

- compliance changes after implantation. **J Biomed Mater Res** 65A: 170-1781, 2003
9. William G Brodbeck, Gabriela Voskerician, Nicholas P Ziats, Yasuhide Nakayama, Takehisa Matsuda, James M Anderson, In vivo leukocyte cytokine mRNA responses to biomaterials are dependent on surface chemistry. **J Biomed Mater Res** 64A: 320-329, 2003
 10. Takehisa Matsuda, Junichi Nagase, Akané Ghodá, Yoshiaki Hirano, Satoru Kidoaki, Yasuhide Nakayama, Phosphorylcholine-encapsulated oligomer and block co-oligomer and surface biological reactivity. **Biomaterials** 24: 4517-4527, 2003
 11. Cailong Li, Toshinobu Sajiki, Yasuhide Nakayama, Masashi Fukui, Takehisa Matsuda, Novel visible-light-induced tissue adhesive composed of multiply strene-derivatized gelatin and poly(ethylene glycol) diacrylate. **J Biomed Mater Res Part B: Appl Biomater** 66B: 439-446, 2003
 12. 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 carrier. **Connect Tissue Res** 44: 318-325, 2003
 13. Yasuhide Nakayama, Hatsue Ishibashi-Ueda, Keiichi Takamizawa, In vivo tissue-engineered small caliber arterial graft prosthesis consisting of autologous tissue (Biotube). **Cell Transplantation**, in press.
 14. Yasuhide Nakayama, Shogo Nishi, Hatsue Ishibashi-Ueda, Geometrical design of luminal surface for microporous covered stents, **Int J Artif Organs**, in press.
 15. 西 正吾、中山泰秀、植田初江、松田武久、高機能ステントグラフトによる実験的動脈瘤の閉塞-その有用性と展望-。日本血管内治療学会誌 4: 6-9, 2003
 16. 中山泰秀、ナノバイオエンジニアリングマテリアル、第I編バイオインターフェース、第3章光反応によるバイオマテリアル界面の精密創製。p.19-29、フォロントピア出版 2004年3月
 17. Tokunaga N, Nagaya N, Shirai M, Tanaka E, Ishibashi-Ueda H, Harada-Shiba M, Kanda M, Ito T, Shimizu W, Tabata Y, Uematsu M, Nishigami K, Sano S, Kangawa K, Mori H. Adrenomedullin Gene Transfer Induces Therapeutic Angiogenesis in a Rabbit Model of Chronic Hind Limb Ischemia. Benefits of a Novel Nonviral Vector, Gelatin. **Circulation**, in press
 18. Saito M, Tada Y, Harada-Shiba M, Yamamoto A, Kusakabe N, Yokogawa M, Kodama H, Asada H, Miyagawa S. Homozygous familial hypercholesterolaemia: development of xanthogranuloma in a boy at puberty under long-term low-density lipoprotein apheresis and drug therapy. **Br J Dermatol.** 2003;149:1302-1303.
 19. Nagaya N, Kangawa K, Kanda M,

- Uematsu M, Horio T, Fukuyama N, Hino J, Harada-Shiba M, Okumura H, Tabata Y, Mochizuki N, Chiba Y, Nishioka K, Miyatake K, Asahara T, Hara H, Mori H. Hybrid cell-gene therapy for pulmonary hypertension based on phagocytosing action of endothelial progenitor cells. **Circulation**. 2003;108:889-895.
20. Makino H, Harada-Shiba M. Long-term effect of low-density lipoprotein apheresis in patients with homozygous familial hypercholesterolemia. **Therap Apher Dial**. 2003;7:397-401.
21. Harada-Shiba M, Takagi A, Miyamoto Y, Tsushima M, Ikeda Y, Yokoyama S, Yamamoto A. Clinical features and genetic analysis of autosomal recessive hypercholesterolemia. **J Clin Endocrinol Metab**. 2003;88:2541-2547.
22. J. Yamashita, S.I. Nishikawa. Embryonic stem cell-derived endothelial cells. **Methods in Endothelial Cell Biology**. Springer-Verlag GmbH, Berlin, New York, Tokyo. *in press*.
23. T. Watabe, A. Nishihara, K. Mishima, J. Yamashita, K. Shimizu, K. Miyazawa, S.I. Nishikawa, K. Miyazono. TGF- β receptor kinase inhibitor enhances growth and integrity of embryonic stem cell-derived endothelial cell. **J. Cell. Biol.** *in press*.
24. M. Fujita, Y. Nakao, S. Matsunaga, M. Seiki, Y. Itoh, J. Yamashita, R.W.M. van Soest, N. Fusetani. Ageladine A: An anti-angiogenic matrixmetalloproteinase inhibitor from the marine sponge *Agelas nakamurai*. **J. Am. Chem. Soc.** *in press*.
25. M. Sone, H. Itoh, J. Yamashita, T. Yurugi-Kobayashi, Y. Suzuki, Y. Kondo, A. Nonoguchi, N. Sawada, K. Yamahara, K. Miyashita, K. Park, S. Nito, M. Shibuya, S.I. Nishikawa, K. Nakao. Different differentiation kinetics of vascular progenitor cells in primate and mouse embryonic stem cells. **Circulation** 107: 2085-2088, 2003.
26. T. Yurugi-Kobayashi, H. Itoh, J. Yamashita, K. Yamahara, H. Hirai, T. Kobayashi, M. Ogawa, S. Nishikawa, S.I. Nishikawa, K. Nakao. Effective contribution of transplanted vascular progenitor cells derived from embryonic stem cells to adult neovascularization in proper differentiation stage. **Blood** 101: 2675-2678, 2003.
27. K. Yamahara, H. Itoh, T.H. Chun, Y. Ogawa, J. Yamashita, N. Sawada, Y. Fukunaga, M. Sone, T. Yurugi-Kobayashi, K. Miyashita, H. Tsujimoto, H. Kook, R. Feil, D.L. Garbers, F. Hofmann, K. Nakao. Significance and therapeutic potential of the natriuretic peptides/cGMP/cGMP-dependent protein kinase pathway in vascular regeneration. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**. 100: 3404-3409, 2003.
28. 山下 潤. 「ヒト ES 細胞の樹立・分化研究と再生医療応用」 **病理と臨床**, 21: 698-702, 2003.

