球は、その転がる速度が次第に遅くなり、完全に停止した後に血管内皮細胞の間隙を通して血管外に移出する。そのため、血管内皮細胞上における好中球の付着特性および挙動を明らかにすることは、微小循環における血流特性や、免疫反応における好中球の挙動の解明に非常に重要である。

さらに、血管内皮細胞は核を有しており、中央部が凸の形状をしているため、血管内皮表面は滑らかではなく凹凸があると考えられる。しかし、好中球の付着特性に関する従来の研究は、血球と血管内皮細胞との間の接着分子に注目したものがほとんどであり、血管表面の凹凸に着目した研究や、先に述べたように、凝集した赤血球により血管壁に押しつけられた状態における好中球の挙動に着目した研究は知見しない。

好中球は、血管内皮細胞だけではなく、ガラス等の人工材料にも付着しやすいという特性を持っており、人工心臓等の人工臓器において、血球が付着、退席して、性能の劣化や血栓形成の原因になる危険性が示唆される。この特性は、血液を微笑流路に流しながら種々の検査を行う μ -TAS の開発、小型化に非常に大きな障害となる。そのため、近年、ポリマー等のコーティングによって血球の付着を防止する手法が考案されているが、その性能を定量的に評価する手法は未だに存在しない。

2. 研究の目的

本研究の目的は、好中球の各種固体壁に対する付着特性を定量的に評価する手法および血管内皮細胞上における血球挙動の解析である。そのために、好中球のモデル細胞としてよく知られている HL60 を用いて、ガラス平板、MPC ポリマーをコーティングした

ガラス平板およびヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) を培養したガラス平板の上における血球挙動を傾斜遠心顕微鏡で観察する。

3. 研究の方法

図 1 に、傾斜遠心顕微鏡の概略図を示す。傾斜遠心顕微鏡は、試料容器、遠心器、CCD カメラを接続した顕微鏡およびレーザー光源から成る。血球の懸濁液で満たした試料容器底部に基板を設置し、容器を遠心器の回転面に対して角度をつけて設置する。そして、遠心器を回転させると、懸濁液中の血球は遠心力により基板方向に移動し、基板に達した血球は、遠心力の基板法線方向成分 F_N により基板に押しつけられながら、接線方向成分 F_T により駆動される。その様子を CCD カメラで記録する。なお、 F_N および F_T は、ロータの回転速度および試料容器の傾斜角を調節することにより、任意に設定することが可能である。本研究では、これを用いて、以下の 3 項目について研究を行う。

(1) ガラス平板に対する HL60 の付着特性および MPC コーティングが付着特性に与える影響

まず、ガラス平板に対する HL-60 の付着特性を明らかにする。ここで、血球にかかる平板の法線方向、接線方向の力を種々に変化させ、血球移動速度の変化を調べる。MPC ポリマーをコーティングしたガラス平板に対しても同様の実験を行い、各平板に対する摩擦力和血球移動速度の関係を求める。また、血球が移動を開始する力を計測し、血球の静摩擦力、すなわち付着力を求める。これらより、付着特性を定量的に評価するモデルを構築する。

(2) HUVEC に対する HL60 の付着特性

好中球は、自身の糖鎖リガンドを血管内皮細胞上のセレクチンと結合させることにより付着する。そこで、ガラス平板上に HUVEC を培養し、これに対する HL-60 の付着特性を

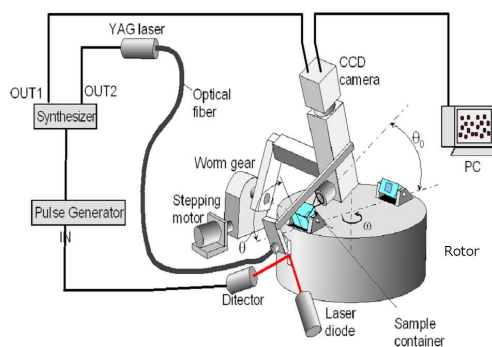


図 1：傾斜遠心顕微鏡概略図

明らかにするとともに、ガラス平板との付着特性の違いを明らかにする。また、傾斜遠心顕微鏡が血球の二次元挙動を観察することが可能であることを利用して、HL-60が凹凸のあるHUVEC上のどこに付着しやすいか、HL-60の移動速度がHUVEC上の位置で違いがあるのかを観察する。

