

- generation American Heart Association 75th Scientific Sessions 2002 11 17-20 (Chicago, USA)
- 64 高見澤格、陳偉、神野桂子、斯波真理子 Surfactant を用いた筋肉での遺伝子発現増強効果 第 34 回動脈硬化学会総会
- 65 斯波真理子 遺伝子導入ヘクターとして的高分子なナノミセル箱根山ワークショップ
- 11 中山泰秀、梅田真理子、ベクター、ヘクター用高分子、その製造方法 核酸含有複合体及びその製造方法、**特願** 2002-299225
- 12 中山泰秀 根本 泰、動脈瘤閉塞剤及び動脈瘤閉塞方法、**特願** 2002-352736
- 13 中山泰秀、根本 泰 動脈瘤閉塞材及び動脈瘤閉塞方法、**特願** 2002-359528
- 14 中山泰秀、林美智子、高見沢計一 植田初江、人工血管、**特願** 2003-052512
- H 知的財産権の出願・登録状況**
- 1 特許取得**
- 1 中山泰秀、西 正吾、山田 進、動脈瘤閉鎖具 **特願** 2002-195851
- 2 中山泰秀、山田 進 荒木修一 生体管接合材 **特願** 2002-088131
- 3 中山泰秀 山田 進、荒木修一、イオン結合性生体組織接着剤、**特願** 2002-088214
- 4 中山泰秀、山田 進、荒木修一、血管内拡張用具、**特願** 2002-088130
- 5 中山泰秀、上垣昭彦、小野静香、ヒドロキサム酸化合物、**特願** 2002-123795
- 6 中山泰秀 根本 泰、組織工学用スキャホールド材及び、該材からなる人工血管、**特願** 2002-091793
- 7 中山泰秀 根本 泰、ベクター、核酸含有複合体及びその形成方法、**特願** 2002-243872
- 8 中山泰秀 西 正吾 根本 泰 ステント **特願** 2002-243871
- 9 中山泰秀、根本 泰、核酸複合体及びその製造方法、**特願** 2002-268698
- 10 中山泰秀、根本 泰、ベクター、核酸含有複合体及びその形成方法、**特願** 2002-299226
- 2 実用新案登録**
- なし
- 3 その他**
- 特になし

厚生労働科学研究費補助金（ヒトゲノム 再生医療等研究事業）
分担研究報告書

ヘクターの骨格設計に関する研究
スター型カチオン性高分子の合成と遺伝子発現

分担研究者 中山泰秀 国立循環器病センター研究所 生体工学部 室長

研究要旨

合成高分子系ヘクターの分子工学的設計における高分子構造の骨格設計として、スター型カチオン性高分子の合成とその遺伝子発現について検討した。合成高分子系ヘクターの幾何学は、遺伝子発現を操作し得る可能性が報告されている。本研究では遺伝子導入の高効率化をめざして、分岐数ならびに鎖長を厳密に制御したスター型高分子を分子設計した。合成はイニファタリビシクル重合法を用いた。イニファタ基数を 1, 3, 4, 6 個有するベンゼン誘導体をそれぞれ相当するハロゲン化メチル基導入体から得、メタノール溶液中での紫外光照射によって 3-(*N,N*-dimethylamino)propyl acrylamide を光重合させ、直鎖ならびに分岐数 3, 4, 6 のスター型高分子を得た。分岐数はイニファタの存在量によって、また鎖長は溶液条件（モノマー濃度と仕込み比）ならびに照射条件（強度と時間）によって調節可能であった。分子量を約 2 万とした各スター型高分子はいずれも DNA (pGL3-control) と混合すると、分岐数に関わらず全て約 250nm ($C/A < 5$)、約 150nm ($C/A > 5$) の粒径を有するポリイオンコンプレックスを生成した。また、 ζ 電位はいずれも約 +5mV ($C/A > 4$) であった。一方、コンプレックスを培養 COS-1 細胞に作用させて得られた Luciferase 活性のおおよその相対量は、直鎖 3 分岐 4 分岐 6 分岐 = 1 2 4 10 となり、分岐数の増加に伴う大幅な発現量の増加を認めた。分子構造のナノ幾何学的設計は遺伝子発現の高効率化を獲得する有力な設計手段に成り得ると考えられる。

研究協力者 長石 誠

国立循環器病センター研究所
生体工学部

大平望都

国立循環器病センター研究所
ハイオサイエンス部

斯波真理子

国立循環器病センター研究所
ハイオサイエンス部

A 研究目的

当初 遺伝子治療は先天的な遺伝子欠損に起因する遺伝病の治療を目的としていたが 現在は病変部位の細胞に遺伝子を導入し、ガンやエイズなど後天的原因による疾患から、再狭窄予防や虚血性疾患を始めとする循環器病疾患など必ずしも致死性でない疾患まで治療の対象となっている。

遺伝子治療には細胞内に治療用遺伝子を送り込むシステムが必要である。一般的な遺伝子送達システムは治療用遺伝子を含む DNA と それを運搬するヘクターとの複合体として構成されている。これまでに多くの遺伝子治療は臨床主導で進められてきており その際ヘクターとして主にレトロウイルスやアデノウイルスといったウイルス系のヘクターが使用されてきた。ウイルス系のヘクターは発現効率が高い反面、安全性に問題を有しており 副作用による死亡事故例も報告されている。

そこで、ウイルス系のヘクターに代わる次世代型のヘクターとして合成高分子が注目され 近年研究が活発化してきている。一般に合成高分子の骨格を構成するのはカチオン性高分子であり、カチオン性高分子のカチオン性基と DNA のリン酸基の有するアニオン性基との静電相互作用によってポリイオンコンプレックスが形成され、これがヘクターとして利用されている。このヘクターは通常、カチオン性高分子が過剰の系で作成され、表面はカチオン性高分子で覆われ、僅かに正電荷を帯びている。そのため、細胞に作用させると 細胞膜表面の糖鎖のアニオン性基と容易に静電相互作用し、エンドサイトーシスによって細胞内に取り込まれる。しかし 受動的な機構によって取り込まれるため効率はかならずしも

高くなく また、取り込まれた後の発現効率も低いため、合成高分子系のヘクターが広く臨床応用される大きな障害となっている。

そこで、遺伝子発現効率を改善するため、ヘクターに生化学的機能を導入したハイブリッド型ヘクターの開発が検討されている。また、一方、ヘクターの構造的な幾何学的設計による効率化が検討されている。これまでに、鎖長を変化させた直鎖型カチオン性高分子の Poly ethylenimine、あるいは水溶性高分子とカチオン性高分子のブロック共重合体である Poly(ethylene glycol)-copoly(L-lysine) カチオン性高分子の側鎖に水溶性高分子をクラフト共重合させた Poly(L-Lysine)-graft-poly(ethylene glycol)などが報告されている。最近では、より幾何学的構造を精密に制御できる Polyamidoamine dendrimer がヘクターに応用されている。テントリマーは世代数を正確に調整できるため、粒子径を厳密に調節できる。テントリマーの世代数つまり粒子の大きさと発現効率との相関関係が調べられ、有る世代数において発現効率が最も高くなることが報告されている。従ってヘクターの幾何学的構造を変化させることによって発現効率を向上させる可能性が示され 一般に合成高分子はランカル重合によって合成されている。ランカル重合は種々にモノマーに適用出来る汎用性の高い重合法であるが、重合は反応性の高いラジカルを連鎖して伝体として進むため その制御は極めて困難であり 通常分子量を制御することは不可能である。従って、通常のランカル重合による高分子の幾何学的設計は不可能である。