29. 山下 潤. 総説「幹細胞・ES細胞-血管」
再生医療, 2: 111-119, 2003. 日本再生医療学会
30. 山下 潤. 「ヒトES細胞と再生医療」血液・免疫・腫瘍, 8: 19-26, 2003. メディカルレビュー社
31. H. Kook et al: Physiological concentration of atrial natriuretic peptide induces endothelial regeneration in vitro. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 284: H1388-1397, 2003.
32. K. Masatsugu et al: Shear stress attenuates endothelin and endothelin converting enzyme expression through oxidative stress. *Regulatory Peptides* 111: 13-19, 2003.
33. K. Miyashita et al: Adrenomedullin promotes proliferation and migration of cultured endothelial cells. *Hypertens. Res.* 26: S93-S98, 2003.
34. T-H. Chun et al: Modification of GATA-2 transcriptional activity in endothelial cells by the SUMO E3 ligase PIASy. *Circ. Res.* 92: 1201-1208, 2003.
35. K. Miyashita et al: Adrenomedullin provokes endothelial Akt activation and promotes vascular regeneration both in vitro and in vivo. *FEBS Lett.* 544: 86-92, 2003.
- G-2. 学会発表
1. Yasuhide Nakayama, Shogo Nishi, Hatsue Ishibashi-Ueda, Development of novel drug-eluting covered stents with combination of micropores and differential coating of heparin and FK506, *Cardiovascular Radiation Therapy 2003* (Washington DC, Hilton Hotel), 2003年1月27日
 2. Shogo Nishi, Yasuhide Nakayama, Hatsue Ishibashi-Ueda, Takehisa Matsuda, A heparin loaded stent graft with micropores: Embolization of experimental carotid aneurysms, *Cardiovascular Radiation Therapy 2003* (Washington DC, Hilton Hotel), 2003年1月27日
 3. 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
 4. 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
 5. 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
 6. 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
 7. Hatsue Ishibashi-Ueda, Yasuhide Nakayama, Shogo 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, (Circulation Journal, 67 Suppl. I, 353, 2003)
8. 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)
 9. Yoritaka Ohtsuka, Satoshi Yasuda, Norihiko Kotooka, Yasuhide Asami, Hiriyuki Okumura, Yasuhide Nakayama, Hitoshi Nonogi, Local delivery of low-doseONO-4817; a broad-spectrum matrix metalloproteinase inhibitor, reduces neointimal hyperplasia coupled with decreased collagen deposition, 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)
 10. 大屋章二、木戸秋悟、松田武久、中山泰秀、人工細胞外マトリックス材料の表面ナノ構造・物性解析、第 52 回高分子学会年次大会 (名古屋国際会議場) 2003 年 5 月 28 日-30 日
 11. 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：ナノ表面化学設計は 3 次元組織構造構築を決定するか、第 52 回高分子学会年次大会 (名古屋国際会議場) 2003 年 5 月 28 日-30 日
 12. 根本泰、巽 英介、中山泰秀、水野敏秀、妙中義之、再生医療用スキャホールド材、器質化材料の開発：ハイブリッド型人工臓器、皮下刺入管カフ材への応用、第 52 回高分子学会年次大会 (名古屋国際会議場) 2003 年 5 月 28 日-30 日
 13. 林 美智子、高木由美、内田欣吾、斯波真理子、大平望都、中山泰秀、可逆的カチオン発生型水溶性高分子による遺伝子ベクターの機能化：ポリイオンコンプレックス形成に及ぼす分子鎖長と置換基の影響、第 52 回高分子学会年次大会 (名古屋国際会議場) 2003 年 5 月 28 日-30 日
 14. 亀尾崇宏、長石 誠、西村 学、平野義明、中山泰秀、エレクトロドナー型親水性高分子の合成と再結合による光ゲル形成、第 52 回高分子学会年次大会 (名古屋国際会議場) 2003 年 5 月 28 日-30 日
 15. 長石 誠、斯波真理子、大平望都、平野義明、中山泰秀、多分岐型カチオン性高分子の構造設計と遺伝子ベクターへの応用、第 52 回高分子学会年次大会 (名古屋国際会議場) 2003 年 5 月 28 日-30 日
 16. 西村 学、川田 徹、森内隆代、中山敦好、中山泰秀、光硬化性生体絶縁材の開発、第 52 回高分子学会年次大会 (名古屋国際会議場) 2003 年 5 月 28 日-30 日
 17. 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、組織工学を利用した三次元心筋作成の試み、第 19 回日本医工学治療学会学術大会 (札幌) 2003 年 5 月 16 日-18 日
 18. 水野敏秀、巽 英介、根本 泰、中山泰秀、北村惣一郎、高野久輝、妙中義之、埋め込み型人工心臓システム使用時にお

- ける感染防御に有用な新規被覆材の検討、
エム・イー学会（札幌コンベンション
センター）2003年6月3日-5日
19. 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、感温硬化性細胞外
マトリックスを用いた三次元心筋組織作
製、エム・イー学会（札幌コンベンシ
ョンセンター）2003年6月3日-5日
20. Naito H, Takewa Y, Mizuno T, Ohya S,
Nakayama Y, Tatsumi E, Kitamura S,
Takano Y, Taenaka Y, Three-
dimensional cardiac tissue
engineering using a thermoresponsive
artificial extracellular matrix, **ASAIO
2003** (Washington DC) 2003年6月
19日-23日
21. 中山泰秀、長石 誠、平野義明、大平望
都、斯波真理子、遺伝子導入ベクターの
幾何学設計：スター型カチオン性高分子
の精密分子設計と遺伝子発現、第19回
日本 DDS 学会大会（京都国際会議場）
2003年6月19、20日
22. Shogo Nishi, Yasuhide Nakayama,
Hatsue Ishibashi-Ueda, Development
of drug-eluting stent graft with
micropores (Heparin and FK506),
**ESAO2003 XXXth Annual
Congress** (Aachen, Germany)2003年
9月3日-6日
23. Yasuhide Nakayama, Shogo Nishi,
Hatsue Ishibashi-Ueda, geometrical
design of luminal surface for
microporous covered stents,
**ESAO2003 XXXth Annual
Congress** (Aachen, Germany)2003年
9月3日-6日
24. Michiko Hayashi, Yasuhide Nakayama,
Yumi Takagi, Mariko Umeda, Kingo
Uchida, Mariko Shiba, Moto Ohira,
High performance gene delivery
polymeric vector: molecular design of
photo-cation generatable water-
soluble polymers, **ESAO2003 XXXth
Annual Congress** (Aachen,
Germany)2003年9月3日-6日
25. Makoto Nagaishi, Yasuhide Nakayama,
Mariko Shiba, Moto Ohira, Yoshiakin
Hirano, High performance gene
delivery polymeric vector: Nano-
structured hyperbranched cationic
polymers, **ESAO2003 XXXth
Annual Congress** (Aachen,
Germany)2003年9月3日-6日
26. Naito H, Takewa Y, Mizuno T, Ohya S,
Nakayama Y, Tasumi E, Kitamura S,
Takano H, Taenaka Y, A
thermoresponsive gelatin with
hyaluronic acid: in vitro engineering
of three-dimensional cardiac tissue,
**ESAO 2003 XXXth Annual
Congress** (Aachen, Germany)2003年
9月3日-6日
27. 安田 聡、宮崎俊一、中山泰秀、野口輝
夫、大塚頼隆、松田武久、野々木宏、循
環器系領域における治療機器の臨床、現
在と将来：進歩する冠動脈インターベシ
ョン：より多機能なデバイスの開発、第
17回日本エム・イー学会秋季大会、京
都2003年10月20-22日
28. 西 正吾、中山泰秀、植田初江、松田武
久、実験的動脈瘤に対する Stent Graft
の応用-微細孔とヘパリン付与の工夫、第
32回日本神経放射線学会、筑波2003

