

これらの溶液を混合すると、PEGDGE の両末端に存在するエポキシ基が、ポリマーのイミダゾール基および VK_3 誘導体のアミノ基もしくはジアゾフォラーゼの表面アミノ基と架橋反応を起こす。これらの結合により、分子量が増大し不溶性ゲル化する。この混合溶液を電極上に塗布し、酵素およびメディエータを固定化した。13 mM VK_3 3 μ l, 798 mM PVI 1 μ l, 11 mM PEGDGE 1 μ l および 27 units Dp 1 μ l のリン酸バッファ溶液を混合し、洗浄したグラッシーカーボン電極(GCE)上に塗布した。室温で 24 時間または 4°C で 48 時間乾燥させ、蒸留水で丁寧に洗浄した。この酵素およびメディエータ固定化電極を作用電極とし、サイクリックボルタンメトリー(CV)を用いて電気化学的に評価した。また、固定化電極の表面を光学顕微鏡および原子間力顕微鏡(AFM)を用いて評価した。CV の測定条件は、B-1 と同様である。

さらに、上記の混合溶液に 20 units グルコースデヒドロゲナーゼ(GDH)を添加し、Dp および GDH の複合酵素固定化電極を作製した。この複合酵素固定化電極を作用電極とし、CV およびポテンシオメトリー(CP)を用いて電気化学的に評価した。pH7.0 のリン酸バッファ溶液中で CV を行い、固定化されたメディエータの機能を評価した。さらに、NADH およびグルコースを順に添加し、触媒電流を観測して固定化された複合酵素およびメディエータの機能評価を行った。また、CP を用いて 5 μ A/cm² の定電流通電時における複合酵素固定化電極の分極挙動を観測し、生物燃料電池のアノードとしての特性評価を行った。

C. 研究結果

C-1. 高機能性メディエータ分子の探索

生物燃料電池の高機能性アノード構築のために、図 B-1 に示したメディエータ分子のサイクリックボルタンメトリー(CV)を行い、電

気化学的な基礎特性評価および反応速度論的な解析を行った。図 C-1(I)に、それぞれのメディエータ分子 (0.1 mM) のサイクリックボルタモグラムを示す。 VK_3 の CV (図 C-1(c)-(I)) では、約 -0.1 V vs. Ag/AgCl の開回路電位から、負の方向へ電位を掃引し、-0.45 V で折り返して正の方向へ掃引した。さらに、+0.1 V で折り返し開回路電位へ戻した。-0.31 V に還元電流ピークおよび -0.25 V に酸化電流ピークが観測された。これより、 VK_3 の酸化還元電位は、-0.28 V とわかった。以上より、酸化体である VK_3 が電極上で還元・酸化されることが確認できた。また、CV からすべてのメディエータ分子が電気化学的に酸化・還元できることが確認された。

AQS および AQS の誘導体である AAQS の酸化還元電位は、それぞれ -0.49 V, -0.50 V であった。また、 VK_3 誘導体である CPVK₃, AEACPVK₃ および APVK₃ の酸化還元電位は、どれも -0.32 V であり、 VK_3 よりも約 40 mV 負な電位を示した。FcOH の酸化還元電位は 0.23 V であった。

次に、Dp の酵素触媒反応による NADH の電気化学的酸化の速度論的解析を行った。図 C-1(II)に、0.11 μ M Dp および 4.8 mM NADH を添加した際の 0.1 mM 各種メディエータ分子の CV を示す。 VK_3 の CV (図 C-1(c)-(II)) では、Dp および NADH を添加すると、添加前と比較して開回路電位が -0.35 V へと負にシフトし、還元電流の減少および酸化電流の大幅な増加が観測され、酸化・還元電流ピークは消失した。これは、典型的な酵素触媒電流であり、Dp の酵素反応により NADH の酸化および VK_3 の還元反応が進行していることを示唆している。すなわち、電極表面上にて、Dp の酵素反応により溶液中に介在させた VK はヒドロキノン類へと還元されているため開回路電位は負へとシフトし、₃還元電流は減少した。さらに、酵素反応により還元されたヒ

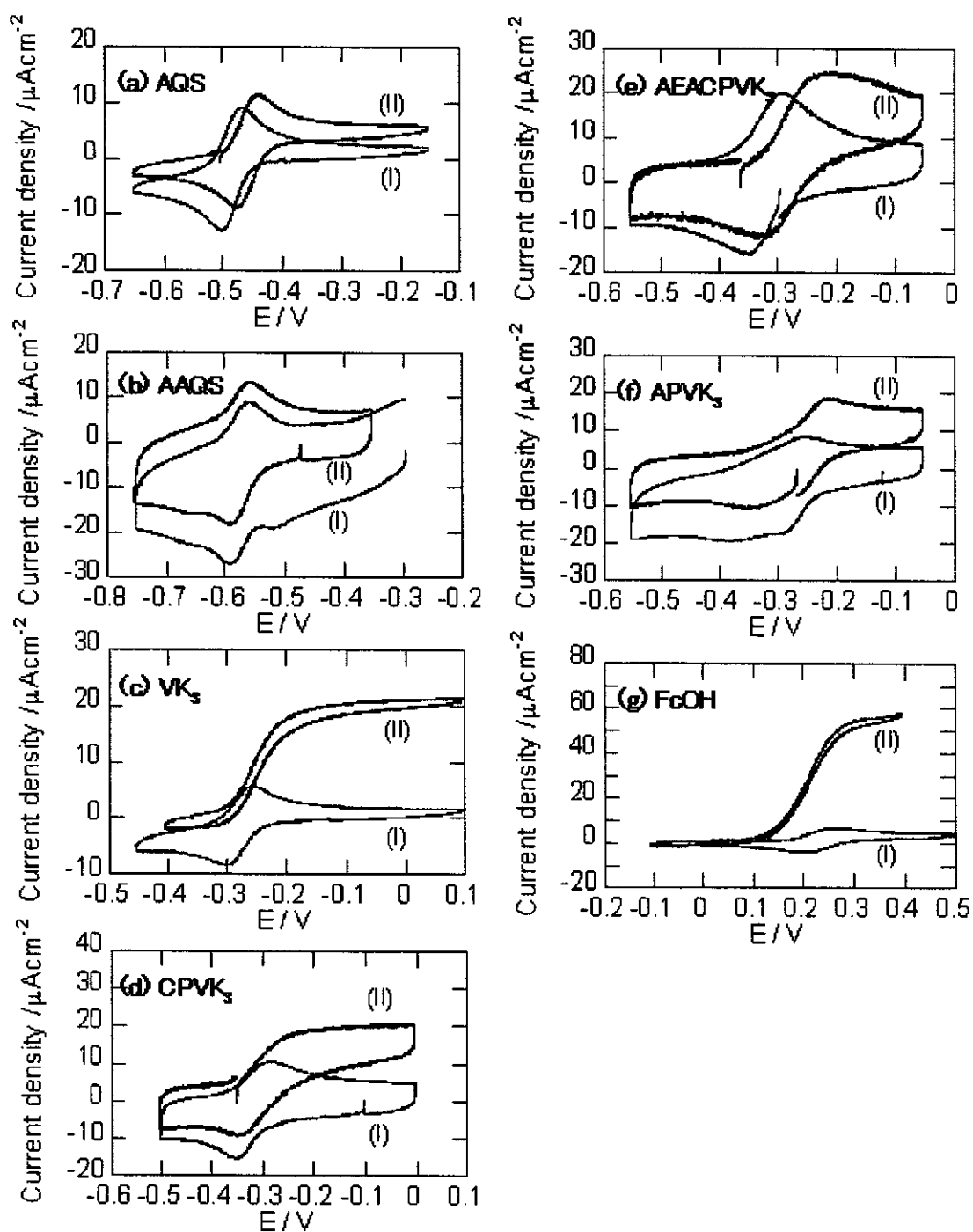


図 C-1 (I)各種メディエータ分子のサイクリックボルタモグラム、(II) 0.11 μM ジアフォラーゼおよび 4.8 mM NADH 存在下における各種メディエータ分子のサイクリックボルタモグラム。掃引速度：5 mV/s、測定溶液：0.1 mM 各種メディエータ/トリスバッファ(pH8.5)。メディエータ：(a) アントラキノン-2-スルホン酸ナトリウム (AQS)、(b) アミノアントラキノン-2-スルホン酸ナトリウム (AAQS)、(c) 2-メチル-1, 4-ナフトキノン (ビタミン K_3 , VK_3)、(d) 2-(3-カルボキシプロピル)-3-メチル-1,4-ナフトキノン (CPVK₃)、(e) 2-{3-[N-(2-アミノエチル)アミノカルボキシル]プロピル}-3-メチル-1, 4-ナフトキノン (AEACPVK₃)、(f) 2-(3-アミノプロピル)-3-メチル-1, 4-ナフトキノン (APVK₃)および(g) フェロセンメタノール (FcOH)。

ドロキノン類の電極表面における酸化反応が進行すると、電極酸化反応において酸化・再生された VK_3 は、再び酵素反応によって還元される。よって、 VK_3 は酵素反応および電極反応による還元、酸化を繰り返す（レドックスサイクリング）ため、電極における酸化電流の増加が観測された。

