HOKKAIDO UNIVERSITY

| | |
|---|---|
| Title | 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 |
| Author(s) | 見藤, 歩 |
| Degree Grantor | 北海道大学 |
| Degree Name | 博士(工学) |
| Dissertation Number | 甲第3269号 |
| Issue Date | 1993-06-30 |
| DOI | https://doi.org/10.11501/3073047 |
| Doc URL | https://hdl.handle.net/2115/49909 |
| Type | doctoral thesis |
| File Information | 000000267478.pdf |

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

博士論文

# 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

平成5年3月

北海道大学大学院　工学研究科
博士後期課程　生体工学専攻

見藤　歩

博士論文

# 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

平成5年3月

北海道大学大学院　工学研究科
博士後期課程　生体工学専攻

見藤　歩

# 目次


第１章　序　　論・・・

２－３－３－２　ＰＨＡ刺激系・・・・・・・・・・・・・・・・・・・１７
２－３－３－３　ＬＰＳ刺激系・・・・・・・・・・・・・・・・・・・１７
２－３－４　試料接触の生細胞による
チミジン取り込みに対する影響・・・・・・・・・・・・・１９
２－３－５　ナイロンウール非付着細胞の増殖能に対する影響・・・２１
２－３－６　試料と接触した血清成分による
細胞増殖能に対する影響・・・・・・・・・・・・・・・・２１
２－３－７　試料接触２時間後の細胞の状態・・・・・・・・・・・２１
２－４　考察・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・３１

第３章　合成高分子材料との短期接触によるリンパ球サブセット変化・・３７

３－１　はじめに・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・３７
３－２　実験方法
３－２－１　実験に用いた細胞・・・・・・・・・・・・・・・・・３７
３－２－２　蛍光標識モノクローナル抗体による細胞染色・・・・・３７
３－２－３　細胞表面抗原の測定・・・・・・・・・・・・・・・・３８
３－２－４　ＦＬ１，ＦＬ２蛍光強度の解析・・・・・・・・・・・３８
３－２－５　芽球化細胞分画の測定・・・・・・・・・・・・・・・３８
３－３　結果・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・３８
３－３－１　調整したマウス脾細胞および
マイトジェン非添加培養後のリンパ球サブセット・・・３８
３－３－２　ConA刺激によるリンパ球総数中のサブセットの割合・・３８
３－３－３　PHA刺激によるリンパ球総数中のサブセットの割合　・・４０
３－３－４　LPS刺激によるリンパ球総数中のサブセットの割合　・・４０
３－３－５　各マイトジェン刺激によるＣＤ４／ＣＤ８の変化　・・４４
３－３－６　各サブセットの細胞数・・・・・・・・・・・・・・・４４
３－３－７　生細胞中における芽球化細胞の割合・・・・・・・・・４９
３－３－８　ConA刺激による芽球化リンパ球サブセットの割合・・・４９
３－３－９　PHA刺激による芽球化リンパ球サブセットの割合　・・・５０
３－３－１０　LPS刺激による芽球化リンパ球サブセットの割合　・　５０
３－３－１１　芽球化細胞におけるＣＤ４／ＣＤ８の変化・・・・・５０
３－４　考察・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・５６

第４章　合成高分子材料との長期接触が及ぼす

リンパ球増殖反応への影響・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・６０

４－１　はじめに・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・６０
４－２　実験方法・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・６０
４－２－１　実験に用いた合成高分子材料・・・・・・・・・・・・・６０
４－２－２　リンパ球の調整方法・・・・・・・・・・・・・・・・・・６０
４－２－３　試料と接触させたリンパ球の細胞増殖能試験・・・・・６１
４－２－４　培養後の細胞数の計測・・・・・・・・・・・・・・・・・６１
４－３　結果・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・６１
４－３－１　ConA刺激後の細胞数に与える試料の影響・・・・・・・６１
４－３－２　PHA刺激後の細胞数に与える試料の影響・・・・・・・・６３
４－３－３　LPS刺激後の細胞数に与える試料の影響・・・・・・・・６３
４－３－４　マイトジェン刺激細胞中の生細胞に与える
試料接触の影響・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・６３
４－３－５　培養４８時間後の生細胞数及び死細胞数・・・・・・・６６
４－３－６　マイトジェン刺激後の細胞増殖能に与える試料の影響・６６
４－４　考察・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・６８

第５章　合成高分子試料上での長期培養によるリンパ球サブセット変化・７２

５－１　はじめに・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・７２
５－２　実験方法
５－２－１　実験に用いた細胞・・・・・・・・・・・・・・・・・・７２
５－２－２　モノクローナル抗体による細胞染色
および表面抗原の解析・・・・・・・・・・・・・・・・・７２
５－３　結果
５－３－１　ConA刺激によるリンパ球総数中のサブセットの割合・・７３
５－３－２　PHA刺激によるリンパ球総数中のサブセットの割合・・７３
５－３－３　LPS刺激によるリンパ球総数中のサブセットの割合・・７３
５－３－４　試料上で培養した細胞のＣＤ４$^{+}$／ＣＤ８$^{+}$比・・・・・７７
５－３－５　各サブセットの細胞数・・・・・・・・・・・・・・・・７７
５－３－６　生細胞中の芽球化細胞の割合・・・・・・・・・・・・・８２
５－３－７　芽球化細胞中のリンパ球サブセットの割合・・・・・・・８４
５－３－８　芽球化細胞中でのＣＤ４／ＣＤ８比・・・・・・・・・・８４

5－4　考察・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・８９

第６章　免疫賦活物質固定化に関する基礎的研究・・・・・・・・・・・・・・・・９１

6－1　はじめに・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・９１
6－2　実験方法・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・９１
6－2－1　担体の作成・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・９１
6－2－2　免疫賦活物質の固定方法・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・９２
6－2－3　ＩＬ－２活性の測定・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・９３
6－3　結果・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・９４
6－3－1　ＩＬ－２の力価及び試料の影響・・・・・・・・・・・・・・・９４
6－3－2　各種固定化方法の比較・・・・・・・・・・・・・・・・・・・９４
6－3－3　固定化ＩＬ－２の浮遊ＩＬ－２に対する力価・・・・１０２
6－3－4　ＩＬ－２の固定化量と物理吸着量の比較・・・・・・１０２
6－4　考察・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・１０２

第７章　結論・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・１０９

謝辞・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・１１１

参考文献・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・１１２

研究業績・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・１１７

# 第１章　序論

## １．１　本研究の背景と目的

現在までに様々な物質が生体材料または医用材料の名前で医療用品に、応用されてきた。血液バッグ、輸血や点滴に用いられるセット、各種カテーテル、プラズマフェレーシスや人工透析器、人工血管、人工心臓、整形外科用補綴物、歯科用補綴物、人工歯根など、その適応範囲は多岐に亙っている。しかしながらこれらの多くは汎用材料の応用であり、医用材料として設計、合成されたものは少ない。それらの材料を、先人達の試行錯誤と努力で医用器具、人工臓器の材料として応用するに至った。材料の系統的な研究開発は近年始まったばかりと言っても過言ではない。

このように、生体材料の開発に際して、従来、生体に対して不活性なものが追求されてきた。特に課題とされてきたものが人工合成物と血液の相互作用であり、人工心臓用材料に代表される抗血栓性材料である。しかし、血液と材料との相互作用は血液凝固のみならず、免疫系へもいろいろな作用をすることが知られている。特に人工透析などの体外循環において古くから論議されてきた。その最初の報告は水戸らの体外循環中での白血球数減少に関する論文である[1)]。彼らのグループは、この白血球減少を健康犬による実験で証明し、この減少が装置に対する白血球の付着によって起こるのではなく、肺などの組織にプールされること、またこの減少が、体液因子によって誘起されることを示した。Kaplowらは透析中の患者血を調べ、これらの白血球の減少はおもに好中球によってもたらされることを示している[2)]。また、減少した好中球は、ほとんどがダイアライザーではなく、肺毛細血管へ集積しており[3)]、肺に捕捉された好中球は1～2時間後に再び血液中に放出され、さらに骨髄にプールされている血球の放出をともなうことが分かっている[4)]。この減少はダイアライザーのタイプ及び滅菌方法には関係無いことが示され[5)]、また、透析膜素材の違いにより、白血球減少量が違うことが分かった。Craddockらは、透析中に、透析膜により、血液（血清）中に存在する免疫調節因子であり、液性免疫の重要な要素である補体(complement)が活性化されることを明らかにした[6)]。補体活性化現象は、補体系というシステムのなかの補体の各成分がカスケード反応により活性化されて行くのであるが、その中で生成される成分の一つであるC5aが好中球の表面レセプターに結合し、好中球の粘着性が増加し、肺の毛細血管への凝集が起こることが示されていることにより[7,8)]、補体の活性化と好中球減少が関連付ら

れている。それ以来、透析中の合併症と免疫系との関係が重要視されるに至った。

更に血液透析によってインターロイキン1(IL-1)の血中濃度が上昇することがDinarelloらにより指摘され[9]、これはC5aによってマクロファージが活性化されることによって起こることが示唆されている。またインターロイキン2のレセプター発現が透析膜との接触によって誘導されるのではないかとの指摘もある[10,11]。この様に材料による免疫系への影響が明らかになるにつれ、その材料の生体適合性の見地より、材料の免疫系への影響が重要な課題となっている。

体外循環療法は、人工腎臓としてのみ使われるばかりではなく、病因となる血液中の有害な細胞、不必要な物質を取り除く方法である。そのなかには、自己免疫疾患患者に対する白血球除去や、癌治療におけるプラズマフェレーシスあるいは免疫吸着剤やprotein Aを用いた免疫吸着法がある[12]。Protein Aカラムを用いた免疫吸着療法では、免疫系細胞に対する阻害物質の除去による効果だけではなく、Protein Aそのものによる治癒効果が示唆されている[13]。また用いられた材料の違いによる白血球機能変化への効果の研究例として次のようなものがある。Cryofiltration療法で治療中の慢性関節リウマチ患者を対象とし、その治療の前後で採取した末梢血リンパ球を用い、マイトジェンに対する芽球化反応試験を行なった結果、抑制されていたリンパ球反応は治療後顕著に回復した。　また、健康人のリンパ球に患者血漿を加える試験、及び、患者リンパ球に標準血清を加え芽球反応試験を行なった。その結果、患者リンパ球の機能の向上は、抑制因子の除去による効果のみではなく、Cryofiltrationに用いられたセルロースアセテート血漿分離膜がなんらかの寄与をしたものと考えらる[14,15]。プラズマフェレーシスでは病因関連物質の除去のみではなく、より積極的な免疫機能制御が求められており、免疫調節材料の開発が求められている。その開発を行うためにも材料－免疫細胞相互作用を研究することが重要な課題となっている。

一方、免疫学の分野は近年急速に研究が進み、その細胞の機能、抗原に対する反応機構、細胞の放出するサイトカインの機能の解明がされつつある。その応用として、様々な疾患（代表的なものとして癌が上げられるが）に対するサイトカイン投与を中心とする免疫療法が、従来の外科的治療や、化学薬物、放射線療法と同等に利用されつつある。

免疫療法として代表的なものに免疫賦活物質であるインターフェロン（ＩＦＮ）やインターロイキン2（ＩＬ－２）の体内投与がある。ＩＦＮは直接的または、抗腫瘍効果を持つエフェクター細胞を誘導、活性化し、体内の抗腫瘍活

性を増進させる。ＩＬ－２はＴ細胞に働き細胞傷害性Ｔ細胞を活性化させる他、大量のＩＬ２投与によりリンパ球の中で腫瘍に対して非特異的に作用し抗腫瘍効果を示すLymphokine activated killer （ＬＡＫ）細胞を誘導する。しかし、これらの物質の投与は次の問題点がある。まず、これらの物質は、生体内代謝が極端に早いということである。つぎに、この生体内代謝の早さより抗腫瘍活性を得るためには、継続的な大量投与が必要である。これらのサイトカイン類は、活性の対象となる細胞のスペクトルが広いため、様々な副作用を引き起こす。ＩＬ－２の大量投与は臓器レベルでの体液貯留を引き起こし、死亡を含む重篤な副作用を引き起こす[16]。　直接投与による危険性を回避し、効率的なＬＡＫ細胞の誘導を行い癌治療を行う方法として、Rosenbergらにより開発された養子免疫療法がある[17]。しかし、この方法も患者よりの末梢血採取や培養の煩雑さやその操作過程でのコンタミネーション等の問題があり、また、体内に戻したＬＡＫ細胞の活性を維持するにはやはり大量のＩＬ－２の継続的投与が必要とされる。現在では、ドラッグデリバリーシステムとの組み合わせや、ＩＬ－２などをゼラチンなどの高分子量物質と結合することにより生体内代謝を遅らせる工夫がなされている[18]。

体外循環により免疫細胞に変調を与えることは事実であり、それが、材料の性質により違いがあることが報告されている。人工透析を主とする体外循環はは確固とした方法論が確立されている。そしてこの方法は、循環系外に細胞を取り出すこと無く細胞に変調を与え戻し、さらに継続的にそこを通過する細胞に作用を与え続けることができる。このことを利用すれば、材料表面に種々の免疫活性物質を固定化することにより目的の免疫誘導を行うことが可能と考えられる。そして、その試みは既に始まっている。しかし、根本となる体外循環による免疫能への変調作用の詳細な解明はいまだになされてはいない。よって生体にとって異物である材料がどのような機構により免疫細胞に影響をあたえ機能の変化を生じさせるかを解明することは重要な課題である。　材料－免疫細胞間の機能変化の機構を調べることは、より効果的な人工臓器の開発につながるものと考えられる。本研究は、人工臓器の開発の一端として、合成高分子材料と免疫細胞の間の機能変化、及び、合成高分子材料による免疫細胞の機能制御の可能性を探るものである。

## １－２　本論文の構成

本論文は、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、液性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ものであり、次の７章により構成されている。

第１章　　序論

第２章　　合成高分子材料との短期接触が及ぼすリンパ球増殖反応への影響

第３章　　合成高分子材料との短期接触によるリンパ球サブセット変化

第４章　　合成高分子材料との長期接触が及ぼすリンパ球増殖反応への影響

第５章　　合成高分子試料上での長期培養によるリンパ球サブセット変化

第６章　　免疫賦活物質固定化に関する基礎的研究

第７章　　結論

以下各章ごとに概要を述べる

第１章は序論で、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明示する。

第２章は、各種汎用高分子材料と短時間接触したリンパ球の機能変化をマイトジェン反応により評価する。評価基準は、細胞数と細胞の$^{3}$H-thymidine取り込み量とし、材料－血清成分－細胞の相互反応について論じ合成高分子材料と細胞の短時間接触の影響を検討する。

第３章は、短時間による接触が、どのリンパ球サブセットに影響を与えているかを明確にするため、合成高分子と短時間接触後マイトジェン刺激を加え培養した細胞の表面抗原をフローサイトメトリー法により解析した。

第４章は、材料と接触した細胞が、増殖する過程でその培養基質となる合成高分子の影響をどのような形で受けるのか検討するため、各種合成高分子上でマイトジェン反応を行い、細胞数と、細胞の$^{3}$H-thymidine取り込み量から、材料－血清成分－細胞の相互反応について検討する。

第５章は、増殖過程での合成高分子の影響が、どの分画のリンパ球サブセットに作用するかをフローサイトメトリー法で解析した。

第６章は、免疫調節材料の開発の試みとして、ＩＬ－２をモデルとした免疫

賦活物質固定化を試み、担体となる合成高分子と固定化方法の最適化を検討する。

第７章は本論文のまとめを行う。

# 第２章 合成高分子材料の短期接触が及ぼすリンパ球増殖反応への影響

## ２－１　はじめに

人工透析などの体外循環において、一過性の白血球減少、インターロイキン１の産生、Ｔ細胞サブセットの変化、リンパ球の機能変化など白血球の諸々の影響が生じることが知られている。[1,2]。これらの現象は、人工透析を行なう際の透析液や、代謝産物の不十分な除去の影響以外に、血液、すなわち、血球、液性因子などが、モジュールを構成する膜材料と直接接触することにより誘導されることが報告されている。事実、患者の免疫系の変調は、モジュールの膜材質により差異があることが報告され、特に補体の活性化との関わりが論議されている[3]。一方、白血球が膜材料と直接作用することにより何らかの影響を受けることも考えられるが、それらの影響については、これまで詳細な検討が行われていなかった。そのため、本研究ではこれら膜材料に用いられている合成高分子材料が免疫系に与える影響を調べるために、リンパ球と高分子膜の短期接触を行い、その後、細胞のマイトジェンに対する反応性を検討した。また、合成高分子材料、リンパ球、及びそのあいだに介在する血清成分の影響についての考察を行なった。実験では、病的な状態ではなく、しかも個体差を少なくし、材料自身の影響を直接調べることを目的とし、近交系マウスのリンパ球を用いた。

## ２－２　実験方法

### ２－２－１　試料の作成

セルロースアセテート（ＣＡ）、ポリビニルアルコール（ＰＶＡ）、ポリアクリロニトリル（ＰＡＮ）、ポリメチルメタクリレート（ＰＭＭＡ）、ポリプロピレン（ＰＰ）を試料として用いた。これらの希薄溶液をガラスシャーレに、solvent-casting method を用いて製膜した。　これらポリマー試料はすべてAldrich製であり、また、溶媒は関東化学製特級試薬を用いた。組合せはそれぞれＣＡがアセトン、ＰＭＭＡがトルエン、ＰＡＮがN,N-ジメチルホルムアミド

であり、ＰＶＡは蒸留水を用いた。それぞれ60℃にて乾燥後、真空下脱気し、残留溶媒を除いた。また、ポリプロピレン試料は、三菱油化（株）にて添加剤を加えずに作成されたものを用いた。各試料は製膜後、エチルアルコール及び蒸留水に浸せきし洗浄した後、十分乾燥し、直径15.7mmの円形に切取り、外形15.8mm、内径12.0mmのテフロンリングにてFALCON 3047 MULTIWELL ™ Tissue Culture Plate のWellの底に固定し、25kGyのガンマ線照射により滅菌した。又、Clture Plate にテフロンリングのみを固定したものを対照試料 （ Blank control ）とした。テフロンリングの寸法は、図２－１に示した。　各試料は、ＥＳＣＡ分析を行い、残留溶媒、不純物がないことを確認した。また、L929細胞を用いた培養実験を行ったが、各試料において増殖率に有意な差はみられなかった。

２－２－２　実験に用いた動物

近交系マウスC57BL/10 (B10)の雌を用いた。　マウスは、 the Shizuoka Laboratory Animal Cooperatipon, Hamamatu Shizuoka Prefecture, Japan.より購入し、Specific pathogen free (SPF)で飼育されたものを使用した。

２－２－３　実験に用いた培養液

細胞の洗浄、および短時間の維持には、Ｈａｎｋｓ平衡塩溶液（ＨＢＳＳ）を用いた。組成は次の通りであった（mg/L）。　$CaCl_2$:140.0,　KCl:400.0, $KH_2PO_4$:60.0,　$MgSO_4$:97.68,　NaCl:8000,　$NaHCO_3$:350.0,　$Na_2HPO_4$:47.68, Glucose:1000, Phenol Red 10.0

細胞の培養にはＲＰＭＩ－１６４０培地を用いた。これに10%の牛胎児血清（Fetal calf serum: FCS), penicillin (100U/ml), streptomycin ( 100μg/ml), 2-mercaptoethanol ($2\times10^{-6}$M/ml)を加えたものを培養に使用した。

２－２－４　リンパ球の調整

近交系マウスC57BL/10 (B10)♀を脱血、屠殺し、脾臓を無菌的に取り出した。脾臓をＨＡＮＫＳ溶液中でホモジナイザーですり潰し、結合組織を取り除いた。赤血球は塩化アンモニウムトリス緩衝液で溶血させて除いた。その後、細胞をＨＡＮＫＳで２回洗浄し、10%FCS含ＲＰＭＩ－１６４０培養液に浮遊させ、トリパンブルーを用いた色素排除試験により、細胞数を算定し、細胞数を$2\times10^6$

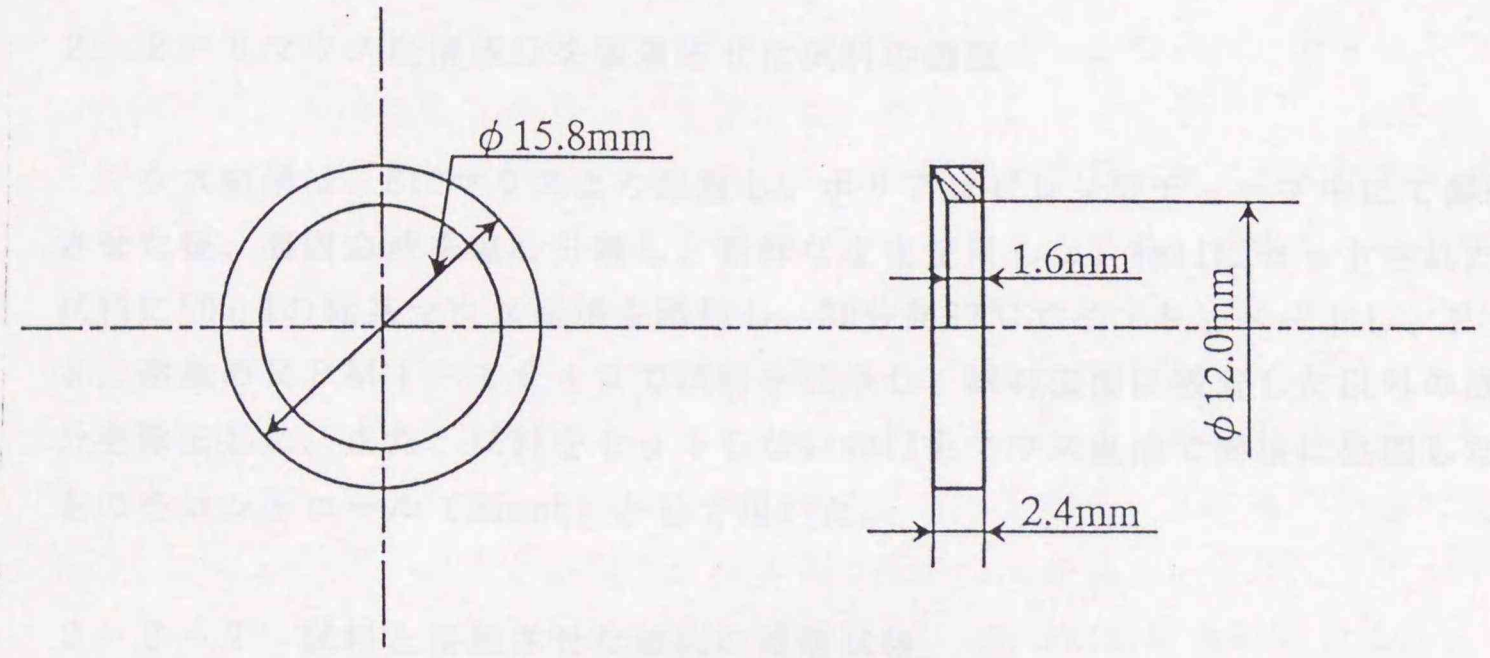



図２－１　テフロンリングの概略図

個/mlに調整した。

2－2－5使用したマイトジェン

Concanavalin A（ Con A ; Sigma Cemical Co., St.Louis, MO, U.S.A)), Phytohemagglutin ( PHA ; Difo Laboratories, Detroit, MI, U.S.A), Lipopoliysaccharide(LPS;Difo Laboratories,Detroit,MI,U.S.A)を用いた。系に加える各マイトジェン濃度は、予備実験の結果得られた至適濃度（ Con A：5μg/ml、PHA：1μl/ml、LPS：5μg/ml）を用いた。

2－2－6マウス血清成分を吸着させた試料の調整

マウス血清は、B10マウスより採取し、ポリプロピレン製チューブ中にて凝固させた後、凝固血液を遠心分離し、新鮮なまま使用した。Wellにセットされた試料に50μlの同系マウス血清を添加し、30分間37℃でインキュベートし、ＦＣＳ非添加のＲＰＭＩ－１６４０で試料を洗浄し、試料表面に吸着した以外の成分を除去した。また、試料をセットしないwellをマウス血清で同様に処理したものをコントロール（Blank）として用いた。

2－2－7　試料と接触させた細胞の増殖試験

２×１０$^{6}$個/mlに調整した細胞浮遊液2mlを各wellに蒔き、800rpmで5分間遠心し、リンパ球を試料へ沈降させた後、炭酸ガス培養器内において37℃で2時間培養した。次に細胞をpipettingにより試料から分離、浮遊させ、その細胞浮遊液を96well平底マイクロプレートに100μlずつ分注した。各マイトジェン溶液を100μl加え、４８時間培養した。その後、$^{3}$H-thymidine 0.5μCi/mlを20μl加えパルスし、１８時間培養した後、グラスフィルター上にハーベストした。測定は液体シンチレーションカウンターを用いて行った。

2－2－8　培養後の細胞数の計測

細胞の計数は、ライツ社製蛍光顕微測光装置ＭＴ－２によって行った。試料と接触させた後、分離、浮遊させた細胞浮遊液をグライナー社製ＭＴ－２用プレートに20μlずつ分注した。細胞を遠心沈降させ、1% NP-40を5μl加え、その後、EtBr（ethidium bromide）溶液を5μl加え遠心し細胞を染色した。溶液中

の残光を消すために牛ヘモグロビン30%溶液を 20μl加え、遠心後ＭＴ－２によりその蛍光強度を測定した。

２－２－９　生細胞と死細胞の比率の測定

培養後の細胞をPI(propidium iodide)により染色後、フローサイトメトリーにより測定し、その生細胞と死細胞の割合を計測した。

２－２－１０　ナイロンウール精製Ｔ細胞による細胞増殖能の測定

脾臓リンパ球浮遊液をナイロンウールカラムに通すことにより、ナイロンウール非吸着性脾臓細胞を調整し、実験に用いた。

ナイロンウール（旭化成製）は、蛋白除去、脱脂のため一晩１規定塩酸に浸漬させた。その後、蒸留水に３日間浸漬し、洗浄した。まお、蒸留水は、各日２～３回交換した。ナイロンウールは乾燥後、30ccディスポーザブルシリンジに、詰め込み、オートクレーブを用い120℃35分の条件で滅菌した。

細胞精製には、ナイロンウールカラムにＨＢＳＳを加え、繊維間にある空気を抜いた。続いて、ＨＢＳＳを５％ＦＣＳを含むＲＰＭＩ－１６４０培地で置換し、ナイロンウールが、培養液で浸された状態にしたまま、３７℃でプレインキュベートした。その後、$0.5\times10^{8}$個/mlに調整した細胞浮遊液を加え、１時間細胞をカラムの中にいれたまま、３７℃にてインキュベートした。その後シリンジ下端に付けてある３方活栓を開き、カラムから出てくる細胞浮遊液を得た。細胞の分画はＦＡＣＳでの測定の結果、96%以上表面ガンマグロブリン陰性細胞であった。この細胞を$2\times10^{6}$個/mlに調整し、２－２－６で示した方法により培養を行ない、増殖能の測定を行なった。

２－２－１１　試料接触２時間後のリンパ球サブポピュレーション

細胞を２時間試料と接触後の細胞表面抗原をフローサイトメトリーにより解析した。染色方法については、第３章で述べた。

２－２－１２　細胞接着状態のＳＥＭ観察

試料と細胞を２時間接触後の試料上での細胞付着形態を走査型電子顕微鏡で観察した。試料の固定方法は次の通りであった。

2時間培養後の試料をwell内で37℃ＨＢＳＳで３回洗浄した。ＨＢＳＳ除去後、１％グルタルアルデヒド（0.15M燐酸緩衝液，pH7.4,440mOsm,37℃）で室温にて１時間固定した。液を除去し次に2.5%グルタルアルデヒド（0.1M 燐酸緩衝液，pH7.4,490mOsm,4℃）で４℃にて９時間固定した。ＨＢＳＳで３回洗浄後、２５％×２，５０％，７５％，８０％，９０％，９５％，９７．５％，１００％×２ のエタノール系列でそれぞれ２０分間ずつ脱水を行った。その後臨界点乾燥機にて乾燥、試料を金蒸着後、走査型電子顕微鏡（ＳＥＭ）にて観察を行った。

## ２－３　結果

### ２－３－１　マイトジェン刺激後の細胞数変化に与える試料接触の影響

#### ２－３－１－１　Con A刺激系

細胞と高分子材料を２時間接触させたのち、pipettingにより細胞を回収した。このときの細胞浮遊液の濃度は、細胞計数板による測定では、各試料、コントロールにおいて培養前のものと変わらず、ほぼ全ての細胞が回収されたと考えられた。

マイトジェン刺激後の細胞数は、蛍光顕微測光装置ＭＴ－２を用いて計測したが、本実験に用いたマウスリンパ球と蛍光強度の関係を図２－２に示した。この結果に基づき、最小自乗法により、培養後の細胞数を算出した（図２－３）。試料をマウス血清で処理しなかった場合（ms-）、コントロールではその総細胞数は、$1.67\times10^{6}$個/mlで、培養開始前の細胞数$1\times10^{6}$個/mlに較べ、若干の増加がみられた（図２－３a)。また、ＰＭＭＡ，ＰＡＮ，ＰＰに接触させたリンパ球においても、コントロールと同程度の細胞数増加が認められた。一方、ＣＡ試料と接触させたリンパ球では　$1.28\times10^{6}$個/mlであり、増加の割合は減少し、ＰＶＡ接触リンパ球においては、$1.07\times10^{6}$個/mlで、全く細胞数の増加が認められなかった。従ってＣＡ，ＰＶＡとの接触がリンパ球に何らかの影響を与えることが明かとなった。　一方、試料を予めマウス血清で処理した場合においては（ms+）、回収細胞数はいずれも培養前よりも増加した。また、各試料と接触したリンパ球をコントロール（ $1.42\times10^{6}$ 個/ml）と比べると、ＰＶＡを除いては細胞数の微増がみられたが、統計的な有意差は棄却され、試料間の相違は認められなかった。

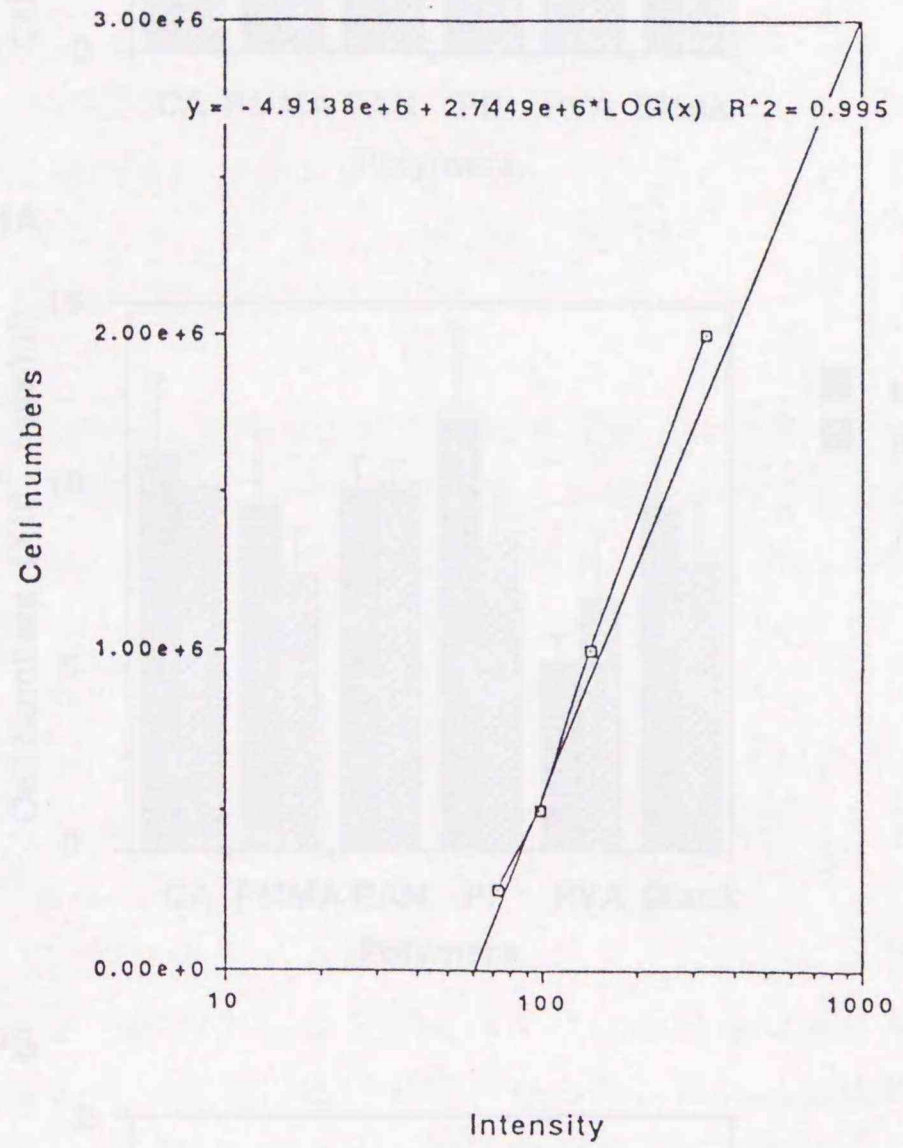
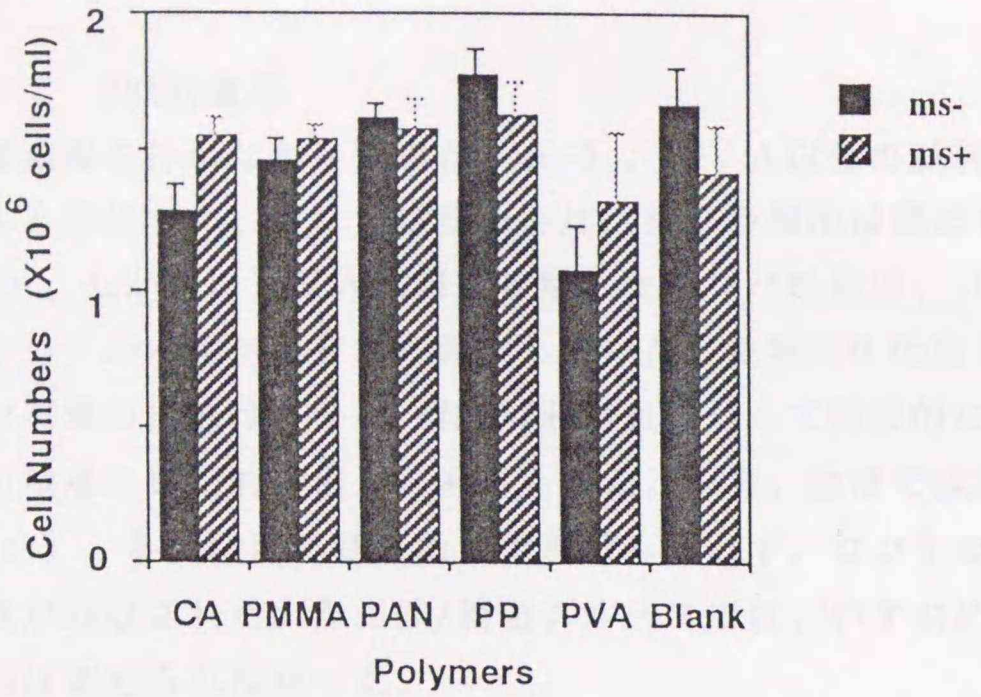
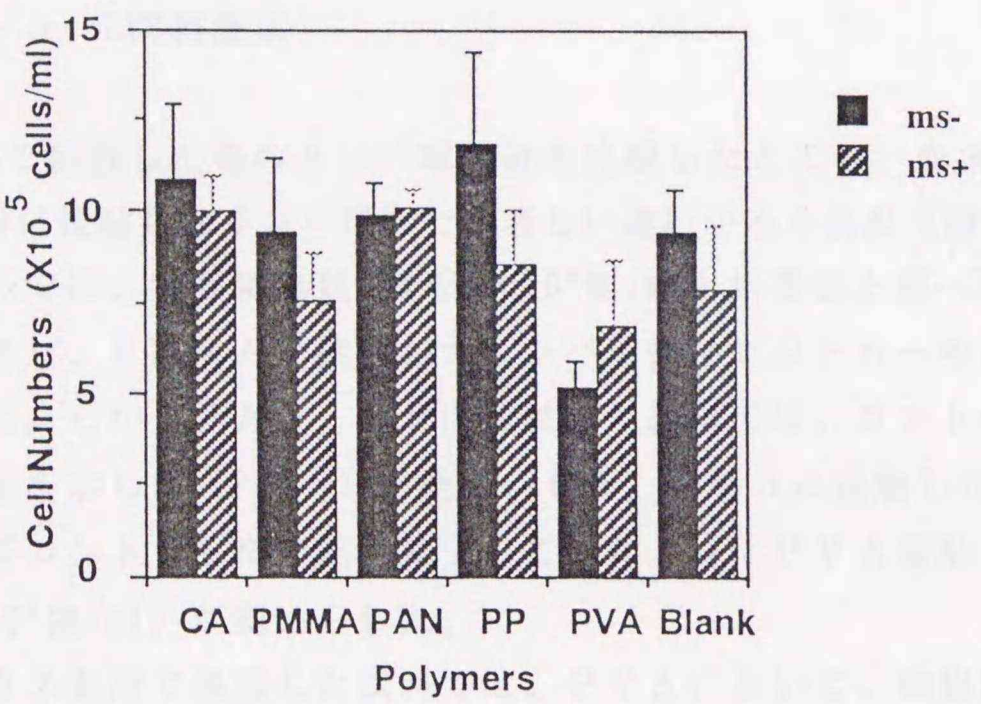