(3) HUVECの配向がHL60の挙動に与える影響

血管内皮細胞は、流れ負荷のかかった方向に配向することが知られている。そこで、HUVECの配向方向および配向度(細胞のアスペクト比)が血球の付着特性に与える影響を、静地培養したHUVECの結果と比較する。また、配向がHL-60の挙動、とくにHUVEC上のどこを通過しやすいのか、に与える影響を明らかにする。これを基に、血管内皮細胞上における血球挙動の力学モデルを構築する。

4. 研究成果

(1) ガラス平板に対するHL60の付着特性およびMPCコーティングが付着特性に与える影響

本研究では、まず、以降の実験のための基礎データを得るために、ガラス平板を用いて、HL60の挙動を解析した。個々の細胞の挙動を詳細に観察したところ、ガラス平板に垂直な軸を中心として回転する血球が見られた。また、微小流路を用いた生態外実験でも見られるStick-Slip運動(ガラス平板への付着と移動を繰り返す挙動)が観察された。ここで、MPCポリマーをガラス平板に塗布したもの(以下、MPC基板)を用いた場合、同一条件でも基板への付着時間の割合が大幅に減少することが確認された。

次に、血球の駆動力である遠心力の基板接線方向成分 F_T を変化させて付着率の変化を調べた。 F_T が小さな領域ではほぼすべてのHL60が基板に付着していたが、 F_T を増加させることによって、両基板ともに付着率が減少した。ただし、ガラス基板上では、 F_T の増加に対してなだらかに付着率が減少するのに対し、MPC基板上では、急激に付着率が減少し、 $F_T > 20\text{pN}$ ではほぼ一定値となることが明らかになった。また、遠心力の基板法線方向成分 F_N を増加させた場合、両基板ともにHL60の付着率が減少をはじめ、 F_T が大きくなった。ガラス平板では、 F_T の増加に伴う付着率の減少割合が小さくなるのに対し、MPC基板では、減少率に変化は見られなかった。このことは、血球の付着力には個体差があるものの、MPCポリマーによる血球付着防止効果があることを表している。この結果を基に、最小自乗法に基づき、HL60と基板との摩擦特性を定式化した。ここで、

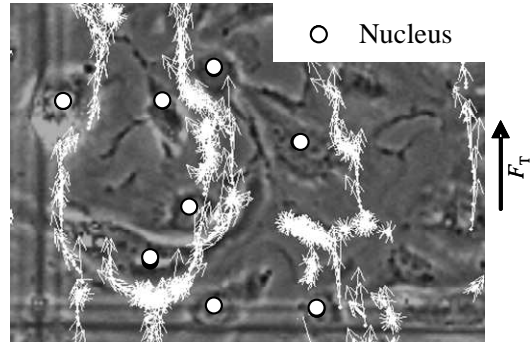


図2: 瞬間速度ベクトルで描かれたHL60の軌跡。核を避けるように移動することが確認される。

ガラス平板の場合は F_N による変動が大きかったため、MPC基板に対して定式化を行った。その結果、HL60の F_T 方向平均移動速度を $U(\mu\text{m/s})$ として、摩擦力 $F_T^*(\text{pN})$ は、

$$F_T^* = 0.933U + 0.06F_N + 4.8$$

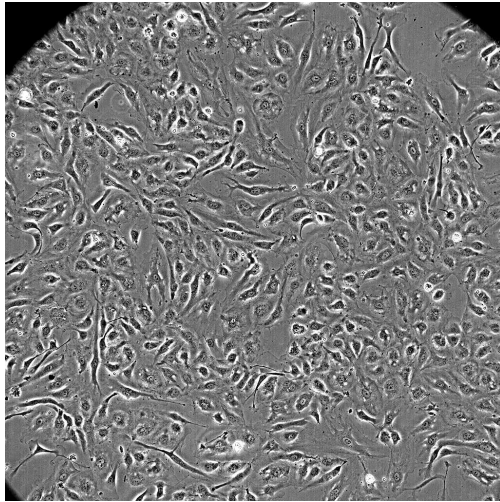
で表されることを確認した。

ここで、HL60とMPC基板との間の摩擦を流体の粘性に起因すると考える力学モデルに基づいて、HL60と基板との間隙幅 h_g と U の関係を求めた。その結果、 U の増加とともに h_g も増加し、 $U > 10\mu\text{m/s}$ の範囲では赤血球を用いた従来の研究と h_g が定量的に一致することが示された。

