

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

ベクターのシステム化に関する研究2：
光硬化性ゼラチンの高機能化に関する研究

分担研究者 植田 初江 国立循環器病センター 臨床検査部 医長

研究要旨

遺伝子の局所送達化デバイスの遺伝子包埋層として用いる材料として、光硬化性ゼラチンを開発している。本研究ではその高機能化設計を行った。ゼラチンまたはアルブミンの側鎖にビニル基を直接あるいはポリエチレングリコール鎖を介して導入した多官能性マクロマーを合成し、可視光照射による硬化性を調べ、硬化物の物性と分解性を調べた。アクリレート化ゼラチンは未修飾ゼラチンと同様、室温下において濃度 20wt%以上でゲル状であった。一方、スチレン化ゼラチンは濃度 40wt%まで室温で流動性のある水溶液状態であり、ゼラチンの分子量を約 10 万から 1 万程度に低下させるとさらに高濃度に溶解可能であった。これらは 1 分以内の光照射で弾力のある透明なヒドロゲルを生成した。ゲル生成能は高濃度化、照射の長時間化により増し、スチレン化体で最も高かった。水溶液中においてスチレン基間の会合が起こったものによると思われる。一方、スチレン化アルブミンは 5 分程度の光照射により硬化したが、生成物は白濁しており、脆弱で弾力はほとんど無かった。また、全てのマクロマーの水溶液はいずれも PEG ジアクリレート（分子量約 1000）を 10wt%程度混合するとゲル生成能が大幅に向上し、アルブミン誘導体においても透明な弾性ゲルを生成した。スチレン基を PEG 鎖を介してゼラチンに導入すると、水溶解性ならびに PEG との相溶性が向上できた。遺伝子の包埋、徐放を調節できる新しいマトリックス材料が開発できた。

A. 研究目的

紫外光照射によりラジカルを発生する、ベンゾフェノン基を側鎖に有する光反応性ゼラチンは、紫外光照射により Water swellable gel を生成することから、人工臓器やバイオセンサを含む biomedical device の表面修飾剤への応用を検討した。また、

ラジカル発生種として可視光照射により反応するカンファキノンをを用いると、可視光照射によりゼラチンがゲル化できることから生体内や細胞存在下で作用させることが可能となり、止血剤を含む組織接着剤、あるいは細胞組込型のハイブリッド人工臓器や tissue engineering 分野における人工細

胞外マトリックス材料への応用を検討している。この可視光硬化系における要素材料は、ゼラチン側鎖にスチレン基を導入したゼラチンマクロマーと水溶性光重合開始剤として新たに分子設計したカルボキシル化カンファキノンである。これらの混合水溶液に数分間光照射すると、マクロマー間での重合により、cross linking が起こり、ハイドロゲルを生成する。また、PEG ジアクリレートと混合して照射すると、共架橋反応が起こり、生成ゲルの強度を高めることができた。ここで、各マクロマー（ゼラチンマクロマーと PEG ジアクリレート）の濃度を高めると、水溶液の硬化速度を高めることができると考えられる。しかし、ゼラチンマクロマーは水溶液濃度を 50wt%以上に高めると、高粘稠となり、ほとんど流動性は無くなった。また、ゼラチンマクロマーと PEG ジアクリレートとの水への co-solubility は低く、全溶質濃度が 30wt%を越えると、水溶液は白濁あるいは層分離を起こし、ゲル化能の大幅な低下を招いた。本研究では、ゼラチンマクロマーをより高濃度で溶解させるためにゼラチンマクロマーの低分子量体化を、またはゼラチンと PEG との co-solubility を高めるためにゼラチンマクロマーと PEG とのハイブリッド化について検討した。低分子量ゼラチンマクロマーについては、水への溶解性と光硬化性について、ならびに組織接着剤への要求性能の一つである生成ゲルの組織への粘着性について調べた。また、ゼラチン PEG ハイブリッドマクロマーについては PEG ジアクリレートとの水への co-solubility について調べた。

BC. 研究方法と結果

BC-1. 低分子量化ゼラチンマクロマー

BC-1-1. 低分子量化ゼラチンマクロマーの合成

ゼラチンマクロマーとして、既報に従って、ゼラチン側鎖にスチレン基を導入したスチレン化ゼラチンを合成した。原料として、これまで用いた分子量約 10 万のゼラチンに比べて分子量の低い、約 3.1 千、5 千、1 万の分子量を有する 3 種類のゼラチンを用いた。ゼラチン側鎖へのスチレン基の導入は水溶性カルボジイミドを用いたゼラチン側鎖のアミノ基と 4-ビニル安息香酸との縮合反応により行った。表に合成条件と生成物のスチレン基導入量をまとめた。スチレン基導入量はゼラチン 1 分子あたり 1.5 個（分子量約 3.1 千のゼラチン）、1.7 個（約 5 千）、3.6 個（約 1 万）であり、いずれも全アミノ基の約 80% にスチレン基が導入された。得られたスチレン化ゼラチンは全て水溶性であった。

BC-1-2. 水溶液の粘性

これまで用いてきた分子量約 10 万のゼラチンマクロマーは 37℃において 20wt%濃度での水溶液の粘度は約 20Pa の溶液状態であるが、濃度の上昇に伴って、急速に粘度が増大し、50wt%で粘度は約 1 万 Pa となり、流動性はほとんど無くなった。一方、分子量約 1 万のゼラチンマクロマーでは、濃度 50wt%においても粘度は約 200Pa の少し粘稠な溶液状態で、流動パラフィンと同程度であった。濃度を 60wt%に増加させると粘度は約 10 倍に増加したが、充分溶液として取り扱いが可能であった。より低分子量のゼラチンを用いると、水溶液の粘度はさらに減少した。いずれの低分子量ゼラチンマクロマーとも濃度 80wt%程度まで高粘稠で

マーとも濃度 80wt%程度まで高粘稠であるが液体として取り扱いが可能であった。

光照射によるゲル化：合成した低分子量ゼラチンマクロマーの水溶液の可視光硬化性を gel yield の比較から調べた。既に報告しているように、分子量約 10 万のゼラチンマクロマーでは濃度 30wt%において、1 分間の照射でゲル化率は約 40%、濃度 40%では約 60%であった。一方、分子量約 1 万の低分子量ゼラチンマクロマーでは濃度 60%で 1 分照射によりゲル化率は-%に増加し、また、80%に濃度を増加させると、30 秒の照射においても約-%の収率でゲルを生成した。低分子量ゼラチンマクロマーでは水溶液濃度を高めることが可能となり、その結果、短時間でゲル生成量を増大させることができた。