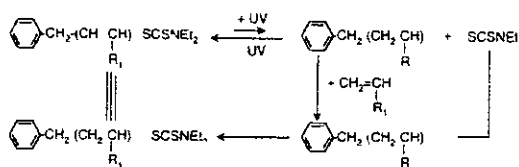


図1 イニファタリピンクラシカル
重合機構

本研究では、ヘクターのナノ幾何学構造を厳密に分子設計することにより、遺伝子発現の効率化を目指している。具体的には同一分子量で分岐数が異なるスター型のカチオン性高分子を合成し、分岐構造が及ぼすDNAとのコンプレックス形成能や遺伝子発現効率への影響について調べる。合成法には我々が医療デハイスの表面修飾法として確立したイニファタリピンクラシカル重合法を用いる(図1)。

イニファタ(iniferter)とは、1分子で重合開始剤(initiator)-連鎖移動剤(transfer)-停止剤(terminator)として機能する化合物のことであり、大津らによって合成された。イニファタの一種であるアルキルンチオカルハメートに紫外光を照射するとC-S結合の解離が起こり、アルキルラジカルとンチオカルハミルラシカルを生成する。アルキルラシカルは反応性が高くヒニルモノマーを付加し、重合鎖を成長させる。一方、ンチオカルハミルラシカルは反応性が低く開始反応を全く起こさないか起こしにくく成長ラシカルと可逆的に一次ランカル停止する。このようにしてンチオカルハミルラシカルと再結合が起こると成長末端は消失し重合は一端停止するか照射を行うと休止末端において再びランカル解離が起こり重合が再開される。そのため重合は光照射時にのみ起こすことかできるので照射条件によって重合成長を制御す

ることかできる。この偽リリンク重合を用いれば重合鎖長を自由に制御することかでき高分子の幾何学的設計か可能となる。

本研究では、イニファタ基の導入量の異なる多イニファタを合成し、それぞれの重合度を変化させることで分子量を統一させた多分基型のカチオン性高分子を分子設計した。これらの分岐度の変化が及ぼすDNAとの複合体形成能を動的散乱測定装置を用いて粒径ならびに表面電位(ゼータ電位)から調べた。また細胞実験により細胞障害性および遺伝子発現効率を調べた。

B 研究方法

B-1 試薬

2,4,6-Tris(bromomethyl)-mesitylene、1,2,4,5-Tetrakis(bromo-methyl)benzene、Hexakis-(bromo-methyl)benzeneはAldrichより購入した。Sodium N,N-diethylthiocarbamate Tri-hydrateは和光純薬工業株式会社より購入した。3-(N,N-dimethylamino)propyl acrylamide (DMAPAAm)は東京化成工業より購入した。その他の溶媒等は和光純薬工業株式会社およびナカライテスク株式会社より購入した。使用に際してDMAPAAmは蒸留精製を行ない、その他の試薬はそのまま使用した。

B-2 装置・測定

B-2-1 NMR 測定

NMR spectrometer (300MHz, Gemini-300, Varian)を用いて行なった。測定試料の溶媒にはCDCl₃を用いた。内部標準物質にはTMS(0ppm)を使用した。測定は室温にて行なった。

B-2-2 紫外光光源

紫外光の光源には SPOT CURE (250W 高圧水銀灯, ウンオ電気株式会社, 東京)を用いた。

B-2-3 ゲル濾過クロマトグラフィー (GPC)

分子量測定は HLC-8020 (東ソー株式会社 東京) にて測定した。カラムは Tosoh TSKgel α -3000 と α -5000 を直列につないで用いた。流量 0.5ml/min, カラム温度 40℃, 溶離液には DMF を用い 検量線の設定には標準 Poly(ethylene glycol)を用いた。

B-2-4 動的光散乱測定および電気泳動光散乱測定

粒径およびゼータ電位はレーザーゼータ電位計 ELS-8000 (大塚電子株式会社, 大阪) にて測定した。光源 He-Ne レーザー (10mW)、セル室温度 37℃。

B-3 多イニファタの合成

B-3-1 分子内に DC 基を 1 つ有するイニファタの合成

Sodium *N,N*-diethyldithiocarbamate (10.3g, 46mmol, M w 225.31) を含む Ethanol 溶液 50ml 中に Benzyl chloride (4.8g, 38mmol) を含む Ethanol 溶液 10ml を窒素雰囲気下 0℃で滴下した。反応溶液を室温で 23 時間攪拌した後 150ml の水を加え、Diethyl ether で抽出した (200ml×3 回)。有機層を水洗いし (100ml×3 回) 硫酸ナトリウムで乾燥させた。エハポレータを用いて減圧下で溶媒を留去し、Benzyl *N,N*-diethyldithiocarbamate を得た (無色液体)。収量 17.6g (収率 93%)。

B-3-2 分子内に DC 基を 3 つ有するイ

ニファタの合成

2,4,6-Tris(bromomethyl)mesitylene (2g, 4.02mmol, F w 398.98) に Ethanol (100ml) と Sodium *N,N*-diethyldithiocarbamate Trihydrate (2.04g, 9.05mmol F w 225.31) を加えて、室温で攪拌した。攪拌開始 24 時間後、ろ過して沈殿を回収した。回収した沈殿を Chloroform に溶解し水で分液洗浄した。Chloroform 層をエハポレータにて濃縮し、テシケータにて真空乾燥させて 2,4,6-Tris(*N,N*-diethyldithiocarbamylmethyl)mesitylene を得た (白色固体)。収量 3.03g (収率 98.4%)。

B-3-3 分子内に DC 基を 4 つ有するイニファタの合成

1,2,4,5-Tetrakis(bromomethyl) benzene (1g, 2.22mmol, F w 449.83) に Ethanol (100ml) と Sodium *N,N*-diethyldithiocarbamate Trihydrate (4g, 17.76mmol, F w 225.31) を加えて 室温で攪拌した。攪拌開始 48 時間後 ろ過して沈殿を回収した。回収した沈殿を Chloroform に溶解し、水で分液洗浄した。Chloroform 層をエハポレータにて濃縮し テシケータにて真空乾燥させて 1,2,4,5-Tetrakis(*N,N*-diethyldithiocarbamylmethyl)benzene を得た (白色固体)。収量 1.48g (収率 91.4%)。

B-3-4 分子内に DC 基を 6 つ有するイニファタの合成

Hexakis(bromomethyl)benzene (1g, 1.57mmol, F w 635.68) に Ethanol (200ml) と Sodium *N,N*-diethyldithiocarbamate Trihydrate (6.36g, 28.23mmol, F w 225.31) を加えて、室温で攪拌した。攪拌開始 4 日後 ろ過して沈殿を回収した。

回収した沈殿を Chloroform に溶解し、水で分液洗浄した。Chloroform 層をエハポレータにて濃縮し、デンケータにて真空乾燥させて Hexakis(*N,N*-diethyldithiocarbamylmethyl)benzene を得た(白色固体)。収量 1.48 g (収率 90.2%)。