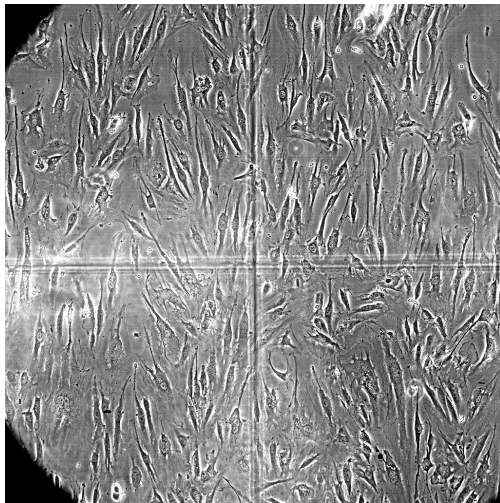
(2) HUVECに対するHL60の付着特性

ヒト臍帯静脈内皮細胞(HUVEC)をガラス平板上にコンフルエントに培養したものを用い、その上を移動するHL60の挙動を詳細に観察した。その結果、図2に示すように、HL60はHUVECの核の部分避け、隣接する細胞間を通過することが確認された。これは、基板状のHUVEC表面は、核のある中央部で凸となり、細胞間が凹となるためである。また、HL60の瞬間移動速度の F_T 方向成分の頻度分布を(1)のMPC基板と比較すると、MPC基板では静止細胞を除きガウス分布に近いプロファイルであるが、HUVEC上では、速度が低い領域でほぼ一定の頻度となった。これは、HL60が核を迂回するためであると考えられる。

次に、HUVEC上におけるHL60の付着率をMPC基板と比較した。その結果、HUVEC上では付着率が著しく上昇することが明らかになった。そこで、HUVEC上において、HL60が核を迂回する領域としない領域に分けて付着率を比較したところ、 $F_T = 30\text{pN}$ において、それぞれ、75.5%と36.2%であった。これは、迂回によって F_T 方向速度成分が小さくなることに起因すると考えられる。しかし、迂回しない領域でもMPC基板と比較して付着率が約10倍であることから、HL60



(a) 配向する前



(b) 配向した後

図 3: 流れ負荷装置による HUVEC の配向

と HUVEC との付着もこの高い付着率の要因であると考えられる。なお、摩擦力 F_T^* を定式化すると、HUVEC および MPC 基板ではそれぞれ、

$$F_T^* = 2.6U + 10.1$$

$$F_T^* = 0.5U + 4.5$$

で表される。

(3) HUVEC の配向が HL60 の挙動に与える影響

血管内皮細胞は、流れによる剪断応力の負荷により、流れ方向に配向するとともに、その高さを減ずることが知られている。そのため、血管内において、内皮細胞は管軸方向に配向し、(2)で用いた HVUEC 基板よりも凹凸が小さくなると考えられる。そこでまず、流れ負荷装置を用いて配向した HUVEC 基板を作成した。その一例を図 3 に示す。図に

おいて、(b)は 2Pa の剪断応力を 24 時間与えた結果である。実験では、(a)、(b)および(b)を 90° 回転させたものを使用した。

まず、 F_N を 47pN で一定として F_T を 10, 30, 50pN と変化させ、個々の HL60 の瞬間移動速度ベクトルの大きさと F_T からの偏向角の分布を比較した。その結果、FT が比較的小さな領域では分布に差は見られなかったが、 $F_T \geq 30\text{pN}$ では、 F_T に平行に配向した基板において、偏向角のばらつきが小さくなり、0° 近傍の速度が大きくなることが確認された。これは、HL60 の移動方向に対する HUVEC の投影面積が小さくなり、核を迂回する頻度が小さくなるためと考えられる。また、配向しない基板では、 F_T を 10pN から 30pN に増加した場合と比較して、30pN から 50pN に増加した場合の方が、速度の大きさの最大値の増加量が減少することが確認された。配向した HUVEC 上では、配向方向にかかわらず増加量が一定であったことから、これは、HUVEC の高さの影響が現れていると考えられる。