一方、AQS の CV (図 C-1(a)-(I)) では、 VK_3 の CV 同様に酸化・還元電流ピークが観測された。0.11 μ M Dp および 4.8 mM NADH を添加すると、還元電流の減少および酸化電流の増加が観測され酵素反応による触媒効果が示されているが、還元電流ピークは完全に消失せず、また、酸化電流の増加も VK_3 ほど顕著ではなかった。このことから、AQS の Dp との酵素反応速度は、 VK_3 と比較して遅いと予想される。そこで、それぞれのメディエータ分子の酵素反応速度を速度論的に評価した。

このように、サイクリックボルタモグラムから得られる触媒定常電流($I_{s,ox}$)およびクロノアンペロメトリーにより得られるメディエータ分子の拡散係数(D_M)を用いて、式(B-4)から $D_{pred} - M_{ox}$ 間の反応速度定数 $k_{cat,ox}/K_M$ を見積もった。図 C-2 に、酸化還元電流に対する各種メディエータ分子の $k_{cat,ox}/K_{M,ox}$ の対数プロットを示す。AQS の酸化還元電位(-0.49 V)は、測定に用いたメディエータ分子の中で最も負であった。Dp の活性中心である FMN (フラビンモノヌクレオチド) の酸化還元電位は -0.56 V (pH8.5)であり、AQS および AAQS の酸化還元電位と近接している。よって、電池を構築した際に大きな電位差を得ることができる。しかし、Dp-メディエータ間の反応速度定数を示す $\log(k_{cat,ox}/K_{M,ox})$ は 6.4 と最も小さく反応速度が遅い。一方、FcOH の反応速度定数は 7.7 と最も大きく反応速度は速いが、酸化還元電位は +0.25 V であり電圧をロスする。 VK_3 の反応速度定数は 7.5 と FcOH に匹敵し、さらに、酸化還元電位も -0.28 V と FcOH に比

べて 0.5 V 程度も負であった。

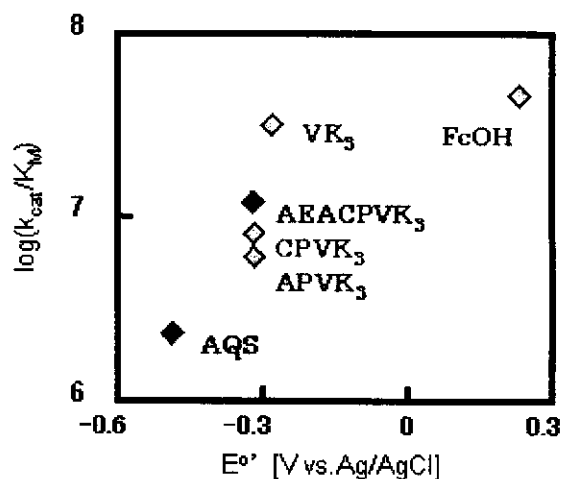


図 C-2 メディエータ分子の酸化還元電位 $E^{0'}$ に対する酵素触媒反応の速度定数 ($k_{cat,ox}/K_{M,ox}$) の対数プロット

VK_3 誘導体である $CPVK_3$, $AEACPVK_3$ および $APVK_3$ の反応速度定数は約 7.0 前後であり VK_3 と比較してわずかに劣るが、AQS よりも大きな値を示した。電流量の指標となる反応速度定数 ($k_{cat,ox}/K_{M,ox}$) は約 4 倍程度大きい。また、 VK_3 誘導体の酸化還元電位は、AQS の酸化還元電位と比較して 0.2 V 程度正であるため電池電圧は小さくなる。しかし、電池の出力は、電池電圧と流れる電流の積であるため、 VK_3 を用いた際の電圧ロスを電流量で補える可能性は大きい。さらに、 VK_3 誘導体に導入されたアミノ基やカルボキシル基を利用するとポリマー、表面処理した電極および酵素にキノン系メディエータを共有結合で固定することが可能になる。よって、生物燃料電池のアノードのメディエータとして、また、生体内バイオセンサのメディエータとしてナフトキノン類は威力を発揮すると予想できる。

C-2. 酵素およびメディエータ分子の固定化

まず、酵素およびメディエータ分子を電極上に固定し、電気化学的に評価した。図 C-3 に、Dp および $AEACPVK_3$ を固定化した電極

を作用電極とした CV を示す。測定溶液は、pH7.0 のリン酸バッファである。-0.4 V 付近に還元電流ピークが、0.0 V 付近に酸化電流ピークが観測された (図 C-3(a))。ボルタモグラムの波形には酸化側にひずみが観測されものの、電極の膜中に固定化された AEACPVK₃ は電極上で酸化・還元されていることが確認された。測定溶液中に 4.8 mM NADH を添加すると、開回路電位は -0.25 V へと負にシフトした。さらに、還元電流の減少および酸化電流の大幅な増加が観測された。これは、添加された NADH の D_p による酸化反応に伴い、電極表面上に固定化された AEACPVK₃ が還元されたことに起因する。すなわち、電極表面上に固定された AEACPVK₃ (酸化型メディエータ) は、酵素反応によって還元されたため電極反応による還元電流は減少した。また、電極上

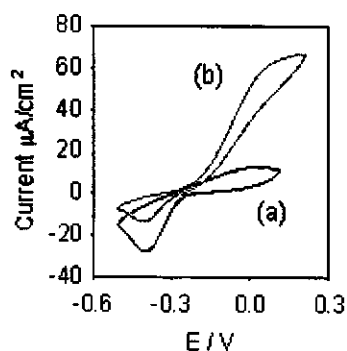


図 C-3 ジアフォラーゼおよびキノン系メディエータ固定化電極の CV。測定溶液：(a)リン酸バッファ(pH7.0)，(b) 4.8 mM NADH を含むリン酸バッファ(pH7.0)。

での酸化反応が進行する電位では、電極表面での AEACPVK₃ の生成・再生反応および酵素反応による AEACPVK₃ の還元反応が繰り返して進行するレドックスサイクリングにより、酸化電流が大幅に増加した。よって、D_p および AEACPVK₃ は電極上に活性を保って固定化され、NADH の酸化反応を触媒できることが示唆された。

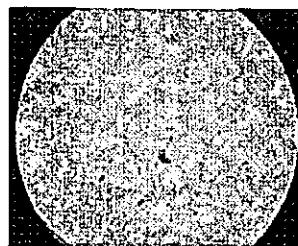


図 C-4 ジアフォラーゼおよびキノン系メディエータ固定化電極の光学顕微鏡写真。

次に、酵素およびメディエータ分子固定化電極の表面状態を観察した。図 C-4 に、D_p および AEACPVK₃ 固定化電極の光学顕微鏡写真を示す。固定化膜が電極表面の全面を覆っている様子が観測された。ポリマー担体である PVI の濃度を 8.0 mM および 0.8 mM (図 C-4 のポリマー濃度の 1/100 および 1/1,000) で固定化を試みたところ、どちらも電極表面の全面に固定化膜を作製できなかった。

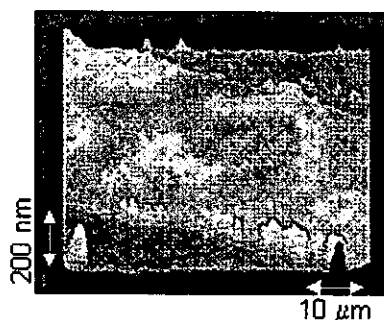


図 C-5 ジアフォラーゼおよびキノン系メディエータ固定化電極の AFM イメージ。

さらに、AFM を用いて固定化膜表面を観察した。膜の一部を物理的に削り取り、その段差を計測して膜厚を計測した。膜表面には、数十 nm 程度の凹凸が観測された。また、膜厚は場所によりばらつきがあったが、約 100 nm であった。表面上にはクレータ状の孔が観測された。この孔の直径は 1 μm-3 μm 程度、深さは 30 nm、クレータの周囲の高さは 200 nm であった。

次に、複合酵素固定化電極の電気化学的な特性評価を行った。図 C-6 に、2 種類の酵素(D_p

および GDH) および AEACPVK₃ 固定化電極を用いた固定化メディエータの CV を示す。NADH およびグルコース添加前(a)には、固定化された AEACPVK₃ の酸化・還元電流が観測された。0.5 mM NADH 添加後、わずかに還元電流が減少し酸化電流は増加した。これは、Dp の酵素反応による NADH の酸化反応に伴う AEACPVK₃ の電極—Dp 間でのレドックスサイクリングに起因する。この段階において、

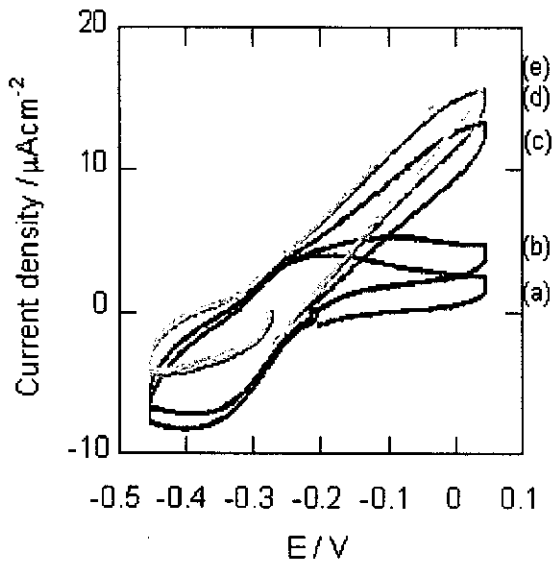


図 C-6 複合酵素およびキノン系メディエータ固定化電極の CV. 測定溶液: (a) 0 mM NADH, 0 mM グルコース, (b) 0.5 mM NADH, 0 mM グルコース, (c) 0.5 mM NADH, 2.0 mM グルコース, (d) 0.5 mM NADH, 5.0 mM グルコースおよび (e) 1.0 mM NADH, 5.0 mM グルコース.