図２－２　MT-2 による蛍光強度と細胞数の関係

(a) Con A




(b) PHA




(c) LPS

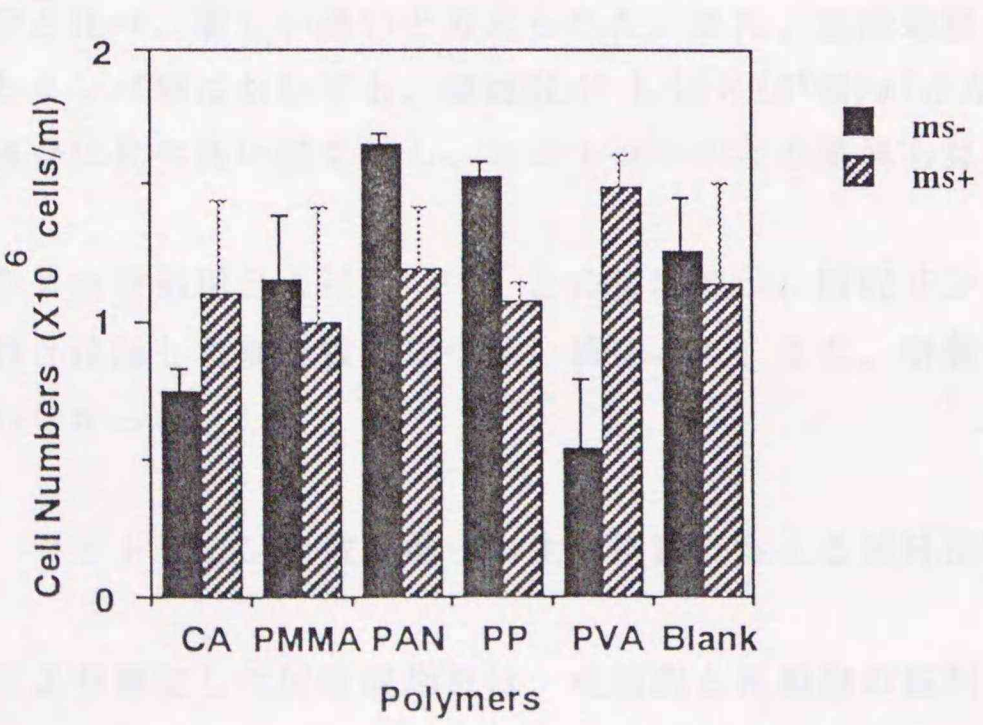



図２－３　各材料との培養初期２時間の接触が48時間後の総細胞数に及ぼす影響

ms-：マウス血清非処理，ms+：マウス血清処理

2－3－1－2　PHA刺激系

試料の血清処理を行わなかった場合（ms-）、ＰＶＡ以外の試料では細胞数はコントロールと差はなく、また、培養前と比べ有意の増加は認められなかった（図２－３b）。しかし、ＰＶＡ試料と接触したリンパ球数は、$0.52\times10^6$個/mlと、コントロールと比べて有意に減少していた（危険率0.05以下）。従って、ＰＶＡとリンパ球の接触は、リンパ球のPHA刺激に対して障害的に働くか、またはリンパ球の増殖に抑制的に働くと考えられた。一方、血清で試料を処理した場合には（ms+）、各試料間に統計的に差異はみられず、コントロールと同じレベルの細胞数が回収された。ただPHA刺激グループでは、いずれにおいても有意の細胞数増加は認められなかった。

2－3－1－3　LPS刺激系

次に、LPSで刺激した後のリンパ球の数を比較したところ、血清処理を行わなかった各試料に接触したリンパ球間では著しい違いがみられた（図２－３c）。コントロールでは、回収細胞数は$1.26\times10^6$個/mlと培養前と較べ若干の増加がみられた。また、ＰＭＭＡと接触したリンパ球数はコントロールと差異が認められなかった。しかしＰＡＮ，ＰＰに接触した細胞では、コントロール試料に比較し高い値を示した（$P<0.1$）。逆に、ＣＡ，ＰＶＡに接触したリンパ球数は、培養前およびコントロールに比べ減少していた。特にＰＶＡ接触では著しい減少（$0.54\times10^6$個/ml）が認められた。

一方、マウス血清で処理した試料では、ＰＶＡにおいて、細胞数の増加が見られた（$1.49\times10^6$個/ml）。この増加はマウス血清非処理ＰＶＡと接触したリンパ球の減少と比べ、著しい違いと考えられた。また、血清処理されたＣＡ試料と接触したリンパ球においても、細胞数が $1.10\times10^6$個/mlとなり、マウス血清非処理の場合に比べ高い値を示し、コントロールとの差異も見られなくなった。

一方、マウス血清処理ＰＡＮ，ＰＰ との接触では、回収リンパ球数は、血清非処理試料と接触した細胞数に比べ低い値をとり、また、培養前と比べても増加はみられなかった。

2－3－2　マイトジェン刺激細胞中の生細胞数に与える試料接触の影響

ＭＴ－２により測定した回収細胞数は、生細胞と死細胞の総和である。そこ

表２－１　４８時間培養後の生細胞と死細胞の割合（％）

| POLYMERS | | | CA | PMMA | PAN | PP | PVA | Blank |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| MITOGEN | MS | | | | | | | |
| Con A | - | LIVE | 20 | 35 | 35 | 42 | 17 | 45 |
| | | DEAD | 80 | 65 | 65 | 58 | 83 | 55 |
| | + | LIVE | 35 | 38 | 34 | 47 | 39 | 41 |
| | | DEAD | 65 | 62 | 66 | 53 | 61 | 59 |
| PHA | - | LIVE | 19 | 24 | 24 | 23 | 11 | 24 |
| | | DEAD | 81 | 76 | 76 | 77 | 89 | 76 |
| | + | LIVE | 25 | 26 | 25 | 27 | 24 | 24 |
| | | DEAD | 75 | 74 | 75 | 73 | 76 | 76 |
| LPS | - | LIVE | 18 | 50 | 46 | 60 | 14 | 52 |
| | | DEAD | 82 | 50 | 54 | 40 | 86 | 48 |
| | + | LIVE | 47 | 52 | 55 | 55 | 51 | 44 |
| | | DEAD | 53 | 48 | 45 | 45 | 49 | 56 |

表２－２　４８時間培養後の生細胞数及び死細胞数

| POLYMERS | | | CA | PMMA | PAN | PP | PVA | Blank |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| MITOGEN | MS | | CELL NUMBERS(×$10^5$cells/ml) | | | | | |
| Con A | - | LIVE | 2.56 | 5.18 | 5.71 | 7.48 | 1.82 | 7.52 |
| | | DEAD | 10.2 | 9.49 | 10.6 | 10.3 | 8.88 | 9.19 |
| | + | LIVE | 5.43 | 5.85 | 5.41 | 7.71 | 5.15 | 5.82 |
| | | DEAD | 10.1 | 9.55 | 10.5 | 8.69 | 8.05 | 8.38 |
| PHA | - | LIVE | 2.07 | 2.26 | 2.38 | 2.74 | 0.57 | 2.26 |
| | | DEAD | 8.83 | 7.14 | 7.52 | 9.16 | 4.63 | 7.14 |
| | + | LIVE | 2.50 | 1.98 | 2.53 | 2.30 | 1.63 | 2.04 |
| | | DEAD | 7.50 | 5.62 | 7.58 | 6.21 | 5.17 | 6.46 |
| LPS | - | LIVE | 1.35 | 5.75 | 7.59 | 9.24 | 0.76 | 6.55 |
| | | DEAD | 6.15 | 5.75 | 8.91 | 6.16 | 4.64 | 6.05 |
| | + | LIVE | 5.17 | 5.15 | 6.55 | 6.30 | 7.60 | 4.97 |
| | | DEAD | 5.83 | 4.75 | 5.36 | 4.82 | 7.30 | 6.33 |

で生細胞実数を得るため、フローサイトメトリーにより生細胞と死細胞の割合を測定した。その結果を表２－１に示した。またその個数を表２－２に示した。表から明らかなように、Con A, PHA, LPSいずれのマイトジェンで刺激した細胞群においても、試料をマウス血清で処理しなかった場合、ＣＡとＰＶＡ試料に接触した細胞では、ほかの試料に接触したものと比べ死細胞の割合が高く、生細胞の割合の著しい減少がみられた。他の試料（ＰＭＭＡ，ＰＡＮ，ＰＰ）ではコントロールと同等の生存率を示した。しかし、試料をマウス血清で前処理することにより、ＣＡ，ＰＶＡ試料においても細胞の死亡率が減少し、コントロールと差がなくなることが明らかになった。

### ２－３－３　マイトジェン刺激後の細胞増殖能に与える試料接触の影響

#### ２－３－３－１　Con A刺激系

Con A刺激後の増殖能を図２－４aに示した。マウス血清で試料を処理しない場合（ms-）、ＣＡ試料、ＰＶＡ試料と接触した細胞では、コントロール及び他の試料に比べ$^{3}$H-thymidineの取り込みが顕著に低かった（$P<0.05$）。他の試料では、コントロールと比べて差は認められなかった。一方、試料を予めマウス血清で処理した場合、いずれの試料と接触した場合も、コントロールと同等の値を示した。

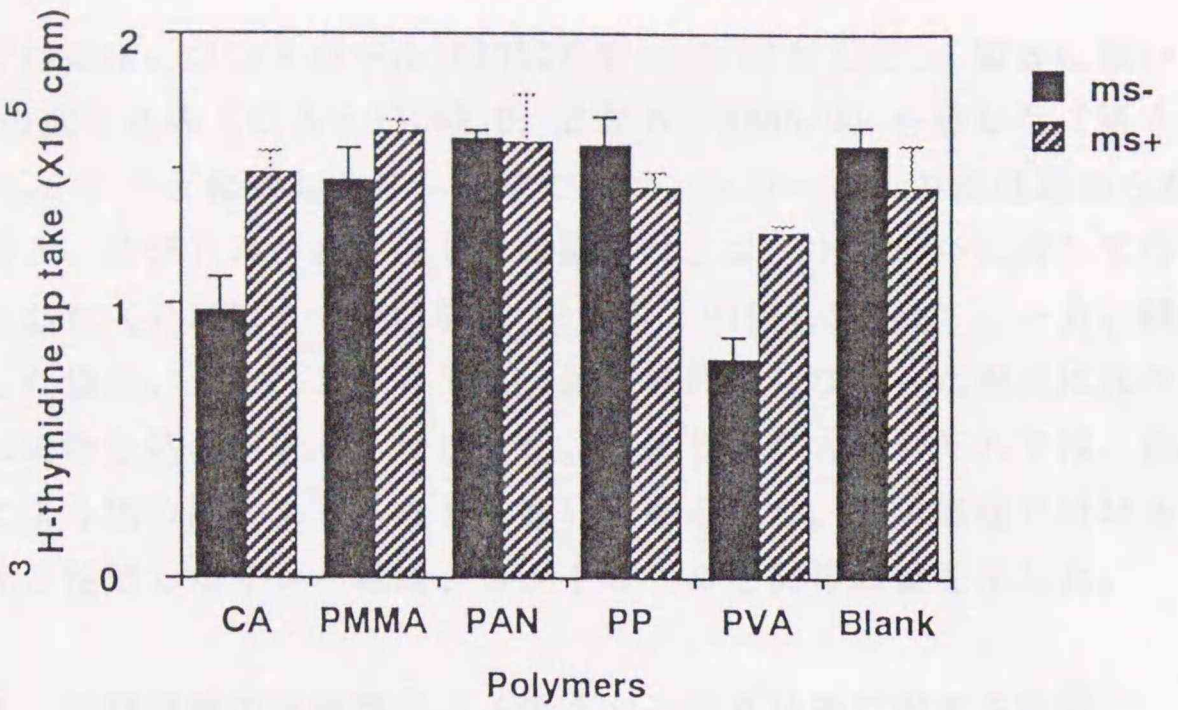
#### ２－３－３－２　PHA刺激系

PHA刺激群でも、高分子材料を血清処理しない場合、ＣＡと接触した細胞はコントロール（34790.3 cpm）と比較して、有意に低い$^{3}$H-thymidineの取り込み量（14265.3 cpm）を示した（図２－４b）。逆に、ＰＶＡ試料と接触した細胞はコントロールに比べむしろ高い値を示した（48737.7 cpm）。この点は、Con A刺激の場合と較べ顕著な差と考えられた。他の試料では、いずれもコントロールと有意の差は認められなかった。一方、試料を血清で予め処理すると、コントロール（32825.3 cpm）に対してＰＰ，ＰＶＡと接触したものがやや高い傾向を示したが、各試料間で顕著な差は認められなかった。

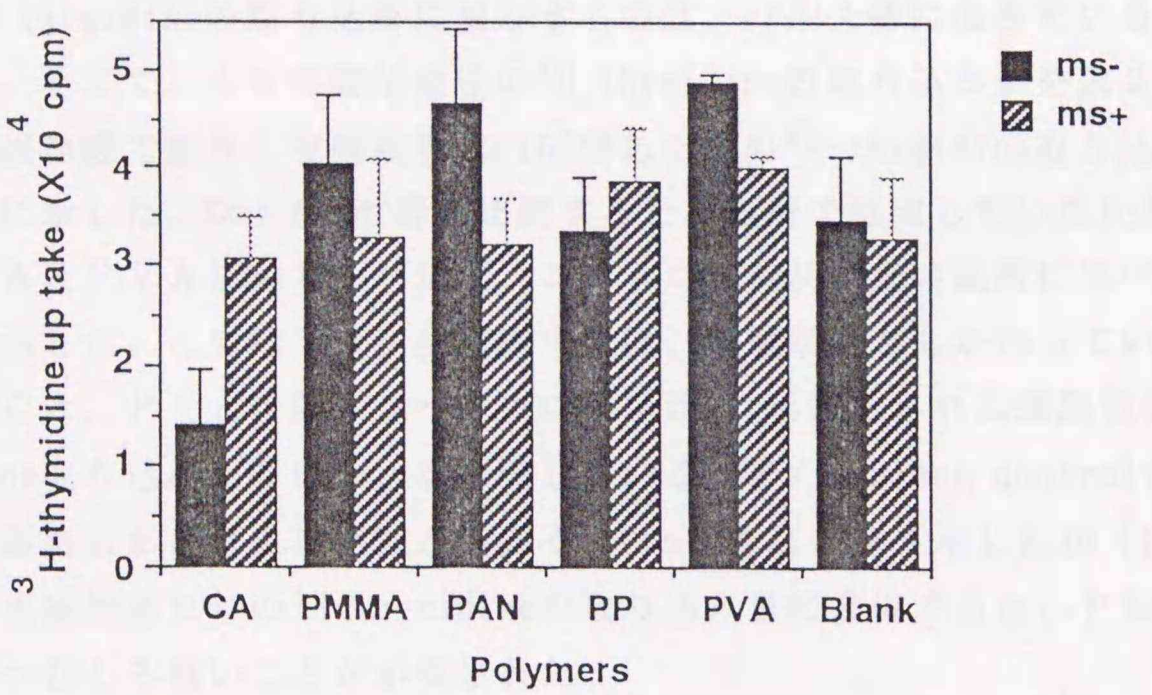
#### ２－３－３－３　LPS刺激系

次にLPS刺激群を比較すると、血清処理をしない場合、ＣＡまたはＰＶＡと接

(a) Con A




(b) PHA




(c) LPS

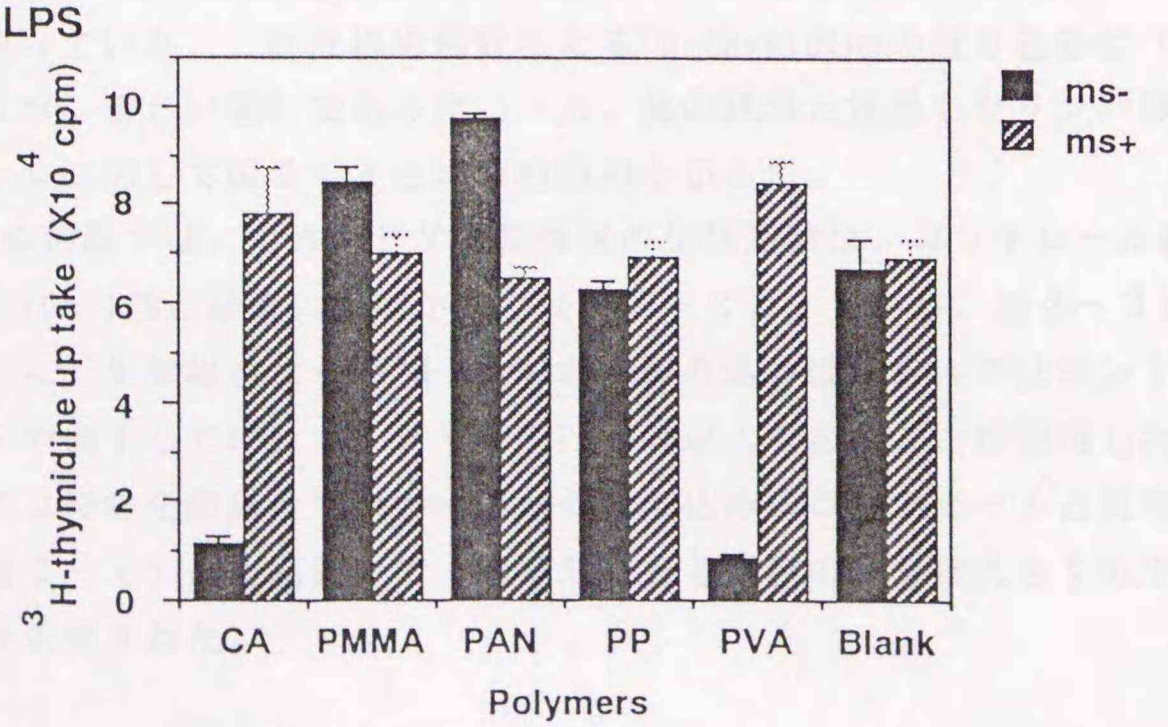



図２－４　各材料との培養初期２時間の接触が48時間後における細胞内への$^{3}$H-thymidine取り込み量に及ぼす影響
ms-：マウス血清非処理，ms+：マウス血清処理

触したリンパ球は、コントロール（67227.7 cpm）に対して、顕著に低い $^{3}H$-thymidineの取り込み（ＣＡ：11252.0，ＰＶＡ：8885.0）を示した（図２－４c）。しかし、ＰＰと接触したリンパ球ではコントロールとの差は認められず、またＰＭＭＡ、及びＰＡＮと接触した細胞では、コントロールに対してむしろ高い値を示した（ＰＭＭＡ：84616.0，ＰＡＮ：97971.3 cpm）。一方、試料を血清処理した場合、ＣＡ，ＰＶＡでは、血清処理をしなかった場合に比べ、$^{3}H$-thymidineの取り込みが著しく増加した。つまり、ＣＡとＰＶＡでは、血清成分の存在により他の試料よりもむしろ高い値を示した。血清処理ＰＭＭＡ，ＰＰ，ＰＡＮと接触したリンパ球は、コントロールと同等の値を示した。

２－３－４　試料接触の生細胞によるチミジン取り込みに対する影響

細胞の$^{3}H$-thymidineの取り込みに関与するのは、パルス時に生きている細胞のみである。そこで、４８時間培養後の$^{3}H$-thymidineの取り込み値を表２－２に示した生細胞数で割り、生細胞数$1\times10^{5}$個あたりの$^{3}H$-thymidine取り込み値を表２－３に示した。Con A刺激群を比較すると、血清で処理していない試料において、ＣＡとＰＶＡ接触リンパ球は、コントロール及び他の試料に比べむしろ高い値を示した。この結果は、生細胞中では、増殖期にさしかかっている細胞の割合がＣＡ，ＰＶＡ接触リンパ球中に多いか、活性化された細胞当たりの$^{3}H$-thymidine取り込みが多いことを示唆している。また、Blank controlおよびＰＰは、総細胞数および生細胞数とも多く、cpm値も高い値を示したが（図２－４）、単位生細胞あたりの$^{3}H$-thymidineの取り込み量に換算すると、ＰＭＭＡ，ＰＡＮと較べむしろ低いことが示唆された。

PHAによる刺激においては、ＣＡと接触した生細胞の増殖能は低下していた。これに対してＰＶＡでは、生細胞の$^{3}H$-thymidineの取り込みはコントロールを顕著に上回っていた。これは総細胞数による$^{3}H$-thymidineの取り込みに（図２－４）くらべ、著しい違いであった。一方、他の試料と接触したリンパ球では、コントロールに対して図２－４と同等の傾向を示した。

LPSによる刺激では、ＣＡ，ＰＶＡ接触後の生細胞数は、コントロールに比べてそれぞれ20%,12%と顕著に少なかった（表２－２）。しかし、表２－３から明らかなように、生細胞当たりの$^{3}H$-thymidine取り込みは、ＣＡではコントロールに比べやや低下していたが、ＰＶＡでは同等以上であることが判明した。一方、ＰＰでは接触全細胞の$^{3}H$-thymidineの取り込みはコントロールと同等であったが（図２－４）、生細胞中で、増殖期にある細胞の割合は大きく低下していることが示唆された。

表２－３　生細胞数により規格化した細胞増殖能

| POLYMERS | | | CA | PMMA | PAN | PP | PVA | Blank |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| MITOGEN | MS | | 3H-TDR uptake ($\times 10^4$cpm/($1\times 10^5$cells/ml)) | | | | | |
| Con A | - | LIVE | 3.75 | 2.86 | 2.83 | 2.13 | 4.38 | 2.12 |
| | + | LIVE | 2.73 | 2.82 | 2.97 | 1.87 | 2.41 | 2.45 |
| PHA | - | LIVE | 0.60 | 1.77 | 1.96 | 1.21 | 6.41 | 1.81 |
| | + | LIVE | 1.23 | 1.66 | 1.30 | 1.67 | 2.42 | 1.76 |
| LPS | - | LIVE | 0.83 | 1.45 | 1.29 | 0.68 | 1.14 | 1.01 |
| | + | LIVE | 1.47 | 1.30 | 0.99 | 1.17 | 1.11 | 1.35 |

以上よりマイトジェン刺激前に高分子試料に接触した細胞群では、総細胞数、生細胞数、全体の$^{3}$H-thymidineの取り込み量、生細胞の中での増殖期にある細胞の割合などをパラメータにした場合、種々の細胞機能の変調が現れることが示唆された。

### 2－3－5　ナイロンウール非付着細胞の増殖能に対する影響

ナイロンウール非付着性細胞を血清成分で処理をしていない試料と接触後、マイトジェン刺激した結果を図2－5に示した。Con A,PHAいずれの刺激によっても、ＣＡと接触した細胞ではBlank controlと比較して増殖能の著しい低下がみられた。一方、ＰＶＡと接触した細胞においては、Con A刺激による増殖反応は軽度の低下、PHA刺激の場合は、他の試料と接触した細胞に比べ著しい増加がみられた。ＰＡＮと接触した細胞では、LPS刺激のもとでのみ細胞増殖能の低下がみられた。ナイロンウール非付着細胞の大部分はＴ細胞（＞96%）であるが、少数含まれるＢ細胞によってLPSに対する有意の反応がみられた（図2－5c）。このLPSに対する反応を各試料接触群で比較すると、ＣＡ，ＰＡＮ，ＰＶＡで抑制がみられた。特に、Con A,PHA反応においても低下の認められたＣＡによってLPS反応はほぼ完全に抑制された。ＰＭＭＡ，ＰＰにおいては、すべてのマイトジェン刺激群においてControlとほぼ同程度の増殖能を示した。

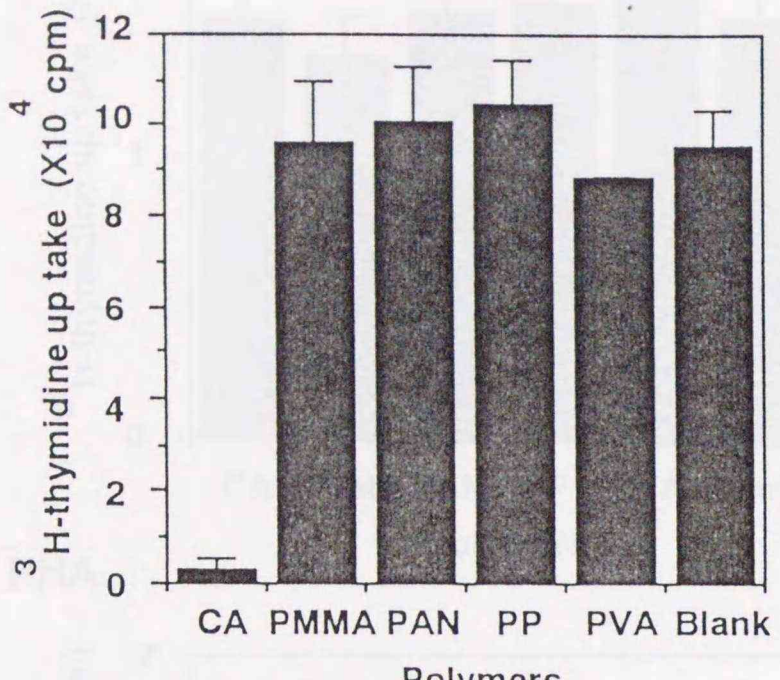
### 2－3－6　試料と接触した血清上清成分による細胞増殖能に対する影響

試料と接触した血清上清による、細胞のマイトジェン反応への影響を検討した。血清上清は試料に37℃30分間で接触させた後、培養液を加え希釈回収した。マウス血清の細胞浮遊液中での最終濃度は、1.25%であった。この試料と接触した血清を加え、マイトジェン刺激培養後の細胞増殖能を調べた結果を図2－6に示した。Con A及びLPSによる刺激では、試料間の差は認められなかった。しかしながらPHAによる刺激では、ＰＶＡと接触した血清上清の入っている培養液中で培養した細胞において、増殖能の増加がみられた。

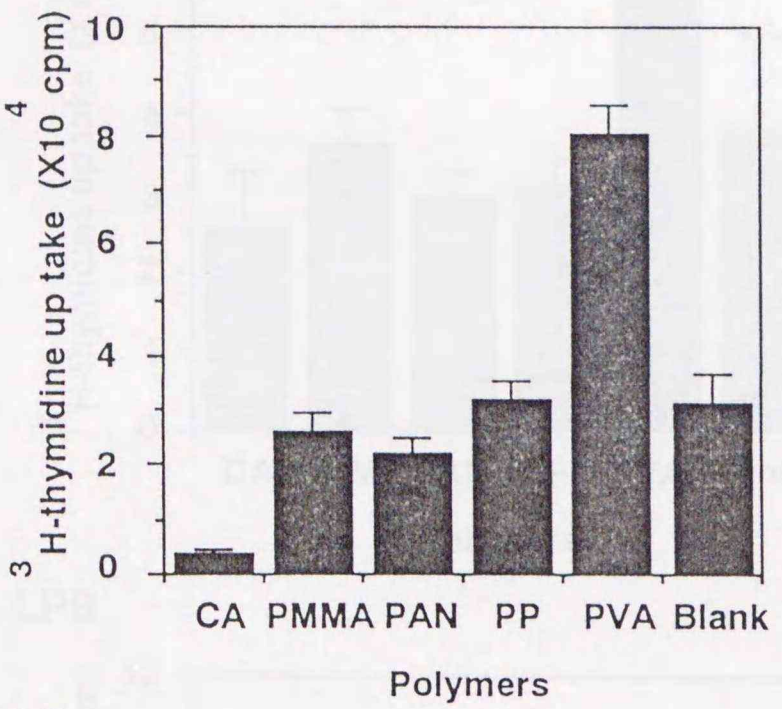
### 2－2－7　試料接触2時間後の細胞の状態

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、2時間接触後の細胞をトリパンブルー色素排除試験により生細胞と死細胞に分類した結果を表2－3に示した。ＣＡ試料のみ顕著に死細胞数の

(a) Con A




(b) PHA




(c) LPS

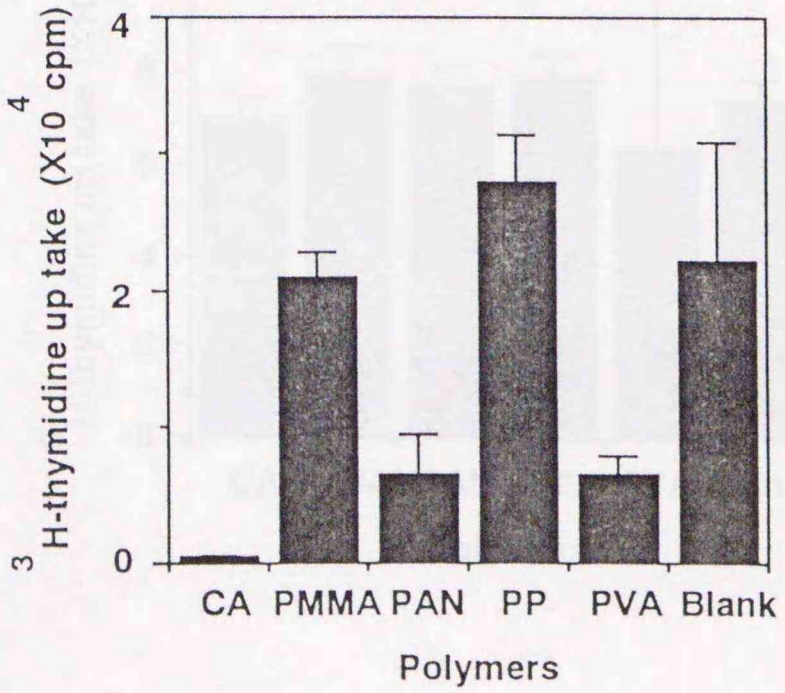



図２－５　各材料との培養初期２時間の接触がナイロンウール非付着細胞の増殖能に及ぼす影響

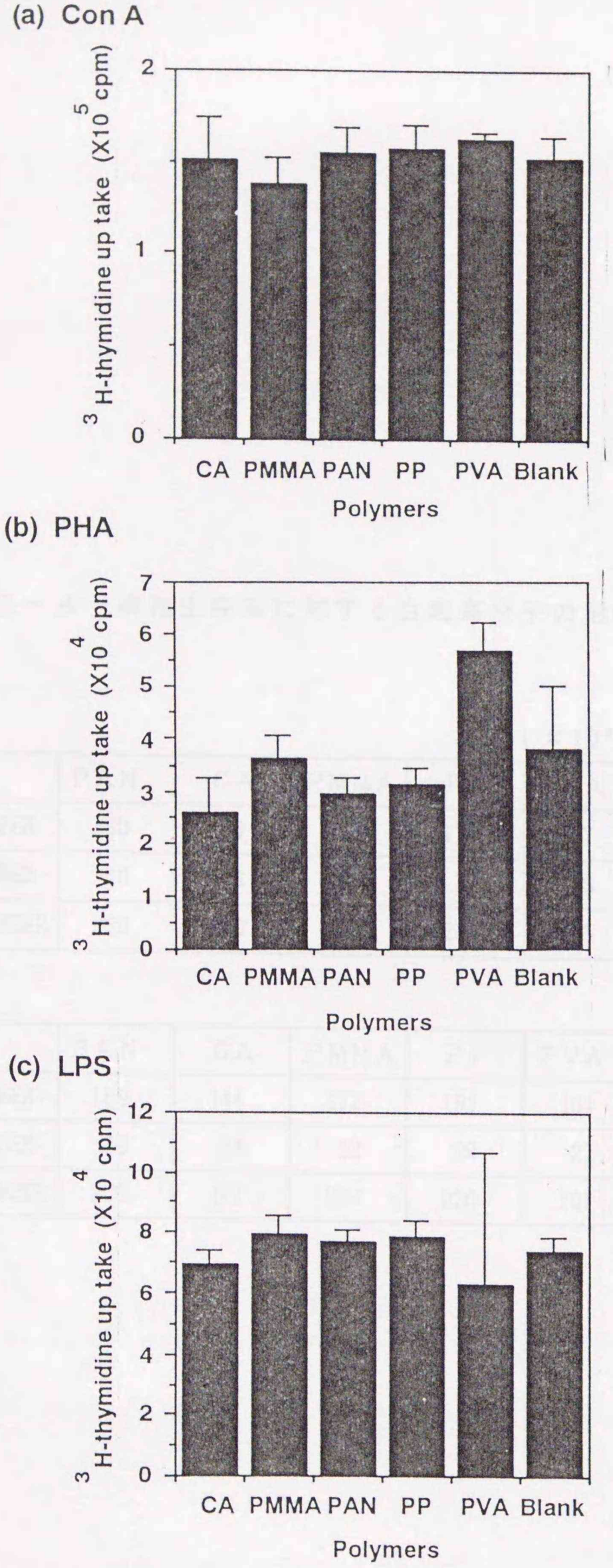



図２－６　試料と接触した血清の細胞内への$^3$H-thymidine取り込み量に及ぼす影響

表２－４　細胞生存率に対する合成高分子の影響

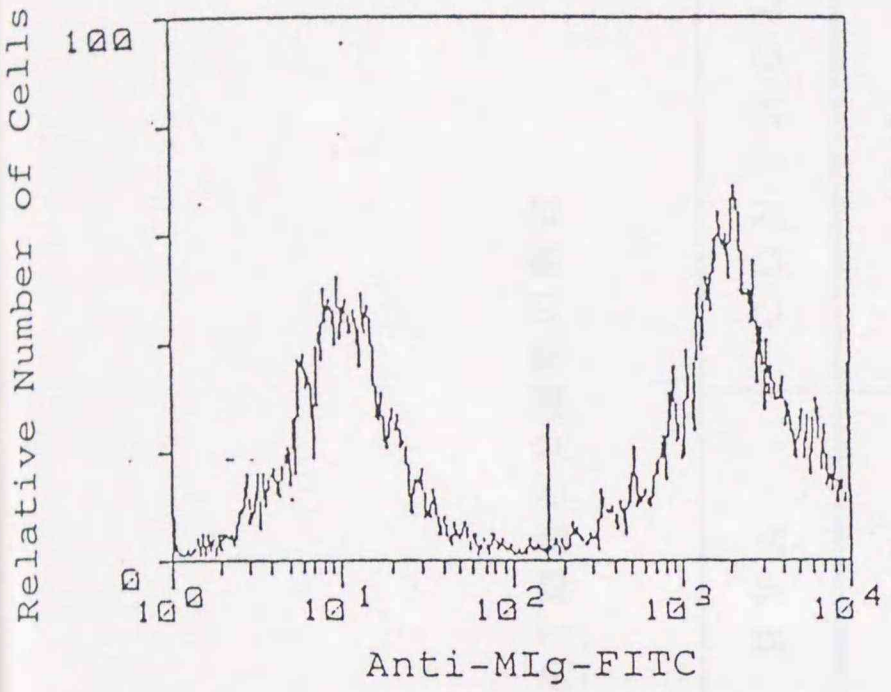
SERUM FREE

（×10⁴cells/mℓ）

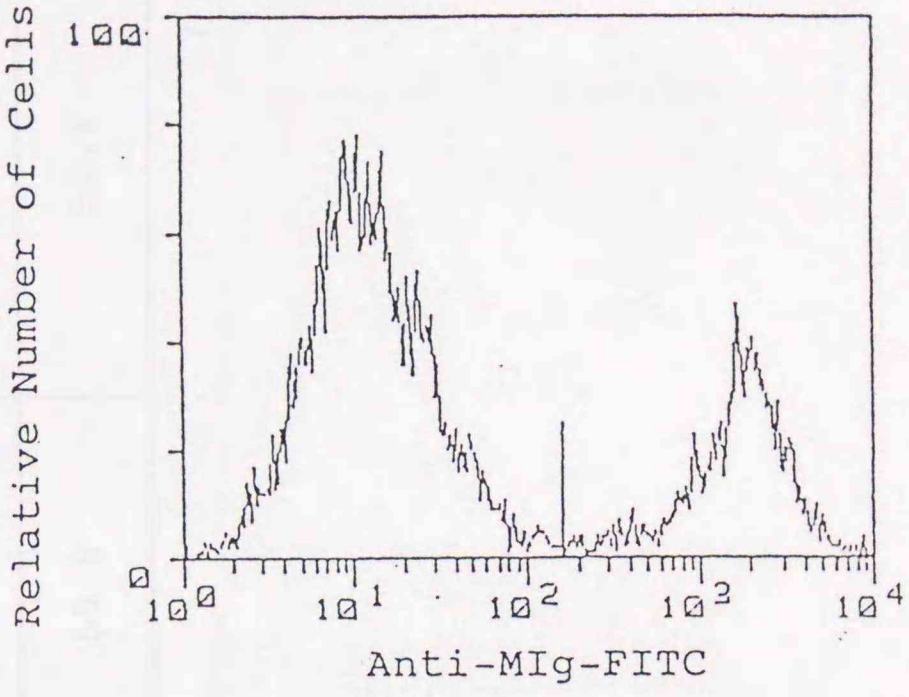
| | PAN | CA | PMMA | PP | PVA | Control |
|---|---|---|---|---|---|---|
| LIVE CELL NUMBER | 180 | 73 | 157 | 174 | 177 | 173 |
| DEAD CELL NUMBER | 40 | 113 | 37 | 37 | 28 | 32 |
| TOTAL CELL NUMBER | 220 | 186 | 194 | 211 | 205 | 205 |

WITH SERUM

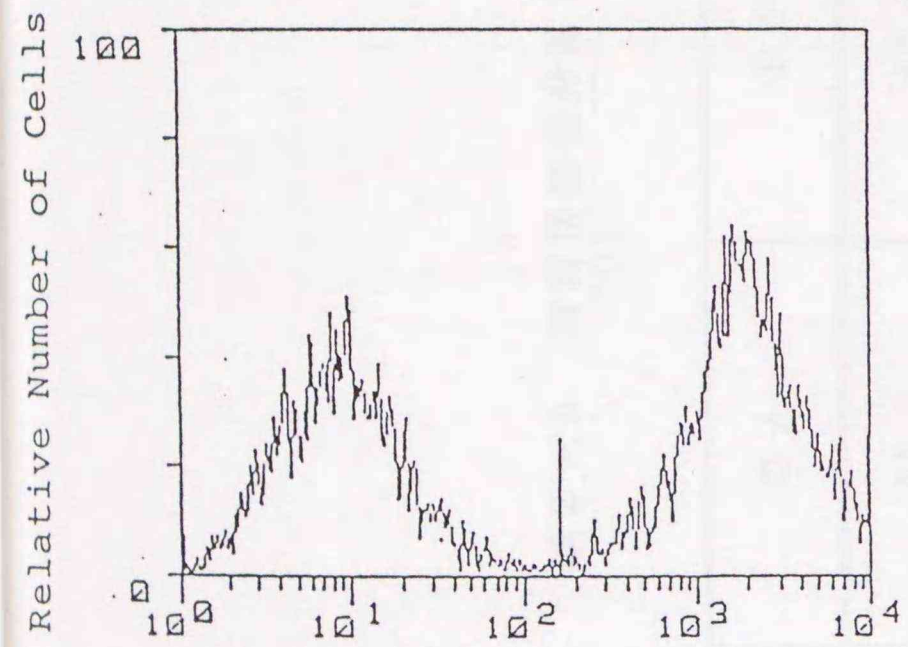
| | PAN | CA | PMMA | PP | PVA | Control |
|---|---|---|---|---|---|---|
| LIVE CELL NUMBER | 169 | 144 | 172 | 191 | 164 | 172 |
| DEAD CELL NUMBER | 39 | 34 | 32 | 29 | 27 | 39 |
| TOTAL CELL NUMBER | 208 | 177 | 204 | 220 | 191 | 211 |



