

学 位 論 文 題 名

体外細胞性免疫調節材料の開発を目的とした
極細繊維による細胞機能制御に関する基礎的研究

学位論文内容の要旨

体外免疫調節法は、疾患により崩れた免疫システムの調節を薬剤投与に頼らずに体外操作によって行う方法であり、その調節対象は血漿成分と細胞成分である。血漿処理による液性成分の調節は種々の疾患に適用され、治療効果も広く認められてきているが、近年、免疫異常を伴う疾患に対しては液性成分の調節と併せて細胞性免疫の調節も行うことが重要であるという認識が高まりつつある。従来、細胞性免疫の調節法としてリンパ球除去等による細胞の除去が行われていたが、近年、除去療法のみならず、体外操作によって免疫担当細胞の機能を調節するという、より積極的な細胞性免疫調節が試みられており、体外で種々の材料と免疫担当細胞を接触させ、細胞機能を変化させる方法が注目されてきている。このような免疫調節材料の一つに、表面に免疫刺激物質を固定化した材料があり、より効果的な刺激物質の研究が進められているが、しかしその一方で、材料と細胞との相互作用において材料の化学的性質、サイズが重要な factor であることが知られているにも関わらず、固定化基質の選択、特に基質サイズの選択に関しては殆ど注意が払われていない。そのため、本研究は、免疫調節材料の免疫担当細胞機能誘導に対する至適サイズを極細繊維を用いて検討し、より効果的な細胞性免疫調節用材料の開発に寄与することを目的とした。本論文は、7章で構成される。以下に、各章についての概要を述べる。

第Ⅰ章は序章であり、本研究で取り上げた細胞性免疫調節用材料の至適材料サイズの検討の背景について述べると共に、本研究の意義を明らかにし、目的について述べている。

第Ⅱ章では、極細繊維径が、接着したマウスリンパ球の活性化に及ぼす影響を *in vitro* で評価している。平均繊維径1.5、3、5、7、17 μm の5種類のポリプロピレン製極細繊維不織布を基質にConcanavalin A (Con A) 刺激下、マウス脾細胞を培養し、培養上清中へのInterleukin 2 (IL-2) の産生量をIL-2依存性増殖株CTL-2を用いたバイオアッセイにより測定した。また、材料への脾細胞の粘着形態を走査型電子顕微鏡 (SEM) により観察した。上清中のIL-2活性は、径が小さくなるほど高まる傾向が得られ、1.5 μm の超極細繊維がリンパ球のIL-2産生に効果的な環境を提供することが示された。また、繊維材料に対する細胞の粘着形態は本来の球形をほぼ保っており、また、個々の細胞と繊維表面との接触面積は、繊維径が小さくなる程小さくなる傾向が観察された。これらのことから、基質と個々の細胞との接触面積が小さくなる程リンパ球のIL-2産生が高まるという超極細繊維のサイズ効果の存在が示唆された。

第Ⅲ章では、ポリプロピレン製極細繊維表面に各種汎用合成高分子をコーティングし、基質の材質がリンパ球のIL-2産生に及ぼす影響を検討するとともに、極細繊維を O_2 プラズマで処理することにより表面に官能基を導入して親水化し、表面の化学的性状の変化により、第Ⅱ章で述べた極細繊維のサイズ効果が受ける影響を検討した。繊維表面の材質はリ

ンパ球のIL-2産生に大きな影響を与えなかった。表面の親水化処理によっても繊維径が小さくなるほどリンパ球のIL-2産生が高まる傾向が示され、超極細繊維のサイズ効果は繊維表面の化学的性状に影響を受けないことが明らかとなった。