BC-1-3. 硬化ゲルの粘着性

ゼラチンマクロマー水溶液をコラーゲンフィルム表面にのせて、所定時間の光照射によりゲル化させた。ゲル表面を別のコラーゲンフィルムで覆い、その上に 100g の分銅をのせてコラーゲンフィルムとゲルを密着させた。1 分後、分銅を取り除き、ゲルを覆ったコラーゲンフィルムを一定速度で上方に引っ張り、ゲルから引き離した。未修飾のゼラチンでは 2mm 程度離れた時点でフィルムに約 50g の引っ張り加重がかかり、ゼラチンがフィルムから分離した。ここで、この破断時にかかる最大荷重量を粘着力と定義した。一方、ゼラチンマクロマーの場合、ゲルは約 5mm まで引き延ばされ、約 400g の加重がかかった時点でゲルがフィルムから分離した。ゲルの粘着力は照射時間とともに増大し、50%濃度の水溶液の場合、40 秒照射時において最大となり、その後の照

射により急速に減少した。また、濃度 60%の場合、より短時間の照射で最大粘着力を示した。一方、現在医用接着剤として臨床にもちいられているフィブリン糊の硬化物では粘着力は約 20g であり、GRF 糊では約 700g であった。

ゲルの伸張量は最大荷重時に最大となり、ゼラチンマクロマーでは約 30 倍に伸張した。この値はフィブリン糊の約 30 倍で、GRF 糊と同程度であった。

BC-2. ゼラチン PEG ハイブリッドマクロマー

BC-2-2. ゼラチン PEG ハイブリッドマクロマーの合成

まず、PEG とブromo酢酸エチルとの反応により方末端をエステル化し、これを加水分解により酸に変換した。次いで、方末端の水酸基を酸クロライド化 4-ビニル安息香酸によりエステル化させることによりスチレン基を導入し、方末端にカルボキシ基を他端にスチレン基を有する PEG 誘導体を合成した。これを上記と同様に、水溶性カルボジイミドを用いた縮合反応により、ゼラチンのアミノ基側鎖に導入した。スチレン基導入量はゼラチン 1 分子あたり -個 (PEG 鎖分子量約千)、-個 (約 5 千) であり、いずれも全アミノ基の約 80% にスチレン基が導入された。

B-2-3. PEG マクロマーとの相溶性

PEG 鎖を有しないゼラチンマクロマー (分子量約 10 万) の場合、20% の PEG1000 ジアクリレート水溶液に 10% のゼラチンマクロマーを混合しても無色透明であるが、ゼラチンマクロマーの濃度を 20% に増加させると溶液が白濁が起り、30% では PEG 層

とゼラチン層の 2 層に分離した。また、分子量約 1000 の PEG 鎖を有するゼラチンマクロマーの場合も同様に、10%の混合では無色透明であったが、20%以上では白濁化した。一方、分子量約 5000 の PEG 鎖を有するマクロマーでは 30%まで混合しても無色透明溶液であった。

一方、ゼラチンマクロマーの濃度を 20%に固定した水溶液に、PEG ジアクリレート混合していくと、ゼラチンマクロマー内の PEG 鎖の有無に関わらず PEG ジアクリレート濃度は 10%では無色透明であった。PEG ジアクリレートの含量を増加させると、PEG 鎖の無いゼラチンマクロマーと分子量約 1000 の PEG 鎖を有するゼラチンマクロマーの場合、20%濃度で共に白濁し、30%濃度以上で層分離を起こした。一方、分子量約 5000 の分子量を有するゼラチンマクロマーの場合、40%においても無色透明を保持した。分子量約 5000 の PEG 鎖を有するゼラチンマクロマーの場合、全溶質濃度が 50%の範囲内で無色透明溶液を与え、この範囲内でマクロマーの混合比を変化させることが可能となった。

これまで我々は光照射によってゾルからゲルを形成する、ゼラチンをベースとした光反応性材料の分子設計を行い、止血剤を含む組織接着剤などの wound healing material や人工臓器や組織工学材料への応用を検討している。これまでゼラチン側鎖に重合性基であるアクリレート基やスチレン基を導入したゼラチンマクロマーを水溶性重合開始剤（カルボキシル化カンファキノン）を用いて可視光照射により重合させることにより、水溶液をゲル化できる新しい可視光硬化系を開発した。本研究では硬化速度の向上をめざし、上記の硬化系における要

素材料である、ゼラチンマクロマーと PEG ジアクリレートの高濃度化について検討した。これまで用いてきた分子量約 10 万のゼラチンマクロマーは 37℃下で水溶液濃度を 50%に高めると、高粘稠でほとんど流動性は無くなり、これ以上濃度を高めることは出来なかった。また、共架橋により硬化速度と硬化強度を高めることを目的に使用してきた PEG ジアクリレートマクロマーはゼラチンマクロマーとの相溶性が悪く、ゼラチンマクロマーと PEG ジアクリレートとの総溶質重量が約 30%を越えると白濁あるいは層分離を起こした。

DE. 考察と結論

本研究ではマクロマーの水溶液濃度を増大させる目的で、1)ゼラチンの低分子量化、ならびに2)ゼラチンと PEG のハイブリッド化の 2 種類について検討した。ゼラチンはコラーゲンの熱変成蛋白質であり、ゼラチン水溶液はゼラチン鎖の一部でコラーゲン様の 3 重らせん構造を分子内で形成し、分子間で 3 次元的に架橋が起こるため熱可逆的にゲル状態を形成する。そのため通常ゼラチンのみでは 37℃下で約 20%以上の高濃度水溶液は調整することが出来ない。本研究において示したように、ゼラチン側鎖にスチレン基を導入するだけでも、架橋構造形成能が阻害されて約 50%濃度まで溶解させることができた。ここで、さらに、ゼラチン分子を低分子量化すれば、分子間で形成される 1 分子あたりのらせん構造形成による架橋点数が減少し、分子間での架橋構造形成が起こりにくくなると考えられる。その結果、ゼラチンをより高濃度で溶解することが可能になると期待される。一方、ゼラチンに PEG 鎖を導入したゼラチン PEG

ハイブリッドマクロマーを合成すれば PEG との相溶性が向上し、両者をより高濃度に混合可能になると期待される。

低分子量化ゼラチンマクロマーは、これまで使用していた原料のゼラチンを低分子量子体に変えるだけで、ゼラチンの場合と同様に、水溶性カルボジイミドを用いた 4-ビニル安息香酸との縮合反応により合成できた。ゼラチンのアミノ基へのスチレン基の導入率はゼラチンの分子量にかかわらず約 80%であった。分子量約 3.1 千と 5 千のゼラチンには約 2 分子、分子量約 1 万のゼラチンには約 3 分子のスチレン基が導入できた。これらの水溶液はいずれも 60%濃度においても 37℃での粘度は約数千で、流動性のある液体状態であった。ゼラチンマクロマーを低分子量化すると水溶液の溶質量を大幅に増加させることが可能となり、予想通り短時間での高い収率でゲルを生成することが可能となった。

