

Homozygous familial hypercholesterolaemia: development of xantho-granuloma in a boy at puberty under long-term low-density lipoprotein apheresis and drug therapy. *Br J Dermatol.* 2003;149:1302-1303.

3. 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, Niishioka 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.
4. 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.
5. 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.

2. 学会発表

国際学会

1. 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 Interna-

tional Symposium for Apheresis (Nashville), ワークショップ発表 (1)

2. 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回国際動脈硬化化学会 (京都)
3. Abè E, Ohira M, Miyamoto Y, Asada Y, Harada-Shiba M: Regulatory mechanism of autosomal recessive hypercholesterolemia (ARH) protein expression. 第13回国際動脈硬化化学会 (京都)
4. 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回国際動脈硬化化学会 (京都)

国内学会

1. 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)
2. 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)
3. 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)

④H:知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

「筋肉注射による遺伝子治療の効果を増強する方法」特許出願中

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

ベクターデリバリーシステムに関する研究：
ナノサイズ磁気ビーズの合成

分担研究者：根本 泰（株式会社ブリヂストン 化成品事業本部）

研究要旨

遺伝子治療へ用いる遺伝子運搬体として、合成高分子系ベクターの開発が進んでいる。本研究ではこれら合成ベクターのデリバリー技術、特に、生体内へ投与し、体外から磁力を印加することによって、疾患部位へ局在化させ、経時的に複合した核酸などを放出させる技術の可能性を検討した。本デリバリー技術によれば、患部へ遺伝子複合体を集合させて効率的な遺伝子治療を行える可能性がある。そこで本研究では、デリバリーシステムの開発にあたって、まず磁気ビーズ(磁性を有するナノ粒子)の合成を検討した。磁気ビーズの材質としては磁性体であるマグネタイト(Fe_3O_4)に注目し、微粒子化は、水酸化鉄をアスコルビン酸と接触させて発生するラジカル酸素を利用して水酸化鉄を定量的に酸化することで粒子径分布の狭い磁気ビーズを合成することができた。粒子径の測定は動的光散乱及び SEM で行い、両者の間で整合性があった。以上より水懸濁液中でナノサイズの粒子径で分散し得る磁気ビーズが合成され、この磁気ビーズを利用したデリバリーシステムの可能性が示唆された。なお、本デリバリーシステムでは、体外からの磁力印加は患部付近の体表へ電磁石、永久磁石を配置する方法を想定している。

A. 研究目的

遺伝子治療の要であるベクターは、遺伝子発現効率を中心に研究され、ウイルス系から合成高分子系へと、近年研究が活発化してきている。これらベクターの *In Vitro* での評価が進む一方で、生体への応用方法、特にデリバリー方法に関しては未だに研究報告が少ない。

また、遺伝子複合体を生体内へ投与した場合、生体内の酵素などの作用によって遺伝子が容易に分解することが懸念されるため、遺伝子複合体はなるべく患部付近へ集中して投与し、投与後には速やかにエンドサイトーシスさせることが望まれる。このことは特に患部付近への投与が困難な病変血管へ応用（血液によ

て遺伝子複合体がすぐに流される)する際に重要な問題となり、遺伝子複合体のデリバリーシステムの開発は大きな課題であると考えられる。

本研究では、体外から印加する磁力によって患部へ集合させることが可能な磁気ビーズを利用した遺伝子複合体のデリバリーシステムの開発のため、磁気ビーズの開発を目的とする。

磁性粒子としては強磁性体のマグネタイト(Fe_3O_4)を選択し、その粒径は、血管内で異物として認識されにくく、毛細血管閉塞などの危険性低いと考えられる10nm程度の粒子径を目標とした。この粒子径であれば、代謝排泄されることが可能がとも考えた。

B. 研究方法

B-1. 磁気ビーズの合成

塩化鉄(II)四水和物(関東化学、JIS 特級)を水へ溶解して0.25M溶液とした。水酸化ナトリウム(関東化学、特級)及びアスコルビン酸(関東化学、特級)を水へ溶解して終濃度がそれぞれ0.5M及び0.25Mの溶液を調製した。

水はいずれも高純度窒素(ログ6)のバブリングで5時間の脱酸素処理を行った日局適合の注射用水を用いた。

ポリオキシエチレン(20)セチルエーテル(Brij58)を0.5Mとなるようにシクロヘキサン300mL(関東化学、特級)へ溶解し、ホモジナイザー(特殊機化工業製、ホモディスパーf)にて激しく攪拌した。攪拌は20℃の水浴中で、高純度窒素ガス(ログ6)を供給し続けた。激しく攪拌しながら、滴下ロートにて0.25M塩化鉄水溶液を毎分0.1mLの速度で滴下し、

総量5mLを混合した。続いて水酸化ナトリウム及びアスコルビン酸の混合溶液を同様に毎分0.1mLの速度で滴下し、pHを約9に調整した後、2時間攪拌を続けた。

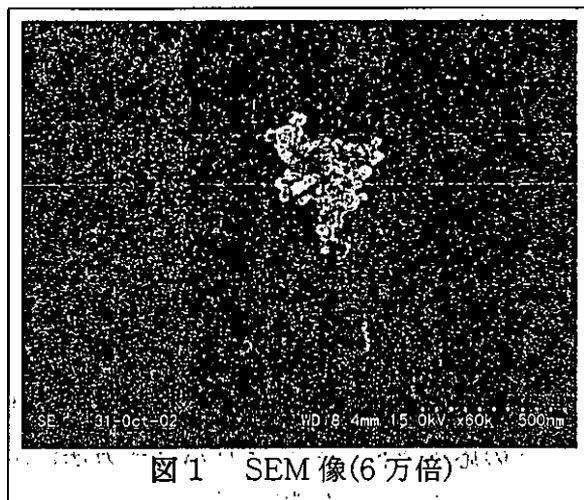
この溶液へテトラエトキシエトキシシラン(関東化学、特級)を15mL添加し、アリーン冷却器による還流下に温度を70℃まで上げ、攪拌を2時間継続した。

得られた懸濁液を遠心分離して上澄みを除去した後、イソプロピルアルコール(関東化学、JIS 特級)で十分に洗浄し、70℃で乾燥させた。ここに水を加え、超音波にて沈殿を分散させ、0.22 μm フィルター(Advantec社、酢酸セルロース膜)にて濾過をし、濾液を透析チューブ(セルロース系、50オングストローム孔)へ入れて水にて72時間透析して磁気ビーズをの懸濁液を得た。

