

## 学 位 論 文 題 名

合成高分子材料によるリンパ球系免疫細胞の  
機能制御に関する基礎的研究

## 学位論文内容の要旨

生体材料の開発は、従来生体反応をいかに抑えるかが重要な課題とされてきた。しかし、生体材料にとってはあくまで異物であり、その異物反応を完全に抑えることは不可能である。最近では、生体と接触する材料と生体側の反応を、目的に応じて引き出すことが肝要と考えられ、その生体反応の中心的役割りを果たす免疫系と生体材料の相互作用の解明が重要な課題となっている。また、人工透析においても、透析膜により補体の活性化が報告されて以来、透析膜の免疫系に対する影響が合併症との関わりで論議されはじめ、多くの研究がなされてきた。しかし、いまだ各種医用高分子材料の免疫系に対する影響に関する詳細な知見は得られていない。本論文は以上の問題点を踏まえ、各種合成高分子材料によって引き起こされる免疫細胞、また液成因子を介した免疫細胞の機能変化を検討することを目的とし、実験を行った。また、免疫調節材料の開発を目的とし、免疫賦活物質固定化材料に関する基礎的研究を行った。

第1章は序論として、生体材料の現状を概括し、各種生体材料の免疫系へ及ぼす影響と、免疫療法の現状を解説し、本研究の目的と意義を述べている。

第2章では、各種汎用高分子材料と短時間接触したマウスリンパ球の機能変化に関する研究を述べている。試料として、セルロースアセテート(CA)、ポリメチルメタクリレート、(PMMA) ポリアクリロニトリル (PAN)、ポリプロピレン (PP)、ポリビニルアルコール (PVA) を用いた。マウス脾臓より調整したリンパ球を、各試料に2時間接触させた後に回収し、マイトジェン (ConA, PHA, LPS) を加え培養し、48時間後の細胞数変化、及び、 $^3\text{H}$ チミジン ( $^3\text{H}$ -TdR) の取り込み量より増殖能を評価した。CA, PVA 試料において、マイトジェン刺激後に回収された生細胞数は細胞培養プレートのみのコントロールに比べ減少を示した。PMMA, PAN, PP 試料ではこのような影響を示さなかった。リンパ球増殖能を測定したところ、PMMA, PAN, PP はコントロールと有意な差はなかったのに対し、CA は全てのマイトジェンで、PVA は ConA と LPS において顕著に減少した。しかし、PHA 刺激系では PVA と接触したリンパ球は、その生細胞数が少ないのに係わらず、コントロールより大きな増殖能を示した。ま

た、 $^3\text{H}$ -TdR 取り込み量を生細胞数で規格化したところ、ConA 刺激においても他の試料より PVA の活性が高かった。ナイロンウールカラム非付着性細胞により実験を行った場合、PVA 試料接触リンパ球が、PHA 刺激に対する細胞増殖能をより顕著に増強させることが示され、PVA がリンパ球に何らかの作用を与えることが明らかとなった。各試料に血清成分を吸着させた場合、細胞数変化と増殖能において、試料間の差が認められなくなった。特に LPS に対する CA、PVA の制御は血清処理により除去された。そのため、血清非吸着系において、CA 及び PVA で生細胞の割合が少なかった原因を調べるため、試料から離脱・回収した直後の生細胞数を計測したところ、血清成分非吸着試料と 2 時間接触後の細胞数は、PVA では変化しなかったのに対し、CA では、死細胞が多く観測された。FACS による測定により、B 細胞の減少が顕著に認められた。また、SEM による観察では、CA 試料上のリンパ球表面に変化がみられ、接触により何らかの影響を与えることが示唆された。一方、CA 試料をあらかじめ蒸留水に浸漬し、表面の水を除去後直ちに細胞を接触した場合、リンパ球の形態変化は見られなかった。したがって CA のリンパ球に対する作用は、試料の含水状態と密接な関係があることが示唆された。

