

報 文

電場下のマイクロ空間における赤血球細胞の挙動観察に 基づく血液型判定の可能性

北川 慎也*, 津田 孝雄^{®*}, 野崎 修**

Novel method of blood typing by cell capillary electrophoresis under microscopic observation

Shinya KITAGAWA, Takao TSUDA* and Osamu NOZAKI**

* Nagoya Institute of Technology, Gokiso-cho, Showa-ku, Nagoya 466-8555

** Kinki University, School of Medicine, Oonohigashi 377-2, Osakasayama-shi, Osaka 589-8502

(Received 12 January 1998, Accepted 10 March 1998)

Agglutinations with cross reactions between red blood cells and blood-typing antibodies in a short fused-silica capillary tubing (50 μm inner diameter and ca. 10 mm in length) were observed by an optical microscope-CCD camera system. The total volume in the capillary was only about 20 nl. The cross reaction was induced by using of counter electrophoretic migrations between red blood cells and the antibody under an applied electric voltage. Since the microscopic magnification was 1000 times, each red blood cell could be clearly observed. The blood typing procedure was as follows: after 50-times diluted whole blood cells were introduced into a capillary, both ends of the capillary were sealed with 1% agarose gels in order to suppress any pressurized flow in the capillary. Then, a direct electric voltage was applied (24 V) to the capillary. The red blood cells migrate toward the positive electrode against electroosmotic flow, while the blood plasma migrated toward to the negative electrode. The blood antibody in the reservoir of the positive electrode was introduced through the stopper of the agarose gel, following a cross-reaction with the red blood cells. Agglutination of some of the red blood cells was observed with a CCD camera and recorded on video-tape. The operation period took only 5 min. This new blood typing was performed using whole blood of nl volume.

Keywords : blood typing; agglutination; whole blood; cross reaction in capillary; fused-silica capillary; cell electrophoresis; single cell.

1 緒 言

血液型判定及び血液型クロスマッチの検査は、臨床で

しばしば緊迫した場面（重篤な場面、夜間や休日の非日常体制時）で必要となり、迅速な報告が求められる。

現在広く用いられている試験管法の問題点は、煩雑で時間がかかる検査操作であること、弱い血球凝集の際に判定が困難なことがある、検査を行うには熟練が必要である、などが挙げられよう。又、凝集反応検査の前に血しょうと血球との分離が必要で、血球は生理食塩水洗浄

* 名古屋工業大学応用化学科: 466-8555 愛知県名古屋市昭和区御器所町

** 近畿大学医学部臨床病理学教室: 589-8502 大阪府大阪狭山市大野東 377-2

後に使用している。

血液型の検査を迅速化や自動化する試みには次の方法が挙げられよう。Tatsumiら²⁾は、自動血球計数装置を用いて、抗原抗体反応後の血球の凝集を血球のサイズ分布から判定している。すなわち、凝集した血球は2個又は数個のサイズとして認識され、これらの集団による新たなピークが生じる。

吉田ら³⁾は、micro typing system ゲル遠心法による輸血検査を報告している。このmicro typing system ゲル遠心法²³⁾は、球状アクリルアミドデキストリンゲル、緩衝溶液、試薬を含んだ小細管を用いて、通常小細管の上部に血球と血清を滴下し一定時間反応させた後に遠心すると、凝集血球はゲルの上部に、非凝集血球はゲルの下部にたまることを利用している。同様な手法としてカラム凝集法 (column agglutination technology, CAT) がある⁴⁵⁾。CAT法ではゲルの代わりにガラスビーズを用いている。これらの方法において、実際にゲルやガラスビーズ上に供する血液を含んだ溶液量は100~40 µl程度である。

血液型判定装置の開発の方向は、確実・迅速で、かつできる限りの微量血液での測定が可能になることである。

本報告では血液の前処理を行わずに全血をそのまま試料とし、nlレベルの血液を用いて、赤血球1個1個の反応を観察し、血液型の判定ができるシステムを提案する。

2 理 論

2.1 全血試料中の赤血球と血しょう成分の電場による分離

細胞が溶融石英キャピラリー管中で電気浸透流の流れ(陰極に向かう)に逆らって陽極側へ移動していく現象を、神経芽細胞において観察している⁶⁾。赤血球細胞の表面は強く負の電荷を帯びているので、赤血球の電場下での移動速度が十分に早い。そのため、全血試料を細管中に導入し、次いで直流電圧を細管の管軸方向に印加して用いると、血球成分と血しょう成分に自動的に分離される。すなわち血球成分は表面電荷が負であるので、陽極へ向かって移動し管中より溶出するが、一方血しょう成分(主成分であるタンパク質など)の電気移動度は、溶媒が中性領域においては浸透流に比べてその絶対値が小さいので、電気浸透流によって運ばれていく。電気浸透流の大きさは溶融石英管の内壁の状態に依存するが、内壁の性質を大きく変えなければ上記の実験状態を作り出すのは困難ではない。すなわち、電場を印加した溶融

