

京都大学	博士 (工 学)	氏名	戸 田 満 秋
論文題目	Complement activation on surfaces carrying hydroxyl or amino groups (ヒドロキシル基もしくはアミノ基を有する表面上での補体活性化に関する研究)		
(論文内容の要旨)			
<p>本論文は治療用デバイスに用いられる人工材料表面と生体の応答についての知見を蓄積し理解を深めることを目指し、金薄膜上に作成された自己組織化単分子膜(以下 SAM)や高分子薄層を、各種官能基をもつモデル表面とし、血清中に存在する生体防御機構の一つである補体系との相互作用に関する研究を5章にまとめたものである。</p> <p>序論においては医療用デバイスに用いる人工材料と生体応答の間に横たわる数々の問題について言及し、材料表面の性状と生体との相互作用を解き明かすこと、その制御を行うことの重要性について言及している。</p> <p>第1章では補体のC3b因子中のチオエステル結合と反応しうるアミノ基を持った材料と補体系の相互作用はまだ不明な点が多いことを指摘し、アミノ基を有するSAMとアミノ基を多量に持つ水溶性高分子であるポリエチレンイミン(以下PEI)を担持させた表面上での血清補体の活性化について検討している。その結果、本章で検討した表面では血清から多量のタンパクの吸着が認められたものの、補体タンパクC3bの沈着は強くは認められず、液相中に放出された補体因子も低い値にとどまることを示し、この結果からアミノ基はその電荷ゆえに補体系以外のタンパクの吸着が優先的に起こり、補体系の活性化を強くは起こさないことを見出している。</p> <p>第2章ではアミノ基を末端に持つアルカンチオールとメチル基を末端に持つアルカンチオールもしくはカルボキシル基を末端に持つアルカンチオールの混合SAMを用いて、表面の疎水性、もしくは電荷を段階的に変化させた表面上での補体活性化を検討している。その結果、アミノ基とメチル基の混合SAM表面ではアミノ基の表面存在比率が上昇するに従い血清からの吸着が増加するが、吸着層への抗C3b抗体結合量はほぼ一定であり、補体第二経路のカスケード反応を引き起こすには至っていないことを示している。一方アミノ基とカルボキシル基との混合SAM表面では、アミノ基とカルボキシル基の表面存在比率が1:1の割合になる条件で吸着層への抗C3b抗体結合量が高値になることを示している。このことはアミノ基の電氣的性質がカルボキシル基により中和されたことにより、表面と血清中のタンパクとの静電的相互作用が減少しタンパクの交換などが起こりやすくなり、表面のアミノ基とC3bとが反応しやすくなったためと考察している。</p> <p>第3章では、金薄膜表面上に固定化したデキストラン及びポリビニルアルコール(以下PVA)の表面における補体活性化を検討している。その結果、デキスト</p>			

ラン及びPVAを固定化した表面はどちらも血清中より補体成分であるC3bの沈着が強く認められ、血清中への補体活性化生成物の産生量も高い値になることを示している。一方デキストラン及びPVAを添加した血清中ではヒドロキシル基存在量が表面での評価時よりも4-2000倍多い条件下であっても、血清中への補体活性化生成物の産生量は表面固定条件と比べ著しく低い値となることを示している。このことから補体系の活性化はヒドロキシル基の存在量だけでなく、その存在状態の違いにも左右されることを指摘している。

第4章ではPVA表面の性質や構造との関係について、特にPVA層に含まれる水の量に着目し、表面作製後の高温処理の有無によってPVA表面層の結晶性と含水率を変化させ、補体系活性化との関係を検討している。その結果、キレート剤をもちいた補体系抑制時にはPVA膜の厚みにかかわらず血清からのタンパクの非特異的吸着が抑制されたことを示している。一方、補体系を抑制しない条件では、PVAを固定した際のPVA膜厚が補体系の活性化に強く影響し、厚いPVA膜では補体系をほとんど活性化しないことを見出している。しかし150度で熱処理を施した厚いPVA膜を血清と接触させると、この条件では血清中の補体系が活性化されることを見出している。以上のことからPVAの含水率や存在形態、表面性状の違いにより補体系の活性化能が大きく異なることを指摘している。