B-2. 測定及び使用装置

B-2-1. SEM測定

SEM測定は脱磁処理した後に冷電界走査型電子顕微鏡(日立製、S4300)を用いて行った。



B-2-3. 動的光散乱

水分散させて動的光散乱装置(HORIBA製、LB-500)で測定した。セル温度は20℃で行った。

CD. 結果と考察

合成した磁気ビーズを水へ懸濁させ、容器壁面へ磁石を近づけると粒子が凝集して集合し、黒色の懸濁液は透明となった。合成した磁気ビーズは磁性体の粒子であることが確認された。

消磁処理した後に測定した SEM 像を図 1 へ示す。

この SEM 像より今回合成した磁気ビーズは 10nm 程度のナノ粒子で、粒子径もほぼ均一であることが分かる。形状は立方体形であり、 Fe_3O_4 単結晶の形状と一致した。また、消磁処理をしない場合には SEM 像が乱れたことから磁性体であることが確認された。次に、水懸濁液中での粒子径であるが、動的光散乱の測定結果を図 2 に示す。

動的光散乱での結果は SEM による測定結果と整合性があり、得られた磁気ビーズは 10nm 程度の粒子径で、粒子径の分布はシャープであった。これより、今回合成した磁気ビーズはナノ領域の粒子径で水中で安定して分散する可能性が示唆された。

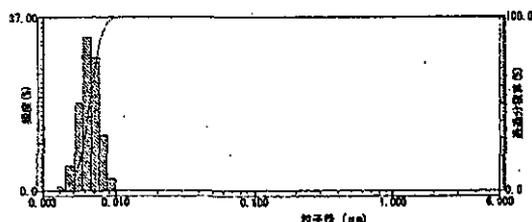


図 2 動的光散乱(水中での粒子径分布)

E. 結論

水酸化鉄水溶液を有機溶媒中へミクロ分散させ、この層へ浸入するアスコルビン酸を水酸化鉄の触媒作用で分解させて発生するラジカルで水酸化鉄を酸化することで粒子径分布の狭い磁気ビーズを得ることができた。この磁気ビーズを利用した遺伝子複合体のデリバリーシステムの可能性が示唆された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許出願

1. 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
2. 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
3. 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
4. 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

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

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

分担研究者：西 正吾（高槻赤十字病院 脳外科 部長）

研究要旨：

遺伝子を患部に局所的に効率よくデリバリーするためのデバイスとして、多孔質高分子フィルムのカバーを有する高機能性ステントの開発を行った。カバー材として用いたセグメント化ポリウレタンフィルムをエキシマレーザー加工することにより、高精度で微細加工を行った。作製した多孔化フィルムを顕微鏡下にてバルーン拡張型ステントの外側に巻き縫合固定した後、フィルム断端を溶融接着することによりカバードステントを作製した。また、分子設計した光反応性ゼラチンをヘパリンと混合してフィルム表面に塗布した後に、光照射するとヘパリンを包埋したゼラチンが形成され、フィルム表面に固定化できた。多孔化により経孔的な組織侵入が起こり、新生内膜組織の再構築が促進されたこと、並びにヘパリン包埋（局所投与）により血液凝固が大幅に抑制されたことが動物実験により示された。

A. 研究目的

近年、動脈硬化による全身血管の狭窄・閉塞病変がますます増加する傾向にある。心臓、末梢動脈系においてバルーンカテーテルによる経皮的血管拡張術（PTCA または PTA）が行われ、ある程度良好な成績を取ってきたが、急性期や亜急性期において 3～8%の割合で起こる血栓性閉塞や、術後 3 から 6 ヶ月の慢性期において 30～50%の割合で起こる再狭窄の発生などから治療法はバルーンからステントへと大きく変遷しつつある。しかし、冠動脈ステントの使用においても再狭窄は完全には抑制できず、依然として 25～30%の高率で生じている。

そのためステントと薬物との組み合わせによる高機能化など様々な提案がなされている。

本研究では、遺伝子担持機能と多孔質フィルムカバーを併せ持つ高機能性ステントの開発を行った。遺伝子に代わり、モデル薬物としてヘパリンを選択した。これにより急性期の血栓形成が抑制できると期待される。また、多孔質フィルムでステントをカバーすることにより、ステント周囲から経壁的に内腔内に侵入する組織量が規制され、慢性期の再狭窄を抑制できると期待される。一方、ヘパリンは血管平滑筋細胞の増殖抑制効果が有ることが知られており、

先に示した血栓形成抑制と同時に再狭窄につながる平滑筋細胞の増殖による内膜肥厚の抑制が期待される。ステントカバーフィルムの材質は人工心臓などに利用されているセグメント化ポリウレタンを選択し、多孔化設計は小口径人工血管の作製のために開発したエキシマレーザーを用いた微細加工技術により行った。これまでの *in vitro* ならびに *in vivo* での細胞侵入に関する予備的な検討から微細孔の口径は 30 μm に、孔と孔との間隔は 250 μm に厳密に設定した。一方、ヘパリンの固定化には既に開発した光硬化性材料を用いた。これはゼラチン側鎖にベンゾフェノン基を導入したのもので、ヘパリンなどの水溶性薬物との混合水溶液として、高分子フィルム表面に塗布した後、紫外光照射すると、ベンゾフェノン化ゼラチンはゲル状に硬化すると同時に基材の高分子フィルムに共有結合により固定化され、生成ゲル内には薬物を包埋することが可能である。

本研究では、まず、カバーステントの開発を行った。次いで、試験モデルとしてヘパリン固定した多孔質カバーでステントの末梢側半分を被覆化した半分カバー化ステントを作製し、これを兎総頸動脈に留置を行った。半分カバーステントを用いると、カバーの有無が内膜肥厚に与える影響を同一の動物を用いて同一のデバイス内での比較することが可能であった。カバーステントの遺伝子デリバリーデバイスとしての有用性を示した。

B. 研究方法

B-1. カバーフィルムの作製

カバーフィルムの基材としてセグメント化ポリウレタンフィルムを用いた。フィルムへの微細加工形成はエキシマレーザーマイクロ加工装置を用いて行った。レーザー光はマイクロ加工機内のビーム成形光学系にて均質化し、可動式試料ステージに固定したフィルムに照射した。ステージの移動、位置決め、およびレーザー発振は全てコンピュータで制御した。加工状態はフィルムを顕微鏡にて拡大してテレビモニターで *in situ* で観察した。多孔化したポリウレタンフィルムの方側面に光反応性ゼラチン (50mg/mL) をヘパリン (25 mg/mL, 164.5units/mg) と混合して塗布 (20 $\mu\text{L}/\text{cm}^2$) し、紫外光照射により固定化した。この塗布・照射操作を2回繰り返した後、フィルムの処理面が内腔に向くようにバルーン拡張型ステント (Palmaz-Schatz, length: 15 mm, diameter: 1.2 mm) の外側に置き、顕微鏡下にて 10.0 ナイロン糸にて支持縫合した後、フィルムの断端を重ね合わせジメチルホルムアミドにて溶融接着させることによりカバーステントを作製した。

