九州大学学術情報リポジトリ
Kyushu University Institutional Repository

成人男性における白血球数および好中球貪食能の日内変動について

内藤, 聖子
九州大学大学院生物資源環境科学府生物機能科学専攻生物機能化学講座食糧化学研究室

劉, 忠峰
九州大学大学院生物資源環境科学府生物機能科学専攻生物機能化学講座食糧化学研究室

黒岩, 中
福岡大学医学部微生物・免疫学教室

音成, 道彦
九州大学大学院生物資源環境科学府生物機能科学専攻生物機能化学講座食糧化学研究室

他

https://doi.org/10.15017/4321

出版情報：九州大学大学院農学研究院学芸雑誌. 59 (1), pp.9-13, 2004-02-01. 九州大学大学院農学研究院
バージョン：
権利関係：

九大農学芸誌（Sci. Bull. Fac. Agr., Kyushu Univ.）
第59巻　第1号　9-13（2004）

成人男性における白血球数および好中球貪食能の日内変動について

内藤聖子[1]・劉　忠峰[1]・黒岩　中[2]
音成道彦[1]・田中　守[3]・清永　明[3]
田中宏暁[3]・立花宏文
山田耕路*・進藤宗洋[3]
九州大学大学院農学研究院生物機能科学部門生物機能化学講座食糧化学研究室
（2003年10月31日受付，2003年11月14日受理）

Circadian Rhythm of White Blood Cell and Neutrophil Phagocytic Function in Men

Seiko NAITO[1], Zhongfeng LIU[1], Ataru KUROIWA[2], Michihiko OTONARI[1], Mamoru TANAKA[3], Akira KIYONAGA[3], Hiroaki TANAKA[3], Hirofumi TACHIBANA, Koji YAMADA* and Munehiro SHINDO[3]
Laboratory of Food Chemistry, Division of Applied Biological Chemistry, Department of Bioscience and Biotechnology, Faculty of Agriculture, Kyushu University, Fukuoka 812-8581, Japan

緒　言

非特異的免疫機能の重要な担い手に，白血球数のおおよそ半分を占めている好中球が在る．これの微生物に対する殺傷機能は走化，接着，貪食，殺菌の一連の動作から成り立っている．免疫機能は食事や運動，精神的ストレス等の影響を受けることが報告されている．また，格別の刺激に暴露されないような平常の生活を送っている場合でも，地球の自転や公転に伴う生活環境の変化や固有の生活リズムに伴う一日周期の生体リズム，日内変動が報告されている．好中球では化学走化性（Pigatto *et al.*, 1985, Miguel *et al.*, 1988）についての報告はあるが，貪食能に関する報告は見当たらない．

そこで，本研究では，成人男性について，好中球の微生物を取り込む能力である貪食能の日内変動を調べることを目的にした．

そして，個体間の差や個体内における運動，栄養等の影響を評価する際に，実験条件として規整しなければならない要件である血液採取のタイミングについて検討した．

方　法

被検者は，21歳から41歳までの成人男性7名であっ

[1]九州大学大学院生物資源環境科学府生物機能科学専攻生物機能化学講座食糧化学研究室
[2]福岡大学医学部微生物・免疫学教室
[3]福岡大学スポーツ科学部運動生理学研究室
[1]Laboratory of Food Chemistry, Division of Applied Biological Chemistry, Department of Bioscience and Biotechnology, Graduate School of Bioresource and Bioenvironmental Sciences, Kyushu University
[2]Department of Microbiology and Immunology, Fukuoka University School of Medicine
[3]Laboratory of Exercise Physiology, Faculty of Sports and Science, Fukuoka University
*Corresponding author (E-mail: yamadako@agr.kyushu-u.ac.jp)

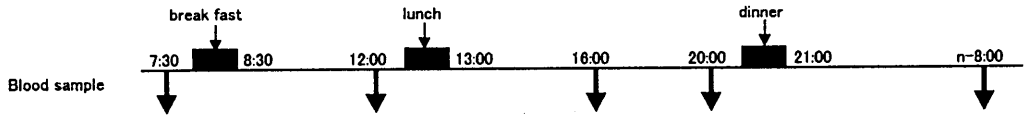

Fig. 1. Protocol of blood sample and food intake

Table 1. Charactarstic of subjects.

