

## A. 研究目的

本研究の主目的は、ナノサイズの分子構造を自在に操作できるナノ分子アーキテクチャ技術を開発し、それをもとに循環器疾患克服のための血液界面代替デバイス（組織工学的、微細加工工学的、高信頼性デバイス）を開発することである。本年度は、ナノ分子アーキテクチャー技術として、これまで分担研究者らが薬物の機能化や遺伝子ベクターの開発研究において基盤技術として着実に蓄積してきた超精密分子設計技術を萌芽的に発展させ、ターゲティング性を高めナノレベルで機能性超分子の構造骨格を建築操作することによって、秩序だった表面ナノ構造化ができ、高度な生体適合性や機能性の獲得をめざす On Surface テクノロジー（表面上でのナノ構造操作）を開発することを目的とする。

循環器系組織は常に血液にさらされているため、それらの機能を代替するデバイスの駆動の長期維持は、血液凝固の回避能に大きく依存している。特にマイクロ化、超微細加工化されると、デバイスの体積に対する比表面積は寸法の逆数に比例して飛躍的に増大するため、より精緻な表面設計が要求される。

血液適合性はデバイスのナノメートルレベルでの極最表面層の物性と構造で決定される。我々は、本年度においてデバイスの表面設計研究に特化し、秩序だつて表面ナノ構造化させることにより、高度な生体適合性や機能性の獲得をめざす On Surface テクノロジー（表面上でのナノ構造操作）と、別に、共同研究として進めている、予め精緻に構造設計されたナノ構造体をデバイス表面にカセット化する To Surface テクノロジー（表面へのナノ操作）の両方向からナノ分子アーキテクチャー技術の確立をめざしている。これらのテクノロジーを最大限に利用することにより、既存のマクロやマイクロ技術

の組み合わせのみでは不可能であった以下に示す再生医療デバイスから低侵襲治療に関わる高機能治療デバイスが実現可能となり、広いスペクトルで萌芽的な高度先端医療の推進が加速されることが考えられる。

具体的には、組織工学的アプローチによる、1) 毛細血管網を包含する3次元人工心筋組織体、2) ES細胞を配した新規形状血管内治療（狭窄拡張、瘤封鎖）デバイス（基盤としてES細胞の血管壁細胞への分化誘導表面ナノテクノロジーを開発）、ならびに微細加工工学的アプローチによる、3) マイクロ血管接合デバイス、4) 頭蓋内血管形成デバイス、を標的デバイスとして、産官学の共同研究機関が密接に連携を図りながら集約的に研究開発する。これらによって循環器病の制圧のための治療戦略を再構築できる。虚血性心疾患や閉塞性動脈硬化症、動脈瘤の根本治療、脳梗塞（痴呆）、腎硬化症等終末臓器不全の治療につながり、また誰も成し得なかった人工組織体の3次元化など臓器再生療法に革新的ブレークスルーを与えることとなり、現代並びに次世代医療上利するところが極めて大きい。さらに、近未来医療の主役となりうるナノテクノロジーの集約体である医療用マイクロマシン開発の基礎基盤を提供できる意義は大きい。これらによって循環器病の制圧のための治療戦略を再構築できると考えられる。

人工臓器などの医療用デバイスが移植などにより体内に導入された後、生体に許容されるか、あるいは拒絶されるか（生体適合性）は、血液あるいは組織と直接接触する医用材料の極表面におけるナノレベルでの化学組成、および構造に大きく依存する。医用材料として広範に用いられているポリビニルアルコール、ポリエチレングリコールやセルロースなど非電荷親水性高分子からなる表面は、タンパク質を吸着し難く、

細胞の付着を阻止することが知られている。従って、治療や検査目的に短期間使用するデバイス表面に生体適合性を付与する手段として非電荷水溶性高分子の共有結合によるカップリング（グラフト）法、あるいは水溶性単量体（例えば、アクリルアミド）のグラフト重合法などの表面修飾技術が開発されている。これにより基材表面に非電荷グラフト鎖による高含水散漫層が形成され、生体の異物認識を短期間回避できる。しかし、溶液反応を利用した水溶性高分子のカップリング（グラフト）法を用いた場合には、適用基材に制約があり、かつデバイス表面の修飾部位を限定できない。

一方、 $\gamma$ 線、グロー放電、コロナ放電、紫外線照射により基材表面に生成したパーオキシドなどの高反応性基をラジカル重合開始剤とする従来の表面グラフト重合法を用いた場合には、複雑な形状を有するデバイスの内部を均質に、あるいは限定した特定部位のみを修飾したり、基材表面への重合開始種の導入量を制御することは困難である。また、 $\gamma$ 線照射やコロナ放電を利用した場合はさらに内部の損傷や物性変化を伴う場合もある。一般にラジカル重合は多くのビニルモノマーの高分子化に有効な重合法であるが、フリーラジカルを連鎖して伝体とする連鎖反応機構で進行するため、通常、高分子設計（分子量、分子量分布ならびに高分子末端基構造の規制、ブロック高分子の合成など）することは困難である。以上のような技術的および原理的な問題により、ラジカル重合による人工臓器などのデバイス修飾への実際的な応用はほとんど行なわれていない。

1980年始めに大津らは新しい型の光ラジカル重合開始剤としてジチオカルバメート誘導体を合成し、これを用いるとスチレン（ST）やメタクリル酸メチル（MMA）などのビニルモノマーの光重合が見かけ上リビングラジカル重合

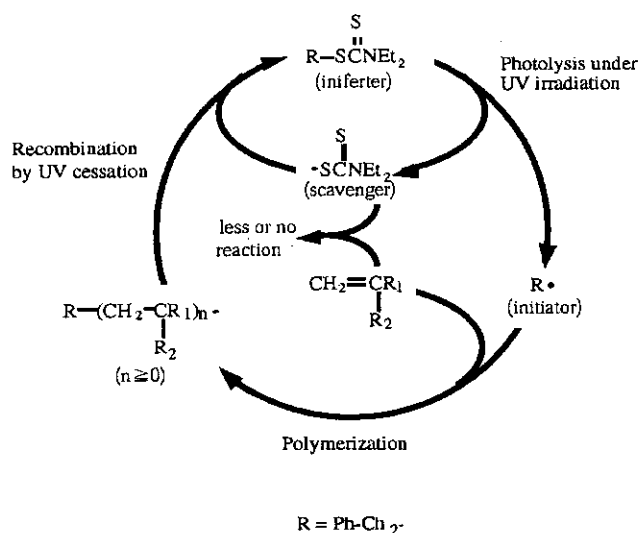


図1. ベンジル*N,N*-ジエチルジチオカルバメートをイニファタとする光ラジカル重合反応

機構で進行し、ラジカル生長を規制できることを報告している（図1）。このジチオカルバメート誘導体は重合開始剤（*initiator*）、連鎖移動剤（*transfer agent*）、停止剤（*terminator*）として機能することから、イニファタ（*iniferter*）と名付けられた。イニファタの一つであるベンジル *N,N*-ジエチルジチオカルバメート（BDC）へ光照射するとベンジルラジカルとジチオカルバメートラジカルを生成する。前者のラジカルは高反応性で重合を開始し、後者は重合を開始しないか、極めて開始しにくく、生長ラジカルと一次ラジカル停止する。このようにジチオカルバメートラジカルとの再結合により重合停止した生長末端は照射により再びラジカル解離し、重合を繰り返す。

高分子表面の微細構造化技術を確立し、細胞レベルでの微細領域での傾斜機能高分子表面を作成することを目的とし、作成した基材上での細胞応答挙動を観察し、細胞の機能（接着・伸展・増殖能）発現を制御できる傾斜機能高分子基材の作成をめざしている。そこでこの傾斜機