第IV章では、II章、III章の結果をもとに、極細繊維を細胞性免疫調節用材料に応用するための基礎研究として、ポリプロピレン製極細繊維不織布表面にCon Aをモデル免疫刺激剤として固定化した試料を作成し、極細繊維を用いた細胞性免疫調節材料における細胞機能誘導能に対する繊維径の影響について検討を行った。Con A固定化極細繊維の平均繊維径は1.5、2.6、3.3、4.5、7.9 μm の5種類とし、これらの試料とリンパ球を接触させて培養し、培養上清中のIL-2活性をCTL-2を用いたバイオアッセイにより測定した。また、SEMにより細胞の極細繊維に対する接着状態を観察した。上清中のIL-2活性は繊維径に依存せず、ほぼ同程度の値となったが、SEMによる接着状態の観察結果から、第II章の観察結果同様に繊維径が小さくなる程個々のリンパ球と繊維表面との接触面積が小さくなることがわかり、径の小さい超極細繊維に接着したリンパ球は、結合できるCon Aの数が太い繊維に接着した場合と比較してかなり少なくなるにも関わらず、太い繊維に接着した場合と同程度の活性化をしたことがわかった。したがって、超極細繊維にはリンパ球に結合する免疫刺激剤の数が少なくてもリンパ球の活性を十分に高めるような働きがあり、免疫担当細胞刺激物質の固定化基質として有用である可能性が示された。

第V章では、平均径3 μm 、7 μm のポリプロピレン製極細繊維、平均直径250 μm のポリプロピレンコートビーズ上で、マウス脾臓常在マクロファージを培養し、接着基質サイズがマクロファージのIL-1産生に及ぼす影響を検討した。マクロファージ培養上清中のIL-1活性は、C3H/HeJマウスの胸腺細胞を用いたバイオアッセイによって測定した。培養上清中のIL-1活性は、7 μm の繊維、ビーズ試料による場合よりも3 μm の超極細繊維に接着した方が高い値が得られた。リンパ球と共に重要な免疫担当細胞であるマクロファージの活性化においても、径の細い超極細繊維が有効であることが示唆された。

第VI章では、第II章から第V章までの結果より明らかとなった超極細繊維の細胞活性増強効果が、繊維径自体の影響であるのか、繊維径が異なることによる不織布の持つ三次元的構造の違いの影響であるのかを明らかにするため、三次元的な細胞分布の影響を排除した平板試料を用いて、リンパ球初期活性化に及ぼす接着基質サイズの影響を検討した。すなわち、シリコンウェハ上にフォトリソで幅1.5 μm 、高さ2 μm の凹凸のストライプ状微細パターンを形成した試料、およびパターンの無い平板試料に蛍光色素を取り込ませたヒト末梢血単核球を接着させ、Con A刺激を加えた時の細胞内 Ca^{2+} 濃度変化に接着基質サイズが及ぼす影響を検討した。細胞内 Ca^{2+} 濃度は、画像解析装置を接続した倒立型蛍光顕微鏡により測定、解析を行った。パターンを形成した試料に接着した方が、パターンの無い平板試料に接着した場合よりもCon A刺激時における細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇率が高まるという結果が得られ、接着基質のサイズ自体がリンパ球活性化に影響を及ぼしており、また、リンパ球の細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇という活性化初期の段階から接着基質サイズの影響が現れていることが示唆された。

第VII章は、本論文の結論であり、本研究で得られた各章での結論を総括して述べ、結びとした。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 勇 田 敏 夫

副 査 教 授 狩 野 猛

副 査 教 授 小野江 和 則 (医学研究科)

副 査 助教授 村 林 俊

学 位 論 文 題 名

体外細胞性免疫調節材料の開発を目的とした 極細繊維による細胞機能制御に関する基礎的研究

体外免疫調節法は、疾患により崩れた免疫システムの調節を薬剤投与に頼らずに体外操作によって行う方法である。血漿処理による液性成分の調節は種々の疾患に適用され、治療効果も広く認められてきているが、近年、免疫異常を伴う疾患に対しては液性成分の調節と併せて細胞性免疫の調節も行うことが重要であるという認識が高まりつつある。従来、細胞性免疫の調節法としてリンパ球除去等による細胞の除去が行われていたが、近年、体外で種々の材料と免疫担当細胞を接触させ、細胞機能を変化させる方法が注目されてきている。このような免疫調節材料の一つに、表面に免疫刺激物質を固定化した材料があり、より効果的な刺激物質の研究が進められている。しかし、材料と細胞との相互作用において材料のサイズが重要な factor であることが知られているにも関わらず、固定化基質サイズの選択に関しては殆ど考慮がなされていない。