固定化された AEACPVK₃ および Dp が有効に機能していることが確認された。ここに、2.0 mM グルコースを添加すると、さらなる還元電流の減少と酸化電流の増加が観測された。これは、図 A-3 に示す酵素反応が固定化膜中で進行していることを示唆している。すなわち、NADH が Dp—GDH 間の、AEACPVK₃ が電極—Dp 間の電子伝達物質として機能し、グルコースの酸化反応を触媒している。グルコースの酸化により放出された電子は、GDH を

介して NAD⁺ に渡り NADH によって運ばれる。さらに、Dp を介して酸化型メディエータである AEACPVK₃ に渡り還元型メディエータ (ヒドロキノン類) によって電極上に運ばれている。以上より、固定化された酵素およびメディエータが機能していることが示唆された。さらに、グルコースおよび NADH を添加 (図 C-6(d) および (e)) して濃度を増加させたところ、触媒電流のわずかな増加が観測された。酵素反応速度が、基質の濃度増加に伴って飽和値に近づくためである。

図 C-7 に、5 μA/cm² 定電流通電時のポテンシオグラムを示す。NADH およびグルコースを添加前 (図 C-7(a)) には、通電すると開回路電位から正の方向に急激な電位シフトが観測された。これは、電極表面上における水の酸化電位 (1 V 以上) へのシフトを示唆している。この系においては、強制的に酸化反応を電極上で進行させているため、電極表面上で電子を受容する必要がある。よって、この系において電極表面上で最も容易に電子を放出する物質である水の酸化反応が起こる。ここに、0.5 mM NADH を添加すると、通電に伴う電位低下が緩やかになった。これは、酵素反応により生成された還元型メディエータ (AEACPVK₃ のヒドロキノン型) が、電極上で酸化され、電子の放出を担っているため、電位を AEACPVK₃ の酸化還元電位近傍に保持できる。さらに、2.0 mM グルコースを添加すると、複合酵素反応が膜中で進行しメディエータのレドックスサイクリングが起こり電極電位をさらに負に保持させることが可能になった。NADH およびグルコース濃度を増加させると、わずかに通電時の電位は負にシフトした。電極表面上に固定された AEACPVK₃ が、酵素反応と電極反応のレドックスサイクリングにより十分再生されていることが示された。

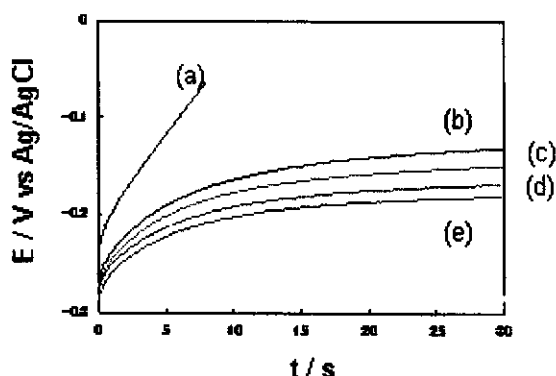


図 C-7 定電流通電時における複合酵素およびキノン系メディエータ固定化電極の分極挙動. 通電電流: $5.0 \mu\text{A}/\text{cm}^2$. 測定溶液: (a) 0 mM NADH, 0 mM グルコース, (b) 0.5 mM NADH, 0 mM グルコース, (c) 0.5 mM NADH, 2.0 mM グルコース, (d) 0.5 mM NADH, 5.0 mM グルコースおよび (e) 1.0 mM NADH, 5.0 mM グルコース.

D. 考察

AQS, VK_3 および FcOH の電気化学的評価を CV にて行ったところ, Dp -電極間のメディエータとして VK_3 が最も有効であると考えられる. 電池の出力密度は, アノードとカソードの電位差および反応速度に起因する電流量の積であるため, アノードのメディエータとして, 酸化還元電位が十分に負で (Dp の反応中心である FMN の酸化還元電位より正であることが条件), 反応速度が大きいことが望まれる. AQS はその酸化還元電位が Dp の活性中心である FMN の酸化還元電位に最も近いが, 速度定数が最も小さいため反応速度が遅い. また, FcOH は速度定数が大きく反応速度は速いが, 酸化還元電位が正であり電圧をロスする. VK_3 の酸化還元電位は, AQS のそれと比較して正であるため, わずかに電圧をロスするものの, 反応速度は FcOH に匹敵するため最も有効なメディエータとして機能すると考えられる.

3 種類の VK_3 誘導体 (CPVK_3 , AEACPVK_3 および APVK_3) の中で最も反応速度定数が大きかった AEACPVK_3 を Dp とともに電極上に固定化したところ, NADH 存在下において触媒電流を観測できた (図 C-3). これは, Dp の酵素反応による NADH の酸化反応に伴う, 固定化 AEACPVK_3 の還元反応に起因している. Dp および AEACPVK_3 固定化電極では, NADH を添加すると電気化学反応を進行させなくても酵素反応は起こる. よって, 酵素反応が効率的にスムーズに進行すると, 電極表面上の膜内に固定化された AEACPVK_3 はすべて還元されると考えられる. 例えば, 図 C-1(c) に示した VK_3 の CV では, NADH 添加後に還元電流の完全な消失が観測され, 電極表面上において, すべての VK_3 分子が酵素反応により還元されていることを示している. しかし, 還元電流は NADH 添加後に減少したが, 完全に消失せずわずかに残った. これは, 膜内に存在する AEACPVK_3 は完全に還元されておらず, 膜内に酸化体の状態で残存していることを意味している. すなわち, 膜内に固定化された AEACPVK_3 と Dp 間の反応速度が遅い, または, 固定化によって酵素から電子を受け取れない分子状態にあると推測される. 今後, 固定化されたメディエータの酵素反応および電極反応を効率的に進行させる固定化法を構築する必要がある.

E. 結論

電池の出力密度の向上を目的に, キノン系メディエータ分子の CV による電気化学特性の評価と $\text{Dp}_{\text{red}} - \text{M}_{\text{ox}}$ 間の反応速度定数 $k_{\text{cat, ox}}/K_M$ から反応速度論的解析を行った. 固定化可能な官能基 (アミノ基) を有する VK_3 誘導体分子が有効である結果を得た. Dp および AEACPVK_3 固定化電極を作製し CV 測定を行ったところ, 典型的な酵素触媒電流を得るこ

とができた。さらに、Dp および GDH 固定化電極を作製し、酵素の触媒反応を利用したグルコースの酸化を達成した。また、定電流 (5.0 $\mu\text{A}/\text{cm}^2$) 通電時の CP 測定から、1.0 mM NADH, 5.0 mM グルコースを添加すると -0.2 V の電位を保持できることから複合酵素およびメディエータ (AEACPVK₃) 固定化電極が、生物燃料電池のアノードとして機能することがわかった。今後は、このアノード電極をカソードと組み合わせて生物燃料電池を構築し、負荷に接続して燃料電池としての性能評価を行う。また、メディエータの固定化量や酵素活性の定量的計測を指標とし、高機能性を有する複合酵素修飾電極の構築を続ける。

F.健康危険情報

なし

G.研究発表

G-1.論文

1. Intercellular Ca^{2+} Imaging for Micropatterned Cardiac Myocytes. H. Kaji, K. Takoh, M. Nishizawa, T. Matsue, *Biotech. Bioeng.*, **2003**, 81, 748-751.
2. A Valveless Switch for Microparticle Sorting with Laminar Flow Streams and Electrophoresis Perpendicular to the Direction of Fluid Stream. T. Takahashi, S. Ogata, M. Nishizawa, T. Matsue, *Electrochem. Commun.*, **2003**, 5, 175-177.
3. Imaging of Immobilized Enzyme Spots by Scanning Chemiluminescence Microscopy with Electrophoretic Injection. Y. Hirano, Y. Mitsumori, D. Oyamatsu, M. Nishizawa, T. Matsue, *Biosens. Bioelectron.*, **2003**, 18, 587-590.
4. Electrochemical / Photochemical Formation of Enzyme Patterns on Glass Substrates using a Scanning Electrochemical / Confocal Microscope. D. Oyamatsu, N. Kanaya, H. Shiku, M. Nishizawa, T. Matsue, *Sens. Actuat. B*, **2003**, 91, 199-204.
5. A microbial chip for glucose sensing studied with scanning electrochemical microscopy (SECM). T. Kaya, K. Nagamine, D. Oyamatsu, M. Nishizawa, T. Matsue, *Electrochemistry*, **2003**, 71, 436-438.
6. Area-selective immobilization of multi enzymes by using the reductive desorption of self-assembled monolayer. D. Oyamatsu, N. Kanaya, Y. Hirano, M. Nishizawa, T. Matsue, *Electrochemistry*, **2003**, 71, 439-441.
7. Scanning Electrochemical Microscopy (SECM)-Based Drug Sensitivity Test for Cell Culture Integrated in Silicon Microstructures. Y. Torisawa, T. Kaya, Y. Takii, D. Oyamatsu, M. Nishizawa, T. Matsue, *Anal. Chem.*, **2003**; 75, 2154-2158.
8. Analysis of Protein Adsorption and Binding at Biosensor Polymer Interfaces Using X-ray Photon Spectroscopy and Scanning Electrochemical Microscopy. A. Glidle, T. Yasukawa, C. S. Hadyoon, N. Anicet, T. Matsue, M. Nomura, J. M. Cooper, *Anal. Chem.*, **2003**, 75, 2559 – 2570.
9. Monitoring the Cellular Activity by Scanning Electrochemical Microscopy (SECM) of a cultured single cell. A comparison with fluorescence viability