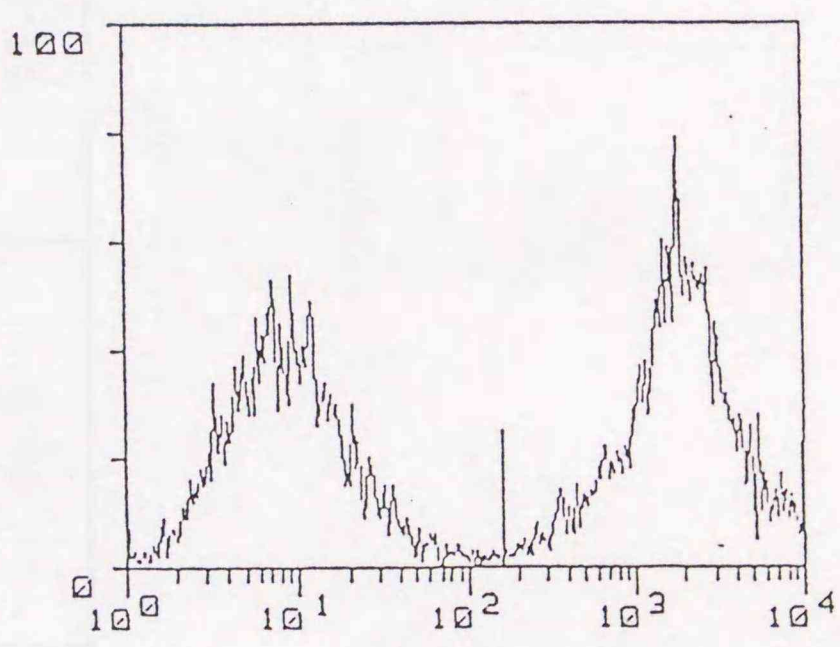

PP




CA




PVA



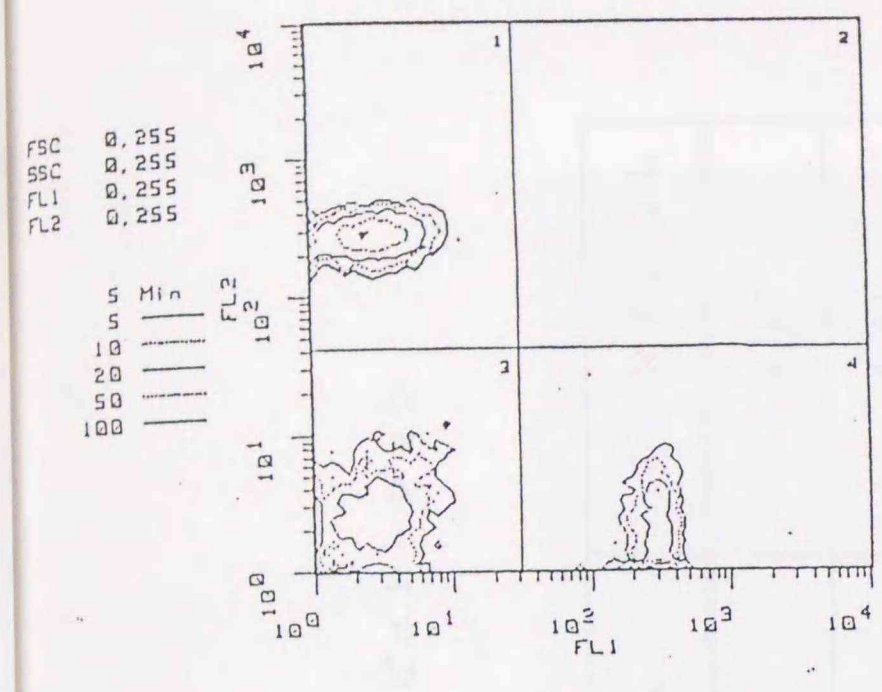

CONTROL

図２－７　材料に接着後分離したリンパ球における表面Ｉｇ抗原の分布

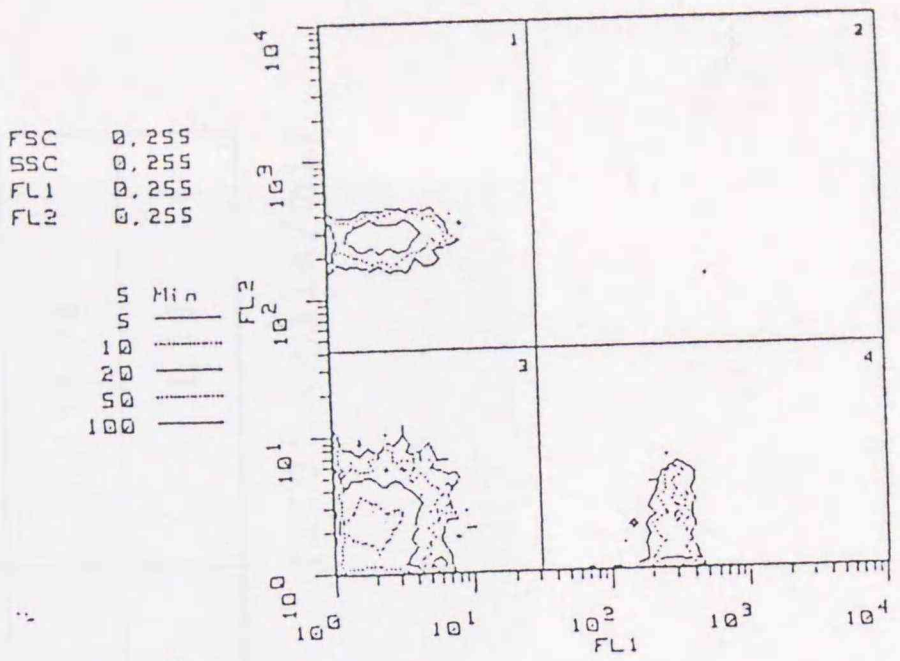
表２－５　材料接触後分離したリンパ球のＴ細胞とＢ細胞の割合

| 試料 / 細胞 | ＣＡ | ＰＰ | ＰＶＡ | ＣＯＮＴＲＯＬ |
|---|---|---|---|---|
| Ｔ細胞 | 73.3 | 42.9 | 44.1 | 46.6 |
| Ｂ細胞 | 26.7 | 57.1 | 55.9 | 53.4 |

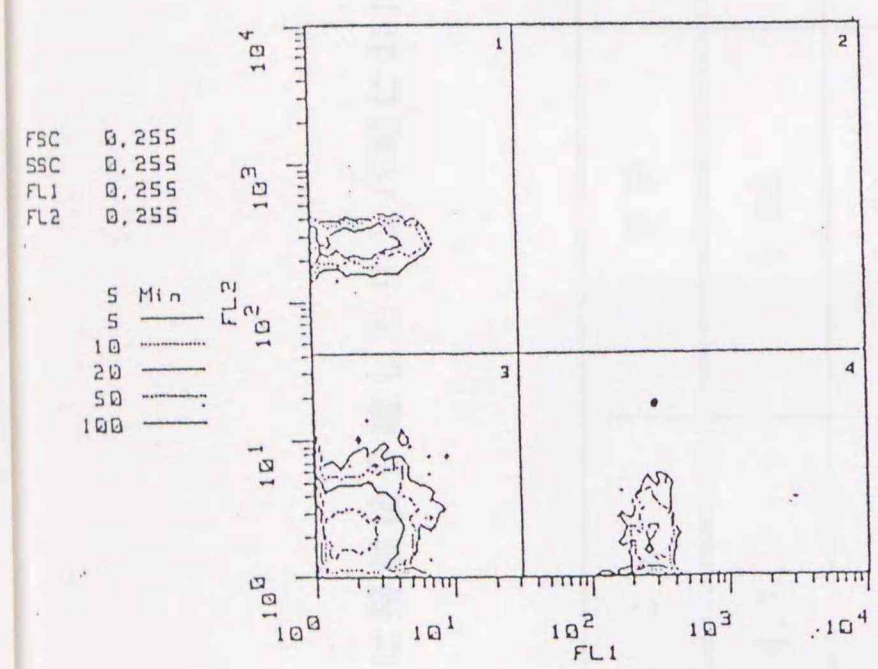
（％）



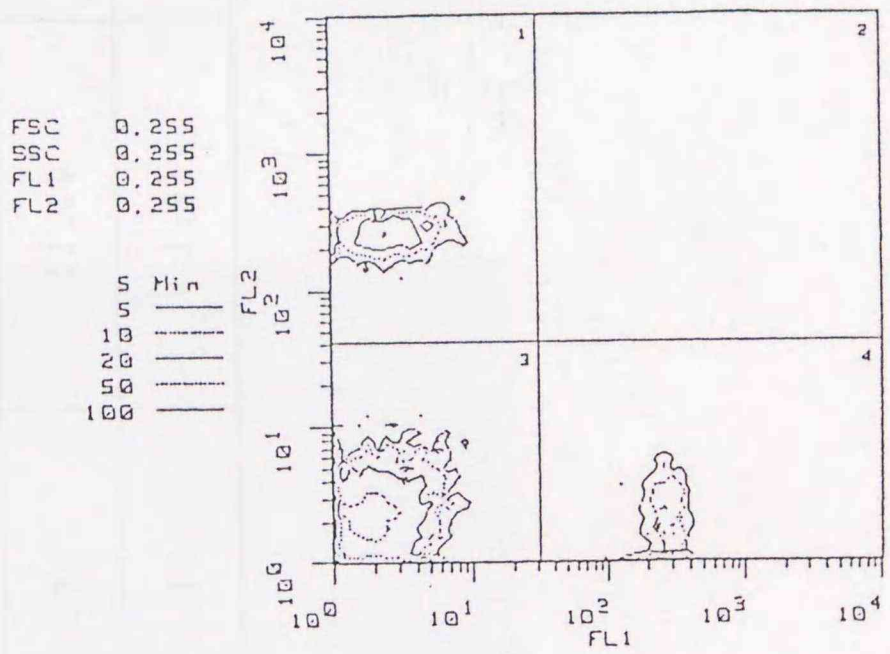

CA




PP




PVA




CONTROL

図２－８　材料に接触後分離したリンパ球のＣＤ４，ＣＤ８抗原の分布
ＦＬ１＝ＣＤ８，ＦＬ２＝ＣＤ４

表２－６　材料に接触後分離したリンパ球におけるサブポピュレーション

| | CA | PP | PVA | CONTROL |
|---|---|---|---|---|
| $CD4^+$ | 4.71 | 3.00 | 2.89 | 2.67 |
| $CD4^+CD8^+$ | 0.05 | 0.04 | 0.04 | 0.03 |
| $CD4^-CD8^-$ | 4.74 | 11.30 | 11.71 | 10.78 |
| $CD8^+$ | 2.74 | 1.94 | 2.11 | 1.77 |

($\times 10^6$ Cells/ml)

a)




b)

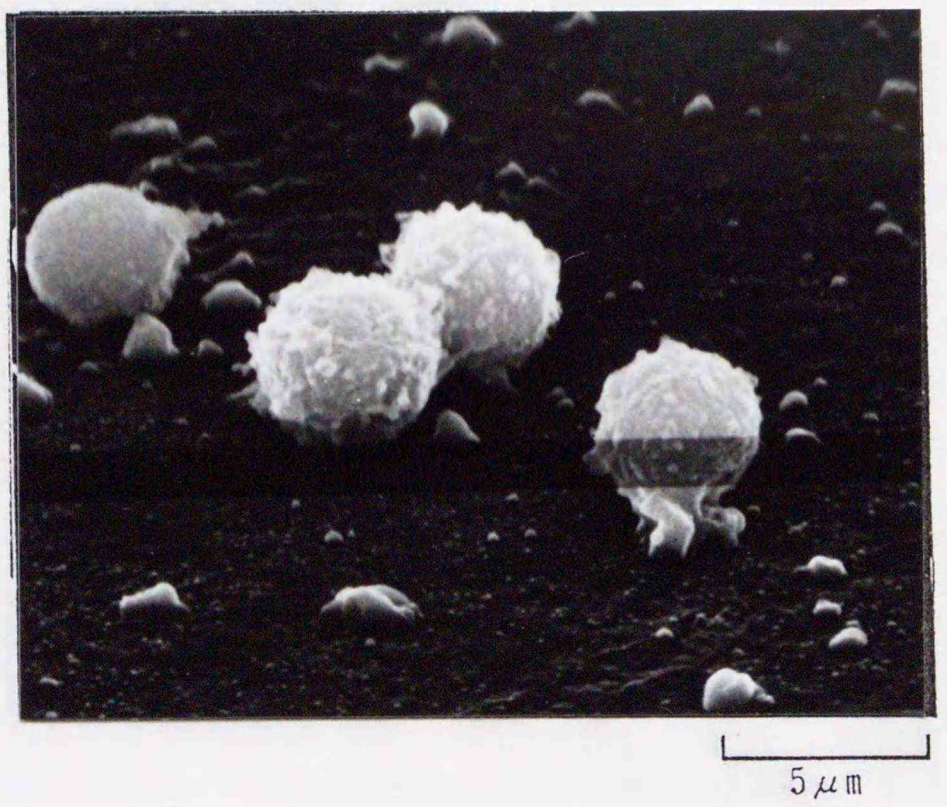
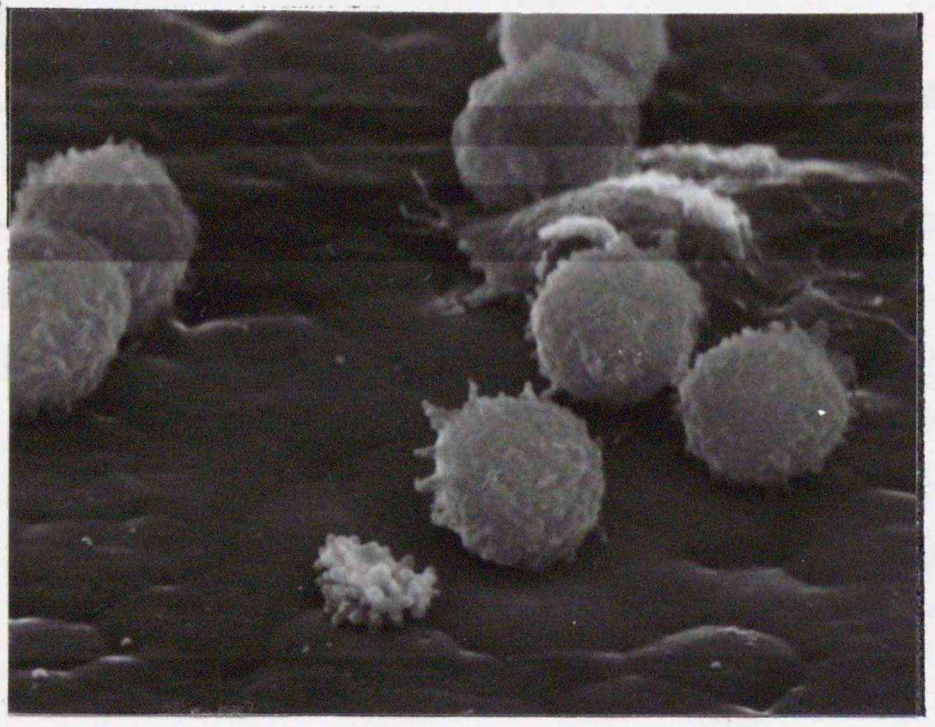



図２－９　ＣＡ膜上に接着したマウス脾細胞のＳＥＭ写真．
a)膜は培養時まで乾燥状態，b)膜は培養前６時間蒸留水に浸漬

a)




b)

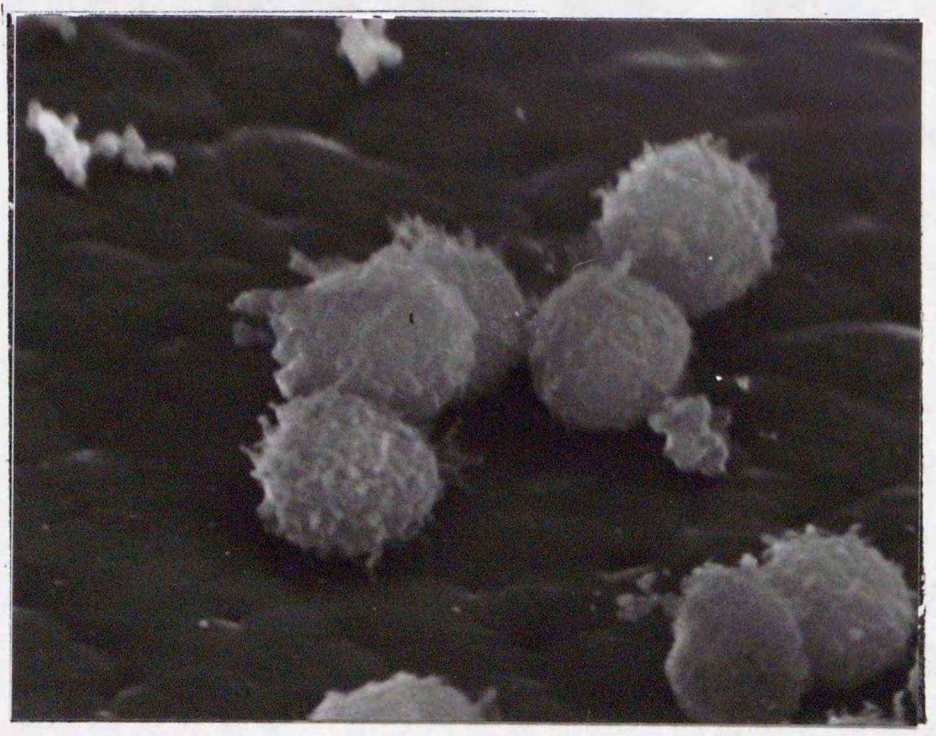



図２－１０　ＰＰ膜上に接着したマウス脾細胞のＳＥＭ写真.
a)膜は培養時まで乾燥状態，b)膜は培養前６時間蒸留水に浸漬

増加がみられた。ＦＡＣＳによる解析では細胞表面イムノグロブリンを持つＢ細胞の割合の低下がみられた（図２－７，表２－５）。また、ＣＤ４，ＣＤ８による解析では、ＣＡのみＣＤ４－ＣＤ８－細胞数の減少とＣＤ４＋，ＣＤ８＋に染まる細胞数の初期値に対する増加がみられた（図２－８，表２－６）。よってＣＡ試料は、Ｂ細胞に影響を与え回収細胞中のその生存数を減少させる。

２時間接触後のＣＡ試料による細胞への影響をさらに調べるために試料上に付着している状態のＳＥＭ観察を行った。対照試料としては、ＰＰを用いた。また、血清成分吸着によりＣＡにおける生細胞数が回復するのでその原因を探るために、細胞を付着させる前に蒸留水で６時間浸漬し、表面の水を除去後、直ちに細胞を接触させた試料を用意した。結果を図２－９，２－１０に示した。ＰＰ試料上の細胞には形態変化はみられなかった。一方、乾燥状態のＣＡ上に接触した細胞では正常な形態を示す細胞は少なく、necrosis的な状態がみられ、blebだと思われるものが膜上に多数見られた。一方含水状態ＣＡ上の細胞では、細胞形態が正常であるものが多くみられた。

## ２－４　考察

材料－血液相互作用による免疫系への影響については、最近特に細胞免疫への影響についての関心が高まっている。Andersonのグループは[4,5]マクロファージと高分子材料との接触が、IL-1の産生量に影響を与え、又、各種ポリマー及び、それに吸着される蛋白により、その産生量を変化させることを示している。また、筆者らは、リンパ球と高分子材料の長期接触によりIL-2産生量が変化することを明らかにしている[6]。

また、人工透析やプラズマファレーシスなどの体外循環療法においても、その治療がもたらす効果について、除去される免疫抑制物質の影響とともに、用いられる材料との関わりが論議されている。特に、村林等によると、ＣＡ製血漿分離膜を用いてCryofiltrationを行うことにより、患者リンパ球のマイトジェン刺激による増殖能が増加することが報告されている[7]。その培養系には患者由来の免疫抑制物質は存在せず、リンパ球機能が用いられた材料との接触により変化することを示している。体外循環にはＣＡ分離膜の他、ポリ塩化ビニール製の血液チューブが用いられているが、その血液チューブのみで体外循環した場合にはそのようなリンパ球変化は生じないため、ＣＡ膜と血液の相互作用により、機能変化がもたらされたものと考えられている。しかし、その効果が、ＣＡとリンパ球との接触によるリンパ球自身の変化であるのか、生体内に

おけるリンパ球成分の分布変化によるものであるか明かではなかった。本研究においては、ＣＡの他、透析膜、血清分離膜などに用いられてる材料に関し、体外循環と同様な条件を *in vitro* において設定し実験を行った。すなわち、各材料と２時間接触させ、脱離・回収したマウスリンパ球に関し、そのマイトジェン刺激に対する反応を検討した。

その結果、マウス血清を材料表面に吸着させなかった場合、ＣＡ及びＰＶＡに接触したリンパ球では、マイトジェン刺激後の細胞増殖能において、他試料及びコントロールと較べ、顕著な差を示すことが明らかになり、また、その作用がＣＡとＰＶＡにおいて全く異なることが判明した。

ＣＡにおいては、PHA刺激後の細胞数変化への影響が少なかったが、その他では、細胞数、増殖能において全て大きく低下していた。特に、LPS刺激系においてその抑制が顕著であった。その原因として、表２－３に示されているように、ＣＡとの２時間の接触により、主としてLPS反応性細胞がダメージを受けたと考えられる。表２－５、及び表２－６に示したＦＡＣＳ解析の結果より、特にＢリンパ球の生存率が顕著に低下することが示されており、Ｂ細胞のマイトジェンであるLPSに対する反応性が低下したものと考えられる。また、Ｔ細胞のマイトジェンであるConA、PHAに対しても反応性が低下しているため、その原因について検討した。まず、培養系に死細胞及びその成分が存在することの影響を調べることを目的とし、超音波照射により破壊した細胞を一定量培養系に加えたが、全く変化はなく、ConA、PHAに対する応答に関わる細胞成分へ、ＣＡが何らかの影響を与えるものと考えられた。

ConA、PHAはともにＴ細胞のマイトジェンであるが、その応答に関与する細胞群は異なっていることが知られている。ヒトでは、Ｔγ，Ｔμリンパ球があり、Ｔリンパ球は、抗体のＦｃ部分と結合するＦｃ＋Ｔ細胞と、そのレセプターを有しないＦｃ－Ｔ細胞に分けられるが、ConAはＦｃ＋Ｔ細胞のみ刺激し、Ｆｃ－Ｔ細胞は刺激しないのに対し、PHAはＦｃ＋Ｔ細胞、Ｆｃ－Ｔ細胞ともに刺激するという報告もある。 また、ＣＤ表面抗原に関しては、Con AがＣＤ４＋、ＣＤ８＋Ｔ細胞をともに増殖させるのに対し、PHAではＣＤ４＋をより選択的に活性化させるという報告もある。このようにConA、PHAでは関与するＴ細胞サブセットが異なっているが、ともにマクロファージの存在が必要と考えられており、その含量が0.3%以下になった場合、$^{3}$H-thymidineの取り込み量が顕著に減少する事が報告されている[8)]。表２－６のＦＡＣＳ解析においては、マクロファージはＢリンパ球と同じくＣＤ４$^{-}$ＣＤ８$^{-}$分画に存在するため、ＣＡから細胞を脱離した段階で、付着性の強いマクロファージは、培養液中に遊離しないものが存在し、すでに減少していた可能性は否定できず、そのマクロファージ

の減少が活性化の低下に関与したものかと考えられる。この仮説、すなわち、ＣＡへの付着によりマクロファージの生存率が減少し、そのためConA,PHA応答性の低下をもたらしたという可能性は、また、ナイロン非付着性脾細胞を用いた結果により支持される。ナイロン繊維には、Ｂ細胞、マクロファージ、またＴ細胞のうち表面抗原としてLyt-1+2+（ＣＤ８）を持つ成分などが吸着され易く、事実、本実験に用いた非付着性細胞もその表面抗原よりＴ細胞が９６％であった。ナイロン非付着性脾細胞を用いた図２－５をみると、図２－４に示したマウス脾細胞を用いた場合に較べ、$^{3}$H-thymidine取り込み量が若干減少したものの、ConA,PHAに対し十分な活性を示し、少なくともその反応に必要なマクロファージが存在していたことを示している。しかし、ＣＡに接触させた場合には、ほとんど活性がみられず、マウス脾細胞をそのまま用いた場合と較べ、より顕著な抑制がみられた。ナイロン非付着性細胞に含まれるわずかな数のマクロファージが、ＣＡとの接触によりさらに減少したとするならば、その活性が生じなかった理由が理解される。すなわち、この実験結果よりも、ＣＡとの接触により、Ｂ細胞のみならず、マクロファージも強く影響を受けることが示唆されたものと考えられる。

一般に、Ｂ細胞及びマクロファージは、Ｔ細胞と較べ、ガラスやプラスチックなどに付着しやすく、ＣＡに付着した場合、その影響をより大きく受けたものと考えられる。しかし、細胞の材料への付着をその材料の表面物性から考えた場合、親水性であるＣＡはＰＰ，ＰＭＭＡなどの疎水性材料と較べ、一般にその相互作用は弱いと考えられ、一般常識から考えれば、ＰＰ等よりも強い損傷を何故Ｂ細胞、マクロファージに与えたかが疑問となった。

これらの試料はsolvent-cast法を用いて製膜しており、その残留溶媒の影響また、洗浄に用いたエチルアルコールの残留の影響が危惧されたが、実験の項でも述べた通り、L929細胞を用いた培養実験においては、ＣＡは他試料およびコントロールとの差はみられず、残留溶媒の影響はないものと考えている。Ｂ細胞、マクロファージがＣＡにより損傷を受けるのであれば、付着性細胞であるL929細胞が何故影響を受けないのか疑問となり、二つの実験操作の相違を考慮した。L929細胞の実験では細胞を自然沈降させたのに対し、リンパ球の実験では細胞浮遊液を添加後、直ちに遠心操作により強制付着させており、その操作の相違が何らかの影響を与えたものと考えられた。しかし、遠心による物理力の影響に関しては、他試料においても同じ条件となるため、ＣＡに特異的な差が生じるとは考えられない。一つの可能性として、細胞がＣＡ表面と接触するに要する時間が要因となることが考えられた。ＣＡは吸水性の材料であり、培養液との接触時間の経過とともに、その表面性状が変化することが考えられ

る。そのため、自然沈降させた場合と遠心操作を行った場合では、その表面性状に相違があり、その結果、付着細胞に異なった影響を与える可能性が考えられた。この仮説を検討するため、蒸留水中に十分に浸漬したＣＡと乾燥ＣＡの試料を用い、マウスリンパ球を遠心により強制付着させ、２時間後、グルタルアルデヒドにて固定し、走査型電子顕微鏡にて観察した。その結果が図２－９であるが、乾燥ＣＡ上では、正常な形を保つ細胞が少なく、細胞が破裂した後にできた粒状物質と思われる物が多く見られた。一方、含水ＣＡにおいては、同様の粒状物質も観察されたが、乾燥ＣＡより数は少なく、またリンパ球も正常と思われる形態を示すものが多かった。ＣＡの含水状態の相違により何故このようなことが生じるのか、その理由は明かではないが、乾燥ＣＡは付着したリンパ球の細胞形態に変化を起こさせる強い作用を与えることが明かとなった。その作用は、材料への付着しやすい、言葉を換えれば、相互作用の大きいＢ細胞、マクロファージに対しより大きく作用することが考えられ、それらの細胞の生存率を低下させ、結果としてマイトジェンへの応答を低下させたものと考えられる。

一方、ＰＶＡにおいては、付着２時間後、表２－４に示したようにリンパ球の生存率は他試料と変化なく、また、表２－６に示したそのサブセット割合においても、全く変化は認められなかった。しかし、全てのマイトジェンにおいて、刺激を加え48時間培養した後では、その細胞数は他試料と較べ顕著に減少していた。その増殖能についてみれば、ConA、およびLPSにおいて低下したが、PHA刺激においては、生細胞数が少ないのに関わらず、他試料と較べ顕著に増加させており、PHA応答に関与する細胞に関して、その反応性を増強する何等かの作用を与えることが明かとなった。この現象は、ナイロン非付着性細胞を用いた場合に、より顕著に現れている。コントロール及び他試料においては、図２－４に示したマウス脾細胞を用いた場合と較べて、$^{3}$H-thymidine取り込み量が減少しているのに対し、ＰＶＡではむしろより増加しており、ＰＶＡは何等かの作用を与えていることが明かと考えられる。ConA刺激の場合においても、生細胞数当りの表２－３に示した3H-thymidine取り込み量を見てみると、コントロールと較べ顕著に増加していること、また、ナイロンウール非付着性細胞を用いた場合には、コントロールと同等な活性を示すことなど、興味ある結果である。これらの事実を考え合わせると、ＰＶＡは他試料と較べ、何等かの特異的な作用をある特定の細胞群に与えていることを示唆しているものと考えられる。

材料－血液との接触により生ずる細胞と材料との相互作用は、材料とその細胞が直接相互作用するのではなく、材料に吸着した血漿タンパク質を介して行

われることが広く認められている。タンパク質の材料への吸着挙動はその材料の表面性状に依存し、吸着タンパク質の種類、吸着量、分布、変性、配向が異なることにより、細胞へ異なった影響を与えることが知られている[9]。これまで議論してきた本実験系においては、マウス血清を加えていない場合であったが、培養液には牛胎児血清が含まれており、その血清タンパク質が材料表面へ吸着し、その影響を考慮することが肝要となる。その場合、ＰＶＡと、ＰＰ等の他試料とにおける最も大きな相違は、ＩｇＧの吸着挙動であり、その吸着配向が異なっていることが知られている[9]。ＰＰなど疎水性材料においては、免疫細胞結合部位であるＦｃ部分が表面に結合するのに対し、ＰＶＡでは抗原結合部位であるＦａｂ部分と結合することが知られている。ＦａｂのＰＶＡへの吸着は、抗原に結合した場合と同様に、免疫細胞のＦｃレセプターに対するリガンドを発現させ、リンパ球への相互作用を強めことが報告されている[10]。本実験に用いた牛胎児血清にもＩｇＧは含まれており、マウス免疫細胞とも結合するものと考えられ、ＰＶＡにおいては吸着したＩｇＧを介して、何等かの影響を与えた可能性が考えられる。Rayanらの報告によれば免疫複合体により、LPSやConA刺激に対する増殖能を抑制し[10]、また、Usamiらによるとレセプター＋Ｔ細胞が免疫複合体を結合すると、マウス脾Ｔ細胞においてその抗原非特異的反応が抑制されると報告されている[11]。しかし、ConA、PHA刺激の応答において、それぞれ種々の細胞が関わるわけであり、その応答を抑制する細胞がＰＶＡによりその作用を強め、結果としてConA刺激により増殖を低下させたことも考えられる。その場合、ナイロンウール非付着性細胞を用いた場合には、ConAにおいて、増殖能の回復、また、PHAにおいてはさらに増強された結果より、その抑制に関与する細胞群はナイロンウール付着性の細胞である可能性が大きいものかと考えられる。しかし、現段階においては、その作用機構は明かではない。　ＰＶＡのマウスリンパ球への作用に吸着タンパク質が関わるのであれば、マウス血清をＰＶＡに接触させた場合には、より大きな変化が生じることが期待された。しかし、その結果は、ConA、PHA刺激において、全く反対であり、マウス血清を吸着させることにより、ＰＶＡと他の材料間との相違は見られなくなった。一方、LPS刺激においては、マウス血清成分の吸着により顕著に増加しており、他試料より有意に増殖を強めることが明かとなった。ＰＶＡなどOH基を有する材料では、補体が活性化し、Ｃ３b成分がＰＶＡと結合する。一方、マクロファージ、Ｂ細胞などはそのＣ３bに対するレセプターを有し、そのためＰＶＡではこれらの細胞に強く作用することが考えられる。事実、本研究室におけるこれまでの研究では、ＰＶＡの薄膜を被覆したガラスビーズ上にてマウスリンパ球を培養し、マウス血清を加え、LPS刺激した場合、他試料と較べ顕著

に増殖能が増加し、マウス非働化血清を加えた場合には差が認められなくなることが示されている。さらに、抗Ｃ３抗体を加えると増殖能のコントロール試料に対する差が認められなくなることより、ＰＶＡ試料にマウス血清を添加した培養系に対するLPS刺激においては、補体の活性化が関与することを明らかにしている。そのため、本実験で行った、短期接触の場合にも、Ｃ３bレセプターを介した作用によりＢ細胞のLPS応答を増強したものと考えられる。

上記マウス血清非吸着系において、培養液中のＩｇＧの関与の可能性を述べたが、しかし、マウス血清成分を吸着させた場合、ConA、PHAにおいて、他試料と有意な差は見られなくなった。マウス血清成分の吸着は、ConAでは増強的に、PHAでは抑制的に作用した。マウス血清を直接作用させた場合と培養液中の非働化牛胎児血清では、その血漿タンパク質濃度、特異性、ConA，PHA応答への作用等に大きな差があり、同じレベルで議論は困難であるが、　マウス血清成分とＰＶＡとの相互作用により何らかの変化が生じているものと考えられる。その可能性は、図２－６に示した、材料と接触させた血清を細胞培養系に添加した場合にも示されている。ＰＶＡと接触した血清では、PHA応答を増強しているが、ＰＶＡと接触した培養液を加えた場合にはこのような変化は生じず、血清中の液性因子の変化が何等かの作用を果たすことが示唆されている。その血清成分の関与について、今後詳しい検証が必要と考えられる。

ＣＡに血清成分を吸着させた場合には、ConA，PHAにおいて、他試料と相違なく、LPSにおいて増加が見られた。血清と接触させる操作により、ＣＡの表面性状は図２－１０に示した吸水表面と同様になり、生存率を低下させないものと考えられる。また、ＣＡも補体を活性化することが知られており、LPS刺激応答の増強に寄与したものと考えられる。プラスマフェレーシスなど、ＣＡが臨床で用いられた場合には、本実験における血清成分吸着系に対応するわけであるが、ConA，PHA刺激に対する応答において、特に増強効果が見られなかった。その結果は、村林らの報告、すなわち、ＣＡ血漿分離膜を用いた場合、リンパ球のマイトジェン応答が増加したことに関するＣＡの作用機構に一つの示唆を与えるものと考えられる。すなわち、ＣＡと短期接触したリンパ球では、マイトジェン応答を増加させるものではなく、生体におけるその結果を考察するには、そのＣＡ－血液相互作用という局所反応がもたらす生体全身系への影響という観点から考慮すべきことを示唆しているものと考えられる。

# 第３章　合成高分子材料との短期接触によるリンパ球サブセット変化

## ３－１　はじめに

血液透析中にリンパ球サブセットの割合のが変化し[1]、特に、ＣＤ４／ＣＤ８比が増加する[2,3]ことが知られている。その変化は用いる透析膜の素材により異なることが報告されており、膜素材とリンパ球の相互作用による影響と考えられ、リンパ球各サブセットに異なった作用をしていることが示唆されている。前章での結果より、各種ポリマーによりマイトジェン刺激に対して細胞数、$^{3}$H-thymidineの取り込みを指標とする細胞増殖能に変化がもたらされることが示されたわけであるが、リンパ球各サブセットに異なった作用を与えていることが考えられる。

前章と同様に各試料と短期接触させマイトジェンで刺激し、培養した後のリンパ球に関して、その表面抗原をフローサイトメトリーを用いて解析し、リンパ球に対する合成高分子の作用を検討することを目的とした。

## ３－２　実験方法

### ３－２－１　実験に用いた細胞

実験で用いたリンパ球は、第２章と同様にC57BL/10マウス脾細胞より調整し用いた。ＣＡ，ＰＭＭＡ，ＰＡＮ，ＰＰ，ＰＶＡの各試料と２時間接触した後、脱離・回収し、それぞれConA，PHA，LPSを加えて４８時間培養し、その表面抗原を調べた。

### ３－２－２　蛍光標識モノクローナル抗体による細胞染色

回収された細胞浮遊液は、ファルコン社製ＦＡＣＳ用チューブに分注し、０．１％アジ化ナトリウムを含むリン酸緩衝食塩水で２度遠心洗浄した。十分に洗浄用緩衝液を除いた後、FITC標識抗ＣＤ４抗体とPE標識抗ＣＤ８抗体を含んだ２％ＦＣＳと0.1%アジ化ナトリウムを含むＲＰＭＩ－１６４０培地を50μl加え、

混和した後、氷温中に３０分間放置した。細胞表面抗原とモノクローナル抗体を結合させた後、余分な抗体を除くために緩衝液で２回洗浄した。その後、生細胞と死細胞を区別するため、死細胞のＤＮＡに結合し蛍光を発するＰＩ（Propidium Iodide ）を加えた。

３－２－３　細胞表面抗原の測定

細胞表面抗原の解析はフローサイトメトリー（ＦＡＣＳ）を用いて行った。染色された細胞はＦＡＣＳにより、各表面抗原を示した蛍光強度（ＰＥ→ＦＬ１，ＦＩＴＣ→ＦＬ２）と、死細胞を示す蛍光強度（ＰＩ→ＦＬ３）、細胞の大きさ・性質を表す、前方散乱光（ＦＳＣ），側方散乱光（ＳＳＣ）の５つの情報をコンピュータ情報として取り込んだ。各試料と接触した細胞群のサブセット、芽球化の情報は、ＦＡＣＳ解析用プログラムＬＹＳＩＳⅡにより解析した。