また、高分子量ゼラチンマクロマーから生成したゲルは比較的強度が強く、粘りや伸びに乏しく、粘着性がほとんど無かった。しかし、低分子量子体では、粘着性は照射時間とともに増加し、ある一定時間で極大を示した。粘着性の増加はゼラチン分子内に導入されたスチレン基の重合により超高分子量化が起こったことによるものと考えられる。照射により徐々に高分子量子体の濃度が増加し、高粘着性を示した。その後、分子間での架橋反応の割合が増加するのに伴ってゲル化反応が起こり、急速に粘着性が減少したと考えられる。高分子量のゼラチンでは 1 分子内に多数のスチレン基が導入されているため、反応初期から架橋反応が起こり、粘着性がほとんど増加しなかったと考えられる。一方、強力な組織接着力を

有する GRF 糊は高濃度のゼラチン溶液を架橋剤（ホルムアルデヒドとグルタルアルデヒド）により化学架橋するもので、架橋剤との混合により速やかに溶液からゲルへと変化する。従って、一定時間内において非常に高い粘着性を示す。今回合成した低分子量子ゼラチンマクロマーは GRF 糊と同程度の高い粘着性と伸張性を示した。

ゼラチン側鎖に PEG スペース鎖を介してスチレン基を導入したゼラチン-PEG ハイブリッドマクロマーと PEG ジアクリレートとの水への相溶性は PEG スペース鎖の鎖長に依存した。PEG 鎖の分子量が約 1,000 の場合、PEG ジアクリレートとの相溶性は PEG 鎖を導入していないゼラチンマクロマーとほとんど変化無く、全溶質濃度を約 30%以上に増加させることは出来なかった。一方、PEG 鎖長の分子量を約 5,000 に延ばした場合、相溶性は大幅に向上し、全溶質濃度が 50%の範囲で無色透明な均一溶液を与えた。PEG ジアクリレートは共架橋剤として、硬化速度と硬化密度を高める目的で使用してきた。ゼラチンと PEG とのハイブリッド化により、より高濃度で溶解させることが可能になり、これらの性能をより高めることができると期待される。

以上、ゼラチンマクロマーの低分子量子化と PEG とのハイブリッド化により硬化性能を向上させることが可能となった。これらのマクロマー水溶液は光照射時に薬物や細胞などを混合しておく、生成ゲル内にそれらを包埋することが可能である。現在、合成したゼラチンマクロマーの可視光硬化系を利用して、組織接着剤、あるいは抗癌治療を目的とした *in situ* でのドラッグリリース担体、血管形成術後の再狭窄予防を目的とした薬物や遺伝子の導入デバイスのマ

トリックス材料への応用を行っている。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. 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.
2. 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. 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.
2. 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.
3. 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バーステントの開発、第 8 回**日本血管内治療学会** (奈良三井ガーデンホテル)、2002 年 7 月 5 日

4. 西正吾、中山泰秀、植田初江、松田武久、高機能カバ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** (奈良三井ガーデンホテル)、2002 年 7 月 5 日
5. 西正吾、中山泰秀、植田初江、松田武久、高機能カバーステントの実験的動脈瘤への応用-薄膜カバ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** (札幌京王プラザホテル)、2002 年 10 月 3 日
6. 西正吾、中山泰秀、植田初江、マツダ武久、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
7. 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
8. 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
9. 西正吾、香月教寿、中山泰秀、植田初江、松田武久、高機能カバーステントの実験的動脈瘤への応用、薄膜カバ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

10. Y. Nakayama, S. Nishi, H. Ishibashi-Ueda, Development of novel drug-eluting covered stents with combination of micropores and differential coating of heparin and FK506, **Cardiovascular Radiation Therapy (CRT) 2003** (Washington DC, Hilton Hotel), 2003年1月27日
11. 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
12. 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
13. 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

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

1. 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

遺伝子開発に関する研究：

ES細胞 *in vitro* 分化系を用いた血管分化関連遺伝子の同定

分担研究者 山下 潤（京都大学大学院医学研究科 分子遺伝学 助教授）

研究要旨

循環器系遺伝子治療に用いる新しい遺伝子の開発研究を行っている。我々は、ES細胞を用いて、共通の前駆細胞（Flk1陽性細胞）から血管（血管内皮、血管壁細胞、血球細胞）を系統的に分化誘導する *in vitro* 血管分化系を構築した。この分化系は分化各段階の細胞をそれぞれ純化して得られるため、分化にともなう遺伝子発現変化を検討するのに適した系である。そこで本研究は、血管分化、特に内皮細胞分化に関与する遺伝子群を網羅的に検索し、血管発生分化の分子機構を包括的に明らかにすることを目的とする。古典的サブトラクション法による検索に加え、DNAチップを用いたトランスクリプトーム解析と RNAi を用いた遺伝子機能阻害実験を組み合わせ、分化誘導から関連遺伝子の網羅的検索、機能解析に至る ES細胞を用いた一連の *in vitro* 解析系を構築することにより、細胞分化研究の新たな方法論を確立し、血管系にとどまらぬ幅広い分化・再生研究への応用を目指す。

A. 研究目的

A-1. 背景

ES細胞（胚性幹細胞：embryonic stem cell）は、初期胚（胚盤胞）内に存在する未分化幹細胞である内細胞塊（inner cell mass）を培養して樹立された細胞株であり、体中の全ての種類の細胞に分化することができるいわゆる「万能」幹細胞と考えられている。ES細胞の全能性（pluripotency）は、ES細胞を胚盤胞に注入して得られたキメラマウスを交配することにより、ES細胞由来の動物個体を作ることができることで、*in vivo* において証明されている。この全能性を *in vitro* において引き出し、分化誘導した細胞を再生治療に用いようとする試みが様々な臓器、細胞をターゲットに行われている。神経細胞、心筋細胞をはじめ

として、血球細胞、内皮細胞、軟骨細胞、色素細胞等の細胞が *in vitro* において ES細胞から誘導出来ることが明らかになっている。血管は、内腔を一層におおう内皮細胞とそれを外から取りまく壁細胞の2種類の細胞からなっている。その中を流れる血球細胞を含めてこれら血管構成細胞は互いに密接に関連しあい血管を形作る。VEGFの受容体の一つである Flk1 は血球・血管系細胞の最も早期の分化マーカーおよび中胚葉のマーカーと考えられている。最近我々は、ES細胞を用いて *in vitro* において中胚葉、さらには血管の構成細胞である血管内皮細胞と壁細胞（血管平滑筋細胞およびペリサイト）を選択的に分化誘導し、最終的に血管としての高次構造を *in vitro* および *in vivo* において構築すること、いわば血管の発生過程を