B-2. 移植実験

実験はニュージーランド白色家兎 (体重 3~4kg) で行った (n=7)。作製したカバーステントをバルーンカテーテルにマウントした後に、ニュージーランド白色家兎の大腿動脈より透視下で総頸動脈に誘導し、バルーンを拡張させてカバーステントを血管内に留置した。3月後、開存性を血管撮影にて評価した。

実験はニュージーランド白色家兎（体重 3～4kg）で行った（n=7）。作製したカバードステントをバルーンカテーテルにマウントした後に、ニュージーランド白色家兎の大腿動脈より透視下で総頸動脈に誘導し、バルーンを拡張させてカバードステントを血管内に留置した。3 月後、開存性を血管撮影にて評価した。

B-3. 組織評価

ステントを周囲の頸動脈組織を含めて摘出し、10%ホルムアルデヒド緩衝溶液にて固定した。固定組織をアルコール系列で脱水後、グリコールメタクリレートにて樹脂包埋し、円周方向の薄切片を作製し、HE染色あるいは Elastica VanGiessen 染色を行い、組織学的に血流面への組織侵入の程度を評価した。別に、摘出組織を 1%オスミウム酸で後固定した後に、アルコール脱水、白金パラジウム蒸着し、走査型電子顕微鏡にて内腔面および断面形状を観察した。

C. 研究結果

カバードステントの作製方法を図 1 に示し、概略を以下に示す。

まず、カバーフィルムの基材となるセグメント化ポリウレタンフィルムにエキシマレーザー加工装置を用いて多孔構造化を行った。これに光反応性ゼラチンを用いて表面にゲルを固定し、ゲル内部にヘパリンを包埋させた。この表面処理した多孔質ポリウレタンフィルムを市販のバルーン拡張型ステントの外側に表面修飾面が内側になるようにラッピングした。フィルムの片面断端をステントの支持金属に縫合固定した。反対側の断端を先の固定断端面に重ね合わ

せ、ジメチルホルムアミドにより溶融接着させた。以下に、操作段階ごとに詳細に説明する。

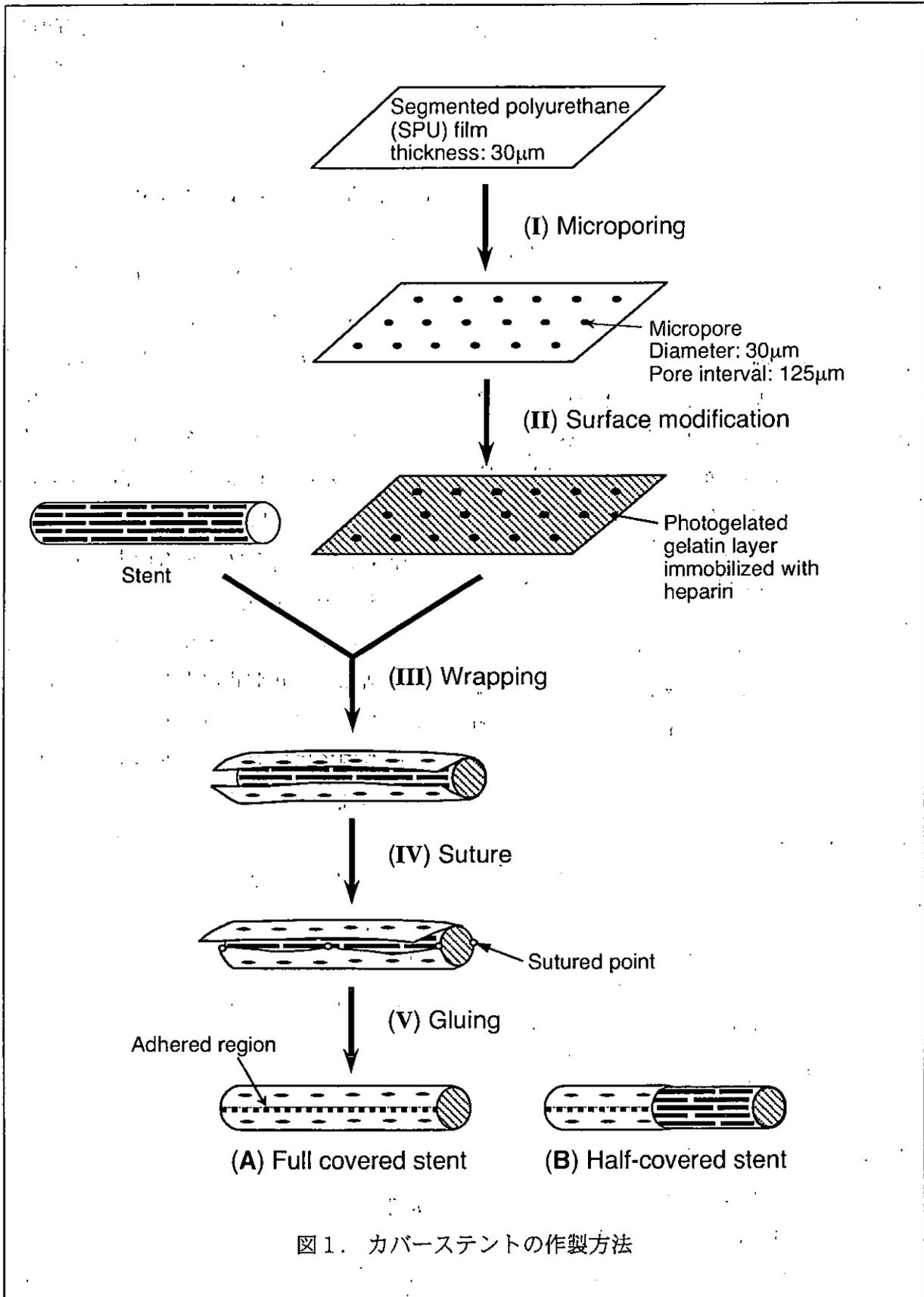
C-1. カバーフィルムの多孔化

ポリウレタンフィルムにエキシマレーザーの紫外パルス光を円形の貫通孔を有するフォトマスクを通して照射すると、フォトマスクの形状に一致した円形の貫通孔が形成された（図 2 a）。コンピューター制御による自動移動ステージを用いて照射部位を段階的に移動させると孔の配置を任意に設計することができた（図 2 b）。