石英管中において、全血試料から血球成分と血しょう成分を分離することができる。

2.2 血液型抗原と抗体のキャピラリー管内凝集反応とその検出

キャピラリー管中に赤血球を注入し、キャピラリー管の両端をゲルで封印した後、陽極側の溶媒ために血液型抗体を導入する。次いで直流電圧をキャピラリー管に印加すると、赤血球と血液型抗体は管中で交差する。血液型抗原と抗体が合致すれば、赤血球表面に血液型抗体(二価抗体)が付着する。感作血球は互いに接触して凝集する。この凝集を顕微鏡で観察できれば血液型の判定ができる。

2.3 凝集の判定

凝集とは、単一赤血球がそれぞれ会合して一体となったことをもって凝集とする。

3 実 験

3.1 ミクロ観察判定装置

nlレベルの血液を用い、個々の赤血球の反応を観察・判定するためにシステムを組んだ。本システムは顕微鏡(POH光学顕微鏡、ニコン製)、自製したスライドガラス上に設置できる短小なキャピラリー管を用いた交差電気泳動システム、直流電源装置(±36.5 V, PLD-36-1.2, 松定プレジジョン製)、電荷結合素子(CCD)カメラ(CCD-S-1, 島津理化製)、ビデオ(HF-F92, 三菱電機製)、ビデオタイマー(最小単位10ミリ秒, VTG-33型, For A)よりなる。短小なキャピラリー管を用いた電気泳動システムは、白金電極を設置した溶媒だめ(2個, 1.0 ml ポリエチレンバイアルのキャップをそのまま使用した, 溶媒量300 µl)、キャピラリー管(内径50 µm, 溶融石英キャピラリー管, 被覆付き, ジェルサイエンス製)を長さ約10 mmにカットして使用よりなり、これらをスライドガラス上に設置した。Fig. 1に概念図, Fig. 2に用いたキャピラリー管と溶媒だめの写真を示した。血液はキャピラリー管に導入し、電場下で泳動させた反応をさせる。本システムによりキャピラリー管中に導入した個々の赤血球の凝集反応、試薬による変化を追跡する。

3.2 試薬の調製

コントロール血清(Dada[®] Moni-Trol[®] I-X, Dade International Inc. 製, USA)、生理食塩水(大塚製薬製)、0.7 mM 硫酸ナトリウム水溶液(和光純薬製)の3液を

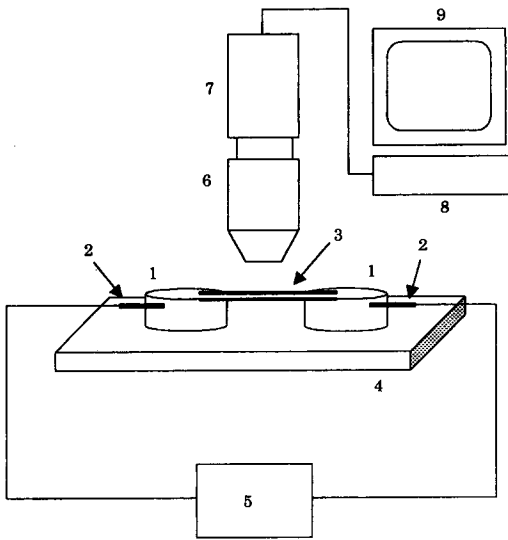


Fig. 1 Optical microscope-CCD system for blood typing in nl scale

1: reservoir; 2: platinum wire electrode, which was installed in the reservoir; 3: a short capillary tube (50 μm inner diameter and 10 mm in length); 4: slide glass; 5: dc power supply; 6: microscope; 7: CCD camera; 8: video recording; 9: cathode ray tube (CRT)

1:2:1に混合した溶液で、全血を50倍程度に希釈し試料溶液を調製する(この希釈に用いる溶液を以下混合溶液Aと記述する)。コントロール血清の混合により赤血球のキャピラリー管への吸着が抑えられた。抗A, B血液型判定用抗体(イムコア抗A, Bモノクロ, 三光純薬製)を用い、抗体試薬は混合溶液A(混合比率約1:4)で希釈した。アガロースゲル(アガロースM, ファルマシア製)を生理食塩水で溶かし1%アガロースゲルを調製した。

