

0-5-1

ハイドロゲルを用いた好中球機能測定法

Novel assay for Neutrophil Chemotaxis and Chemiluminescence
by using thermoreversible hydrogel

○三浦 茂樹¹⁾, 坂巻 秀男¹⁾, 吉岡 浩¹⁾, 森 有一¹⁾, 鈴木 克彦²⁾

1) 早稲田大学理工学術院, 2) 早稲田大学人間科学学術院

We developed an easy method for oxygen radical production and migration capability of neutrophils by use of thermoreversible hydrogel without isolating neutrophils from whole blood. An aqueous solution of thermoreversible gelation polymer (TGP) or scaffolded-TGP (S-TGP) was solidified by raising at more than 20°C. Peripheral blood samples were mixed with luminol and set on the gel at 37°C. During the incubation time, neutrophil migrated into the S-TGP and emitted chemiluminescence but not in the TGP. The cells in the gel were more than 90% of neutrophils, and less than 100 μ l whole blood can be used. These results suggested that S-TGP can be applied to clinical tests for estimating neutrophil activity.

【目的】

炎症の程度や易感染性などは、好中球の数と機能に反映される。細胞数は、血球計算機による測定結果から容易に算出できる。一方、機能の測定は、全血から好中球を単離する必要があり手順が煩雑である。本研究では、全血サンプルをそのまま使用する簡便かつ迅速な好中球の機能測定法を検討した。

【方法】

血液サンプルは、健康成人の静脈へパリン加血を使用した。熱可逆性ハイドロゲル材料 (Thermoreversible Gelation Polymer: TGP) として、足場を付加していない TGP と足場を付加した S-TGP の 2 種類を使用した。TGP または S-TGP の水溶液を 37°C でゲル化させたハイドロゲル上に全血と 2.5mM ルミノール含有 HBSS を等量混合したうえでのせて、90 分間 37°C で静置した。0, 30, 60, 90 分の時点でハイドロゲル底面からルミノール依存性化学発光の強度を測定した。90 分のルミノール依存性化学発光強度の測定後、ハイドロゲル表面を PBS で洗浄して赤血球を除去し、熱可逆性ハイドロゲルを冷却して溶解させ、ゲル中へ遊走した細胞を回収した。回収した細胞数を血球計算機により測定し、遊走細胞数を算出した。

【結果】

ハイドロゲルを通して検出されたルミノール依存性化学発光は経時的に増加し、TGP と S-TGP をくらべると、60 分では 7~20 倍、90 分では 6~54 倍 S-TGP の方が大きな値を示した。一方、全血とルミノール試薬を混合しただけでは化学発光を観測できなかった。S-TGP において 90 分間遊走後にハイドロゲルから回収した細胞を分析した結果、ゲル中へ遊走した細胞の 90% 以上が好中球であり、使用した全血に含まれる好中球全体の 5~9% に相当した。

【結論】

ハイドロゲルとルミノール依存性化学発光を利用することにより、100 μ L 以下の全血サンプルをそのまま用いて好中球の遊走と活性酸素産生を測定することができた。