第 3 章では、前章の実験、すなわち各試料と接触後、マイトジェンを加えて 48 時間培養後のリンパ球について、その表面抗原の変化を FACS により解析した結果を述べている。対象とした表面抗原は、CD 4 及び CD 8 であった。マウス血清成分非吸着の場合、PMMA、PAN、PP と接触したリンパ球ではコントロールと較べ変化がなかったのに対し、CA、PVA において有意な差がみられた。CA においては  $\text{CD}4^+\text{CD}8^-$  分画の減少が顕著に観察された。前節でも述べたが、CA においては接触後、脱離・回収した時点で、その分画の減少が観察されており、その影響と考えられる。 $\text{CD}4^+/\text{CD}8^+$  比を見たところ、コントロールと差はみられなかった。一方、PVA においては、全てのマイトジェン刺激において、 $\text{CD}4^+\text{CD}8^-$  の減少がみられ、さらに  $\text{CD}4^+/\text{CD}8^+$  比が他の試料に対して増加し、リンパ球表面抗原の発現に関しても何らかの作用を与えることが明らかとなった。一方、血清成分を表面に吸着した PVA では、他の試料との差は観測されなかった。

第 4 章では、上記高分子材料上でマウスリンパ球を培養し、マイトジェンにより刺激した系における実験結果を述べている。すなわち各試料がリンパ球の増殖時に基質として接触している場合、その試料が及ぼすリンパ球の細胞数変化、及び増殖能に対する影響に関し検討した。血清成分非吸着の場合、PMMA、PAN、PP では、コントロールと較べ、有意な差は認められなかった。一方、CA、PVA では、全てのマイトジェンにおいて、細胞数、増殖能ともに減少し、とくに ConA、及び LPS 刺激系において顕著であった。血清成分を吸着させた場合、CA において細胞数は増加したが、コントロールに対する割合で示すと、ConA : 23%→38%, PHA : 33.3

%→70.2%, LPS : 15%→25.8%への増加にとどまり、低値を示した。増殖能に関しても、コントロールの値へは回復せず、第2章で述べた短期接触の場合とは異なる作用を示すことが明らかとなった。PVAにおける細胞数増加は、ConA : 2%→4%, PHA : 9.8%→62%, LPS : 1.4%→10.5%であり、また、増殖能に関しても、ConA, LPS 刺激系においてCAよりも低値を示した。しかし、PHA 刺激系において、生細胞数が少ないにも係わらず、コントロールと同程度の<sup>3</sup>H-TdR 取り込みを生ずることが明らかとなった。また、ConA, LRS 系においても、生細胞数で規格化した場合の<sup>3</sup>H-TdR 取り込み量は、コントロールと較べ顕著に高値を示すことが明らかとなった。試料に用いたPVAは架橋を施しておらず、本実験条件下では、膨潤した高親水性基質となるため培養基質としては好ましくなく、細胞増殖に抑制的に作用することは十分考えられる。しかし、上記の実験結果より、PVAは活性化されたリンパ球に特異的に作用することが示唆された。

第5章では、前章の実験、すなわちマイトジェン存在下に各試料と長期接触させたリンパ球について、その表面抗原を調べた結果を述べている。PMMA, PNA, PPにおいて、コントロールと差はなかったのに対し、CAおよびPVAにおいて顕著な変化が生じ、CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>比が増加した。特にPVAにおいては、血清成分非吸着-LPS 刺激系において、コントロールと較べその比が著しく増加することが明らかになった。血清成分を吸着させた場合、各マイトジェン刺激系において、その増加率は減少するが、第3章で述べた短期接触の場合とは異なり、他試料と較べ有意の差異を示すことが明らかとなった。