３－２－４　ＦＬ１，ＦＬ２蛍光強度の解析

ＦＬ１，ＦＬ２の蛍光強度の測定に当たっては、ＦＬ３の蛍光強度分布ヒストグラムにゲートをかけ死細胞を除き、ＦＳＣ，ＳＳＣの二次元グラフによりリンパ球以外の分画を除いた後、解析を行った。

３－２－５　芽球化細胞分画の測定

芽球化細胞分画は、ＦＳＣの情報をもとより、無刺激の場合の細胞分布との比較でそれより大きなサイズのものを芽球化細胞とした。

３－３　結果

３－３－１　調製したマウス脾細胞およびマイトジェン非添加培養後のリンパ球サブセット

本実験に用いたマウス脾臓細胞由来リンパ球、及び培養後のリンパ球のサブセットを、ＣＤ４＋ＣＤ８－（ＣＤ４＋），ＣＤ４＋ＣＤ８＋（＋＋）、ＣＤ４－ＣＤ８－（－－）、およびＣＤ４－ＣＤ８＋（ＣＤ８＋）に分類し、それぞれの割合を表３－１に、また生細胞数を表３－２に示した。培養４８時間後

表３－１　脾臓リンパ球の各サブセットの割合

（％）

| | Fresh | MS- | MS+ |
|---|---|---|---|
| $CD4^+$ | 17.9 | 18.1 | 20.9 |
| ++ | 2.6 | 0.3 | 0.4 |
| -- | 72.5 | 75.3 | 71.9 |
| $CD8^+$ | 9.3 | 6.3 | 7.7 |

表３－２　脾臓リンパ球の各サブセット数

（生細胞　$\times 10^5$個/ml）

| | Fresh | MS- | MS+ |
|---|---|---|---|
| $CD4^+$ | 1.80 | 0.49 | 0.26 |
| ++ | 0.26 | 0.08 | 0.01 |
| -- | 7.30 | 2.04 | 0.90 |
| $CD8^+$ | 0.93 | 0.17 | 0.10 |

Fresh:脾臓より摘出直後のリンパ球

MS-　:well上で48時間培養

MS+　:血清吸着wellで2時間培養後wellに移し変えて48時間培養

では死細胞の割合が増加した。ＣＤ８＋分画においてその割合が多少減少したが、大きな変化は見られなかった。培養wellに血清成分を吸着させた場合では、細胞の生存率がさらに低下し、吸着した血清成分は細胞の維持に好ましくない作用をすることが示されたが、血清非吸着系と較べ、その細胞分画の割合には変化がなく、その影響は各細胞亜群に特異的ではないことが明かとなった。

### ３－３－２　ConA刺激によるリンパ球総数中のサブセットの割合

ConA刺激を受けたリンパ球サブセットの割合を表３－３に示した。マウス血清未処理試料の場合、各試料と接触したリンパ球は、コントロールに較べ、ＰＭＭＡ，ＰＡＮ，ＰＰ群では、顕著な変化は認められなかった。一方、ＣＡ接触群ではＣＤ４－ＣＤ８－細胞の割合が顕著に低く、ＣＤ４＋細胞，ＣＤ８＋細胞分画の割合が高くなった。ＰＶＡ群ではコントロールに較べ、ＣＤ４＋細胞の割合のみが顕著に高くなっていた。　そのほかの分画では、ＰＭＭＡ，ＰＰと比較して顕著な差は認められなかった。ＰＡＮにおいては、ＣＤ４＋の減少、ＣＤ８＋の増加がみられた。

マウス血清処理試料とリンパ球が接触した場合、ＣＡ，ＰＶＡと接触した細胞群では、各試料接触群の間で著明な差は認められず、ＣＡ，ＰＶＡ表面に血清成分が吸着することにより、サブセットの割合に変化が生じなくなることが明かとなった。

### ３－３－３　PHA刺激によるリンパ球総数中のサブセットの割合

PHA刺激を受けたリンパ球サブセットのそれぞれの割合を表３－４に示した。マウス血清未処理試料と接触したリンパ球において、ＣＤ４＋の割合は、コントロールと較べＰＭＭＡ，ＰＡＮ，ＰＰ群ではほぼ同等であった。一方、ＣＡ，ＰＶＡ群では、コントロールに較べ約２倍となり、顕著に高い割合を示した。それに相反するように、ＣＤ４－ＣＤ８－細胞の割合はＣＡ，ＰＶＡ群では、減少したが、その割合は、ＣＡ接触リンパ球において最も低くコントロールの60%程度であった。ＣＤ８＋細胞は、コントロールと比較して、ＰＶＡ群のみが顕著に低下した。

血清処理試料と接触したリンパ球においては各試料群間に著明な差は認められなかった。

### ３－３－４　LPS刺激によるリンパ球総数中のサブセットの割合

表３－３　Con A刺激のもとでのリンパ球サブセットの割合

| Polymers | | CA | PMMA | PAN | PP | PVA | Blank |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| ms | sAg | | | | | | |
| - | $CD4^+$ | 21.05 | 6.58 | 5.14 | 9.24 | 22.62 | 9.22 |
| | ++ | 4.80 | 0.56 | 0.37 | 0.75 | 0.50 | 0.43 |
| | -- | 56.39 | 87.32 | 91.74 | 82.06 | 71.36 | 83.67 |
| | $CD8^+$ | 17.76 | 5.54 | 2.75 | 7.95 | 5.52 | 6.67 |
| + | $CD4^+$ | 9.38 | 9.97 | 9.76 | 8.36 | 7.572 | 9.42 |
| | ++ | 1.18 | 1.25 | 1.14 | 1.25 | 0.65 | 0.83 |
| | -- | 79.52 | 77.41 | 76.72 | 78.42 | 82.58 | 81.90 |
| | $CD8^+$ | 9.92 | 11.37 | 12.38 | 11.97 | 9.20 | 7.85 |

表３－４　PHA刺激のもとでのリンパ球サブセットの割合

| Polymers | | CA | PMMA | PAN | PP | PVA | Blank |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| ms | sAg | | | | | | |
| - | $CD4^+$ | 57.87 | 27.90 | 29.33 | 26.94 | 57.48 | 28.65 |
| | ++ | 1.42 | 0.92 | 0.82 | 1.68 | 0.59 | 0.93 |
| | -- | 28.64 | 63.36 | 60.85 | 59.16 | 38.56 | 60.83 |
| | $CD8^+$ | 12.07 | 7.81 | 9.00 | 12.22 | 3.37 | 9.59 |
| + | $CD4^+$ | 37.26 | 36.44 | 38.13 | 33.14 | 39.91 | 42.52 |
| | ++ | 1.45 | 1.44 | 0.90 | 1.66 | 1.06 | 1.28 |
| | -- | 49.47 | 47.96 | 47.87 | 50.38 | 47.64 | 39.85 |
| | $CD8^+$ | 11.83 | 14.16 | 13.11 | 14.83 | 11.39 | 16.35 |

表３－５　LPS刺激のもとでのリンパ球サブセットの割合

| Polymers | | CA | PMMA | PAN | PP | PVA | Blank |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| ms | sAg | | | | | | |
| - | $CD4^+$ | 38.47 | 13.75 | 13.97 | 12.34 | 36.46 | 14.28 |
| | ++ | 0.17 | 0.16 | 0.14 | 0.20 | 0.07 | 0.27 |
| | -- | 50.17 | 83.20 | 82.72 | 84.14 | 62.14 | 82.17 |
| | $CD8^+$ | 11.18 | 2.89 | 3.16 | 3.32 | 1.33 | 3.27 |
| + | $CD4^+$ | 23.70 | 16.49 | 15.80 | 23.70 | 16.55 | 24.74 |
| | ++ | 0.16 | 0.14 | 0.14 | 0.13 | 0.21 | 0.18 |
| | -- | 70.91 | 79.41 | 80.09 | 71.90 | 79.77 | 70.08 |
| | $CD8^+$ | 5.23 | 3.96 | 3.96 | 4.27 | 3.47 | 4.99 |

LPS刺激を受けたリンパ球のサブセットの割合を表３－５に示した。血清未処理試料と接触したリンパ球において、　各試料間のサブセットの分布傾向は、ConA，PHA刺激の場合と同様で、コントロールに対して、ＣＡ，ＰＶＡでＣＤ４－ＣＤ８－細胞の割合が顕著に低下、ＣＤ４＋において増加した。またＣＤ８＋においては、ＣＡで増加、ＰＶＡで減少がみられた。

血清吸着処理試料と接触したリンパ球群では、各試料間で顕著な差異は認められなかった。

### ３－３－５　各マイトジェン刺激によるＣＤ４／ＣＤ８の変化

ＣＤ４＋Ｔ細胞とＣＤ８＋Ｔ細胞の比を表３－６に示した。血清で試料を処理しない場合、すべてのマイトジェン刺激のもとで、コントロールと比較して、ＰＶＡと接触した細胞のみ、顕著に高い値を示した。また、ＰＡＮにおいてはConA刺激において若干の増加がみられた。一方、血清を吸着させた試料では、各マイトジェン刺激下で、コントロールにたいする顕著な差異は認められなかった。

### ３－３－６　各サブセットの細胞数

第２章で得た生細胞数と生細胞総数中での各サブセットの割合より各サブセットの細胞数を算定した。

ConAで刺激した細胞数を図３－１に示した。血清非吸着試料において、ＣＤ４－ＣＤ８－分画の細胞数がＣＡ，ＰＶＡでは顕著に減少していた。　また、ＰＶＡにおいてＣＤ８＋細胞数が顕著に減少していた。血清吸着処理をした試料では、試料間に目立った差異は認められなかった。

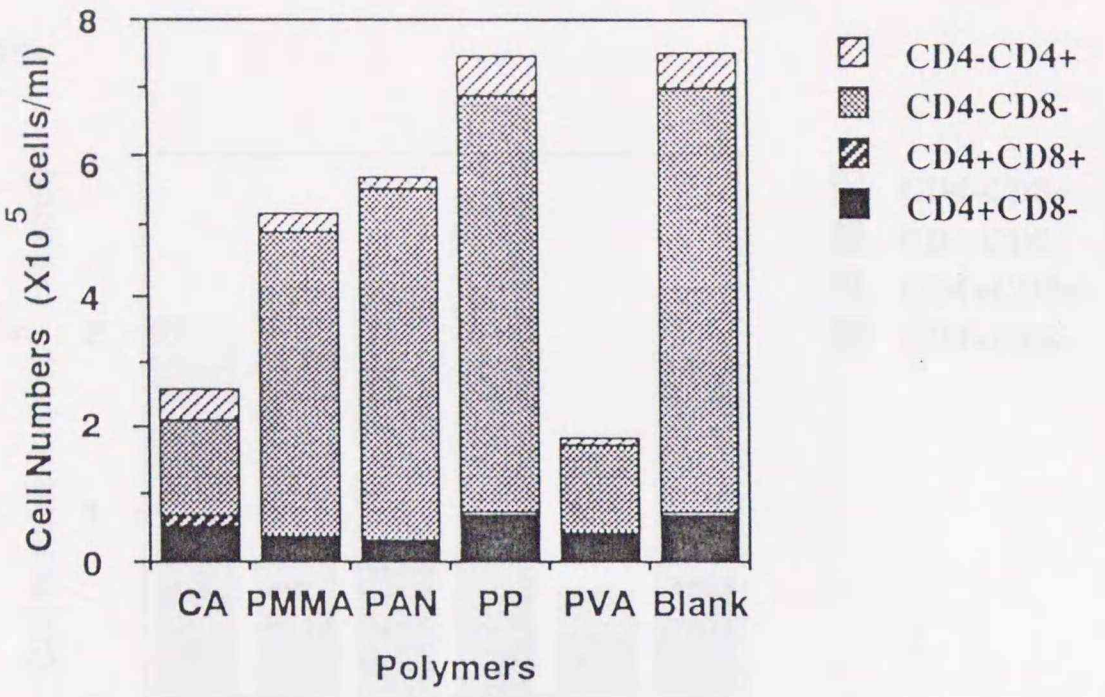
PHAで刺激した細胞数を図３－２に示した。血清非吸着試料において、ＣＡ，ＰＶＡでＣＤ４－ＣＤ８－分画の細胞数が顕著に減少していた。また、ＰＶＡでは、ＣＤ４＋，ＣＤ８＋細胞数の減少もみられた。一方、ＣＡではＣＤ４＋細胞の数が、他の試料と接触した場合に較べ多いことが認められた。血清吸着処理を行った場合、特定分画の顕著な増減は認められなかった。

LPSで刺激した細胞数を図３－３に示した。　血清非吸着試料では、ＣＤ４－ＣＤ８－分画の細胞数が、ＣＡ，ＰＶＡで顕著な低下を示した。また、ＰＶＡにおいてはＣＤ４＋細胞の減少が目立った。血清吸着処理を行った場合、特定分画の顕著な増減は認められなかった。

表３－６　４８時間培養後のＣＤ４／ＣＤ８比

| Polymers | | CA | PMMA | PAN | PP | PVA | Blank |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| mitogen | ms | | | | | | |
| ConA | - | 1.2 | 1.2 | 1.9 | 1.2 | 4.1 | 1.4 |
| | + | 0.9 | 0.8 | 0.8 | 0.7 | 0.8 | 1.2 |
| PHA | - | 4.8 | 3.6 | 3.3 | 2.2 | 17.1 | 3.0 |
| | + | 3.3 | 2.6 | 2.9 | 2.2 | 3.5 | 2.6 |
| LPS | - | 3.4 | 4.8 | 4.4 | 3.7 | 27.4 | 4.4 |
| | + | 4.5 | 4.2 | 4.0 | 5.6 | 4.8 | 5.0 |

(a) ms-




(b) ms+

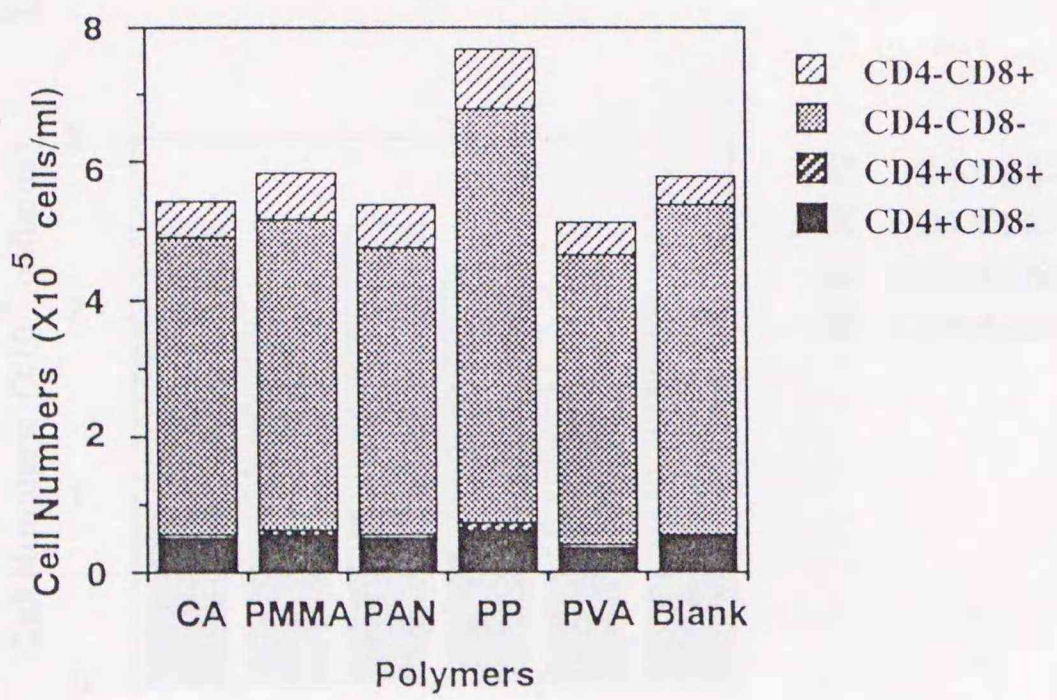
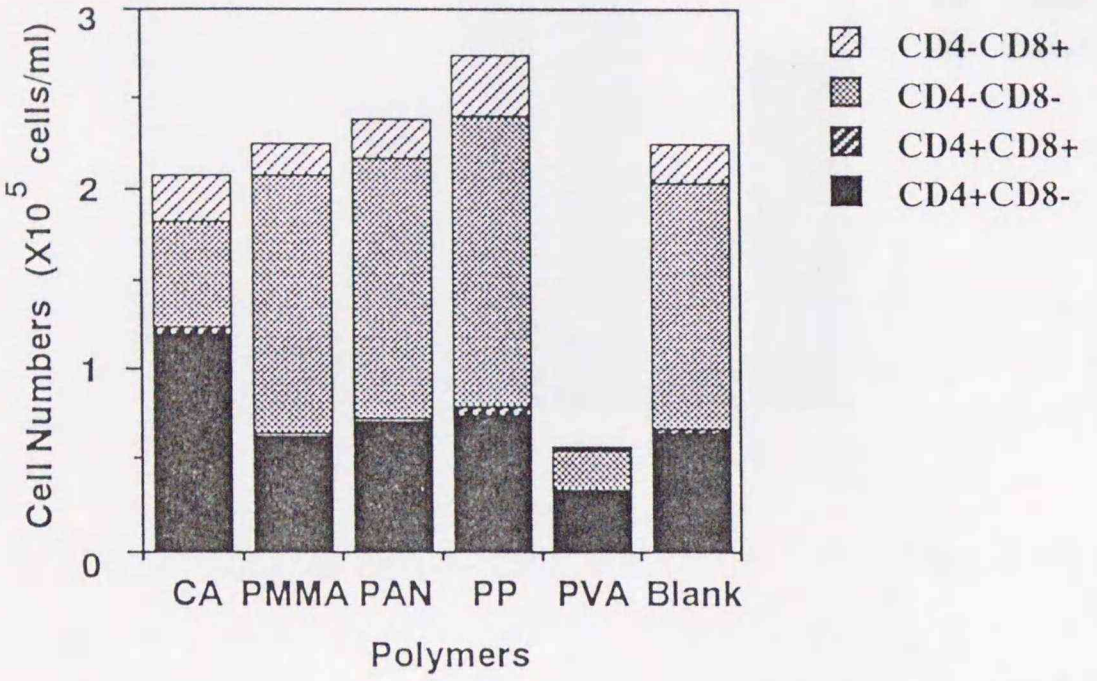



図３－１　Con A 刺激下での48時間培養後における各サブセットの細胞数。
材料とは初期２時間接触
(a)：マウス血清非処理，(b)：マウス血清処理

(a) ms-




(b) ms+

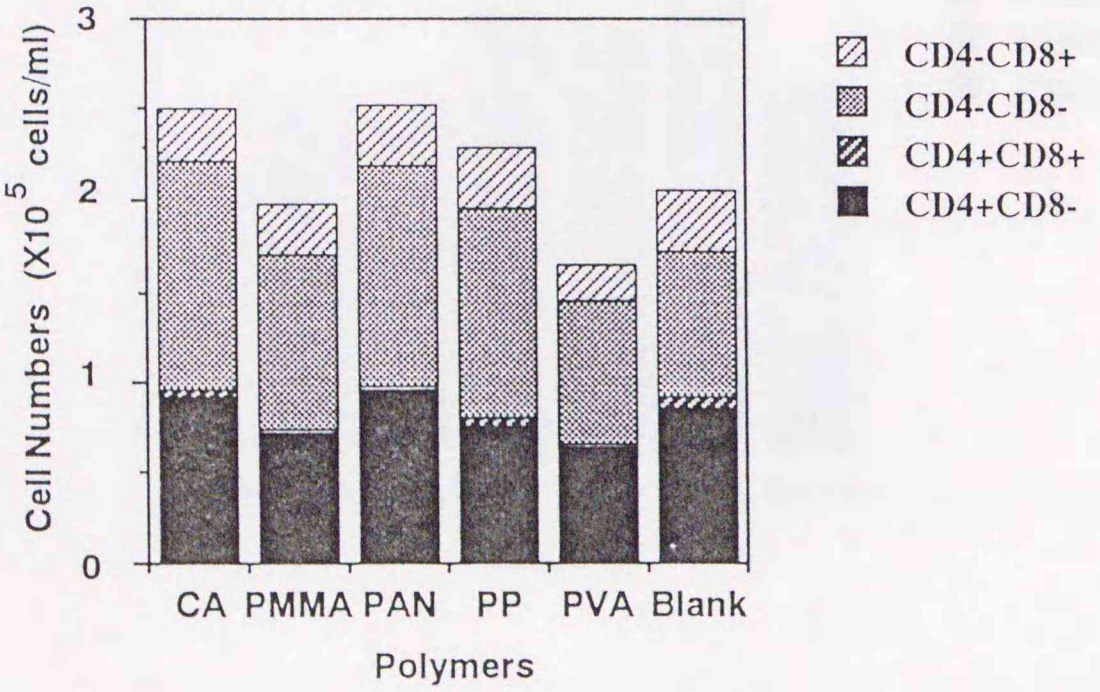
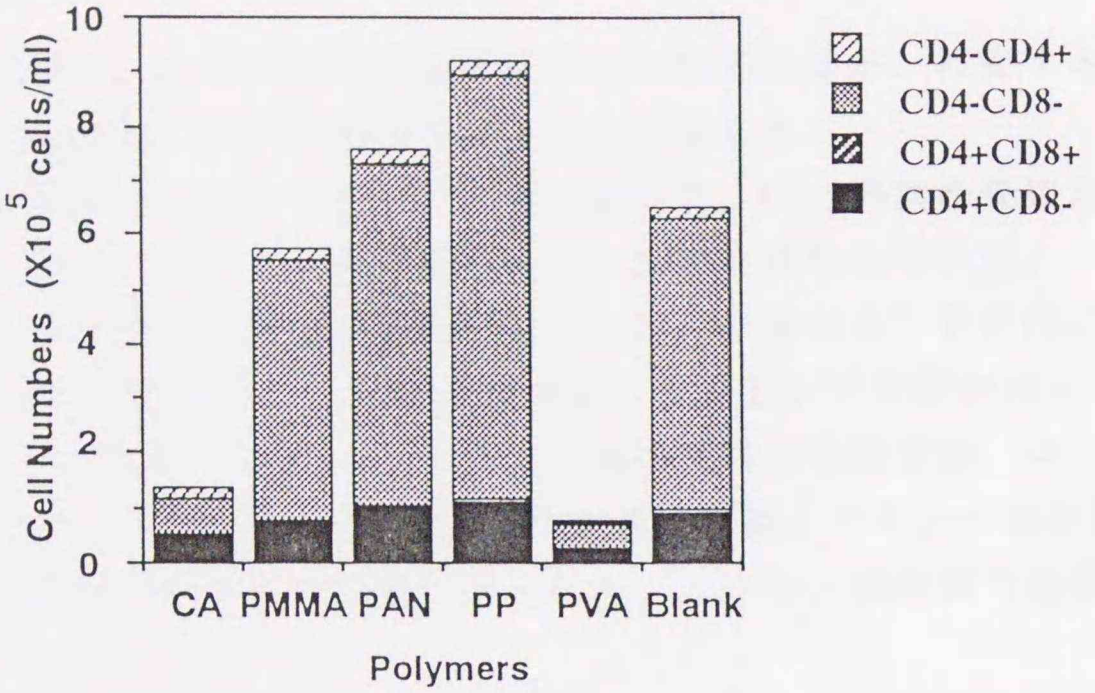



図３－２　PHA 刺激下での48時間培養後における各サブセットの細胞数。
材料とは初期２時間接触
(a)：マウス血清非処理，(b)：マウス血清処理

(a) ms-




(b) ms+

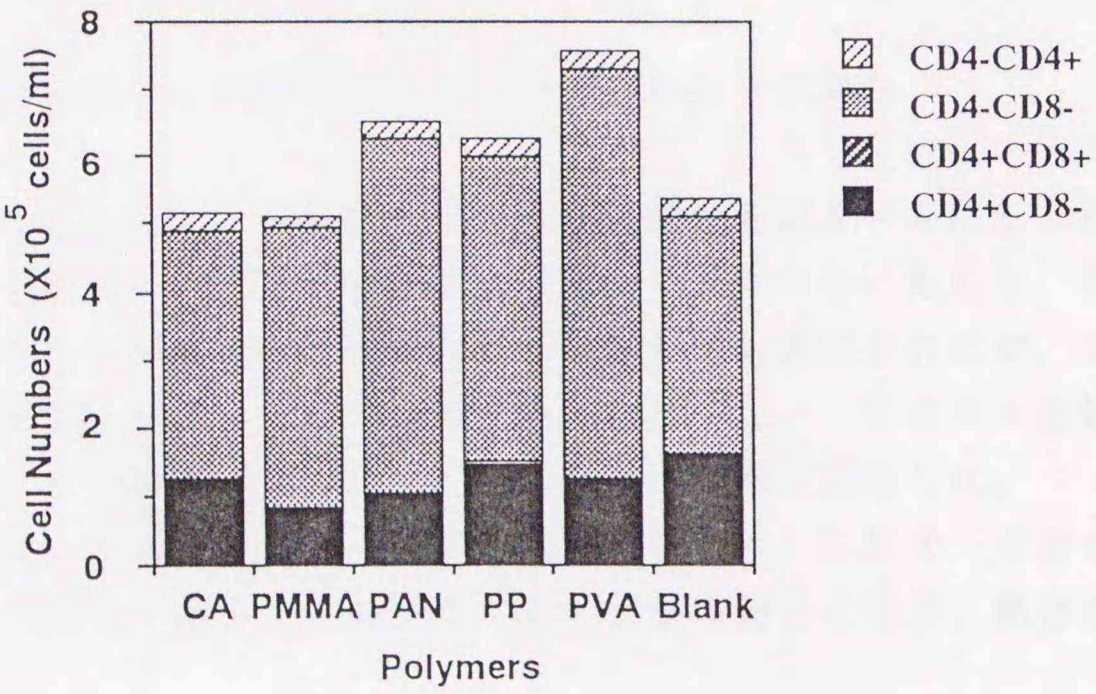



図３－３　LPS 刺激下での48時間培養後における各サブセットの細胞数。
材料とは初期２時間接触
(a)：マウス血清非処理，(b)：マウス血清処理

### 3－3－7　生細胞中における芽球化細胞の割合

マイトジェン刺激は、細胞の芽球化を誘導するわけであるが、培養４８時間後の芽球化細胞の生細胞に対する割合を表３－７に示した。

マウス血清未処理試料と接触したリンパ球において、ConA刺激を受けた場合、ＣＡおよびＰＶＡ群がコントロールに較べわずかながら増加していた。一方，ＰＡＮ群では、芽球化細胞の割合は顕著に減少した。ＰＭＭＡ，ＰＰは、コントロールとほぼ同等の値をとった。PHAで刺激をした場合、ＰＰ群がコントロールに対して著しく高い割合を示した。しかし、他の試料接触群では、コントロールと較べ、顕著な差はみられなかった。LPS刺激群では、コントールと較べＣＡ群で芽球化細胞の割合の著しい減少がみられた。しかし、他の群では顕著な差異はみられなかった。

マウス血清処理試料と接触したリンパ球において、ConA刺激の場合各試料群に顕著な差異は認められなかった。PHA刺激の場合、コントロールに較べ、ＣＡ，ＰＰ群では同等の割合であった。一方、ＰＭＭＡ，ＰＶＡではやや低下の傾向を示し、ＰＡＮでは顕著な低下がみられた。LPS刺激の場合では、芽球化細胞の割合は、コントロールに較べ、ＰＭＭＡ，ＰＡＮ，ＰＶＡではやや低下を示した。また、ＣＡ，ＰＰ群では、顕著にその割合が減少した。

### 3－3－8　ConA刺激による芽球化リンパ球サブセットの割合

ConA刺激により芽球化した細胞のサブセットの割合を表３－８に示した。血清処理を施さない場合、ＣＤ４＋細胞の割合はコントロールに対して、ＣＡ，ＰＶＡで上昇した。この現象は、総細胞中での割合でも観測されたが、コントロール及び他の試料にたいしての差は相対的に縮まった。　ＣＤ８＋細胞は、ＣＡ試料と接触した細胞群で、コントロールの２倍の割合を示した。　一方、ＰＶＡ試料と接触した細胞群では、顕著な減少を示した。ＣＤ４－ＣＤ８－細胞の割合は、ＣＡ試料と接触した細胞群で半分以下の割合となり、顕著に減少した。

試料を血清で処理した場合、ＣＤ４＋の割合は、各試料で、コントロールと大きな差異は認められなかった。ＣＤ８＋細胞では、ＰＡＮおよびＰＰ試料において、コントロールに対する増加がみられた。

また、総細胞中の割合と比較すると、芽球化細胞群では、Ｔ細胞分画であるＣＤ４＋とＣＤ８＋の割合の増加が全試料でみられた。

### 3－3－9　PHA刺激による芽球化リンパ球サブセットの割合

PHA刺激により芽球化した細胞のサブセットの割合を表3－9に示した。　試料に血清を吸着させない場合、　コントロールに対して、ＰＡＮがほぼ同等、ＰＭＭＡ，ＰＰで微増を示した。それに対し、ＣＡでは約2倍、ＰＶＡでは3倍の増加を示した。ＣＤ４－ＣＤ８－細胞群は、ＣＡにおいて顕著な低下がみられる他は、めだった差異は認められなかった。ＣＤ８＋の割合は、ＰＶＡと接触した場合において他の試料に対し、その割合を約半分にしており顕著に低下していた。

血清吸着試料に接触した細胞では、各試料間において、そのサブセットに顕著な差異は認められなかった。

総細胞中のサブセットの割合を比較すると、各試料に接触した細胞群とも、ＣＤ８＋細胞の割合の顕著な増加がみられた。

### 3－3－10　LPS刺激による芽球化リンパ球サブセットの割合

LPS刺激により芽球化した細胞のサブセットの割合を表3－10に示した。血清処理しない試料と接触した場合、ＣＡ試料においてＣＤ４－ＣＤ８－細胞の割合の減少と、ＣＤ８＋の割合の増加がみられた。また、ＰＶＡにおいては、ＣＤ８＋細胞の割合が顕著に減少した。

試料に血清を吸着した場合、サブセットの割合は、各試料間で顕著な差異を認めなかった。

全生細胞中のサブセットの割合を比較すると、各試料に接触した細胞群とも、ＣＤ４－ＣＤ８－細胞の割合の顕著な増加がみられた。

### 3－3－11　芽球化細胞におけるＣＤ４／ＣＤ８の変化

芽球化細胞における、$CD4^+$細胞と$CD8^+$細胞の比をとり表3－11に示した。血清で試料を処理しない場合、ＰＶＡと接触した細胞群で、全てのマイトジェン刺激に対して、顕著に高い値が示された。とりわけ、LPS刺激のもとでは２１倍にも及んだ。試料に対し、血清吸着処理をした場合、ConA，PHA刺激に対しては、このような顕著な差異は認められなくなった。しかし、LPS刺激においては血清成分の存在によりその差は少なくなったが、増加傾向を示し、全生細胞の結果とは異なることが示唆された。

表３－７　生細胞中のBlast cellの割合（％）

| polymers | | CA | PMMA | PAN | PP | PVA | Blank |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| mitogen | ms | | | | | | |
| Con A | - | 41.9 | 29.3 | 16.7 | 33.7 | 42.7 | 35.5 |
| | + | 39.7 | 40.9 | 38.5 | 38.8 | 37.2 | 39.4 |
| PHA | - | 12.9 | 11.7 | 8.2 | 20.3 | 8.7 | 9.1 |
| | + | 19.7 | 14.6 | 9.0 | 21.4 | 14.7 | 22.7 |
| LPS | - | 21.5 | 50.6 | 51.9 | 44.5 | 49.5 | 40.0 |
| | + | 32.6 | 42.4 | 42.9 | 33.8 | 47.2 | 52.9 |

表３－８　Con A刺激のもとでの芽球化リンパ球サブセットの割合

| Polymers | | CA | PMMA | PAN | PP | PVA | Blank |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| ms | sAg | | | | | | |
| - | $CD4^+$ | 29.96 | 17.07 | 17.81 | 22.29 | 39.68 | 21.48 |
| | ++ | 6.59 | 1.58 | 1.85 | 1.40 | 0.88 | 0.89 |
| | -- | 25.09 | 64.61 | 65.77 | 54.25 | 48.49 | 60.35 |
| | $CD8^+$ | 38.36 | 16.73 | 14.57 | 22.06 | 10.95 | 17.28 |
| + | $CD4^+$ | 18.43 | 19.28 | 19.23 | 17.15 | 15.52 | 18.08 |
| | ++ | 2.10 | 2.10 | 2.58 | 2.54 | 1.25 | 1.51 |
| | -- | 58.54 | 55.30 | 48.19 | 52.64 | 62.90 | 64.61 |
| | $CD8^+$ | 20.93 | 23.32 | 30.00 | 27.66 | 20.32 | 15.80 |

表３－９　PHA刺激のもとでの芽球化リンパ球サブセットの割合

| Polymers | | CA | PMMA | PAN | PP | PVA | Blank |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| ms | sAg | | | | | | |
| - | $CD4^+$ | 25.69 | 18.16 | 14.92 | 18.41 | 42.37 | 13.91 |
| | ++ | 7.34 | 4.81 | 6.63 | 6.97 | 5.08 | 6.62 |
| | -- | 16.51 | 37.86 | 27.62 | 33.67 | 30.51 | 34.11 |
| | $CD8^+$ | 50.46 | 39.17 | 50.83 | 40.96 | 22.03 | 45.36 |
| + | $CD4^+$ | 19.86 | 13.67 | 14.25 | 18.89 | 19.23 | 22.05 |
| | ++ | 6.50 | 7.79 | 6.11 | 4.83 | 4.91 | 4.78 |
| | -- | 22.74 | 22.49 | 18.58 | 25.92 | 22.65 | 20.65 |
| | $CD8^+$ | 50.90 | 56.06 | 61.07 | 50.37 | 53.21 | 52.53 |

表３－１０　LPS 刺激のもとでの芽球化リンパ球サブセットの割合

| Polymers | | CA | PMMA | PAN | PP | PVA | Blank |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| ms | sAg | | | | | | |
| - | $CD4^+$ | 6.80 | 7.03 | 7.28 | 5.71 | 5.94 | 6.78 |
| | ++ | 0.65 | 0.30 | 0.25 | 0.41 | 0.14 | 0.63 |
| | -- | 81.88 | 89.76 | 89.38 | 90.05 | 93.64 | 87.88 |
| | $CD8^+$ | 10.68 | 2.91 | 3.09 | 3.83 | 0.28 | 4.71 |
| + | $CD4^+$ | 8.68 | 7.45 | 7.50 | 7.45 | 10.24 | 9.64 |
| | ++ | 0.46 | 0.27 | 0.33 | 0.33 | 0.43 | 0.37 |
| | -- | 86.23 | 88.32 | 88.04 | 87.25 | 86.00 | 85.86 |
| | $CD8^+$ | 4.46 | 3.96 | 4.13 | 4.97 | 3.33 | 4.13 |

表３－１１　４８時間培養後芽球化細胞のＣＤ４／ＣＤ８比

| Polymers | | CA | PMMA | PAN | PP | PVA | Blank |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| mitogen | ms | | | | | | |
| ConA | - | 0.8 | 1.0 | 1.2 | 1.0 | 3.6 | 1.2 |
| | + | 0.9 | 0.8 | 0.6 | 0.6 | 0.8 | 1.1 |
| PHA | - | 0.5 | 0.5 | 0.3 | 0.4 | 1.9 | 0.3 |
| | + | 0.4 | 0.2 | 0.2 | 0.4 | 0.4 | 0.4 |
| LPS | - | 0.6 | 2.4 | 2.4 | 1.5 | 21.2 | 1.4 |
| | + | 2.0 | 1.9 | 1.8 | 1.5 | 3.1 | 2.3 |

## 3－4　考察

前章においても述べたが、本実験に用いたマイトジェンは、それぞれ応答する細胞群が異なっており、刺激後の時間経過とともに、その細胞亜群に変化が生じることが知られている。高分子材料と接触したリンパ球においては、その相互作用によりさらに何等かの変化が生じることも考えられ、また、特に異常応答を示したＣＡおよびＰＶＡについては、その細胞亜群の変化が生じているものと考えられた。そのため、培養４８時間後の表面抗原より、ＣＤ４＋ＣＤ８－、ＣＤ４＋ＣＤ８＋、ＣＤ４－ＣＤ８－、ＣＤ４－ＣＤ８＋の４分画に分類し、各種高分子材料の影響を調べることを目的として、本実験を行った。

まず、調製したマウスリンパ球の細胞のサブセットを調べたところ、末梢血と較べ、ＣＤ４－ＣＤ８－分画のＢ細胞の割合が多く見られたが、これは調製に用いた脾細胞の特徴であり、報告されている割合と大きな差は見られなかった。マイトジェンを加えずに培養した場合には、死細胞が増加することが示され、４８時間後においては、その生存率は２７％となった。それぞれの細胞亜群でみてみるとＣＤ８＋分画の割合が多少減少することが示され、本培養条件においては、サプレッサー／細胞傷害性Ｔ細胞の viabilityが低下することが明かとなった。培養wellに血清成分が吸着している場合には、生存率はさらに低下し、マウス血清成分中に細胞のviabilityを低下させる何等かの因子が存在していることが示されたが、各細胞亜群の割合は、血清成分非吸着系の場合と同じであり、その因子の作用はある特定の細胞に関与する特異的なものでないことが明かとなった。

マイトジェンを加え培養を行ったところ、細胞亜群の割合がマイトジェン非刺激の場合と較べ、大きく変化し、また、その割合が、各マイトジェンそれぞれにおいて差異があることが認められ、４８時間の培養後において、その表面抗原を分析することにより有意義な知見が得られることが確認された。ConA刺激において、その応答に関与しないと考えられるＢ細胞のviabilityが高く維持されているが、ConAなどマイトジェンにより刺激を加えた場合には、それぞれの応答に関与する細胞を活性化し、種々のサイトカインを分泌するわけであり、培養液に含まれるそのサイトカインが他の細胞にも作用し、その細胞の生存率を増加させるものと考えられている。そのため、マイトジェン刺激後の生細胞分画を考慮するにあたっては、特異的な応答に関与する細胞群、及び他の細胞のviabilityに及ぼす影響を踏まえて考慮する必要があるものと考えられる。