第5章では遮光条件かつ-20度で12日間保存した試料、メトキシ化PEGを常温・光照射条件でデシケータ中に8日間保存した試料、もしくは殺菌灯で60分照射した試料に正常ヒト血清を曝露し、補体系の活性化についての検討を行っている。その結果、遮光条件かつ-20度で12日間保存した表面では補体系の活性化が抑えられていることを見出している。一方常温・光照射条件でデシケータ中に8日間保存した試料および殺菌灯で60分照射した試料では、SPR測定において、血清への曝露後多量のタンパクを吸着していることを示し、その多くが補体タンパクC3bであること、また曝露血清に多量の補体活性化産物が生成していることを確認している。一方、キレート剤を添加し補体系の活性化を抑制した条件では血清への曝露後も表面へのタンパク吸着をほとんど認めず、補体タンパクC3bの表面沈着が認められなかったことを示している。このことからメトキシ化PEGを劣化させた表面では無希釈の血清においても補体系を活性化し表面に大量の補体タンパクC3bの沈着を引き起こすことを指摘している。

概要では、本編全5章において得られた成果を要約している。

(論文審査の結果の要旨)

本論文は人工材料に対する生体反応についての理解を深めることを目指し、金薄膜上に形成させたアルカンチオールの自己組織化単分子膜(SAM)と高分子固定化薄膜をモデルとして、これらの表面と生体防御系の一つである補体系との相互作用について解析した結果を5章にまとめたものである。得られた主な成果は次のとおりに要約される。

補体のC3b因子中のチオエステル結合と反応するアミノ基を有する表面は、第二経路を介して強く補体系を活性化すると予想されてきた。しかし、相反する結果が報告されている。アミノ基を有するSAMへのタンパク吸着またC3b因子の固定化を詳細に検討し、以下の二点を明らかにした。

- 1) アミノ基を有するSAMに多量の血清タンパクが吸着しC3b因子とアミノ基との反応を阻害するため、アミノ基SAMは補体系を活性化できない。
- 2) アミノ基とメチル基もしくはカルボキシル基を末端に有するアルカンチオールの混合SAMを作製した。アミノ基とメチル基を有する混合SAM表面では、補体系の活性化は見られなかった。一方、アミノ基とカルボキシル基を有する混合SAM表面では、それらの表面存在比率が1:1近傍で補体系が活性化がされた。この混合SAM表面では、血清タンパクの吸着が抑制されC3b因子がアミノ基と反応できたためである。

C3b因子中のチオエステル結合と反応するヒドロキシル基を有するポリビニルアルコール(PVA)、また、ヒドロキシル基を持たないポリエチレングリコール(PEG)と補体系の相互作用を調べ、以下の三点を明らかにした。

- 3) PVAの水溶液を血清に添加したときは、補体系はほとんど活性化されない。一方、PVAを固定化した表面は補体系を活性化する。
- 4) 表面PVA層の含水率が低くなるとともに補体系活性化能が大きくなる。PVA表面が立体的に補体制御因子とC3b因子との相互作用を阻害するためである。
- 5) 表面へのPEGの固定化は生体に対する不活性の付与方法として多用されてきた。PEG固定化表面を室温また光存在下で保存すると強く補体系を活性化することを見出した。PEG鎖の分解により形成されたPEG鎖末端のヒドロキシル基が補体系の活性化を引き起こしている。

本論文は、新規医療用材料の開発に必要な材料表面と生体との相互作用の基礎的知見を与えるものであり、学術上、實際上寄与するところが少なくない。よって、本論文は博士(工学)の学位論文として価値あるものと認める。また、平成22年2月23日、論文内容とそれに関連した事項について試問を行った結果、合格と認めた。