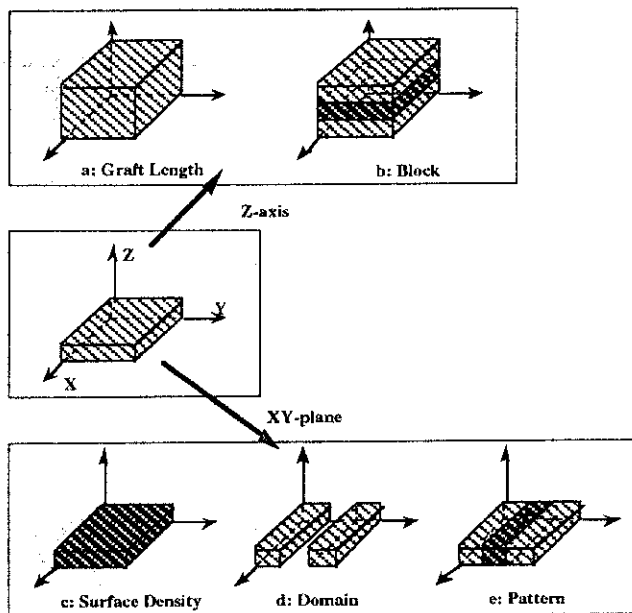


図 2. 表面グラフト重合の精密 3次元制御

能高分子表面を作成するための基盤プロセス技術の開発を行った。具体的には上記したBDCの光反応性を利用して、成型加工したデバイスの修飾部位、グラフト鎖密度、およびグラフト鎖長を制御を可能にする表面グラフト重合の精密3次元制御（XY平面、Z軸高さ）について検討した。BDCは光照射時のみラジカル解離して重合を開始することから、照射エネルギー（照射時間、光量）を調節することによってグラフト量（グラフト鎖長）を規制でき（Z軸方向の制御、図2 a）、モノマーを変えて照射を繰り返すとグラフト薄膜の積層化ができると考えられる（図2 b）。また、基材への光反応性基の導入量を調節することでグラフト鎖の表面密度が調節でき（XY平面の制御、図2 c）、照射領域を規制することによって2次元平面でのグラフト領域の制御（図2 d）、および異種グラフトによるパターン化ができると考えられる（図2 e）。

まず、側鎖にBDC基を有する光反応性高分子を基材に塗布する、または基材表面にBDC

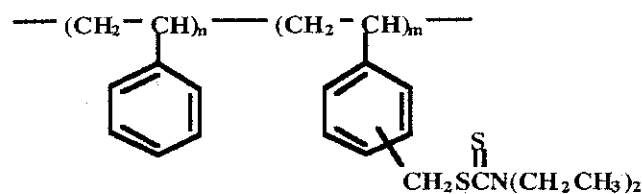


図 3. 光反応性高分子の化学構造

基を化学固定することにより、BDC基を基材表面に導入した。この基材上で種々のビニルモノマーの光グラフト重合を行った。重合の進行をナノグラムの精度で超微細な質量変化を共振周波数変化として感知することができる水晶発振子センサー（QCM）を用いて *in situ* で観察し、モノマーの重合性を比較した。さらに、光グラフト重合による精密微細加工の可能性について検討した。

また、この表面光重合法を利用してミクロンレベルでの微細領域においてイオン性の異なる数種類の水溶性モノマーのグラフト重合膜厚の傾斜表面を作成し、各表面での細胞の接着増殖挙動の比較検討を行った。

## B. 研究方法

### B-1. 光反応性高分子の合成

ベンジルジチオカルバミル基を有する光反応性高分子（図3）は、クロロメチルスチレン（*m, p*-置換混合物）をメタノール中で *N, N*-ジエチルジチオカルバミン酸ナトリウムと反応させビニルベンジル *N, N*-ジエチルジチオカルバメートを得、これとスチレンをAIBNを開始剤として遮光下でのラジカル共重合により合成した。生成物は <sup>1</sup>H-NMR スペクトル測定（JNM-dX 270: 270 MHz、日本電子）により同定した。光反応性基（ジチオカルバミル基）の導入量の調節は、共重合のモノマー仕込み比を変化させて行った。光反応性基導入率の異なる

る3種類の光反応性高分子（光反応性基導入量：11.1、25.1、49.3 mol%、元素分析による）を得た。

## B-2. 光反応性高分子フィルムの作成

光反応性高分子フィルムの作成は以下の2種類の方法で行なった。1) B-1で合成したジチオカルバミル基を含む光反応性高分子をトルエン溶液（1wt%）とし、これをポリエチレンテレフタレート（PET）フィルム上に塗布・乾燥した。2)  $\gamma$ 線照射により架橋させたポリスチレンフィルム表面をクロロメチルエチルエーテルによりクロロメチル化した後、*N,N*-ジエチルジチオカルバミン酸ナトリウムと反応させ、ジチオカルバミル基に変換した。表面の光反応性基量はXPSスペクトル測定（ESCA-750、島津製作所）により求めた（光反応性基導入率30.5 mol%）。

## B-3. 表面光グラフト重合

表面光グラフト重合は2-2で作成した2種類の光反応性高分子フィルム上で行なった。30mLの石英セル内に窒素置換したビニルモノマー（0.5mol/dm<sup>3</sup>）のメタノールあるいは水溶液20mLを入れ、光反応性高分子フィルムをセル内に固定し、窒素を吹き込みながらフィルム表面に紫外光を照射した。モノマーは*N,N*-ジメチルアクリルアミド（DMAAm）、*N,N*-ジメチルアミノプロピルアクリルアミド（DMAPAAm）、アクリル酸（AA）、メタクリル酸（MAA）、スチレン（ST）、および*n*-ブチルメタクリレート（BMA）をいずれも和光純薬工業より購入し、蒸留により精製した後、用いた。光源には250W超高压水銀灯（SPOT CURE250、ウシオ電気）を用い、付属の石英製ファイバーにより光を誘導して行った。照射強度はファイバー先端とサンプル間の

距離を変化させることにより5mW/cm<sup>2</sup>に調節した。

グラフト重合の進行の*in situ*観察は高感度マイクロバランスである水晶発振子（QCM）を用いて行なった。QCM（基準振動数、9MHz、1Hzの振動数の減少は1.05ngの質量増加に相当）の電極表面（面積、0.196cm<sup>2</sup>）にB-1で合成した光反応性高分子（約15ug）をキャストした。上記と同様に光照射し、共振動数の変化を測定することによって、グラフト重合の進行を観察した。

## B-4. 表面光ブロック・グラフト重合

光反応性高分子フィルムを基材として用い、石英セル（30ml）内に固定した。セル内に窒素置換したビニルモノマーのメタノールあるいはトルエン溶液（20ml、モノマー濃度：0.5mol/dm<sup>3</sup>）を加えた。溶液内に窒素ガスを吹き込みながらフィルム表面に紫外光を照射することにより表面グラフト重合を行った。表面ブロック・グラフト共重合は表面グラフト重合した光反応性フィルムを別のモノマー溶液中に浸漬し、紫外光を照射することにより行った。

## B-5. グラフト重合膜厚傾斜表面の作成方法

スチレンとビニルベンジル*N,N*-ジエチルジチオカルバメートとのラジカル共重合反応により合成した光反応性高分子を2%トルエン溶液からポリエチレンテレフタレート（PET）フィルム表面にコーティングし、光反応性高分子フィルムを作成した。これをモーター制御移動ステージに固定し、上をストタイプパターン状のフォトマスク（線幅約500um）で覆った。3種類の親水性モノマー、*N,N*-ジメチルアクリルアミド（DMAAm）、*N,N*-ジメチルアミノプロピルアクリルアミドメチオダイド