B-4 多分岐型カチオン性高分子の合成

B-4-1 直鎖型 PDMAPAAm の合成

DMPAAm (3.9g, 24.96mmol, M w 156.23) と Benzyl *N,N*-diethyldithiocarbamate (23.94mg, 0.1mmol, F w 239.41) の混合物を Methanol で希釈し、全量 20ml の溶液を調整した。この溶液に窒素ガスを吹き込みながら攪拌し、紫外光 (光量 1mW/cm²) を照射した。紫外光照射 30 分後、重合溶液をエハポレータにて濃縮し、大量の Diethyl ether に滴下することで高分子を析出させた。テカンテーションにより上澄み液を除去し、高分子を水に溶解し、凍結乾燥させた。凍結乾燥後、GPC にて得られた高分子の分子量を測定した。

B-4-2 3 分岐型 PDMAPAAm の合成

2,4,6-Tris(*N,N*-diethyldithiocarbamylmethyl)mesitylene (20.14mg, 1.67mmol, F w 604.08) を Chloroform (300 μ l) に溶解し、DMPAAm (1.6224g, 10.38mmol, M w 156.23) に加えた。この混合物を Methanol で希釈し、全量 20ml の溶液を調整した。この溶液に窒素ガスを吹き込みながら攪拌し、紫外光 (光量 1mW/cm²) を照射した。紫外光照射 30 分後、重合溶液をエハポレータにて濃縮し、大量の Diethyl ether に滴下することで高分子を析出させた。テカンテーションにより上澄み液を除去した後、高分子を水に溶解し、凍結乾燥した。凍結乾燥後、GPC にて得られた高分子の分

乾燥後、GPC にて得られた高分子の分子量を測定した。

B-4-3 4 分岐型 PDMAPAAm の合成

1,2,4,5-Tetrakis(*N,N*-diethyldithiocarbamylmethyl) benzene (18.08mg, 1.25mmol, F w 723.30) を Chloroform (300 μ l) に溶解し、DMPAAm (1.326g, 8.49mmol, M w 156.23) に加えた。この混合物を Methanol で希釈し、全量 20ml の溶液を調整した。この溶液に窒素ガスを吹き込みながら攪拌し、紫外光 (光量 1mW/cm²) を照射した。紫外光照射 30 分後、重合溶液をエハポレータにて濃縮し、大量の Diethyl ether に滴下することで高分子を析出させた。テカンテーションにより上澄み液を除去した後、高分子を水に溶解し、凍結乾燥した。凍結乾燥後、GPC にて得られた高分子の分子量を測定した。

B-4-4 6 分岐型 PDMAPAAm の合成

Hexakis(*N,N*-diethyldithiocarbamylmethyl)benzene (17.43mg, 0.83mmol, F w 1045) を少量の Chloroform に溶解し、DMPAAm (3.9g, 24.96mmol, M w 156.23) に加えた。この混合物を Chloroform で希釈し、全量 20ml の溶液を調整した。この溶液に窒素ガスを吹き込みながら攪拌し、紫外光 (光量 1mW/cm²) を照射した。紫外光照射 30 分後、重合溶液をエハポレータにて濃縮し、大量の Diethyl ether に滴下することで高分子を析出させた。テカンテーションにより上澄み液を除去した後、高分子を水に溶解し、凍結乾燥した。凍結乾燥後、GPC にて得られた高分子の分子量を測定した。

B-5 ポリイオンコンプレックスの粒径およびゼータ電位の測定

B-5-1 高分子溶液の調製

直鎖型 PDMAPAAm (2.6mg, M_w 18000) を Tris-HCl-Buffer (5ml, pH=7.4) に溶解した。

B-5-2 DNA 溶液の調製

DNA (pGL3 control plasmid, 1.023mg/ml) を 49 μ l 採取し Tris-HCl-Buffer (951 μ l) を加えて希釈した。(濃度 50 μ g/ml)

B-5-3 PDMAPAAm/DNA ポリイオンコンプレックス(C/A=1)溶液の調製

DNA 溶液 (880 μ l) に Tris-HCl-Buffer (1100 μ l) を加えた後 高分子溶液 (20 μ l) を加えて C/A=1 のポリイオンコンプレックス溶液を調製した。

B-5-4 粒径およびゼータ電位の測定

調製したポリイオンコンプレックス溶液を 37℃で 24 時間静置させた後、動的光散乱測定により粒径を、電気泳動光散乱測定によりゼータ電位を測定した。

3 分岐、4 分岐、6 分岐型 PDMAPAAm も直鎖型と同様の操作でポリイオンコンプレックス溶液を調製した。

B-6 遺伝子導入における高分子ベクターの分岐数の影響

B-6-1 高分子溶液の調製

直鎖型 PDMAPAAm (2.36mg, M_w 18,000) をそれぞれ Tris-HCl-Buffer (2ml) に溶解した。この溶液を 50 μ l 採取し、Tris-HCl-Buffer を加えて希釈し 全量 500 μ l の溶液とした。3 分岐型、4 分岐型、6 分岐型も同様にして溶液を調製した。

B-6-2 DNA 溶液の調製

pGL3 control plasmid (0.2 μ g/ μ l, 90 μ l) に 2×Buffer 溶液 (450 μ l) を加え、全量 540 μ l の溶液を調製した。

B-6-3 ポリイオンコンプレックス(C/A=1)の調整

DNA 溶液(100 μ l)に高分子溶液(67 μ l)を加え 37℃で 24 時間静置させた。

B-6-4 ポリイオンコンプレックスのトランスフェクション実験

24well-plate 上で培養 1 日目の COS-1 細胞に 1well 当たり 25 μ l のポリイオンコンプレックス溶液を添加し 5%CO₂ インキュベータ内で培養した。培養 3 時間後、培地を除去し、PBS で洗浄した後 1well 当たり 1ml の DMEM を加え 再度 5%CO₂ インキュベータ内で培養した。培養 2 日後、培地を除去し、PBS で洗浄した後 Luciferase cell culture lysis 5×Reagent を 1well 当たり 200 μ l 加え、静置させた。30 分後 細胞をエノベントルフ型チューブに移し 遠心分離した (4℃、15000rpm、1min)。遠心後 上清を 4 μ l ずつマイクロプレートに採取し ルミノメータでルンフェラーゼ活性を測定した。また 遠心後の上清を 5 μ l 採取し 蛋白定量を行なった。

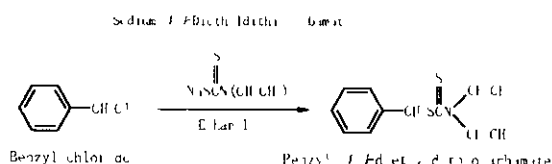


図2 Benzyl N,N-diethyldithiocarbamate
の合成

CD 結果と考察

CD-1 多イニファタの合成

Sodium N,N-diethyldithiocarbamate を含む Ethanol 溶液に Benzyl chloride を含む Ethanol 溶液を窒素雰囲気下で滴下し、得られた生成物を $^1\text{H-NMR}$ 測定すると、 δ 7.407 ~ 7.271ppm (m, 5H, Ar-H) δ 4.540ppm (s, 2H, Ar-CH₂S) δ 4.082 ~ 4.012ppm (q, 2H, -N-CH₂-), δ 3.763ppm ~ 3.692ppm (q, 2H, -N-CH₂-) δ 1.311 ~ 1.252ppm (m, 6H, -CH₂-CH₃)にそれぞれピークが検出された。原料である Benzyl chloride の $^1\text{H-NMR}$ 測定結果と比較したところ、ハロゲン化メチル基由来の ^1H ピーク (δ 4.597ppm, Ar-CH₂Cl)が消失し、新たに S-メチレン基 (δ 4.540ppm, Ar-CH₂S) および N-メチレン基 (δ 4.082 ~ 4.012ppm, -N-CH₂-) (δ 3.763 ~ 3.692ppm, -N-CH₂-) に由来するピークが検出された。この結果より、Benzyl 位に DC 基が導入されたといえる。したがって得られた白色固体は Benzyl N,N-diethyldithiocarbamate といえる (図2)。また、2,4,6-Tris(bromomethyl) mesitylene (2g, 4.02mmol, Fw 398.98) に Ethanol (100ml) と Sodium N,N-diethyldithiocarbamate Trihydrate (2.04g, 9.05mmol, Fw 225.31)を加えて、室温で攪拌した。攪拌 24 時間後、沈殿物の

