

【13】

氏 名	清 ^{しみず} 理 ^り 葉 ^は
学位の種類	博士（医学）
学位記番号	甲第751号
学位授与の日付	令和2年3月4日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項 (心臓・血管外科学)
学位論文題目	Clinically feasible method for assessing leukocyte rheology in whole blood (全血での流動中における白血球活性化の指標の検討)
論文審査委員	(主査) 教授 井 上 晃 男 (副査) 教授 瀬 尾 芳 輝 教授 田 口 功

論 文 内 容 の 要 旨

【背 景】

動脈硬化疾患は慢性炎症を基盤とした病態であり、白血球や白血球と血小板の相互作用は動脈硬化において重要な役割を持つ。炎症や低いshear stress下において白血球は活性化するが、流動中の微小血管の白血球の挙動を評価する臨床指標は開発されてない。単純な毛細血管モデルであるマイクロチャンネルアレイによる血液流動性測定装置を用いた研究では、急に流路が狭くなるため、血小板が活性化し全血通過時間に影響が及んでいた。そこで今回、心筋微細血管を模したシリコン微細加工を利用したマイクロチャンネルアレイ回路による新しい微小血管モデルを工学系研究者と開発した。このモデルではマイクロチャンネルの直径が段階的に減少するため、採血後の血小板活性化が少なく赤血球や白血球が毛細血管を通過時に、変形する様子を無染色で観察できる。これまで我々は、接着白血球数を肉眼で数え白血球活性化指標としてきたが、時間を要し迅速な臨床検査としては不向きである。臨床で使用することが可能な白血球活性化指標が求められている。

【目 的】

新しく作成したマイクロチャンネルアレイ回路による微小血管モデルを用いて、異なる抗凝固剤を用いて流動中の白血球活性化の指標を検討する。

【対象と方法】

本研究は獨協医科大学日光医療センター生命倫理委員会の承認を得て指針に従って行った。対象者は安静座位で血液採取を行い、2種類の抗凝固剤（ヘパリン，EDTA-2Na）の採血管に注入した。20

分以内にMicro Channel array Flow Analyzer (MC-FAN) と新しく作成したマイクロチャネルアレイ回路を用いて測定を行った。0.1mlの血液を回路内に注入し、30cm水柱圧と60cm水柱圧を加えた。全血が通過する前後の生理食塩水通過時間、全血通過時間を測定した。全血の0.08-0.1mlが通過する間のランダムで選択した5視野の接着白血球数を測定し、平均値を測定した。全血通過時間は補正式を用いて補正通過時間を算出した。(補正全血通過時間 = 全血通過時間 × 12 / 全血投与前の生理食塩水通過時間)

まず、健常者において好中球走化性因子であるN-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine (FMLP) をそれぞれの採血管に注入し、慢性炎症のモデルを作成し、実験をおこなった。

本実験として健常者79人、糖尿病患者42人、急性冠症候群36人を対象とし、前項目を計測した。

JMP 14.0を用いて統計解析を行った。連続変数は平均 ± 標準偏差を用いた。群間の比較はStudent's testまたは分散分析を用いた。相関関数はFisher係数を用いた。p < 0.05を有意とした。

【結 果】

FMLP (10^{-7} ~ 10^{-8} M) を投与した全血は、ヘパリン採血管では全血通過時間と接着白血球数は増加したが、ヘパリン+EDTA-2Na採血管ではわずかにしか増加しなかった。健常者においてヘパリン採血管とヘパリン+EDTA-2Na採血管を比較すると、補正全血通過時間は有意にヘパリン+EDTA-2Na採血管において有意に短かった。接着白血球数もヘパリン+EDTA-2Na採血管において有意に少なかった。糖尿病患者、急性冠症候群の患者と比較すると、健常者は接着白血球数が少なかった。ヘパリン採血管と(ヘパリン+EDTA-2Na採血管)の補正全血通過時間の差は、健常者に比べ糖尿病患者、急性冠症候群患者で増加した。Myeloperoxidase (MPO) 濃度は健常者で低かった。ヘパリン採血管とヘパリン+EDTA-2Na採血管の補正全血通過時間の差は、MPO濃度、接着白血球数に有意に相関した。白血球活性化の指標となる最適な陰圧も検討した。感度をあげられると考えられた25cm水柱圧ではチャンネル閉塞数が増え、通過時間が非常に延長する例が多くなり、検査として適正ではなかった。30cm水柱圧、35cm水柱圧の陰圧が、白血球活性化を検討するのに適正と考えられる。