(DMPAA<sub>2</sub>MeI)あるいはメタクリル酸ナトリウム(MANa)の内、1種類の水溶液中で超高压水銀灯からの紫外光を光ファイバーで誘導し、15分間照射した(超高压水銀灯、強度5 mW/cm<sup>2</sup>)。照射中はステージを一定速度(2.2μm/sec)で一方向に移動させてシャッターを連続的に開かせることにより照射領域を連続的に拡大させた。照射後、フィルムを蒸留水、メタノールおよびエタノールで繰り返し洗浄し、空气中で乾燥した。

#### B-6. 表面グラフト重合体の表面形状観察

表面グラフト重合した光反応性高分子フィルムの表面形状をAFM(Nano Scope II, Digital Instruments, Inc.)によりcontact modeで観察した。カンチレバーはバネ定数0.12N/mでV型(長さ200mm)のSi<sub>3</sub>N<sub>4</sub>製を用いた。

また、重合したフィルム断面の超薄切片(厚さ:約800Å)を作成し、ヨウ素の蒸気にて12時間染色した後、TEM(CM-120, Philips)で観察した。

#### B-7. 表面グラフト重合体の表面解析

水濡れ性は接触角計(CA-D, 協和界面科学)を用いて液滴法による表面水接触角測定により評価した。表面化学組成はX線光電子スペクトル(XPS)測定(ESCA-750, 島津製作所)により分析した。

#### B-8. 細胞接着性

牛血管内皮細胞を15%牛血清(FCS)を含むダルベッコ変法イーグル培地(DMEM: Flow Laboratories)にて培養した。ポリ(N,N-ジメチルアクリルアミド)を表面にグラフトしたポリエチレンテレフタレートフィルムをポリスチレン製培養用24穴マルチウエル(Corning Glass Works)内に固定し、内皮細胞を播種し

た。3時間インキュベート(37℃, 5% CO<sub>2</sub>)した後、トリプシン処理し、接着細胞を浮遊させ、コールターカウンター(ZBI, Coulter Electronics, Inc.)にて細胞数を計測した。

#### B-9. 細胞応答性の評価方法

コラゲナーゼ処理により牛胸部大動脈より採取した血管内皮細胞は15%牛血清(FCS)を含むダルベッコ変法イーグル培地にて培養した。作成したグラフト重合膜厚傾斜表面(1.54 cm<sup>2</sup>)に内皮細胞(濃度3 x 10<sup>4</sup> cells/well)を播種し、30℃, 5% CO<sub>2</sub>/95% air 雰囲気にて3日間培養した。内皮細胞の形態観察は位相差顕微鏡で行った。

#### (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。

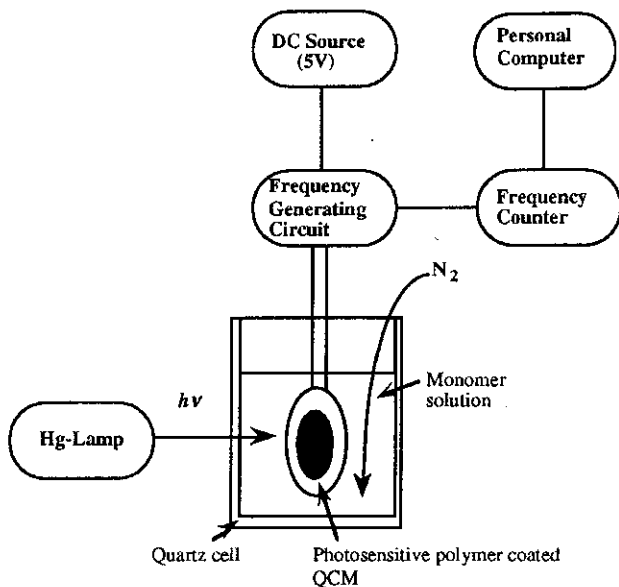


図4. 水晶発振子マイクロバランス (QCM) を用いた光グラフト重合の進行の *in situ* 観察。

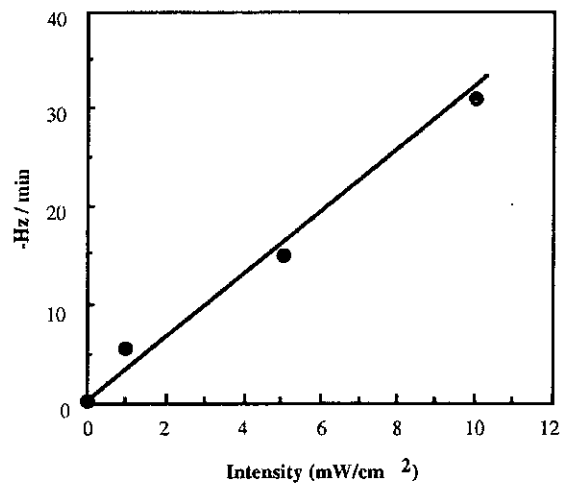


図5. 照射光量とQCM周波数変化量との関係。

## C. 研究結果

### C-1. 表面光グラフト重合の進行の *in situ* 観察

光反応性高分子 (スチレン-vinylbenzyl *N,N*-diethyldithiocarbamate 共重合体) を用いてビニルモノマーのグラフト重合を行い、*in situ* で観察した。方法を図4に示す。光反応性高分子を予めコーティングした水晶発振子マイクロバランス (QCM) センサーをモノマーを含むメタノールあるいは水溶液中に浸漬させ、窒素置換した後、紫外光を照射した。QCM センサーは電極表面上の微小な質量変化をナノグラムのオーダーの精度で周波数の変化として検出できる。1 Hzの周波数の減少は1.05ナノグラムの質量増加に相当する。QCMの周波数変化を測定することにより、グラフト成長の観察を行った。

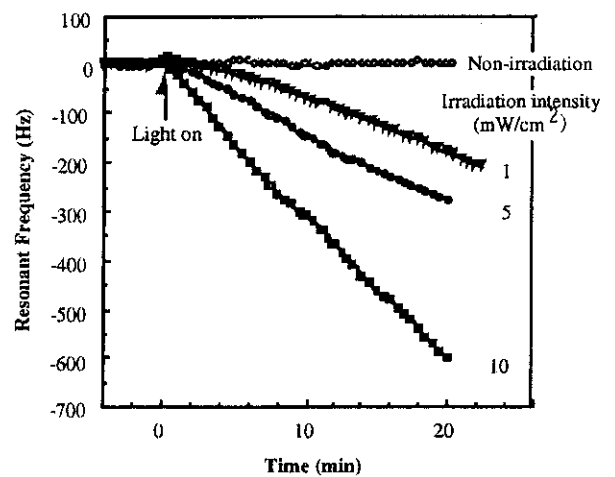


図6. 光反応性高分子上でのSTの光重合反応の進行のQCMによる *in situ* 観察。照射光量変化の影響。

まず、光反応性高分子を塗布したQCMをスチレン (ST) のメタノール溶液に浸漬した。未照射では周波数はほとんど変化せず、塗布した光反応性高分子層は安定して固定されている。高分子塗布面に紫外光照射を開始するとSTの存在にかかわらず共振動数は電気的ノイズにより瞬間的にわずかに増加した。その後ほぼ直線

