

- double-tubular compliant arterial graft prosthesis: time-dependent morphogenesis and 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, Akane Ghoda, Yoshiaki Hirano, Satoru Kidoaki, Yasuhide Nakayama, Phosphorylcholine-endocapped 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(ethyleneglycol) 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
- ## 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 Otsuka, 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

- 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、ME 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、ME 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 (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ンション：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、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
31. 舩田 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
32. 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
33. 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
34. 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
35. 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

### 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)プリヂストン
- 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)プリヂストン
- 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)プリヂストン
- 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
5. 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
  6. 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
  7. 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：2003-192140、国立循環器病センター、(株)ブリヂストン
  8. 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
  9. 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
  10. 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
  11. 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

厚生労働科学研究補助金（萌芽的先端医療技術推進研究事業）  
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  
To Surface テクノロジー開発、微細加工工学デバイスの開発

分担研究者 妙中義之 国立循環器病センター研究所人工臓器部長

研究要旨：本研究ではナノテクノロジーを用いることにより新しい循環器用医療デバイスを開発する。ナノサイズの超分子ユニットを集合、接合、生長させることで、医療デバイスの表面構造をナノレベルで自在に操作し、生体適合性やドラッグデリバリー性などの表面機能を極めて柔軟に設計できる革新的技術である。この技術をもとに循環器用医療デバイスを開発する。特に本分担研究では、To Surface テクノロジー開発、および微細加工工学デバイスの開発として、抗血栓性のナノ分子ユニットを表面固定した血液接触デバイス（人工血管、カテーテル、人工弁、心肺補助装置など）などを開発する。プロトタイプのパフォーマンスを動物実験により評価し、最終年度までに、ナノテクノロジーから発信された上記の医療デバイスを前臨床段階にまで引き上げ、製品化をめざす。本年度は対象となる医療機器のひとつである人工肺の抗血栓性の評価とともに、人工肺の重要な機能であるガス交換性能にこのナノテクノロジー技術が影響を与えるかどうかについて、慢性動物実験で検討した。その結果、本ナノテクノロジー技術によりヘパリン表面固定技術を施行することで、ガス交換性能、抗血栓性のいずれにおいても優れた人工肺の可能性を示唆することができた。また、この優れた抗血栓性の発現機序を解析することを目的とし、このコーティングを施した細胞培養皿への線維芽細胞の接着状態について形態学的な観察を行った。

A. 研究目的

本研究ではナノ分子アーキテクチャー技術を開発し、新しい循環器用医療デバイスを開発する。ナノ分子アーキテクチャー技術とは、ナノサイズの超分子ユニットを集合、接合、生長させることで、医療デバイスの表面構造をナノレベルで自在に操作し、生体適合性やドラッグデリバリー性などの表面機能を極めて柔軟に設計できる革新的技術である。この技術をもとに循環器用医療デバイスを開発する。特に本分担研究では、To

Surface テクノロジー開発、および微細加工工学デバイスの開発として、抗血栓性のナノ分子ユニットを表面固定した血液接触デバイス（人工血管、カテーテル、人工弁、心肺補助装置など）などを開発する。初年度には、ナノスケールで超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確立した。同時に、上記の循環器用医療デバイスに要求される性能を詳細に調べ、プロトタイプのパフォーマンスを動物実験により評価する。最終年度までに、ナノテクノロジーから発信さ

れた上記の医療デバイスを前臨床段階にまで引き上げ、製品化をめざす。

## B. 研究方法

血液凝固反応のカスケードの進行により活性化されるトロンピンはそのインヒビターであるアンチトロンピンⅢと複合体を形成することで不活化され、血栓化を防止できる。ヘパリンはアンチトロンピンⅢと複合体を形成することで、前述のトロンピンとアンチトロンピンⅢとの結合反応を触媒的に促進させることで、抗凝血剤として働く。ヘパリン分子内にはアンチトロンピンⅢに対して特異的に結合する活性部位が存在しており、この部位に如何に自由度を与えてやるかがヘパリン固定化技術のキーポイントになる。従来はヘパリンを共有結合にて固定化させる方法とイオン結合にて固定化させる方法とが用いられてきた。共有結合では長期間にわたり材料表面にヘパリンが存在するものの、ヘパリンの自由度が制限され、その活性が低く十分な抗血栓性を確保することができなかった。イオン結合方式はヘパリンの有するマイナス電荷にプラス電荷を有するアンモニウム塩を結合させて水に不溶化、有機溶媒に可溶化し、材料表面に塗布する方法である。この際、アンモニウム塩とヘパリンのイオン結合は血液中で解離して、ヘパリンが血液中に溶出することによって高い活性を維持していた。しかしこの方法では早期にヘパリンが溶出して材料表面が血栓化することおよびアンモニウム塩も血液中へ溶出するというように安全性に問題があった。

