

[A27]微小流路中を流れる白血球計数方法の開発

知能機械工学専攻 山田研究室
0534017 大瀧 順一郎

1. 諸言

輸血用血液製剤を輸血すると、非溶血性発熱反応や HLA 抗原同種免疫反応、GVHD（移植片対宿主病）等の副作用が起こる危険性を伴う。その発生率は、製剤中に混入する白血球数が多いほど高いことが知られている。そこで、血液センターでは、保存前に血液を白血球除去フィルターに通すように義務付けられている。

血液製剤中の白血球計数の従来法として、Nageotte 法や電気抵抗法、フローサイトメトリー法がある^[1]。これらの手法は、装置の測定誤差、測定時間、ランニングコストなどに問題があるとされている。蛍光染色した白血球を静止画として取得し、画像処理を用いて計数する装置（ICC 法^[2,3]）も提案されているが、試料の準備に遠心操作が必要であり、試料調製が煩雑である。従って、採血装置に接続可能な測定系を確立することができれば、採血と同時に検査を行うことができるようになり、検査の効率化・迅速化などが期待される。

そこで我々は、採血装置に接続可能な検査機器の開発を目指して、マイクロチップ上に構成された微小流路中を流れる白血球を撮影し、得られた動画画像から白血球を抽出・計数する方法を開発し、その評価を行った。また、測定範囲は 1~50[個/ μ l]を目標とし、開発した測定法の妥当性を従来法である Nageotte 法と比較することによって評価した。

2. 原理

白血球の発光原理と、蛍光染色した白血球の測定原理・計数アルゴリズムについて説明する。

まず、白血球の発光原理について説明する。血液中の細胞成分（赤血球・白血球・血小板）のうち、白血球のみが細胞核（DNA）を有することを利用する。細胞浮遊液に試薬を混ぜると、まず、界面活性剤が、白血球細胞膜とその他の不必要な細胞を溶解する。次に試薬中の DNA 染色色素が、白血球核内の DNA の塩基対中に挿入され、励起光を照射することで、DNA が蛍光を発生する。

続いて、蛍光染色した白血球の測定原理について説明する（図 1）。マイクロ流路を流れる試料が励起光の照射位置を通過すると、蛍光染色された白血球核のみが蛍光を発生する。その蛍光を CCD カメラで撮影し、動画画像解析にて抽出・計数する。

CCD カメラで撮影された動画画像は、時間的に連続した静止画像からなる。図 2 より、静止画像 a の Δt 秒後の画像を静止画像 b とすると、蛍光が右に移動したことがわかる。a, b の二つの差分画像 $b-a+\text{offset}$ で、移動前と移動後の白血球を抽出する。流路内は層流で、流れに垂直な方向の細胞の移動は殆どないことを考慮して、前後の画像間で同じ白血球を対応付け、番号を与える。測定した全画像について、同じ処理を行えば、最終の番号が求める白血球の数になる。