以上の結果を基に、リンパ球サブセット変化に及ぼす材料の影響を調べたところ、増殖能において異常応答を示したＣＡとＰＶＡにおいて、やはり大きな変化が生じることが明かとなった。ＰＭＭＡ，及びＰＰにおいては、コントロールと較べ顕著な差は見られず、増殖能においての結果との矛盾は示さなかった。しかし、ＰＡＮにおいては、PHA、及びLPS刺激においてはコントロールとの差異は認められなかったが、ConA刺激においてＣＤ４＋及びＣＤ８＋分画の減少が認められ、特にＣＤ８＋において顕著であった。ＰＡＮはまた、ConA，PHA刺激系において、芽球化細胞中の死細胞の割合が多く、何等かの作用を与えているものかと考えられる。前章で示した増殖能の結果では、ＰＡＮはConA刺激により、コントロールより増加傾向を示しており、このＣＤ４＋，ＣＤ８＋分画の減少の結果を理解するのは困難に思われ、現在のところその理由は明かではない。

ＣＡにおいては、全てのマイトジェンにおいて、Ｂ細胞およびマクロファージの分画であるＣＤ４－ＣＤ８－の減少が見られた。これは前章で述べた通り、ＣＡと２時間接触後、脱離・回収した時点ですでにこの分画の細胞の生存率が低下したことがその理由と考えられる。一方、ＣＤ４＋、およびＣＤ８＋の分画に関しては、ConA，LPS刺激系において、これらの細胞にＣＡは影響を与えないことが示唆された。なぜならば、ConA刺激において、ＣＤ４＋，ＣＤ８－分画の細胞数は、コントロールとの間に有意の差は見られておらず、ＣＡ接触によってもこれらの細胞分画には、大きな影響は与えないものと考えられる。LPS刺激においては、ＣＤ４＋，ＣＤ８＋分画の細胞数はともに減少したが、そのＣＤ４＋／ＣＤ８＋の比は、コントロールと一致している。また、ＣＡにおけるＴ細胞数は、表３－２に示したマイトジェン非刺激系と同等であり、ＣＤ４－ＣＤ８－分画の細胞の減少あるいは機能変化により、LPS刺激により活性化されるマクロファージがダメージを受け、マクロファージ活性化に伴うＩＬ-１などのサイトカインが不足し、ＣＤ４＋，ＣＤ８＋の生存率が減少したものと考えられる。そのように考えた場合、LPS刺激系おいても、ＣＡがそれらＣＤ４＋およびＣＤ８＋の分画の細胞に影響を与えていないことを示唆しているものと思われる。しかし、PHA刺激系においては、ＣＤ４＋分画の細胞数が、コントロールと較べ、顕著に増加するという大きな相違が示された。PHA刺激においては、ConA，LPS刺激と較べ、$G_1$期が長く、４８時間の培養においては、いまだ細胞分裂を生じていないと考えられる。事実、PHA刺激系では、表３－７に示したように芽球化細胞の割合が低く、また死細胞を合わせた総細胞数においても、培養前の数より少ないことが本実験においても示されている。PHA非刺激系と比較し、コントロールにおける細胞分画を見てみると、ＣＤ８＋は変化なく、Ｃ

Ｄ４＋が増加しており、PHAはＣＤ４＋に作用し、その生存率を高めていることを示している。　ＣＡにおいては、その生存率をより高めていることとなり、ＣＡとの接触により、ＣＤ４＋分画の細胞が何等かの作用を受けたこととなる。一方、その作用は、ConA刺激系には関与しないものということとなる。ＣＡによるＣＤ４＋の変化がPHAによる活性化過程に関与するとすれば、その増殖能に影響を与えることが期待される。しかし、前章の増殖能の結果は否定的であった。すなわち、ConA刺激系、PHA刺激系ともに、ＣＡ接触細胞において抑制が見られたが、コントロールと比較した$^{3}$H-thymidine取り込み量の割合は、ConA：５８％に対し、PHA：４３％であり、PHAにおいてその減少率はむしろ大きく、その関連を考えることは困難である。現段階では、PHA刺激系におけるＣＤ４＋分画の増加の理由は明かではなく、その解明は今後の課題である。

ＰＶＡにおいては、全てのマイトジェン刺激において、顕著な減少が見られた。コントロールに対する割合を示すと、ConA刺激系（ＣＤ４＋：５９％、ＣＤ４－ＣＤ８－：２０％、ＣＤ８＋：２０％、PHA刺激系（ＣＤ４＋：５１％、ＣＤ４－ＣＤ８－：１６％、ＣＤ８＋：９％）、LPS刺激系（ＣＤ４＋：３０％、ＣＤ４－ＣＤ８－：９％，ＣＤ８＋：５％）であり、特に、Ｂ細胞分画、およびサプレッサー／細胞傷害性細胞の分画において特に顕著であっり、マイトジェン非刺激系よりも有意に減少することが示された。前章において示したが、ＰＶＡに接触したリンパ球の各分画における細胞数は、脱離・回収した直後においてはコントロールと何ら変りなく、その減少はマイトジェン刺激４８時間後における結果といえる。何故このような影響が生じるのか、興味ある事実であり、増殖能の結果と合わせて考察することが必要となる。前章においては、培養液中に含まれるＩｇＧが関与しうる可能性について述べたが、その仮説はこの細胞亜群変化の結果に関しても否定されないものかと思われる。減少率が相対的に少なかったＣＤ４＋ＣＤ８－の細胞はヘルパー機能を持つ細胞を含むが、ヘルパー機能を示す細胞はＩｇＧに対するＦｃレセプターを有しないことが報告されており[1,2]、Ｆｃレセプターを有するＴ細胞はＣＤ４－ＣＤ８＋により多く存在すると考えられる。また、ＣＤ－ＣＤ８－の分画のほとんどを占めるＢ細胞においてもその多くがＦｃレセプターを有している。これらのことより、マイトジェン刺激後、細胞数が顕著に減少した細胞群はＦｃレセプターを有していることとなる。ＰＶＡに吸着したＩｇＧがこれらの細胞に結合し、その結果、マイトジェン刺激後の生存率に何らかの影響を与えるものとすれば、本実験結果が説明されると考えられる。今後、この仮説に関し、詳細な検討が必要であるが、ＰＶＡ接触後マイトジェン刺激が各細胞に異なった作用を与える事実は、材料を用いた免疫調節の観点からも興味深いものと考えられる。

各試料に血清成分を吸着させた場合には、増殖能の結果と矛盾せず、細胞サブセットにおいてもさほど大きな変化は見られなかった。ＰＶＡに接触後LPS刺激の場合には、相対的にＢ細胞数の増加が見られたが、補体の活性化が関与しているものと思われる。

# 第4章　合成高分子材料とリンパ球の長期接触が及ぼすリンパ球増殖能への影響

## 4－1　はじめに

各種高分子材料が及ぼすリンパ球の影響に関し、第2章、第3章においては、各試料と短期接触後、離脱回収した細胞を用い、マイトジェン刺激を行い、その応答を調べた。その実験条件は、人工透析法などの体外循環における材料－リンパ球相互作用をin vitroにて模擬したものであり、材料との付着、脱離により生ずるリンパ球への影響を調べたわけである。その結果、2時間程度の短時間接触によっても、材料により異なった影響を与えることが明かとなった。人工透析などの体外循環療法をさらに進めた免疫療法を考えた場合、養子免疫などリンパ球を体外に取り出し各種の刺激を加え、増殖培養しリンパ球の機能を誘導し、体内に戻すわけである。しかし現在のシステムでは、汎用的に細胞培養に優れた培養器具を用いており、対象となる細胞に対する機能誘導にどの様な培養基質材料が適切か等という研究はいまだほとんどリンパ球に関してはなされてはいない。よって、マイトジェン刺激によるリンパ球増殖過程において、その材料はいかなる作用を与えるのかを調べることは、材料とリンパ球との相互作用を解明する上で重要であると考えられる。また、第6章で述べる免疫賦活物質固定化材料の開発において、その基質の選択は重要な課題であるが、マイトジェンによる活性過程に及ぼす各種材料の影響を調べることにより有意義な知見が得られるものと考えられる。そのため、本実験では、各種高分子材料上においてリンパ球を培養し、マイトジェン刺激を加えた系において、細胞数増加、及び増殖能に及ぼす各種材料の影響を検討した。

## 4－2　実験方法

### 4－2－1　実験に用いた合成高分子材料

実験に用いた合成高分子材料は、ＣＡ，ＰＭＭＡ，ＰＡＮ，ＰＰ，ＰＶＡであった。試料とするための調整方法は、第2章で記述した方法と同じであった。

### 4－2－2　リンパ球の調整方法

リンパ球はB10マウスの脾臓より抽出したものを用いた。細胞の抽出調整方法の詳細は第2章で述べた方法と同様であった。細胞は最終的に$2\times10^6$個/mlに調整された。

### 4－2－3　試料と接触させたリンパ球の細胞増殖能試験

$2\times10^6$個/mlに調整した細胞浮遊液1mlを各wellに蒔き、800rpmで5分間遠心し、リンパ球を試料へ沈降させた後、炭酸ガス培養器内において37℃で2時間培養した。2時間の培養後、各マイトジェン溶液1mlを液面を乱さないように静かに加えた。マイトジェン添加後、48時間培養後、細胞をpipettingにより試料から分離、浮遊させ、その細胞浮遊液を96well平底マイクロプレートに200μlずつ分注し、$^3$H-thymidine 0.5μCi/mlを20μl加えパルスし、18時間培養した後、グラスフィルター上にハーベストした。測定は液体シンチレーションカウンターを用いて行った。

### 4－2－4　培養後の細胞数の計測

細胞の計数は、ライツ社製蛍光顕微測光装置MT－2によって行った。測定の手順については、第2章で述べた通りであった。

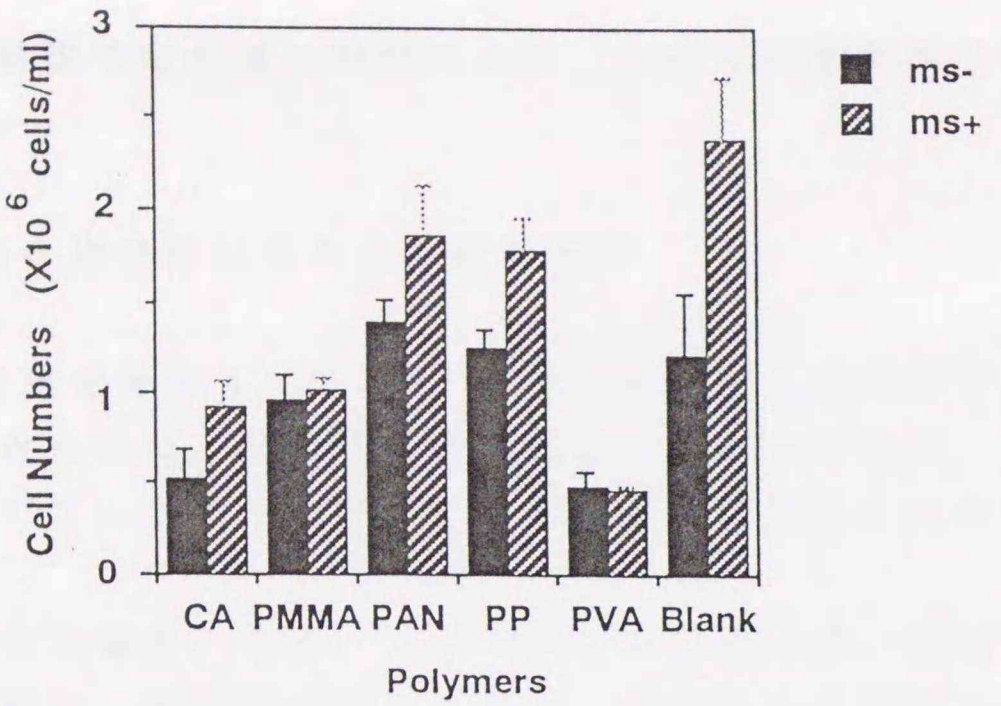
## 4－3　結果

### 4－3－1　ConA刺激後の細胞数に与える試料の影響

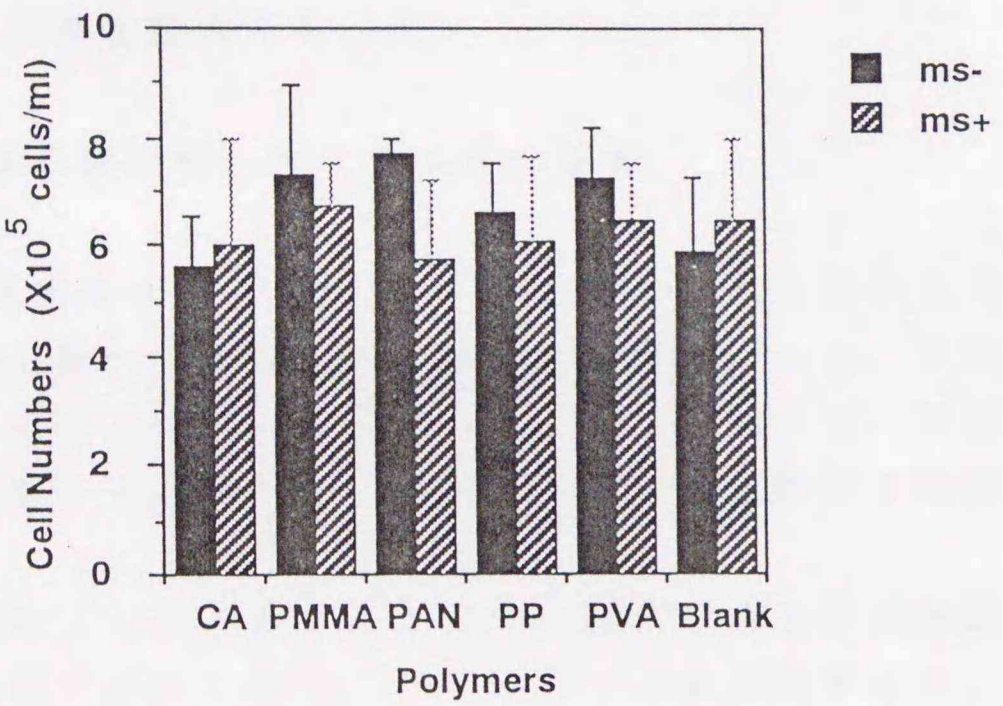
ConA刺激による細胞数変化を図4－1（a）に示した。試料を血清で処理しなかった場合、培養前の初期細胞濃度（$1\times10^6$個/ml）と比較して、CA，PVA試料上で培養した細胞群で半分までその数を減少させた。PMMA試料上にあった細胞群では初期値と変化はみられなかった。PAN，PP，コントロール群では、初期値に較べ若干の増加がみられた。

試料に血清を加え、30分間インキュベートした後、培養液ですすぎ試料表面に血清成分を吸着させ場合、CA試料上の細胞数は、初期細胞濃度と同程度まで回復した。PMMA，PVAでは血清非吸着の場合と変化がなかった。一方、PVAでは細胞数は初期値に較べ低下したままであった。PAN，PP，

(a) Con A




(b) PHA




(c) LPS

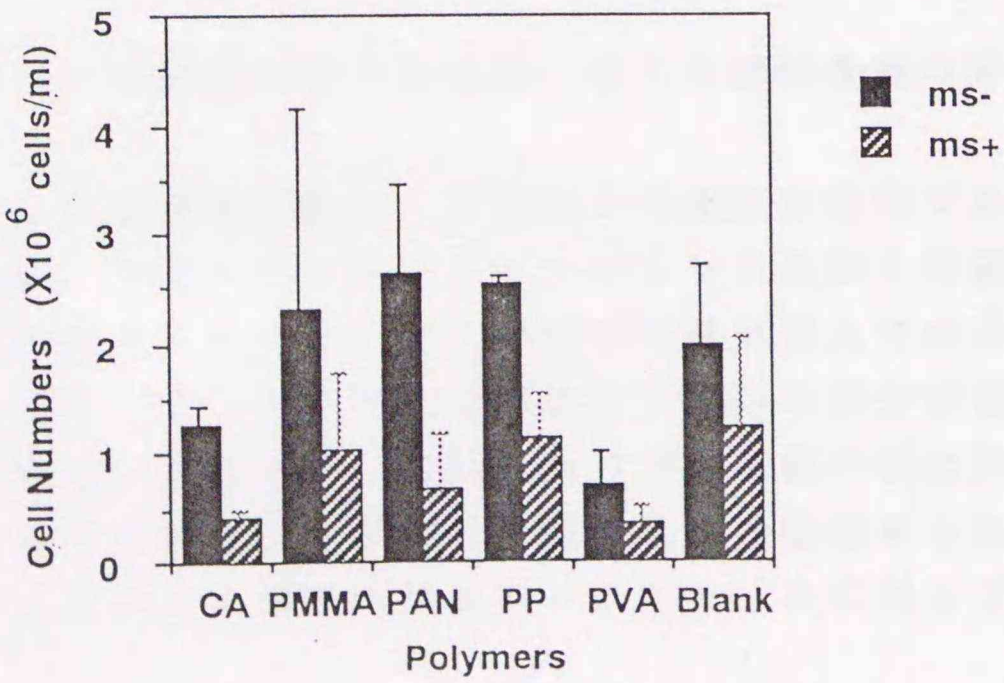



図４－１　試料上での48時間培養後における総細胞数
ms-：マウス血清非処理，ms+：マウス血清処理

コントロール試料上の細胞では血清の吸着により、血清非吸着試料に較べ、細胞数の増加がみられた。

4－3－2　PHA刺激後の細胞数に与える試料の影響

PHA刺激による細胞数変化を図4－1（b）に示した。全ての試料で、培養前の細胞数に較べ減少がみられた。試料を血清で処理しなかった場合、ＰＭＭＡ，ＰＡＮ，ＰＰ，ＰＶＡでコントロール及びＣＡ対し高い値を示したがその差は誤差内であった。

試料に血清を吸着させた場合、ＣＡ，コントロールにおいて、血清非吸着試料上で培養した場合と較べ、細胞数の傾向を見せ、反対に、ＰＭＭＡ，ＰＡＮ，ＰＰ，ＰＶＡでは、血清非吸着試料上で培養した場合に較べ減少傾向を示した。しかしながらその差は誤差範囲内であった。

4－3－3　LPS刺激後の細胞数に与える試料の影響

LPS刺激による細胞数変化を図4－1（c）に示した。ＣＡ試料上で培養した場合、培養前の細胞数に較べ、細胞数の上昇がみられた。一方、ＰＶＡ上で培養した細胞群では、3割ほどの低下がみられた。コントロール，ＰＭＭＡ，ＰＡＮ，ＰＰ試料上で培養した細胞では、培養前に較べ細胞数が2倍以上に及んだ。

血清吸着処理した試料上での培養では、全ての試料で血清非吸着試料上での培養に較べ、細胞数の低下がみられた。コントロールと比較すると、ＣＡ，ＰＶＡでは顕著な減少がみられた。また、ＰＡＮでは若干の減少が観測された。ＰＭＭＡ，ＰＰではコントロールと同等の細胞数であった。

4－3－4　マイトジェン刺激細胞中の生細胞に与える試料接触の影響

ＭＴ－2により測定した回収細胞数は、生細胞と死細胞の総和である。そこで生細胞実数を得るため、フローサイトメトリーにより生細胞と死細胞の割合を測定した。その結果を表4－1に示した。血清非吸着試料上での培養では、全てのマイトジェンに対してＣＡとＰＶＡで顕著に生細胞の割合が低下した。

血清吸着処理をした場合、ＣＡでは、ConA刺激では生細胞の割合が著しく増加した。しかし、その他の刺激では、顕著な生細胞数の増加はみられなかった。ＰＶＡでは、全マイトジェンで生細胞の割合はコントロールに対して低いまま

表４－１　４８時間培養後の生細胞と死細胞の割合（％）

| POLYMERS | | | CA | PMMA | PAN | PP | PVA | Blank |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| MITOGEN | ms | | | | | | | |
| Con A | - | LIVE | 3.56 | 44.68 | 47.38 | 47.86 | 2.23 | 48.33 |
| | | DEAD | 96.44 | 55.32 | 52.62 | 52.14 | 97.77 | 51.67 |
| | + | LIVE | 31.22 | 47.03 | 39.42 | 44.10 | 6.50 | 40.40 |
| | | DEAD | 68.78 | 52.97 | 60.58 | 55.90 | 93.50 | 59.60 |
| PHA | - | LIVE | 8.97 | 28.60 | 25.42 | 18.45 | 2.08 | 20.56 |
| | | DEAD | 91.03 | 71.40 | 74.58 | 81.55 | 97.92 | 79.44 |
| | + | LIVE | 13.29 | 20.71 | 21.63 | 20.52 | 11.02 | 12.18 |
| | | DEAD | 86.71 | 79.29 | 79.37 | 79.48 | 89.98 | 87.82 |
| LPS | - | LIVE | 15.50 | 56.08 | 58.52 | 60.58 | 2.67 | 57.51 |
| | | DEAD | 84.85 | 44.13 | 41.68 | 39.42 | 97.44 | 42.77 |
| | + | LIVE | 39.70 | 46.46 | 58.52 | 60.17 | 17.96 | 57.89 |
| | | DEAD | 60.30 | 53.54 | 41.48 | 40.09 | 82.04 | 42.21 |

表４－２　４８時間培養後の生細胞数及び死細胞数

| POLYMERS | | | CA | PMMA | PAN | PP | PVA | Blank |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| MITOGEN | ms | | CELL NUMBERS(×$10^5$cells/ml) | | | | | |
| Con A | - | LIVE | 0.19 | 4.30 | 6.63 | 6.00 | 0.11 | 5.84 |
| | | DEAD | 5.03 | 5.31 | 7.36 | 6.50 | 4.71 | 6.21 |
| | + | LIVE | 2.88 | 4.76 | 7.36 | 7.89 | 0.30 | 9.69 |
| | | DEAD | 6.34 | 5.36 | 11.3 | 10.0 | 4.39 | 14.2 |
| PHA | - | LIVE | 0.51 | 2.17 | 1.96 | 1.22 | 0.15 | 1.21 |
| | | DEAD | 5.14 | 5.43 | 5.74 | 5.38 | 7.10 | 4.64 |
| | + | LIVE | 0.80 | 1.39 | 1.24 | 1.25 | 0.71 | 0.79 |
| | | DEAD | 5.20 | 5.31 | 4.51 | 4.85 | 5.74 | 5.66 |
| LPS | - | LIVE | 2.00 | 13.0 | 16.1 | 15.5 | 0.19 | 11.5 |
| | | DEAD | 10.8 | 10.1 | 10.3 | 10.1 | 6.83 | 8.50 |
| | + | LIVE | 1.63 | 4.92 | 4.07 | 6.80 | 0.66 | 7.23 |
| | | DEAD | 2.43 | 5.68 | 2.89 | 4.50 | 3.01 | 5.26 |

であった。

4－3－5　培養48時間後の生細胞数及び死細胞数

図4－1で示した総細胞数と表4－1から生細胞と死細胞の数を算定した。結果を表4－2に示した。血清非処理試料と培養した場合、ＣＡとＰＶＡは全てのマイトジェン刺激でコントロールに対して低い値を示した。ＣＡではコントロール試料に対する比で各々、ConA:0.03, PHA:0.42, LPS:0.17であった。ＰＶＡでは、ConA:0.02, PHA:0.12, LPS:0.02であり、ＣＡよりもさらに低いものであった。

試料に血清を吸着させた場合、ConA, LPS刺激のもとではＣＡ, ＰＶＡはコントロールに対して顕著に低い値（ＣＡ；ConA:0.30, LPS:0.23, ＰＶＡ；ConA:0.03, LPS:0.09）をとった。しかし、PHA刺激のもとでは、顕著な差異は認められなくなった。

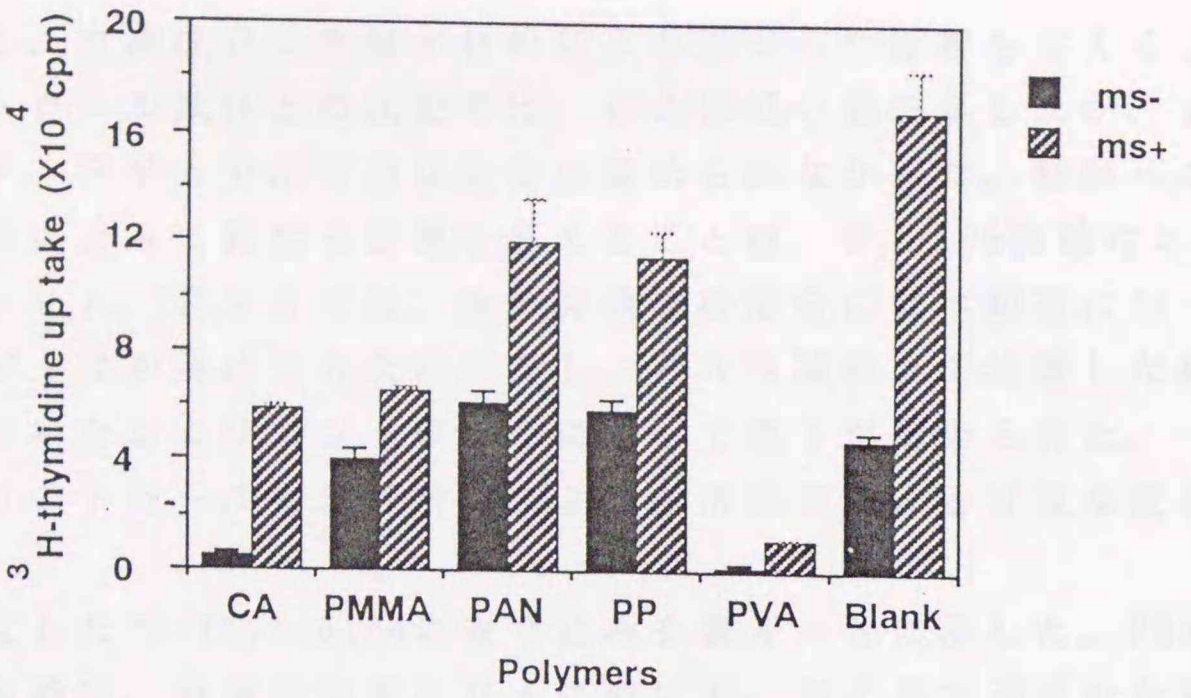
4－3－6　マイトジェン刺激後の細胞増殖能に与える試料の影響

マイトジェンで刺激を行い、試料と共に48時間培養後の$^{3}$H-thymidineの取り込みを図4－2に示した。

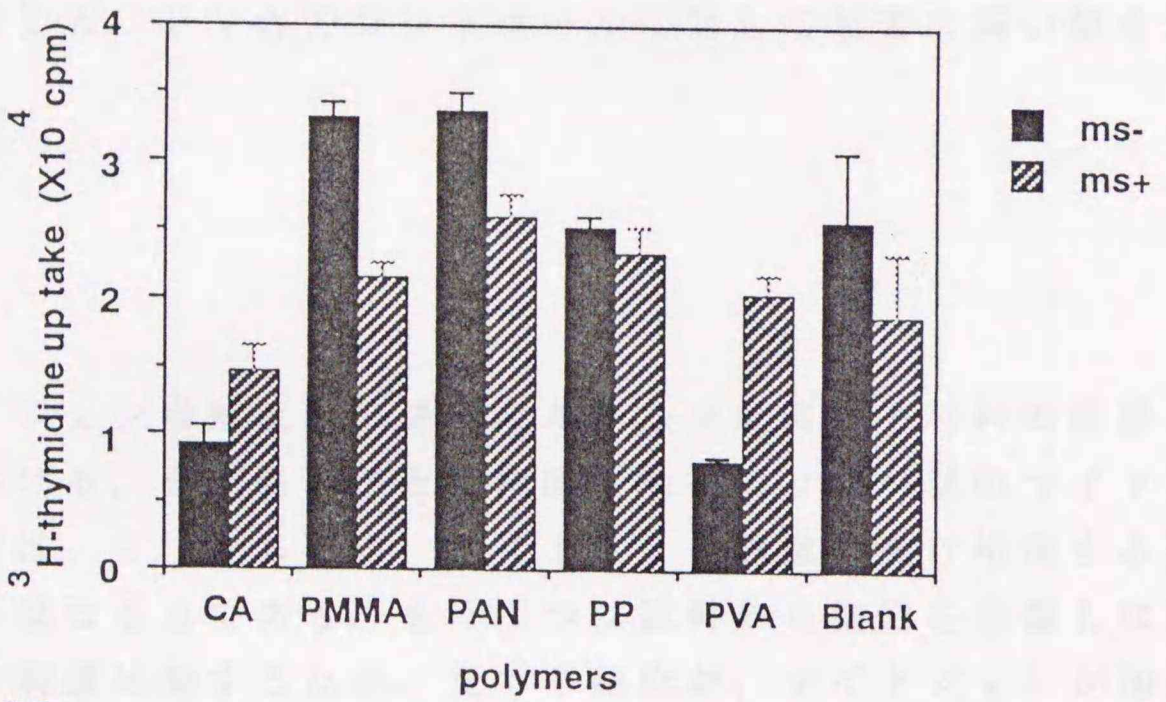
Con A刺激後の増殖能では、マウス血清で試料を処理しない場合（ms-）、ＣＡ試料、ＰＶＡ試料と接触した細胞では、コントロール、及びＰＭＭＡ, ＰＡＮ, ＰＰに対して顕著に$^{3}$H-thymidineの取り込みが抑制された（図4－2(a)）。一方、他の試料間では顕著な差はみられなかった。同様の傾向がLPS刺激のもと血清非吸着試料と培養した場合にみられた（図4－2(c)）。　PHA刺激後の$^{3}$H-thymidineの取り込みにおいても、同様の傾向がみられた。しかしながら、コントロールと比較した値でみると、ConA刺激の場合ＣＡ：12%, ＰＶＡ：4%、LPS刺激でＣＡ：1%, ＰＶＡ：2%に対して、PHA刺激ではＣＡ：35%, ＰＶＡ：31%であり、その低下率はConA, LPSに較べ低かった。

マウス血清吸着処理をした試料上での培養では（ms+）、ConA刺激のもとでは、血清非添加試料と較べて、全ての試料で$^{3}$H-thymidineの取り込みが上昇した。特にＣＡ試料ではその増加は顕著なものであった。コントロールとの比較では、その割合は35%まで回復した。一方、ＰＶＡ試料においては、7%であり依然として低いままであった。PHA刺激では、ＣＡ及びＰＶＡ上で培養した細胞において、血清非吸着処理の場合に較べて$^{3}$H-thymidineの取り込みが上昇が認められた。一方、ＰＭＭＡ, ＰＡＮ, ＰＰ, コントロールにおいては$^{3}$H-thymidineの取り

(a) Con A




(b) PHA




(c) LPS

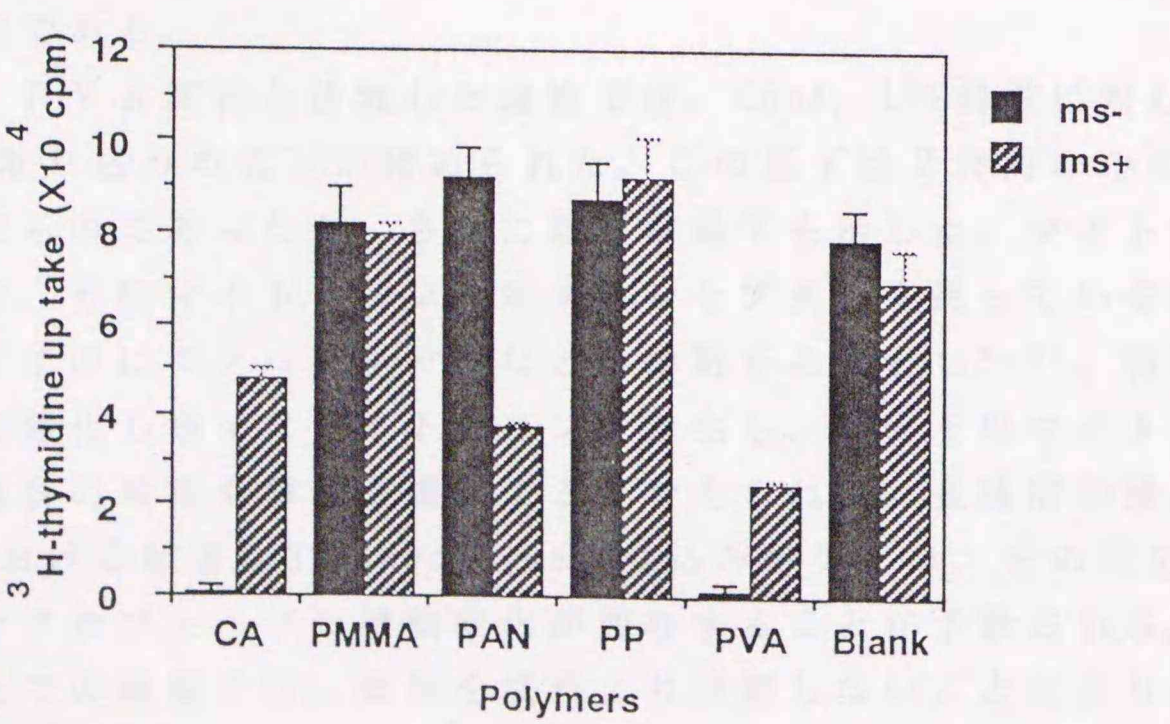



図４－２　各種高分子材料上での培養が48時間後における細胞内への$^3$H-thymidine取り込み量に及ぼす影響
ms-：マウス血清非処理，ms+：マウス血清処理

込み量の低下を示し、血清成分の有無が材料により異なった影響を与えることが示された。コントロール試料との比較では、ＣＡは低い値を示したが、ＰＭＭＡ，ＰＡＮ，ＰＰ，ＰＶＡでは有意な変化は認められなかった。材料への血清成分の吸着が材料によって異なる影響を与えることは、またLPS刺激においても見出いだされた。ＣＡ，ＰＶＡでは、血清非吸着の場合に較べ顕著に$^{3}$H-thymidineの取り込みが上昇が認められたのに対し、ＰＡＮ試料上で培養した細胞では、血清非吸着の場合およびコントロールに対して低下が認められた。一方、ＰＭＭＡ，ＰＰ，コントロールでは試料間および血清処理による有意な変化は認められなかった。

生細胞数で規格化した$^{3}$H-thymidineの取り込みを表４－３に示した。PHA刺激のもとでの細胞増殖能は、血清非吸着ＰＶＡにおいて、第２章で示された短期接触の場合と同様、高い増殖能を示した。一方、LPS刺激において血清吸着試料上での培養においてＣＡ，ＰＶＡでコントロールに対して顕著に高い値を示した。

## ４－４　考察

本章では、マイトジェン増殖反応の過程における合成高分子材料の影響を検討した。第２章における、合成高分子と短時間接触後のリンパ球のマイトジェン反応実験との相違は、１つとしては、マイトジェン刺激を受け増殖する際の基質が各試料により異なる点であり、もう１つは試料から細胞を分離しないでマイトジェンにより刺激培養するため、全ての細胞が、マイトジェンが加えられる時点では、機能があるにしろ失われてるにしろコントロールといっさいその数に変化がない点である。

血清非吸着ＣＡ，ＰＶＡ試料と接触した細胞では、ConA，LPS刺激に対して顕著な$^{3}$H-thymideine取り込みの低下が認められた。この低下は２時間のみの短期接触でも認められたものであったが、さらに顕著な低下を示した。マイトジェンによる増殖反応は、そのマイトジェンに対するレセプターを持っている細胞以外にも増殖を起こすのにマクロファージなどの細胞を必要とし[1,2]、刺激を受けたリンパ球は活性化し様々なサイトカインを産生し、本来そのマイトジェンに反応しない細胞群の増殖や機能を調節すると考えられる。長時間の接触の場合のConA，LPSにおける顕著な3H-thymidine取り込みの低下は、その反応に深く関わるＢ細胞、マクロファージの機能変化が関与することが予想される。血清非吸着ＣＡ試料上での培養では、細胞を試料より分離しないことにより、第

表４－３　生細胞数により規格化した細胞増殖能

| POLYMERS | | | CA | PMMA | PAN | PP | PVA | Blank |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| MITOGEN | MS | | 3H-TDR uptake ($\times 10^4$cpm/($1\times 10^5$cells/ml)) | | | | | |
| Con A | - | LIVE | 3.00 | 0.93 | 0.92 | 0.97 | 1.72 | 0.82 |
| | + | LIVE | 2.05 | 1.37 | 1.64 | 1.46 | 3.86 | 1.74 |
| PHA | - | LIVE | 1.79 | 1.53 | 1.71 | 2.06 | 5.35 | 2.14 |
| | + | LIVE | 1.84 | 1.55 | 2.09 | 1.87 | 2.89 | 2.40 |
| LPS | - | LIVE | 0.05 | 0.63 | 0.57 | 0.57 | 0.94 | 0.69 |
| | + | LIVE | 2.94 | 1.62 | 0.92 | 1.36 | 3.79 | 0.96 |