- 年 2 月 26-28 日
29. 西 正吾、中山泰秀、植田初江、森 久恵、湯川弘之、FK506、ヘパリンを付与した Stent graft (DESG)の開発-急性期血栓症と中長期再狭窄予防を目指して、第 19 回日本脳神経血管内治療学会、2003 年 11 月 17-19 日
 30. 神田圭一、中山泰秀、伊藤 裕、山下潤、斉藤裕子、万木貴美、根本泰、北村信夫、実験ツールとしての ES 細胞組み込み型小口径人工血管モデル-生体内 Hemodynamic Stress 下での ES 細胞の動態観察-、第 41 回日本人工臓器学会大会、仙台 2003 年 10 月 30-31 日
 31. 神田圭一、斉藤祐子、万木貴美、中山泰秀、伊藤 裕、山下 潤、根本 泰、北村信夫、未分化 ES 細胞を導入した新しいハイブリッド型超小口径人工血管モデルの開発、第 56 回日本胸部外科学会総会、東京 2004 年 11 月 19-21 日
 32. 舛田 健、中山泰秀、再狭窄防止を目的とした MMPI ポリマーのステントコーティング剤としての有用性、第 25 回バイオマテリアル学会、大阪 2003 年 12 月 16、17 日
 33. 亀尾崇宏、大高 敦、西田真美、平野義明、中山泰秀、組織工学用マトリックス材料の設計：再結合を利用した光感受性低侵襲性光ゲル形成、第 25 回バイオマテリアル学会、大阪 2003 年 12 月 16、17 日
 34. 鎌田なぎさ、大高 敦、川田 徹、砂川賢二、中山敦好、中山泰秀、神経電極固定剤の開発、光硬化性ポリエステルマクロマーの物性と *in vivo* 評価、第 25 回バイオマテリアル学会、大阪 2003 年 12 月 16、17 日
 35. 神田圭一、中山泰秀、伊藤 裕、山下 潤、西田真美、根本 泰、夜久 均、北村信夫、ES 細胞を組み込んだハイブリッド型人工血管モデル、Hemodynamic Stress による分化誘導-第 34 回日本心臓血管外科学会学術総会、福岡 2004 年 2 月 18-20 日
 36. 神田圭一、中山泰秀、伊藤 裕、山下 潤、根本 泰、西田真美、夜久 均、ES 細胞の生体内 Hemodynamic Stress における動態を観察するためのハイブリッド型人工血管モデルの開発、第 3 回再生医療学会、幕張メッセ 2004 年 3 月 23-25 日
 37. 内田欣吾、並川 敬、斉藤全亮、林 美智子、中山泰秀、長い共役鎖を持つジアリールエテンの金表面上でのフォトクロミック反応、第 84 回日本化学会春期年会、関西学院大学 2004 年 3 月 26-28 日
 38. 中山泰秀、血液界面代替デバイスの開発、第 8 回次世代医療システム産業化フォーラム、大阪 2004 年 2 月 13 日
 39. 中山泰秀、遺伝子導入の時間・空間・量を厳密に制御できる次世代型ベクターの分子設計と遺伝子導入デバイスの総合開発、ヒューマンサイエンス振興財団講演会、東京 2004 年 3 月 5 日
 40. 中山泰秀、分子ナノアーキテクチャー技術を用いた遺伝子導入ベクターの開発、第 3 回バイオシグナルの統合と治療応用に関する研究会、大阪 2004 年 3 月 19 日
 41. Harada-Shiba M, Makino H, Takamisawa I, Hiuge A, Yoshimasa Y, Yamamoto A: Long term effect of LDL-apheresis on Homozygous FH. The 4th World Congress of International Symposium for

- Apheresis (Nashville), ワークショップ
42. Harada-Shiba M, Takagi A, Abe E, Ohira M, Miyamoto Y, Ikeda Y, Asada Y, Yokoyama S: Analysis of autosomal recessive hypercholesterolemia (ARH) knockout mouse. 第13回国際動脈硬化学会 (京都)、一般演題
 43. Abe E, Ohira M, Miyamoto Y, Asada Y, Harada-Shiba M: Regulatory mechanism of autosomal recessive hypercholesterolemia (ARH) protein expression. 第13回国際動脈硬化学会 (京都)、一般演題
 44. Harada-Shiba M, Takagi A, Miyamoto Y, Tsushima M, Ikeda Y, Yokoyama S, Yamamoto A: Clinical Features and Genetic Analysis of Autosomal Recessive Hypercholesterolemia. 第13回国際動脈硬化学会 (京都)、一般演題
 45. 斯波真理子、高木敦子、安部映里、大平望都、宮本恵宏、池田康行、浅田祐士郎、横山信治: Autosomal Recessive Hypercholesterolemia (ARH)ノックアウトマウスの解析、日本動脈硬化学会第36回総会 (京都)、一般演題
 46. 安部映里、大平望都、宮本恵宏、浅田祐士郎、斯波真理子: Autosomal Recessive Hypercholesterolemia (ARH)蛋白質合成制御機構の検討、日本動脈硬化学会第36回総会 (京都)、一般演題
 47. 高見澤格、大平望都、安部映里、浅田祐士郎、斯波真理子: 高脂血症に対する気管内投与による遺伝子治療の試み、第36回日本動脈硬化学会総会 (京都)、一般演題
 48. Yamashita J.: Vascular development in ES cell differentiation system. **Endothelome Conference 2003** (2003.2.22 小樽)
 49. Yamashita J.: Cardiovascular development in ES cell in vitro differentiation system. **Aso International Meeting** (2003.5.16 熊本)
 50. 山下潤: ES細胞を用いた心血管分化研究、**Cardiovascular Science** 研究会 (2003.6.13 東京)
 51. 山下潤: ES細胞を用いた血管の分化多様化機構の解析と血管再生、**動脈硬化 update 2003** (2003.6.14 東京)
 52. Yamashita J.: ES cell in vitro differentiation system for cardiovascular development. **Korea-Japan Joint Symposium on Vascular Biology** (2003.8.21-23, Chuncheon, Korea)
 53. Yamashita J., Nishikawa SI.: Cardiovascular development in ES cell in vitro differentiation system using Flk1-positive mesodermal progenitors. **13th International Symposium on Atherosclerosis** (poster) (2003.9.28-10.2 京都)
 54. 山下潤: ES細胞を用いた心血管分化誘導と心血管再生への応用の可能性、第9回日本胎児心臓病研究会 (特別講演) (2003.2.15 兵庫県東浦町)
 55. 山下潤: ES細胞 in vitro 分化系を用いた血管発生機構の解析、**東北大学加齢医学研究所シンポジウム** (2003.2.19 仙台)
 56. 山下潤: ES細胞と心血管再生、第2回

- 日本再生医療学会シンポジウム「心筋再生の現況と将来」(2003.3.11 神戸)
57. 山下 潤: ES細胞を用いた心血管分化誘導と再生医療、第6回日本組織工学会シンポジウム「循環器の再生医療」(2003.6.13 東京)
58. 山下 潤: ES細胞による心血管再生の可能性、新潟ポータル心臓フォーラム(特別講演)(2003.7.12 新潟)
59. 山下 潤: ES細胞を用いた血管分化・多様化システムと血管再生、第51回日本心臓病学会パネルディスカッション「血管新生治療における遺伝子治療と細胞治療:現状と未来」(2003.9.9 東京)
60. 山下 潤: ES細胞における血管前駆細胞の分化・多様化と血管新生の機構、第35回日本動脈硬化学会シンポジウム(2003.9.27 京都)
61. 山下 潤: ES細胞分化系による血管細胞分化・多様化メカニズムの解析、第24回日本炎症・再生学会シンポジウム「炎症と再生の接点-血管新生-」(2003.11.27 京都)
62. A. Nakayama, N. Yamano, N. Yamamoto, N. Kawasaki, and S. Aiba, Factors affecting biodegradation of polyesters in soil, **Kyoto International Symposium on Biodegradable Polymers (KISBP 2003)** (H15:11)
63. H. Itoh: Embryonic stem (ES) cells and vascular regeneration medicine. **2003年韓国動脈硬化学会秋季学術大会シンポジウム** 2003.9.26-27 (Seoul, Korea)
64. H. Itoh: Significance of endothelium-derived vasorelaxing peptides, C-type natriuretic peptide (CNP) and adrenomedullin (AM) in vascular protection and regeneration for translational application. **XIII International Symposium on Atherosclerosis**. 2003.9.28-10.2 (Kyoto, Japan)
65. K. Miyashita et al: Adrenomedullin provokes endothelial Akt activation and promotes vascular regeneration both in vitro and in vivo. **XIII International Symposium on Atherosclerosis**. 2003.9.28-10.2 (Kyoto, Japan)
66. K. Yamahara et al: Contribution of embryonic stem (ES) cell-derived vascular progenitor cells (VPC) to neovascularization in murine hindlimb ischemia model. **XIII International Symposium on Atherosclerosis**. 2003.9.28-10.2 (Kyoto, Japan)
67. K. Yamahara et al: Significance and therapeutic potential of natriuretic peptides (NPs)/cGMP/cGMP-dependent protein kinase (cGK) pathway in vascular regeneration. **XIII International Symposium on Atherosclerosis**. 2003.9.28-10.2 (Kyoto, Japan)
68. M. Sone et al: Identification of 'vascular progenitor cells' from primate embryonic stem cells. **XIII International Symposium on Atherosclerosis**. 2003.9.28-10.2 (Kyoto, Japan)
69. T. Yurugi-Kobayashi et al: Proper

differentiation stage of embryonic stem (ES) cell-derived vascular progenitor cells (VPCs) for vascular regeneration therapy. **XIII**