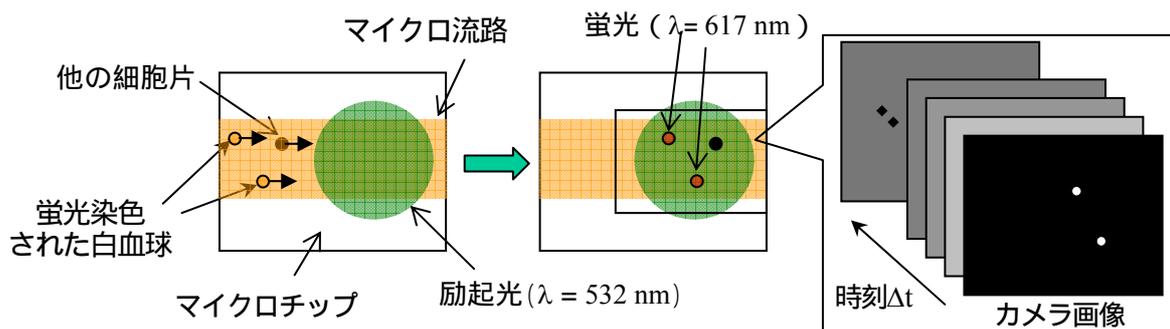


図 1 蛍光染色された白血球の測定原理

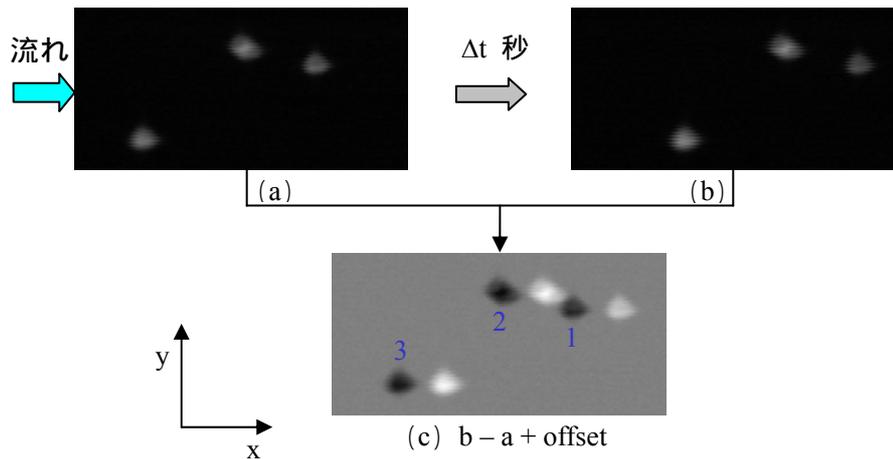


図2 計数アルゴリズム

3. 装置構成

測定系の概略図を図3の左に示す。測定系は、流量をモニタリングする流量制御系とマイクロ流路内の試料を計測する光学系の二つに大別される。

まず、流量制御系について説明する。試料を入れるサンプル溜めには、シリンジを用い、ピストンを外して、上から吊り下げた。シリンジの先には、注射針が付けられている。その注射針には、シリコンチューブが取り付けられ、マイクロチップに溶着されたシリコンチューブは、マイクロ流路と接続されている。マイクロチップはPDMS(polydimethylsiloxane)とガラスを張り合わせたものを用いた(図3右)。幅200 μ m、深さ50 μ m長さ30mmの直線状のマイクロ流路が、PDMS側に掘り込まれている。シリンジポンプとマイクロチップは、廃液溜めを介して、

接続されている。廃液溜めは電子天秤に載せられ、電子天秤はRS-232Cを介してPCと接続される。

励起光の光源には、ネオジウム・ヤグレーザー(波長532nm)を用いる。レーザー光は、ダイクロイックミラーを介してマイクロチップ内のマイクロ流路に照射される。照射位置に白血球核があると、617nmの蛍光が発せられる。ダイクロイックミラーとバンドパスフィルターで蛍光以外の迷光やノイズ光を除去する(図4)。対物レンズでおよそ5倍に拡大された画像は、有効画素が640 \times 480のCCDカメラの素子面に投影される。CCDカメラは、ビデオキャプチャーボードに接続される。キャプチャーボードによって取り込まれた画像(640 \times 192)は、動画像として保存され、開発したアルゴリズムによって画像解析を行い、白血球を抽出・計数した。