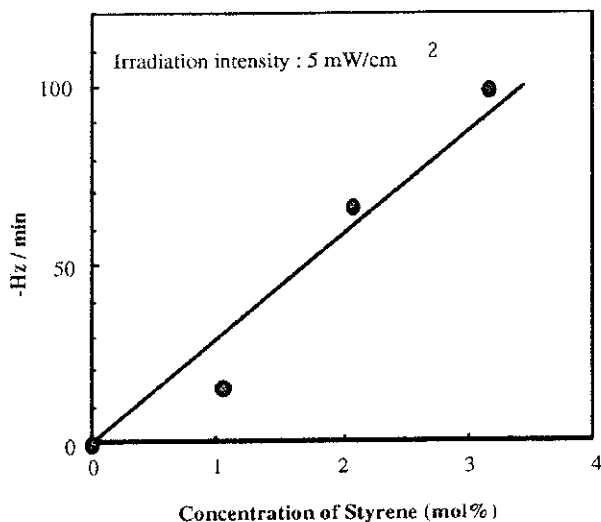


図 7. モノマー濃度と QCM 周波数変化量との関係。

的に周波数は減少した。この周波数の減少は電極上での質量増加を示すことから、グラフト重合が光照射によって進行したと言える。周波数減少量は照射時間とともに直線的に増加したので、単位時間あたりの周波数変化量を照射光量に対してプロットした(図 5)。周波数減少量は照射光量の増加(0~10mW/cm<sup>2</sup>)に対して直線的に増加した。

ST濃度を変えてグラフト重合を行い、QCMで進行を観察した。いずれの濃度(0~0.76mol/dm<sup>3</sup>)においても照射にともなってほぼ直線的に周波数は減少し(図 6)、周波数減少量はモノマー濃度の増加に対して直線的に増加した(図 7)。グラフト重合量は照射光量およびモノマー濃度の増加に対して一次に増加することが示された。

また、光照射を停止すると、共振動数の減少は顕著に抑制された(図 8)。この照射による共振動数の減少と遮光による停止は、数回の繰り返しが可能であった。一方、光反応性高分子を塗布した QCM を ST のメタノール溶液に浸漬させ、加熱した。溶液温度を 60℃ に上昇さ

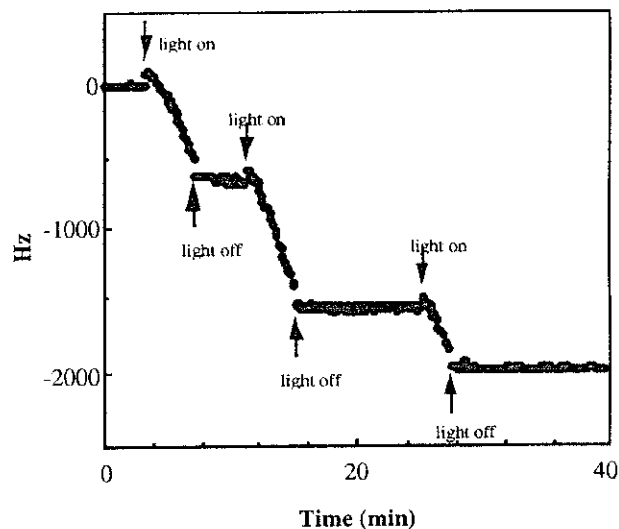


図 9. 光反応性高分子上での DMAAm の光重合反応の QCM による in situ 観察。光照射・遮光の影響。

せても共振動数の大きな変化は観察されなかった。BDC 基のラジカル重合は熱によっては開始されなかった。

DMAAm 溶液中で光反応性高分子フィルムに 20 分間紫外光照射を行い、XPS スペクトルを測定により表面元素分析を行った(図 10)。照射前にはわずかであった窒素と酸素のシグナルが共に増大し(照射前の炭素に対する窒素の元素組成; N/C=0.019、炭素に対する酸素の元素組成比; O/C=0.036、照射後; N/C=0.164、O/C=0.168)、それぞれ DMAAm の理論値(N/C=0.2、O/C=0.2)と近似した。

炭素シグナルでは照射前は 285.0eV に炭化水素由来の強いピークを示したが、照射後には 286.0eV および 287.6eV に、それぞれ C-N および C=O に帰属される高エネルギー成分が増加した。イオウシグナルでは、照射した後においても、強度は照射前に比べ約半分程度に減少したが、ジチオカルバミル基に由来するスペクトルが観測された(照射前の炭素に対するイオウの元素組成比; S/C=0.037、照射後;

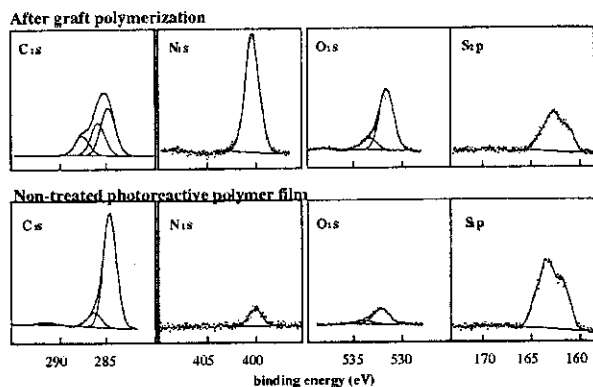


図9. 光反応性高分子上でのDMAAmの光重合によるXPSスペクトル変化。

S/C=0.021)。また、さらに洗浄してもXPSスペクトルに大きな変化は見られなかった。

照射後の表面の水接触角を測定した。測定は接触角測定装置(CA-D、協和界面化学)を用いて液滴法により行った。未処理の光反応性高分子フィルム表面の後退接触角は $86.7^{\circ} \pm 0.8^{\circ}$  ( $n=5$ )であったが、DMAAm溶液中で20分間照射すると $5^{\circ}$ 以下となった。疎水性の光反応性高分子表面が親水性へと大きく変化した。以上のQCM測定、ESCAスペクトル分析、および水接触角測定の結果より光反応性高分子表面への紫外光照射によりDMAAmのグラフト重合が開始され、照射時のみに重合が進行したといえる。

他のモノマーについて同様に光照射し、QCM測定を行った(図10)。酢酸ビニル(VA)ではほとんど共振動数の変動はなく、重合性は乏しかった。それ以外のモノマーについてはいずれも照射時間と共にほぼ直線的な共振動数の減少を示し、グラフト重合の進行を示した。重合初期における重合速度(時間に対して直線的に減少する共振動数の傾き)は2-ヒドロキシエチルメタクリレート(HEMA)、エチルメタクリレート(EMA)で高く、メタクリル

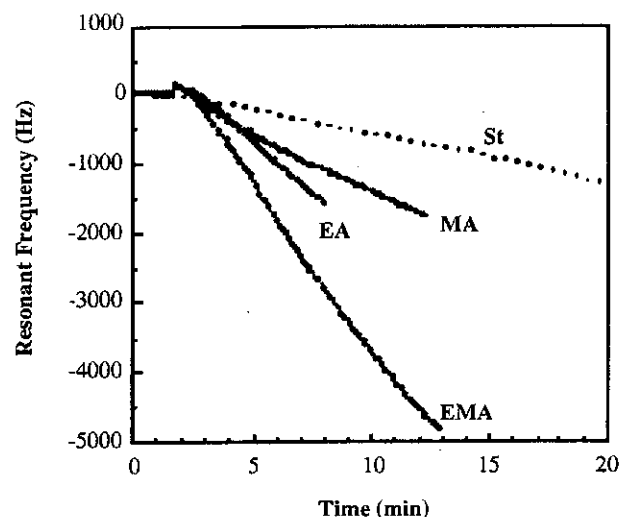
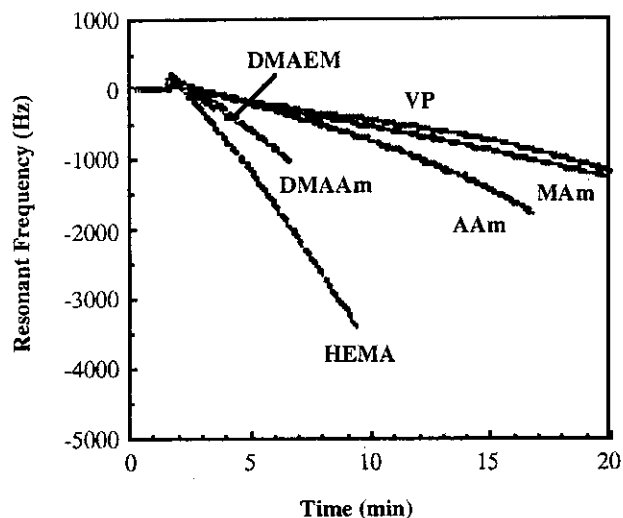