TLC 測定を行うと、原料である 2,4,6-Tris(bromomethyl)mesitylene の UV スポット (rf=0.80) は消失しており、新たに 2 つのスポットが現われた。これら 2 つの UV スポットは Sodium N,N-Diethyldithiocarbamate Trihydrate (rf=0.66) と DC 基が 3 基導入された生成物 (rf=0.57) 由来のスポットであると考えられる。

ろ過により回収した沈殿物を Chloroform に溶解し、水で洗浄することで未反応の Sodium N,N-Diethyldithiocarbamate Trihydrate を除去した。Chloroform 層の TLC 測定を行うと、Sodium N,N-Diethyldithiocarbamate Trihydrate の UV スポット (rf=0.66) は消失した。Chloroform 層をエバポレータにて濃縮し、デシケータにて真空乾燥させた。析出した白色固体の $^1\text{H-NMR}$ 測定をした結果、 δ 4.447ppm (s, 6H, Ar-CH₂S) δ 4.086 ~ 4.015ppm (q, 6H, -N-CH₂-) δ 3.746 ~ 3.676ppm (q, 6H, -N-CH₂-), δ 2.421ppm (s, 9H, Ar-CH₃) δ 1.324 ~ 1.222ppm (m, 18H, -CH₂-CH₃)、にそれぞれピークが検出された。

原料である 2,4,6-Tris(bromomethyl)mesitylene の $^1\text{H-NMR}$ 測定結果と比較したところ、ハロゲン化メチル基由来の ^1H ピーク (δ 4.580ppm, Ar-CH₂Br) が消失し、新たに S-メチレン基 (δ 4.447ppm, Ar-CH₂S) および N-メチレン基 (δ 4.086 ~ 4.015ppm, -N-CH₂-), (δ 3.746 ~ 3.676ppm, -N-CH₂-) に由来するピークが新たに検出された。この結果より、Benzyl 位に DC 基が導入されたといえる。したがって得られた白色固体は 2,4,6-Tris(N,N-diethyldithiocarbanylmethyl)mesitylene といえる (図3)。

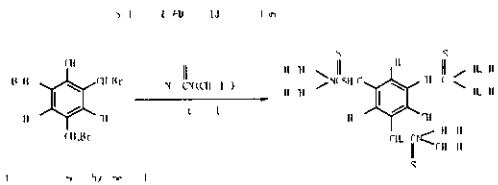


図3 2,4,6-Tris(N,N-diethylthiocarbonylmethyl)mesitylene の合成

1,2,4,5-Tetrakis(bromomethyl)benzene (1g, 2.22mmol Fw 499.83) に Ethanol (50ml) と Sodium N,N-Diethylthiocarbamate Trihydrate (4g, 17.76mmol Fw 225.31) を加えて室温で攪拌した。攪拌 48 時間後 沈殿物の TLC 測定を行なうと 原料である 1,2,4,5-Tetrakis(bromomethyl)benzene の UV スポットは消失しており 新たに 2 つの UV スポットが現われた。これら 2 つの UV スポットは Sodium N,N-Diethylthiocarbamate Trihydrate (rf=0.66) と DC 基が 4 基導入された生成物 (rf=0.54) に由来するものと考えられる。

ろ過により回収した沈殿物を Chloroform に溶解し 水で洗浄することで未反応の Sodium N,N-Diethylthiocarbamate Trihydrate を除去した。Chloroform 層の TLC 測定を行なうと Sodium N,N-Diethylthiocarbamate Trihydrate の UV スポット (rf=0.66) は消失した。Chloroform 層をエバポレータにて濃縮し テンケータにて真空乾燥させた。析出した白色固体の ¹H-NMR 測定をした結果 δ 7.487ppm (s, 2H, Ar-H)、δ 4.573ppm (s, 8H, Ar-CH₂S) δ 4.065~3.994ppm (q, 8H -N-CH₂-) δ 3.765~3.687ppm (q, 8H -N-CH₂-)、δ

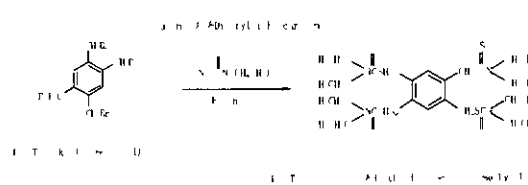


図4 1,2,4,5-Tetrakis(N,N-diethylthiocarbonylmethyl)benzene の合成

1.304~1.256ppm (t, 24H, -CH₂-CH₃)にそれぞれピークが検出された。

原料である 1,2,4,5-Tetrakis(bromomethyl)benzene の ¹H-NMR 測定結果と比較したところ、ハロゲン化メチル基 (δ 4.605ppm Ar-CH₂Br) 由来のピークが消失し 新たに S-メチレン基 (δ 4.573ppm, Ar-CH₂S) と N-メチレン基 (δ 4.065~3.994ppm -N-CH₂-) (δ 3.765~3.687ppm -N-CH₂-) に由来するピークが検出された。この結果より、Benzyl 位に DC 基が導入されたといえる。したがって得られた白色固体は 1,2,4,5-Tetrakis(N,N-diethylthiocarbonylmethyl)benzene と言える (図4)。

Hexakis(bromomethyl)benzene (1g, 1.57mmol, Fw 635.68) に Ethanol (50ml) と Sodium N,N-Diethylthiocarbamate Trihydrate (6.36g, 28.23mmol, Fw 225.31) を加えて室温で攪拌した。攪拌 4 日後 沈殿物の TLC 測定を行なうと 原料である Hexakis(bromomethyl)benzene の UV スポット (rf=0.88) は消失しており 新たに 2 つの UV スポットが現われた。これら 2 つの UV スポットは Sodium N,N-Diethylthiocarbamate Trihydrate (rf=0.66) と DC 基が 6 基導入された生成物 (rf=0.14) に由来するものと考えられる。