- monitoring. T. Kaya, Y. Torisawa, D. Oyamatsu, M. Nishizawa, T. Matsue, *Biosens. Bioelectron.*, **2003**, *18*, 1379-1383.
10. Characterization of Local Respiratory Activity of PC12 Neuronal Cell by Scanning Electrochemical Microscopy. Y. Takii, K. Takoh, M. Nishizawa, T. Matsue, *Electrochim. Acta.*, **2003**, *48*, 3381-3385.
 11. Imaging of Enzyme Activity by Scanning Electrochemical Microscope Equipped with a Feedback Control for Substrate-Probe Distance. D. Oyamatsu, Y. Hirano, N. Kanaya, Y. Mase, M. Nishizawa, T. Matsue, *Bioelectrochemistry*, **2003**, *60*, 115-121.
 12. Pharmacological characterization of micropatterned cardiac myocytes. H. Kaji, Y. Takii, M. Nishizawa, T. Matsue, *Biomaterials*, **2003**, *24*, 4239-4244.
 13. Characterization of Peroxidase Activity of Single Algae Protoplasts by Scanning Electrochemical Microscopy. H. Zhou, S. Kasai, H. Noda, H. Ohya, H. Shiku, T. Matsue, *Bull. Chem. Soc. Jp*, **2003**, *76*, 1757-1762.
 14. Localized chemical stimulation to micropatterned cells using multiple laminar fluid flows. H. Kaji, M. Nishizawa, T. Matsue, *Lab on a Chip*, **2003**, *3*, 208-211.
- G-2.学会発表
1. 細胞デバイス, 末永智一, 第2回日本再生医療学会大会シンポジウム, (2003年3月11日)
 2. 酵素固定化マイクロおよびナノ電極を組み込んだマイクロ流体システムの作製と電気化学的評価, 安川智之, Andrew Glidle, 野村昌行, 末永智一, Jonathan M Cooper, 第70回電気化学会, (2003年4月1日)
 3. グルコース/O₂型生物燃料電池の開発研究:キノン系メディエータを用いた複合酵素アノードの調製と評価, 佐藤淳一, 大橋拓矢, イスラム カムルル, 小谷松大祐, 西澤松彦, 末永智一, 第70回電気化学会, (2003年4月1日)
 4. 走査型化学発光顕微鏡 (SCLM) による抗体アレイチップの評価, 平野 悠, 小谷松大祐, 西澤松彦, 末永智一, 第70回電気化学会, (2003年4月1日)
 5. 酵素固定化マイクロ電極を組み込んだ電気化学センシングチップの開発, 安川智之, Andrew GLIDLE, 野村昌行, 末永智一, Jonathan M. COOPER, 第7回化学とマイクロ・ナノシステム研究会 (2003年4月11日)
 6. Imaging of Protein Microarray by Scanning Electrochemical Microscopy / Scanning Chemiluminescence Microscopy (SECM/SCLM), Y. Hirano, N. Motochi, Y. Mitsumori, D. Oyamatsu, M. Nishizawa, T. Matsue, The First International Congress on Bio-Nanointerface, (2003. 5. 22)
 7. Characterization and Imaging of Cellular Devices with a Nanoelectrode Probe, T. Matsue, The First International Congress on Bio-Nanointerface, (2003. 5. 23)
 8. 抗体アレイチップの高感度電気化学測定法の開発, 末永智一, 第64回分析化学討論会 (2003年5月24日)
 9. フタル酸エステルの電気化学イムノアッセイを用いた測定法の開発, 平野 悠, 安川智之, 珠玖 仁, 末永智一, 免疫測定法研究会 (2003年6月21日)
 10. 電気化学リソグラフィーを利用した細

- 胞のパターンニングとその評価, 末永智一, エレクトロオーガニックケミストリー討論会 (2003 年 6 月 26 日)
11. Fabrication of Cellular Devices for Electrochemical Biosensing, T. Matsue, H. Kaji, Y. Takii, M. Nishizawa, World Congress on Medical Physics and Biomedical Engineering, Sydney, Australia, (2003. 8. 28)
 12. Characterization of Single Embryos with SECM, T. Matsue, H. Shiku, 226th American Chemical Society National Meeting, New York (2003. 9. 11)
 13. キノン系メディエータを固定した酵素修飾電極の作製と生物燃料電池への応用, イスラム カムルル, 大橋拓矢, 安川智之, 珠玖 仁, 西澤松彦, 末永智一, 電気化学秋季大会 (2003 年 9 月 12 日)
 14. シアフォース電気化学顕微鏡を利用したプロテインチップの高解像イメージング, 真瀬佳朗, 平野 悠, 小谷松大祐, 安川智之, 珠玖 仁, 末永智一, 表面技術協会第 108 回講演大会 (2003 年 9 月 18 日)
 15. マイクロ・ナノ電極システムによる細胞機能の探索と応用, 末永智一, 第 14 回バイオフィロントニア講演会 (2003 年 9 月 18 日)
 16. Fabrication and Characterization of Cellular Patterns with Microelectrode Systems, T. Matsue, H. Kaji, T. Kaya, M. Nishizawa, 204th Meeting of The Electrochemical Society, Orland, USA, (2003. 10. 13)
 17. マイクロ・ナノ電極を用いたバイオセンシング, 末永智一, 学術審議会分子ナノテクノロジー第 174 委員会 第 7 回研究会 (2003 年 10 月 20 日)
 18. 走査型電気化学顕微鏡による乳癌細胞の増殖モニタリングと制癌剤感受性試験への応用, 鳥澤勇介, 珠玖 仁, 安川智之, 西澤松彦, 末永智一, 生体機能関連化学部会 (18 回)・バイオテクノロジー部会 (7 回) 合同シンポジウム (2003 年 10 月 13 日)
 19. マイクロ電極システムを用いた細胞デバイスの作製と評価, 末永智一, 第 62 回表面技術アカデミック研究会討論会 (2003 年 11 月 12 日)
 20. マイクロ細胞デバイスの開発, 末永智一, 日本分析化学会北海道支部 2004 年冬季研究発表会 (2004 年 2 月 3 日)
- その他多数
- ### G-3.新聞報道
1. 極微量たんぱく質計測 装置も小型化, 日経産業新聞 (2003 年 6 月 13 日)
 2. 微量たんぱく質を計測, 東北大など, 血液量 1/1000 で可能, 日本経済新聞 (2003 年 6 月 13 日)
 3. 極微量タンパク質の電気化学検出に成功, 日経プレスリリース (2003 年 6 月 13 日)
 4. 極微量たん白質, 電気化学検出法を開発, 東北大など, 2 年で小型装置実用, 化学工業日報 (2003 年 6 月 13 日)
 5. たんぱく質量, 酵素反応で測定, 第一化学東北大と技術開発, 河北新報 (2003 年 6 月 13 日)
 6. タンパク質正確測定, 検出法開発, 疾患の早期発見に期待, 東北大など研究グループ 日刊工業新聞 (2003 年 6 月 13 日)
 7. チップ基板上の細胞, 微小電極で任意の場所に固定, 異なる種類書き込み, 日刊工業新聞 (2003 年 12 月 16 日)
 8. 胚や培養細胞の成長観察, 生きたまま迅速・簡単に, 授精の成否判定効率化, ヒトへの応用も, 日本工業新聞 (2003 年 11 月 21 日)

H.知的所有権の取得状況

1. 燃料電池 出願日平成 14 年 3 月 22 日
出願番号：特願 2002-079918、発明者：
板橋武之，赤星晴夫，末永智一，西澤松
彦，出願人：(株) 日立製作所

厚生労働省科学研究補助金（萌芽的先端医療技術推進事業）
平成15年度分担研究報告書

ナノテクノロジーによる機能的・構造的生体代替デバイスの開発
Ⅱ. ナノ分子操作技術による血液界面代替デバイスの開発研究
On Surface テクノロジーの開発と組織工学デバイスの開発