International Symposium on Atherosclerosis. 2003.9.28-10.2 (Kyoto, Japan)

70. K. Yamahara et al: Contribution of embryonic stem (ES) cell-derived vascular progenitor cells (VPC) to neovascularization in murine hindlimb ischemia. **American Heart Association Scientific Sessions 2003**. 2003.11.9-12 (Orlando, USA)
71. M. Sone et al: Identification of vascular progenitor cells from primate embryonic stem cells. **American Heart Association Scientific Sessions 2003**. 2003.11.9-12 (Orlando, USA)

G-3.新聞報道

なし

H.知的所有権の取得状況

- 人工血管、発明者：中山泰秀、林 美智子、高見沢計一、植田初江、出願日：平成15年2月28日、出願番号：特願2003-052512、国立循環器病センター、(株)ブリヂストン
- ステント、発明者：中山泰秀、西 正吾、根本泰、出願日：平成15年4月14日、出願番号：特願2003-109168、国立循環器病センター、(株)ブリヂストン
- ステントの製造方法、発明者：中山泰秀、西 正吾、根本泰、出願日：平成15年4月14日、出願番号：特願2003-109169、国立循環器病センター、(株)ブリヂストン
- ステントの製造方法、発明者：中山泰秀、西 正吾、根本 泰、出願日：平成15年4月14日、出願番号：特願2003-109167、国立循環器病センター、(株)ブリヂストン
- ベクター、中山泰秀、長石 誠、斯波真理子、出願日：平成15年4月18日、出願番号：特願2003-114541、国立循環器病センター、(株)ブリヂストン
- ステントの製造方法及びステント、岡本吉弘、中山泰秀、西 正吾、出願日：平成15年6月16日、出願番号：特願2003-169510、国立循環器病センター、(株)ブリヂストン
- 核酸複合体及びその製造方法、中山泰秀、大高 敦、根本 泰、出願日：平成15年7月4日、出願番号：特願2003-192140、国立循環器病センター、(株)ブリヂストン
- ステント、中山泰秀、西 正吾、根本 泰、出願日：平成15年7月24日、出願番号：特願2003-201201、国立循環器病センター、(株)ブリヂストン
- ステント、中山泰秀、西 正吾、出願日：平成15年7月25日、出願番号：特願2003-201836、国立循環器病センター、(株)ブリヂストン
- ステント、中山泰秀、西 正吾、根本 泰、出願日：平成15年8月15日、特願番号：2003-286901、国立循環器病センター、(株)ブリヂストン
- 光硬化性生体吸収材料、中山敦好、中山泰秀、西村 学、鎌田なぎさ、大高 敦、川田 徹、砂川賢二、出願日：平成15年11月7日、特願2003-379012、国

立循環器病センター、(独)産業技術総合
研究所

12. 筋肉注射による遺伝子治療の効果を増強
する方法、斯波真理子、特許出願準備中
13. 霊長類動物胚性幹細胞から血管系細胞へ
の分化方法、伊藤 裕、米国特許出願(平
成16年2月27日)
14. 内皮細胞分化増殖方法、伊藤 裕、特願
2004-25631

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

高効率遺伝子導入ベクターの開発に関する研究1：
ブロック鎖を有するスター型高分子遺伝子導入ベクターの開発

分担研究者：中山泰秀（国立循環器病センター研究所 室長）

研究要旨

前年度、新しい遺伝子キャリアーとして、スター型に分岐した構造を有するカチオン性高分子を開発した。本年度では4分岐鎖のスター型高分子について、鎖のブロック化を検討した。カチオン性ブロック鎖の外層に非イオン性ブロック鎖を導入することによって、ポリプレックスの溶液安定化による高発現化を目指した。*N,N*-Diethyldithiocarbamyl (DC) 基を4個有するベンゼン誘導体 (1,2,4,5-Tetrakis(*N,N*-diethyldithiocarbamylmethyl)-benzene) に DMAPAAm 溶液中で紫外光照射すると、各 DC 基からリビング重合が起こった。溶液濃度を調節することで、末端に DC 基を有する DMAPAAm 鎖が導入された3種類の4分岐カチオン性高分子 (M_n : ca. 1.0、1.8、 5.0×10^4) が得られた。次いで、DMAAm 溶液中で再度光リビング重合させると、Poly(DMAAm)鎖 (M_n : ca. $1.0 \times 10^3 \sim 3.3 \times 10^4$) がブロック化された。内層にカチオン性ブロック鎖、外層に非イオン性で親水性のブロック鎖を有する4分岐ブロック化高分子が合成できた。得られたブロック化高分子は、C/A (カチオン/アニオン) 比が1以上で錯形成し、ポリプレックス粒子 (粒径: 150 nm~200 nm) を生成した。ブロック前の4分岐カチオン性高分子では、分子量の増大に伴って発現効率は高くなった。高分子量体 (M_n : ca. 5.0×10^4) の場合、遺伝子キャリアーとして市販されている Poly(ethyleneimine) (PEI) の約2倍の発現効率を示した。一方、ブロック化させると、発現効率は高分子量体からのブロック体ではほとんど変化なかったが、低分子量体 (M_n : ca. 1.0×10^4) からのものでは、大幅な増加を認めた。これは細胞内での DNA の放出能が向上したためと考えられる。増加量は、非イオン性鎖の分子量の増加に伴って大きくなり、 M_n : ca. 1.6×10^4 の非イオン性鎖をグラフトすると、ブロック前の約3倍となった。さらに、ポリプレックスの溶液安定性も増し、1日放置後の残存活性は、PEI: ブロック前: ブロック後=約 0: 40: 100 (%) であった。溶液中でのポリプレックスの凝集が阻害されたためと考えられる。従って、非イオン性のブロック鎖を導入することによって、合成ベクターの遺伝子発現能を大幅に向上させることを可能とした。

研究協力者 笥 千聡
龍谷大学理工学部

林 美智子
国立循環器病センター研究所
生体工学部

舛田 健
国立循環器病センター研究所
生体工学部

斯波真理子
国立循環器病センター研究所
バイオサイエンス部

大平望都
国立循環器病センター研究所
バイオサイエンス部

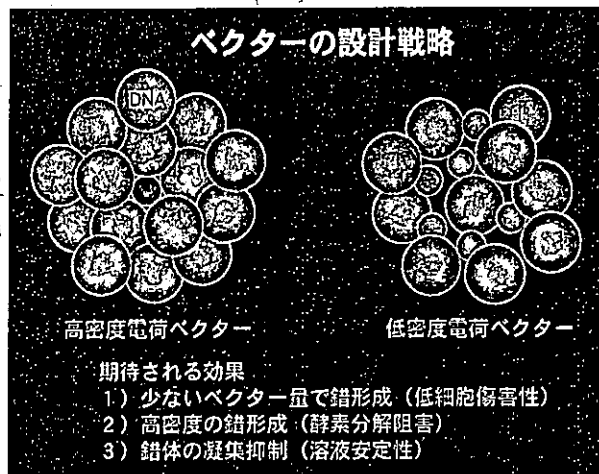


図1. 高発現化のためのベクターの設計

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、それを運搬するベクターとの複合体として構成されている。これまで多くの遺伝子治療は臨床主導で進められてきており、その際ベ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ベクターが使用されてきた。ウイルス系のベ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、ウイルス系のベクターに代わる、次世代型のベ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、これがベクターとして利用されている。このベクターは通常、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、合成高分子系のベクターが広く臨床応用される大きな障害となっている。

我々は、ベクターの遺伝子発現の高効率化を獲得するための戦略として、ベクター電荷の高密度化を提案している (図1)。ベクターの電荷密度を高くできれば、1) 少ない量