作製した多孔質フィルムの力学的性質を引っ張り強度試験により調べた。フィルムを一定速度で延伸させると、フィルムの歪みが増加し、孔形状は円形から楕円形に変形した（図 2 c）。100%までの歪みの変化の範囲内では応力はほぼ直線的に増加し、また 4 倍程度まで延伸させても破断することはなかった（図 3）。延伸初期に得られた歪み-応力曲線の直線部の傾きからフィルムの弾性率を求めると、無孔フィルムの場合には $1.6 \times 10^7 \text{ Pa}$ であり、直径 100 μm の孔を 500 μm の間隔で多孔化したフィルムでは $1.3 \times 10^7 \text{ Pa}$ 、250 μm 間隔では $7.5 \times 10^6 \text{ Pa}$ であった。

C-2. カバーフィルムへのヘパリンの固定化

光反応性ゼラチンをヘパリンとの混合水溶液とし、ポリウレタンフィルムの片側表面に塗布・乾燥させた後に、紫外光を照射



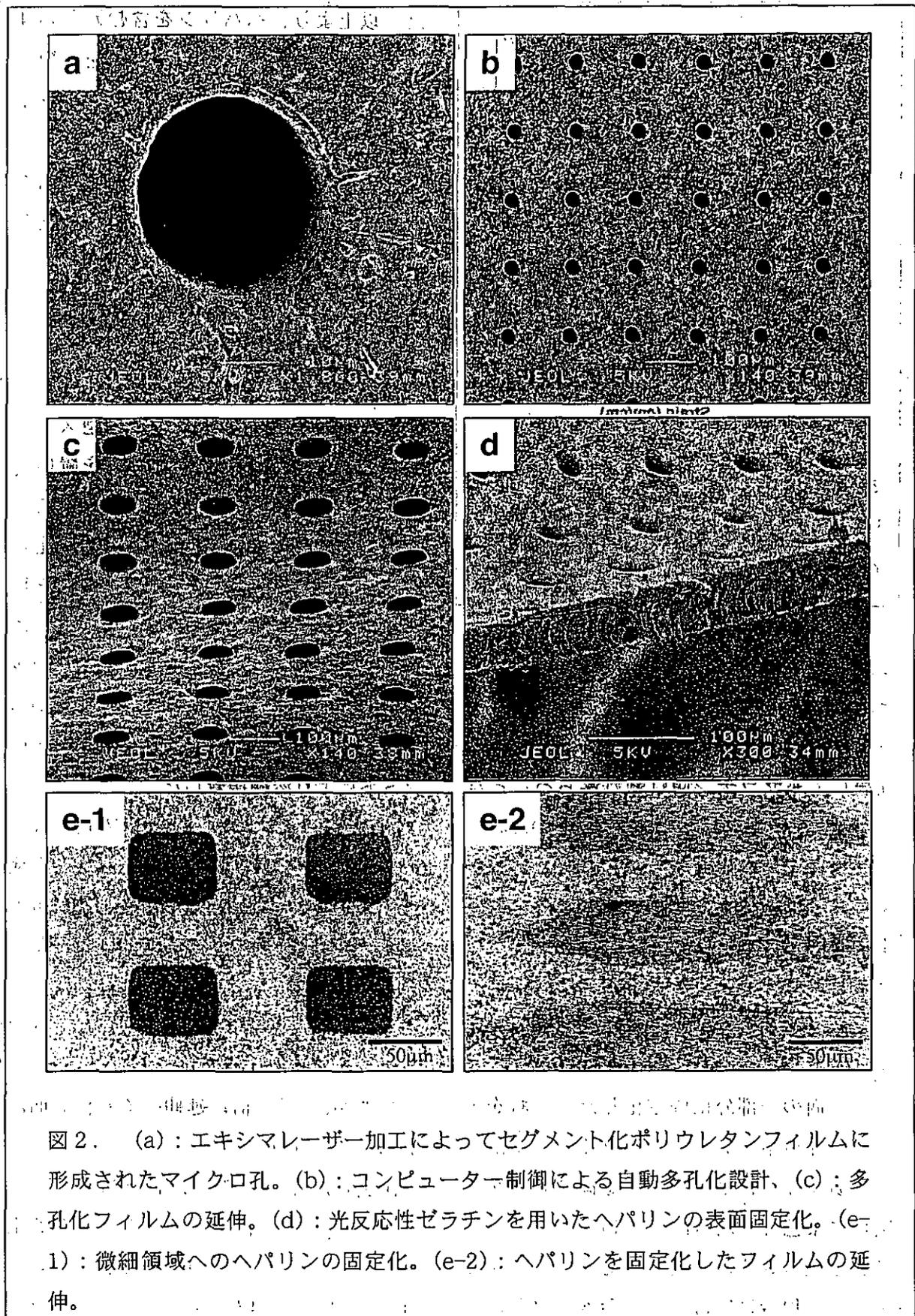


図 2. (a) : エキシマレーザー加工によってセグメント化ポリウレタンフィルムに形成されたマイクロ孔。(b) : コンピューター制御による自動多孔化設計、(c) : 多孔化フィルムの延伸。(d) : 光反応性ゼラチンを用いたヘパリンの表面固定化。(e-1) : 微細領域へのヘパリンの固定化。(e-2) : ヘパリンを固定化したフィルムの延伸。

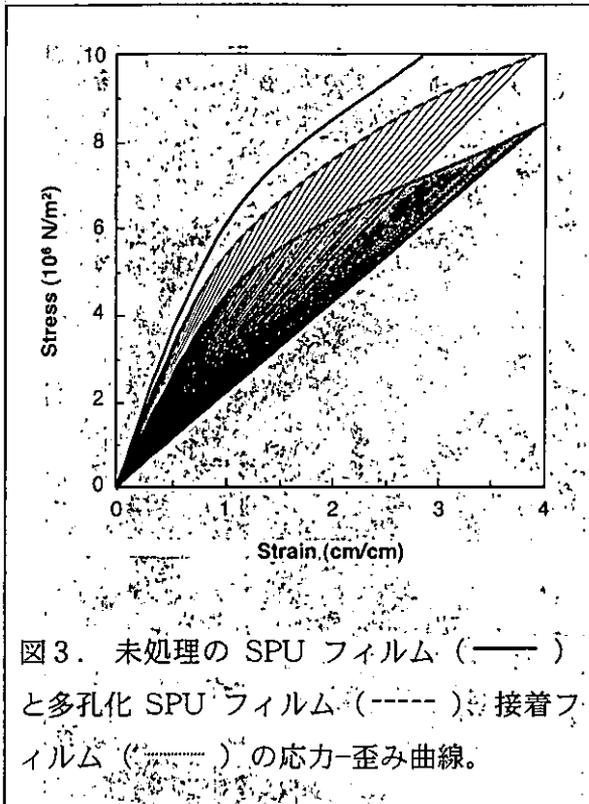


図3. 未処理の SPU フィルム (—) と多孔化 SPU フィルム (----)、接着フィルム (.....) の応力-歪み曲線。

した。処理したフィルムを水に浸漬させると、照射した表面が僅かに膨潤し、ゼラチンゲルの形成を認めた。これを水で激しく洗浄してもゼラチン層は剥げ落ちることなく強固にフィルム表面に固定されていた。