本研究ではアンモニウム塩のアルキル基の炭素鎖長を制御することによって、

結合してもヘパリンの自由度、すなわち活性が発揮できる低疎水性のアンモニウム塩と、結合したときにヘパリンに自由度を与えず、材料表面から溶出させない疎水性の高いアンモニウム塩とを組み合わせることで長期間にわたり極めて高い活性を維持可能な新しいヘパリン固定化技術を開発する。このアンモニウム塩は長鎖ジアルキル基を二本有しており、血液接触時には疎水性の医療機器の基材表面に2本の長鎖ジアルキル基が、血液側にヘパリンの親水性部分が露出することになり、これは長鎖ジアルキル基を内部に有し、血液接触面に親水性の高いホスファチジルコリン部分が露出している細胞膜の構造に類似している。この微細構造もこのナノテクノロジー技術が他に類を見ない、非常に優れた抗血栓性を有していることの一要素となると考えられる。

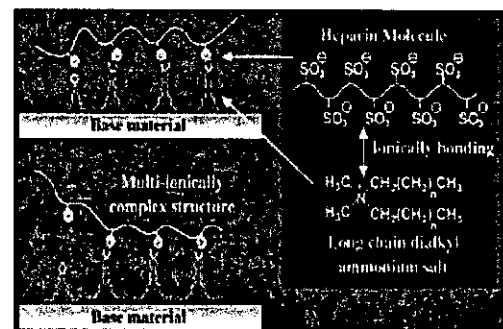


図1：本技術のコンセプト図

本年度は対象となる医療機器のひとつである人工肺について、抗血栓性の評価とともに、人工肺の重要な機能であるガス交換性能にこのナノテクノロジー技術が影響を与えるかどうかについて慢性動物実験で検討した。抗血栓性については実験継続中であり、一部の動物実験について報告する。また、この優れた抗血栓性の発現機序を解析することを目的とし、

このコーティングを施した細胞培養皿への線維芽細胞の接着状態について形態学的な観察を行った。

#### (1) 抗血栓性分子ユニットの表面固定技術

本研究で用いた抗血栓性分子ユニットの表面固定技術は、複数の鎖長の長鎖ジアルキル基を有する脂肪族系カップリング剤とヘパリンとのイオン結合体により、生体膜の脂質構造を模擬させた新しい血液接触面の処理技術である。本抗血栓性処理技術は、処理行程が簡便で比較的低价格かつヘパリン固定量が多いというイオン結合法の特徴を生かしつつ、異なる鎖長の結合体の割合によりヘパリンの徐放を制御することで共有結合法に匹敵する長期耐久性の獲得を目指したものである。

#### (2) 試験人工肺

採用した特殊ポリオレフィン中空糸膜の非対称多孔質構造は、中空糸状に熔融紡糸する過程において、ポリオレフィン材料に対し独自の熱処理を行い、中空糸の延伸時に結晶化の異なるガス流路側に微多孔質層、血液流路側に0.2  $\mu\text{m}$ 以下の厚みの緻密層を発現させている。これにより、血液とガスの直接接触を妨げ、血漿漏れを防止することで、高いガス交換性能とその長期耐久性を獲得している。昨年度までの中空糸膜の製作方法の改良により、膜の空孔率は27.4%から32.5%へと増加し、平均孔直径は446  $\text{\AA}$ から532  $\text{\AA}$ となった。これより使用した中空糸膜の酸素透過性能は、従来型において $40 \times 10^{-5} \text{ m}^3(\text{STP}) / \text{m}^2 / \text{sec} / \text{mmHg}$ 、高透過型において $120 \times 10^{-5} \text{ m}^3(\text{STP}) / \text{m}^2 / \text{sec}$

$/\text{mmHg}$ であった。本研究では、従来型中空糸膜を用いた人工肺(AL1)と高透過中空糸膜からなる人工肺(AL2)を試作した。本試験人工肺は、同じ中空糸膜サイズ、ハウジング、中空糸膜充填率、配糸方法にて試作し、同様な流路構造とした。いずれの試験人工肺も中空糸膜内-外径は165-225  $\mu\text{m}$ 、ハウジングの内部寸法は $95 \times 58 \times 30 \text{ mm}$ 、中空糸充填率は44%で、血液充填量は250 mLである。

#### (3) 回路構成

上記の試験人工肺には、0.2% T-NCVC<sup>®</sup>液を用いてコーティングを施した。遠心ポンプには回転軸のシール構造を排して低い溶血量と長期耐久性を実現しているJostra社製Rotaflowを採用し、1% T-NCVC<sup>®</sup>液を用いてコーティングを施した。これら以外の血液回路、送脱血管には東洋紡社製のものを採用し、1% T-NCVC<sup>®</sup>液を用いてコーティングを施した。これにより、全ての血液接触面にT-NCVC<sup>®</sup>コーティングを施したECMO回路を作成した。

#### (4) 長期耐久性の評価

上記のECMO回路を用いて、成山羊2頭(I:58 kg・人工肺AL1、II:60 kg・人工肺AL2)に対して、右心房脱血、右頸動脈送血にて動静脈バイパスを作成した。ECMO開始後はヘパリン等の抗凝血療法は一切施行しなかった。回路の血流量は2.0-3.0 L/minを維持した。全身状態、血液凝固系検査、血液生化学検査、人工肺のガス交換性能および各デバイスの血栓付着状況について検討した。各試験人工肺のガス交換性能測定時には100%酸素



を吹送し、ガス血液流量比(V/Q)が3になるように調節した。人工肺の流入部および流出部で血液を採取し血液ガス分析装置 (ABL-500 and OSM-3, Radiometer, Copenhagen, Denmark)を用いて血液ガス値を計測した。