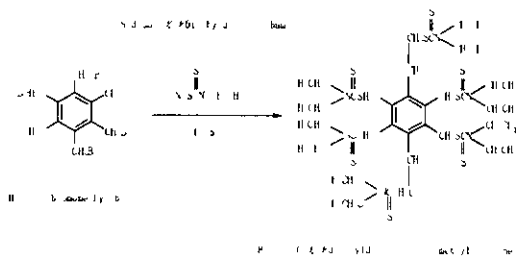


図 5 Hexakis(N,N-

diethylthiocarbamylmethyl)benzene の合成

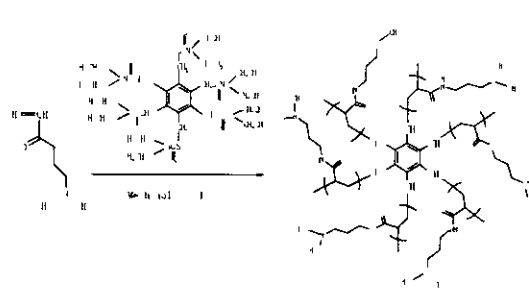


図 9 6分岐型カチオン性高分子の合成

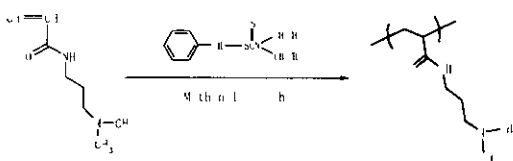


図 6 直鎖型カチオン性高分子の合成

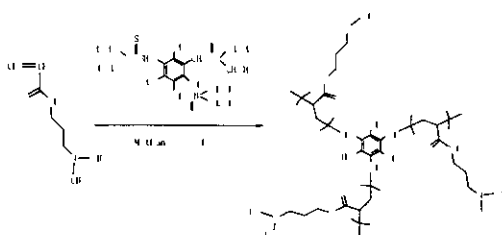


図 7 3分岐型カチオン性高分子の合成

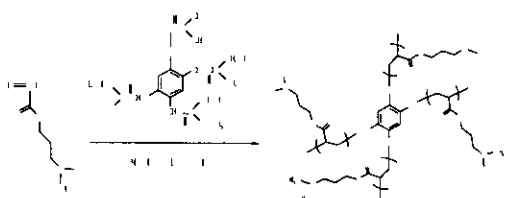


図 8 4分岐型カチオン性高分子の合成

ろ過により回収した沈殿物を Chloroform に溶解し 水で洗浄することで未反応の Sodium N,N-Diethylthiocarbamate Trihydrate を除去した。Chloroform 層の TLC 測定を行なうと Sodium N,N-Diethylthiocarbamate Trihydrate の UV スポット (rf=0.66) は消失した。Chloroform 層をエハポレータにて濃縮し テンケータにて真空乾燥させた。析出した白色固体の $^1\text{H-NMR}$ 測定をした結果 δ 4.565ppm (s, 12H, Ar-CH₂S) δ 4.012~3.988ppm (q, 12H, -N-CH₂-), δ 3.731~3.708ppm (q, 12H, -N-CH₂-) δ 1.307~1.261ppm (m, 36H, -CH₂-CH₃)にそれぞれピークが検出された。原料である 1,2,4,5-Tetrakis(bromomethyl)benzene の $^1\text{H-NMR}$ 測定結果と比較したところ ハロゲン化メチル基 (δ 4.702ppm, Ar-CH₂Br) に由来するピークが消失し、新たに S-メチレン基 (δ 4.565ppm, Ar-CH₂S) と N-メチレン基 (δ 4.012~3.988ppm, -N-CH₂-), (δ 3.731~3.708ppm, -N-CH₂-)に由来するピークが新たに検出された。この結果より Benzyl 位に DC 基が導入されたといえる。したがって得られた白色固体は Hexakis(N,N-diethylthiocarbamylmethyl)benzene と言える (図 5)。

CD-2 多分岐型カチオン性高分子の合成 (図 5-9)

合成した多イニファタを用いてカチオン性モノマーの重合を行なった。重合体の分子量測定は GPC にて行なった。

モノマー濃度が増加すると重合体の数平均分子量(Mn)も増加した。一方、分子量分布は約 2 前後に抑えることかできた。

原料である DMAPAAm と生成物の $^1\text{H-NMR}$ を測定した結果、DMAPAAm の C-C 二重結合に由来するピークが生成物では消失しており、他のピークは残っていることから、生成物は PDMAPAAm である。

他の分岐型カチオン性高分子も直鎖型と同様に、モノマー濃度を変化させることで重合鎖長の調節を行なった。他の分岐型カチオン性高分子も直鎖型と同様に、モノマー濃度を変化させることで重合鎖長を調節することかできた。この中から分子量が 18 000 の重合体を用いて、以下、物理化学的・生物学的性質について検討した。

CD-3 カチオン性高分子と DNA とのポリオンコンプレックス形成能

CD-3-1 ポリオンコンプレックスの粒径測定

カチオン性高分子の正電荷量と DNA の負電荷量が 1 : 1 になるように混合し、動的光散乱測定によりポリオンコンプレックスの粒径測定を行なった。

図 10、11 に示すように、カチオン性高分子は DNA と混合直後にポリオンコンプレックスを形成した。キュムラント解析による粒径では約 250nm のナノ粒子を生成しており、24 時間後も安定であるとわかった。

他の分岐型カチオン性高分子も直鎖型と

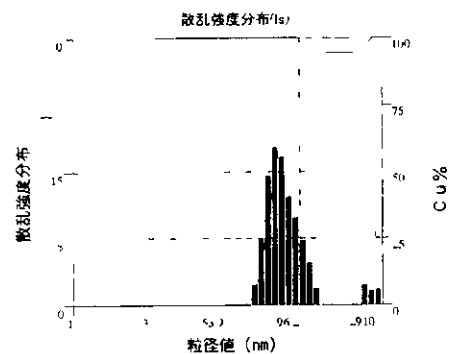


図 10 DLS によるポリオンコンプレックス (C/A=1) 形成直後の粒径測定 (キュムラント解析)

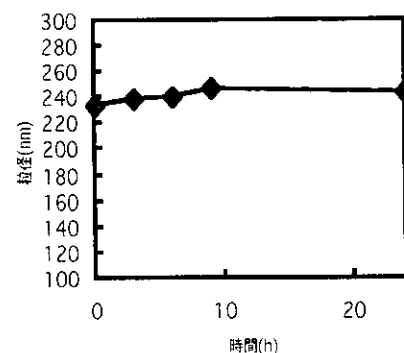


図 11 ポリオンコンプレックス(C/A=1) 形成直後の粒径変化

同様に DNA と混合すると、約 250nm のナノ粒子を生成した(図 12)。これはカチオン性高分子と DNA とかポリオンコンプレックスを形成していると考えられる。