SEMにてフィルム断面を観察すると、フィルムに作製した貫通孔を塞ぐようにフィルム片面のみに厚さ約 5 μ m の極薄いゼラチンゲルの薄膜の形成を認めた (図 2 d)。

また、フォトマスクを用いて照射領域を規制することにより、ゼラチンゲルをフィルム表面の一部分に固定化した。これをカチオン性色素、トルイジンブルーの水溶液に浸漬すると、ゼラチン固定領域のみが青紫色に染色された (図 2 e-1)。一方、ヘパリンを混合せずに光反応性ゼラチンでゲル固定した場合にはほとんど色変化はなかつ

た。以上より、ヘパリンを含む光反応性ゼラチンに光照射するとヘパリンを包埋したゲルが生成し、同時にポリウレタンフィルム表面に固定された。

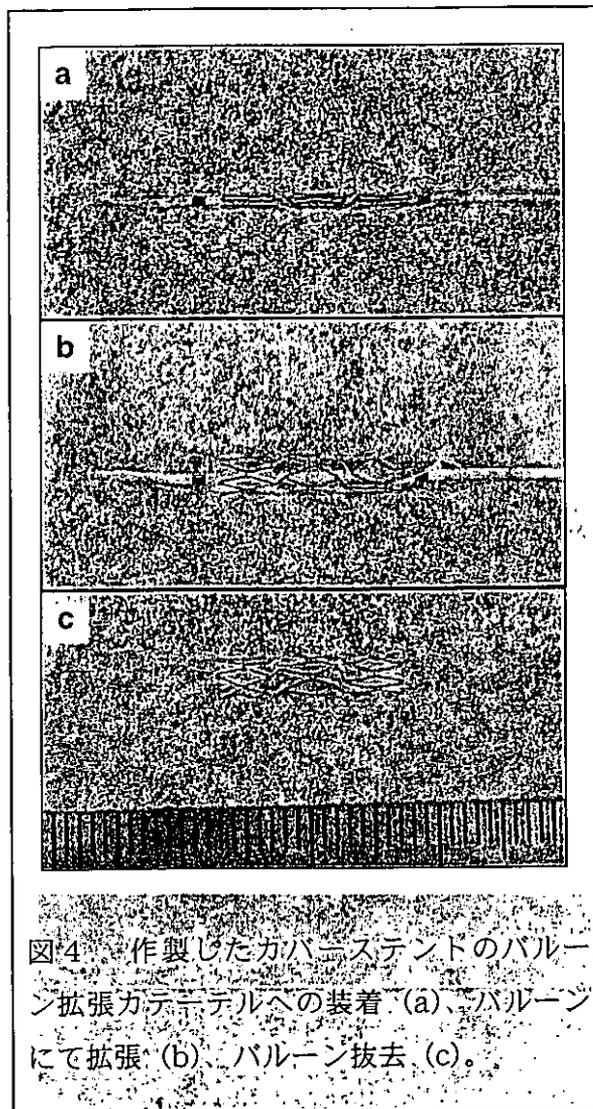
また、このゼラチン固定化フィルムを延伸すると、ゼラチン層は剥がれることなくフィルムの延伸に追従した (図 2 e-2)。

C-4: カバーステントの組立て

ヘパリンを包埋したゼラチン固定面が内腔面に向くようにバルーン拡張型ステントの外側にポリウレタンフィルムを置いた。次に、顕微鏡下にて 10.0 ナイロシにてフィルム断端の 3 箇所をステントの支持金属ストラット部に縫合固定した。縫合部を起点に約半周分のフィルムをステントに巻き、そこで更に 2 箇所縫合固定した。その後、残りのフィルムを完全に巻き残り部約 1mm 幅の自由端を重ね合わせてジメチルホルムアミドにより溶融接着した。

溶融接着したポリウレタンフィルムを先と同様に引っ張り強度試験機を用いて延伸させると、歪み増加に伴う応力の増加を示した (図 3)。得られた歪み-応力曲線において、初期歪みにおける直線部の傾きをもとに見かけの弾性率を算出すると、溶融接着フィルムは未処理に比べ約 2/3 に減少していたが、約 4 倍に延伸しても接着面が破断することは無かった。

作製したカバーステントをバルーンカテーテルにマウントした。バルーンを拡張させるとフィルム共々ステントが拡張した (図 4)。バルーンを収縮させステントから引き



抜いても、ステントの拡張形状は変化することなく維持された。

C-5. 移植実験

口径 30 μm の微細孔を 250 μm の間隔で配置したヘパリン固定化多孔質ポリウレタンフィルムをステントストラットの外表面の半分にラッピングすることにより半分カバー化ステントを作製した。カバーフィルムには内腔面にヘパリンを固定した。

カバーステントは末梢側がカバー領域となるようにバルーンカテーテルにマウント

した後に、5F シースを通して兎の大腿動脈より挿入した。挿入時にはステントがバルーンから外れないように細心の注意を要した。血管内の操作に関してはフィルムの有無でほとんど差は無く、ともにスムーズであった。透視下にて総頸動脈に誘導し、バルーンの拡張によりステントを留置した。カバーの有無で拡張性にほとんど差はなかった。摘出後のカバーステントの肉眼的観察では全て顕著な内膜肥厚は認めなかった。

走査型電子顕微鏡で観察すると、カバーの有無にかかわらず、全てコンフルエントの内皮細胞層での被覆化を認めた。短軸方向でステントの断面形態を観察すると、カバー化されていないステントストラットのみ領域ではストラットを取り囲むように薄い新生内膜層の形成を認めた。一方、カバー領域においては、主としてカバーフィルム内腔面に新生内膜層の形成を示じ、新生内膜層と旧内膜層とはフィルムに作製した微細孔を通して一体化していた。未カバー領域に形成された新生内膜層の厚さは平均 230.6 μm 、カバー領域での厚さは平均 244.3 μm となり、両者の差にほとんど有意さはなかった。