再現することに成功した。すなわち、京都大学分子遺伝学西川らが開発した ES 細胞からの Flk1 陽性細胞の分化誘導と抗 Flk1 抗体を用いた FACS による Flk1 陽性細胞純化の技術 (Development 1998, Blood 1999) を用い、(1) 単一の Flk1 陽性細胞から内皮細胞、壁細胞の双方が分化すること。(2) Flk1 陽性細胞からの内皮細胞及び壁細胞への分化はそれぞれ VEGF、PDGF-BB により誘導されること。(3) Flk1 陽性細胞の 3 次元培養により、内皮細胞の管腔形成とその周囲への壁細胞の接着をともなった成熟血管構造の形成が可能であること。(4) Flk1 陽性細胞のニワトリ胎仔への移植実験により、Flk1 陽性細胞が in vivo においても内皮細胞、壁細胞に分化し、新生血管の形成に寄与しうることを明らかにした (Yamashita et al. Nature, 2000)。この in vitro 分化系では、Flk1 陽性細胞を共通の前駆細胞として、内皮細胞、壁細胞、血球細胞が分化し、さらにそれらの細胞が in vitro において血管としての高次構造を形成する。(図 A-1)

このように我々の ES 細胞を用いた in vitro 分化系は、血管および血球を系統的に分化誘導することができ、血管の発生分化過程を培養下に恣意的に操作しながらしかも経時的に観察できる。従って、この分化系を用いることにより血管の発生分化のメカニズムを細胞レベル、分子レベルで検討するという新しいアプローチが可能になったと考えられた。すなわち、これまで通常の細胞培養系では立ち入ることのできなかつた分化という現象を培養細胞レベルで扱い、ノックアウトマウスの形質解析に頼らざるを得なかつた分子の機能解析を in vitro で行うという、in vitro のみで発生分化機構の包括的解析を行うこれまでにない全く新しい実験系を構築できる可能性が示唆された。

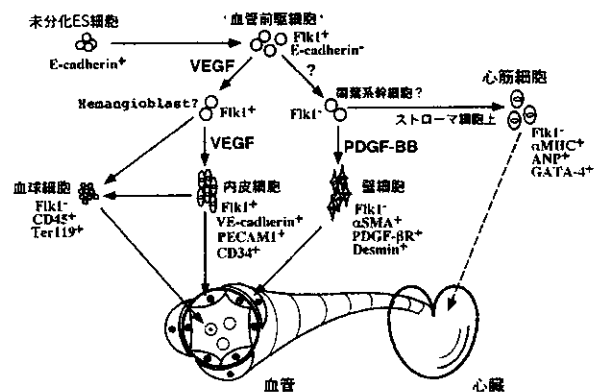


図 A-1 : ES 細胞 in vitro 心血管分化系

未分化 ES 細胞から分化誘導した Flk1 陽性細胞は、血管を誘導することのできる血管前駆細胞と考えられる。すなわち、Flk1 陽性細胞は VEGF 存在下には内皮細胞 (および血球細胞) に分化し、非存在下ではおもに PDGF-BB の作用により壁細胞が誘導される。これら誘導された血管細胞は in vitro および in vivo において、血管としての高次構造を形成する。

A-2. 目的

本研究は、我々が開発した ES 細胞 in vitro 血管分化系を用いて、血管の発生分化に関与する遺伝子群を網羅的に検索するとともに機能解析も in vitro で行う新しい遺伝子探索システムを構築し、血管分化に関与する機能遺伝子の網羅的同定を行い、血管発生分化の分子機構を包括的に明らかにすることを目的とする。血管の発生分化に関しては様々な遺伝子群の関与が報告されているが、いずれもノックアウトマウスの表現型の解釈によるものであり、それらの細胞学的意味は不明なものが多い。また血管細胞としての形質を決定している因子は同定されていない。散発的なノックアウトマウスの結果を待つだけでなく、分化に関与する機能遺伝子を in vitro において簡便にかつ網羅的に検索することは、血管分化メカニズムの全貌を明らかにするための近道である。またそこから発見された遺伝子群を新しい血管再生治療へ応用

していくためにもこうした効率的な新システムを構築することは不可欠であると考えられる。また本研究は、血管分化のみならず、ES 細胞を用いて誘導できる細胞に関して、すべて同様のアプローチでその分化機構の解析に応用することが可能であり、本研究による新しい方法論の確立は、今後の分化・再生研究の新たな礎となる極めて重要な意義を有する。

B. 研究方法

B-1. 古典的サブトラクション法による内皮分化特異的遺伝子群の同定

未分化 ES 細胞より、Flk1 陽性細胞を分化誘導した後、抗マウス Flk1 抗体を用いたフローサイトメトリーにより Flk1 陽性細胞(Flk1+)を純化・再培養する。内皮細胞分化誘導 1 日後(EC1)の分化初期の内皮細胞を VE-カドヘリンおよび PECAM1 に対する抗体を用いて純化する。壁細胞に分化した細胞群 (SMA+) を内皮細胞マーカー陰性群として用意する。それぞれの細胞群から RNA を抽出し cDNA ライブラリーを作製する。また、抽出した RNA は DNA チップ解析に供する。Flk1+/EC1, Flk1+/SMA+, EC1/SMA+間でそれぞれサブトラクションクロニングを行い、それぞれの細胞群に特異的遺伝子群を同定する。

B-2. DNA チップを用いた内皮分化特異的遺伝子群の網羅的同定

ヒトやマウスなど生物ゲノムの配列情報が次々と明らかになって来るにしたがい、ゲノム情報すべてを対象として遺伝子やタンパクの解析を試みるバイオインフォマティクス研究が盛んになってきた。トランスクリプトーム解析はある時点での細胞や組織における遺伝子発現を網羅的に解析し、それぞれの状況における遺伝子発現プロファイルを作成し比較検討することにより、対象とする生物現象に関与する遺伝子群を網羅的に検索しよう

とするもので、ポストゲノムにおける新しい研究法の主流の一つをなしている。共通の前駆細胞とそこから派生する細胞群を高純度で潤沢に、かつ時間的経過を追って集めることのできる申請者らの *in vitro* 分化系は、分化に関するトランスクリプトーム解析に非常に適した系である。我々の系を用いた DNA チップによる解析により、ゲノムレベルで網羅的にかつ効率よく、しかも高い信頼性で分化関連因子の候補遺伝子を絞り込むことができる。

我々の分化系では、分化各段階の細胞を潤沢に採取することが可能であり、PCR などによる増幅過程を経ずに DNA チップに供するだけの RNA を得ることができる。これにより増幅に伴うバイアスがかからない信頼性の高いデータを蓄積することができる。我々は神戸先端医療センターとの共同研究により解析を開始している。すなわち、未分化 ES 細胞、Flk1 陽性細胞および Flk1 陽性細胞の再培養に VEGF を添加して得られる分化 1 日目、2 日目、3 日目の内皮細胞 (VE-カドヘリン陽性細胞) と血清または PDGF を加えて得られる壁細胞をそれぞれ純化し、RNA を抽出する。Affymetrix 社の Gene chip を用いて約 36000 個のマウスの遺伝子に関し、これらの細胞群由来 RNA を用いた遺伝子発現プロファイルを作製する。それぞれの細胞の分化に応じて特異的発現を示す遺伝子群をクラスター解析等により抽出し、分化に関与すると考えられる候補遺伝子を同定する。