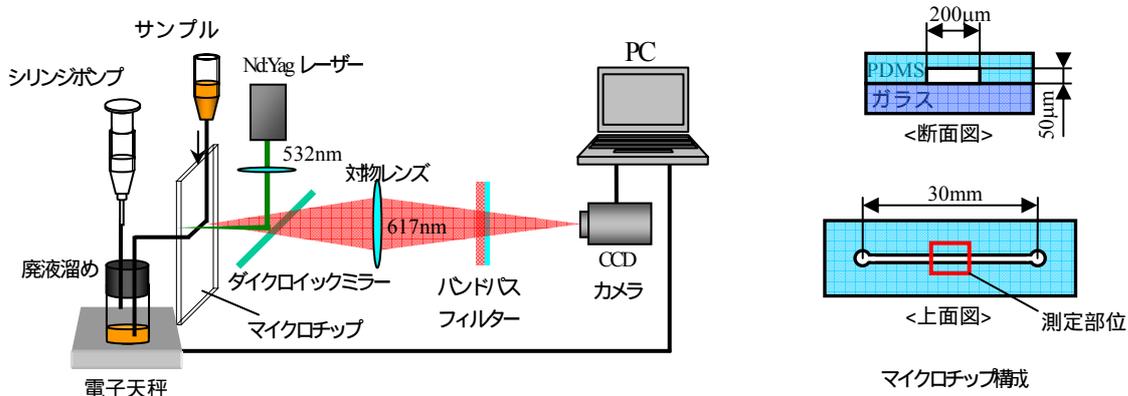


図3 本研究における測定系の概略図

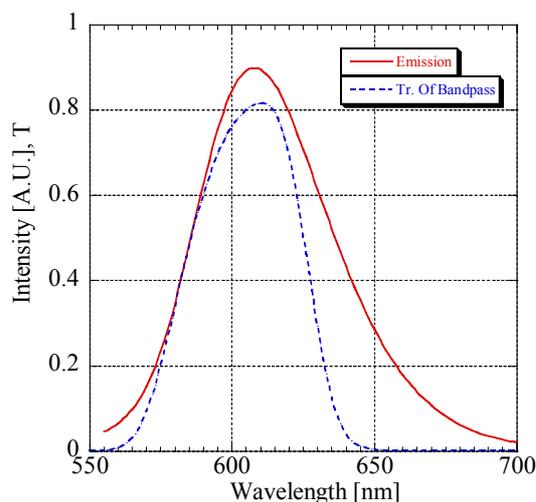


図4 測定系の分光特性

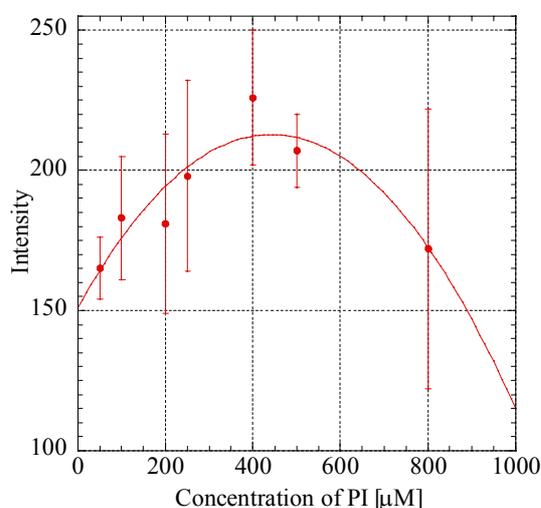


図5 PI濃度とU937細胞の光強度の関係

4. 実験方法

本方法の評価を行うために、同一試料中の白血球を、Nageotte法と本方法の両方で計測を行い、その結果を比較した。試料はU937(ヒト単球様培養細胞)を用いた。U937細胞浮遊液中の細胞数は1xの時、276個/mlであった。蛍光染色試薬PI(Propidium Iodide)の濃度に対する蛍光強度予備実験により、図5のようになった。PI濃度が約400 μ Mの時に、U937細胞の蛍光強度が大きいことが確認できたので本研究では最終濃度400 μ MのPIを使用した。ポンプによる流量は2~4 μ l/mに設定し、フレームレートは100fps 露光時間は6.1ms 撮影枚数は512枚であった。

Nageotte法による計数では試料40 μ lとチュルク液160 μ lを混和し細胞染色後、Nageotteチャンパー(図6)に導入し、顕微鏡下で計測した(図7)。この原液をPBSバッファで希釈し、細胞数を1~300個/ μ lになるように調製し

た。

一方、本方法では、PIと界面活性剤TritonX-100の混合溶液を染色液とし、染色液100 μ lに対して試料100 μ lを加えた。この混合溶液を微小流路に導入した。

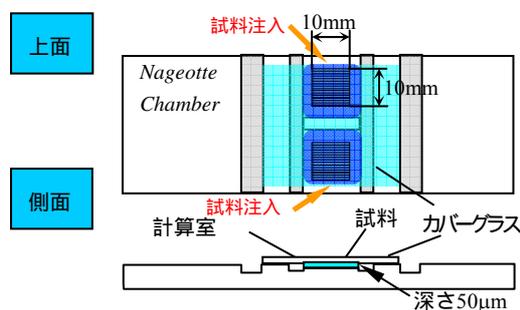


図6 Nageotteチャンパー概略図



図7 Tülk液染色U937細胞光学顕微鏡写真(40x)

5. 結果および考察

単球の蛍光を大きさで分類した(図8)。単球核の蛍光画像の直径は10~20 μ mである。細胞はカメラの露光時間の分だけ流れに沿って移動し、流線型の形になる。流路内は層流であることから、流れと垂直な方向には、殆ど流れは無いことから、垂直方向の長さDを白血球核の直径とみなし、個数としてカウントしたのは直径10~20 μ mのType Mである。それ以外は、白血球ではないとして除外した。

Nageotte法による計数結果を横軸に、本方法による計数結果を縦軸に示したのが図9である。Nageotte法の計数と本方法の計数は、理想と同じになることから、理想直線は破線になる。9つの濃度ごとの平均値をプロットし、回帰直線を求めた結果、相関係数 R^2 は0.97となった。回帰直線の傾きがほぼ1であり、10個/ μ lより大きな濃度では、両方法の計測結果が良く一致していることが分かる。