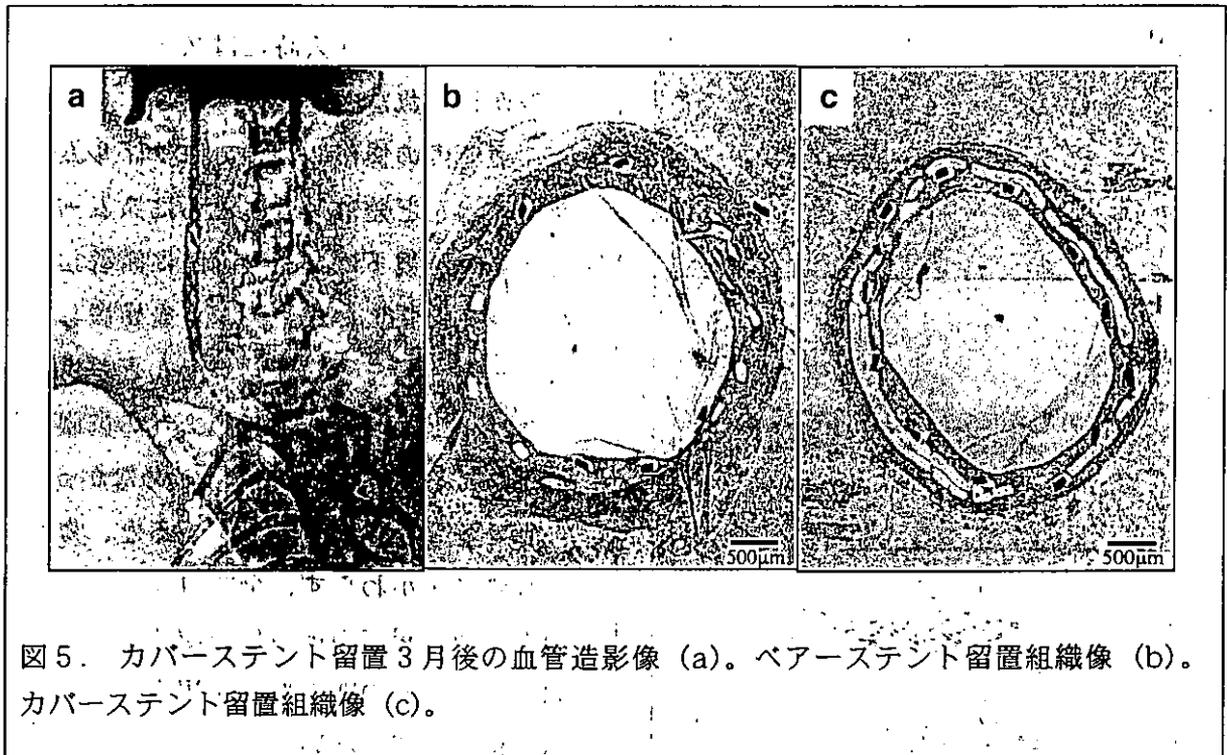


図5. カバーステント留置3月後の血管造影像 (a)。ベアーステント留置組織像 (b)。カバーステント留置組織像 (c)。

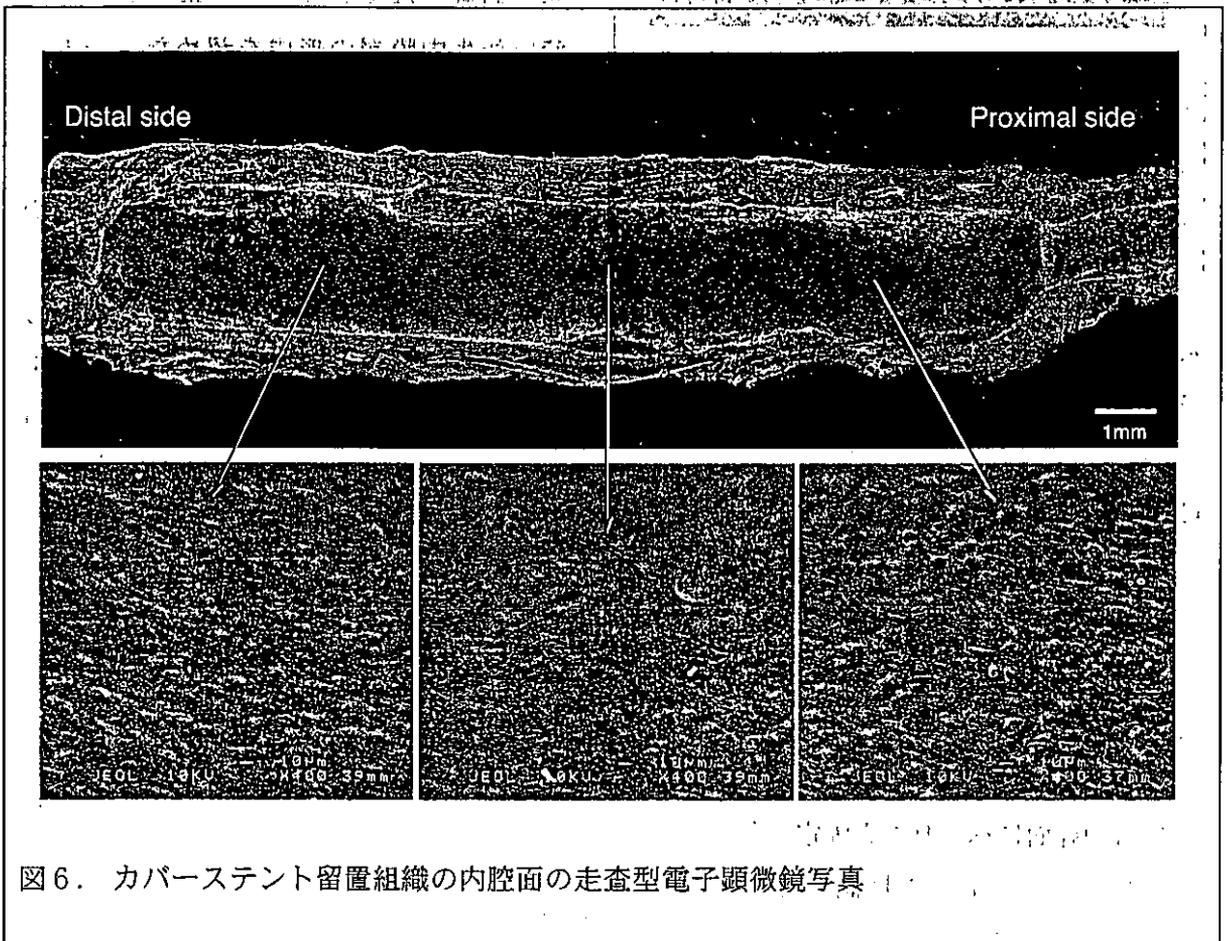


図6. カバーステント留置組織の内腔面の走査型電子顕微鏡写真

D. 考察

動脈硬化性の動脈狭窄病変に対して、従来のバルーンに加えてステントなど外科的手術に比べ低侵襲な血管形成が盛んに行われ、その治療効果は多大である。しかし、慢性基の再狭窄が問題となっている。この再狭窄の抑制を目的として従来型のステントに対して、ステント金属部を合成高分子で皮膜化する、さらに高分子内へ薬物を混合する、またはヘパリンなど抗血液凝固物質で金属部を被覆化するなどの試みが行われている。