B-3. siRNA を用いた ES 細胞分化過程における *in vitro* 遺伝子機能解析系の構築

こうした DNA チップによる解析は、これまで盛んに行われてきたサブトラクション法やディファレンシャルスクリーニング法などと共通の欠点を有している。すなわち、候補遺伝子は数多く同定できても、それらの機能解析ができないことには、真に重要な遺伝子を決定することができず、遺伝

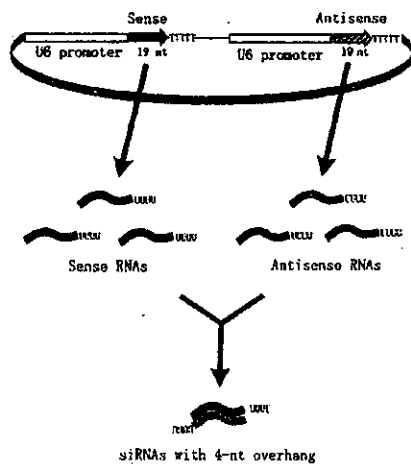


図 B-3-1：ベクターによる siRNA 発現システム

U6 プロモーターによる snRNA (short nucleotide RNA)合成系を導入することにより、ベクターを用いた siRNA 合成が可能となった。

子リストの山を前に研究が停滞してしまうことである。したがってすぐれた機能解析系をもっていることが研究を進めるうえの重要なカギとなる。

RNAi (RNA interference; RNA 干渉)は、細胞に導入された 2 本鎖 RNA がそれに相当する配列をもつ遺伝子の発現を抑制する現象で、線虫において発見されたがその後ショウジョウバエや植物などにおいても効果があることが知られている。哺乳動物においては、21-23 塩基の短い 2 本鎖 RNA (siRNA: short interfering RNA)が遺伝子発現抑制に効果的であることが報告されたが、RNA 断片の細胞内導入効率の限界により、その応用範囲は限られていた。最近になりベクターを用いた siRNA 発現系が次々に報告され、哺乳動物細胞においても siRNA による高効率かつ選択的な遺伝子発現抑制を行える可能性が広がってきた。

ES 細胞における siRNA 発現システムは、東京大学工学系研究科化学生命工学の多比良教授らのグループとの共同研究により開発を進めている。多比良らのグループは U6 プロモーターを使った

ベクターによる siRNA 発現システムを最近報告したが(Miyagishi et al. Nat. Biotech., 2002) (図 B-3-1)

彼らはテトラサイクリンにより誘導性に発現を制御できる U6 プロモーター系も開発しており(Ohkawa et al. Hum. Gene. Ther., 2000)、これを siRNA 発現システムに応用することが可能である。恒常的な遺伝子発現の変化は ES 細胞の分化に大きな影響を与えてしまい、目的とする特異的な変化が検出しにくくなる可能性が高い。したがって ES 細胞の分化系においては、誘導性のプロモーターシステムを用いて、遺伝子発現の時間的調節ができることが非常に重要である。また、一般に ES 細胞は遺伝子導入効率が悪く、レトロウィルスベクターや HIV ベクターなどが有効な遺伝子導入法として知られている。レトロウィルスベクターの ES 細胞への遺伝子導入効率は約 40%と報告されており、GFP 遺伝子をベクター内に組み込んでおくことにより、遺伝子導入された細胞のみを純化してその後の解析を行うことが十分可能である。遺伝子導入された細胞にテトラサイクリンを添加することにより、分化誘導中の任意の時間に siRNA を発現させ、標的遺伝子の発現を抑制することができる。

(倫理面への配慮)

研究上で倫理面に配慮すべき研究内容が生じた場合には、必要に応じて各所属施設内での倫理委員会において承諾を受けた上で実施を行う。また、ボランティアを必要とする研究ではインフォームドコンセントを行った上で協力をお願いする。

全ての動物実験は国際標準規格 Principles of Laboratory Animal Care (National society for Medical Research) と Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (National Institutes of Health Publication No. 86-23) に従って行い、動物愛護に配慮する。飼育は各施設付属の動物管

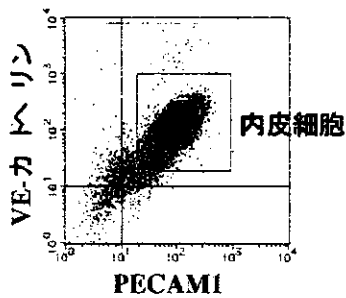


図 C-1. Flk1 陽性細胞から誘導した内皮細胞の内皮細胞マーカー(VE-カドヘリンおよび PECAM1)による定量的評価と再

理施設にて一括管理される。

C. 研究結果

C-1. 定量的血管分化評価システムの構築

我々の分化系では血管構成細胞および心筋細胞をそれぞれ Flk1 陽性細胞を開始材料に誘導することができるが、誘導効率を定量的に評価できることが機能阻害実験を行うためには不可欠である。血管内皮細胞に関しては、分化誘導された内皮細胞数および細胞全体に占める割合を内皮細胞マーカーである VE-カドヘリンや PECAM1 に対する抗体を用いたフローサイトメトリーにより定量的に評価できる (図 C-1)。

また、VE-カドヘリンプロモーターにより GFP 遺伝子を内皮特異的にさせ、FACS およびプレートリーダーにより GFP 発現を定量的に評価するシステムも構築した。

C-2. サブトラクション法による内皮細胞分化特異的遺伝子群の同定：

前述のように Flk1 陽性細胞と分化 1 日目の初期内皮細胞との間でサブトラクションライブラリーを作製し、Flk1+に比し、EC1 群において有意に発現が上昇している内皮細胞分化特異的遺伝子を約 30 個同定した。

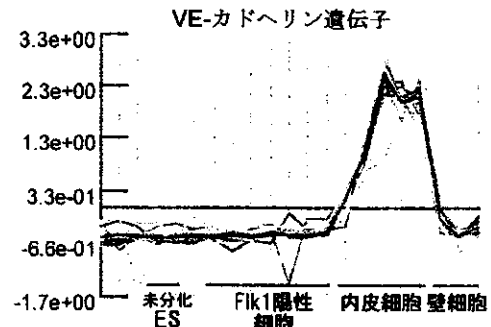


図 C-3

C-3. DNA チップを用いた内皮分化特異的遺伝子群の網羅的同定

未分化 ES 細胞、Flk1 陽性細胞および Flk1 陽性細胞の再培養に VEGF を添加して得られる分化 1 日目、2 日目、3 日目の内皮細胞 (VE-カドヘリン陽性細胞) と血清または PDGF を加えて得られる壁細胞をそれぞれ純化し、RNA を抽出し、Affymetrix 社の Gene chip を用いて約 36000 個のマウスの遺伝子に関し、これらの細胞群由来 RNA を用いた遺伝子発現プロファイルを作製した。内皮細胞特異的のマーカーと考えられる VE-カドヘリン遺伝子は、図 C-3 に示すように内皮細胞特異的発現パターンを示した。このような内皮特異的発現を示す遺伝子群を約 200 個同定した。