Age (year)	26.88± 6.53
Height (cm)	172.8 ± 5.55
Weight (Kg)	68.2 ±10.65
BMI (Kg/m^2)	22.9 ± 3.89

n=7
mean±S.D.

た．事前に，個人ごとに測定の目的と測定内容，及び，測定に伴う危険について十分な説明を行い，署名によるインフォームドコンセントを得た．

被検者の身体特性として，事前に身長，体重を測定し，得られた結果より，BMI（Body Mass Index；体格指数）を算出し，Table 1に示した．

採血および食事時間のプロトコールを Fig. 1に示した．血液は，7：30，12：00，16：00，20：00，翌日の8：00（以下 n-8：00）に，少なくとも10分間の座位安静を保った後，肘静脈より7 ml ずつ採取した．

食事による影響を考慮し，栄養組成が一定となるよう被検者には予め用意した規定食を摂食させた．さらに，食事から各採血までの時間が一定となるよう，実験日前日は20：00までに規定食を夕食として，実験日当日は規定食を朝食として7：30～8：30に，昼食として12：00～13：00，夕食として20：00～21：00に摂取させた．好中球の標本のための採血については，早朝の採血は前日の夕食後約12時間の絶食をした後に，日中の採血は，朝食後3.5～4時間以後と，昼食後8時間以後にした．

総白血球数は，Micro cell counter F-500（Sysmex 社製）を用いて算出した．白血球分画は SRL 社に依頼し，得られた結果より好中球数，リンパ球数，単球数を算出した．

好中球の貪食能については，ヘパリン加末梢血100 μl に蛍光ビーズ Fluoresbrite 2.0μm（フナコシ社製）を4×10^{7}個/ml に調節した蛍光ビーズ浮遊液を100μl 加え，37℃の恒温震盪槽 NTS-120（東京理化機会社製）にて20分間インキュベーションを行った後，Flowcytometory（BECTON DICKINSON 社製）にて，細胞に貪食された蛍光ビーズの解析を行った．解析によって得られた全細胞に占める蛍光ビーズを貪食した細胞の割合を下記の式にて算出し，好中球貪食率とした．

好中球貪食率＝蛍光ビーズを貪食した好中球数/全好中球数

また，好中球1個あたりの貪食能（Phagocytic Index; P.I.）として，貪食された蛍光ビーズ数を全好中球数で除したものを下記の式にて算出し，P.I. とした．

P.I.＝好中球に貪食された蛍光ビーズ数/全好中球数

統計処理は，一元配置の分散分析（One way ANOVA with repeated）を行い，有意な差が認められた場合は，対比法（Contract）を用いて差の検定を行った．全ての統計解析は，Super ANOVA (version 1.11, Abacus Concepts, Inc）を用い，いずれの検定も危険率5％未満を有意水準とした．

結果および考察

白血球数の日内変動を Table 2に，白血球分画の日内変動を Table 3に示した．

総白血球数は，20：00において12：00（$p<0.01$），16：00（$p<0.05$），n-8：00（$p<0.05$）より有意に高い値を示した．また，好中球数は，12：00において7：30（$p<0.05$），20：00（$p<0.01$）より有意に低い値を示し，16：00において20：00より有意に低い値を示した（$p<0.05$）．リンパ球数，単球数，および白血球分画には有意な変化が認められなかった．以上の結果から，総白血球数および好中球数には日内変動が認められ，その値は総白血球数が20：00に最も高くなること，好中球数が12：00に最も低下することが示唆された．

これらのパラメーターから算出した好中球貪食率の日内変動を Fig. 2に，P.I. の日内変動を Fig. 3に示した．

Table 2. Circadian rhythms of total WBC, neutrophil, monocyte and lymphocyte counts.