我々は今回従来のステントを改良し、抗血液凝固性と組織侵入量の調節の2つの機能を付与したカバーステントを作製した。組織侵入量の調節機能の付与はカバー材として用いたポリウレタンフィルムに精密に微細孔設計することにより行った。また、抗血液凝固機能に関しては、既に表面修飾剤として開発している光反応性ゼラチンを用いてヘパリンを包埋固定することにより付与した。

ポリウレタンフィルムへの微細孔設計はエキシマレーザーを用いて行った。エキシマレーザーは紫外域に高強度のエネルギーを有するパルスレーザーであり、分子間の結合を化学的に開裂させることができ、ほとんど熱を伴わないため高分子の精密加工法として利用されている。我々は既にポリウレタンフィルムにエキシマレーザーを照射するとミクロンレベルでの精度で加工できることを示し、小口径人工血管の作製手段として利用している。今回、カバー材と

して用いたシーダム社製のポリウレタンフィルムにおいても精密に微細孔形成することができた。多孔化することによりフィルムの弾性率は減少し、孔密度の増加によりさらに減少した。多孔化フィルムの弾性率は孔形成部を除くフィルム面の総面積に依存することを既に報告しており、今回得られた傾向と一致した。また、カバーフィルム表面へ抗血液凝固性を付与する目的でヘパリン固定化を行った。これは、我々の研究グループに於いて既に合成され、組織接着剤や人工血管の表面修飾剤として応用している光反応性ゼラチンを用いて行った。これはコラーゲンの熱変性タンパク質であるゼラチンの側鎖に紫外光を照射することによりラジカルを発生するベンゾフェノン基を導入したものであり、ゼラチン1分子あたり約30個のベンゾフェノン基が導入されている。光反応性ゼラチンを用いると、基材表面にコーティングして照射するだけでゲルを形成すると同時に基材表面に強固に固定することができ、また、光反応性ゼラチンのコーティング時にヘパリンを混合しておくことで生成したゼラチンゲル内に容易にヘパリンを包埋しておくことができた。

作製したカバーステントを兔に移植すると、ステント内腔面はカバーフィルムの有無にかかわらず全て新生内膜層の構築を認め、血流接触面は全て完全に内皮化された。カバーフィルム両端からの組織侵入に加えて、微細孔からの経壁的な組織侵入が起こったことによると考えられる。形成された新生内膜の厚さはカバーフィルムの有無で

ほとんど差は無く極薄かった。これまで内膜肥厚を抑制する目的で平滑筋細胞のステント内腔内への浸潤を抑制するため、ステントを高分子チューブで皮膜化する試みが行われている。高分子の材質にはポリグリコール酸やポリカプロラクトンなどの分解性高分子やポリウレタンやシリコン、ポリエステルなどの非分解性高分子が用いられている。しかし、いずれの場合も材質にかかわらず豚冠動脈に移植されると、顕著な炎症反応を起し、平滑筋細胞の必要以上の増殖を促し、強度の血管狭窄を生じている。本研究では、表面にヘパリンを固定していることで初期の血栓形成が抑制されたこと、またフィルムの多孔化により早期での内皮化が起こったことの相乗効果が働き、血栓形成に由来する平滑筋細胞の増殖が抑制されたと考えられる。

ステント表面へのヘパリンのコーティングはステントストラット表面へのカチオン性高分子（ポリエチレンジイミン）などを下地として予めコーティングしておいた上にヘパリン還元末端との end attachment や長鎖アルキル鎖を有するアルキル化ヘパリンの吸着コーティングなどにより行われている。ヘパリンコーティングすると動物実験において急性期の血栓形成は大幅に抑制されることが示されている。しかし、慢性期での内膜肥厚の程度はヘパリンコーティングの有無で大差は認められていない。ヘパリンは 1970 年後半に血管平滑筋細胞に対する増殖抑制効果が見いだされ、最近では、抑制効果の生化学的作用機序に関する

基礎研究が精力的に行われており、また臨床的にもヘパリンの動脈硬化部位での局所投与による抗内膜肥厚化が検討されつつある。したがって、ステント内面のゼラチン層から徐放されるヘパリンは抗凝固効果、外面の組織接触面からは平滑筋細胞の増殖抑制効果が期待できる。

また、光反応性ゼラチンのコーティング時に他の薬物を混合しておけば、生成ゼラチン内に容易に包埋することが可能である。ゼラチン層は薬物の担持・放出機能を有するマトリックスとして機能することが期待される。また、ゼラチン層の光形成・固定化技術は、本研究でのヘパリンによる抗凝固作用に加えて、より積極的な薬物治療が原理的に可能である。すなわち、内面と外面のゼラチン層に異なる薬物を担持させる drug delivery system をステントに搭載することによって積極的な血管再構築を行うものである。例えば、強力に平滑筋細胞の増殖を特異的に抑制する薬剤や遺伝子を組織接触面に包埋・固定化して内膜肥厚を抑制し、一方、血液接触面には、ヘパリンに加えて、内皮細胞のみに作用する増殖因子（例えば VEGF）を固定化して血液接触面の早期内皮化が期待できると考えている。また、フィルムに作製した多数の微細孔を經由してフィルム外側の生体血管組織から内腔面への組織侵入が起こり、新生内膜層が早期に構築されれば早期から血栓形成が抑制されるものと考えられる。さらに慢性期において内腔面への組織侵入量が微細孔の密度の調節で制御できれば内膜肥厚が抑制され、再狭窄の防止につながるものと期待される。今回行った正常な動物を用いた実験では、内膜肥厚の程度はヘパリン化力

パーの有無でほとんど差を認めなかった。
 83100J-200S 試験 平成14年 11月

E. 結論

ステントに遺伝子の固定化機能を付与する技術が開発でき、血管内に遺伝子を局所送達できるデバイスが開発できた。血管病変に対する遺伝子治療に効果を発揮すると期待される。

F. 健康危険情報

なし
 試験 平成14年 11月

G. 研究発表

G-1. 論文

1. Yasuhide Nakayama, Shogo Nishi, Hatsue Ueda-Ishibashi, Takehisa Matsuda, Fabrication of micropored elastomeric film-covered stents and acute-phase performances. **J Biomed Mater Res** 64A: 52-61, 2003
2. Yasuhide Nakayama, Shogo Nishi, Hatsue Ishibashi-Ueda, Fabrication of drug-eluting covered stents with micropores and differential coating of heparin and FK506. **Cardiovasc Rad Med** 4: 77-82, 2003
3. Shogo Nishi, Yasuhide Nakayama, Hatsue Ishibashi-Ueda, Takehisa Matsuda, Embolization of experimental aneurysms using a heparin-loaded stent graft with micropores. **Cardiovasc Rad Med** 4: 29-33, 2003
4. Shogo Nishi, Yasuhide Nakayama, Hatsue Ueda-Ishibashi, Takehisa

Matsuda, Occlusion of experimental aneurysms with heparin-loaded, microporous stent grafts.