図10. 光反応性高分子上での光重合反応の進行のモノマー比較(上;親水性モノマー、下;疎水性モノマー)。

アミド(MAM)、ビニルピロリドン(VP)、スチレン(ST)で低かった。

### C-2. グラフト鎖の表面密度

合成した光反応性基導入率の異なる種々の光反応性高分子からフィルムを作成し、フィルム表面の光反応性基密度と、その表面でのSTの光グラフト重合での重合初期における重合速度を測定した(図11)。表面の光反応性基密度はXPSスペクトル分析の測定値からN/C比求



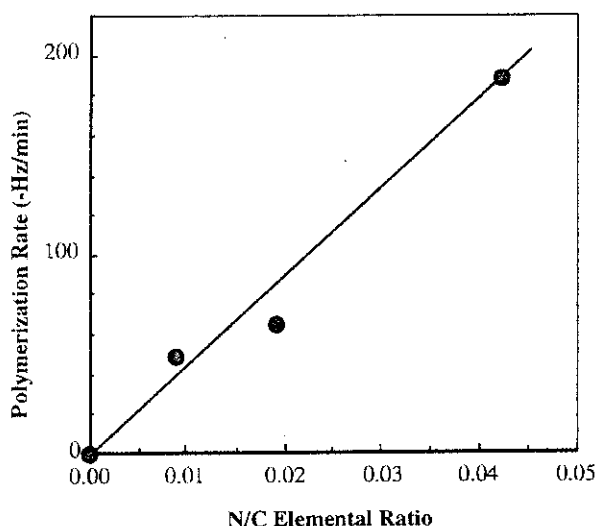


図 11. 光反応性基導入量の異なる光反応性高分子上での光重合速度の比較。

め、この値で評価した。初期重合速度は QCM 測定から時間に対して直線的に減少する共振動数を測定することより求めた。光反応性基の導入率が 11.1, 25.1, 49.3 mol% の光反応性高分子から作成したフィルム表面の N/C 比はそれぞれ 0.009, 0.019, 0.04 であった。光反応性基導入率の増大に伴って、N/C 比はほぼ直線的に増大した。また、重合速度は N/C 比の増大に伴ってほぼ直線的に増加した。このことは反応初期において開始効率を一定と仮定した場合、光反応性高分子の光反応性基の導入量を変化させることでグラフト鎖の表面密度が調節できることを示唆した。

### C-3. 表面水濡れ性

水溶性モノマーの光グラフトを行ない基材表面への親水性層の付与について検討した。基材としてポリエチレンテレフタレートフィルムを用い、これに光反応性高分子をキャストし、水溶性モノマー (*N,N*-ジメチルアクリルアミド) 存在下で照射時間を変えて光グラフト重合した。図 12 に光照射処理表面における水との後退接

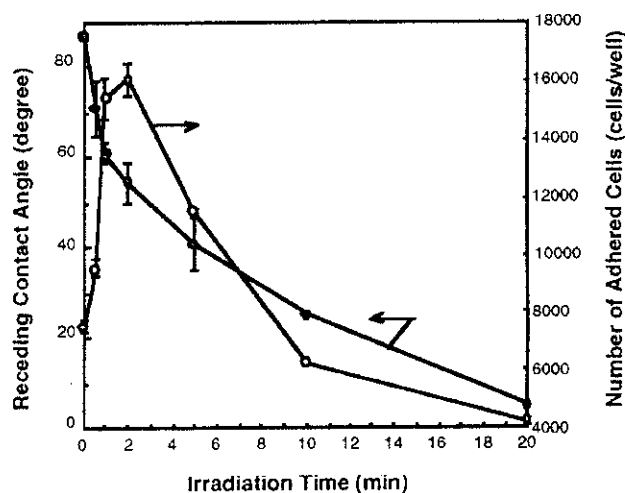


図 12. DMAAm を光重合した表面の水濡れ性とその表面での細胞接着数の変化

触角、および血管内皮細胞の初期接着数を照射時間に対してプロットした。照射処理すると接触角は単調に減少し、表面の水濡れ性が増大した。このことは光反応性高分子表面で *N,N*-ジメチルアクリルアミドのグラフト重合が進行し、表面物性が変化したことを示している。細胞の初期接着数を測定すると、未照射の表面では細胞は接着し難かったが、数分間照射処理した表面では良好に接着した。未照射の表面では疎水性が高いため培養初期において基材へ蛋白質の付着が十分でなく、そのため細胞が強固に接着できなかったと考えられる。その後、照射時間の経過に伴い細胞接着数は徐々に減少し、20分間グラフトした表面では細胞接着は大きく阻害された。これは表面の親水性が増大し、散漫層が形成されたことによると考えられる。

### C-4. 表面微細加工性

この光グラフト重合法によって微細領域の2次元加工が可能であるか検証する目的で、格子状のスリット (格子間隔約 60  $\mu\text{m}$ ) を有するフォトマスクを用いて、表面グラフト重合を行

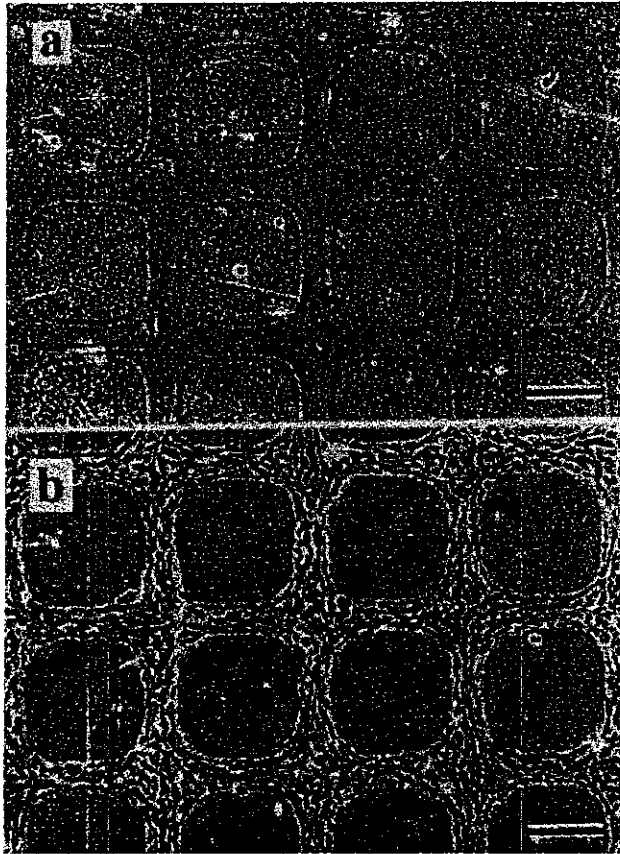


図 13. (a) : フォトマスクを通した光照射により作成した親水・疎水パターン表面の位相差顕微鏡写真。(b) : 上記基材上に牛血管内皮細胞を播種・培養後 3 日目の位相差顕微鏡写真。Bar = 100 $\mu$ m。