第6章では、免疫調節材料の開発の試みとして、免疫賦活物質固定化材料に関する基礎的研究を行い、IL-2をモデル物質として用い、その固定化方法の最適化を検討した結果を述べている。エチレンビニルアルコール共重合体 (EVAL) 各種及びPVAを担体基質として用い、担体の水酸基を各種架橋剤と反応させることによりIL-2を固定し、IL-2依存性T細胞クローン株であるCTLL-2を用いてIL-2活性を評価した。固定方法はIL-2のアミノ基に対して結合する方法が最も活性を高く保てた。また担体としては、EVAL32が最も良好な活性を示した。

第7章では、本実験の総括として、実験に用いた汎用高分子材料の免疫細胞への作用に関し、短時間及び長時間接触の実験結果を比較、検討し、考察を述べている。また、材料と免疫細胞との相互作用による免疫調節の可能性について述べている。

## 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 勇 田 敏 夫

副 査 教 授 山 本 克 之

副 査 教 授 小野江 和 則 (医学研究科)

副 査 助 教 授 村 林 俊

生体材料による免疫系への作用は、その材料の生体適合性の見地のみならず、新たな免疫調節材料の開発のためにも重要な課題となっているが、材料の免疫系への影響、特に免疫担当細胞への作用に関する研究はいまだ十分には行われていない。

本論文は、このような現状において、人工透析膜等として広く用いられている各種合成高分子材料を試料として用い、その接触がマウスリンパ球の増殖能、及び表面抗原の変化に及ぼす影響を述べたものである。また、免疫調節材料の開発の基礎研究として、免疫賦活物質固定化を試み、その固定化基質、固定方法を検討したものであり、その成果は、以下に要約される。

まず、試料としてセルロースアセテート (CA)、ポリメチルメタアクリレート (PMMA)、ポリアクリロニトリル (PAN)、ポリプロピレン (PP)、ポリビニルアルコール (PVA) を用い、マウスリンパ球を各試料と 2 時間接触後、脱離・回収し、マイトジェン (ConA, PHA, LPS) を加え、その増殖能、及び表面抗原を調べたところ、CA, PVA において、大きな変化が生じ、一方他試料においては、全く影響を与えないことを明らかにしている。CA では B リンパ球、及びマクロファージ分画に特異的に作用し、脱離時にすでに不可逆的変性を生じさせていること、また、その原因として、CA 膜の含水状態が関与している事を示している。PVA では、脱離時における変性は生じさせないが、各マイトジェンに対する感受性に変化を生じさせ、リンパ球の各亜群に特異的な作用をすること、また、その作用機構に血清成分の抗体、補体等が関与していることを明らかにしている。

次に、各試料上でマウスリンパ球を培養し、マイトジェンにより刺激した系において検討しているが、CA, PVA において大きな変化が生じ、一方他試料においては、全く影響を与えないことを明らかとしている。CA, PVA におけるその作用は、短期接触の場合と同傾向の結果であるがより顕著に発現し、免疫調節の観点から興味ある知見を明らかとしている。

さらに、免疫調節材料の開発の試みとして、成分比が異なる各種エチレンビニルアルコール共重合体、ポリエチレン及び PVA を担体基質として用い、IL-2 をモデル免疫賦活物質として固定化し、その固定方法の最適化を検討している。その固定化担体により IL-2 の吸着挙動が異な

ること、また、吸着 IL-2 の力価が経時的に増加すること、さらに、共有結合により IL-2 を固定化した場合には、IL-2 の力価はビニルアルコールの量に比例せず、ある特定の最適量が存在することなど、免疫賦活物質固定化材料の開発にあたって、非常に有意義な知見を見いだしている。

これを要するに、著者は、汎用合成高分子材料が免疫細胞の機能へ変化を与えることを明確に示し、さらに免疫調節材料開発の際の基材としての合成高分子材料が果たす役割の重要性を示したものであり、生体材料、さらに生体工学の進歩に寄与したところが大きい。

よって著者は、博士（工学）の学位を授与される資格あるものと認める。