#### (5)細胞培養実験

T-NCVC®コーティングを施した細胞培養皿に線維芽細胞を播種し、細胞の接着状態について光学顕微鏡を用い、組織化学的および形態学的な観察を行った。

### C. 研究結果

生体の細胞膜と同様に2本のアルキル鎖を有する構造を基本とし、ナノメートルオーダーでこのジアルキル基の鎖長を制御することにより、先端に結合させた生理活性物質、ヘパリンを親水性環境下であたかも血中に溶出したような状態でその活性を十分に発揮させるとともに、実際にはヘパリンが血中に溶出して行くことなく材料表面に留まるための疎水性環境をも同時に維持する技術について検討を行った。人工肺と血液ポンプを用いた心臓・肺機能の代替装置を成ヤギに装着し、慢性動物実験を継続できた。

#### (1)全身状態

成山羊I、IIのいずれにおいても、安定した状態でそれぞれ36、28日間の生存が可能であった。全経過を通して、バイパス血流量は2.0～3.0 L/minを維持することが可能であった。

#### (2)血液凝固系検査

手術時において、一過性に静脈内に投与したヘパリン(0.1 I.U./kg)が消失した

後は、全経過を通して、血液中のヘパリンは一切検出されなかった。全血凝固時間(ACT)は103 s～123 s、活性化プロトロンビン-トロンビン時間(APTT)は28.7 s～67.0 sといずれも全経過を通して生理的な範囲内で推移した。

#### (3)血液生化学検査

本ECMOシステムによる血液灌流に伴うヘモグロビン濃度の低下は、最低でも9.1 g/dLと非常に軽微であった。血漿遊離ヘモグロビン濃度の上昇も軽微で、実験終了時における値は成山羊Iで9.8 mg/dL、成山羊IIで6.7 mg/dLと、本ECMOシステムによる溶血は極めて軽微であった。また、血小板の消費も成山羊Iで術前 $47.3 \times 10^4$  /mLから術後 $23.5 \times 10^4$  /mL、成山羊IIで術前 $26.2 \times 10^4$  /mLから術後 $31.0 \times 10^4$  /mLと軽微な範囲に収まっていた。

#### (4)ガス交換性能の比較と長期耐久性

最高36日間にわたる長期ECMOにおいて、明らかな血漿漏出および血流量の低下はみられず、試作人工肺およびポンプの交換は要しなかった。全経過を通して、従来型人工肺(AL1)と高透過型人工肺(AL2)のガス交換性能に明らかな低下は認められなかった。従来型人工肺(AL1)の平均酸素移動量は92 mL/min、平均炭酸ガス移動量は101 mL/minを示した。高透過型人工肺(AL2)の平均酸素移動量は155 mL/min、平均炭酸ガス移動量は123 mL/minを示した。本検討において、高透過型人工肺(AL2)のガス交換性能は従来型人工肺(AL1)のガス交換性能よりも高い性能を示した。(図2、図3)

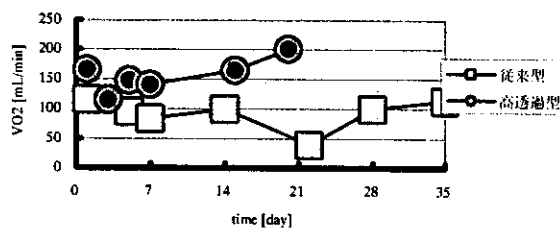


図2：酸素添加能の推移

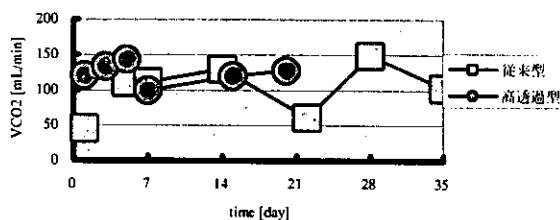


図3：炭酸ガス除去能の推移

#### (5)各デバイスの血栓付着状況

送脱血管内には血栓形成等の異常所見は全く認められず、生体内の送脱血管周囲においても血栓形成等の所見は認められなかった。遠心ポンプ内には明らかな血栓形成等の所見は全く認められなかった。血液回路内にも明らかな血栓形成等の所見は全く認められなかった。高透過型人工肺(AL2)と従来型人工肺(AL1)のいずれにおいても、inflow側には遠心ポンプもしくは血液採取用ポートから飛来したと思われる微小血栓が認められたが、これを除くと血液の流れがもっとも停滞すると考えられるinflowおよびoutflowケーシングの辺縁部以外において血栓形成は全く認められなかった。さらに、このケーシング辺縁部においても血栓形成は軽微な範囲に収まっていた。

#### (6)細胞培養実験

T-NCVC®コーティング培養皿では細

胞播種後 24 時間後においても培養皿底面で接着、仮足形成を行う細胞は観察されず、細胞は単離されたままの状態を保っていた。従って、本コーティング法の抗血栓性機序には、培養細胞の初期接着過程の顕著な抑制が関与していると考えられた。

#### D. 考察

いずれの試験人工肺においても血漿漏出等の問題点は認められず、長期間にわたり安定したガス交換性能を示していた。また、高透過型人工肺(AL2)のガス交換性能は従来型人工肺(AL1)のガス交換性能よりも高い性能を示していた。本研究結果より、改良した中空糸膜の空孔率と平均孔直径の上昇は、ガス交換性能を向上させ得るとともに、血漿漏出による耐久性の減少が生じない範囲に収まっていると考えられた。