2章で示されたＣＤ４－ＣＤ８－分画の細胞数の減少がさらに進むこと、すなわち第２章図２－９aで示された細胞の異常が時間という単位で区切りを受けることがないため試料上でのＣＤ４－ＣＤ８－細胞の減少が継続したためであると考えられる。一方、短時間の接触でも認められたが、ＰＶＡ試料上でも同様に活性抑制が認められた。しかし、ＰＶＡ接触２時間後には死細胞数の増大は認められなかった。ゆえに、ＣＡとはその機構を異とすると考えられる。京大筏グループの研究によるとＰＶＡは非常にマクロファージ活性の低い物質でありそのＩＬ-１産生は他の合成高分子上での培養と較べると非常に低いものである[3]。ＩＬ-１はマイトジェンによる作用と同様に、Ｔ細胞を活性化させ、ＩＬ-２の産生を促し[4]、また、Ｂ細胞に対しては分裂増殖分化を促すシグナルペプチドである[5]。長期接触における血清非吸着ＰＶＡ試料上でのConA，PHAに対する活性の顕著な低下はマクロファージを中心とした免疫ネットワークの機能低下が関与する可能性がある。また、血清非吸着ＰＶＡでは、死細胞の割合が全てのマイトジェン刺激で97%以上であり（表４－１）大きく異なり、ＰＶＡ試料上では、細胞死を誘発する何かがあるのかも知れない。一方、PHAで刺激した場合においてＰＶＡは、ＣＡと同程度の$^{3}$H-thymidineの取り込みしか示さなかった。ＰＶＡは、２時間の短期接触の後、分離・回収しPHA刺激で培養した場合ではコントロールと比較して高い値をとっていた。この結果は相反するものに思える。しかし、長時間の接触において、ＰＶＡ試料上でのリンパ球の$^{3}$H-thymidineの取り込みの低下は、繊維芽細胞，マクロファージで細胞の接着率や活性化がＰＶＡ試料上での培養ではきわめて低いことが報告されいることより[3,5]、ＰＶＡはリンパ球の培養基質としても適切ではないと考えられる。しかし、PHA刺激における生細胞数はきわめて少なく、これより細胞１個当たりの$^{3}$H-thymidineの取り込みは、活発であることが考えられる（表４－３）。これよりＰＶＡはPHA反応サブセットのみ生存させることが考えられる。短時間の接触時における反応性を考慮すると、ＰＶＡ試料にはPHA反応サブセットを修飾し何らかの作用により増殖能を高めると考えられる。

また、血清吸着処理を行った場合、ＣＡにおいて、全てのマイトジェンで$^{3}$H-thymidineを指標とする増殖能は回復を見せたが、コントロールに及ぶものではなかった。ＰＶＡにおいては、PHAを除いては、コントロールに対して顕著に低下したままであった。長時間の接触の間には、マウス吸着成分もその吸着状態に変化をもたらすと考えられる。細胞培養前に添加した血清中のタンパク質は、血清量が少ないためDipping effectと同様な効果が起こる可能性があり、本実験で行った簡単なリンスでは、可逆的吸着を示すタンパク質が除けなかったことが考えられる。よって、短時間接触の場合では細胞との接触時間内では、

試料表面吸着マウス血清タンパク質と培養液中のタンパク質は平衡状態へ移行中の段階と考えられ、試料による細胞に対する影響は、マウス血清中の可逆的吸着タンパク質によりマスクされていたと考えられる。一方、長時間の接触では、試料吸着タンパク質が、培養液に対して平衡な状態に移行し、材料による吸着成分の違いや、それによる試料表面のタンパク質のコンフォメーションの違いが現れてくることが予想される。よって、細胞に対する試料の影響は、血清非吸着試料上での培養との違いは少なくなると予想される。ゆえに、細胞の接着初期に試料から与えられる影響以外は、血清吸着試料と血清非吸着試料の性質の差は少なくなると考えられる。このため、短時間接触時にみられたような血清吸着による細胞増殖の大きな回復はみられなくなったと考えられる。

しかし、表４－３に示された正規化された生細胞当たりの$^{3}$H-thymidineの取り込みにおいて、ＬＰＳ刺激において、血清吸着を施したＣＡとＰＶＡでは、コントロール及び他の試料に対して高い値を示した。ＣＡ，ＰＶＡは水酸基を持つため共に補体活性化の高い合成高分子である。補体成分C3のフラグメントC3bは材料表面に吸着する。補体のC3成分がLPSによる細胞増殖能を増強するとの報告があり[7]、この影響が生細胞当たりのLPS反応性の高さに反映された可能性がある。

# 第５章　合成高分子試料上での長期培養におけるリンパ球サブセット変化

## 5－1　はじめに

第４章の結果より、マイトジェン刺激のもと各種合成高分子上での培養において、細胞数，$^{3}$H-thymidineの取り込みに顕著な差異を示すことが認められた。これらの変化がどのリンパ球サブセットにより引き起こされるかを明らかにすることは、リンパ球のサブセット別の培養、機能誘導を材料により増強しようとする免疫調節材料開発にとって重要な課題である。また、第３章で述べた試料との短時間接触後、試料から分離しマイトジェン刺激で４８時間培養したときに起きる変化との相違を明らかにしなければならない。本章では、前章で用いた培養細胞を用いて、フローサイトメトリーにより、細胞表面抗原を解析しそのサブポピュレーション、サブセットの違いを検討した。

## 5－2　実験方法

### 5－2－1　実験に用いた細胞

実験には、第４章で用いた培養細胞を用い、表面抗原の解析に供した。すなわち、細胞浮遊液を合成高分子材料に２時間強制接触させた後、マイトジェンを静かに加え、４８時間培養した後、pippetingにより分離・回収した細胞を用いた。それらの細胞による$^{3}$H-thymidine up take に関する結果は第４章において述べた。

### 5－2－2　モノクロナール抗体による細胞染色および表面抗原の解析

リンパ球サブセットの解析にはFITC標識抗ＣＤ４抗体とPE標識抗ＣＤ８抗体を用いた。細胞の染色方法及びＦＡＣＳｃａｎを用いた解析方法は第３章で述べた方法と同様であった。

## 5－3　結果

### 5－3－1　ConA刺激によるリンパ球総数中のサブセットの割合

ConA刺激のもとで、合成高分子材料と一緒に４８時間培養後のリンパ球サブセットの割合を表５－１に示した。試料を血清で処理していない場合（ms-）、$CD4^+$細胞の割合は、ＰＶＡで顕著な増加を示し、コントロールに較べ５倍にも及んだ。また、ＣＡにおいても$CD4^+$細胞は増加を見せたが、コントロールの２培程度であった。$CD4^-CD8^-$細胞の割合は、ＰＶＡで減少を示した他は大きな差異は認められなかった。$CD8^+$細胞の割合は、ＣＡでは$CD4^+$細胞の割合と異なり、ＰＭＭＡ，ＰＡＮ，ＰＰと差は認められなかった。またコントロールに較べ若干の減少が認められた。一方、ＰＶＡでは$CD8^+$の割合が他の試料に較べ増加がみられた。

試料に血清を吸着させた場合、ＰＶＡ以外の試料上で培養した細胞では、各サブセットの割合で顕著な差は認められなかった。一方、ＰＶＡでは、$CD4^+$細胞ではコントロールの４倍、$CD8^+$細胞ではコントロールの３倍であり、$CD4^-CD8^-$分画の減少がみられた。

### 5－3－2　PHA刺激によるリンパ球総数中のサブセットの割合

PHA刺激のもとで、合成高分子材料と一緒に４８時間培養後のリンパ球サブセットの割合を表５－２に示した。血清非吸着試料と培養した場合（ms-）、各サブセットの割合は、ＰＰでは$CD4^+$細胞の割合がやや高いが、ＰＭＭＡ，ＰＡＮ，コントロールと差異はなかった。一方、ＣＡ，ＰＶＡ試料では$CD4^+$細胞の割合の顕著な増加とそれにともなう$CD4^-CD8^-$細胞の低下が認められた。$CD4^+$細胞の割合はコントロールに較べ、ＣＡでは1.5倍，ＰＶＡでは2.6倍であった。$CD8^+$細胞の割合はコントロールに対してＣＡ：0.8倍，ＰＶＡ：0.7倍の減少が認められたにとどまった。試料に血清を吸着させた場合、ＰＶＡにおいて$CD4^+$で増加傾向、$CD8^+$で減少傾向を示したが、他の試料においては顕著な差はみられなかった。

### 5－3－3　LPS刺激によるリンパ球総数中のサブセットの割合

LPS刺激を加え、合成高分子材料上で４８時間培養後のリンパ球サブセットの

表５－１　ConA刺激のもとでのリンパ球サブセットの割合

| Polymers | | CA | PMMA | PAN | PP | PVA | Blank |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| ms | sAg | | | | | | |
| - | $CD4^+$ | 9.12 | 2.74 | 4.42 | 4.28 | 22.86 | 4.34 |
| | ++ | 0.12 | 0.24 | 0.14 | 0.30 | 1.06 | 0.38 |
| | -- | 86.96 | 93.80 | 91.88 | 91.50 | 67.98 | 90.34 |
| | $CD8^+$ | 3.80 | 3.22 | 3.56 | 3.92 | 8.10 | 4.94 |
| + | $CD4^+$ | 7.20 | 6.12 | 5.94 | 4.68 | 29.62 | 6.78 |
| | ++ | 0.40 | 0.32 | 0.42 | 0.24 | 1.16 | 0.36 |
| | -- | 86.58 | 88.80 | 86.32 | 90.80 | 57.66 | 89.12 |
| | $CD8^+$ | 5.86 | 4.74 | 7.32 | 4.28 | 11.56 | 3.74 |

表５－２　PHA刺激のもとでのリンパ球サブセットの割合

| Polymers | | CA | PMMA | PAN | PP | PVA | Blank |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| ms | sAg | | | | | | |
| - | $CD4^+$ | 36.92 | 22.22 | 22.00 | 31.16 | 61.56 | 24.08 |
| | ++ | 1.85 | 2.37 | 2.22 | 1.67 | 2.61 | 2.31 |
| | -- | 48.75 | 59.70 | 61.96 | 53.67 | 25.28 | 57.49 |
| | $CD8^+$ | 12.48 | 15.71 | 13.81 | 13.50 | 10.54 | 16.12 |
| + | $CD4^+$ | 27.88 | 20.63 | 23.93 | 21.47 | 31.65 | 28.36 |
| | ++ | 2.84 | 2.62 | 1.90 | 1.34 | 1.74 | 1.66 |
| | -- | 57.19 | 62.79 | 63.86 | 63.08 | 55.90 | 53.58 |
| | $CD8^+$ | 12.09 | 13.96 | 10.32 | 14.11 | 10.74 | 16.40 |

表５－３　LPS刺激のもとでのリンパ球サブセットの割合

| Polymers | | CA | PMMA | PAN | PP | PVA | Blank |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| ms | sAg | | | | | | |
| - | $CD4^+$ | 12.58 | 15.02 | 12.27 | 17.78 | 39.65 | 17.71 |
| | ++ | 0.30 | 0.67 | 0.54 | 0.88 | 0.88 | 0.81 |
| | -- | 84.57 | 79.80 | 83.51 | 76.74 | 57.93 | 76.45 |
| | $CD8^+$ | 2.55 | 4.52 | 3.68 | 4.61 | 1.54 | 5.03 |
| + | $CD4^+$ | 20.50 | 18.12 | 13.82 | 16.16 | 23.41 | 16.79 |
| | ++ | 0.92 | 0.71 | 0.77 | 0.70 | 0.40 | 0.35 |
| | -- | 71.69 | 75.54 | 78.70 | 78.99 | 74.09 | 77.13 |
| | $CD8^+$ | 6.89 | 5.63 | 6.72 | 4.15 | 2.10 | 5.22 |

割合を表５－３に示した。マウス血清非吸着試料上で培養した場合（ms-）、ＰＶＡにおいて顕著な変化がみられた。ＣＤ４$^{+}$細胞の割合の著明な増加とそれに伴うＣＤ４$^{-}$ＣＤ８$^{-}$細胞の低下、及びＣＤ８$^{+}$細胞の低下が認められた。また、ＣＡにおいては、ＣＤ８$^{+}$が減少していた。しかし他の試料では目立った差は認められなかった。血清吸着処理を行った場合（ms+）、ＰＶＡはコントロールに対してＣＤ４$^{+}$細胞の割合が増加しており、ＣＤ８$^{+}$細胞の減少が認められた。しかしながらそれ以外には顕著な差異は認められなかった。

### 5－3－4　試料上で培養した細胞のＣＤ４$^{+}$／ＣＤ８$^{+}$比

サブセットの割合では、培養開始前の時点で既にＣＤ４$^{-}$ＣＤ８$^{-}$細胞の割合が70%を占めていた。そのため、ＣＤ４$^{-}$ＣＤ８$^{-}$細胞の割合の変化は分かりやすいが、ＣＤ４$^{+}$細胞とＣＤ８$^{+}$細胞の割合の変化はとらえにくい。よって、ＣＤ４$^{+}$/ＣＤ８$^{+}$比をとることにより、Ｔ細胞に属するこれら細胞群の変化を示す指標とした。表５－４にその比をとった結果を示した。

ConA刺激群では、血清非吸着試料（ms-）において、ＣＡとＰＶＡで、コントロール及びＰＭＭＡ，ＰＡＮ，ＰＰと比較して顕著に高い値を示した。一方、血清吸着試料（ms+）では、ＣＡの値に低下がみられ、他試料と同程度となったが、ＰＶＡ試料上で培養された細胞では、血清添加による変化はわずかであった。

PHA刺激群では、血清非吸着試料においては、ConA刺激と同様ＣＡとＰＶＡで高い値を示した。特にＰＶＡでは顕著であった。一方、血清吸着試料と共に培養した場合では血清非吸着試料に較べると低下はしたが、ＰＶＡはコントロールに対して高い値を示した。

LPS刺激群では、全体として他の刺激群に較べ、高い値を示した。血清非吸着試料では、ＣＡではコントロールの２倍近い値を示した。ＰＶＡではＣＤ４/ＣＤ８比は25.7となり、コントロールの７倍の値を示した。血清吸着試料上で培養した場合、ＣＡではコントロールより若干低い値を示した。またＰＶＡでもコントロールの３倍程度まで減少した。一方、ＰＭＭＡはコントロールと同等の値を示したが、ＰＡＮではＣＤ４/ＣＤ８比は血清非添加時及びコントロールに対して約２／３となり低下した。

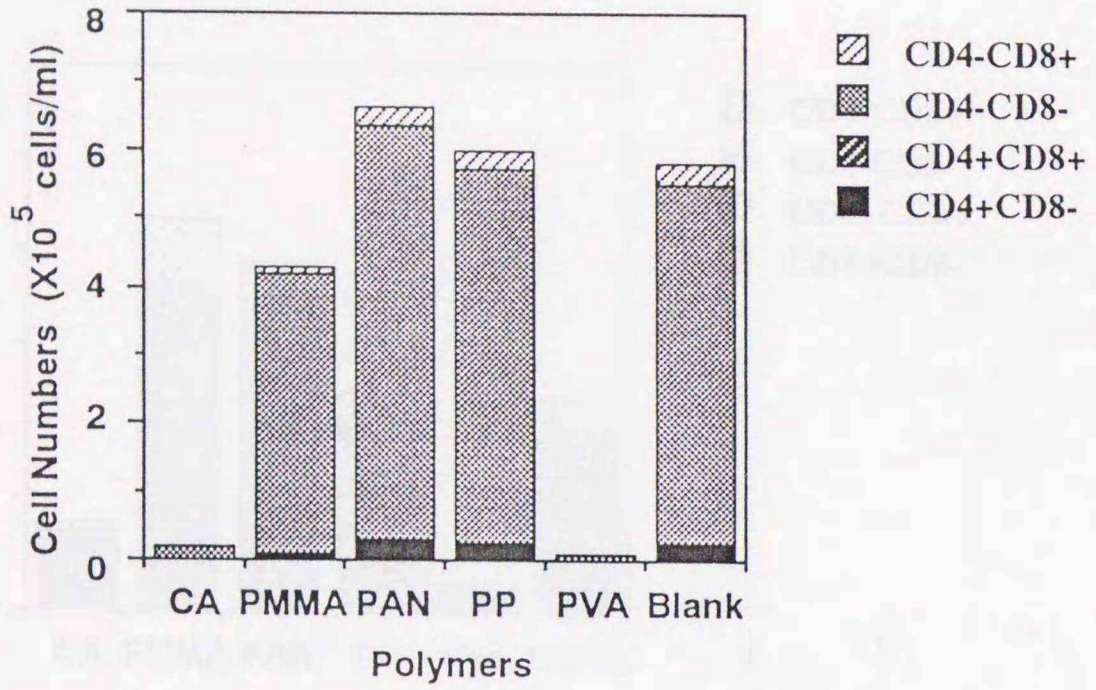
### 5－3－5　各サブセットの細胞数

前章で得られた細胞数をもとに各サブセットの細胞数を算定した。

表５－４　４８時間培養後のＣＤ４／ＣＤ８比

| Polymers | | CA | PMMA | PAN | PP | PVA | Blank |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| mitogen | ms | | | | | | |
| ConA | - | 2.4 | 0.9 | 1.2 | 1.1 | 2.8 | 0.9 |
| | + | 1.2 | 1.3 | 0.8 | 1.1 | 2.6 | 1.8 |
| PHA | - | 3.0 | 1.4 | 1.6 | 2.3 | 5.8 | 1.5 |
| | + | 2.3 | 1.5 | 2.3 | 1.5 | 2.9 | 1.7 |
| LPS | - | 6.7 | 3.3 | 3.3 | 3.9 | 25.7 | 3.5 |
| | + | 3.0 | 3.2 | 2.1 | 3.9 | 11.1 | 3.2 |

(a) ms-




(b) ms+

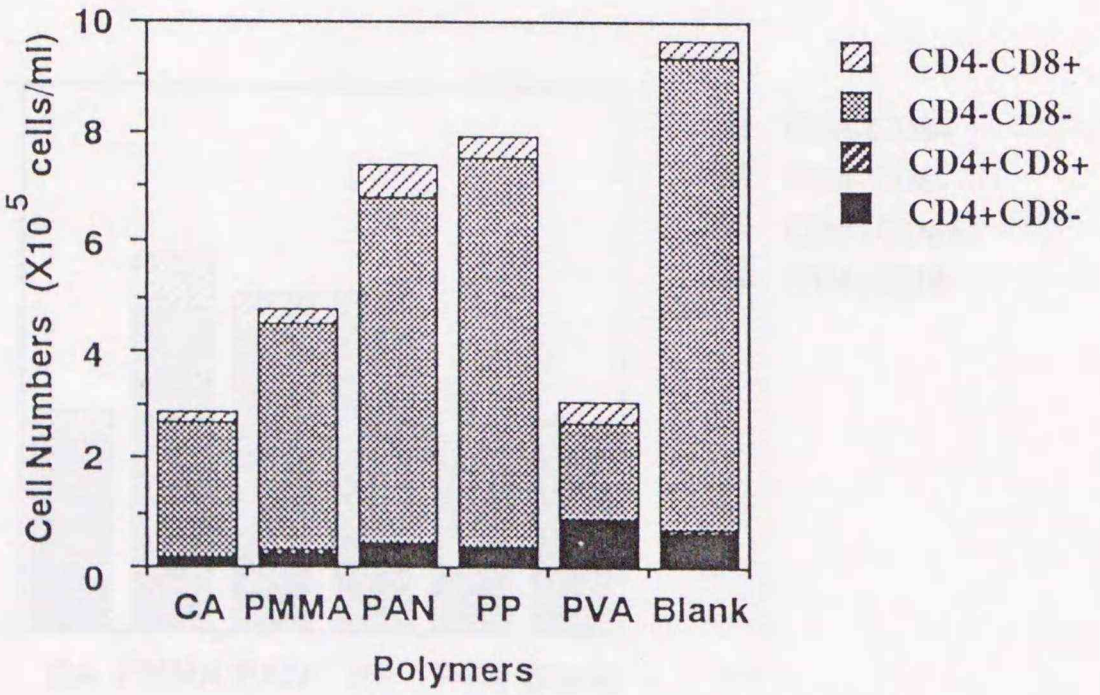
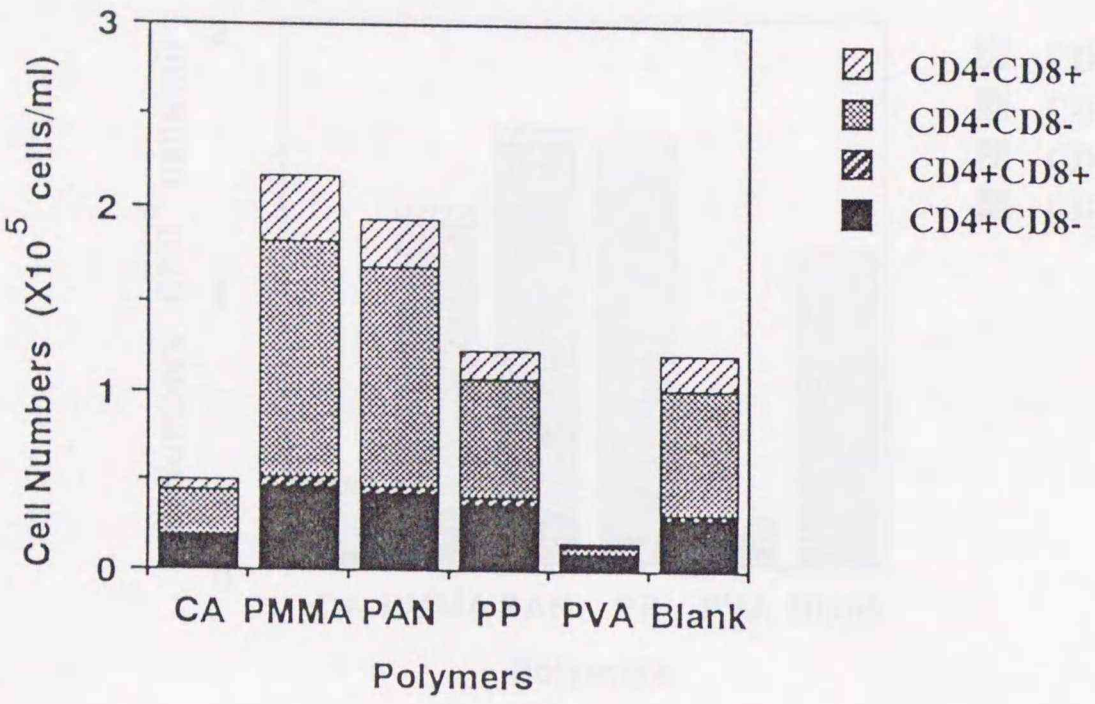



図５－１　Con A 刺激下、試料上で48時間培養後の各サブセットの細胞数。
(a)：マウス血清非処理，(b)：マウス血清処理

(a) ms-




(b) ms+

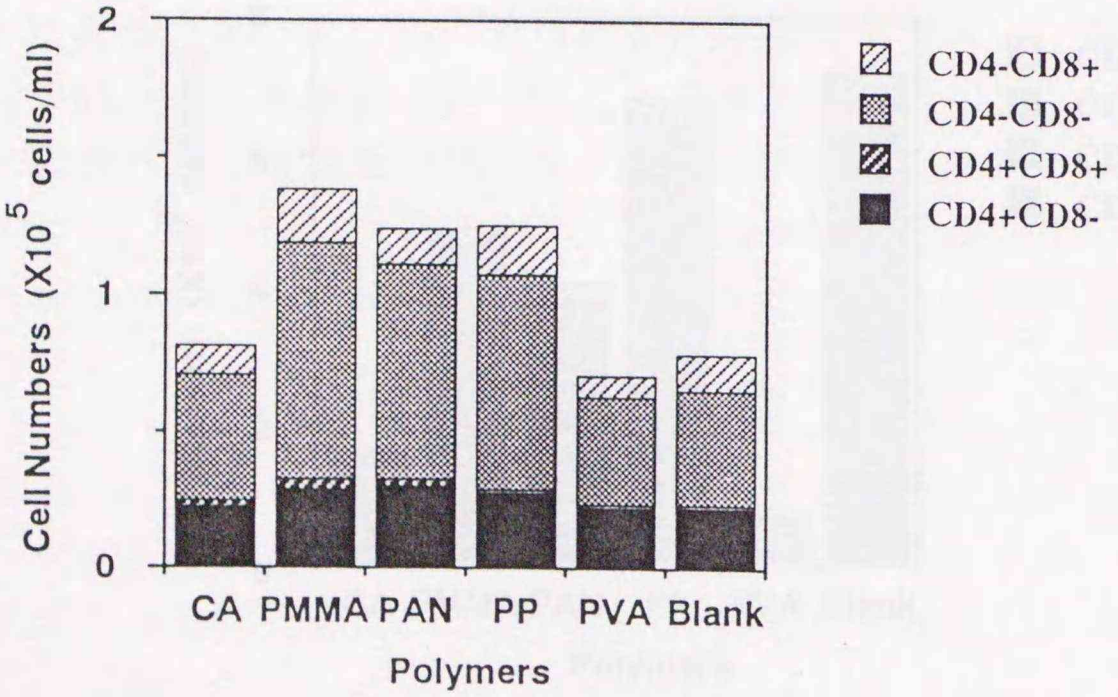
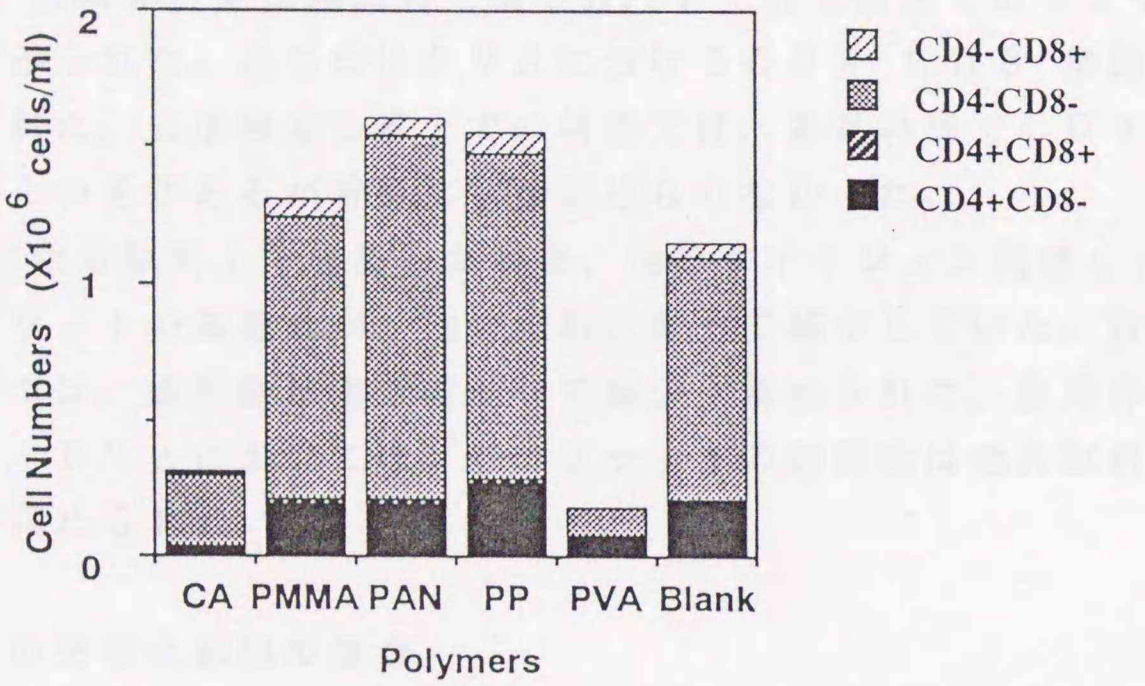



図５－２　PHA 刺激下、試料上で48時間培養後の各サブセットの細胞数。
(a)：マウス血清非処理，(b)：マウス血清処理

(a) ms-




(b) ms+

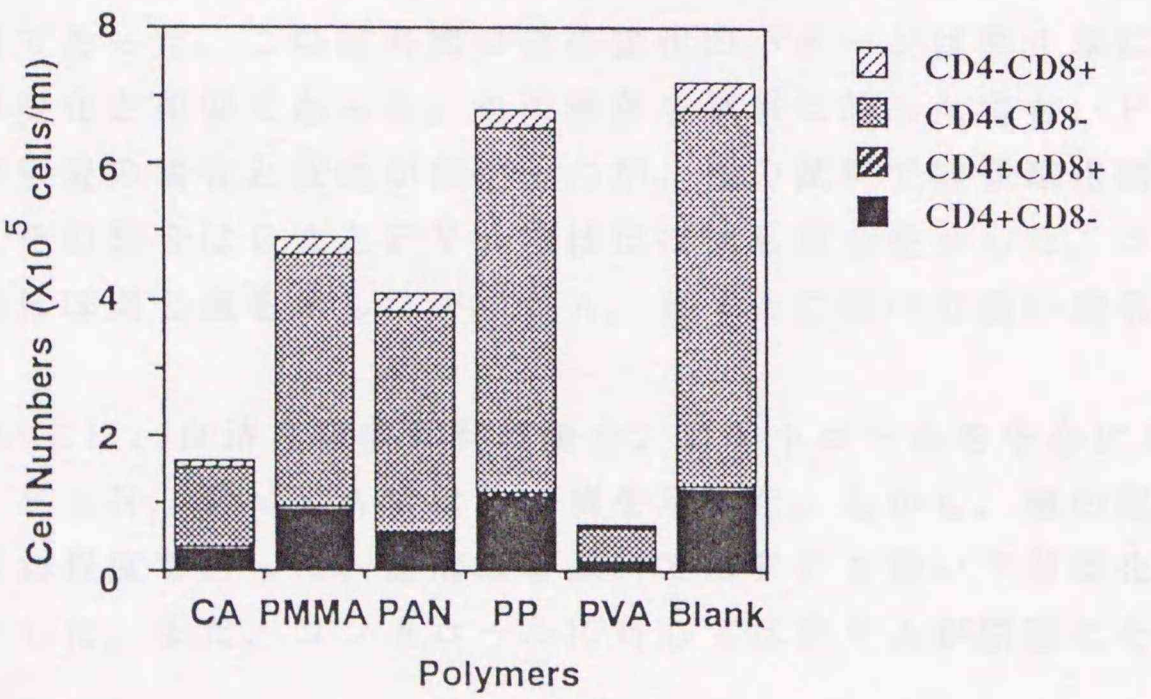



図５－３　LPS 刺激下、試料上で48時間培養後の各サブセットの細胞数。
（a）：マウス血清非処理，（b）：マウス血清処理

ConA刺激のもとでの各サブセットの細胞数を図５－１に示した。血清非吸着試料上で培養した場合、ＣＡ，ＰＶＡでは全てのサブセットで細胞数の顕著な減少がみられた。一方、血清吸着処理をした場合、ＣＡ，ＰＶＡにおいては、ＣＤ４⁻ＣＤ８⁻分画の細胞数の減少がみられた。しかし、ＰＶＡでは、ＣＤ４⁺細胞数が他の試料に対して増加していた。

PHAで刺激した場合、血清非吸着処理試料ではＣＡ，ＰＶＡでは全てのサブセットで細胞数の減少がみられた。とりわけＰＶＡにおけるＣＤ４⁻ＣＤ８⁻細胞の減少が著しく認められた。血清吸着し量上での培養では、各試料間でＣＤ４⁻ＣＤ８⁻分画細胞のばらつきがあるが著明な差は認められなかった。

LPS刺激では、血清非吸着試料上で培養した場合、他のマイトジェン同様ＣＡ，ＰＶＡですべてのサブセットの細胞数が、他の試料に較べて減少していた。血清吸着試料上での培養では、細胞数は全ての試料で減少が認められた。血清非吸着試料と同様、ＣＡ，ＰＶＡにおいては、各サブセットの細胞数は他の試料と較べて顕著な減少が認められた。

### ５－３－６　生細胞中の芽球化細胞の割合

第３章でも触れたが、マイトジェンは細胞を芽球化させる物質であり、芽球化している細胞は分芽増殖しようとしている細胞といえる。芽球化細胞の割合を表５－５に示した。

ConA刺激の場合、血清非吸着試料では、コントロールに対してＣＡとＰＶＡでは顕著な低下、またＰＭＭＡで若干の低下を示した。ＰＡＮおよびＰＰではコントロールと同程度であった。この試料間の値の変化のパターンは第４章における$^{3}$H-thymidineの変化と相似であった。血清吸着を試料に施した場合、ＰＭＭＡにおいて血清非吸着の場合と変化が無かったが、他の試料では芽球化細胞の割合は増加した。その割合はＣＡとＰＶＡではほぼ同じ割合を示した。コントロールとＰＡＮはほぼ同じ値を示したが、ＣＡ，ＰＶＡに較べて高い割合を示した。

PHA刺激の場合においては、血清非吸着試料の場合、コントロールを中心にＣＡ，ＰＶＡでは低く、ＰＡＮ，ＰＭＭＡでは高い値を示した。しかし、値の変化はコントロールの２割程度であった。血清吸着試料ではＰＰを除いて芽球化細胞の割合は低下を示した。また、コントロールに対してはＰＶＡが顕著にその割合の低下を示した。

LPS刺激の場合、血清非吸着試料ではＣＡにおいて8%と顕著に低い値を示した。そのほかの試料では芽球化細胞の割合は50%以上を占めた。

表５－５　生細胞中の芽球化細胞の割合（％）

| polymers | | CA | PMMA | PAN | PP | PVA | Blank |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| mitogen | ms | | | | | | |
| Con A | - | 18.6 | 23.8 | 35.6 | 28.4 | 10.8 | 32.1 |
| | + | 32.6 | 23.6 | 44.5 | 37.2 | 32.3 | 44.9 |
| PHA | - | 36.2 | 50.7 | 54.0 | 35.6 | 36.4 | 44.4 |
| | + | 33.3 | 42.0 | 32.0 | 35.2 | 27.6 | 37.6 |
| LPS | - | 8.6 | 68.3 | 71.9 | 64.1 | 54.0 | 65.0 |
| | + | 58.5 | 59.2 | 59.4 | 69.2 | 73.4 | 64.5 |

血清吸着試料では、ＣＡ試料における芽球化細胞の割合はコントロール程度まで上昇を示した。また、試料間での比較では、ＰＶＡが最も高く芽球化率が7割を超えることが示された。

5－3－7　芽球化細胞中のリンパ球サブセットの割合

芽球化細胞におけるリンパ球サブセットの割合を表５－６（ConA刺激）、表５－７（PHA刺激）、表５－８（LPS刺激）に示した。

ConA刺激においては、生細胞総数中での解析に較べＴ細胞分画であるＣＤ４$^+$とＣＤ８$^+$の割合の上昇がみられた。血清処理しない場合においてはＴ細胞分画はＣＡ，ＰＶＡで顕著に高かった。しかし、血清吸着処理により、Ｔ細胞分画の占める割合はＣＡでは低下をした。この傾向は生細胞総数中での解析で示されたことと同様であった。

PHA刺激においては、ＣＤ８$^+$の割合が生細胞総数中での解析に較べ増加した。また、血清非吸着試料においては、ＣＡとＰＶＡで他の試料及びコントロールに較べや高かった。血清吸着試料との培養ではＣＡ，ＰＶＡにおけるＴ細胞の割合は低下した。この傾向も生細胞総数中での解析で示されたことと同様であった。

LPS刺激においてはＰＶＡにおいて、血清成分の有無に関わらず、ＣＤ８$^+$の低下がみられたが、他の試料に関しては大きな変化はみられなかった。

5－3－8　芽球化細胞中でのＣＤ４／ＣＤ８比

芽球化細胞の中でのＣＤ４／ＣＤ８比を表５－９に示した。

ConAで刺激した細胞では、血清吸着の有無に関わらず、ＣＡとＰＶＡで他の試料より高い値を示した。表５－４に示した総細胞におけるＣＤ４／ＣＤ８においては、ＣＡでは血清成分の吸着により、他試料と同程度となっており、差がみられた。

PHAで刺激した場合においては、血清非吸着ＰＶＡでのみコントロール及び他の試料に対して高い値をとった。一方、ＣＡにおいてはコント路留にたいする顕著な差は認められなかった。

LPSでの刺激では、血清吸着処理の有無にかかわらずＰＶＡ試料のみコントロールに対してＣＤ４／ＣＤ８比の顕著な増加がみられた。

表５－６　ConA刺激のもとでの芽球化リンパ球サブセットの割合

| Polymers | | CA | PMMA | PAN | PP | PVA | Blank |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| ms | sAg | | | | | | |
| - | $CD4^+$ | 32.90 | 8.72 | 9.32 | 11.39 | 54.71 | 12.33 |
| | ++ | 1.51 | 1.26 | 0.67 | 0.91 | 1.66 | 1.31 |
| | -- | 46.88 | 77.52 | 80.70 | 74.75 | 18.67 | 71.23 |
| | $CD8^+$ | 18.71 | 12.50 | 9.32 | 12.94 | 24.95 | 15.13 |
| + | $CD4^+$ | 17.06 | 13.21 | 12.26 | 13.81 | 51.61 | 15.47 |
| | ++ | 1.84 | 2.12 | 1.53 | 1.99 | 2.72 | 1.11 |
| | -- | 61.20 | 64.94 | 70.68 | 73.35 | 24.26 | 75.12 |
| | $CD8^+$ | 6.89 | 19.73 | 15.54 | 10.85 | 21.41 | 8.29 |

表５－７　LPS刺激のもとでの芽球化リンパ球サブセットの割合

| Polymers | | CA | PMMA | PAN | PP | PVA | Blank |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| ms | sAg | | | | | | |
| - | $CD4^+$ | 14.53 | 11.83 | 9.73 | 14.24 | 16.73 | 15.47 |
| | ++ | 1.74 | 0.63 | 0.43 | 0.88 | 1.22 | 0.86 |
| | -- | 80.23 | 83.59 | 86.78 | 81.42 | 80.41 | 81.09 |
| | $CD8^+$ | 3.49 | 3.96 | 3.06 | 3.46 | 1.63 | 4.22 |
| + | $CD4^+$ | 13.44 | 10.90 | 10.33 | 13.17 | 13.92 | 13.30 |
| | ++ | 0.96 | 0.76 | 0.98 | 0.65 | 0.50 | 0.94 |
| | -- | 79.51 | 83.87 | 81.64 | 82.57 | 84.27 | 81.32 |
| | $CD8^+$ | 6.09 | 4.47 | 7.05 | 3.60 | 1.30 | 4.44 |