3.3 実験手順

内径50 μm , 長さ約10 mmの短い溶融石英キャピラリー管に、試料溶液(血球を含む)を毛管現象で満たす。試料をキャピラリーに満たした後(このときキャピラリー管中のすべての場所に赤血球が存在する), その両端を1%アガロースゲルで封印する。

スライドガラス上に固定した溶媒だめ間に、試料を満したキャピラリー管を設置する。このとき、陰極側の溶媒だめには混合溶液Aを満し、陽極側の溶媒だめには血液型判定用抗体を含む試薬(抗Aモノクロ, 又

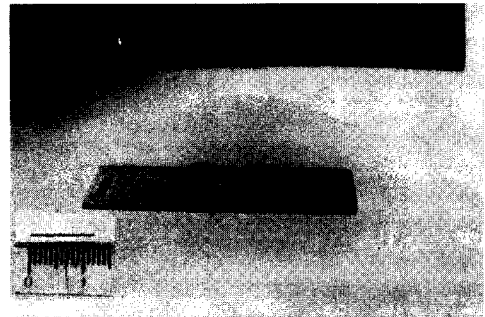


Fig. 2 A photo for the apparatus of a set reservoirs and a capillary tube for cross-electro migration

は抗Bモノクロ)を混合溶液Aで希釈した溶液を満す。次いで電圧20~30 Vを印加する。キャピラリー管内の赤血球はその負電荷により陽極へと泳動する。又、血液型抗体を含む溶液は電気浸透流により陰極の方へ向かう。これらの交差により抗体と血球表面の抗原の型が合致すれば、血球は感作されその後凝集する。この凝集の有無を顕微鏡下で観察し、同時にビデオで記録する。

4 結 果

溶融石英キャピラリー管(直径50 μm)の内容積は、管の長さが10 mmのとき19.6 nlである。このキャピラリー管中の状態をモニターのディスプレイ上で約1000倍の倍率で観察するので、1個の赤血球は約5~7 mmの大きさで観察される。本実験では非常に希釈な血液溶液を使用しているので、管中では個々の赤血球が観察できる。赤血球はこの管内において、管の長さに対しての断面方向で数個並べることができる。顕微鏡観察においては平面の観察であるので重なった場合観察できないが、溶液が希釈であるためこのようなことはあまり生じなかった。

4.1 全血中の血球と血しょうの自動分離

全血を混合溶液Aで希釈し、これを小さなキャピラリー管に注入し、次いでアガロースで両端を封印する。アガロースゲルによる封印は、キャピラリー管中の圧力差流を防止するために行った。又、溶媒だめに入れた抗体試薬は、このアガロースゲルの内部を通過してキャピラリー管中へ自由に導入できた。

このキャピラリー管をマイクロ電気泳動装置に設置して電圧を印加すると、管中の赤血球は陽極に向かって泳動するのが観察された。又、抗体試薬(抗A又は抗B)

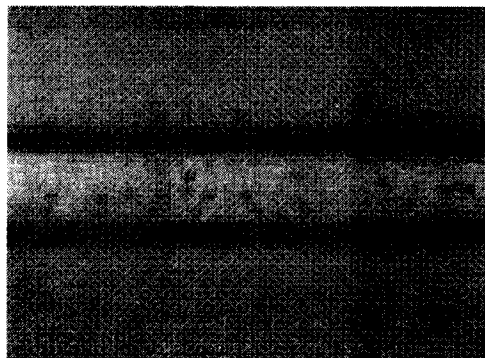


Fig. 3 A photo of red blood cells type A in the capillary tube

を陽極側の溶媒だめに入れて電圧を印加すると、それぞれ対応した血球では、いずれも抗原抗体反応に基づいた凝集が認められた。これらの事実より試料の全血中の血しょうに含まれる二価抗体は陰極側に溶出している。すなわち血球と血しょう（主として血液型抗体）の自動分離がキャピラリー管中のできる。