CD-3-2 ポリオンコンプレックス粒径の C/A 比依存性

ポリオンコンプレックスの C/A 比を変化させたときの粒径への影響について調べた。動的光散乱測定により求めた各ポリオンコンプレックスの粒径を図 13 に示す。

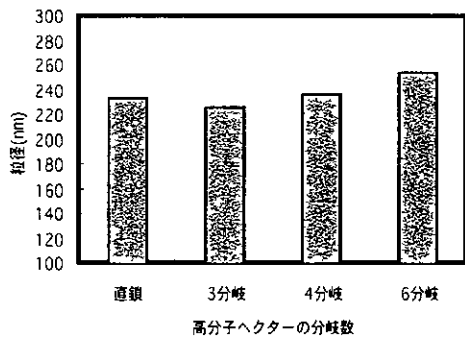


図 12 分岐型カチオン性高分子と DNA とのポリイオンコンプレックス(C/A=1)形成直後の粒径

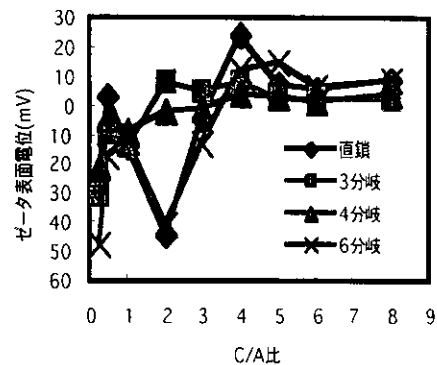


図 14 C/A 比の異なるポリイオンコンプレックスの表面電位

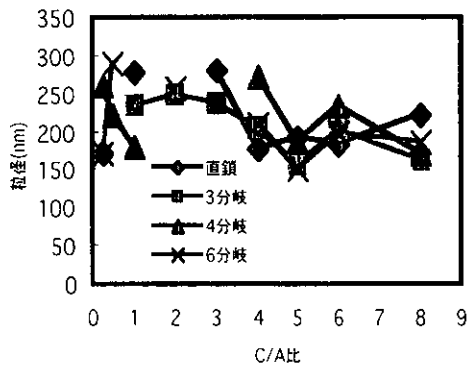


図 13 C/A 比を変化させたときの各ポリイオンコンプレックスの粒径 (キュムラント解析による)

C/A 比の増加に伴い 粒径は減少し C/A=5 以降で約 150nm に近づく傾向にあった。

CD-3-3 ポリイオンコンプレックスの表面電位(ゼータ電位)

電気泳動光散乱測定によりポリイオンコンプレックスの表面電位 (ゼータ電位) の測定を行なった。図 14 に示すように ポリイオンコンプレックスの C/A 比が増加するに伴ってゼータ電位が増加し、C/A=3 以降で約+5mV でほぼ一定の値を示した。

CD-4 多分岐型カチオン性高分子の細胞障害性

多分岐型カチオン性高分子の細胞への障害性は、トランスフェクション実験における蛋白定量値より算出した。図 15 に示すように、この実験ではカチオン性高分子の添加量が約 10(μ g/ml)までは細胞への障害性は見られなかったが、それ以上になると相対細胞生存率が減少した。相対細胞生存率が減少しているのは カチオン性高分子の有する正電荷によって細胞が障害を受けているためと考えられる。

CD-5 遺伝子導入における高分子ベクターの分岐数の影響

分岐数の異なる高分子ベクターを用いてトランスフェクション実験を行なうと、図 16 に示すように、高分子の分岐数が増加するにつれて遺伝子発現効率は大幅に増加した。また、最も高い遺伝子発現効率を示した 6分岐型カチオン性高分子を用いて C/A 比を変化させたときの遺伝子発現効率への影響についても調べた。図 17 に示すように、

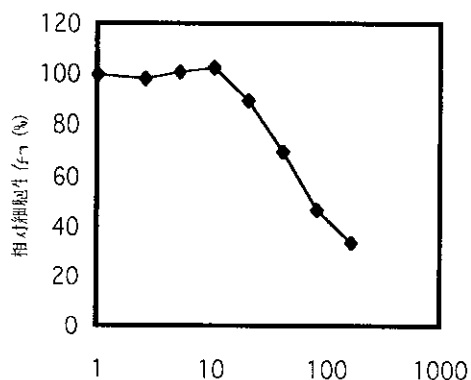
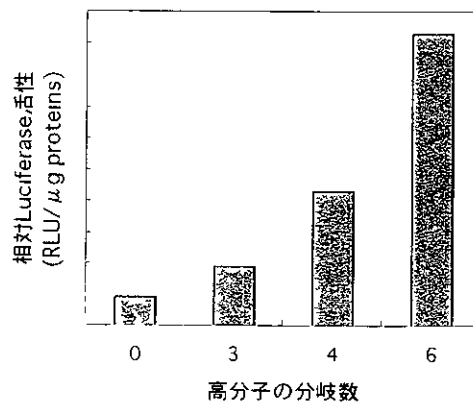


図 15 多分岐型カチオン性高分子の細胞障害性



対ルシフェラーゼ活性

C/A=4 のとき、最も高い遺伝子発現効率を示した。

E 結論

イニファタ光リピングラジカル重合による多分岐型カチオン性高分子の合成

多イニファタを用いると、モノマー濃度を調節することで多分岐型カチオン性高分子の重合鎖長を厳密に調節することができた。また、分子量分布も 2 前後に押さえられていた。

多分岐型カチオン性高分子と DNA とのポリイオンコンプレックス形成能

合成した多分岐型カチオン性高分子は DNA と混合直後に安定なポリイオンコンプレックスを形成し、24 時間後も安定であった。粒径は C/A 比の増加に伴い、約 150nm に近づく傾向にあった。また 表面電位は C/A=4 以降において約 +5mV で安定となった。

図 16 分岐数の異なる高分子ヘクターの相

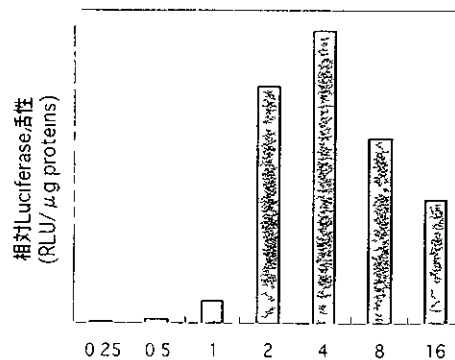


図 17 C/A 比 C/A比 を変化させたときの相対ルシフェラーゼ活性

多分岐型カチオン性高分子の細胞障害性および分岐構造の遺伝子発現効率への影響

多分岐型カチオン性高分子添加量が約 10(μg/ml)以上で細胞に障害性が見られた。遺伝子発現効率は高分子ヘクターの分岐数か多くなるほど高くなり、C/A=4 のとき最大であった。

F 健康危険情報

なし

G 研究発表

- 1 論文発表
- 1 Y Nakayama, M Sudo, K Uchida, T Matsuda, Spatio-resolved hyper-branched graft polymerized surfaces by iniferter-based photograft copolymerization, *Langmuir*, 2002, 18, 2601-2606
 - 2 H Sonoda, S Urayama, K Takami-zawa, Y Nakayama, C Uyama, H Yasui, T Matsuda, Compliant design of artificial graft compliance determination by new digital X-ray imaging system-based method *J Biomed Mater Res*, 2002, 60, 191-195
 - 3 H Okino, Y Nakayama, M Tanaka, T Matsuda, *In situ* hydrogelation of photocurable gelatin and drug release, *J Biomed Mater Res*, 2002, 59, 233-245
 - 4 S Yasuda, T Noguchi, M Gohda, T Arai, N Tsutsui, Y Nakayama, T Matsuda, H Nonogi, Local delivery of low dose docetaxel, a novel microtubule polymerizing agent reduces neointimal hyperplasia in a balloon-injured rabbit iliac artery model, *Cardiovas Res*, 2002, 53, 481-486
 - 5 T Kawada, Y Nakayama, C Zheng, S Ohya, K Okuda, K Sunagawa, A novel photocurable insulator material for autonomic nerve activity recording, *Biomaterials*, 2002, 23, 3169-3174
 - 6 W G Brodbeck, J Patel, G Voskerician, E Christenson, M S Shive, Y Nakayama, T Matsuda, N P Ziats, J M Anderson, Biomaterial adherent macrophage apoptosis is increased by hydrophilic and anionic substrates in vivo, *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99, 10287-10292
 - 7 T Magoshi, H Ziani-Cherif, S Ohya, Y Nakayama, T Matsuda, Thermoresponsive heparin coating heparin conjugated with poly(N-isopropylacrylamide) at one terminus, *Langmuir*, 2002, 18, 4862-4872
 - 8 S Yasuda, M Kanna, S Sakuragi, S Kojima, Y Nakayama, S Miyazaki, T Matsuda, K Kangawa, H Nonogi, Local Delivery of single low-dose of C-type natriuretic peptide, an endogenous vascular modulator, inhibits neointimal hyperplasia in balloon-injured rabbit iliac artery model, *J Cardiovas Pharmacol*, 2002, 39, 784-788
 - 9 W G Brodbeck, Y Nakayama, T Matsuda, E Colton, N P Ziats, J M Anderson, Biomaterial surface chemistry dictates adherent monocyte/macrophage cytokine expression in vitro, *Cytokine*, 2002, 18, 311-319
 - 10 Y Nakayama, S Nishi, H Ueda-Ishibashi, T Matsuda, Fabrication of micropored elastomeric film-covered stents and acute-phase performances, *J Biomed Mater Res*, 2003, 64A, 52-61
 - 11 W G Brodbeck, G Voskerician, N P