C-4. レトロウイルスベクターを用いたテトラサイクリン誘導性 siRNA 発現システムの構築

多比良らのテトラサイクリン誘導性 U6 プロモーターのシステムをレトロウイルスベクターに持ち込んだ ES 細胞対応の siRNA 発現システムの構築を行った。すなわち、多比良らのテトラサイクリン応答性 U6 プロモーター/siRNA 配列と導入細胞の選択マーカーとして GFP 遺伝子を CMV プロモーター下に挿入したものを MSCV レトロウイルスベクターに組み込み、ES 細胞への siRNA 導入用のレトロウイルスベクターを構築した。同ウイルスベクターをパッケージング細胞 Plat-E (29

3T 細胞を改変したもの)にリポフェクション法により導入し、導入遺伝子を含むウイルス上清を得た。同上清を ES 細胞に添加したのち、siRNA を発現する細胞を FACS にて純化することを試みた。ES 細胞の分化途上においては遺伝子導入効率は著しく悪く(1%以下)、導入された siRNA の効果を検討することはできなかった。現在 ES 細胞への効率的遺伝子導入法を検討中である。

D. 考察

1) 我々の ES 細胞 in vitro 分化系は、内皮分化過程の詳細な検討において非常に有用な新しいツールとなる。

2) 古典的サブトラクション法では、2点間で発現に差がある遺伝子であるということのみが情報として得られるにすぎないが、DNA チップ解析では、各々の遺伝子発現の経時的変化を追えることから、内皮分化との関連性の高い、信頼度の高いデータを得ることができる。しかも、圧倒的に多数の遺伝子を容易にピックアップすることができる。

3) siRNA による遺伝子阻害実験は in vitro において遺伝子機能を検討できる非常に有用な方法であるが、ES 細胞に関しては、その細胞の特性、すなわち遺伝子導入の困難さ、分化することによりその性質を変化させていること、遺伝子発現のタイミングにより分化過程に変化が生じることなどを鑑み、通常の cell line などの場合とは異なる全く新しいシステムを構築する必要がある。

E. 結論

ES 細胞 in vitro 分化系、DNA チップによる網羅的遺伝子発現解析、siRNA による in vitro 遺伝子機能解析の3つを組み合わせた本研究は、細胞分化の分子機構に新たな可能性を与える有力な新手法であるが、その樹立にはまだいくつかの点で適正化を図る必要がある。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. T. Yurugi-Kobayashi, H. Itoh, J. Yamashita, K. Yamahara, H. Hirai, T. Kobayashi, M. Ogawa, S. Nishikawa, S.I. Nishikawa and K. Nakao. Effective contribution of transplanted vascular progenitor cells derived from embryonic stem cells to adult neovascularization in proper differentiation stage. **Blood In press.**
2. N. Ohono, H. Itoh, T. Ikeda, K. Ueyama, K. Yamahara, K. Doi, J. Yamashita, M. Inoue, K. Masatsugu, N. Sawada, Y. Fukunaga, S. Sakaguchi, M. Sone, T. Yurugi, H. Kook, M. Komeda, K. Nakao. Accelerated reendothelialization with suppressed thrombogenic property and neointimal hyperplasia of rabbit juglar vein grafts by adenovirus-mediated gene transfer of C-type natriuretic peptide. **Circulation** 105: 1623-1626, 2002.
3. K. Doi, T. Ikeda, H. Itoh, K. Ueyama, K. Hosoda, Y. Ogawa, J. Yamashita, T.H. Chun, M. Inoue, K. Masatsugu, N. Sawada, Y. Fukunaga, T. Saito, M. Sone, K. Yamahara, H. Kook, M. Komeda, M. Ueda, K. Nakao. C-type natriuretic peptide induces redifferentiation of vascular smooth muscle cells with accelerated reendothelialization. **Arte-**

- rioscler. *Thromb. Vasc. Biol.* 21: 930-936, 2001.
4. N. Sawada, H. Itoh, J. Yamashita, K. Doi, M. Inoue, K. Masatsugu, Y. Fukunaga, S. Sakaguchi, M. Sone, K. Yamahara, T. Yurugi, K. Nakao. cGMP-dependent protein kinase phosphorylates and inactivates RhoA. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 280: 798-805, 2001.
 5. T. Saito, H. Itoh, T.H. Chun, Y. Fukunaga, J. Yamashita, K. Doi, T. Tanaka, M. Inoue, K. Masatsugu, N. Sawada, S. Sakaguchi, H. Arai, M. Mukoyama, K. Tojo, T. Hosoya, K. Nakao. Coordinate regulation of endothelin and adrenomedullin secretion by oxidative stress in endothelial cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 281:H1364-71, 2001.
 6. Y. Fukunaga, H. Itoh, K. Doi, T. Tanaka, J. Yamashita, T.H. Chun, M. Inoue, K. Masatsugu, N. Sawada, T. Saito, K. Hosoda, H. Kook, M. Ueda, K. Nakao. Thiazolidinediones, peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonists, regulate endothelial cell growth and secretion of vasoactive peptides. *Atherosclerosis.* 158:113-9, 2001.
 7. J. Yamashita, H. Itoh, M. Hirashima, M. Ogawa, S. Nishikawa, T. Yurugi, M. Naito, K. Nakao and S.I. Nishikawa. Flk1 positive cells derived from embryonic stem cells serve as vascular progenitors. *Nature* 408: 92-96, 2000.
- ## 2. 学会発表
1. Keystone Symposia 2002 Angiogenesis in Cancer and Other Diseases. Feb. 9, 2002. Banf, CANADA (Invited lecture)
 2. 第39回臨床分子医学会 3月1日、大阪
 3. 第67回日本循環器学会 4月26日、札幌
 4. 国際 vascular biology 学会 2002 5月13日、軽井沢
 5. 第25回日本高血圧学会モーニングセッション 10月13日、東京
 6. 第43回日本脈管学会 11月7日、東京
 7. American Heart Association Scientific Meeting 2002. Nov. 17, 2002. Chicago, USA
- ## H. 知的財産権の出願・登録状況
- なし。