のベクターで DNA と錯体形成することが可能となるため、カチオン性高分子が細胞に与える傷害性を低減でき、2) 高密度の錯体が形成されることで、酵素からの分解を阻害でき、3) 形成された錯体の凝集が抑制されることで、溶液安定性が向上すること、などが期待された。そこで昨年度、ベクターの電荷を高密度化させる分子設計として、分岐構造を有するスター型カチオン性高分子を設計した。合成はイニファタ (1 分子で重合開始剤、連鎖移動剤、停止剤の 3 種類の機能を有する化合物) によるリビングラジカル重合法を用いることによって、低い分散度を保ちながら、分子量を厳密に調整しながら重合によって行った。その中で、分子量を約 15000 にそろえたスター型高分子間において遺伝子発現量の比較を行い、分岐数の増加に伴って段階的に発現効率が增加することなど、極めて興味深い知見を得た。

一方、カチオン性高分子とポリアニオンである DNA の静電相互作用によって形成されるポリイオンコンプレックス、つまりポリプレックスは、溶液状態で放置しておく、静電引力によってポリプレックス同士が徐々に凝集する性質を有している。分岐構造化によって大幅に凝集を阻害することができたが、一般に、市販されている代表的なカチオン性高分子ベクターである PEI (商品名: Exgen500) は、ポリプレックス形成後、すみやかに凝集し始めるため、数時間程で発現量はほとんど消失する。

本年度の研究では、ポリプレックスの溶液内でのさらなる安定性を獲得するために、ポリプレックスの表面を非イオン性親水性高分子で覆うことを考えた。この目的のために、昨年度合成したスター型カチオン性高分子の各分岐鎖の末端に非イオン性親水性鎖を導入

することを検討した。具体的には、分岐しているカチオン高分子を合成した後に続けて非イオン性モノマーを重合することで、分岐鎖のブロック化を行った。

DMAPAAm の Dimethylamino 基は強い塩基性 ($pK_a=10.35$) を示し、中性の水溶液中では容易にプロトン付加が起こってカチオンを生成する。従って、水溶液中で DNA のリン酸基由来のアニオンと容易に静電相互作用を起こし、ポリプレックスを形成する。また、非イオン性、親水性の双方の性質を有する DMAAm を導入すると、高分子のカチオン数はそのまま、非イオン的な水溶性が付与され、凝集、沈殿を防ぐことができると期待される。さらに付加的な効果として、ポリプレックス表面が非イオン性高分子鎖で覆われるため、ポリプレックスに内在する DNA を剥き出しで存在させず、酵素の DNA との接触を妨げることができ、酵素分解を阻害できることが期待される。また、Poly(DMAPAAm) のカチオンによりベクター表層付近は正に帯電しているため、負に帯電している細胞表面に静電吸着した後、ポリプレックスがエンドサイトーシスにて細胞内へ取り込まれ、細胞内に入ったコンプレックスはエンドソームのリソソームへの膜融合によってリソソーム内に取り込まれた後、Poly(DMAPAAm-*b*-DMAAm) の中性化が起こり、コンプレックスから速やかに DNA を放出することが期待される。

本研究では、これまで合成したスター型高分子の中で、合成時に用いる溶媒や発現能を考慮して 4 分岐型カチオン性高分子を基本骨格に選択した。これに、非イオン性かつ親水性である DMAAm をグラフト重合とすることで、分岐鎖のブロック化を行い、ポリプレックスの溶液安定化によるさらなる高発現化を目指した。

B. 研究方法

B.1 試薬

Sodium *N,N*-diethyldithiocarbamate trihydrate、DMAAm は和光純薬工業株式会社（大阪）より購入した。1,2,4,5-Tetrakis(bromomethyl)benzene は Aldrich より購入した。DMAPAAm は東京化成工業（東京）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（京都）より購入した。使用に際して DMAPAAm、DMAAm は減圧蒸留精製を行い、その他の試薬はそのまま使用した。DNA は、Luciferase をコードする pGL3-control plasmide を用いた。

B.2 1,2,4,5-Tetrakis(*N,N*-diethyl-dithiocarbamylmethyl)benzene の合成

Sodium *N,N*-diethyldithiocarbamate trihydrate (6.00 g, 26.63 mmol, Mw. 225.31) を Ethanol (50 mL) に溶解し、1,2,4,5-Tetrakis(bromomethyl)benzene (1.00 g, 2.22 mmol, Mw. 449.83) を懸濁し加え、遮光下、室温にて 5 日間攪拌した。この溶液を濾過して沈殿物を回収した。この沈殿物を Chloroform (40 mL) に溶解して分液操作（水：20 mL×1）にて洗浄を 3 回行った。有機層を無水 MgSO₄ で乾燥後、濾過、濃縮した。デシケータ中で真空乾燥させると目的とする白色固体の 1,2,4,5-Tetrakis(*N,N*-diethyldithiocarbamyl)benzene を得た（収量：1.29 g, 収率：80.32%）。¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 7.48 ppm (s, 2H, Ar-H), δ 4.57 ppm (s, 8H, Ar-CH₂S), δ 4.06~3.99 ppm (q, 8H, -N-CH₂-), δ 3.75~3.69 ppm (q, 8H, -N-CH₂-), δ 1.30~1.26 ppm (t, 24H, -CH₂-CH₃)

B.3 4 分岐型 Poly(DMAPAAm) の合成

典型例を示す。1,2,4,5-Tetrakis(*N,N*-diethyldithiocarbamyl)benzene (18.08 mg, 0.0249 mmol, Fw. 723.30) を Chloroform (400 μL) に溶解し、DMAPAAm (1.062 g, 6.8 mmol, Mw. 156.23) に加えた。この混合溶液を Methanol で希釈し、全量を 20 mL に調整した。紫外光照射前に 5 分間、N₂ ガスを溶液内へ吹き込み溶存酸素を除去した後、N₂ ガスをバブリングしながら紫外光を 30 分間照射した。生成した反応溶液の溶媒をエバポレータで留去し、残渣を Ether (400 mL) 中に滴下することで反応生成物を析出させた。攪拌を続けると、ガラス壁面に付着し、オイル状になった。溶液をデカンテーションにより取り除き、オイル状物質を水に溶解して凍結乾燥し、目的とする 4 分岐型 Poly(DMAPAAm) を白色固体として得た。（収量：0.222 mg, 転換率：19.4%） Mn = ca. 10000 (GPC), ¹H-NMR (300 MHz, D₂O): δ 3.00 ppm (-NH-CH₂-), δ 2.20 ppm (-CH₂-N(CH₃)₂), δ 2.04 ppm (N-(CH₃)₂), δ 1.52 ppm (-CH₂-CH-, -CH₂-CH₂-CH₂-) 他の分子量の異なるものは、結果と考察中の表 3-1 に従って同様に合成した。

B.4 4 分岐型 Poly(DMAPAAm-*b*-DMAAm) の合成

典型例を示す。DMAAm (247.7 mg, 0.0025 mol) に先に合成した Poly(DMAPAAm) (62.5 mg, 0.00625 mmol, Mn=ca. 10000) を加え Methanol で希釈し、全量を 5 mL に調整した。紫外光照射前に 5 分間、N₂ ガスを溶液内へ吹き込み溶存酸素を除去した後、N₂ ガスをバブリングしながら紫外光を 30 分間照射した。生成した反応溶液の溶媒をエバポレータで留去し、残渣を Ether (400 mL) 中に滴下することで反応生成物を析出させた。溶液をデカンテーションにより取り除き、沈殿物を水に溶解

して凍結乾燥し、目的とする 4 分岐型 Poly(DMAPAAm-*b*-DMAAm) を白色固体として得た。(収量: 84.4 mg, 転換率: 3.8%) Mn = 18238, ¹H-NMR (300 MHz, D₂O): δ 3.00 ppm (-NH-CH₂-), δ 2.91~2.79 ppm (-CO-N(CH₃)₂), δ 2.25 ppm (-CH₂-N(CH₃)₂), δ 2.10 ppm (-CH₂-N-(CH₃)₂), δ 1.56 ppm (-CH₂-CH-, -CH₂-CH₂-CH₂-) 他の分子量の異なるものは、結果と考察中の表 3-2~表 3-6 に示す合成条件に従って同様に合成した。