表５－８　PHA 刺激のもとでの芽球化リンパ球サブセットの割合

| Polymers | | CA | PMMA | PAN | PP | PVA | Blank |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| ms | sAg | | | | | | |
| - | $CD4^+$ | 22.16 | 15.27 | 15.26 | 20.06 | 40.19 | 15.69 |
| | ++ | 9.90 | 7.86 | 7.12 | 4.72 | 10.28 | 8.20 |
| | -- | 27.60 | 38.45 | 44.86 | 36.57 | 28.35 | 35.69 |
| | $CD8^+$ | 40.34 | 38.42 | 32.76 | 38.65 | 21.18 | 40.41 |
| + | $CD4^+$ | 19.21 | 15.20 | 19.08 | 15.95 | 22.76 | 19.57 |
| | ++ | 7.86 | 7.91 | 4.96 | 6.60 | 7.13 | 5.86 |
| | -- | 37.23 | 38.43 | 45.33 | 36.16 | 36.47 | 30.62 |
| | $CD8^+$ | 35.70 | 38.46 | 30.63 | 41.29 | 33.64 | 43.95 |

表５－９　４８時間培養後の芽球化細胞のＣＤ４／ＣＤ８比

| Polymers | | CA | PMMA | PAN | PP | PVA | Blank |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| mitogen | ms | | | | | | |
| ConA | - | 1.8 | 0.7 | 1.0 | 0.9 | 2.2 | 0.8 |
| | + | 2.5 | 0.7 | 0.8 | 1.3 | 2.4 | 1.9 |
| PHA | - | 0.5 | 0.4 | 0.5 | 0.5 | 1.9 | 0.4 |
| | + | 0.5 | 0.4 | 0.6 | 0.4 | 0.7 | 0.4 |
| LPS | - | 4.2 | 3.0 | 3.2 | 4.1 | 10.3 | 3.7 |
| | + | 2.2 | 2.4 | 1.5 | 3.7 | 10.7 | 3.0 |

## 5－4　考察

第４章までで、ＰＶＡにおけるPHA反応性増強が顕著に観察され、ＰＶＡ接触細胞が何らかの作用を受け機能変化することが明かとなった。ＣＡでは血清非吸着の場合、接触時におけるＣＤ４⁻ＣＤ８⁻分画のダメージにより、細胞の増殖反応性が抑制されると考えられた。さらに長時間の材料上での培養では、血清非吸着ＣＡ，ＰＶＡ試料で増殖過程にＣＤ４⁻ＣＤ８⁻が主となる、または必要とするConA，LPSで細胞の増殖反応が他の試料に較べ、顕著に低いことが認められた。よって、マイトジェン刺激中での合成高分子材料の存在が、各サブセットの割合・数に影響を与えるかを目的とし、本実験を行った。

血清非吸着ＣＡおよびＰＶＡにて、ＣＤ４／ＣＤ８比を調べた結果、この値が全てのマイトジェンで、他の試料と較べて増加していた。また血清吸着試料においてもLPS刺激の場合、この値が有意に増加していた。しかし、これは短期接触の場合、血清非吸着ＰＶＡにおいてのみ観察された現象であった。LPSはＴ細胞には関与しないマイトジェンである。この原因は、各サブセットの細胞数から検討した結果、培養基質としてのＰＶＡが顕著にＣＤ８＋の細胞数を減じることに原因があると考えられる。血清吸着によりその影響は緩和されるが、ＰＶＡはＣＤ８＋細胞存在に不利な環境であることが考えられる。血清非吸着ＣＡにおいても同様に、PHA刺激以外は、ＣＤ４⁺にたいして、ＣＤ８⁺細胞数の低下によりＣＤ４／ＣＤ８値が低下していた。

血清吸着ＰＶＡでは、ConA刺激のもとでＣＤ４／ＣＤ８の低下は認められなかった。細胞数からみると、ＣＤ８⁺細胞数はコントロールと同等なのに対し、ＣＤ４⁺細胞がコントロールよりも増加していることに起因していた。しかし、前章で検討した$^{3}$H-thymidineの取り込み量では、コントロールと比較すると顕著低いことが認められた。また、細胞数では脾臓取り出し直後に較べると、ＣＤ４⁺細胞数は50％、ＣＤ８⁺細胞が38％であった。無刺激での培養と較べると、その４８時間後の細胞数はＣＤ４⁺が1.8倍、ＣＤ８⁺細胞が1.3倍であった。これらの結果より、血清吸着ＰＶＡ試料上におけるＣｏｎＡ刺激では、４８時間後の細胞増殖能は低下するが、Ｔ細胞サブセットの４８時間後の細胞数の減少は少ないといえる。総細胞数の低下は、主として、ＣＤ４⁻ＣＤ８⁻分画細胞によるものである。しかし、Ｔ細胞分画の細胞数と$^{3}$H-thymidine取り込みの不一致については現在のところ不明であり、経時変化などの更なる検討が必要である。

同じ血清吸着ＰＶＡ試料上の増殖でも、LPS刺激ではＴ細胞分画の細胞数は、血清非吸着ＰＶＡと同様、著しい減少がみられた。また、第４章で示されたが、

血清吸着ＰＶＡ試料上での　LPS活性は、$^{3}$H-tymidine取り込みでみる限り、コントロールに対して顕著に低いものであった。血清吸着ＰＶＡ試料では、細胞付着性が低くマクロファージの活性が低いことが考えられる。マクロファージの産生するＩＬ-１は、Ｔ細胞に対してＴ細胞増殖因子であるＩＬ－２の増殖トリガーとなるサイトカインである。LPSからの直接的な増殖活性を受けないＴ細胞はＩＬ-１の協力なしでは当然のように増殖活性は起こらないと考えられ、Ｔ細胞分画は、自然とその数を減少することが予想される。また、ＰＶＡは繊維芽細胞や、マクロファージの場合と同様に培養基質として適さないことが考えられ、細胞数を著しく減少させたことも予想される。材料-血清-マイトジェンの作用による細胞のviabilityは今後の検討を要する問題である。

PHAはＣＤ８$^{+}$よりはＣＤ４$^{+}$を選択的に活性化するマイトジェンである[1)]。血清非吸着試料において、ＰＭＭＡ，ＰＡＮ，ＰＰではコントロールと較べＣＤ４$^{+}$細胞数は同等であった。一方、ＣＡ，ＰＶＡではＣＤ４$^{+}$細胞数は減少を示していた。これは前述の通り、培養基質としてＣＡ，ＰＶＡは適さない可能性があることに起因すると思われる。しかし、血清吸着試料上での培養では、ＣＤ４$^{+}$細胞数がＣＡ，ＰＶＡで他の試料と差異がなくなることにより、血清吸着処理によるＣＡ，ＰＶＡの表面正常の変化により、細胞増殖を抑制する効果が減少したと思われる。

前章において、ＣＡ，ＰＶＡは血清成分で処理することにより、補体成分C3を活性化し、その活性化にともない生ずるC3bがＣＡ，ＰＶＡに吸着し、Ｂ細胞のLPS反応性を高めるのではないかと考察した。しかし、生細胞中での各サブセットの割合・数からこのことを検証することはできなかった。だが、細胞の芽球化率では、血清吸着処理を施したＰＶＡにおいて、全てのマイトジェン刺激中最大の芽球化率を示した。この数字を有意とするかについては本実験では不十分であり、培養時間を変えた測定などが必要と思われる。

# 第６章　免疫賦活物質固定化に関する基礎的研究

## ６－１　はじめに

### 免疫賦活物質の固定の試み

前章までにおいて、汎用合成高分子材料によっても免疫系に種々の影響を与えることを明かとしたが、体外免疫調節法など、より積極的な免疫調節を行う材料としては、さらに特異的、かつ作用効果の高い材料が必要と考えられる。その免疫調節材料の開発をめざした場合、一つの方法として、各種免疫賦活物質の固定化材料が考えられる。事実、これまでにもLPS固定化材料[1,2]、ＰＷＮ固定化材料[3,4,5]などが開発され、動物を用いた実験が行われているが、固定化基材の影響等、明らかにしなければならない課題は多い。そのため本研究では、基材としてエチレン－ビニルアルコール共重合体（EVAL）各種、及びポリエチレン、ポリビニルアルコールを用い、生理活性物質としてインターロイキン２（IL-2）を固定化し、その力価を評価した。基材に用いた合成高分子は単純な化学組成、かつ親水性から疎水性までの影響を調べるのに最も適切であり、また血漿分離膜としても実用化されているものである。また、ＩＬ－２は免疫細胞間のシグナル伝達物質でおもにＴ細胞を調節し、また癌の治療法として注目を浴びているＬＡＫ細胞を誘導することが知られている。力価の評価についても、測定方法としてのバイオアッセイが簡便に確立されているため、細胞刺激物質のモデルとして選択した。

## ６－２　実験方法

### ６－２－１　担体の作成

担体はガラスビーズにポリマーを solvent-casting method によりコーティングしたものを用いた。ガラスビーズは直径212～300μm（SIGAMA No.G-9143 GLASS BEADS）を濃硫酸で洗浄、蒸留水ですすいだ後、乾燥させたものを用いた。

ポリエチレンは、Aldrich社製high densityをトルエンにて加熱溶解し、常温に戻した後、Whatman社製フィルターペーパー４を用いて凝集したものを除き溶液を得た。ポリビニルアルコールは、Aldrich社製Average M.W.86000を蒸留水にて加熱溶解した。ＥＶＡＬはクラレより提供されたポリエチレンモル比47,32,27%のものをジメチルスルホキシドにより加熱溶解した。各溶液は、SIGMA社製GLASS BEADS 212-300 micronsに十分馴染ませた後テフロンシート上にてsolvent-casting methodによりコーティングした。コーティングの可否は濡れの状態および走査型電子顕微鏡による観察により確認した。ポリマーによってコーティングされたガラスビーズは、ステンレス製篩により500μm以上の大きさを持つ凝集塊を除いた後2.5M Gyのγ線照射により滅菌した。

６－２－２　試料への免疫活性物質の固定方法

（１）物理吸着による方法

インターロイキン２（IL-2）は武田製薬製TGP-3を用いた。無菌操作の下で合成高分子をコーティングしたビーズ試料を1.0gずつポリプロピレン製遠沈管に分注した。炭酸ナトリウム重炭酸ナトリウム緩衝液pH.9.0にて1000U/mlに調整したIL2溶液を1ml加え、室温にて16時間振蕩した。試料に吸着した以外のIL2を除くため洗浄操作が必要であるが、その洗浄法による違いを見るためにめに、IL2溶液の上清を吸引除去した後、試料をそれぞれポリオキシフェニル（10）オクチフェニルエーテル1%水溶液（Triton X）、Hanks平衡緩衝液（HBSS）、牛胎児血清（FBS）の３種類の溶液により洗浄し、2mlの各溶液を加え、１時間振蕩した。振蕩の後上清を吸い取り、10mlの蒸留水を加え、1時間振蕩した。最後にガラス吸引濾過器により、200mlの蒸留水で洗浄し、水分を除去した。

（２）化学試薬による共有結合法

グルタルアルデヒドによる固定方法

各ビーズ試料1gに、グルタルアルデヒド5%溶液（Ｇ．Ａ原液25%液を用いて、溶液質量50g調整として、$H_2O$ 34ml, $Na_2SO_4$ 5g, $H_2SO_4$ 1ml, GA 10ml）を10ml加え、50℃恒温槽中で１時間振とうした。蒸留水で洗浄の後、ＩＬ-２（武田製薬TGP-3）1000unitを燐酸緩衝液（pH7.4）加えた溶液1mlを添加し、３時間常温にて振とうした。ＩＬ-２結合後残っているグルタルアルデヒドの活性部位を潰すために、0.5Mグリシン水溶液を加え、３時間常温にて振とうした。　　その後、

TritonX（ポリオキシフェニル(10)オクチフェニルエーテル1%水溶液）1ml中に１０分間漬けた後、ガラスフィルター上で蒸留水にて洗浄した。

ビスオキシランによる固定方法[6,7]

各ビーズ試料1gに対して1mlの1,4-ブタジオールグリシルエーテルと、2mgの$N_aBH_4$を含む0.6M NaOH 1mlを加え、常温中にて８時間振とうした。その後グラスフィルター上で蒸留水により十分洗浄した。ＩＬ-２1000unitを含む炭酸ナトリウム重炭酸ナトリウム緩衝液（pH9.0）1mlを試料に加え、常温で１５時間カップリング反応を行った。0.5Mグリシン水溶液1mlを加え、常温にて３時間おいた後、Triton X に１０分間漬けた。その後ガラスフィルター上で蒸留水にて洗浄した。

エピクロロヒドリンによる固定方法[6,8]

各ビーズ試料1gに対して、蒸留水1.5ml, 2M NaOH 0.65ml, エピクロロヒドリン0.15mlを順次加え、40℃で２時間振とうした。これにより担体表面をエポキシ化した。その後グラスフィルター上で蒸留水で十分洗浄した。25%アンモニア水を1.2ml加え、40℃で1.5時間振とうした。蒸留水で洗浄後、さらに0.1M NaCl で洗浄した後、0.1M NaClに懸濁した。そこに無水コハク酸0.8gを少量ずつ加えた。その間、20% NaOH を加え、pHを６に保った。アルカリを消費しなくなった後、室温にて５時間放置した。その後、上清を除去して0.1M NaOH 2ml を加え、室温にて３０分間放置した。蒸留水で洗浄した後、5%カルボジイミド（ドータイトＷＳＣ）燐酸緩衝水溶液（pH5.8）2mlを加え、40℃で３時間振とうした。pH7.4燐酸緩衝液で洗浄後、ＩＬ-２ 1000unit を含むpH7.4燐酸緩衝液を加え、室温で3時間カップリング反応を行った。カップリング後の処理はビスオキシランによる方法で述べたのと同様であった。

６－２－３　ＩＬ-２活性の測定

ビーズ試料の活性測定

ＩＬ-２の活性はＩＬ-２依存性マウスクローン細胞株CTLL-2によるバイオアッセイにて評価を行った。ＩＬ-２固定化終了後の試料は直ちに２４well培養プレートに移し変えた。各試料の量は0.7g/wellであった。10%FCSを含むRPMI-1640培養液1mlを加え、遠心してビーズの間にたっまっている気泡除去、その後４

×１０$^4$個/mlに調整されたCTLL-2細胞浮遊液1mlを加え、２４時間培養した。なお、細胞は自然沈降させた。培養終了８時間前に、$^3$H-thymidineを5μCi加えた。培養終了後、pippetingにより細胞を機械的に試料から分離、浮遊させ、96wel l培養プレートに200μlずつトリプリケートで蒔き直し、セルハーベスターによりグラスフィルター上に回収した。放射線の測定は液体シンチレーションカウンターにて行い、結果はcpmで表した。

遊離ＩＬ-２の力価測定

ビーズ分注後、細胞培養液2mlを加え一定時間37℃インキュベータに静置したのち、上清を静かに1ml試験管に取った。上清は100μlずつ96穴培養プレートに分注した。そこに4×10$^4$cells/mlに調整した細胞浮遊液を静かに加え、上清中のIL2の力価を測定した。なお、ビーズは残った上清を除去した後に、培養液2mlで２回洗浄したのちCTLL-2細胞にて残った力価を測定した。

## ６－３　結果

### ６－３－１　ＩＬ-２の力価及び試料の影響

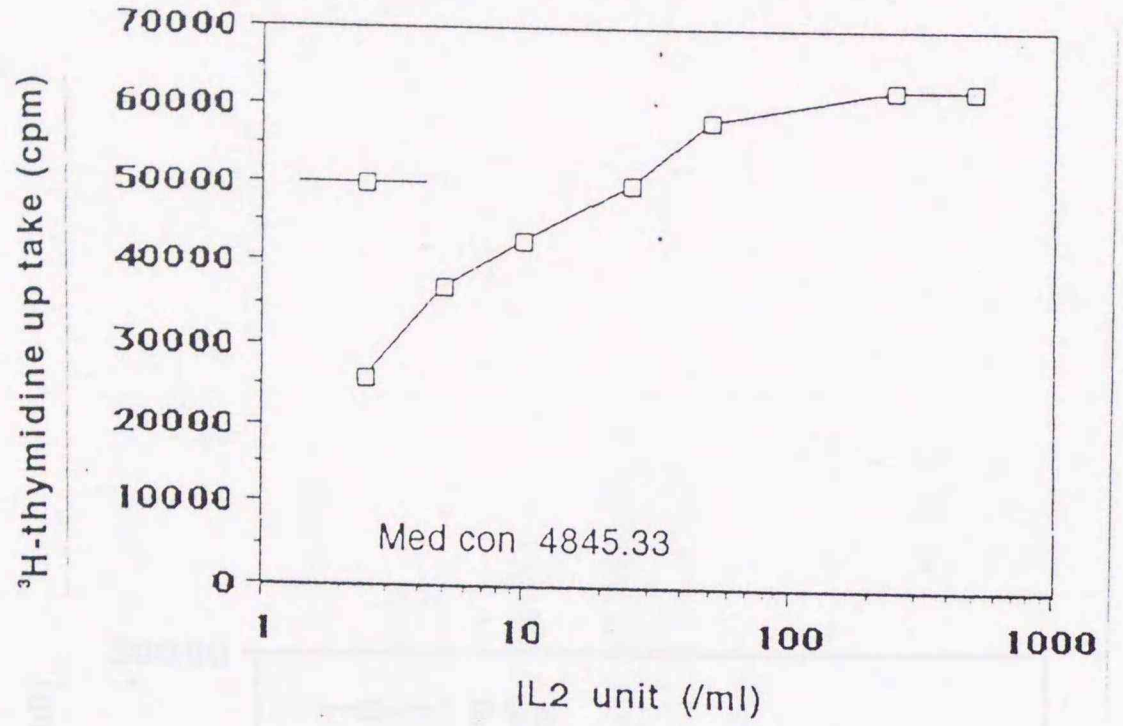
実験に用いたＩＬ－２の力価曲線を図６－１に示した。ＩＬ－２は培養液中に加えられたものであり、図６－１-a はビーズが存在しない培養プレート上におけるCTLL-2細胞の反応を示し、図６－１-b は培養プレート内にEVAL32を被覆したビーズ試料が存在する下で、IL2の反応を見たものである。これによると同じIL-2濃度でもビーズの存在によりCTLL-2の反応性が低下したことが示された。各高分子試料ががCTLL-2の増殖に与える影響を図６－２に示した。各ビーズ0.7gを培養プレートに分注した後、CTLL-2細胞浮遊液とIL-2溶液を加えて培養した。ポリエチレンビーズでは他のポリマーに比べて少し高い増殖を示したが、EVAL各種及びポリビニルアルコールでは異差は認められなかった。

### ６－３－２　各種固定化方法の比較

１）物理吸着による方法

各種ポリマービーズに吸着したＩＬ-２の力価を図６－３に示した。Triton X をによる洗浄を行った場合、ポリエチレンでは、CTLL-2のバックグラウンドcpmと同じ程度の値を示すのみで、ＩＬ-２の力価は認められず、Triton X によ

(a)




(b)

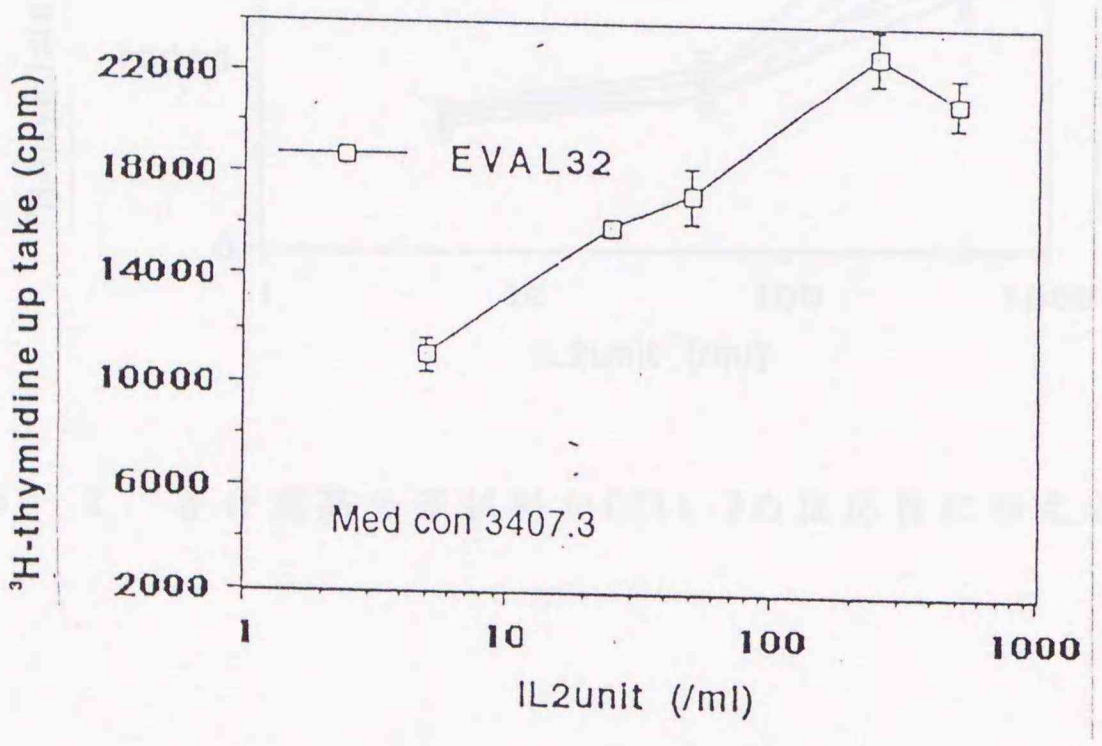



図６－１　ＩＬ－２の力値
(a):培養プレートのみ、(b):EVAL32ビーズ存在下

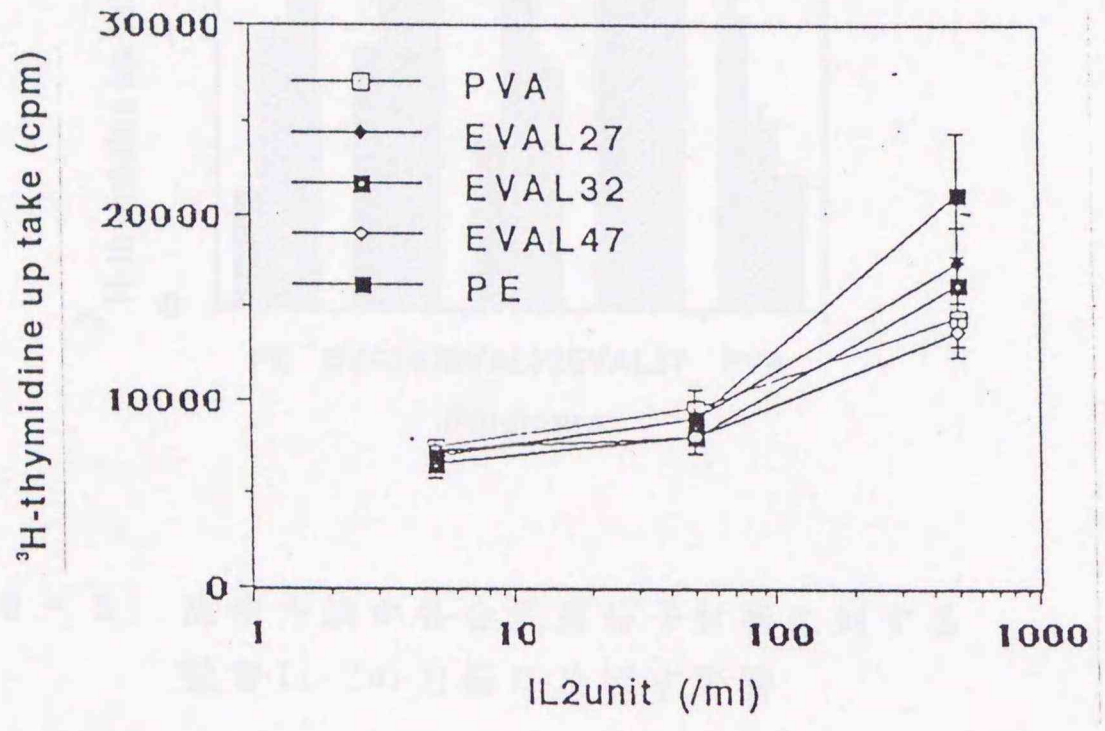



図６－２　各合成高分子試料がCTLL-2の反応性に与える影響

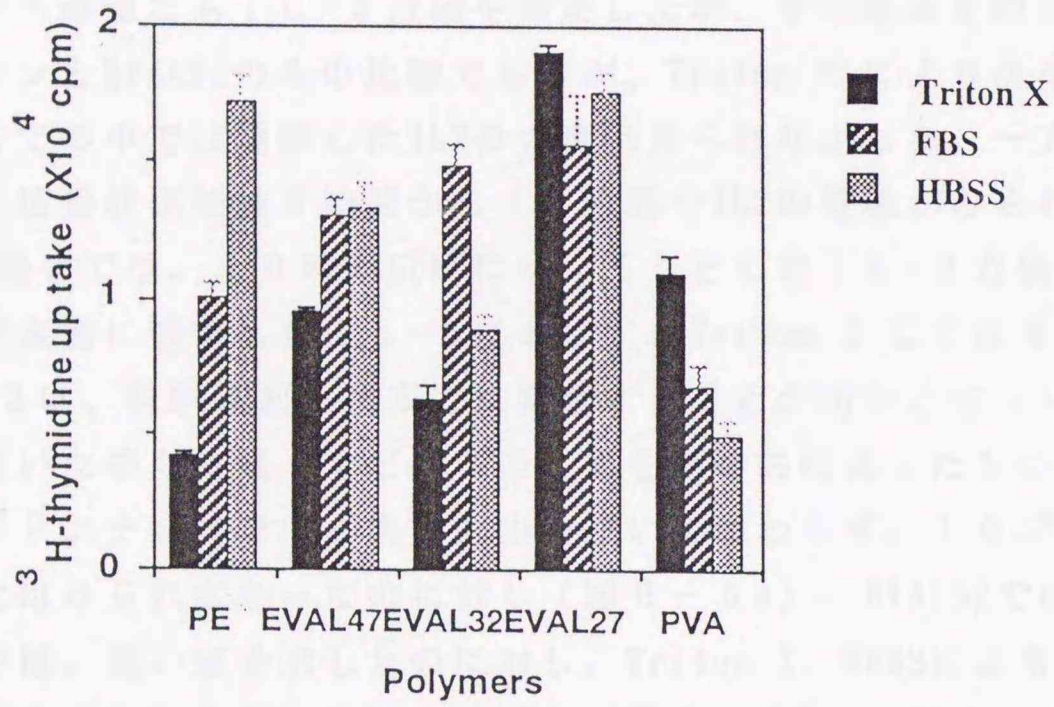



図６－３　洗浄方法が各合成高分子材料に対する
吸着IL-2の力価に及ぼす影響

りＩＬ-２が完全に除かれたと考えられる。それに対し、ポリビニルアルコールおよびＥＶＡＬ各種では吸着IL2の力価が認められた。ＦＢＳおよびＨＢＳＳによる洗浄では、ポリエチレン表面にＩＬ-２は残存し、一方、ポリビニルアルコールでは、Triton Xを用いた場合よりもむしろ表面に残留するＩＬ-２の量が少ないことが明かとなった。EVALにおいては、エチレン量27%において最も安定にＩＬ-２が吸着されることが明かとなった。

それぞれの方法で洗浄したＩＬ-２吸着ビーズを一定時間培養液に浸して、その培養液中へ遊離たもＩＬ-２力価を測定したが、その結果を図６－４に示した。ポリエチレンとEVAL32のみの比較であるが、Triton X により洗浄したものでは２４時間までの中では遊離したIL2の力価は見られなかった。一方FBSを用いたものでは、培養液添加後５時間から１０時間でIL2の遊離がみられた。またHBSSを用いた場合では、１０時間以降にゆっくりとしたＩＬ-２力価の上昇がみられた。材料表面に吸着したＩＬ-２において、Triton X にて洗浄後も残存していたＩＬ-２は、材料表面上に安定に存在することが明かとなった。

上清を除いたのちに残ったビーズの力価を経時的に追ったものを図６－５に示した。ポリエチレンでは、洗浄方法の違いに関わらず、１０時間以後はそれぞれの変化はみられなかったのに対し（図６－５a）、EVAL32では、FBSで洗浄したものでは、高い値を示したのに対し、Triton X, HBSSによる洗浄では、時間後退とともにむしろ高い活性を示した（図６－５b）。図６－４に示したＩＬ-２の溶出実験においては、Triton X において時間変化なし、ＨＢＳＳ洗浄では、２４時間後の溶出ＩＬ-２が多い結果が得られており、そうなれば、当然、EVALの表面に残るＩＬ-２が減少し、力価も低下することが期待されるのに対し、矛盾する結果が得られた。

２）化学試薬を用いた共有結合法

実験方法で述べた３種類の固定化方法による活性の違いを図６－６に示した。グルタルアルデヒド（Ｇ．Ａ）による固定では、ＰＶＡで特に活性が低く、CTLL-2の刺激上清を含まない培養上清のみのネティブコントロールの値である515(cpm)と変化はなかった。残留グルタルアルデヒドによる細胞への影響が心配されたため、グルタルアルデヒド処理をしＩＬ-２固定を行わずグリシンで官能残基を潰したＰＶＡ試料上で，ＩＬ-２溶液を加えると細胞は正常な増殖反応（12323.33cpm）を示した。よってグルタルアルデヒドの残留による細胞毒性の可能性は無いと考えられた。また、Ｇ．Ａによる固定では、エチレンの割合が増えるにつれＩＬ２固定化量が増加した。一方、エピクロロヒドリンを用いた場合には、逆にエチレンの割合が少ないほど固定化量が増加し、ＰＶＡにて最

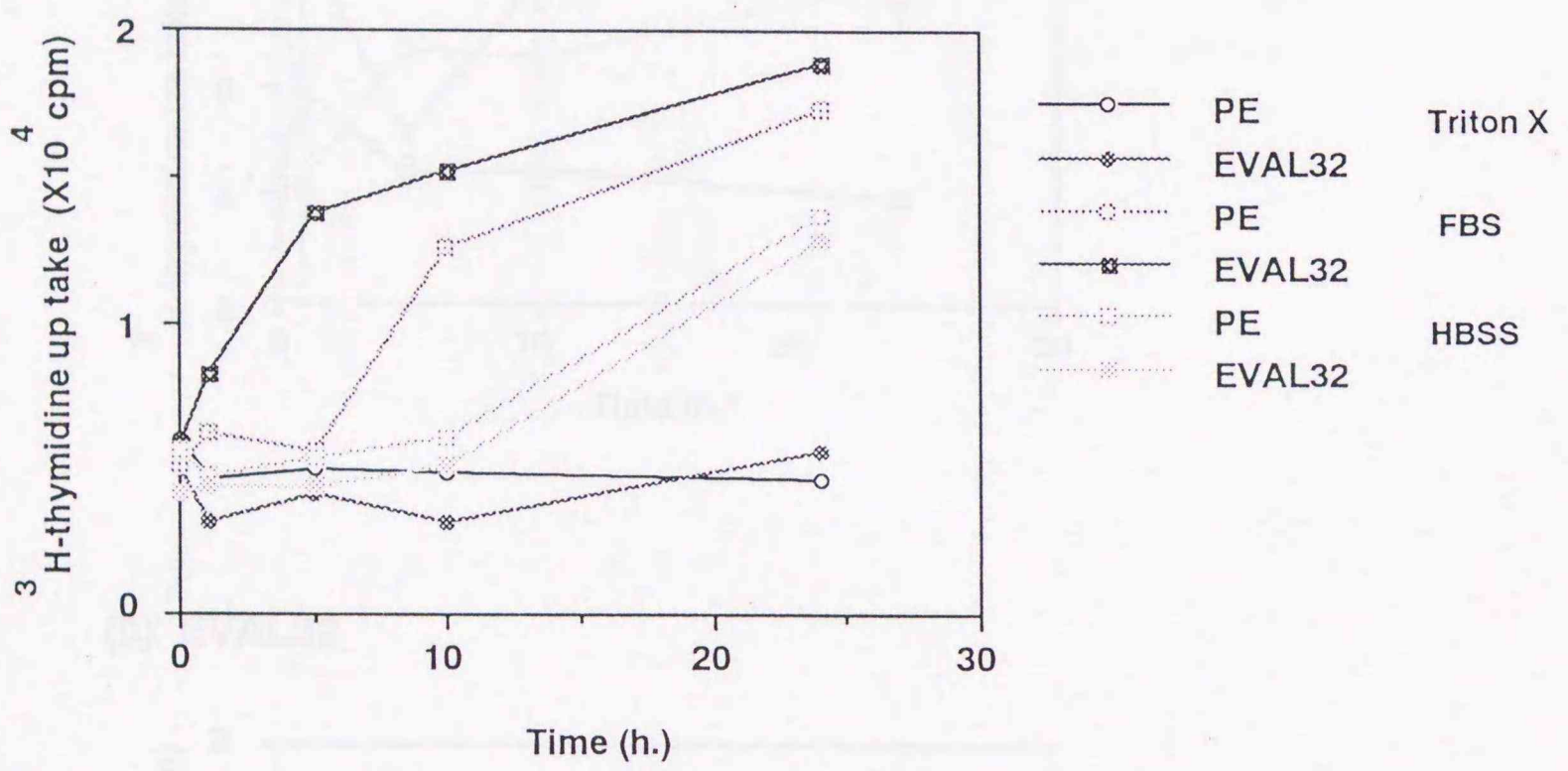
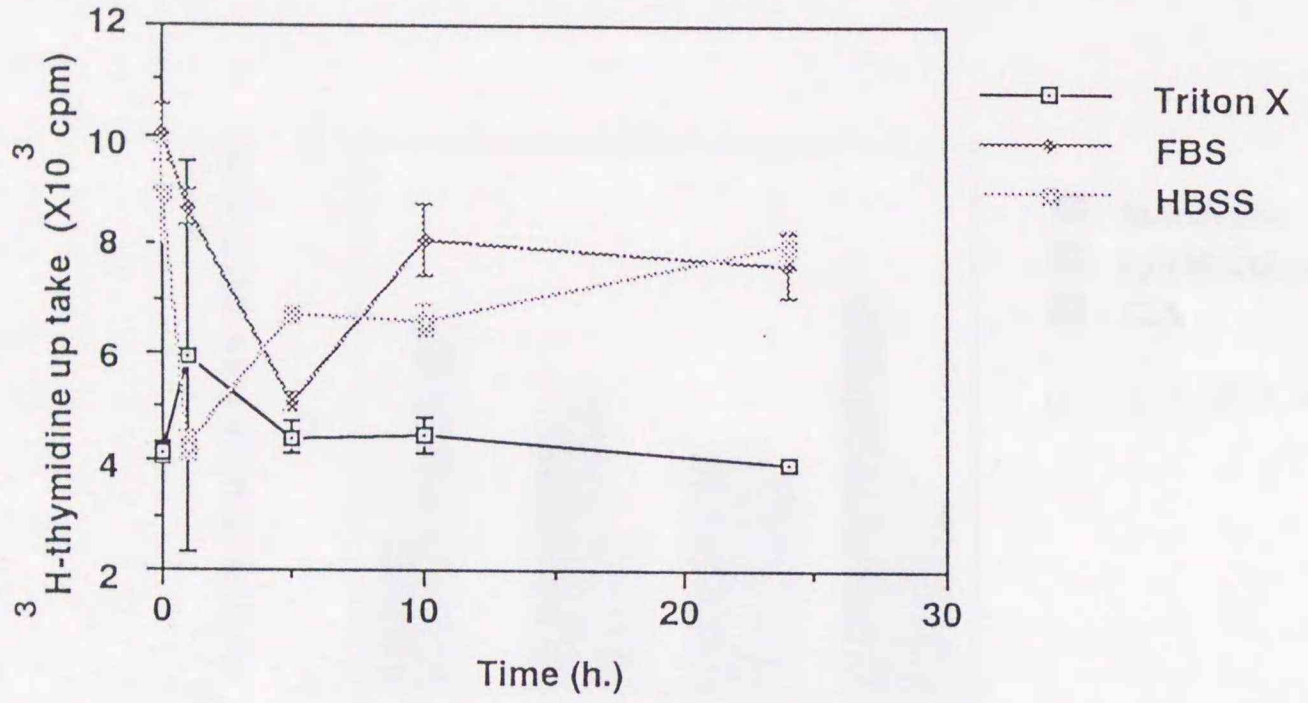