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：

血管内皮前駆細胞を含む幹細胞やES細胞を利用して細胞の供給源の確保が図られ、様々な組織工学的アプローチにより *in vitro* においてハイブリッド人工血管の作製が提案されている。免疫などの問題を考慮すれば移植物は全て自家組織から構成されることが最も望ましい。一方、生体内に人工物を埋入すると生体防御機構の働きにより埋入物の周囲にカプセル状の組織形成が起こることは古くから知られており、既存の人工血管を Scaffold として生体内において血管壁構造の再構築が試みられている。本研究ではこのカプセル化を利用して自己組織のみからなる血管様管状組織体を作成し、人工血管への応用を検討した。埋入物（鑄型）としてポリ塩化ビニル、ポリエチレン、シリコン（Si）、ポリフルオロエチレン、ポリメチルメタクリレート（PMMA）、ポリウレタンなどの高分子の円柱（直径3mm、長さ2cm）を兔背部の皮下に埋植した。所定期間後に摘出し、組織切片を顕微鏡で観察し、力学的性質をコンプライアンス（stiffness parameter: β 値）で評価した。いずれの高分子を埋植しても2週間程度で周囲に管状の組織体が形成された。埋入一ヶ月後には組織の厚さはいずれの場合も数百 μm であった。得られた管状組織体の内腔に水圧を徐々に200mmHgまで付加させても破断することはなかった。管外径は埋入剤に依存し数 数十%の範囲で拡張した。内圧と管外径の相関関係は数回再現性良く繰り返された。組織の構成成分は、繊維芽細胞以外は、ほとんどがコラーゲン繊維であったが、一部弾性繊維の出現と、多数の血管新生を認めた。一般にSiでは硬くのびにくく、PMMAで柔軟な組織が形成される傾向にあった。加えて、埋入物の種類、期間による形成組織の構成成分、寸法、強度の変化を体系的に調べるとともに、生理活性物質の共存による組織形成の加速化について検討した。移植部位に適した力学的適合性を有する人工血管を患者の体内にて患者の組織や細胞を用いて患者自身が作成できる、分担研究者が提唱する *in situ* オーダーメイド医療が実現されつつある。

A. 研究目的

移植における組織や臓器は、免疫反応などの問題を考慮すると全て自家組織から構成されることが望ましい。しかし、血管などにおいても移植に相応しい組織体を常時確保することは困難である。例えば、冠動脈狭窄や閉塞にともなう狭心症や心筋梗塞に対する外科的治療として、患者自身の血管をグラフトとして用いるバイパス術が行われている。グラフトには、下肢の大伏在静脈や内胸動脈が広く一般に用いられている。不足する場合には、胃大網動脈や橈骨動脈なども検討されているが、自己の組織量は有限であるため長期の開存性に優れたグラフトを必ずしも十分量を確保することは不可能である。

再生医療は、21世紀の来るべき次世代の新しい医療を牽引し、発展させる上で中心的な役割を果たすことが最も期待されている最先端医療分野の一つである。内径 5mm 以下の小口径人工血管の領域において、大血管において臨床応用されているダクロンや PTFE などの人工素材のみからなるグラフトは、抗血栓性などが不十分であるため、短期間のうちに閉塞を来す。そこで人工素材に加えて生体素材を組み合わせたいわゆるハイブリッド型的人工血管の開発が進められている。これまで、採取した自己血管壁の構成細胞をコラーゲンゲル内に段階的に包埋させた後に培養することで、*in vitro* において生体の血管壁に近い階層性の形態を持たせる技術が開発され、直径 4mm のグラフトにおいてイヌ頸動脈への自家移植により極めて高い開存性が報告されている。また、自家大伏在静脈の血管壁構成細胞の混合浮遊液を播種・培養した、ポリ乳酸系高分子からなる管状スポンジは、ヒト肺動脈を再建することに成功し、組織工学的手法を応用した再生医療の可能性が大きく高まった。また、最近では血管内皮前駆細胞を含む幹細胞や ES 細胞などの利用によって細胞の供給源の確保がはかられ、先と同様な *in vitro*

での組織工学的アプローチによってハイブリッド型人工血管の作製が種々提案されている。

しかし、移植には自己の細胞やマトリックス成分のみで構成される移植組織が物性や形状を含めて自由に設計できれば理想と考えられる。本研究では自家の細胞とマトリックス成分を用いて自己の体内において自らの移植血管組織を自在に設計・作製できる新しい組織工学技術の開発について検討する。作業原理は人工物を生体内に埋入した際に生体防衛機構の働きによって埋入物の周囲に繊維芽細胞とそれが産出するコラーゲン繊維によって主に構成されるカプセル状の組織体を利用するものである。このカプセル化の現象は、1930年代より知られており、Preirce らによってこのカプセル状の組織体を管状化させ、人工血管として応用する研究が始めて行われた。また、1960年代後半に Sparks らはカプセル状組織体とダクロン製人工血管とを組み合わせる臨床応用が積極的に検討された。これは以下の方法による。まず、シリコーンロッドを挿入したダクロンメッシュ管を患者の皮下組織内に埋入させる。一定期間放置しておくことダクロンメッシュの周囲を自家組織が覆う。ここで内部のシリコーンロッドを抜去すると自家組織管が得られる。管の両末端をそれぞれ閉塞した動脈に吻合することで動脈バイパスとして応用された。さらに、最近では Campbell らによってカプセル状の管状組織体のみでの人工血管への応用が検討されている。シリコーンロッドをラット、マウス、兎あるいはイヌの腹腔内に数週間留置すると繊維芽細胞とコラーゲン繊維からなる中膜壁の外側に Mesothelial cells の皮膜層を有する管状組織体が形成される。得られた組織体をめくり返すと Mesothelial cells 層が内腔面となり抗血栓性が付与される。この組織体 (3-5mm) をグラフトとして自己に移植すると、数ヶ月に渡って高い開存性が報告され、カプセル状の組織体のみでも人工血管への応用の可能性が示された。

一方、小口径人工血管の慢性期における開存性において、人工血管と宿主血管との力学的な適合化（コンプライアンスマッチング）の必要性が議論されている。閉塞を来す内膜肥厚の原因の一つとしてコンプライアンスのミスマッチが指摘されている。実際、高分子エラストマーであるポリウレタンのチューブを多孔化させコンプライアンスを調節することで、内膜肥厚が大幅に抑制されることが実証されている。

本研究では、種々の棒状の高分子基材を兔背部皮下に埋入させ、形成されるチューブ状のカプセル組織体（バイオチューブ）の構成成分を組織学的に調べると共に、耐圧性や拍動の追従性、コンプライアンスを含めた力学的性質を調べ、移植部位に応じた人工血管の力学的設計ならびに形状設計の可能性について議論する。

B. 研究方法

B-1. バイオチューブの作製

実験動物には、体重 2~2.5kg の 9 匹のニュージーランド白色家兔を用いた。麻酔は、ケタミン（62.5mg/kg）とキシラジン（8.3mg/kg）を併用した。兔の背中を剃り、イソジンにて消毒した。背部に 6 カ所の約 1cm の切開創を作製し、切開創毎の皮下にポケットを作製した。各ポケット内に長さ 20mm、直径 3mm の円柱棒を挿入した。棒の基材として、低密度ポリエチレン（PE）、軟性ポリ塩化ビニール（PVC）、ポリフルオロエチレン（PFA）、シリコーン（Si）、ポリメタクリル酸メチル（PMMA）、ポリウレタン（PU）の 6 種類を用いた。1、2、3 月後にバイオチューブで皮膜化された埋入物を皮下より摘出し、皮膜の一部を切開し、内部の基材を取り出し、バイオチューブを得た。

B-2. 機械的強度の測定

200mmHg までの内圧負荷によって、バイオ

チューブの力学的強度を調べた。また、内圧-外径相関関係を調べることによって stiffness parameter (β) を求め、内圧 100mmHg 近傍でのコンプライアンス（力学的適合性）を評価した。

C. 研究結果

C-1. バイオチューブの形成

兔背部に作製した切開創から、基材とした高分子の丸棒を皮下内に挿入した。高分子の材質として PMMA および Si、PU、PE、PVC、PFA の 6 種類を用いた。各高分子基材は、全ての兔について、背部に作製した 6 カ所の切開創毎に 1 種類ずつ挿入された。埋入 1 月後に背部を切開すると、全ての高分子基材は皮下粘膜組織に覆われて皮下組織表面に包埋されていた（図 1 A）。しかし、各基材は粘膜とは接着しておらず、容易に摘出することが可能であった（図 1 B）。摘出した基材の周囲には、薄くて比較的硬いカプセル状の組織体が形成されていた。この組織体の一端を切開すると、内部の基材と組織体は全く接着しておらず、組織体に損傷を与えることなく内部の基材を容易に抜くことができ、チューブ状の組織体（バイオチューブ）が得られた。このバイオチューブの外側面は皮下の粘膜組織が付着しており、少し乱雑であったが、内腔面はバイオチューブの組織体のみからなる極めて平滑な面を有していた。埋入 3 月後においても、全ての高分子基材はカプセル化した組織体で覆われ、皮下粘膜組織内に包埋されていた。得られたバイオチューブは埋入 1 月に比べてしっかりと管腔形状を保った。

バイオチューブの円周方向の断面構造を組織学的に観察した。PMMA 製の丸棒を 1 月埋入後に得られたバイオチューブの内径は、用いた基材の外径とほぼ同じ約 3mm であった（図 2）。壁の厚さはほぼ均一であり、平均約 110um