なった。基材としてポリエチレンテレフタレートフィルムを用い、これに光反応性高分子をキャストし、フォトマスク上から紫外光を照射し *N,N*-ジメチルアクリルアミドを 20 分間グラフト重合した。スリットに対応し、照射部は散漫層の形成された高親水性表面となり、未照射部は疎水性で変化なかった。ポリジメチルアクリルアミドが光照射部のみに限定して固定化された (図 13a)。

血管内皮細胞を播種し、3 日間培養すると、細胞は照射していない疎水性部のみに選択的に接着した。散漫層の形成された高親水性グラフ



図 14. AFM 測定によるグラフト表面の観察。

ト表面では、蛋白質の接着を阻害するため初期において僅かに接着した細胞も伸展、増殖することなく、培養中に剥がれ、3 日間培養し洗浄すると細胞は全く観察されなかった。培養初期において接着の弱かった疎水性の高い未照射表面では、培養時間の経過に伴い蛋白質の堆積が進み、細胞が強固に接着、伸展し、増殖したものと考えられる。また、3 日間培養液に浸漬させてもグラフト層は剥離せず強固に固定されていた (図 13b)。これらのことから表面グラフトは剥離することなく、ミクロンオーダーの加工精度で行なえることが確認された。

#### C-5. グラフト重合膜厚

原子間力顕微鏡 (AFM) は表面を原子のレベルで測定できる走査型顕微鏡で、探針と最外層の原子との間に働く原子間反発力を測定することにより、ナノレベルでの表面微細領域が観測できる。この顕微鏡を用いて表面グラフト重合を行った微細加工表面の評価を行った。図 14 に未処理の光反応性高分子フィルム、および投影マスクを通して照射し、照射部に ST ポリマーをグラフトしたフィルム表面の形状を示した (縦軸は高さ方向、XY 軸は走査二次元表面を示す。単位はいずれもナノメートル)。未処理

の表面は約10~20 nmの凹凸がある程度で極めて平滑であった。一方、露光部は大きなうねりを有するグラフト高分子で覆われていた。グラフト層の厚さは照射時間と共にほぼ直線的に増し、20分照射後のグラフトの厚さは約120~160nmと見積もられた。露光部と未露光部の境界部分は40,000nm以上にわたってマイクロンレベルでほぼ直線であった。

### C-6. グラフト重合膜厚の傾斜表面の作成

一方向で連続的に照射時間を変化させることにより、光反応性高分子を塗布したPETフィルムの任意の微細領域において精密に制御されたグラフト重合膜厚の傾斜表面の作成について検討を行った。照射時間を制御するためにシャッターとモータ制御移動ステージを組み合わせて照射を行った。モノマーとして非イオン性の

DMAAm、カチオン性のDMPAAmMeI、及びアニオン性のMANaを用いた。作成法を図15に示す。まず、光反応性高分子をコーティングしたPETフィルムを移動ステージに固定した。その上をストライプ模様の金属製マスク（ライン幅450 $\mu$ m）で覆った。さらに、シャッターと一体化した重合反応槽をシャッターの開閉方向と金属マスクのライン方向が直行するように置いた。反応槽内を窒素置換したモノマーの水溶液で満たした。一定速度でステージを一方向に連続移動させることによりシャッターを連続的に開大させながら紫外光を15分間照射した。ステージの移動速度は2.2 mm/secに設定した（ステージの全移動距離：1980mm）（Step I）。照射した後フィルムを蒸留水及びアルコールでよく洗浄し、室温で乾燥した（Step II）。

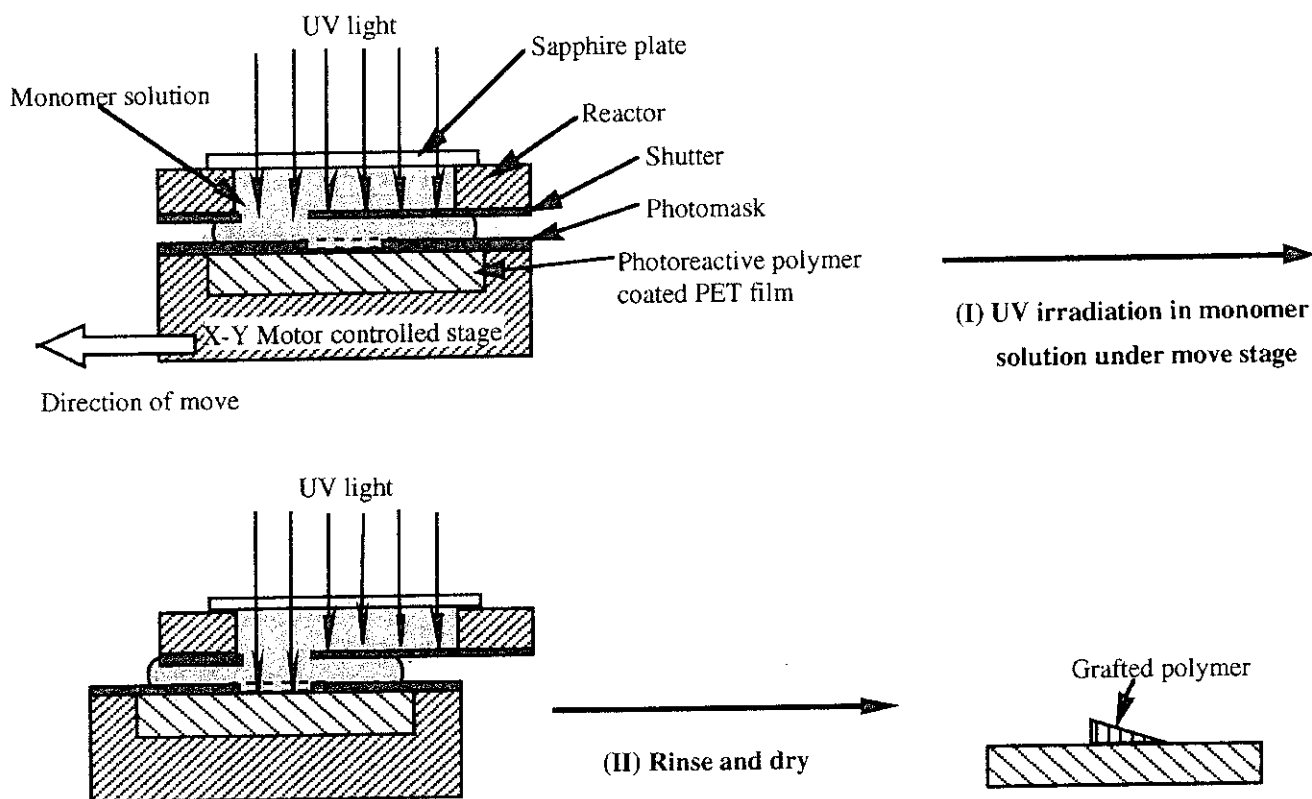


図15. 光グラフト重合による膜厚傾斜表面の作成図

光反応性高分子をコーティングしたPETフィルムをDMAAmの水溶液中で照射した後、原子間力顕微鏡（AFM）で表面トポグラフィー観察を行った。図16にAFM像と重合膜の断面形状図を示す。未照射表面は比較的平滑であり、表面荒さは約50nmであった。一方、照射した表面はグラフト重合した高分子で覆われ大きく盛り上がった。14分間照射した後の重合膜の厚さは約1.5 $\mu\text{m}$ と得られた。グラフト膜の厚さは照射時間とともに増大した。このことはグラフト膜厚がフィルム表面の未照射領域からの距離に応じて徐々に増加していることを示している。また、AFM観察によりDMAPAAmMeIやMANa等のモノマーを用いた場合においても同様の重合膜厚の傾斜表面が形成されることが示された。このように、本表