B.5 ポリプレックス形成の確認

DNA と Poly(DMAPAAm-*b*-DMAAm) とのポリプレックス形成能はアガロースゲル電気泳動によって調べた。方法を以下に示す。

DNA (25 ng, 5 μL (5 μg/mL)) に、Poly(DMAPAAm-*b*-DMAAm) (1.2~30 ng, C/A=0.2~5, 0.24~1.2 mg/mL) 溶液 (5 mL, pH7.4 10 mM Tris-HCl buffer) を加えた。10 分間室温にてインキュベーションした後、Loading buffer (2 mL) を加え、その混合溶液から 10 μL をアガロースゲル (ゲル濃度: 1%) のスロットへ導入した。TAE buffer 中にて 100 V の電圧下で電気泳動を行い、ゲルを EtBr (10 mg/mL) にて染色後写真撮影を行った。DNA のバンドの消失によって、ポリプレックスが形成されていると判断した。

B.6 ポリプレックスの粒径測定

典型例を示す。Poly(DMAPAAm-*b*-DMAAm) (29.98 mg, Mn=12700) を含む Tris-HCl Buffer (1 mL, pH7.4) から 20 μL を分取し、Tris-HCl Buffer (1080 μL) で希

表2-1 コンプレックスの仕込量

サンプル	分子比 (Mn) Poly(DMAPAAm)/Poly(DMAAm)	採取した高分子量 (mg/mL)
1	10000 / 2700	29.98
2	10000 / 4727	34.76
3	50000 / 5626	24.34
4	50000 / 15368	28.60
5	50000 / 32768	36.22

pGL3-control plasmide : 46 μg 分散液量 : 2 mL

釈した。この希釈溶液と DNA 溶液 (920 μL, 50 μg/mL) と混合し、全量を 2 mL とした。37°C 恒温槽内において分散液の DLS 測定を行った。分子量の異なる他の Poly(DMAPAAm-*b*-DMAAm) は、表 2-1 に示す量と同様に行った。

B.7 トランスフェクション実験

前日に COS-1 細胞を播種した 24 well-plate の培地をアスピレーターで取り除き、各 well を PBS (1 mL) で洗浄後、OPTI-MEM (200 μL) を加えた。1 well 当たり 25 μL のポリプレックス溶液を添加し、37 °C, 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 (1 mL) で洗浄した後、1 well 当たり 1 mL の MEM を加え、再度 37 °C, 5 %CO₂ インキュベータ内で培養した。2 日後、培地を除去し、PBS (1 mL) で洗浄した後、Luciferase cell culture lysis 5×Leagent を 1 well 当たり 200 μL 加え、静置させた。30 分後、細胞をマイクロチューブに移し、遠心分離した (4 °C, 15000 rpm, 1 min)。得られた上澄溶液から 5 μL ずつマイクロプレートに採取し、ルミノメータで Luciferase 活性を測定した。また、遠心後の上澄を 5 μL 採取し、Bio Rad (200 μL) で希釈後、蛋白量を測定した。遺伝子発現量は、蛋白質量あたりの Luciferase 活性量とした。

B.8 装置・測定

B.8.1 ^1H -NMR 測定

^1H -NMR 測定は NMR spectrometer (300 MHz, Genimi-300; Varian) にて行った。測定試料の溶媒には CDCl_3 (内部標準: TMS (0 ppm))、 D_2O を用いた。

B.8.2 紫外光照射

紫外光の光源には SPOT CURE (250 W, 高圧水銀灯, ウシオ電気株式会社, 東京) を用いた。反応は照射強度を Photo meter (UVR-1, TOPCON, 東京) を用いて、 $1 \text{ mW}/\text{cm}^2$ に調節して行った。

B.8.3 GPC 測定

分子量の測定は HLC-8020 (東ソー株式会社, 東京) にて測定した。カラムは Tosoh TSKgel a-3000 と a-5000 を直列につないで用いた (流量 $0.5 \text{ mg}/\text{mL}$, カラム温度 $40 \text{ }^\circ\text{C}$)。溶離液に DMF (30 mmol/L Lithium bromide を含む) を用い、検量線の設定には標準 Polyethylene glycol を使用した。測定は各試料 (10 mg) を含む DMF 溶液 (1 mL) を調製して行った。

B.8.4 DLS 測定

DLS の測定は、ELS-8000 (大塚電子株式会社, 大阪) で測定した。条件は次の通りである。光源: He-Ne レーザー (10 mW)、セル室温度: $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 。

B.8.5 凍結乾燥

凍結乾燥は、Freeze dryer (旭テクノグラフス, 千葉) を用いて行った。

CD. 研究結果と考察

CD.1 1,2,4,5-Tetrakis (N,N-diethyldithiocarbamylmethyl)-benzene の合成

1,2,4,5-Tetrakis(N,N-diethyldithiocarbamylmethyl)benzene の合成は図2の合成経路に従って行った。この反応はDCの-Sがプロモメチル基の炭素原子に対する求核付加することにより進行するが、原料も目的物も Ethanol に溶解しないことから、反応は固-液状態を経て進行すると考えられる。しかし、Chloroform には溶解するため、分液操作で過剰な Sodium N,N-dimethyldithiocarbamate trihydrate を容易に除去することが可能であり、他の副生成物を生成しないため、分液操作のみの簡単な操作によって十分精製できた。

化合物の同定は $^1\text{H-NMR}$ 測定 (溶媒: CDCl_3) にて行った (図3)。生成物には特徴的なピークが検出された。Sodium N,N-dimethyldithiocarbamate trihydrate の $-\text{N}-\text{CH}_2-$ の4つのメチレンプロトン (δ 3.98~3.91 ppm) は互いに等価な1種類のカルテットで現れるのに対して、生成物のメチレンプロトンは2種類の互いに等価でないメチレンプロトンであることを示す、2つのカルテット (δ

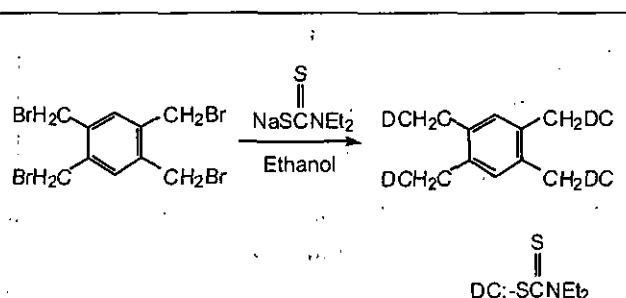


図2 1,2,4,5-Tetrakis(N,N-diethyldithiocarbamylmethyl)benzene の合成

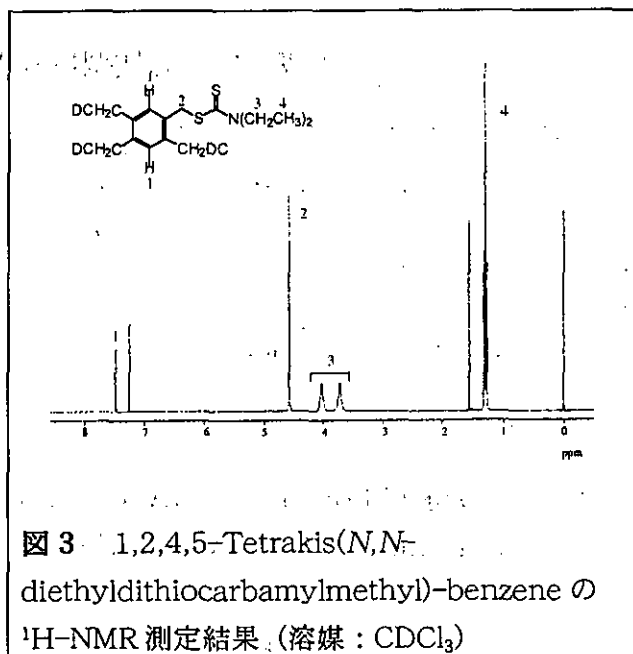


図3 1,2,4,5-Tetrakis(N,N-diethyldithiocarbamylmethyl)-benzene の $^1\text{H-NMR}$ 測定結果 (溶媒: CDCl_3)