本研究は長期ECMOによるバイパス期間中、ヘパリンを含む抗凝固療法を一切行わないという極めて厳しい条件下で施行したにもかかわらず、安定した状態で最高36日間の連続灌流が可能であった。従来のイオン結合型のヘパリンコーティングは、ヘパリンの溶出がその抗血栓性発現の機序とされ、コーティングから徐放されるヘパリンによるACTの延長や、それに伴う出血傾向も観察され、長期耐久性に問題を有していた。T-NCVC®も従来の分類からするとこのイオン結合型に属するが、上記のような血液中へのヘパリンの溶出は検出可能閾以下という極めて軽微なものであり、ACTの延長も全く

観察されないにも関わらず、極めて優れた抗血栓性を長期間示すという従来のイオン結合型とは全く異なる特性を有することがわかった。共有結合型のヘパリンコーティングは、従来から長期耐久性に優れる抗血栓性を有するものが存在するが、T-NCVC®はこれらに比較しても同等以上の抗血栓性を有すると考えられた。共有結合型はそのヘパリンコーティング工程が複雑であるため、コーティング対象に制限があり、かつ高コストであるという短所を有するものが多いが、T-NCVC®は非常に多様な材料、デバイスへのヘパリンコーティングを簡便かつ低コストで施行し得るといった長所も有している。さらに本研究にて明らかになったT-NCVC®の特徴として、血液成分、特に血小板への影響が極めて軽度であることがあげられる。従来のヘパリンコーティングを施行したシステムでは、長期灌流を施行した際に、血小板の著しい消費は不可避であり、臨床使用上の大きな問題点の一つであった。従って、本ECMOシステムを使用した長期の動静脈バイパスにおいて、血小板の消費が極めて軽度であるという特徴は、臨床使用上非常に高い有用性を持つものと考えられた。

また、細胞培養実験の結果から、本コーティング法の抗血栓性機序には、培養細胞の初期接着過程の顕著な抑制が関与していると考えられた。これらの結果をふまえ本コーティングに対する細胞接着時の細胞膜上接着蛋白の動態について今後も検討を行い、さらに本コーティングの用途をより広げる目的で、様々な

血液接着デバイスへの応用を検討し、特に現在では抗細胞接着性に優れた人工血管の開発を行う予定である。

## E. 結論

本研究のナノテクノロジー技術によりヘパリン表面固定技術を施行することで、ガス交換性能、抗血栓性のいずれにおいても優れた人工肺の可能性を示唆することができた。また、この技術は、優れた細胞接着の抑制性能も有しており、今後諸種のデバイスへの応用の可能性が示唆された。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) 押川満雄、片桐伸将、妙中義之、武輪能明、西中知博、巽 英介、大西裕幸、塩谷恭子、福田敏秀、本間章彦、築谷朋典、高野久輝、舟久保昭夫、福井康裕：外部灌流型人工肺のポートレイアウトの差に対するCFD (Computational Fluid Dynamics)および動物実験による性能比較による検討。膜型肺 26：38-43、2003
- 2) 高野久輝、巽 英介、武輪能明：現代医療の最前線ー人工臓器とメディカル・エンジニアリングの進歩ー人工肺開発の現状と将来。最新医学 58 (6月増刊号) 1341-1349、2003
- 3) 巽 英介：未来型人工肺開発の現況と展望。膜型肺 26：52-58、2003
- 4) 片桐伸将、舟久保昭夫、築谷朋典、巽 英介、西中知博、武輪能明、妙中義之、福井康裕、高野久輝：外部灌流中空糸膜型人工肺の酸素・炭酸ガス移動現象の数値流体解析による検討。膜型肺 26：30-37、2003

## 2. 学会発表

- 1) Katagiri N, Funakubo A, Tsukiya T, Taenaka Y, Tatsumi E, Nishinaka T, Takewa Y, Homma A, Fukui Y, Takano H, Kitamura S: Investigation of flow behavior and O<sub>2</sub> and CO<sub>2</sub> transfer performance of an oxygenator with computational fluid dynamics (CFD). ASAIO-ISAO Joint Conference (49), Washington D.C. 6.19-21, 2003
- 2) Mizuno T, Nishinaka T, Tatsumi E, Katagiri N, Ohnishi H, Oshikawa M, Shioya K, Tsukiya T, Homma A, Takewa Y, Takano H, Kitamura S, Taenaka Y: Pathological changes in the lungs of animals under-going up-to-five-months prolonged venoarterial ECMO. ASAIO-ISAO Joint Conference (49) Washington D.C.6.19-21, 2003
- 3) Tatsumi E, Nishinaka T, Taenaka Y, Katagiri N, Oshikawa M, Mizuno T, Tsukiya T, Takano H, Kitamura S, Sato M, Kashiwabara S, Tanaka H, Sakai K, Matsuda T: Over-five-months heparinless ECMO in goat with a newly developed heparin-coated ECMO system. ASAIO-ISAO Joint Conference (49) Washington D.C.6.19-21, 2003
- 4) Mizuno T, Tatsumi E, Nishinaka T, Katagiri N, Shirakawa Y, Tsukiya T, Homma A, Takewa Y, Takano H, Kitamura S, Taenaka Y: The chronic effects on the lungs in the goat following up-to five month venoarterial bypass using an extracorporeal membrane oxygenation. International