本論文は、このような背景のもと、免疫調節材料の免疫担当細胞機能誘導に対する至適サイズを極細繊維を用いて検討し、より効果的な細胞性免疫調節用材料の開発に寄与することを目的としたものである。本論文は7章で構成され、各章についての概要を述べる。

第I章は序章であり、本研究の背景、目的について述べている。

第II章では、極細繊維径が、接着したマウスリンパ球の活性化に及ぼす影響をin vitroで評価している。平均繊維径1.5、3、5、7、17 μ mの5種類のポリプロピレン製極細繊維不織布を基質に Con A 刺激下、マウス脾細胞を培養し、Interleukin 2 (IL-2) の産生量を測定し、脾細胞の粘着形態を走査型電子顕微鏡 (SEM) により観察した結果、IL-2産生は、繊維径が小さくなるほど高まる傾向が得られ、また、個々の細胞と繊維表面との接触面積は、繊維径が小さくなる程小さくなる傾向が観察されており、基質サイズが小さく、個々の細胞との接触面積が小さくなる程リンパ球のIL-2産生が高まるという超極細繊維のサイズ効果の存在が示唆されている。

第III章では、ポリプロピレン製極細繊維表面に各種汎用合成高分子をコーティングし、また、極細繊維をO₂プラズマで処理することにより表面の化学性状を変えて、第II章と同様の検討を行ったところ、超極細繊維のサイズ効果は繊維表面の化学的性状に影響を受けないことを明らかにしている。

第IV章では、極細繊維を細胞性免疫調節用材料に応用するための基礎研究として、平均

繊維径1.5、2.6、3.3、4.5、7.9 μm のポリプロピレン製極細繊維表面にCon Aをモデル免疫刺激剤として固定化した試料を作成し、細胞機能誘導能に対する繊維径の影響についてリンパ球のIL-2産生量の測定により検討を行っている。また、SEMにより細胞の接着状態を観察している。超極細繊維にはリンパ球に結合する免疫刺激剤の数が少なくてもリンパ球の活性を十分に高めるような働きがあり、免疫担当細胞刺激物質の固定化基質として有用である可能性を示している。

第V章では、極細繊維、直径250 μm のビーズ上で、マウスマクロファージを培養し、接着基質サイズがマクロファージのIL-1産生に及ぼす影響を検討しており、マクロファージの活性化においても、径の細い超極細繊維が有効であることを示唆している。

第VI章では、シリコンウェハ上に凹凸のストライプ状微細パターンを形成した試料、およびパターンの無い試料にヒトリンパ球を接着させ、Con A刺激を加えた時の細胞内 Ca^{2+} 濃度変化に接着基質サイズが及ぼす影響を検討している。パターンを形成した試料に接着した方が、パターンの無い平板試料に接着した場合よりも細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇率が高まり、接着基質のサイズ自体がリンパ球活性化に影響を及ぼしていることを示唆している。

第VII章は、本論文の結論であり、本研究で得られた各章での結論を総括して述べている。

これを要するに、著者は、材料との接触によるリンパ球の機能制御には、材料サイズを考慮することが非常に重要であり、材料サイズの小さい方が機能誘導に有利であるという体外細胞性免疫調節材料の開発上有益な新知見を得ており、体外免疫療法および、医学と工学との境界領域における生体工学の進歩に貢献するところ大なるものがある。

よって著者は、北海道大学博士（工学）の学位を授与される資格あるものと認める。