4.06~3.99 ppm, δ 3.75~3.69 ppm) で現れた。これは DC 基に新しく $-\text{CH}_2-\text{S}-$ 結合が生成したことによって、この結合付近に存在する各原子の電子密度状態が変化し、その結果 $-\text{N}-\text{CH}_2-$ 結合間距離が短くなったため、隣接する $-\text{C}=\text{S}$ 基の大きな S-分子の影響をうけて $-\text{N}-\text{CH}_2-$ 結合間の自由回転が束縛を受けたためであると考えられる。

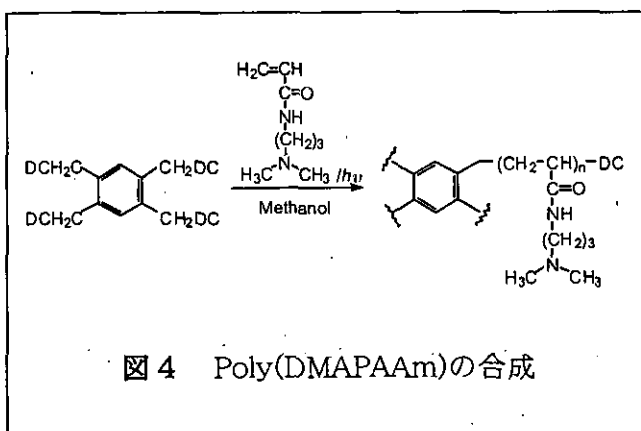


図4 Poly(DMAPAAm)の合成

表3-1 4分岐型Poly(DMAPAAm)の合成結果

No.	[Monomer] (M)	[DC] (mM)	Irradiation time (min)	Solvent	Min. ca.	Yield (g)	Conversion (%)
1	0.34	5	30	Methanol	10000	0.222	19.4
2	0.50	5	30	Methanol	18000	0.533	32.8
3	1.10	5	30	Methanol	50000	1.376	39.7

Monomer : DMAPAAm, Light intensity : 1 mW/cm²

CD.2 4分岐型 Poly(DMAPAAm)の合成

1,2,4,5-Tetrakis (N,N-diethyldithiocarbamylmethyl)benzeneからのDMAPAAmの重合体は図4の合成経路に従って行った。DMAPAAm と 1,2,4,5-Tetrakis (N,N-diethyldithiocarbamylmethyl)benzene を Methanol 溶液中において、紫外光照射により光ラジカルリビング重合を行った。

生成物の精製はまず、反応溶液の溶媒をエバポレータで留去した後、Ether 中にて残渣を滴下すると高分子が析出し、デカンテーションによって容易に Monomer である DMAPAAm を取り除くことができた。

この時高分子は、最初は白色固体として溶液中で浮遊しているが、時間経過とともに透明なオイル状化合物となって容器の底面や壁面に付着した。これは高分子の吸湿性が非常に強いためであると考えられる。析出した高分子は真空乾燥後、凍結乾燥を行って白色固体として得た。高分子の分子量測定は、GPC 測定より見積もった。

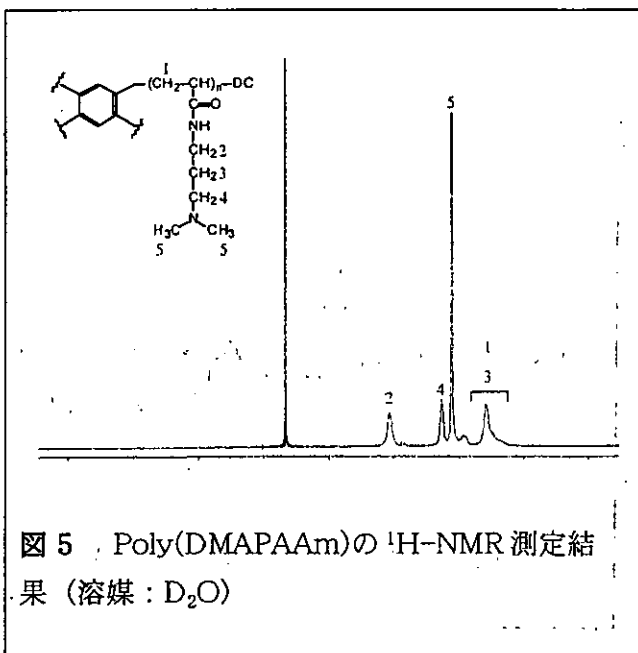


図5 Poly(DMAPAAm)の¹H-NMR測定結果 (溶媒: D₂O)

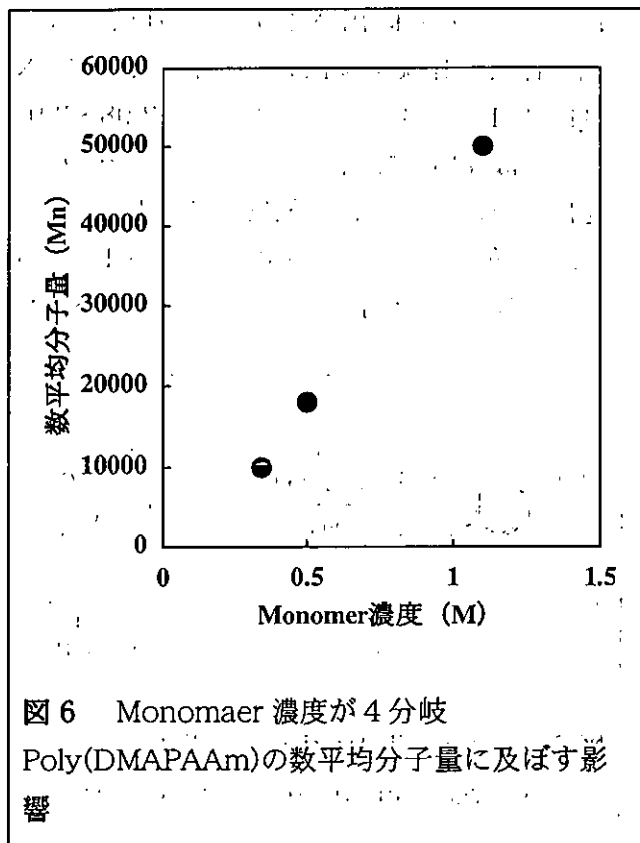
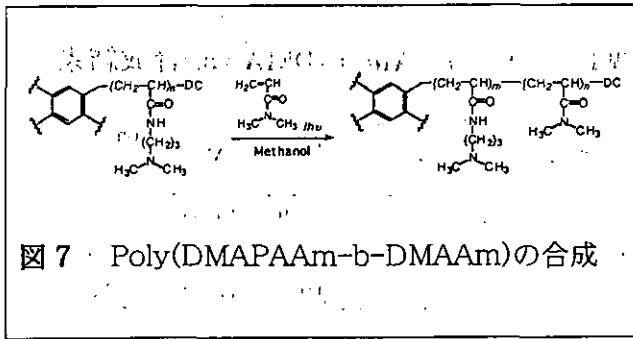