- Ziats, Y Nakayama, T Matsuda, J M Anderson, In vivo leukocyte cytokine mRNA responses to biomaterials are dependent on surface chemistry, *J Biomed Mater Res*, 2003, 64A 320-329
- 12 T Masuda, Y Nakayama, Development of a water-soluble matrix metalloproteinase (MMP) inhibitors as an intra-arterial infusion drug for prevention of restenosis after angioplasty, *J Med Chem*, 2003, in press
- 13 Y Kuboki M Kikuchi, H Takita, R Yoshimoto, Y Nakayama, T Matsuda Y Ikada, Laser-perforated membranous biomaterials induced pore size-dependent bone-induction when used as a new BPM-carrier *Connective Tissue Res*, 2003, in press
- 14 Y Nakayama T Matsuda Photo-control of cell adhesivity and proliferativity on photo-induced cation-generatable polymer film surface *Photochem Photobiol*, 2003, in press
- 15 H Sonoda K Takamizawa Y Nakayama H Sasui T Matsuda, Coaxial double-tubular compliant arterial graft prosthesis time-dependent morphogenesis and compliance changes after unplantation *J Biomed Mater Res*, 2003, in press
- 16 Y Nakayama, T Matsuda, Photo-control of interaction between endothelial cells and photo-cation generatable water-soluble polymers, *J Control Release*, 2003, in press
- 17 S Nishi, Y Nakayama, H Ueda-Ishibashi, T Matsuda, Occlusion of experimental aneurysms with heparin-loaded micropored stent graft, *Neurosurgery*, 2003, in press
- 2 学会発表**
- 1 亀尾崇宏 平野義明、松田武久 中山泰秀 多水酸基化親水性高分子の可視光ケル化 第51回高分子学会年次大会 (パンフィコ横浜)、2002年5月30日
- 2 梅田真理子 庄田香織 斯波真理子、内田欣吾 中山泰秀、光カチオン生成型親水性高分子を用いた DNA とのコンプレックス形成の光制御 第51回高分子学会年次大会 (パシフィコ横浜)、2002年5月30日
- 3 奥田かな 中山泰秀 松田武久 機能性セラチンの分子設計 オリコステレン化セラチンの合成と光ケル形成の促進 第51回高分子学会年次大会 (パンフィコ横浜)、2002年5月30日
- 4 中村孝吉 大屋章二 内田欣吾 中山泰秀 松田武久 王鎖にエステル結合を有するヒニル系ポリマーの合成と加水分解性 第51回高分子学会年次大会 (パシフィコ横浜)、2002年5月30日
- 5 舛田健 中山泰秀、MMP 阻害薬の水溶性高分子化設計による血管傷害治療の促進化 第51回高分子学会年次大会 (パシフィコ横浜) 2002年5月30日
- 6 Nakayama Y, Umeda M, Harada-

- Shiba M Shoda K, Development of high-performance gene delivery vector Photocontrol of DNA complex formation *European Society for Artificial Organs (ESAO) 2002 XXIX Conference* (Winner), 2002, Aug 30th
- 7 Nakayama Y, Kanda K, Development of simple cuff technique for microvascular anastomosis *European Society for Artificial Organs (ESAO) 2002 XXIX Conference* (Winner), 2002, Aug 29th
- 8 Nakayama Y, Ishibashi-Ueda H, Takamizawa K, Biotubes prepared in recipient's body as a vascular prosthesis *European Society for Artificial Organs (ESAO) 2002 XXIX Conference* (Winner), 2002, Aug 30th
- 9 Masuda T Nakayama Y, Drug material design for balloon angioplasty and stenting Development of water-soluble matrix metalloproteinase inhibitor *European Society for Artificial Organs (ESAO) 2002 XXIX Conference* (Winner), 2002, Aug 30th
- 10 Nishi S, Nakayama Y, Ueda-Ishibashi H, Matsuda T, A novel high-performance stent graft with micropores and heparin immobilization Embolization of canine cervical carotid aneurysm *European Society for Artificial Organs (ESAO) 2002 XXIX Conference* (Winner), 2002, Aug 30th
- 11 Kanda K, Nakayama Y, Ito H, Yamashita J, Kitamura N, Development of the hybrid vascular prosthesis Incorporation of differentiated embryonic stem cells in vitro and in vivo (preliminary study) *European Society for Artificial Organs (ESAO) 2002 XXIX Conference* (Winner), 2002, Aug 29th
- 12 Ohya S, Nakayama Y, Matsuda T, Matrix design in tissue engineering In vitro and in vivo evaluation of thermoresponsive gelatin for cell scaffold *European Society for Artificial Organs (ESAO) 2002 XXIX Conference* (Winner), 2002, Aug 28th
- 13 中山泰秀、奥田かな、庄田香織、組織工学用マトリックス材料の設計 光硬化性ゼラチンの高ゲル化能の獲得、*光化学討論会*、2002年9月13日
- 14 亀尾崇宏、鈴木貞信、長石誠 西村学、平野義明、中山泰秀、医療テハイスの光表面設計 プロトントナー型親水性高分子の合成と表面光ゲル形成、*光化学討論会*、2002年9月11日
- 15 中山泰秀、斯波真理子、梅田真理子、内田欣吾、庄田香織、林美智子 マラカイトグリーン化高分子の遺伝子ヘクターとしての可能性、*光化学討論会*、2002年9月11日
- 16 大屋章二、中山泰秀、木戸秋悟、松田武久、AFMによるポリ(N-イソプロピルアクリルアミド)化ゼラチンゲルの超微細構造 物性測定とマトリックス機能との相関、第24回日本バイオマテリアル学会(早稲田大学国際会議