【考 察】

動脈硬化の過程で慢性炎症が原因となるが、その一つとして白血球がさまざまな役割を担う中で、流動中の微小血管の白血球の挙動を評価する指標は開発されていない。

以前から使用されているMC-FANを用いたマイクロチャネルは単純な流路であったため、今回心筋モデルに新しいマイクロチャネルチップを作成し、そのモデルを用いて白血球活性化の指標を検討した。

白血球は活性化するとカルシウム依存的に偽足を形成し、接着分子が増加し、遊走しやすくなる。今回の実験では2種類の作用機序の異なる抗凝固剤を用いた。ヘパリンはアンチトロンビンⅢを活性化させ、凝固能を間接的に阻害するため、白血球や血漿はほぼin vivoの状態を再現している。一方でEDTA-2Naはカルシウムをキレートするため、カルシウム依存性の白血球と血小板の活性化を抑制する。

FMLPを注入すると、ヘパリン採血管では接着した白血球数は増加するが、ヘパリン-EDTA-2Na

採血管では上昇を認めなかった。カルシウム依存性の白血球活性化の抑制、白血球と血小板の重合の抑制が起こったと考えられる。

接着した白血球数と、MPO濃度はヘパリン採血管とヘパリン+EDTA-2Na採血管の補正通過時間の差に相関しており、流動中の白血球活性化を定量化できると考える。

【結 論】

MC-FANを用いて全血で検査を行える新しいデザインのマイクロチャネル回路を開発した。ヘパリンと、ヘパリン+EDTA-2Naの補正通過時間の差は白血球流動を定量化することができる。

論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

【論文概要】

新しく開発したマイクロチャネルを用いて、流動中の白血球の挙動を評価する方法を、ヘパリン採血管、EDTA-2Na採血管を用いて検討している。結果、1) 炎症モデルを作成した健常者では、ヘパリン採血管で接着白血球が増加し、EDTA-2Na採血管では接着白血球は増加しないこと、2) 健常者でヘパリン採血管では接着白血球数、全血通過補正時間が高くなること、3) 糖尿病患者、急性冠症候群患者において、健常者に比べ接着白血球数、全血通過補正時間が増加した。さらに、ヘパリン採血管とEDTA-2Na採血管の全血通過補正時間の差はmyeloperoxidase (MPO)、接着白血球数と相関したことを明らかにしている。これらの結果から、ヘパリンとEDTA-2Na採血管の全血通過補正時間の差が、流動中における白血球の活性化の指標となりうるのではないかと結論付けている。

【研究方法の妥当性】

申請論文では、従来の標準的な計測方法であるチップ内の接着白血球数をカウントする方法と比較し、ヘパリン採血管、EDTA-2Na採血管の全血通過補正時間を解析している。データの不足は、N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanineやMPOを用いて補うとともに、適切な対照群の設定と客観的な統計解析を行っており、本研究方法は妥当なものである。

【研究結果の新奇性・独創性】

流動中における白血球活性化の指標となるもので現在臨床応用されているものには種々の問題が指摘されている。申請論文では、新しいシリコンチップを開発し豊富な症例を用いて、詳細な解析から、ヘパリン採血管とEDTA-2Na採血管の全血通過補正時間の差が白血球活性化の指標となりうることを初めて明らかにしている。この点において本研究は新奇性・独創性に優れた研究と評価できる。

【結論の妥当性】

申請論文では、多数の症例を適切な対象群の設定の下、確立された実験方法と統計解析を用いて白血球活性化の指標を位置づけている。そこから導き出された結論は、論理的に矛盾するものではなく、また微小循環など関連領域における知見を踏まえても妥当なものである。

【当該分野における位置付け】

申請論文では、臨床応用が困難であった流動中における白血球活性化の指標を、全血通過時間で代

用できるように試み、その結果、ヘパリン採血管とEDTA-2Na採血管の全血通過補正時間で流動中における白血球活性化の定量となりうることを明らかにしている。これは、微小循環の研究の進歩にも大いに役立つ大変意義深い研究と評価できる。

【申請者の研究能力】

申請者は、微小循環の理論を学び実践した上で作業仮説を立て実験計画を立案した後、適切に本研究を遂行し、貴重な知見を得ている。その研究成果は当該領域の国際誌への掲載が承認されており、申請者の研究能力は高いと評価できる。

【学位授与の可否】

本論文は独創的で質の高い研究内容を有しており当該分野における貢献度も高い。よって、博士(医学)の学位授与に相応しいと判定した。

(主論文公表誌)

Heart and Vessels

(35 : 268-277, 2020)