図6 Monomer 濃度が4分岐 Poly(DMAPAAm)の数平均分子量に及ぼす影響

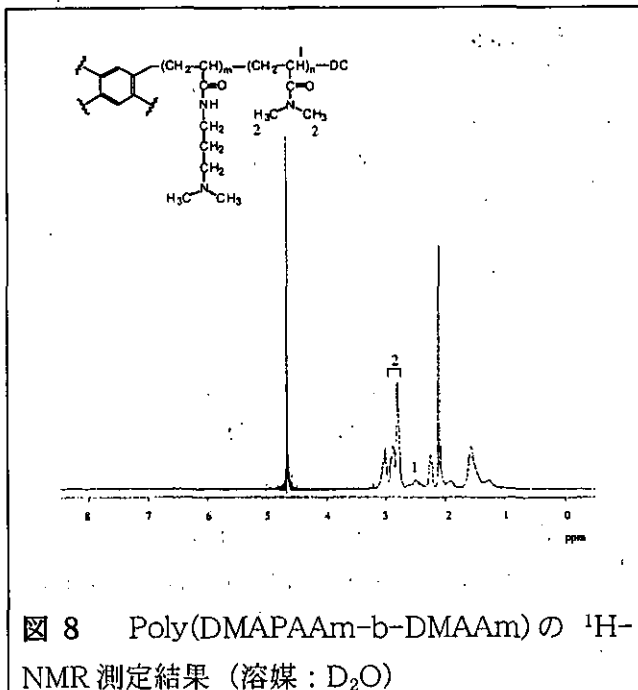


また、DMAPAAm と生成物の $^1\text{H-NMR}$ 測定 (溶媒: CDCl_3) を行った結果、DMAPAAm の $\text{C}=\text{C}$ 二重結合に由来するピークの消失と各ピークより、生成物は Poly(DMAPAAm) であると判断した (図5)。

同様の方法で DMAPAAm の濃度を調節することにより 3 種類の分子量を有する 4 分岐型 Poly(DMAPAAm) (M_n : ca. 1.0、1.8、 5.0×10^4) をそれぞれ得た (表 3-1, 図6)。

CD.3 4分岐型 Poly(DMAPAAm-b-DMAAm)の合成 (Poly(DMAPAAm) M_n : ca. 10000 を用いた場合)

Poly(DMAPAAm) (M_n : ca. 10000) と



DMAAm のブロック共重合体は図7の合成経路に従って行った。先に合成した 4 分岐型 Poly(DMAPAAm) を開始剤として DMAAm を Methanol 溶液中にて、紫外光照射することにより光ラジカルリビング重合を行った。化合物の精製は Poly(DMAPAAm) と同様の方法で残渣を滴下することで高分子を得た。しかしながら、Poly(DMAPAAm) とは異なり、白色固体は時間が経過しても固体状態を保っていた。これは DMAAm が重合することによって吸湿性が減少したためであると考えられる。

溶液をデカンテーションして分離し、析出した高分子は真空乾燥後、凍結乾燥を行って白色固体を得た。Poly(DMAPAAm-b-DMAAm) の重合比と分子量は $^1\text{H-NMR}$ 測定 (溶媒: D_2O) により算出した (図8)。DMAAm のジメチル基由来のピーク (δ 2.7~3.0 ppm) をはじめとし Poly(DMAAm) 鎖が導入されていることが確認できた。

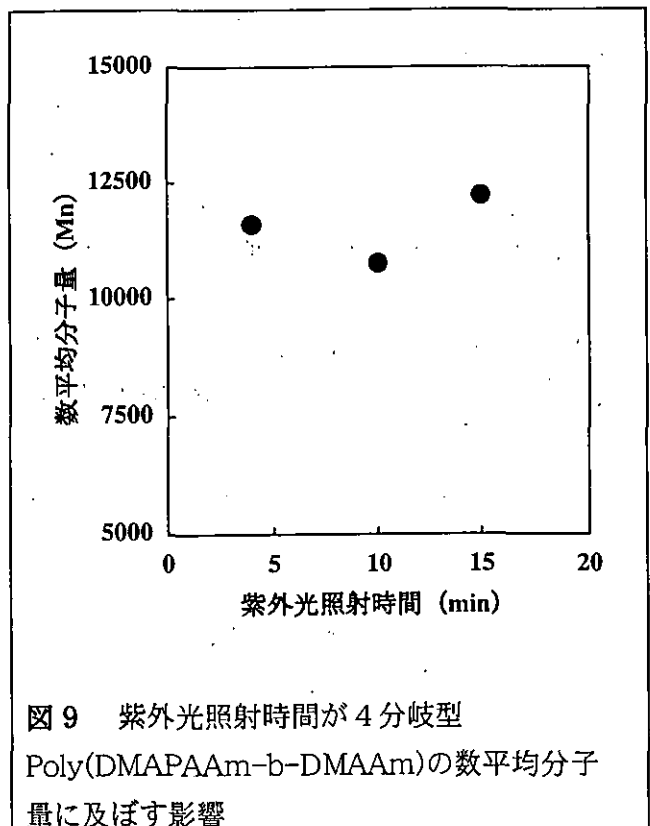


表3-2 紫外光照射時間の変化による4分岐型Poly(DMAPAAm-*b*-DMAAm)合成結果

No.	[Monomer] (M)	[DC] (mM)	Irradiation time (min)	Solvent	PDMAAm/PDMAPAAm	Yield (g)	Mn	Conversion (%)
1	0.5	5	5	Methanol	0.13	0.039	10765	1.1
2	0.5	5	10	Methanol	0.38	0.055	12220	4.0
3	0.5	5	15	Methanol	0.27	0.054	11600	3.0

Monomer : DMAAm, DC : Poly(DMAPAAm) (Mn : ca. 10000) , Light intensity : 1 mW/cm²

表3-3 Monomer濃度の変化による4分岐型Poly(DMAPAAm-*b*-DMAAm)合成結果

No.	[Monomer] (M)	[DC] (mM)	Irradiation time (min)	Solvent	PDMAAm/PDMAPAAm	Yield (g)	Mn	Conversion (%)
1	0.5	5	30	Methanol	0.45	0.053	12700	4.6
2	1.5	5	30	Methanol	1.21	0.091	17075	5.1
3	2.0	5	30	Methanol	2.80	0.155	26500	9.8

Monomer : DMAAm, DC : Poly(DMAPAAm) (Mn : ca. 10000) , Light intensity : 1 mW/cm²

さらに、紫外光照射時間、Monomer 濃度、開始剤濃度を変化させることによって得た様々な分子量の Poly(DMAAm) を有する Poly(DMAPAAm-*b*-DMAAm) の合成例を以下に示す。

CD.3-1 紫外光照射時間を変化させた場合

紫外光を 5、10、15 分間照射することによって 3 種類の Poly(DMAPAAm-*b*-DMAAm) を得た (表 3-2)。しかしながら、紫外光照射時間を延長しても 15 分までほとんど分子量の増加は見られなかった。この結果より、紫外光照射時間を延長しても導入された Poly(DMAAm) 鎖の分子量を大幅に増加させることは困難であることがわかった (図 9)。

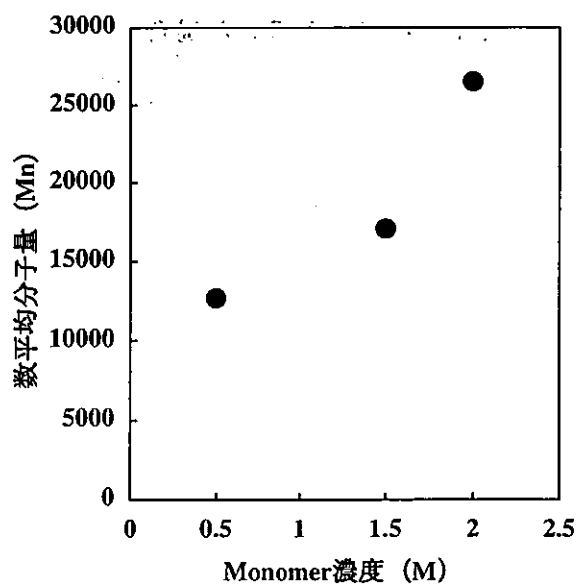


図 10 Monomer 濃度が 4 分岐型 Poly(DMAPAAm-*b*-DMAAm) の数平均分子量に及ぼす影響