Time	WBC	Neutrophils	Lymphocytes	Monocytes
	(×10²cells/μl)	(×10²cells/μl)	(×10²cells/μl)	(×10²cells/μl)
7 : 30	56.93±10.99a	32.00± 9.37a	19.86±6.07	2.32±1.32
12 : 00	49.93±10.76	25.35± 9.00ab	20.45±3.72	1.72±1.36
16 : 00	52.89±17.75a	27.98±14.91ac	20.68±4.46	1.84±0.62
20 : 00	62.18±19.77b	34.63±11.35ac	22.17±8.01	2.76±1.57
n-8 : 00	56.29± 7.16a	32.41± 7.74ab	19.47±6.32	2.01±1.16

n=7
mean±S.D.

Value without a common letter are significantly different at less than 0.05.

Table 3. Circadian rhythms of differental white blood count.

Time	Neutrophils	Lymphocytes	Monocytes
	(%)	(%)	(%)
7 : 30	55.86± 9.82	34.71± 8.60	4.43±2.88
12 : 00	49.71± 8.65	41.86± 9.25	3.57±2.82
16 : 00	50.86± 9.99	41.14± 9.34	3.57±1.13
20 : 00	55.43± 3.21	35.86± 4.95	4.43±2.23
n-8 : 00	57.43±11.84	34.86±12.23	3.43±1.51

n=7
mean±S.D.

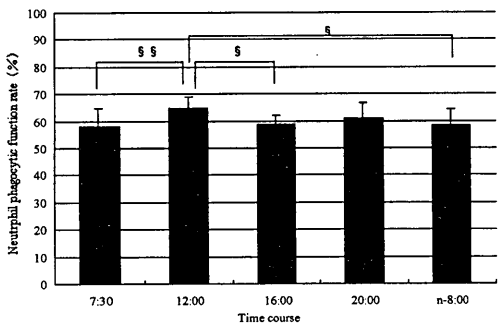

Fig. 2. Circadian rhythms of neutrophil phagocytic fanction rate
§ Significantly different between each time (p<0.05).
§§ Significantly different between each time (p<0.01).

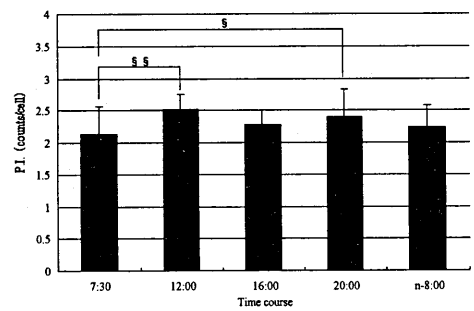

Fig. 3. Circadian rhythms of P.I.
§ Significantly different between each time (p<0.05).
§§ Significantly different between each time (p<0.01).

好中球貪食率は，12 : 00において7 : 30 (p<0.01)，16 : 00 (p<0.05)，n-8 : 00 (p<0.05) より有意に高い値を示し，P.I. は12 : 00において7 : 30 (p<0.01)，20 : 00 (p<0.05) より有意に高い値を示した．

以上の結果より，好中球貪食率および P.I. は日内変動を有すること，その値は12 : 00に最も高くなるこ

とが示唆された．

先行研究において，総白血球数は夕方から夜にかけて，好中球数は夜に増加のピークを迎えることが報告されている（Miyawaki *et al.*, 1984, Plytyzc and Seljelid, 1997）．本研究では，総白血球についてはこれら先行研究を支持したが，好中球数については，20：00が12：00および16：00より有意に高いという同じ結果であるものの7：30とは差がないという若干異なる結果が得られた．このことについては，好中球数が最も低い12：00に好中球貪食能が最も高いこと，さらに両者に負の相関関係が認められた（$p<0.01$, date not shown）ことから，好中球数と好中球機能は拮抗関係にあり，数の増加と機能の増加がともに生起するのを調節することで，過剰な自己免疫反応を回避している可能性を考えてみた．

