

[別紙2]

審査の結果の要旨

論文提出者氏名 三輪 潤一

本論文は、「抗原抗体間相互作用を用いたマイクロ細胞分離デバイスの開発」と題し、7章より成っている。

様々な組織細胞へと分化する能力を有する幹細胞を体外培養の後に移植することで重度疾患を治療する再生医療が、高度な次世代医療技術として期待されている。最も優れた多分化能を有する胚性幹細胞の使用は倫理的な問題をはらんでいるため、成人の体内に存在する幹細胞の効率的な抽出の重要性が指摘されており、複数種類の細胞を含む懸濁液より単一細胞を抽出する高精度・高効率な細胞分離法の必要性が高まっている。幹細胞のような希少細胞の分離には、細胞種やその状態に応じ細胞膜上に発現する抗原と、これに対し特異的な結合を形成する抗体とを用いることが望ましい。しかし、蛍光細胞分離法や磁気細胞分離法など既存の手法を用いる場合には目的細胞の標識に必要な微粒子が分離後の細胞に及ぼす影響が懸念され、より幹細胞抽出に適した細胞分離法が望まれる。本論文では、細胞分離に標識粒子を必要とせず、また分離後の細胞回収が容易な手法として、マイクロ流路壁面に固定した抗体による特異的接着力により目的細胞と他の細胞との速度差を生成するものを提案している。また、生体適合性に優れた新規材料を用いた抗体固定表面形成法を開発し、マイクロマシン技術により製作した細胞分離デバイス内において二種類の細胞の分離を達成している。

第一章は序論であり、まず体性幹細胞を用いた再生医療における幹細胞抽出法開発の重要性、生体液中において希少な細胞を分離する際に抗原抗体反応を利用することの有用性について述べている。次に既存の抗原抗体反応を用いた細胞分離法およびそれぞれの特徴を列挙し、幹細胞のような未分化細胞を少量の試料中より分離するために解決すべき問題点を挙げている。以上の議論を踏まえ、再生医療に用いる幹細胞分離のためには標識粒子の使用やデバイスでの細胞の捕捉を必要としない細胞分離法の必要性を論じている。

第二章では、序論において述べた要求を満たす細胞分離法として、抗体固定壁面上を流下する細胞に働く特異的接着力による減速効果を用いるものを提案している。また、化学動力学モデルを用いて抗原抗体間の結合力を予測し、細胞が機能化壁面上で受ける結合力は細胞直径程度の寸法を有するマイクロ流路内流れの壁面せん断力と同程度のオーダーであることを示し、本手法の有効性を主張している。さらに、目的細胞の減速による細胞分離を実現するにあたり、細胞直径と同程度の流路高さを有する扁平な矩形流路から成る細胞分離デバイスを設計している。

第三章では、目的細胞に対し特異的接着力を作用させる抗体固定表面の形成法について述べている。既存の材料と比較し簡便な操作により強固な抗体固定を実現可能な新規材料として、アミノメチル機能化ポリパラキシリレンを採用し、その優れた生体適合性や表面の反応性について述べている。次に本材料表面アミノ基に複数の生体分子を介し抗体を固定する手法および固定条件を考案し、水晶振動子微量天秤を用いて基板の重量変化を計測することで抗体の固定量について

定量的な評価を行っている。以上により、特異的接着性を付与する表面材料としての機能化ポリパラキシリレンの有用性を示している。

第四章では、前章において開発した抗体固定法との整合性を考慮したマイクロ流路構造の製作プロセスを構築している。特に、新規材料である機能化ポリパラキシリレンの熱圧着条件を見いだし、表面アミノ基を損なわず流路のシーリングを行うことに成功している。

第五章では、抗原抗体間相互作用による細胞減速効果を、顕微鏡下での細胞流下速度計測により評価している。モデル細胞としてはヒト臍帯静脈血管内皮細胞(HUVEC)を用い、まず抗体を固定しない流路内における細胞流下速度はバルク平均流速と同等であることを示している。次に HUVEC に対し特異的に結合する CD31 抗体を固定した流路内においては、HUVEC 流下速度が最大 70 %程度まで低下することを示し、減速効果の抗体濃度および試料流速に対する依存性について述べている。一方 HUVEC に対し特異的結合をしない CD86 抗体の影響による細胞減速効果は十分小さいことから、抗体固定表面上での細胞減速が特異的作用であることを示している。また、以上の計測結果は特異的接着力および細胞膜の変形を考慮した二次元膜剥離モデルにより近似できることを示し、計測を行った範囲外の条件での細胞減速効果について推定を行っている。

第六章では、前章の結果を踏まえ、HUVEC および CD31 抗体に対し結合をしないヒト白血病細胞(HL60)を混合した試料を用いた細胞分離実験について述べ、第二章において提案した細胞分離法の有用性を論じている。まず、それぞれの細胞種について、細胞分離デバイス最下流部を通過する細胞数の時間推移を評価し、二種類の細胞を含む懸濁液プラグが抗体固定流路内で各細胞腫のプラグへと分離したことを示している。

第七章は結論であり、本論文で得られた成果をまとめている

以上、本論文では、再生医療における幹細胞抽出のための細胞分離原理として、細胞分離に標識粒子を必要とせず、分離後の細胞回収が容易であるという点で有利な、抗原抗体間相互作用による細胞減速効果の利用を提案し、実際にマイクロデバイスを製作してその有効性を示している。その際開発した機能化ポリパラキシリレン表面への抗体固定法は、簡便な操作により強固な生体分子固定を実現するものであり、細胞分離のほか生化学センサーや表面処理など、広い応用が可能である。モデル細胞系を用いた細胞分離実験では、良好な分離成績を示しており、再生医療の重要な技術課題である高精度・高効率な幹細胞抽出法の実現への寄与が認められる。従って、本論文は、マイクロスケールでの細胞ハンドリング技術について新たな知見を加えたもので、医療工学、そして熱流体工学をはじめ機械工学の学術の上で寄与するところが大きい。

よって本論文は博士（工学）の学位請求論文として合格と認められる。