- 場)、2002年11月29日
- 17 舛田健 庄田香織、中山泰秀、MMPI
ポリマーの細胞遊走・増殖抑制効果と
血管形成促進剤としての可能性、第 24
回**日本バイオマテリアル学会**(早稲
田大学国際会議場)、2002年11月29
日
 - 18 大屋章二、中山泰秀、松田武久 機能
性人工細胞外マトリックス設計 感温
性セラチンの *in situ* ケル硬化性Scaf-
fold 材料への応用、第 31 回**医用高分
子シンポジウム**(上智大学)、2002年
8月1日
 - 19 西正吾 中山泰秀 植田初江 松田武
久 再狭窄への予防-ヘパリン固定化多
孔質カハーステントの開発 第 8 回**日
本血管内治療学会**(奈良三井ガーテン
ホテル)、2002年7月5日
 - 20 西正吾 中山泰秀 植田初江、松田武
久、高機能カハーステントによる実験
的動脈瘤の閉塞-その有用性- 第 8 回
日本血管内治療学会(奈良三井カーデ
ンホテル)、2002年7月5日
 - 21 中山泰秀 神田圭一、西正吾、山田進
血管接合具の開発、第 40 回**日本血管
内治療学会**(札幌京王プラサホテル)、
2002年10月3日
 - 22 中山泰秀、林美智子 高見沢計一 植
田初江 人工血管への応用をめさすハ
イオチューブ組織体の作製 第 40 回**日
本血管内治療学会**(札幌京王プラサホ
テル) 2002年10月4日
 - 23 西正吾 中山泰秀、植田初江、松田武
久、高機能カハーステントの実験的動
脈瘤への応用-薄膜カハーへの微細孔と
ヘパリンの付与、第 40 回**日本血管内
治療学会**(札幌京王プラサホテル)、2002
年10月3日
 - 24 西正吾 中山泰秀、植田初江、マソタ
武久、FK506 を付与した covered stent
の開発-内膜肥厚に対する抑制効果 第
40 回**日本血管内治療学会**(札幌京王
プラザホテル) 2002年10月3日
 - 25 大屋章二 中山泰秀、松田武久 再生
医療を目指す *in situ* 感温ゲル化性
Scaffold 材の開発、第 40 回**日本血管
内治療学会**(札幌京王プラサホテル)
2002年10月3日
 - 26 神田圭一、中山泰秀、伊藤裕、山下潤、
根本泰、山田進 北村信夫 ES 細胞を
用いたハイブリッド型人工血管の開発
第 40 回**日本血管内治療学会**(札幌京
王プラザホテル)、2002年10月3日
 - 27 植田初江 中山泰秀、西正吾 薬物塗
布 polymer covered stent の動物実験
での組織像について、第 50 回**日本心
臓病学会学術集会**(名古屋国際会議
場)、2002年8月9日
 - 28 西正吾 香月教寿、中山泰秀、植田初
江 松田武久 頸部内頸動脈血管形成
術(ステント留置術)より安全な手技
長期効果を目指して、第 18 回**日本脳
神経血管内治療学会**(沖縄コンベン
ションセンター) 2002年12月5日
 - 29 西正吾 香月教寿 中山泰秀 植田初
江、松田武久、高機能カハーステント
の実験的動脈瘤への応用、薄膜カハー
への微細孔とヘパリンの付与 第 18 回
日本脳神経血管内治療学会(沖縄コ
ンベンションセンター)、2002年12月
5日
 - 30 Y Nakayama, S Nishi, H Ishibashi-
Ueda, Development of novel drug-
eluting covered stents with combi-

- nation of micropores and differential coating of heparin and FK506, *Cardiovascular Radiation Therapy (CRT) 2003* (Washington DC, Hilton Hotel), 2003年1月27日
- 31 S Nishi, Y Nakayama, H Ishibashi-Ueda, T Matsuda, A heparin loaded stent graft with micropores Embolization of experimental carotid aneurysms, *Cardiovascular Radiation Therapy (CRT) 2003* (Washington DC, Hilton Hotel), 2003年1月27日
- 32 中山泰秀、林美智子、植田初江、バイオチューブ人工血管の開発 ナノ表面化学設計による組織形成制御、第2回**再生医療学会**(神戸国際会議場)2003年3月11日
- 33 大屋章二、中山泰秀 松田武久、再生医療における3次元人工細胞外マトリックス設計 感温性ゼラチンの分子設計とマトリックス材料としての機能評価 第2回**再生医療学会**(神戸国際会議場)2003年3月11日
- 34 内藤洋、武輪能明、水野敏秀 大屋章二、中山泰秀、巽英介、北村物一郎 高野久輝、妙中義之、感温硬化性ゼラチンを用いた心筋細胞三次元培養の試み、第2回**再生医療学会**(神戸国際会議場)2003年3月11日
- 35 神田圭一、中山泰秀、伊藤裕、山下潤、根本泰、山田進、北村信夫、ES細胞を導入したハイブリット型人工血管モデルの開発 第2回**再生医療学会**(神戸国際会議場)2003年3月11日
- 36 H Ishibashi-Ueda, Y Nakayama, S Nishi, Histological evaluation of FK506 eluting and polymer covered stents in rabbits, 第67回**日本循環器病学会学術集会**(福岡国際会議場)2003年3月30日
- 37 Satoshi Yasuda, Shunichi Miyazaki, Yoritaka Ohtsuka, Yasuhide Nakayama, Takehisa Matsuda, Hiroshi Nonogi, Local drug delivery for prevention of post-angioplasty restenosis, 第67回**日本循環器病学会学術集会**(福岡国際会議場)2003年3月28日(Circulation Journal 67 Suppl I, 32, 2003)
- 38 Yoritaka Otsuka, Satoshi Yasuda, Norihiko Kotooka, Yasuhide Asami, Hiriyuki Okumura, Yasuhide Nakayama, Hitoshi Nonogi, 第67回**日本循環器病学会学術集会**(福岡国際会議場)2003年3月30日(Circulation Journal, 67 Suppl I, 353, 2003)
- H 知的財産権の出願・登録状況
- 1 特許取得
- 1 中山泰秀 西 正吾、山田 進 動脈瘤閉鎖具、**特願**2002-195851
- 2 中山泰秀、山田 進、荒木修一、生体管接合材、**特願**2002-088131
- 3 中山泰秀、山田 進、荒木修一 イオン結合性生体組織接着剤 **特願**2002-088214
- 4 中山泰秀、山田 進 荒木修一 血管内拡張用具、**特願**2002-088130
- 5 中山泰秀、上垣昭彦 小野静香 ヒドロキサム酸化合物、**特願**2002-123795
- 6 中山泰秀 根本 泰、組織工学用スキャホールド材及び、該材からなる人工血管、**特願**2002-091793

- 7 中山泰秀 根本 泰 ヘクター 核酸含有複合体及びその形成方法、特願 2002-243872
- 8 中山泰秀、西 正吾 根本 泰、ステント、特願 2002-243871
- 9 中山泰秀、根本 泰、核酸複合体及びその製造方法 特願 2002-268698
- 10 中山泰秀、根本 泰、ヘクター、核酸含有複合体及びその形成方法、特願 2002-299226
- 11 中山泰秀、梅田真理子、ヘクター、ヘクター用高分子 その製造方法、核酸含有複合体及びその製造方法、特願 2002-299225
- 12 中山泰秀 根本 泰 動脈瘤閉塞剤及び動脈瘤閉塞方法 特願 2002-352736
- 13 中山泰秀 根本 泰、動脈瘤閉塞材及び動脈瘤閉塞方法 特願 2002-359528
- 14 中山泰秀、林美智子 高見沢計一、植田初江、人工血管 特願 2003-052512

2 実用新案登録

なし

3 その他

特になし