面光グラフト重合はグラフト重合膜の厚さの制御を可能とした。

### C-7. 微細領域での傾斜表面上での細胞応答性

細胞接着、伸展及び増殖を含む細胞応答挙動をモノマーを変えて作成したイオン性の異なる3種類の膜厚傾斜表面で観察した。各傾斜表面において播種後3日間培養した後の血管内皮細胞の位相差顕微鏡写真を図17に示す。未照射の光反応性高分子表面では内皮細胞はコンフルエント状態であった。一方、カチオン性のDMPAAmMeIポリマーおよびアニオン性のMANaポリマーグラフト表面においては細胞接着性はフィルム膜厚に依存した。いずれも未照射領域からの距離（照射時間）に応じて接着細

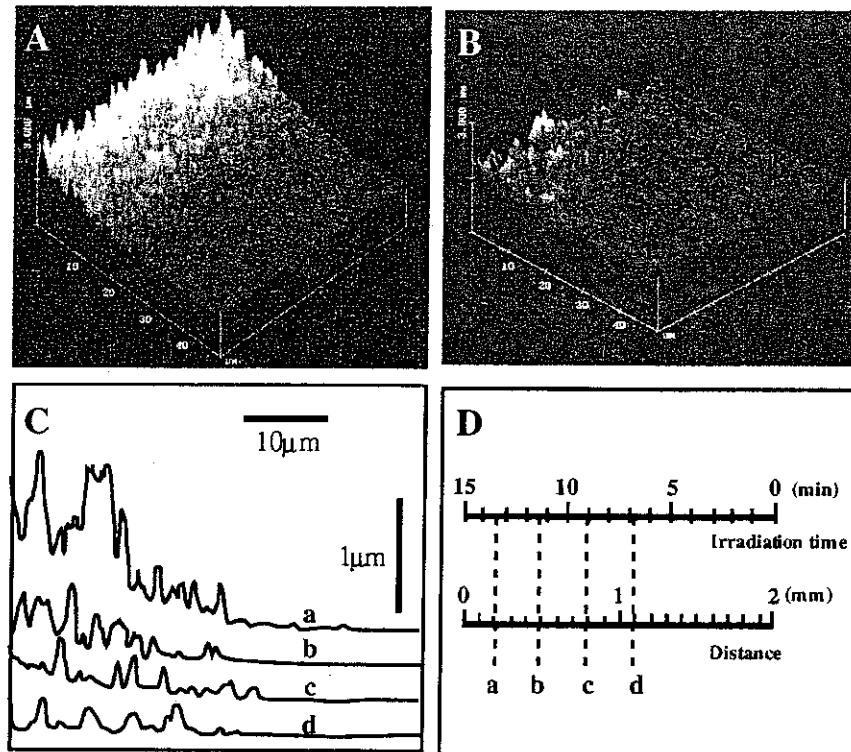


図16. 原子間力顕微鏡（AFM）によるグラフト重合膜厚の傾斜表面の観察。AとBはそれぞれD中の位置a（未照射部からの距離0.2mm、照射時間13.5分）と位置d（距離1.1mm、照射時間6.75分）におけるAFM像を示す。CはD中の各位置でのグラフト膜の断面形状を示す。Dは照射時間とシャッターの開口距離を示す。

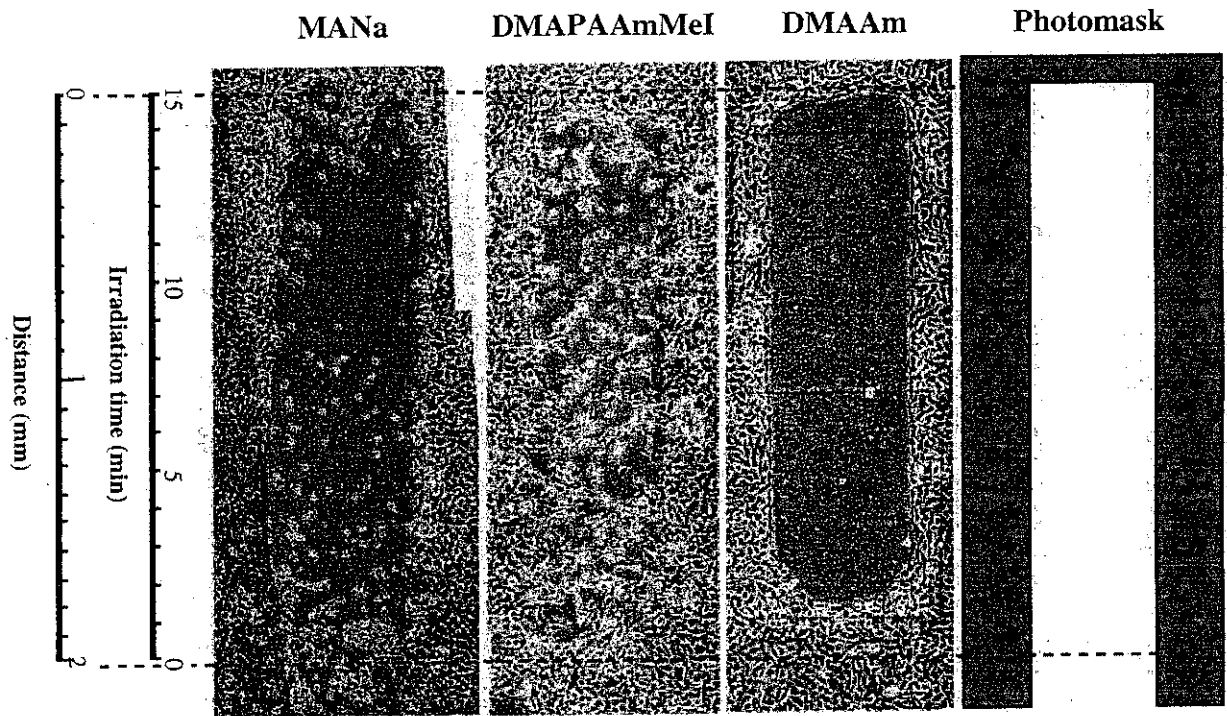


図 17. グラフト重合傾斜表面に播種した血管内皮細胞を 3 日間培養した後の細胞形態の位相差顕微鏡写真。

胞数は顕著に減少した。このことは血清内に含まれている細胞接着性タンパク質の吸着の安定性が重合膜厚、すなわち重合鎖長の増加に伴って減少することによるものと考えられる。また、非イオン性高分子膜厚傾斜表面では接着・非接着領域がある膜厚を境として明確に分離した。

#### D. 考察

表面を精密に設計できる表面精密微細加工・修飾技術の開発は医療分野におけるデバイスのマイクロ化を実現させるための要素技術の一つとして要望されている。マイクロ化したデバイスではマクロデバイスに比べ表面効果が極めて増長されるため、体内に誘導するあるいは体内に埋め込み血液や体液と直接接する場合、マクロデバイスにおいて要求されていた以上に生体防衛機能を活性化しない、より厳密な表面設計が必要と考えられる。近年医用材料の分野において