Society for Rotary Blood Pumps (11)

Bad Oeynhausen 8.31-9.2, 2003

- 5) 巽 英介、西中知博、妙中義之、片桐伸将、大西裕幸、高野久輝、北村惣一郎、佐藤正喜、柏原 進、田中秀典、酒井一成、松田智昌 抗血栓性と耐久性に優れた次世代型 ECMO システムの開発と抗凝血療法非施行下での最長5ヶ月間の動物実験評価。日本エム・イー学会大会(42) 札幌市 6.3-5、2003
- 6) 片桐伸将、舟久保昭夫、築谷朋典、巽英介、妙中義之、西中知博、武輪能明、本間章彦、福井康裕、高野久輝、北村惣一郎：中空糸膜型人工肺内の血液-ガス層連立数値流体解析による酸素・炭酸ガス移動に関する検討。日本エム・イー学会大会(42)札幌市6.3-5、2003
- 7) 巽 英介、西中知博、妙中義之、片桐伸将、大西裕幸、高野久輝、北村惣一郎、佐藤浩一、柏原 進、田中秀典、酒井一成、松田智昌：優れた抗血栓性と長期耐久性を有する次世代型 ECMO システムの開発：動物実験における最長5ヶ月間のヘパリン非投与連続灌流。日本医工学治療学会学術大会(19)札幌市 5.16-18、2003
- 8) 水野敏秀、巽 英介、西中知博、片桐伸将、押川満雄、白川幸俊、内藤 洋、塩谷恭子、築谷朋典、本間章彦、武輪能明、高野久輝、北村惣一郎、妙中義之：長期VAバイパスECMOの施行に伴う肺の病理組織学的変化に関する研究。日本人工臓器学会大会(41)仙台市 10.30-11.1、2003
- 9) 水野敏秀、巽 英介、西中知博、片桐伸将、押川満雄、白川幸俊、内藤 洋、塩谷恭子、築谷朋典、本間章彦、武輪能明、高野久輝、北村惣一郎、妙中義之：

長期 VA-ECMO が生体に与える影響の病理学的検討。膜型人工肺研究会(32)仙台市 10.30、2003

10) 片桐伸将、舟久保昭夫、築谷朋典、巽 英介、妙中義之、西中知博、武輪能明、本間章彦、福井康裕、高野久輝、北村惣一郎:血液-ガス層連立 CDF 解析による外部灌流中空糸膜型人工肺の酸素・炭酸ガス移動に関する研究。膜型人工肺研究会(32)仙台市 10.30、2003

G. 知的財産の出願・登録状況

本年度は特になし

### III. ナノ生化学系による非細胞性代謝機能代替デバイスの開発研究

#### 装置化へ向けた各種素材および基盤技術の統合

分担責任者 絵野沢 伸 国立成育医療センター研究所移植・外科研究部・室長

研究要旨：人工臓器は基礎科学の成果が統合されて臨床が要求するスケールと精度を達成したものである。その中で濾過や透析を基本とする血液浄化法は人工臓器の中でも完成度の高いものといえる。しかしながら、この機能は基本的に限外膜を介した物理化学的拡散による低分子の除去であり、生体で主に肝および腎が行う血液浄化とは根本的に原理が異なる。肝・腎による生理的血液浄化は分化した細胞が有する特異機能、さらにつきつめればナノメータースケールの酵素やトランスポーターといった生体高分子機能によるものである。そこでこれら生体高分子と人工素材を組み合わせた非細胞性代謝機能代替デバイスの開発が本研究の目的である。まず臨床に要求されるレベルのリポソームの効率的な大量調製について中空糸カラムを用いた方法を開発した。本法はリン脂質と界面活性剤による混合ミセルを血液透析カラムを通してリポソーム化するもので、従来の透析法やゲル濾過法あるいは小孔を通すエクストルーダー法に比べ簡易で大量調製が可能かつ連続的に行える方法である。また、リポソームの形状も粒径が 100～200nm で従来法と同程度であることもわかった。今後、本法を発展させ低分子除去のための担体であるリポソームをリサイクルする系を検討しようと考えている。一方、生体高分子として細胞膜表面に存在する有機アニオントランスポーターMDR1を取り上げ、同タンパクを組み込んだ小胞（プロテオリポソーム）を調製し、機能を調べた。このプロテオリポソームにおいてMDR1を内向きに配位し、代表的リガンドであるDigoxinをATP依存的に取り込むことがわかった。よって、この原理を応用して生物学的な力を利用した異物除去システムの人工構築の基礎が確立したといえる。さらに他の生物学的レセプタータンパク利用として $\beta$ -2-Microglobulin-Megalin系の応用による透析アミロイドーシス抑止アフィニティー透析の実験系確立に着手した。本年度はこれらタンパクのリコンビナント発現系の構築と抗 megalin 抗体の作成を行った。

#### A. 研究目的

生体はナノメータースケールの機能的あるいは構造分子が構成素材となり、マイクロメータースケールの細胞を形成、さらに肉眼レベルである組織や臓器が構成されている。本研究は、この分子レベルからの