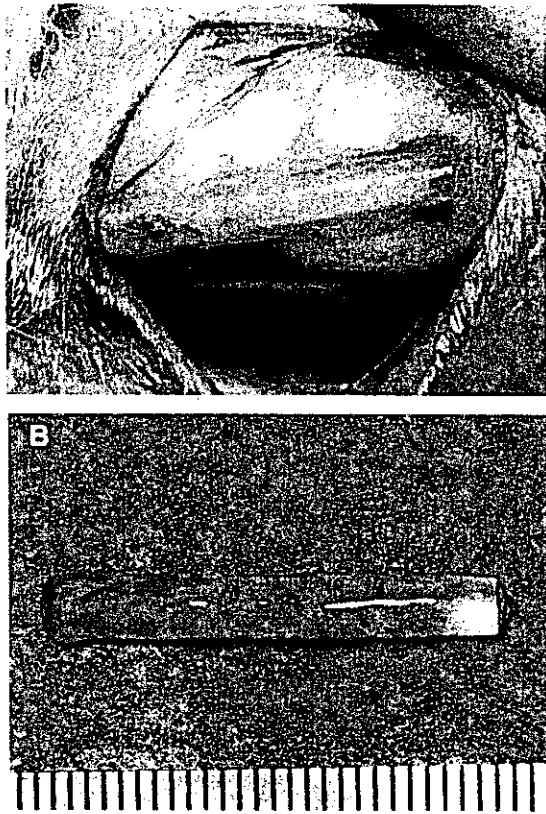


図1. PMMA 製丸棒を兔皮下に挿入し、1月後にPMMA棒の周囲に形成されたバイオチューブ (A) とその摘出後 (B)。

であった。壁の構成成分は主としてコラーゲンであり、細胞成分はほとんどが繊維芽細胞であった (図3)。埋入3月後では、内径は埋入1月とほとんど変化なかったが、壁の厚さはほぼ均一に約2倍に増加した (図4)。各高分子基材の3ヶ月の埋入によって形成されたバイオチューブの壁構造を比較すると、PFAではバイオチューブの壁厚は薄く、コラーゲン繊維が疎であり、細胞成分を比較的多く含んでいた (図5)。Siの場合では、チューブの壁厚は薄い、緻密な網目構造を持ったコラーゲン繊維が積層されており、細胞成分はほとんど認めなかった。一方、PMMA、PU、PVCの場合、いずれも中程度の壁厚が形成され、比較的大きなコラーゲン繊維の網目構造が形成された。いずれも細胞成分が豊富で、

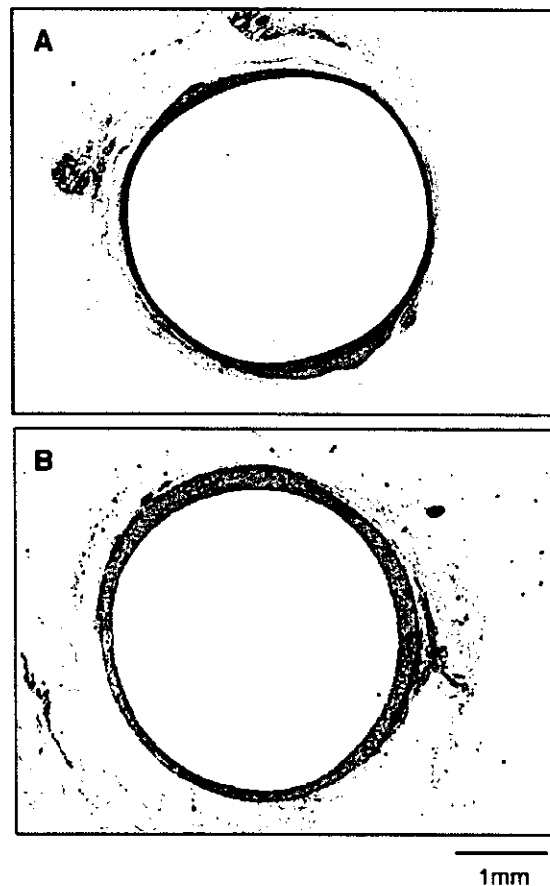


図2. PMMA 製丸棒を兔皮下に挿入し、形成されたバイオチューブの短軸方向での組織断面。移植期間1月 (A) と3月 (B)。

特にPUとPVCでは炎症性細胞が多数含まれていた。PEの場合には壁厚は極めて厚かったが、コラーゲン繊維の秩序だった網目構造はほとんど形成されていなかった。壁の厚さを移植期間で比較すると、埋入1月後において、SiとPFAの場合では、約70 μm であり、PU、PVC、PMMAでは約100 μm であった。PEにおいて最も厚く約200 μm であった。埋入3月後には、PFAを除く全ての基材において、形成されたチューブの厚さは大幅に増大した。2月間での増大量は約1.5倍から2倍であった (図4)。

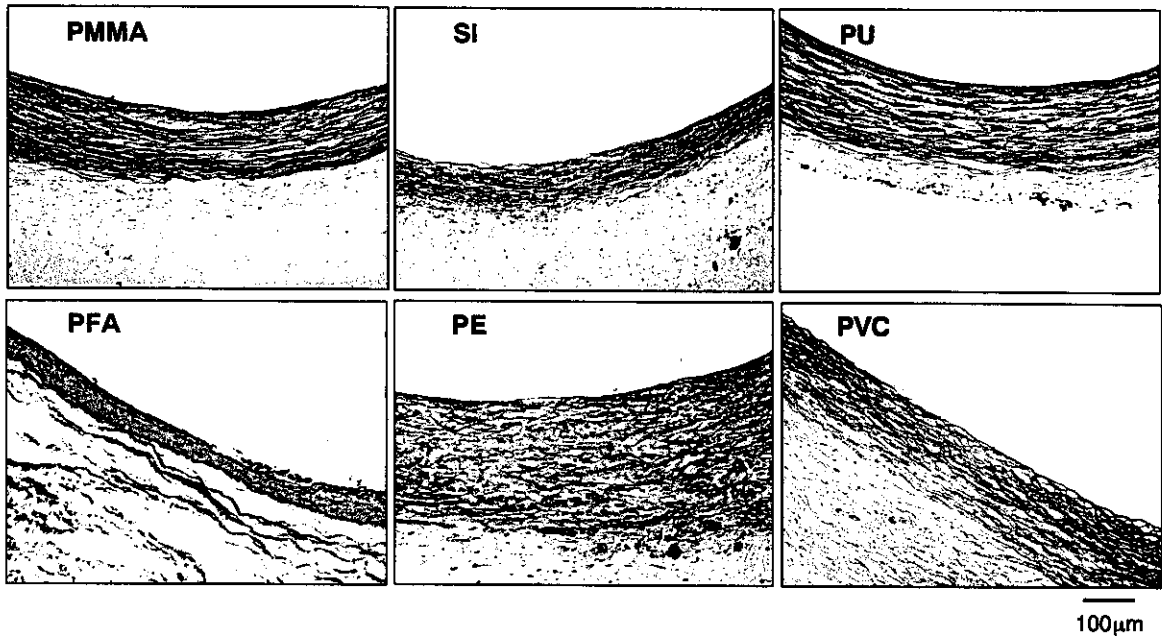


図 3. 各高分子丸棒の周囲に形成されたバイオチューブの短軸方向での組織断面

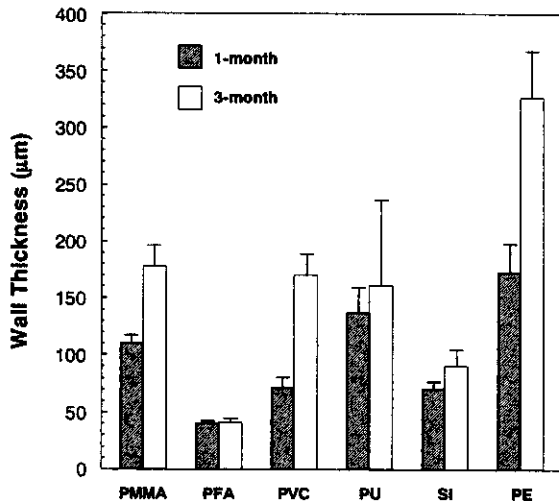


図 4. 各高分子丸棒の周囲に形成されたバイオチューブの壁厚の経時的変化

C-2. バイオチューブの力学的性質

バイオチューブの両端を閉鎖し、内腔内に連続的に水圧を付加することによりバイオチューブの管外径変化を測定した。Si 基材に形成されたバイオチューブにおいて、管外径は

低圧の付加によって少し拡張したが、約 20mmHg 以上の付加では大きな変化は無かった (図 6)。一方、PMMA の場合、管外径の拡張性は、低圧域において大きく、高圧域まで徐々に持続した。いずれの場合も 200mmHg の内圧を付加しても破断することは無く、耐圧性を有していた。200mmHg の水圧付加時の管外径の拡張率は Si で約 5%、PMMA で約 25%であった。

PMMA に形成されたバイオチューブに関して、0~200mmHg まで内腔内の水圧の負荷・除荷を繰り返す、管外径の変化を調べた (図 7)。水圧付加前には約 2.7mm であった管外径は数十 mmHg の水圧付加によって約 3mm に拡張され、その後、経時的な内圧付加によって徐々に拡張を続け、内腔圧 200mmHg 時には管外径は約 3.2mm となった。続いて、内腔内の水圧の除圧を始めると管外径は徐々に減少し、数十 mmHg 時に約 3mm まで減少し、その後、急速に減少し、0mmHg 時には、水圧負荷前と同じ約 2.7mm へと戻った。この内腔圧の負荷に伴う管外径の変化は何度か繰り返してもほぼ