遺伝子導入デバイスの開発に関する研究：
血管内遺伝子導入デバイスの開発に関する研究

分担研究者 西 正吾（高槻赤十字病院 脳外科 部長）

研究要旨

頸動脈の動脈瘤閉鎖治療として、従来の外科手術やプラチナコイル、あるいは未修飾のステントを用いる方法に変わるカバーステントを用いる閉塞技術を開発した。用いた基材は経皮的血管形成術のために開発、商品化された金属ステントである。これにカバーフィルムとしてポリウレタンで皮膜化し、これに微細孔を作製し、カバー表面に光硬化性ゼラチンを用いてヘパリンを包埋固定した。動脈瘤は実験的に犬の静脈片を動脈側方に接ぎ木するように接続させて作製した。動脈瘤はすべてステント留置直後に閉塞し、留置1週間で血栓を伴い塞栓した。頸動脈はステント留置直後（n=2）、1週間後（n=4）、1ヶ月後（n=3）、3ヶ月後（n=4）のいずれもほとんど狭窄を伴わず、開存した。走査型電子顕微鏡観察の結果、ステント内腔表面は留置1週間で動脈瘤の場所に関わらずカバーフィルムの微細孔を通しての組織侵入により完全に内皮化された。我々が開発したステントは特に動脈瘤部位への血液の流入を即座に止め、早期に内皮化できることで、瘤口での血栓形成による閉塞を大幅に抑制できるため、動脈瘤治療として非常に有望であると言える。現在、ヘパリンに加え、外側面に組織化を促進する増殖因子を発現する遺伝子を固定・徐放化させることで治療技術の信頼性を高めつつある。

A. 研究目的

Guglielmi の開発した電氣的脱離型コイル（GDC コイル）を用いた頭蓋内動脈瘤の血管内治療の発達により臨床的にすばらしい成果が得られている。しかしながら、大きさの限られた動脈瘤でさえ完全に塞栓するには数十ものコイルを必要とする。また、GDC コイルを用いた治療は、特に外科的に困難な巨大な動脈瘤の治療において本質的に適用困難である。さらに、留置した塞栓材料が外れ親血管に入ると、血流を

塞栓材料が外れ親血管に入ると、血流を妨げるので、大きな動脈瘤の治療では親血管の閉塞が起こる可能性がある。血栓性閉塞性合併症も起こり、瘤口の残留物が動脈瘤の再成長および破裂を引き起こす可能性も指摘されている。さらに、動脈瘤へのマイクロカテーテルの留置により動脈瘤の破裂および血栓移動のリスクを有している。

高分子フィルムでステントを皮膜化させた単

純なカバーステントは、頭蓋外の動脈瘤治療の新規手法として開発された。しかし、ステントは無孔のポリマーフィルムでカバーをしたものであった。

血管内治療技術は上述の頭蓋内外の動脈瘤の外科治療に比べていくつかの利点がある。例えば、瘤口をカバーフィルムにより物理的に完全に塞栓できる。一方、単純なカバーステントは経皮的冠動脈形成術（PTCA）に実験的に応用されている。これらの研究で用いたポリマーはポリグリコール酸、ポリ乳酸のような分解性ポリマーまたはポリウレタン、シリコン、ポリエステルのような非分解性ポリマーであった。しかしながら、豚冠動脈に移植した無孔のポリマーフィルムコーティングステントが重大な炎症、血栓形成および SMC の過増殖を招き、狭窄した。カバーフィルムにより、未処理のステントに比べて血栓形成や炎症反応を増加させる血液接触面積の大幅な増加を引き起こしたためであると考えられる。

最近、我々は動脈再狭窄治療のために組織侵入の物理的制御、薬物固定化の両機能を有する新規ステントを設計・開発した。それは拡張可能なバルーン金属ステントと薬物を貯蔵できる化学的に修飾した微細孔含有弾性フィルムから構成されている。移植初期で血管閉塞を引き起こす血栓形成はフィルム表面にヘパリン固定化ゼラチンをコーティングすることにより防止できる。内腔面の早期の内皮化と周辺組織から微細孔を通しての組織侵入の制御が実験的に達成されている。

本研究では、我々の開発中のステントの最小限の血栓形成、すみやかな制御された組織再構築、および物理的バリアの特徴に基づいて、作製したステントを犬頸動脈の動脈瘤の塞栓に応用した。我々はステントの使用により初期閉塞の防止と3ヶ月間の高い開存率を伴い動脈瘤が

塞栓することを示し、本ステントの神経外科における代替治療デバイスとしての可能性を議論した。

B. 研究方法

我々は7匹の雑種の成犬（体重：13-15Kg）に13の動脈瘤を実験的に作成した。動脈瘤は瘤口の直径が0.5 cmで、高さ1cmであった。高機能ステントはヘパリンを浸漬させた薄い微細孔を有するSPUフィルムで覆われた金属ステント（PalmaZ stent; Cordis, Johnson&Johnson, Japan）である。ステントは瘤口をふさぐように頸動脈内に留置した。動脈瘤作製一週間前から毎日アスピリンとトリクロピジンをそれぞれ81mg, 100mg服用した。ステント留置直前、直後、1、4、12週後に血管造影した。

B-2. ステントの作成

微細孔はエキシマレーザーアブレーション法を用いて市販のセグメント化ポリウレタン（SPU）（厚さ：30 μm , Sheeedom Co., Tokyo, Japan）に作成した。孔の大きさは100 μm で、孔の間隔は250 μm であった。微細孔を作成した後、光反応性ゼラチンを用い、1 mg(164.5units)/ cm^2 のヘパリンをフィルム表面に固定化した。顕微鏡を用い、修飾SPU薄膜をステントに10.0径のナイロン糸で縫い、巻き付けた後、*N,N*-ジメチルホルムアミドにて接着した。使用前、作製したステントを0.5%マスキナルコールで滅菌し、生理食塩水で洗浄し、PTAバルーンに取り付けた（a 5 French Power Flex PTA balloon, Cordis, Johnson&Johnson, Japan）。