4・2 抗原抗体反応に基づく感作血球の凝集による血液型の判別

血液（血球）に A 型血球を用い、試薬に A 型抗体を用いたときは凝集する。これを Fig. 3, 4 に示した。Fig. 3 は希釈した全血をマイクロキャピラリー交差電気泳動管に導入し、次いで電圧を印加した直後の赤血球の状態を示している。すなわち、まだ抗体に交差していないので、空試験の泳動図である。Fig. 4 には陽極側の溶媒だめに入れた A 型抗体が、電圧の印加に伴いキャピラリー管に導入され、A 型血球と交差し、これにより凝集が生じている状態が示されている。A 型抗体は二価抗体であるので、血球間の凝集が生じる。A 型血球が B 抗体と交差しても凝集は生じなかった。このようにして赤血球に関して A, B, AB, O 型の判別が、nl の全血試料で可能なことが分かった。又、操作時間は約 5 分で測定できた。

5 考 察

5・1 ミクロキャピラリー交差電気泳動装置を用いての血液型判定

提案した方法による血液型判定は、表試験において成立した。同様に裏試験においても予備試験結果では成立している。実際に適用するには、全血クロスマッチの表、

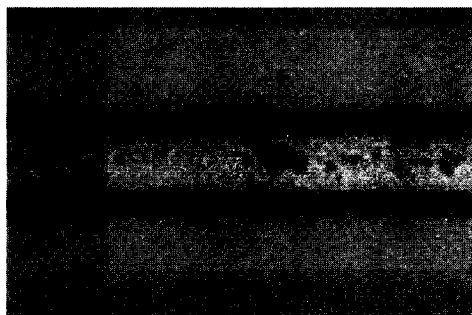


Fig. 4 A photo of red blood cells type A being encountered with their antibody, following aggregating

裏両試験の成立が必要である。原理的にこれらは問題なく適用可能である。

5・2 凝集の判定について

提案した方法のシステム面での問題点は凝集の判定にある。Fig. 4 に示したのは判定しやすい例であるが、検体により凝集の弱い場合における判定が確実にできるかが最も大切なことである。又、非特異的凝集が空試験で認められる場合に、その後の交差反応によって生じた凝集の区別が必要である。これらの点について、現在は目視により判定しているが、コンピュータを用いた画像処理を行えば、更に確実性が高まるであろう。

凝集の判定について、もう一つの可能性は赤血球のブラウン運動を利用することである。顕微鏡観察により、個々の赤血球はブラウン運動をしていることが認められた。凝集した場合には凝集体としてのブラウン運動を行うので、凝集体かそれとも単なる重なりかの判定に、このブラウン運動の動きを利用すれば有効な方法となろう。

本実験においてはすべて手作業で行った。これは将来自動化するのが適当であろう。操作時間は 5 分と非常に短時間である。20 nl の極微量全血試料を用いて、抗原抗体反応による血液型判定方法が可能になったのは、キャピラリー管の使用による安定なマイクロ場の利用による。

本実験に当たり中谷研究助成財団よりの研究助成、及び東亜医用電子(株)松本英淋氏の資料の提供に感謝します。

文 献

- 1) 日本臨床衛生検査技師会編：“日本技輪血検査標準法”，p. 8 (1992)。

- 2) N. Tatsumi, I. Tsuda, K. Inoue: *Clin. Lab. Haemat.*, **11**, 123 (1989).
- 3) W. Hitzler, H. Schmig-Brekner, D. Mathias: *Arzliche laboratorium*, **35**, 89 (1989).
- 4) K. J. Reis, R. Chachowski, A. Cupido, D. Davies, J. Jakway, T. M. Setcavage: *Transfusion*, **33**, 639 (1993); 石田朋子, 大西修司, 松崎龍典, 大谷哲司, 山岡 学, 岡前文字, 阿部 操, 野村昌作, 福原資郎: *機器・試薬*, **20**, 863 (1997).
- 5) S. Kitagawa, C. Kawaura, O. Hashimoto, T. Takahashi, M. Naoi, T. Tsuda: *Electrophoresis*, **16**, 1364 (1995).

要 旨

短い溶融石英キャピラリー管 (内径 50 μm , 長さ 10 mm) 中に全血を入れて電場 (20~30 V) を印加すると, 血球成分と血しょう成分に分離できる。分離された血球成分に赤血球抗体試薬を向流により会合させると, 抗原抗体反応が生じない場合には血球成分の凝集は認められず, 抗原抗体反応が生じると血球の凝集が認められる。これにより血液型の判定ができた。これらの観察は顕微鏡下で行われるので凝集のレベルは数個の血球集団が生じるかによって判定できた。検査に供された希釈された全血を含む溶液は約 20 nl の極微量であり, 操作時間は約 5 分で, 顕微鏡での観察は CCD カメラ, ビデオ記録を併用した。本法は迅速, 極微量の全血を用いる新たな血液型判定法として用いることができる。