統合を人工的に行い、物理的ふるい分けに依存している現在の血液浄化を生体高分子の有する選択性・能動性を利用した生物学的な力によるナノ代謝代替デバイスとして新規な血液浄化法の創生をめざすものである。同様の目的をもったものとして

ハイブリッド人工臓器という概念がある。これは主に肝を対象に開発が試みられているが、人工基材と細胞を組み合わせた人工臓器である。我々も以前よりハイブリッド（またはバイオ）人工肝の開発を行い、細胞の有する生物学的効果に現状の血液浄化法に勝るものがあることを示してきた。しかしながら、その研究過程で細胞を用いた機器は、製造、取り扱いが難しいことが欠点であることも明確になってきた。この必然的な結果として工業生産や品質管理が困難で、医療機器としての普及は難しいと考えている（表1）。

項目	優	>	劣	理由
予想される効果	ハイブリッド人工肝、ナノ代謝代替デバイス	>	現行の血液浄化法	生体高分子が有する選択性、能動性
安全性	ナノ代謝代替デバイス	>	ハイブリッド人工肝	工業生産ラインにのせ、品質管理が可能
経済性	ナノ代謝代替デバイス	>	ハイブリッド人工肝	リポソームやリコンビナントタンパク生産技術が応用できる。

表1 現行の血液浄化法、細胞利用ハイブリッド人工肝、非細胞性ナノ代謝代替デバイスの比較

現在行われている血液濾過透析や血漿交換を組み合わせた血液浄化法は、劇症肝炎をはじめ様々な疾患に対する治療法の基幹といえる。しかしながら、ひとりの患者に対し大量の血漿が必要であることや亜急性劇症肝炎では昏睡からの一時的な覚醒効果はみられるものの最終的な救命率の向上は得られないなど問題点も多い。

この血液浄化法の限界の背景には、中空糸カラムによる血中物質の除去が単に膜の孔径にのみ依存し、生体にとって要不要の別なく排除してしまうという原因が考えられる。病期の体液には為害性物質だけでなく疾患に反応して治癒を促す物質も存在し、これらも透析・濾過によって排除されてしまう。理想的な血液浄化は生体が行っているように毒性物質のみを選択的に取り除くシステムである。

そこで我々は細胞表面に存在し細胞内外の物質輸送を行うチャンネルタンパク分子を人工膜に固定化するという新規な発想を検討している。薬物代謝酵素系や細胞膜上のチャンネルタンパクは分子種群をなし、新しい分子が続々と遺伝子レベルで同定されている。これらの機能性タンパクは、それぞれ異なった基質特異性を有するので肝・腎不全の病態を改善するために必要な分子種を選び出すことができる。こうして再構成された人工合成膜であるナノ代謝代替デバイスに生きた細胞のように統合した選択的・能動輸送を行わせることが我々の目標である。

## B. 研究方法

### 1) 中空糸カラム利用リポソーム調製法.

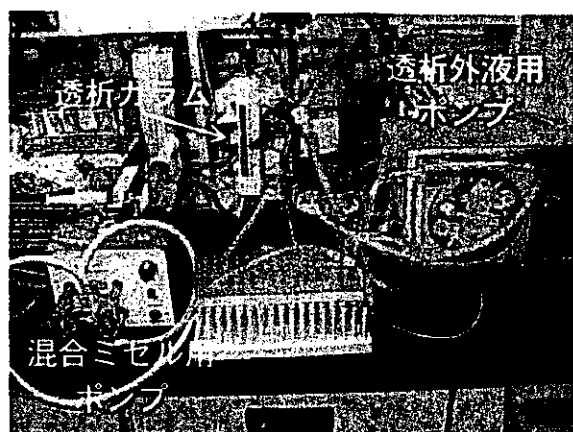


図1 中空糸カラム利用リポソーム調製法の全体像

混合ミセルは卵黄レシチンまたは卵黄ホスファチジルコリン（ナカライテスク 55128-59-1 または 8002-43-5）を 50 mmol/L n- オクチルグルコシド（n-Octyl-beta-D-glucopyranoside, Sigma O-8001）, 100 mmol/L KCl (pH 6-7) 水溶液に溶解させて得た。この混合ミセル溶液 5 ml をローラーポンプを用いて人工透析用中空糸カラム（Gambro, FH66D）の血液流入側に 35-45 ml/min の速度で流した。これと同時に、100 mmol/mL KCl 水溶液(以下透析外液)を、別のローラーポンプを用いて中空糸の透析液側に 200ml/min で流した（図1）。透析外液は、混合ミセル 5 ml に対して 500 ml を使用し、循環させた（図2）。