Neurosurgery 53: 1397-1405, 2003

5. Yasuhide Nakayama, Shogo Nishi, Hatsue Ishibashi-Ueda, Geometrical design of luminal surface for microporous covered stents, **Int J Artif Organs**, in press.
6. 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

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. 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)
4. 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
 5. 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
 6. 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
 7. 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
- 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
 2. 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
 3. 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
 4. 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
 5. 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
 6. 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
 7. 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

G-3. 新聞報道

なし

H. 知的所有権の取得状況

1. ステント, 発明者: 中山泰秀, 西 正

ベクターのシステム化に関する研究：

生体内分解性高分子の開発

分担研究者 中山 敦好（行政独立法人 産業技術総合研究所人間系特別研究体
主任研究員）

研究要旨

遺伝子の局所送達化デバイスの遺伝子包埋層ならびにデバイス基材として用いる材料として、生分解性を有する高分子化合物の開発を行っている。光硬化性を有する機能性生分解性ポリマーを開発した。その合成はグリシドールと環状酸無水物もしくはラクトンとの共重合によって得られる水酸基を有するコポリマーにオレフィン系側鎖を導入することにより行った。これは神経束に接続するワイヤー電極の固定化等の生体内吸収性の光硬化性固定化剤として有効であることを示した。新規なポリアミド系生分解性ポリマーの合成、モデルによるブレンド系生分解性材料の分解挙動についても調べた。

A. 研究目的

遺伝子導入ベクターを担持させるための素材開発を行う。本開発により、作成された遺伝子導入ベクターを効率的に必要箇所にて機能を発現させることが可能となる。

生分解性ポリエステルはバイオメディカル分野に加え、農林園芸分野や包装材料分野など幅広い分野で注目されている。しかしながら、機能化に関してはまだ研究報告は少ない。機能化にはグラフト重合による表面機能化やカプセル化、多層膜化などが考えられるが、分子設計レベルでの機能化手法としては高分子主鎖に機能性基をペンダントとして導入することが効率的である。

その足がかりとしてのカルボキシル基やアミノ基はその導入率により pH への影響が大きく、生体材料としては水酸基がもっとも適当であると考えた。水酸基は例えば酸塩化物をもつ生理活性物質と反応し、エステル結合を介して主鎖に導入される。こうしたポリマーは生体中においてエステル結合の加水分解により、主鎖、側鎖共に分解し、徐放性、生分解性材料兼医薬として機能すると期待される。そこで水酸基を有する生分解ポリエステルを中心にペースト状のもの合成を行った。また、新規生体材料となりうるアミノ酸系ポリマーやブレンドシステムについても検討した。側鎖を有

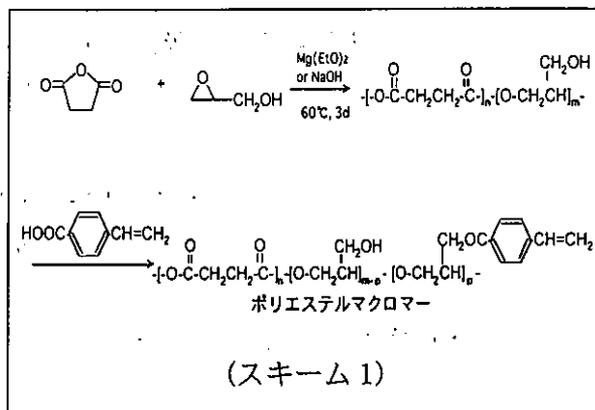
するポリマーでは、その側鎖に光重合性基を導入することにより、生体内吸収性光固定化材料を作成し、その評価を行った。

B. 研究方法

遺伝子導入ベクターを担持させるための材料開発としてラクトン、オキシラン類などを出発物質とした開環重合法によるコポリエステル、コポリエステルエーテル等を合成し、側鎖への官能基の導入による機能化を行った。その性能評価と生体系への適用についても検討した。さらにアミノ酸を原料とするポリアミノ酸（ポリアミド）合成、ブレンド系モデルによる分解挙動解明についても行った。

B-1. 水酸基を有するポリエステルへの機能性基の導入 (スキーム 1)

水酸基を有するポリエステルへの置換基導入は機能性基として光硬化性基を選定した。光硬化性基としては光によるラジカル重合が可能な二重結合を有するもので、 $\text{CH}_2=\text{CH}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{CO}-$ 、 $\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CO}-$ 、 $\text{CH}_2=\text{CH}(\text{CH}_3)-\text{CO}-$ などを対象とした。置換基の導入は、1-エチル-3-(ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド塩酸塩、あるいは1-シクロヘキシル-3-(2-モルフォリノエチル)カルボジイミドメソ-p-トルエンスルホン酸などの水溶性カルボジイミド系結合試薬を用いたエステル化により行った。具体例としては、4-ビニル安息香酸の DMF 溶液に氷冷下にて DCC の DMF 溶液を滴下し、室温で 1 時間攪拌後、水酸基側鎖を持つコポリエステル DMF 溶液を氷冷下にて滴下した。室温下で一晩攪拌後、可溶性部を濃縮し、メタノールで抽出し、濃縮して目的とするビニル化ポリエステルを無色のペー



ストととして得た。収率は 40% で、ビニル側鎖の導入率は分子量 1000 当たり約 1 であった。

B-2. ビニル化ポリエステルの性能評価

ビニル化ポリエステル 30mg (Wa) にカンファーキノン(CQ)と 2-ジメチルアミノエチルメタクリレート(DMAEMA)とをそれぞれ 0.5wt%、1.5wt% になるように混合し、ガラスシャーレ上にてハロゲンランプ (トクソー、パワーライト、照射波長: 400-600nm、照射強度: 200mW/cm²) の可視光を所定時間照射して光硬化を行った。硬化性の評価は照射物にクロロホルムを加え、30 分放置後、溶液中の非ゲル化部分を除去し、真空乾燥後、重量測定(Wb)しゲル化率を求めた。さらにゲル化サンプルに水を加え重量変化より膨潤度を計算した。

B-3. アミノ酸系生分解性ポリマーの合成 (スキーム 2)

アミノ酸系ポリマーとして、 γ -アミノ酪酸を繰り返し単位に含むポリアミド合成を行った。重合はバルク重合もしくは非プロトン性極性溶媒を用いて、金属ナトリウム/酸塩化物系を開始剤とし、室温にて重合を行った。得られたポリマーはギ酸/メタノー