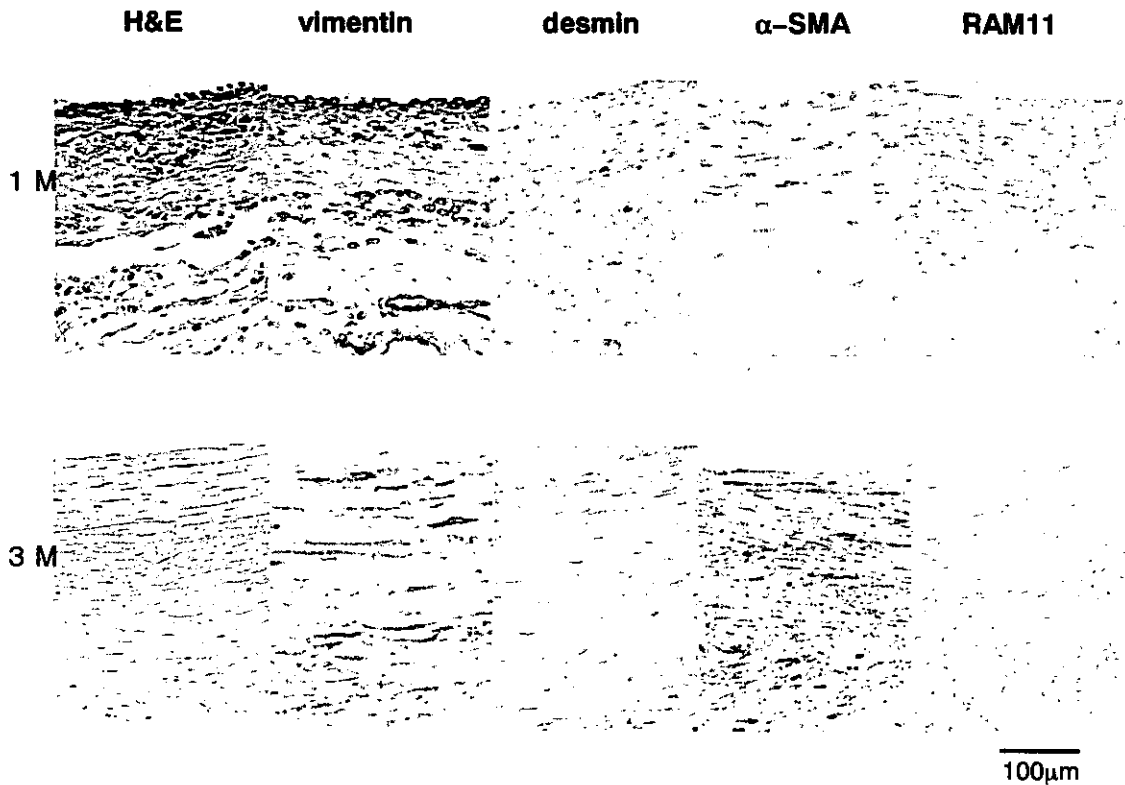


図5. 各高分子丸棒の周囲に形成されたバイオチューブの組織の免疫染色像

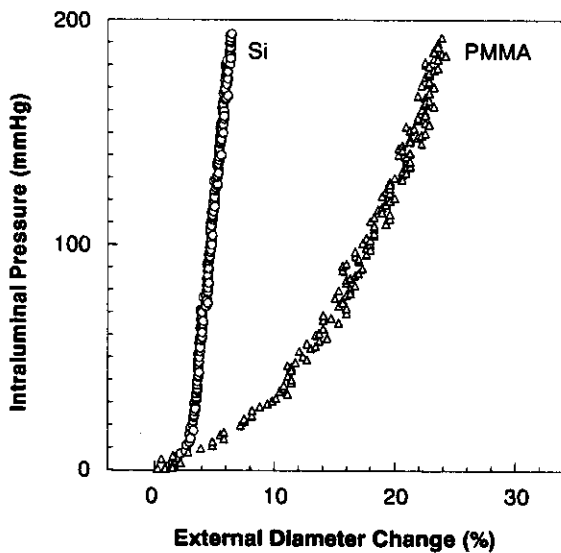


図6. Si棒とPMMA棒の周囲に形成されたバイオチューブの力学的性質(力学的強度)の評価。内圧負荷によるバイオチューブ外径の変化

同じ挙動を繰り返した。他の基材で作製されたバイオチューブにおいても基本的に同じ変化挙動を繰り返した。

管外径と内腔圧の関係から相対圧力の対数値 ($\ln(P/P_s)$) と相対外径 (D/D_s) の関係を求めると、生理的圧力の範囲 (60~140mmHg) において線形関係を有していたので、基準内圧 (100mmHg) 近傍におけるグラフの傾きからコンプライアンス (β) 値を求めた (図8)。包埋1月においてSiに形成されたバイオチューブは最も大きな値 (約55) を示し、PMMA、PE、PVCの順に減少し、バイオチューブの柔軟性が増した。PMMAに形成されたバイオチューブはヒト冠動脈に近いコンプライアンスを示し、PEではヒト大腿動脈に、また、PVCではヒト総頸動脈に近い値を示した。また、PMMAにおいて形成されたバイオチューブにおいて、包埋1月後のコンプライアンス値は約30で

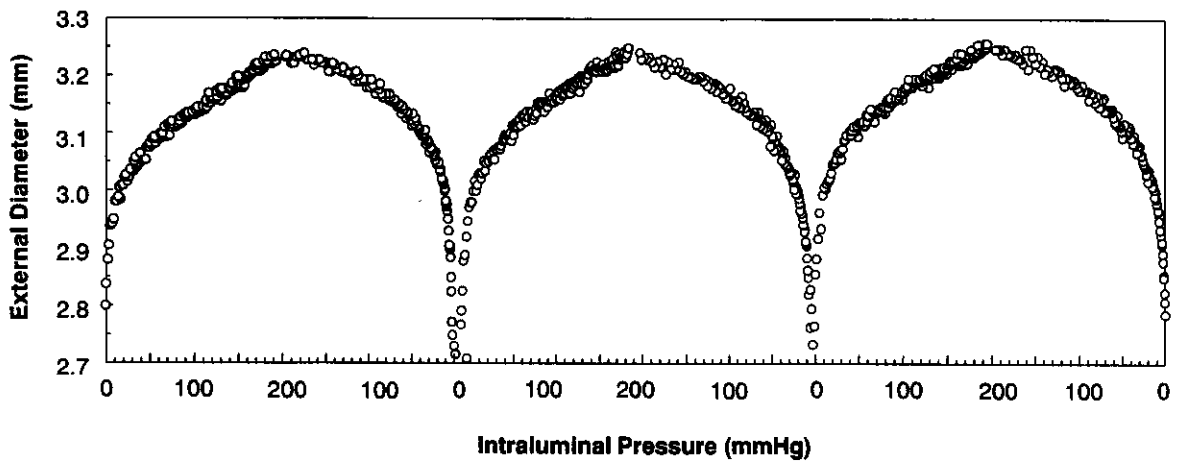


図7. PMMA 棒の周囲に形成されたバイオチューブの力学的性質（拍動性）の評価。連続的な内圧負荷によるバイオチューブ外径の変化

あったが、包埋3月後には約80とほぼ直線的に増加した（図9）。

D. 考察

人工物など生体にとっての異物を皮下などの生体内に埋入させると、生体防衛機構の働きによって異物を排除しようとする動きが起こる。その代表的なものの一つは分解であり、もう一つはカプセル化である。異物が炎症性の物質を放出する場合、異物の周囲には白血球などの炎症性細胞の集積が起こり、遅れてマクロファージが浸潤してくる。これらの細胞によって異物は貪食を受け分解される。一方、炎症性の低い異物の場合、異物の周囲で繊維芽細胞の集積が起こり、それがコラーゲンを産出して、異物を包み込むようにコラーゲン繊維からなるカプセルが形成される。このカプセル形成の現象に関しては古くから良く知られている。しかし、人工物と形成されるカプセルの量や物性などの相関関係は詳しく調べられていない。従って、どのような人工物を用いればどの様にカプセルが形成されるかなどの傾向に関しては系統だって説明

されていない。

Siは生体適合性の良い材料の一つとして知られ、医用材料として広く使用されている。このSiの基材を生体内に埋入するとカプセル化が起こることも経験的に良く知られている。チューブ状のSi基材を体内に埋入させると、Siの周囲に管状の組織体が形成される。この管状組織体は古くから血管の代替え物（人工血管）として検討され、ダクロン製人工血管などで補強され下肢において動脈バイパスとしての臨床応用が試みられた。この管状組織体は、移植初期には血管としての機能が獲得されているが、内腔面にはコラーゲン繊維と繊維芽細胞が露出しているため、多くの場合、短期間の内に閉塞が起こる。そのため、その後30年近くこの手法は全く忘れ去られた。しかし最近、抗血栓性が期待できるMesothelium細胞を、Si基材から得られた管状組織体の内腔面に配することが検討された。この処理を行うことによって動物実験で移植2月において約70%の比較的高い開存率が報告されている。抗血栓性処理を施すことで管状組織体のみで、血管としての機能のある程度果たすことが示された。