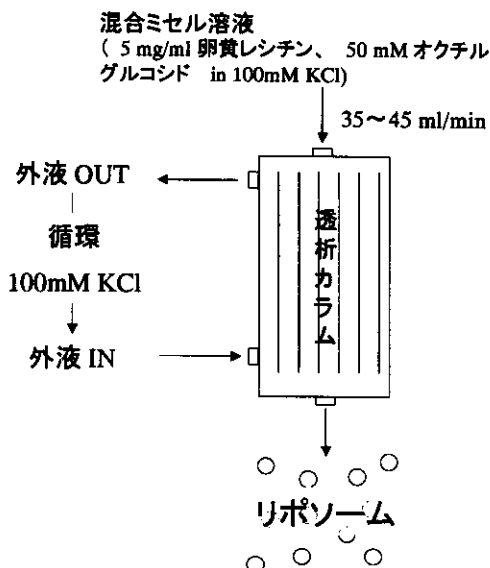


図2 透析カラム法によるリポソーム作成法の概略（絵野沢他、特願 2004-033439）

本法におけるオクチルグルコシドの残留量測定はレゾルシノール硫酸法（Anal Biochem 175, 525, 1988）によった。

また、他の界面活性剤、すなわちコール酸 Na（ナカライテスク, 08805-14）、デオキシコール酸 Na（和光純薬, 192-08312）、Triton X-100（Sigma, X-100）、MEGA9（同仁化学, 341-05083）を用いた場合の本法の有効性についても調べた。この時の混合ミセル形成時の濃度はそれぞれ 28, 10, 2, 50 mmol/L とした。これらの濃度は文献値を参考にしたが、Triton X-100 以外は臨界ミセル濃度のほぼ 2 倍、Triton X-100 は 20 倍とした。

本方法で調製したリポソーム濃度は、濁度（340nm または 600nm の吸収）、リン脂質量（リン脂質 Test C Wako）で定量し、粒径はサブミクロンアナライザー N 5（Beckman- Coulter 社）で測定した。また、一部は三枝分担者（産業医学総合研究所）



に送り、透過電子顕微鏡像の撮影に供した  
(この部分の方法と結果は本年度三枝分  
担者報告を参照のこと)。

2) MDR1 プロテオリポソームの Digoxin  
取り込み活性の測定。

MDR1 タンパクは植田分担者(京都大学  
大学院)から供与を受けたバキュロウィル  
ス- s f 9 細胞系で強制発現させた細胞  
ペレットから、昨年の報告書に記載の方法  
で精製した。最終精製は NTA キレートカ  
ラムにより、回収率は 1ml の細胞ペレット  
から 150 $\mu$ g の精製標品が取れている。こ  
の精製標品を久保井分担者(大阪大学大学  
院基礎工学研究科)に送付しリポソーム組  
込を行い、阪大および当方で実験に用いた。  
プロテオリポソーム作成法と阪大におけ  
る実験に関しては本年度久保井分担者の  
報告を参照されたい。

MDR1 プロテオリポソームを用いた実  
験として、ATP 水解能と基質である放射性  
Digoxin 取り込み能を調べた。ATP 水解能  
は基本的には久保井分担者の方法によっ  
た。すなわち 0.75mg-1.35mg のリン脂質  
を含むリポソーム(リポソーム粒径を  
100nm と仮定して  $6-10 \times 10^{12}$  のリポソ  
ーム)を 150 $\mu$ l の 25mmol/L Tris-Cl, pH7.5  
に懸濁し、最終濃度 20mmol/L ATP と 37 $^{\circ}$ C、  
30 分反応させ遊離無機リン量を測定した。  
Digoxin 取り込み能測定では、放射性  
Digoxin (NEN, NET-222)を用いた。Digoxin  
の最終濃度は 1.32 $\mu$ mol/L (アッセイチュ  
ープ当たり 185kBq/100 $\mu$ L)とした。反応  
後、遠心(40,000 $\times$ g、1 時間)によりリポ  
ソームを沈降させ、一度緩衝液にて洗浄後、

リポソーム画分の放射活性を液体シンチ  
レーションカウンターで測定した。

2)  $\beta$ -2-Microglobulin- Megalin 系の構築。  
 $\beta$ -2-Microglobulin ( $\beta$ 2-M) リコンビナ  
ント発現系では Glutathione-S-transferase  
(GST) gene fusion system を用いた。具体的  
には 1)  $\beta$ 2-M を組み込んだ pGEX-6P-1 を、  
塩化カルシウム法により大腸菌 Rosetta 株  
に導入。2) GST- $\beta$ 2-M 融合タンパク質発  
現用の pGEX 組換体のスクリーニング。3)  
小スケールで培養し、抗 $\beta$ 2-M 抗体を用い  
てウェスタンブロット法を行い $\beta$ 2-M の  
発現を確認。4)目的菌株を大量培養の後、  
遠心(4 $^{\circ}$ C、5,000 $\times$ g、15 分間)により集  
菌。5) 超音波破碎後、遠心(4 $^{\circ}$ C、16,000  
 $\times$ g、20 分間)により封入体を分離。6) 封  
入体を緩衝液(50 mmol/L Tris-HCl pH8.0,  
1 mmol/L EDTA, 2% Triton-X100)で 3 回洗  
浄した後 7M 塩酸グアニジン溶液(pH2.0)  
48ml に溶解。7) 遠心(10,000 $\times$ g、10 分間、  
室温)により不溶成分を除き、さらに 7M  
塩酸グアニジンを加え(43.2ml)、室温で  
1 時間振盪し可溶化。8) 超純水 24ml を加  
えて室温で透析。9) 遠心で沈殿を除いた  
後、さらに水に対して透析。10) Glutathion  
Sephadex 4B を用いて GST- $\beta$ 2-M を精製  
した。