図６－４　IL-2吸着合成高分子より遊離するIL-2力価の経時変化

(a) PE




(b) EVAL32

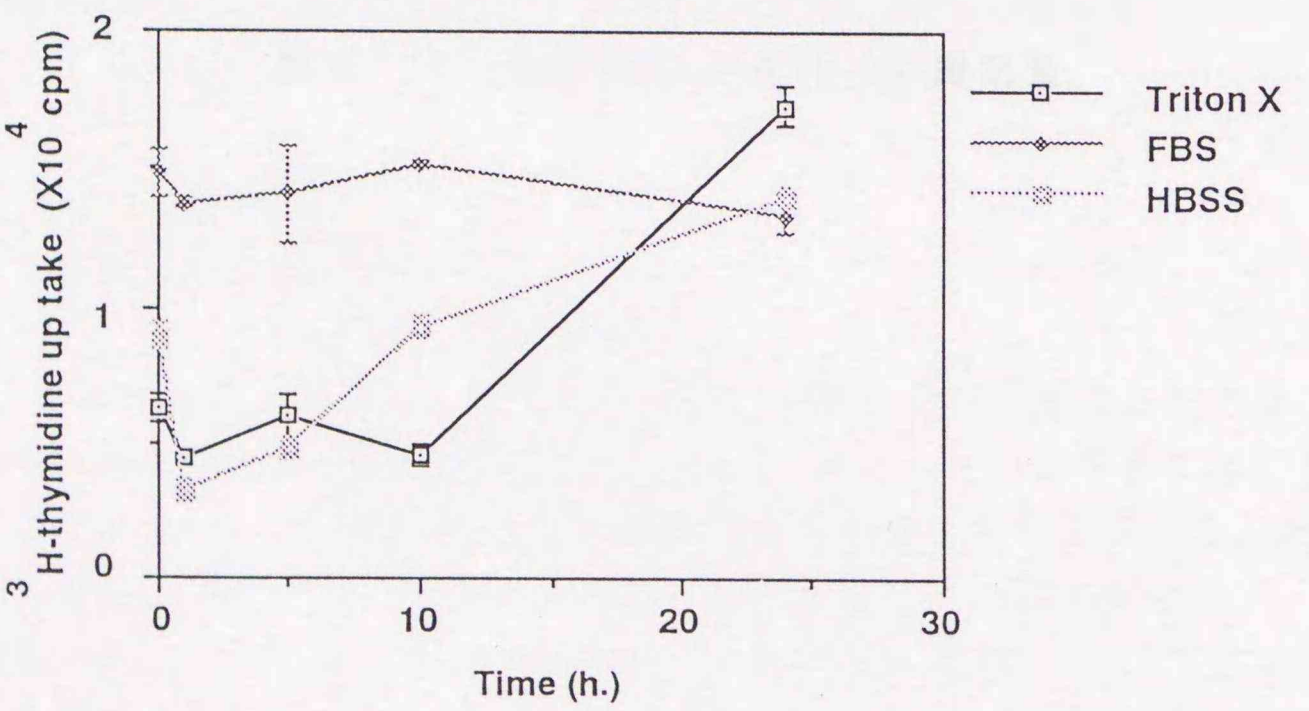



図６－５　合成高分子上に吸着しているIL-2力価の経時変化

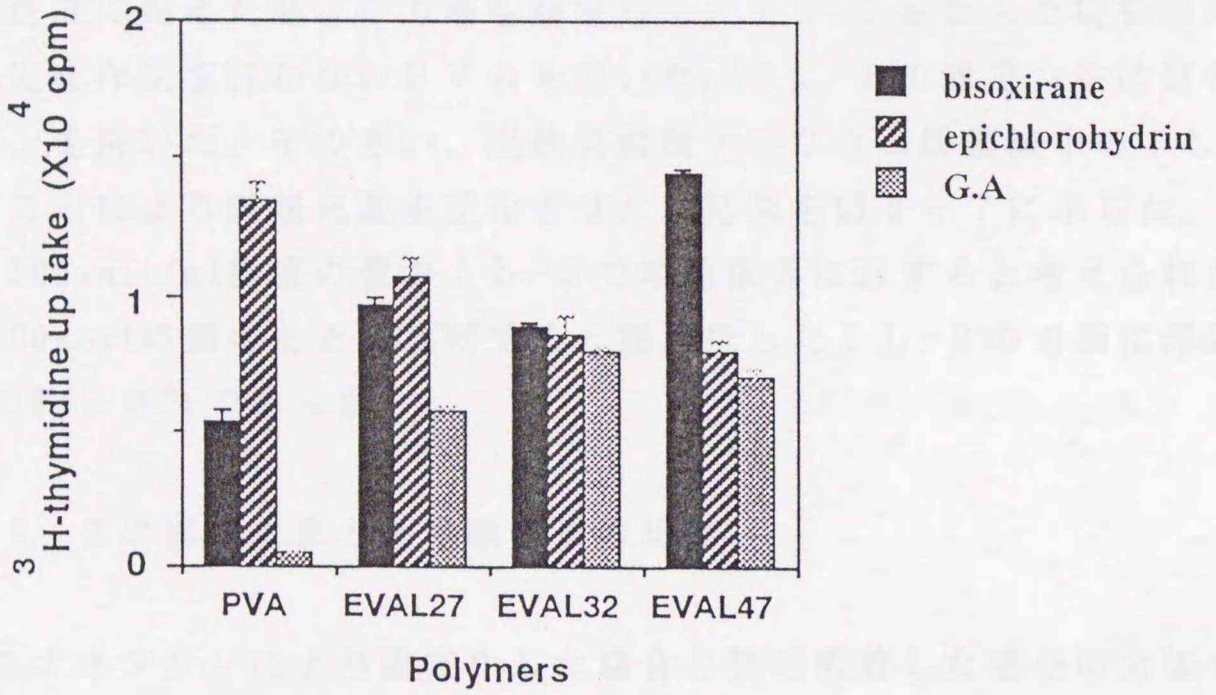



図６－６　各試薬によるIL-2の固定量

も高い活性が得られた。ビスオキシランを用いた場合にはEVAL47において最も高い活性が得られた。

### ６－３－３　固層化ＩＬ-２の浮遊ＩＬ-２に対する力価

ＩＬ２の固定化操作によって材料表面に固層化される量は、仕込値にくらべかなり低いことが予想される。そこで、ＰＶＡを担体としてＩＬ-２を固定化した場合と細胞浮遊液に加えた場合の力価を測定した。ＩＬ-２を含んだ培養液における培地は固定化作業を行わないＰＶＡを用いた。ＩＬ-２の固定方法は簡便なビスオキシランを用いた。そのさい、炭酸重炭酸ナトリウム緩衝液中のＩＬ２の量を変えることにより固層化量を変化させた。結果を図６－７に示した。CTLL-2細胞は、500unit/ml程度の量のＩＬ-２で増殖限界に達すると考えられた。500unitおよび200unitの値をもとに比較すると固層化したＩＬ-２の力価は浮遊ＩＬ-２の力価の約２０％であった。

### ６－３－４　ＩＬ-２の固定化量と物理吸着量の比較

ＩＬ-２のビスオキシランにより固定化した場合と物理吸着した場合の力価を表６－１に示した。表中で＋は細胞培養時にＩＬ-２ 1000 unit を架橋材による処理をしていない試料に添加した場合を示し、－はＩＬ-２無添加の場合のCTLL-2細胞の$^{3}$H-thymidine取り込みを示した。この結果、固定化により高い活性を示すことが明かとなった。

## ６－４　考察

リンホカインに代表されるような生理活性物質は現在治療薬として注目を浴びており臨床応用が試みられている。しかし、それらの物質の多くは、半減期が短いことにより、効果を求めるには大量投与を要求する場合がある。また、作用する対象のスペクトルが広かったり、毒性を持っているものもあり、本格的臨床応用に、多くの臨床家達が躊躇しているのが現状である[9,10]。これらの生理活性物質を治療に効果的に用いるためには、「1.その物質を対象となる細胞及び患部臓器に局在化させる 2.その物質の半減期を伸ばし、少量の投与により治癒を図る」ことが考えられる。我々は体外循環療法により対象とする細胞のみを選択的に活性化することを考えてきた。この目的の基礎として、合成高分子

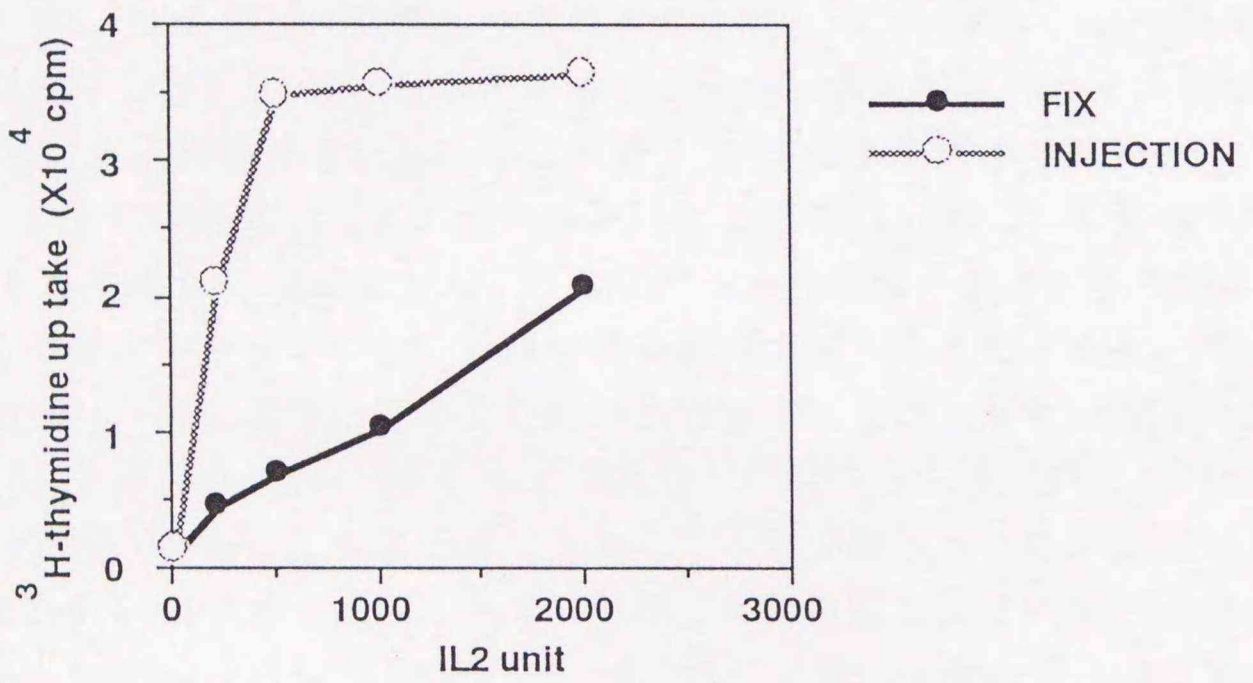



図６－７　ビスオキシランによるIL-2固定化時の仕込値と力価の関係

表６－１　ビスオキシランによる固定と物理吸着におけるＩＬ２力価

| Polymers | FIXED | adsorption | + | − |
|---|---|---|---|---|
| EVAL32 | 19688 | 12820 | 26669 | 3029 |
| PVA | 17903 | 10225 | 26202 | 3541 |

材料が生理活性物質に及ぼす影響を検討するために、本研究では、性質の連続的に異なるポリマーを用いてその表面に吸着したＩＬ-２の力価を測定した。

Triton X は、非イオン性界面活性剤であり、強力な洗浄効果を持つ。これを用いて洗浄した場合、ポリエチレンを除いては、ビーズの入っていないmedium control（5260cpm）に場合に比べ、CTLL-2細胞は明かに高い反応性を示した。これは微量のＩＬ-２がビーズ表面に吸着して残っていると考えられた。この残留量は、浮遊状態のＩＬ-２の力価を示す図６－１bと比較し、浮遊状態に換算して、5～100unit/mlであった。また、図６－４に示されたように、Triton X による洗浄では、培養液中に遊離するＩＬ-２は測定されなかった。一方、FBS及びHBSSを用いた場合に、図６－３に示されたように、全ての試料でCTLL-2細胞は、medium controlより高い反応性を示した。これよりTriton X は強力な洗浄力を持ちＩＬ-２を高分子試料より離脱させるが、ポリエチレン以外の試料では、強固に吸着したＩＬ-２が残りその力価を保持し続けていると考えられる。FBS及びHBSSによる洗浄では、ほとんど吸着ＩＬ-２除去に寄与しないことが示された。しかしながらポリビニルアルコールにおけるFBS,HBSSの挙動についてはTriton X よりも低い力価を示しているのでこの現象については不明である。

上清への遊離状態及びビーズへの吸着状態の時間変化を比較すると、ポリエチレンの場合ビーズに吸着しているものの力価はほぼ横ばいなかった。一方、上清にたいする遊離は、Triton X による洗浄では全く見られなかったのに対して、FBS,HBSSでは時間にともない増加してくることが観察された。上清を測定したものでは96well培養プレート中で、上清と細胞浮遊液により細胞を培養しているので、２４wellプレート内で、0.7gのビーズが存在するもとでの培養条件の違いは否めないため、$^{3}$H-thymidineの値で直接比較できないが、これらの結果よりFBS,及びHBSSを用いた場合、24時間までの培養液への浸漬ではその力価には変化がみられないだけの多量のＩＬ-２が吸着してたと考えられる。一方EVAL32を用いた方では、上清への遊離はTriton X を用いた場合ではほとんど見られなかったが、FBS,HBSSを用いた場合では徐々に遊離するのがみられた。しかし、培養液に浸漬したビーズにおいて、FBSによる洗浄で０時間から２４時間まで高いレベルのまま力価が推移するのに対して、HBSS,Triton X による洗浄では、時間の経過にともなって上昇し、２４時間後には０時間の時点よりも高い力価を示した。EVALは親水性のポリビニルアルコールと疎水性のポリエチレンの共重合体であり、膜の構造はミクロ層分離構造をとると考えられる。一方ポリエチレンは完全な疎水表面である。培養液中には１０％の牛胎児血清が含まれていた。ＩＬ-２は、図６－８に示した構造で、βシート構造を持たず、６つのα-ヘリックスのセグメントより構成されており、細胞表面ＩＬ-２レセプ

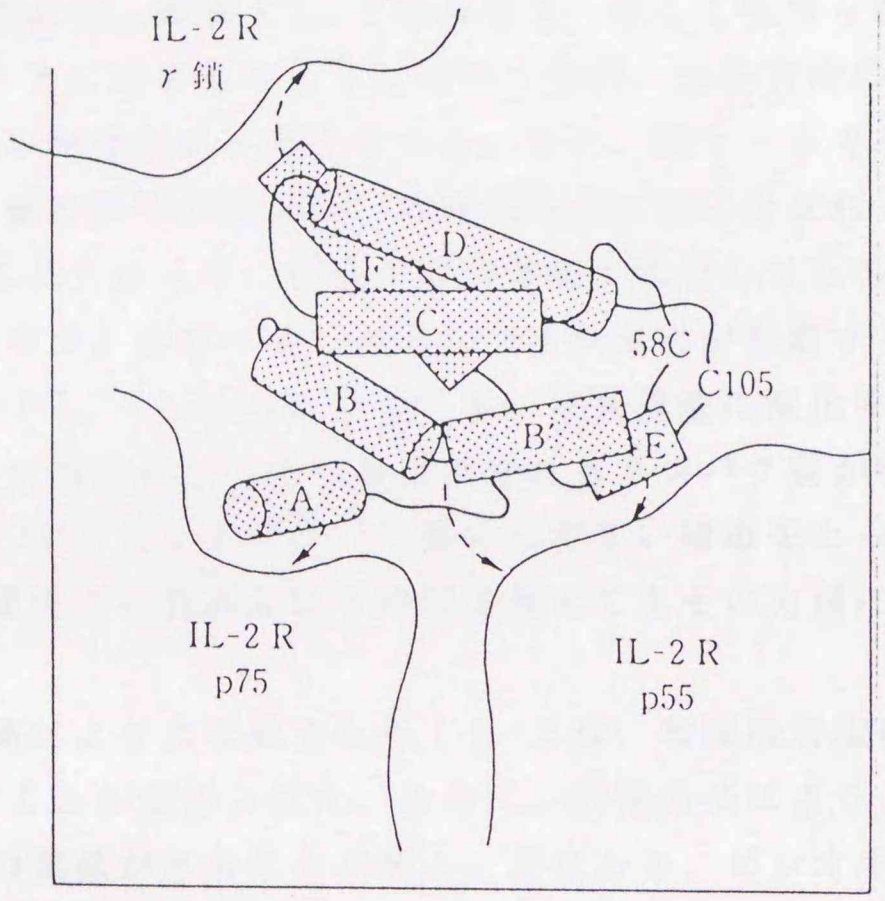



図６－８　ＩＬ－２の三次構造とＩＬ－２Ｒとの相互作用

（羽室淳爾 著　「インターロイキンネットワーク」より引用）

ターと結合する[11]。ＩＬ-２は、１カ所ジスルフィド結合を持つのみの分子量約15000程度の一本鎖のタンパク質である。そのため吸着により変形を受け易いと考えられる。また、ＩＬ-２は、Ｎ末端のＡ，Ｃ末端のＦセグメントが生物活性を示すために細胞側のＩＬ-２レセプターと有効な相互作用をすることが必要である。分泌型ＩＬ-２は当然親水性タンパク質であるが、個々のセグメント、特に生物活性に関わるセグメントであるＡとＦセグメントの構成を見ると、Ａセグメントは、９アミノ酸よりなり、塩基性側鎖１，酸性側鎖１，非荷電性側鎖２，そして非極性側鎖５からなる。また、Ｆセグメントは、１７アミノ酸よりなり、塩基性側鎖１，非荷電性側鎖７、そして非極性側鎖９からなる。よってこの二つのセグメントは疎水性が強いと思われる。これより材料の親水性、疎水性の違いにより、吸着ＩＬ-２の構造は、著しく異なってくると考えられる。よって、図６－３に示されたように材料の性質、洗浄方法によりその吸着ＩＬ-２の力価に違いが現れると考えられる。また、図６－５で示されたビーズ表面上のＩＬ-２力価の経時的変化は、培養液中の血清に含まれるタンパク質が試料表面に吸着することにより、強固に試料表面に吸着してその立体構造を変形させていたＩＬ-２が、周囲に他の血清成分中の蛋白が吸着することによりCTLL-2細胞表面上のＩＬ-２受容対に結合し易い立体構造に変化することが示唆される。FBSを用いた場合にはそれ自身に含まれるタンパク質が吸着しており、ＩＬ-２が初めからＩＬ-２レセプターと結合しやすい構造をとっていたため、０時間から２４時間まで培養液に浸す時間を変えてもその力価に変化がなかったと考えられる。

各種結合試薬により共有結合したＩＬ-２は、物理吸着法に較べより高いＩＬ-２活性を示すことが認められた。さらに、固定方法により、材料とＩＬ-２活性の間に一定の関係があることが解る。すなわち、ビシオキシランとグルタールアルデヒドを用いた固定では、材料の水酸基の割合が少ない方がＩＬ-２の活性が高く、反対にエピクロロヒドリンを用いた方法では、水酸基の数の多いポリマーで活性が高かった。グルタルアルデヒドとビスオキシランは両末端反応性試薬である。一方エピクロロヒドリンは片一方が塩化アルキル基で、片一端がエポキシ基であり、塩化アルキル基の方が、水酸基よりも反応しやすい性質を持つ。そのため、架橋剤により、基材の水酸基同士の架橋率は少ないと考えられる。そのため、水酸基の数の多い方が高いＩＬ-２活性を示したと考えられる。 また、用いた試料の中では水酸基の割合が中間に位置するEVAL32では全ての架橋試薬で同程度の反応性を示していた。このことよりEVAL32は架橋材にあまり左右されない安定した固定担体であると考えられる。

本実験では、どの固定方法が最も有効かは、決定できるだけの結果を得るこ

とができなかった。しかし、ＩＬ-２固定化の場合、本実験で行った、エピクロロヒドリンを用いた改良法によるカルボキシル基－アミノ基のカップリング反応が有望だと思われる。上述したが、ＩＬ-２の生物活性を示すのに重要だと考えられるＡセグメントとＦセグメントにはともにアミノ基側鎖を持つアミノ酸であるリシンが存在しないため、ＩＬ-２の生物活性を架橋により破壊することが少ないと考えられるからである。しかし、問題点は、エピクロロヒドリンはその分子長が短いため、基材の影響によるコンフォメーション変化を受け易いと考えられる。よって基材側をＩＬ-２のコンフォメーション変化が少ないものを選ぶことが肝要であると考えられる。また、スペーサーを付けて分子長を長くすることも有効であると思われるが、架橋反応の確率の高いものを探すことが今後の課題であると思われる。

# 第７章　結論

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、生体材料は生体にとって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適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生じることが報告されて以来、透析膜の免疫系への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への影響に関する詳細な知見は得られていない。

本論文で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、また液性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、免疫賦活物質固定化材料に関する基礎的研究を行い、以下の知見を得た。

１）汎用高分子材料である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）と２時間の短期接触後、離脱・回収したリンパ球培養系にマイトジェンを加え、４８時間後の細胞数変化、及び、チミジンの取り込み量により増殖能を評価したところ、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較べ減少を示した。ＰＭＭＡ，ＰＡＮ，ＰＰ試料では、この様な影響を示さなかった。$^{3}$H-thymidineの取り込みを指標として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はなかったのに対して、ＣＡは、全てのマイトジェンで、ＰＶＡはConAおよびLPS刺激において顕著に減少が認められた。しかし、PHA刺激系ではＰＶＡと接触したリンパ球は、生細胞数が少ないのに関わらず、コントロールに較べ高い増殖を示した。ナイロンウールカラム非付着性細胞を用いて実験を行った場合、ＰＶＡ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れることが示され、ＰＶＡがＴリンパ球に何らかの作用を与えることが明かとなった。各試料に血清成分を吸着させた場合、細胞数，増殖能において、試料間の差は認められなくなった。特にLPSに対するＣＡ，ＰＶＡの抑制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・回収後の生細胞数を計測したところ、血清非吸着試料と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させた場合、リンパ球の形態変化は見られなかった。ゆえに、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。試料と接触・分離後マイトジェン刺激を行い４８時間培養後の表面抗原解析においては、ＰＭＭＡ，ＰＡＮ，ＰＰおよびコントロールと較べ、ＣＡ，ＰＶＡで顕著な差異が観察された。ＣＡにおいては、離脱・回収時点でＣＤ４⁻ＣＤ８⁻の減少が顕著に観察された。ＣＤ４／ＣＤ８比を見たところＣＡではコントロールと差は見られなかった。一方、ＰＶＡにおいては、全てのマイトジェン刺激において、ＣＤ４⁻ＣＤ８⁻の減少がみられ、さらにＣＤ４⁺／ＣＤ８⁺の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かとなった。

長時間の接触における機能変化、つまり、細胞増殖反応が試料上で進む場合、短時間のみの接触と傾向的には同じであった。また、繊維芽細胞、マクロファージなどで観察されているＣＡ，ＰＶＡの培養基質として適さないと考えられ、リンパ球のマイトジェン反応は接触による細胞の機能変化は低下した。

２）ＩＬ-２をモデルとした免疫賦活材料開発の試みにより、担体の性質によりその吸着挙動は大きく異なった。また、架橋試薬によりその力価は異なった。

以上、本研究により得られた成果を述べたが、本研究は、従来の臨床的研究より、さらに進んだ、材料そのものの細胞に対する影響を試みたものであり、境界領域学問としての生体工学の分野に十分貢献するものと結論できる。

# 謝辞

本研究は、昭和６２年より現在に至るまで約６年間、北海道大学工学部生体工学機能合成工学講座において行なわれたものである。ここのに至るまで、本研究に対する問題の提示や研究全般にわたる多大な御指導ならびに御鞭達を賜った当講座主任　勇田　敏夫　教授に心より感謝致します。さらに本論文に対し数々の有益なる御教示、御助言を頂きました本学工学部生体工学専攻の山本　克之　教授、村林　俊　助教授、免疫科学研究所病理部門　小野江　和則　教授に心より感謝致します。

さらに、当講座の院生、学生の方々からは、常日頃から御協力を頂き、大変ありがとうございました。

本研究は、これら各位の多大な御援助のおかげで仕上げられたものでありここに改めて深くお礼申しあげます。

# 参考文献


第１章　参考文献

１）水戸迪郎、西村昭男、住吉章、河合実智雄、能勢之彦、河村鉄也、吉本千禎．膜型人工内臓（肝、腎）の体外循環について　総合医学17:86(1960)

２）Kaplow,L.S.and Goffinet,J.A. profound neutropenia during the early phase of hemodialysis. JAMA 203:1135 (1968)

３）Toren,M.,Goffinet,J.A.,and Kaplow,L.S. pulmonary bed sequestration of neutrophils during hemodialysis Blood 36:623(1971)

４）Brubaker,L.h. and Nolph,K.D. mechanisms of recovery from neutropenia induced by hemodialysis Blood 38:337(1970)

５）Jensen,D.P.,Brubaker,L.H.,Nolph,K.D.,Johnson,C.A.,and Nothum,R.J. hemodialysis coil-induced transient neutrophilia in normal man. Blood 41:399(1973)

６）Cradock,P.R.,Fehr,J.,Dalmasso,A.P.,Bringham,K.L.,and Jacob,H.S. hemodialysis leukopenia:pulmonary vascular leukpstasis resting from complement activation by dialyzer cellophane membrance. J.Clin.Inv.59:879 (1977)

７）Craddock,P.R.,Hammershmidt,D.,White,J.G.,Dalmasso,A.P.,and Jacob,H.S. Complement(C5a)-induced granulocyte aggregation in vitro:A possible mechanism of complement-mediated leukostasis and leukopenia. J.Clin.Inv.60:260(1970)

８）Chenoweth,D.E.,Hugh,P.E. Demonstration of specific C5a receptor on intract human polymorphonuclear leukocyte. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A. 75:3943(1978)

９）Dinarello,C.A. The Biologu of Interleukin-1 and Its relevance to hemodialysis. Blood Purification 1:197-224(1983)

１０）Tchorzewski,H.,Luciak,M.,Trznadel,K.,Majewska,E. and Pokoca,L. Effect of Hemodialysis on T lymphocyte subsets, Con-A-activated suppressor cell activity, and Interleukin-2 receptor expression on lymphocytes in chronic uremic patients. Artificial Organs 13(3):185-189(1989)

１１）Chatenound,L.,Dugas,B.,Beaurain,G.,Touam,.M.,Dueke,T.,Galanaud,P., Bach,J-F.,and Delfrassy,J-F. Interleukin-2 production and targeting in hemodialyzed patients. Contr.Nephrol.,Vol.59,10-16(1987)

１２）塩崎滋弘、阪上賢一、折田薫三。　癌に対する体外免疫療法　人工臓器 17:1561-1570(1988)

１３）J.Richner, P.Schuff-Werner, R.Batge, J.-H.Beyer, and G.A.Nagel　In Vitro Adsorption of Colon Cancer Sera over Staphylococcus Protein A: Lymphocyte stimulation by Leakage of Adsorbance.　Klin Wochenschr 65: 353-358(1987).

１４）村林　俊、能勢之彦。　生体医用材料　Medical Way 5:104-110(1988).

１５）S.Omokawa, T.Suzuki, M.M.Dustoor, N.Uchida, P.S.Malchesky, and Y.Nose Humoral, Celluar, and Hemodynamic Changes Induced by Blood-Material Interaction in Menbrane Plasmapheresis.　Trans Am Soc Artif Intern Organs., Vol.33, 112-117(1987)

１６）水野 和人、楊河 宏章、曽根 三郎。　ＩＬ－２／ＬＡＫ治療に伴う vascular leak syndrome（ＶＬＳ）の発症機構　臨床免疫，23(4)：597-601, (1991)

１７）S.Rosenberg　Lymphokine-activated killer cell:a new approch to Immunotherapy of cancer.　JNCI 75: 595-603 (1985)

１８）大西 博昭、奥野 清隆、安富 正幸、戸村 隆訓。　Interleukin 2（ＩＬ－２）の生体内代謝　臨床免疫，24(4):601-606 (1992)

第２章　参考文献

１）Dinarello, C.A. The Biologu of Interleukin-1 and Its relevance to hemodialysis.　Blood Purification　1:197-224(1983)

２）Dratwa, M., Collart, F., Mascart-Lemone, F., Vetter, L., Tielemans, C,. Wens, R., and Duchateau, J. Haemodialysis-Induced Acute Changes In T Lymphocyte Subsets.　Proc EDTA-ERA 22:196-201(1985)

３）Omokawa, S., Suzuki, T., Dustoor, M.M., Uchida, N., Malchesky, P.S. and Nose Y.　Humoral, Cellular, and Hemodynamic Changes Induced by Blood-Material Interaction in Membrane Plasmapheresis. Trans Am Soc Artif Intern Organs 33:112-117(1987)

４）Bonfield, .T.L., Colton, E., and Anderson, J.M.　Plasma protein adssorbed biomedical polymers:Activation of human monocytes and induction of interleukin 1. J.Biomed.Mater.Res., 23, 535-548 (1989)

５）Miller, K.M., Rose-Caprara, V., and Anderson, J.M.　Generation of IL1-like activity in response to biomedical polymer implants: A comparison of in vitro and in vivo modeles. J.Biomed.Mater.Res., 23,　1007-1026

(1989)
6) Mitoh, A., Murabayashi, S., Yuhta, T., Iwabuchi, C., Iwabuchi, K., and Onoe, K. Alteration in CD4+Tcells/CD8+Tcells Ratios in Con A Stimulated Lymphocytes by Synthetic Polymers:In Vitro Evaluation. Artificial Organs Vol 14, Suppl 3 :168-170(1990)
7) 村林 俊, 能勢 之彦。生体医用材料 : Medical Way, 5(4) : 104-110 (1988)
8) Y. Masuzawa, S. Sawada, J. Sawada, T. OsawaInt. Arch. Allergy appl. Immun. 57:451 (1978))
9) Murabayashi, S. and Nose, Y. Biocompatibility: Bioengineering Aspect. Artificial Organs 10 :114-121(1986)
10) 片岡一則、岡野光夫、桜井靖久、第2回バイオマテリアル学会大会論文集、p.11-15、1980)
11) Rayan, J.L. and Hankart, P.A. Fc receptor-mediated inhibition of murine B lymphocyte activation. J.Exp.Med 144: 768-775 (1976)
12) Usami, k., Mitama-Inaba, M., kuibayashi, K., Sakaguchi, S., Hanaoka, M., and Masuda, T. Immunological properties of Fc receptor on lymphocyte. Antigen-specific FcγR T and antigen-nonspecific FcRγ+T suppresions in immuno tolerance. Acta, Haem. Jap. 45:772-784, (1982)

第3章 参考文献

1) Rubin, B., Hertel-Wulff, B Scand. J. Immunol. 4:452, (1975)
2) Yodoi, J., Miyama, M., Matsuda, T, Cell. Immunol 35:266, (1978)

第4章 参考文献

1) 森沢成司, 大谷周造。Mitogen とその特性 臨床免疫, 11(6) :391-399 (1979)
2) 大沢利昭。免疫応答と生体膜 リンパ球の活性化機構 化学増刊 83 :145-164(1980)
3) 筏 義人 著 : 医用高分子材料。共立出版 p65-67 (1989)
4) 新津 洋司朗, 渡辺 直樹 : マクロファージ由来細胞傷害因子。臨床免疫, 19:653-665 (1987)
5) 水口 純一郎, マクロファージのB細胞活性化機構。臨床免疫, 21:1847-1855 (1989)
6) 筏 義人 編 : 高分子表面の基礎と応用 (下)。化学同人 p89 (1986)

7）Ogama,J.,Murabayashi,S.,Yuhta,T.,Iwabuchi,K.,Iwabuchi,C.,Ogasawara,K.and Onoe,K.　：　Enhanced proliferation of murine lymphocytes by synthetic polymers:in vitro study. Artificial Organs 14,Suppl 3 : 171-173 (1990)

第５章　参考文献

1）Reinherz,EL.,:Separation of functional subsets of human T cells by monoclonal antibody.　Proc. Natl. Acad. Sci. USA.,76:4061 (1979)

第６章参考文献

1）谷　徹、小玉 正智、岡　藤太郎、花沢 一芳、橋本 宇史、中根 佳宏、西海 四郎、寺本 和雄、堀沢 昌弘：抗腫瘍効果を目的としたLipopolysaccharideの固定下の試み。人工臓器、13(3),1163-1167 (1984)

2）谷　徹、岡　藤太郎、花沢 一芳、遠藤 善裕、沼　謙司、中根 佳宏、小玉 正智、寺本 和雄、村上 隆夫：抗腫瘍効果を有する繊維材料エンドトキシン固定化繊維。人工臓器、14(2),834-837 (1985)

3）土屋 敬子、須賀原 敏了、山脇 直邦、宮田 征司、小平 了二、大野　聡、田中 紀章：新規抗腫瘍免疫細胞誘導法の基礎的研究。人工臓器、18(3),1406-1408 (1989)

4）沼　謙司、谷　徹、吉岡 豊一、遠藤 善裕、石井　豊、青木 裕彦、松田 孝一、阿部　元、玉川 正明、小玉 正智、須賀原 敏了、渡辺 廣行、山脇 直邦：PWM 固定化カラムを用いた Direct Hemoperfusion の試み。人工臓器、18(3),1431-1434 (1989)

5）沼　謙司、谷　徹、阿部　元、吉岡 豊一、遠藤 善裕、松田 孝一、青木 裕彦、石井　豊、小玉 正智、須賀原 敏了、渡辺 廣行、山脇 直邦：固定化 Pokeweed Mitogen による癌治療の試み。人工臓器、19(2),949-952 (1990)

6）松本 勲武：アフィニティークロマトグラフィーとその応用。有機合成化学、38(3),128-138 (1980)

7）Sundberg,L.,Porath,J.,:Preparation of adsrbents for biospecific affinity chromatography. J Cromatogr.,90,87-98 (1974)

8）Matumoto,I.,Mizuno,Y.,Seno,N.,Activation of sepharose with epichlorohydrin and subsequent immobilization of ligand for affinity adsorbent. J.Biochem.,85,1091-1098 (1979)

9）水野 和人、楊河 宏章、曽根 三郎　：IL-2/ＬＡＫ治療に伴うvascular leak syndrome（ＶＬＳ）の発症機構.　臨床免疫　23(4):597-601(1991)

１０）大西 博昭、奥野 清隆、安富 正幸、戸村 隆訓：Interleukin 2（IL-2）の生体内代謝. 臨床免疫 24(4):601-606,1992）
１１）羽室 淳爾/著：インターロイキン・ネットワーク. 講談社 p101（1992）

# 研究業績

## Ⅰ. 論文、資料　（１９９３年３月現在）

### A）原著

1）合成高分子材料のＩＬ２活性及びＩＬ２レセプター発現に及ぼす影響
見藤　歩、村林　俊、宮崎　浩、森田 泰史、勇田 敏夫
人工臓器　20(1), 241-246 (1991)

2）免疫担当細胞機能制御に及ぼす高分子材料のマクロ構造効果
宮崎　浩、村林　俊、見藤　歩、森田 泰史、勇田 敏夫
人工臓器　20(1), 235-240 (1991)

3）リンパ球機能制御への超極細繊維の応用
宮崎　浩、村林　俊、見藤　歩、勇田 敏夫
人工臓器　21(4), 1349-1353 (1992)

### B）資料

1）Alteration in $CD4^+$TCells/$CD8^+$TCells Ratios in Con A Stimulated Lymphocytes by Synthetic Polymers:In Vitro Evaluation
A.Mitoh, S.murabayasi, T.Yuhta, C.Iwabuchi, K.Iwabuchi, and K.Onoe
Artificial Organs(Volume 14,Suppl 3) 168-170 (1990)

2）反応性スパッタリングで蒸着したアルミナ薄膜の抗血栓性に関する基礎的研究　－蒸着時における酸素分圧の影響－
菊田 幸明、中兼 雅之、西村 生哉、見藤　歩、村林　俊、勇田 敏夫
北海道大学　工学部研究報告　第１６１号, 55-62 (1992)

## Ⅱ. 講演

1）表面改質されたアルミニウム基金属を用いた機械弁の開発に関する研究（第３報）

見藤　歩、勇田 敏夫、三田村 好矩、下岡 聡行
昭和62年度精密工学会北海道支部学術講演会　１９８７年９月

２）抗腫瘍材料開発に関する基礎的研究　第一報
見藤　歩、村林　俊、勇田 敏夫、下岡 聡行
第４回エル・エス・ティ学会大会　１９８８年１１月

３）Alteration in $CD4^+$TCells/$CD8^+$TCells Ratios in Con A Stimulated Lymphocytes by Synthetic Polymers:In Vitro Evaluation
A.Mitoh, S.murabayasi, T.Yuhta, C.Iwabuchi, K.Iwabuchi, and K.Onoe
ＶＩＩth World Congress of the International Society for Artifcia Organs　August 1989

４）合成高分子材料のＩＬ２活性及びＩＬ２レセプター発現に及ぼす影響
見藤　歩、村林　俊、宮崎　浩、森田 泰史、勇田 敏夫、小野江和則
第２８回日本人工臓器学会大会　１９９０年９月

５）リンパ球のマイトジェン応答能におよぼす合成高分子の影響
見藤　歩、村林　俊、、勇田 敏夫
第２９回日本人工臓器学会大会　１９９１年９月

６）免疫担当細胞機能制御に及ぼす高分子材料のマクロ構造効果
宮崎　浩、村林　俊、見藤　歩、森田 泰史、勇田 敏夫、小野江和則
第２８回日本人工臓器学会大会　１９９０年９月

７）合成高分子材料のリンパ球機能変化に及ぼす影響
森田 泰史、村林　俊、見藤　歩、宮崎　浩、勇田 敏夫、小野江和則
第２８回日本人工臓器学会大会　１９９０年９月

８）超極細繊維のリンパ球機能制御に及ぼす影響
宮崎　浩、村林　俊、見藤　歩、森田 泰史、勇田 敏夫
第１２回日本バイオマテリアル学会大会　１９９０年１０月

９）リンパ球機能制御への超極細繊維の応用
宮崎　浩、村林　俊、見藤　歩、勇田 敏夫
第２９回日本人工臓器学会大会　１９９１年９月

１０）免疫細胞に対するパルス磁場の影響
深谷 浩平、村林　俊、見藤　歩、宮崎　浩、勇田 敏夫
第７１回北海道医学大会　１９９１年１０月

１１）低周波電磁場の生体に与える影響－免疫細胞の活性化について
深谷 浩平、村林　俊、見藤　歩、宮崎　浩、勇田 敏夫

第７回エル・エス・ティ学会大会　１９９１年１１月

１２）生体材料表面形状の細胞接着に及ぼす影響

山田 浩司、見藤　歩、西村 生哉、下岡 聡行、村林　俊、勇田 敏夫

１９９２年度　精密工学会北海道支部大会

１３）生体材料表面形状の細胞接着に及ぼす影響

山田 浩司、見藤　歩、西村 生哉、下岡 聡行、村林　俊、勇田 敏夫

１９９２年度　精密工学会秋期大会　１９９２年１０月

１４）生体材料の表面形状が繊維芽細胞の接着形態に及ぼす影響

山田 浩司、見藤　歩、西村 生哉、下岡 聡行、村林　俊、勇田 敏夫

第３１回　日本ＭＥ学会北海道支部大会　１９９２年１０月

１５）生体材料表面形状の細胞接着に及ぼす影響　－第２報－

山田 浩司、見藤　歩、西村 生哉、下岡 聡行、村林　俊、勇田 敏夫

１９９３年度　精密工学会春期大会　１９９２年３月

inches 1 2 3 4 5 6 7 8

cm 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19

**Kodak** Color Control Patches

© Kodak, 2007 TM: Kodak

Blue Cyan Green Yellow Red Magenta White 3/Color Black

**Kodak** Gray Scale

C Y M

© Kodak, 2007 TM: Kodak

**A** 1 2 3 4 5 6 **M** 8 9 10 11 12 13 14 15 **B** 17 18 19