B-3. 犬への動脈瘤の作製

7匹の雑種成犬（体重：13-15Kg）の2本の頸動脈にそれぞれ5mmの穴を持つ血管壁に袋

を有する動脈瘤を作製した。合計 14 の動脈瘤を作製した（直径 0.5cm の口と 1.0 cm の高さを有する）。手術は当研究所の Animal Care Committee で定められたプロトコールに従って行った。体重 13-15Kg の犬は標準の実験室食物により維持し、動脈瘤作製の 1 週間前から毎日 81mg のアスピリンと 100mg のトリクロピジンを用いた。ケタラール（1cc/Kg）とアトロピンスルフェート（0.5mg）を犬に筋肉注射して麻酔し、気管内に挿管し、20-30mg/Kg の sodium pentobarbital により維持した。犬を仰向けにし、滅菌条件下にて頸部の中央を切開し、筋肉と結合組織を剥離することにより、両側の頸動脈と右外頸静脈を露出させた。外頸静脈は動脈の外膜から剥離し、きれいにした。静脈の断片の両端を 3.0 シルク糸で結び、それらの間を切断、取り出し、ヘパリン溶液ですすぎ、生理食塩水に浸した。静脈の断片を 2 つに切り、片側を 3.0 と 4.0 のシルク糸で強く結んだ。頸動脈を露出させ、外膜をきれいにし、血管動脈瘤クリップの間の血流を止めた。嚢状の動脈瘤を作るため、動脈を縦に直線状に 5mm 切開した。片側を縛った静脈片を動脈切断面に end-to-side で 7.0 ナイロン糸により不連続に吻合した。クランプを外した後、吻合部分を追加することと出血部位を押しつけることにより止血した。7 匹の犬はそれぞれの頸動脈に一つの動脈瘤を有した。傷は 3.0 シルク糸で層状に閉じた。犬には術前と同様にアスピリンとトリクロピジンを含む餌を与えた。動脈瘤作製後少なくとも 4 週で処置した。動脈瘤の開存率は処置前にデジタル・サブトラクション・アンギオ装置（DSA）により C-アームイメージ増強装置を用い、神経血管ソフトウェアによって調べた。我々の以前の動脈瘤の実験では 4 週間で自然に血栓が生成しなかったため、コントロールはこの時用いなかった。

B-4. 動脈瘤塞栓の方法

以下に示すように、動脈瘤を作製して 4 週から 6 週後に作製したステントにより塞栓した。通常の気管内麻酔下の犬で頸動脈を外科的に露出させた。A6 French sheath introducer を大腿動脈に導入し、設置した。作製したステントを備え付けた A5 French Power Flex PTA バルーンカテーテル（頸動脈のサイズに合わせた直径 4 または 5mm、長さ 2 cm）を sheath を通して挿入し、造影下頸動脈の動脈瘤の瘤口まで挿入させた。バルーンを膨らませ、ステントを留置した。頸動脈の開存と動脈瘤の閉塞を調べるために、ステント留置前後で血管造影を行った。ステントを両頸動脈に留置した後、バルーンカテーテルを取り除き、大腿動脈を結紮した。術後の経過はすべての犬で良好であった。

B-5. 組織学的評価

ステント留置直後、1 週、1 ヶ月、3 ヶ月後に血管造影による経過追跡した。すべての動脈瘤と頸動脈周辺接組織を取り出し、10%ホルマリン中性緩衝液にて固定した。標本をメチルメタクリレートにより包埋した。光学顕微鏡観察用の標本を円形のダイヤモンド製のナイフで縦に 0.5mm の厚さに切り、手で押しつけ厚さ 30-40 μ m とした。ステント動脈瘤標本は病理診断用に作製した。標本を加工、包埋した後、パラフィンブロックを約 5 μ m の厚さに切断した。それぞれをヘマトキシリン-エオシンおよびマッソントリクロム染色した。標本の一部は電子顕微鏡観察用に加工した。

（倫理面への配慮）

研究上で倫理面に配慮すべき研究内容が生じた場合には、必要に応じて各所属施設内での倫理委員会において承諾を受けた上で実施を行う。また、ボランティアを必要とする研究ではイン

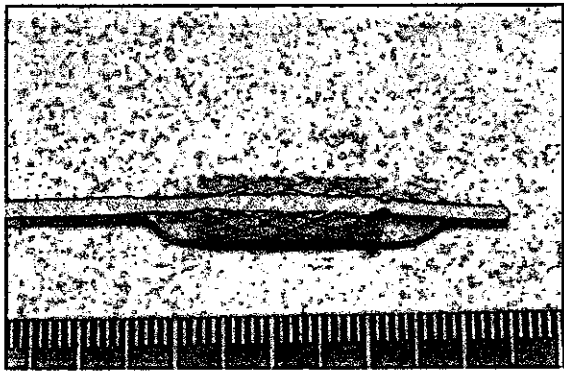
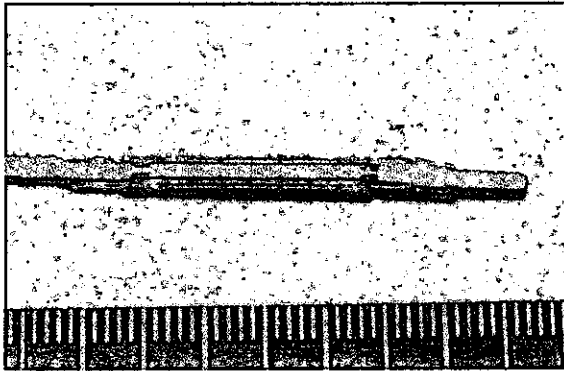


図 1

フォームドコンセントを行った上で協力をお願いする。

全ての動物実験は国際標準規格 Principles of Laboratory Animal Care (National society for Medical Research) と Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (National Institutes of Health Publication No. 86-23) に従って行い、動物愛護に配慮する。飼育は各施設付属の動物管理施設にて一括管理される。

C. 研究結果

C-1. ステントの作製

動物実験の前に、ステントの膨張、脱膨張の前後での伸縮性能をまず *in vitro* で観察した (図 1)。作製したステントグラフトは容易に経皮的動脈形成 (PTA) バルーンに装着でき、バルーンを膨張できた。バルーンの脱膨張により脱着されたステントは表面に微細孔を有し、完全に



図 2

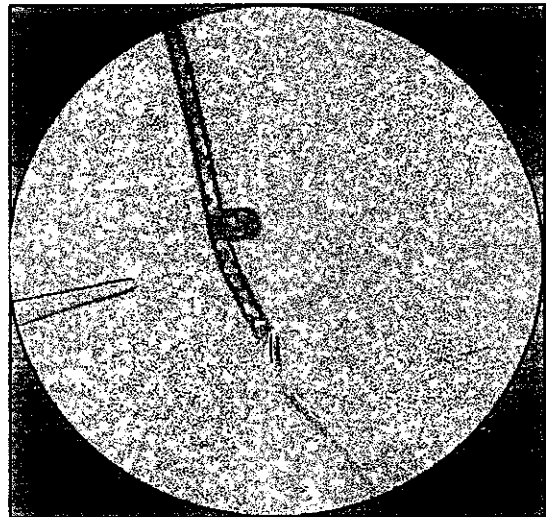


図 3

伸びた形状を保持した。

C-2. 動脈瘤の作製

動脈瘤 (n=13) は一つの動脈瘤を持つ一匹の犬を除き、すべての犬で両頸動脈に作製できた (図 2,3)。すべての犬は 4 時間以内に手術から回復し、本研究に用いられた。

C-3. 血管造影所見

ステント留置直後、動脈瘤への血液の流入はほとんど阻止できた。数分後には全ての動脈瘤は血管造影により観察できなくなった (図 4)。ステント留置の 1 週、1 ヶ月、3 ヶ月後には動脈