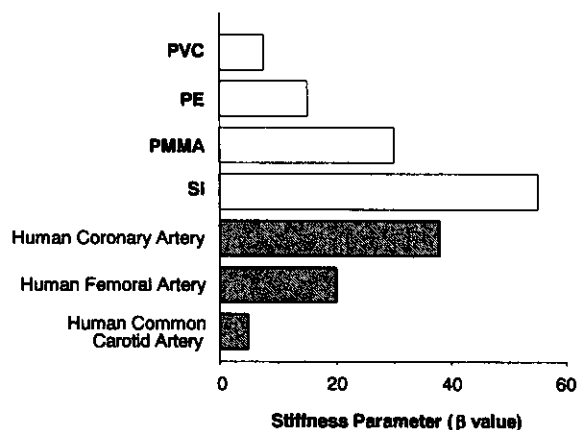


図8. 各種高分子棒を1月埋入後に形成されたバイオチューブの力学的性質（コンプライアンス）の評価。

我々は、*in vivo* tissue engineeringとも呼べる、このカプセル形成による管状組織体（バイオチューブ）の作製技術を、近年のサイトカイン工学やナノテクノロジーと組み合わせ、開存性の高い小口径人工血管を開発し、広く臨床応用することを目指している。カプセル化を利用すれば、患者の体内において、移植を目的とする血管部位の力学的性質や形状に最適設計されたバイオチューブを作製することが可能と考えられる。また、バイオチューブは自己の細胞と細胞外マトリックス成分からのみ構成されるため、それを用いた移植は、自家組織の移植と同等とみなせ、免疫拒絶反応が全く回避され、さらに移植後に体内において自己化され成長が期待される。加えて、移植片は患者の体内においてほぼ無尽蔵に作製することができるため、現在行われている自己血管を用いたバイパス術の最大の問題点の一つであるドナー血管不足がまったく解消される。

人工血管特に内径 5mm 以下の小口径人工血管の開存性に要求される性能として、1) 血圧に対する耐圧性、2) 移植初期の血栓性の閉塞を回避するための抗血栓性、さらに3)

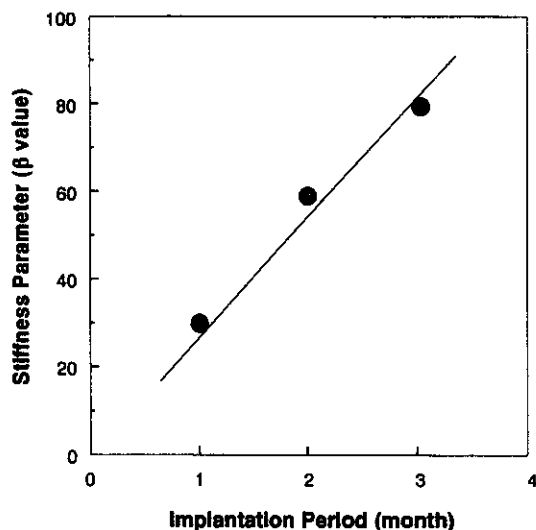


図9. PMMA 棒の周囲に形成されたバイオチューブの力学的性質（コンプライアンス）の評価。移植期間毎のコンプライアンスの変化

慢性期における内膜肥厚による閉塞を回避するためのコンプライアンスの適合化と拍動追従性を含めた力学的整合性、などがあげられる。本研究では、様々な汎用性高分子を基材として体内に埋め込み、材質に依存した組織形成能を調べ、人工血管に要求される上記の要求項目1と3に関して検討を行った。基材として用いた高分子は、疎水性の PMMA、PU、PVC、PE、Si、ならびに撥水性の PFA であり、いずれも医用材料として用いられている。これらを兔の皮下に埋入すると、1月後には全ての基材についてバイオチューブが形成された。バイオチューブは内腔面においては基材とは全く接着しておらず、また、外側面は粘膜炎組織に覆われて皮下組織内に包埋されていたが容易に剥離可能であり、バイオチューブは基材を含んだ形で皮下からバイオチューブに全く損傷を与えることなく摘出することができた。PFAを除いて、全てのバイオチューブは 200mmHg の内圧を付加しても破断することはなかった。得られたバイオチューブの壁は主としてコラーゲンの網目構造が形成され、

その中に繊維芽細胞が存在した。しかし、PFAではコラーゲン繊維の密度は低く、炎症性細胞が大多数を占め、ほとんどカプセル形成が起こらなかった。PFA表面では、蛋白質の吸着や細胞の接着が抑制されることが知られており、繊維芽細胞の接着が阻害され、カプセル形成が起こりにくかったと考えられる。コラーゲンの網目構造はPEでは乱雑に堆積していたが、PU、PVC、PMMAでは比較的大きな周期をもった網目構造が形成されていた。PUでは炎症性の細胞の浸潤も観察された。PUは血液適合性の良い材料として人工心臓の素材として用いられているが、人工血管として移植された場合には、しばしばその外側面において炎症に起因する肉芽形成が起こることが報告されている。PUは組織反応性の強い材質と考えられている。Siでは緻密なコラーゲンの網目構造が形成されていた。バイオチューブの壁の厚さは、PE>PU>PMMA>PVC>Si>PFAの順に大きく、いずれも移植期間に伴って増大した。一方、コンプライアンスは生理的血压下における力学的性質を表す指標であり、その値が小さいほど柔軟で柔らかいことを示している。PFAとPUを除く、コンプライアンスの大きさは、Si>PMMA>PE>PVCの順となった。従って、力学的な性質はチューブの壁の厚さと壁の内部構造の双方によって決定されることがわかる。Siから形成されたバイオチューブは比較的硬くしっかりとしていたのに対して、PMMAでは低圧域で伸縮性に富み、高圧域で伸びにくい、生体動脈に類似した力学的性質を示した。いずれも拍動に対する追従性は良好であった。PMMAを用いて包埋1月後に得られたバイオチューブは、ヒト冠動脈と近いコンプライアンスを示した。基材と埋入期間を選択することで移植部位に応じた力学的性質を有する人工血管を任意に設計することが可能となった。しかし、基材毎に形成されるバイオチューブの物性の違いに関してはよく分かっていない。原因として、1) 基材表面の化学組成、2) 基材表面の微細な物理構造、3) 基

材の力学的強度、4) 生化学的活性、などが考えられる。現在、基材をPMMAに統一して、その極表面(約数百nm)のみの化学組成を変化させた、表面グラフト化基材を表面ナノテクノロジーを用いて作製し、バイオチューブ形成に及ぼす表面化学の影響を調べ始めている。

本研究によって、生体血管との力学的性質を適合化させることが可能となった。これによって慢性期における内膜肥厚性の閉塞を抑制できることが期待できる。しかし、バイオチューブの形成には少なくとも1月間の包埋期間が必要である。従って、心筋梗塞など緊急を要する場合には対応することはできない。そこで、組織形成の促進化を目指して、基材表面へのサイトカインの固定化によるバイオアクティブ基材の設計を行っている。具体的には、b-FGFなどの細胞増殖因子の基材表面への固定化を検討している。また、さらに今後は移植初期の閉塞を抑制するために内腔面の抗血栓性処理を検討する必要がある。最も効果的なのは、バイオチューブ内腔面に血管内皮細胞を移植後早期に誘導させ、内腔面を完全に内皮化させることである。そのことをめざして、基材表面へのVEGFの固定化を検討している。VEGFの徐放化は新生血管の浸潤を促進し、末梢や心血管虚血に対する血管新生療法として有効であることが報告されている。我々の予備的な検討において、基材表面からVEGFを徐放化させることによって、バイオチューブの組織内に新生血管の誘導が促進されることが分かった。この新生血管を豊富に含んだバイオチューブを移植すれば、内腔面に内皮細胞が供給され、移植後早期に内皮化が獲得されると期待される。

本バイオチューブ作製法の利点として、形状を自由に設計できることもあげられる。埋入させる基材の形状を工夫すれば、その形状に添ってカプセル化が起こり、複雑な形状をしたバイオチューブが得られることになる。実際、予備的な検討において、分岐させた基

材を兔皮下内に埋入させると、分岐形状に応じたバイオチューブが得られることが分かった。目的とする移植部位に応じた形状の移植片を容易に作製することが可能となった。

バイオチューブ人工血管は、自己の細胞ならびに細胞外マトリックス成分を用いて、自己の体内において作製することができる。さらに、力学的性質や形状などを任意に設計することが可能であり、それらを宿主血管組織と適合化させることが容易である。供給限界は考慮する必要が無く、自家移植であるため免疫拒絶は問題ない、さらに、移植後に宿主血管と同様に成長することが期待され、移植血管として理想であると考えられる。今後は、先に示した表面設計を組み合わせてバイオチューブ作製法を確立させ、動物への移植実験をとおして小口径人工血管としての有用性を実証していく。

E. 結論

開発したナノ分子操作技術を応用することによって、移植部位に適した力学的適合性を有する人工血管（バイオチューブ人工血管）を患者の体内にて患者の組織や細胞を用いて患者自身が作成できる、分担研究者が提唱する *in situ* オーダーメイド医療が実現されつつある。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

G-1. 論文

1. Takeshi Masuda, Yasuhide Nakayama, Development of a water-soluble matrix metalloproteinase inhibitor as an intra-arterial infusion drug for prevention of restenosis after

angioplasty. *J Med Chem* 46: 3497-3501, 2003

2. 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
3. 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
4. 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
5. Shogo Nishi, Yasuhide Nakayama, Hatsue Ueda-Ishibashi, Takehisa Matsuda, Occlusion of experimental aneurysms with heparin-loaded, microporous stent grafts. *Neurosurgery* 53: 1397-1405, 2003
6. Yasuhide Nakayama, Takehisa Matsuda, Photo-control of the interaction between endothelial cells and photo-cation generatable water-soluble polymers. *J Control Release* 89: 213-224, 2003
7. Yasuhide Nakayama, Akiko Furumoto, Satoru Kidoaki, Takehisa Matsuda, Photocontrol of cell adhesion and proliferation by a photoinduced cationic polymer surface. *Photochem Photobiol* 77: 480-486, 2003
8. Hiromichi Sonoda, Keiichi Takamizawa, Yasuhide Nakayama, Hisataka Yasui, Takehisa Matsuda, Coaxial