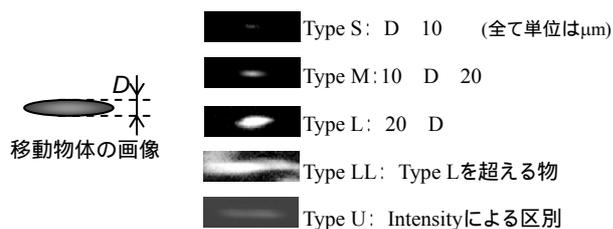


図8 単球核蛍光画像の分類

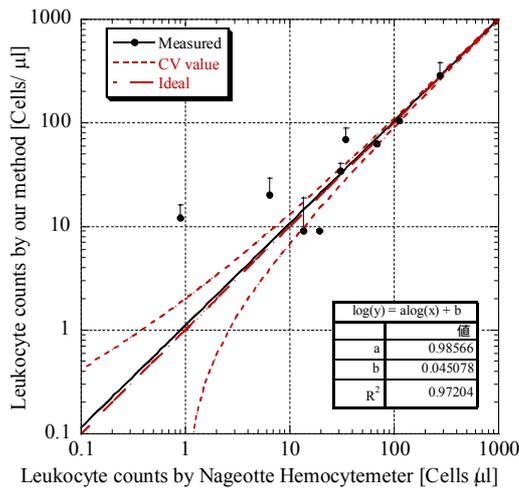


図9 Nageotte 法と本方法による計数結果

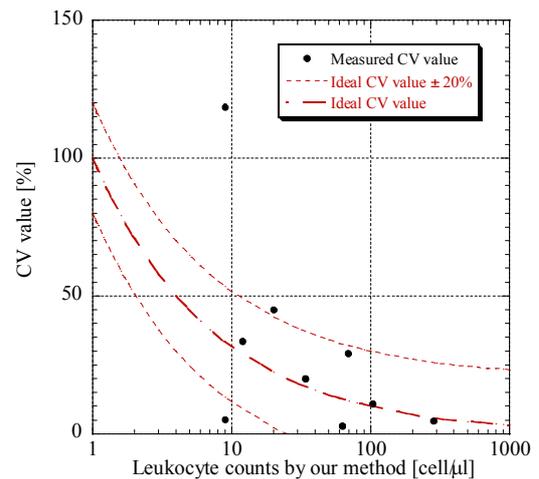


図10 計測された CV 値と理論 CV 値との比較

マイクロチップ内の流路に、ある一定時間、細胞浮遊液を流す時にカメラの画面内を横切る白血球数は、Poisson分布を取りうる。繰り返し誤差をあらわす CV 値^[4] (Coefficient of variance: 変動係数) は、理論的には、

$$CV = \frac{SD}{Mean} \times 100 = \frac{\sqrt{Mean}}{Mean} \times 100 = \frac{1}{\sqrt{Mean}} \times 100 [\%]$$

となる。個数の少ない場合、例えば 1 個/ μl の場合には CV 値は 100% となり、著しく精度が落ちる。また、計測結果による CV 値は

$$CV = \frac{SD}{Mean} \times 100 [\%]$$

で求められる。CV 値の計測値と理論値を比較したのが、図9である。図10より、計測値の CV 値の回帰曲線は、理論 CV 値の $\pm 20\%$ 以内に分布していることが分かった。また、細胞濃度が低い場合の値が理論 CV 値から大きく離れている。今回の実験では一回の測定における体積量が非常に少なかったため、濃度が低いと 1 μl あたりの体積率に変換した時に、測定結果の細胞数の変化が拡大されてしまったためである。これは、モニタリングの時間を増やし、一回の測定量を増やすことで解決できる。

6. 結言

我々が開発した白血球計数方法は、従来法と良好に一致することが確認された。

今回の実験では、約 10 ~ 300[個/ μl]の範囲での線形性が確認された。血液製剤中の混入白血球数の許容基準は、25[個/ μl](米国)であり、製剤の品質検査に有用であると考えられる。

再現性は、理論 CV 値の $\pm 20\%$ 以内であることを確認した。

将来的には、マイクロチップ上に蛍光試薬と白血球の混合を行うためのマイクロミキサーを実装し、測定の簡略化を図る。

¹ Andea, H. S. P. Garritsen, U. Cassens, R. Kelsch, W. Sibrowski, "A Flow-Cytometric Method for Assessing Leukocyte Contamination in White-Cell-Depleted Blood Products", *Infusion Therapy Transfusion Medicine*, pp. 53-56, vol.26, 1999

² K. Yabusaki, N. Saitoh, T. Hirono, H. Matsui, H. Okada, "High-Sensitivity Method for Counting Low Concentrations of Particles in Liquides Using Centrifugation and Image Analysis", *Jpn. J. Appl. Phys.* pp.3641-3644, vol. 39, 2000

³ T. Hirono, Y. Katsumi, and Y. Yamada, "The development of leukocyte counter using fluorescence imaging analysis", *Optical Quantum Electronics*, pp. 735-753, vol. 37, 2005

⁴ S. Dzik, "Counting Low Numbers of Leukocytes in Leukoreduced Blood Components", *Infusion Therapy Transfusion Medicine*, pp.62-65, vol. 26, 1999