生体適合性を付与する目的で表面グラフト重合による表面改質が行われている。このグラフト重合は $\gamma$ 線、UV 光照射あるいはグロー放電処理することにより基材表面に生成したラジカル重合開始能を有する活性基を利用して行われている。しかし、これらの処理による表面改質ではデバイスの特定の微細領域のみを限定して修飾することは困難であるため、工業的にフィルム表面の修飾が行われている以外、複雑な形状をした成形加工されたデバイスへの応用はほとんど行われていない。

本研究ではベンジル *N,N*-ジエチルジチオカルバメート (BDC) 基の光反応性を利用した表面グラフト重合の精密微細制御について検討した。ESCA スペクトル分析、および水接触角と QCM 測定より、種々のビニルモノマー溶液中において *N,N*-ジエチルジチオカルバミル基を導入した光反応性高分子表面に紫外光照射する

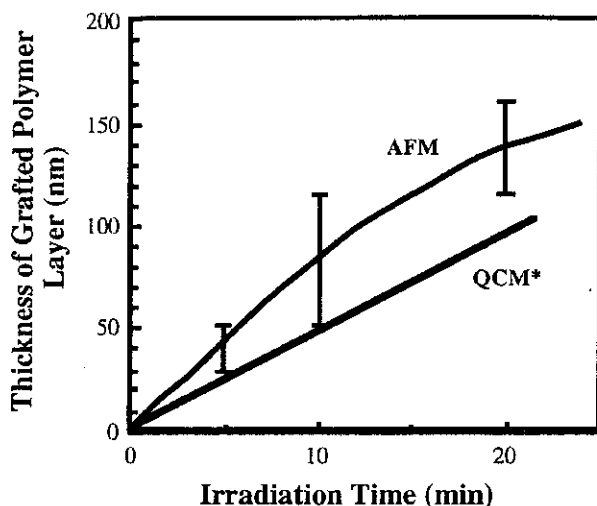


図 18. AFM 測定と QCM 測定によるグラフト重合による膜厚変化の比較。

と表面グラフトすることが示された。本表面グラフト重合はベンジルラジカルによって重合できる他のモノマーにも適用可能であると考えられる。井上らは疎水性ポリシロキサンフィルム表面にジチオカルバミル基を導入し、親水性モノマー (HEMA, AAm, MAA など) のグラフト重合による表面への親水性の付与について報告した。ATR-IR および水接触角測定によりグラフト収率は反応時間と共に増加することが示された。

大津らはポリスチレンゲル表面にジチオカルバミル基を加水分解可能なエステル基を介して導入し、表面グラフト重合を行った。St や MMA の光重合と続く加水分解によって得られた St ポリマーや MMA ポリマーの収率および数平均分子量は光照射時間と共に増加したことより、表面グラフト重合系においても溶液重合系と同様に St および MMA はリビングラジカル重合機構で進行することが示された。さらに、モノマーを変えて繰り返しグラフト重合することにより PSt-PMMA といった AB 型の 2 元ブロック共重合体あるいは PSt-PMMA-PSt や

PSt-PMMA-PMAA といった ABA 型や ABC 型の 3 元ブロック共重合体が合成されている。一方、図 14 に示したように AFM 測定より光反応性高分子フィルム表面において形成された ST ポリマーのグラフト層の厚さは照射時間と共に増加することが観察され、QCM 測定から求めた膜厚変化とよい一致を示した (図 18)。本グラフト重合の反応機構について詳細な検討は行っていないが、モノマーとして St を用いた場合においては大津らの系と同様にリビングラジカル重合機構で進行したことが示唆される。照射時間でグラフト鎖長が調節できると考えられる。

本グラフト重合は光照射によって開始されるため、光照射領域を規制することによって重合領域を規制することが可能であった。表面グラフトのパターンは使用した投影マスクのパターンとよい一致を示し、数十ミクロンレベルの精度で 2 次元微細加工できた。また、光照射を繰り返すことでグラフト重合が繰り返されるので、モノマーを変えて光照射することにより、グラフト薄膜の積層化が可能であった (猶、ブロック共重合体が生成しているかは確認していない)。

本グラフト重合は光照射エネルギー (照射時間、光量) に依存して生長するので、透過光量が一方向に徐々に変化するフィルターを通して照射すると、グラフト量が一方向に徐々に変化するグラフト量傾斜表面が作成できた。表面の性質が徐々に変化する傾斜表面は一つの表面で一度に一連の測定ができるので検査用基材などへの応用が期待されている。最近、プラズマ放電やコロナ放電で徐々に基材表面を処理することによって官能基密度の傾斜表面が作成されている。本グラフトではグラフト層の厚さを傾斜させることができた。機能性モノマーを用いてグラフト重合すれば水濡れ性、化学的性質、電

荷といった望む性質の傾斜表面が作成可能であると考えられる。

## E. 結論

本研究では、循環器疾患克服のための血液界面代替デバイス（組織工学的、微細加工工学的、高信頼性デバイス）を開発することを最終目的として、本年度はナノサイズの分子構造を自在に操作できるナノ分子アーキテクチャー技術を開発することを目的とした。ナノ分子アーキテクチャー技術として、秩序だって表面ナノ構造化させることにより、高度な生体適合性や機能性の獲得をめざす On Surface テクノロジー（表面上でのナノ構造操作）の開発について検討を行った。

グラフト重合は紫外光照射によってのみ開始され、グラフト量は照射エネルギーの増加に伴ってほぼナノレベルで直線的に増加し、グラフト領域はミクロンレベルに限定できることを示した。

光エネルギーは光ファイバーで誘導することができるので複雑な形状をした成形加工されたデバイスの特定部位に対して選択的にナノメーターレベルで修飾することを可能とした。

ジチオカルバミル基を側鎖に有するポリスチレン誘導体フィルムをビニルモノマーの水溶液中に浸漬させ、一定速度で開くシャッターで照射領域を経時的に連続的に変化させながらフォトマスクを通してフィルム表面に紫外光を照射すると、フィルム表面において用いたフォトマスクの形状に対応したミクロンレベルのライン状の親水性グラフト重合体がナノレベルの厚さで生成させることに成功し、顕微鏡観察および AFM による表面トポグラフィ観察によって、グラフト重合膜厚がナノレベルでほぼ連続的に変化するナノ傾斜高分子表面の生成を実証した。

本表面グラフト重合法は XY 平面（グラフト

領域と密度）および Z 軸（グラフト鎖長）のナノメーター制御を可能にした世界で始めての方法であり、細胞レベルでの微細領域でのナノ構造化高分子表面を作成するための基盤プロセス技術としてナノ分子アーキテクチャー技術の一つである On Surface テクノロジーが開発できたと結論できる。

## 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 hyperbranched graft polymerized surfaces by iniferter-based photograft copolymerization, *Langmuir*, 2002, 18, 2601-2606.
- 2) H. Sonoda, S. Urayama, K. Takamizawa, 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. Phram.*, 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 implantation, *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ゲル化、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
- 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) 奥田かんな、中山泰秀、松田武久、機能性ゼラチンの分子設計：オリゴスチレン化ゼラチンの合成と光ゲル形成の促進、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
- 4) 中村孝志、大屋章二、内田欣吾、中山泰秀、松田武久、主鎖にエステル結合を有するビ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) 舩田健、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、医療デバイスの光表面設計：プロトド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ベ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) 舩田健、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：感温性ゼラチンの *in situ*ゲル硬化性 Scaffold 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
- 20) 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
- 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**(札幌京王プラザホテル)、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ざすバイオチューブ組織体の作製、第40回**日本血管内治療学会**(札幌京王プラザホテル)、

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
- 24) 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
- 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**（札幌京王プラザホテル）、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
- 30) 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
- 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、北村惣一郎、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

入したハイブリッド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、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
- 11) 中山泰秀、梅田真理子、ベクター、ベクター用高分子、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