次に、配向していない HUVEC の基板を用いて、 F_T を 30pN で一定として F_N を 30, 47, 94pN と変化させた。その結果、 $F_N=30\text{pN}$ では偏向角はほぼ $\pm 30^\circ$ であったが、 F_N が増加すると、偏向角の分布が広がることを確認された。これは、 F_N が小さいほど HL60 の HUVEC への押しつけ力が小さいため、核を乗り越える細胞の存在を表すと考えられる。格子ボルツマン法を用いた数値解析で、細静脈程度の血管内において単一の赤血球から白血球が受ける押しつけ力は最大で約 30pN と見積もられるとの報告がある。そのため、集軸効果により凝集した赤血球からの押しつけ力はこの値より大きくなる可能性があり、生体内において、好中球は血管内皮細胞の凹凸に沿って移動する可能性がある。しかし、先に述べたように流れ負荷に晒された血管内皮細胞は流れ方向に配向するため、この配向のために好中球はより直線的に血管内を移動することが可能であると考えられる。

なお、(2)でも述べたように、HVUEC を用いた実験計測では、HUVEC の凹凸による機械的な要因と接着分子の影響を完全に分離できていない。今後は、これらの影響を分離し、機械的要因と接着分子のどちらが血球の挙動に主要な影響を与えるかを解析する必要がある。

最後に、本研究課題を遂行するに当たり、東北大学華麗医学研究所医用細胞資源センターより HL60 の提供を受け、細胞培養および HUVEC の流れ負荷実験に関して東北大学大学院医工学研究科佐藤(正)研究室にご指導頂いた。ここに深く謝意を表す。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計1件)

1. Atsushi SHIRAI and Toshiyuki HAYASE, Numerical simulation of distribution of neutrophils in a lattice alveolar capillary network, *Respir. Physiol. & Neurobiol.*, 査読有, Vol. 165 (2009), 143-153.

[学会発表] (計10件)

1. Atsushi SHIRAI, Takashi UMIMOTO, Haruka URANUMA and Toshiyuki HAYASE, Observation of Motion of HL60 Cells on HUVEC Cultured on a Flat Glass Plate using the Inclined Centrifuge Microscope, ELYT Annual Workshop in Sendai 2011, 2011/2/22-24, 宮城
2. Hiroki SATO, Atsushi SHIRAI and Toshiyuki HAYASE, Observation of Velocity of Antibody-modified HL60 Cells on Glass Plate using the Inclined Centrifuge Microscope, 4th East Asian Pacific Student Workshop on Nano-Biomedical Engineering, 2010/12/15-16, シンガポール
3. 浦沼 晴香, 白井 敦, 早瀬 敏幸, 血管内皮細胞の配向方向が好中球の挙動に与える影響に関する実験的研究, 日本機械学会第21回バイオフィロンティア講演会, 2010/11/12-13, 石川
4. Haruka URANUMA, Atsushi SHIRAI and Toshiyuki HAYASE, Experimental Study on Effect of Direction of Endothelial Cells' Orientation on Motion of HL60 Cells, 7th International Conference on Flow Dynamics, 2010/11/1-3, 宮城
5. 白井 敦, 早瀬 敏幸, 傾斜遠心顕微鏡で撮影された連続画像のぶれ補正手法, 日本流体力学会年会2010, 2010/9/9-11, 北海道
6. 佐藤 博樹, 白井 敦, 早瀬 敏幸, 傾斜遠心顕微鏡を用いたガラス平板上におけるHL60の微視的挙動に関する基礎的研究, 日本機械学会2010年度年次大会, 2010/9/5-8, 愛知
7. Atsushi SHIRAI, A Stabilization Technique of Wobbly Images taken by the Inclined Centrifuge Microscope, 6th World Congress on Biomechanics, 2010/8/1-6, シンガポール
8. Atsushi SHIRAI and Toshiyuki

HAYASE, An Aligning Technique of Successive Images Taken by the Inclined Centrifuge Microscope, 2010 Annual ELYT Workshop, 2010/3/15-16, フランス

9. Haruka URANUMA, Atsushi SHIRAI and Toshiyuki HAYASE, Experimental Observation of Behavior of Neutrophil-like HL60 Cells on Oriented Endothelial Cells, 3rd East Asian Pacific Student Workshop on Nano-Biomedical Engineering, 2009/12/21-22, シンガポール
10. 浦沼 晴香, 白井 敦, 早瀬 敏幸, 血管内皮細胞の配向が好中球の挙動に与える影響に関する実験的研究, 日本機械学会 2009 年度年次大会, 2009/9/14-16, 岩手

6. 研究組織

(1) 研究代表者

白井 敦 (SHIRAI ATSUSHI)

東北大学・流体科学研究所・准教授

研究者番号：20302226

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：