好中球の血液標本採取のタイミングについては，全ての項目において，連続した二日間の早朝空腹時の値の間には有意な差が認められなかったこと，日中は免疫に影響を及ぼすとされる食事や体温，自律神経，内分泌物質，身体活動などの生活因子やそれに影響を受ける生理的因子を同一条件に規整することが困難であると考えられるので，これらの変動による影響をなるべく受けない早朝かつ空腹状態での安静時が望ましいと考えられる．

要　　約

免疫の日内変動を知ることは，運動が免疫に及ぼす影響を観察する場合に重要であると思われる．本研究では，成人男性における白血球と好中球貪食能の日内変動を明らかにし，あわせて血液採取のタイミングについて検討することを目的とした．

被検者は，21～41歳の男性7名であった．12時間の絶食後，7：30，12：00，16：00，20：00，翌日8：00に，肘静脈よりそれぞれ7 mlの採血を行い，得られた血液より白血球数，白血球分画，好中球貪食率および好中球1個あたりの貪食能（P.I.）を測定した．結果の統計処理には，一元配置の分散分析を用い，有意差が認められた場合のみ対比法を用いて有意差検定を行った．有意水準は，危険率5％未満とした．その結果，総白血球数，好中球数，好中球貪食能は日内変動を有することが示唆され，総白血球数，好中球数は12：00に最も高い値を示し，好中球貪食率，P.I.は12：00に最も低い値を示すことが示唆された．また，安静時での免疫比較を行う場合の血液採取には，全ての項目で有意差が認められなかったこと，その他の免疫に影響を及ぼす因子の影響をなるべく受けないためにも，早朝空腹時に採血を行うことが望ましい可能性が考えられた．

文　　献

Muniain, M. A., R. Mata, F. Pozuelo, C. Rodriguez, D. Rodriguez, A. Romero and A. Trube 1988 Circadian rhythmicity in neutrophil chemotaxis. *J. Rheumatol.*, **15**(6)：1044-1045

Miyawaki, T., K. Taga, T. Nagaoki, H. Seki, Y. Suzuki and N. Taniguchi 1984 Circadian changes of Tlymphocyte subsets in human perpheral blood. *Clin. Exp. Immunol.*, **55**(3)：618-622

Pigatto, P. D., A. Radaelli, G. Tadini, L. Brambilla, G. Altomare and F. Carandente 1985 Circadian rhythm of the *in Vivo* migration of Neutrophils in Psoriatic patients. *Arch. Dermatol. Res.*, **277**：185-189

Plytyzc, B. and R. Seljelid 1997 Rhythms of immunity. *Arch. Immunol. The Exp.* (*warsz*)., **45**：157-162

Summary

It is important to know about the circadian rhythms of immune cells when we study the effects of exercise on immune system. The purpose of this study to investigate about the circadian rhythms of white blood cell and neutrophil phagocytic function in men. Seven men volunteered for this study. The blood samples were collected at 7 : 30, 12 : 00, 16 : 00, 20 : 00 and next day 8 : 00 (n-8 : 00). Counts of total White blood cell (WBC), neutrophils, lymphocytes, monocytes and the differental white blood count were measured. At 20 : 00, the number of total WBC were significantly higher than at 7 : 30 ($p<0.01$), 16 : 00 ($p<0.05$), n-8 : 00 ($p<0.05$). Neutrophils were significantly higher at 20 : 00 than 16 : 00 ($p<0.05$), 12 : 00 ($p<0.01$) and it increased at 7 : 30 than 12 : 00. Neutrophil phagocytic rate was significantly higher at 12 : 00 than 7 : 30, 16 : 00 and n-8 : 00. Neutrophil phagocytic index was significantly lower at 7 : 30 than 12 : 00 and 20 : 00. These dates suggested that there are circadian rhythms of the number of total WBC and neutrophils and phagocytic function.