$\beta$ 2-M の生理的レセプターである  
Megalin については、膜タンパクであるこ  
とから大腸菌ではなくバキュロウィルス  
による大量発現系を採用した。具体的には  
Bac-N-Blue Baculovirus expression system  
(Invitrogen)を用いた。

## C. 研究結果

### 1) 中空系カラム利用リポソーム調製法.

プロテオリポソームを臨床で用いるに際して表2に示す計算を行った。これによると、

腎近位尿細管細胞当たりの MDR1 タンパク分子数	50,000 個 (推定)
腎近位尿細管細胞の形状 (参考)	直径 10 $\mu$ m の球体
一腎当たり近位尿細管細胞数	2 $\times$ 10 <sup>9</sup> 細胞
リポソームの形状	直径 100nm の球体
リポソーム 1 個に固定化する MDR1 分子 (予想)	5 個
1 腎に相当するリポソーム数と体積	2 $\times$ 10 <sup>13</sup> 個、80L

表2 必要リポソーム量の試算

生体腎の近位尿細管に相当する機能を再現するには約 80L のリポソームが必要であることがわかった。これをゲル濾過あるいは透析バッグを用いたバッチ法で行うのは現実的ではなく、また考察で述べるリポソームリサイクル系への発展のためには連続的な作成方法が望ましいと考えた。そこで図2に示すような血液透析カラムを用いたリポソーム作成系で検討した。まず 5 ml の混合ミセル溶液を通過させるという方法でリポソームの調製を行った。排出された各フラクションの濁度及び

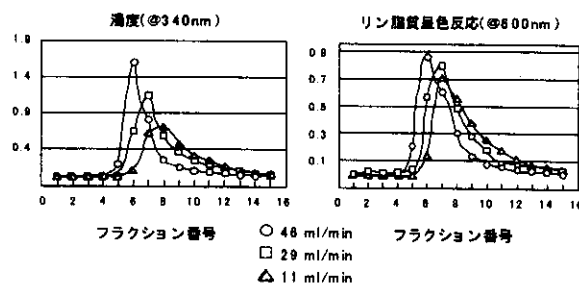


図3 調製されたリポソームの排出パターン

リン脂質量を測定したところ、混合ミセルの流速が速まるにつれ濁度が低下した(図3左)。リン脂質量はどの場合も同程度であることから(図3右)、濁度の差は形成されたリポソームの粒径と考えられた。すなわち、高速で流すと粒径の小さいリポソームが得られ、低速になるにつれて粒度の粗いものができたものと思われる。

しかしながら、この系は一回通過させるだけでは界面活性剤の除去効率が悪いので、循環させることによってカラム長を増加させるシミュレーションを行った(図4)これによると、濁度の増加によって示されるリポソームの形成と対応して速やかに界面活性剤濃度が低下することが示された。界面活性剤濃度の低下促進に対して今回は循環させることによって対応したが、カラム長を適宜変更することによって一回通過でも十分な除去が可能になると考えられる。予備的にカラムを2本並列させた実験を行ったが、十分な除去が可能であると考えられた。

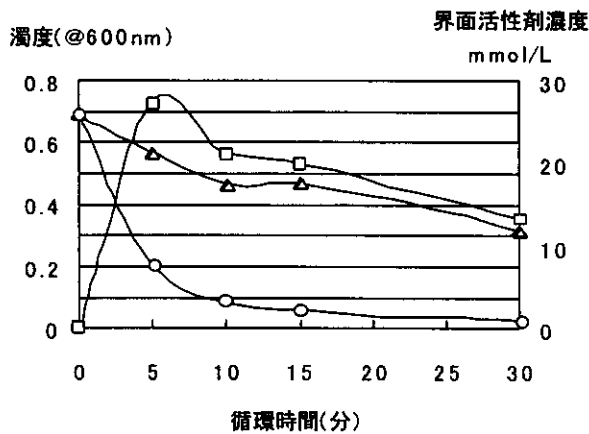


図4 透析時間と界面活性剤濃度の関係。  
○；n-オクチルグルコシド濃度 (mmol/L)、  
□；濁度、○；リン脂質濃度。

今までの実験は非イオン性の界面活性剤で比較的臨界ミセル濃度が高い n-オクチルグルコシドを用いたが、本方法が汎用性のあるものかを調べるために他の界面活性剤についても調べた (表3)。エクストルーダー法は阪

作成条件	測定値 nm, 平均 ± SD
エクストルーダー法 (従来法の一つ。作成方法については久保井分担者報告参照)	144 ± 52
透析カラム法	
Octylglucoside 使用 (25)*	157 ± 39
Cholate 使用 (14)	144 ± 63
Deoxycholate 使用 (5)	57 ± 18
Triton X-100 使用 (0.9)	110 ± 47
MEGA9 使用 (25)	176 ± 60

\* ( ) 内はそれぞれの界面活性剤の臨界ミセル濃度 (mmol/L)

表3 各種方法で作成したリポソーム粒径 (サブミクロンアナライザーによる測定)

大久保井研究室で行っている方法で、基本的には有機溶媒を蒸発させ薄膜化した脂

質に水系溶媒を加えて乳濁させさらに小孔を繰り返し通すことによって均一かつ単層のリポソームを作り出す方法である。その方法によるリポソーム粒径が 144 ± 52 nm であったのに対し、透析カラム法によるリポソームもデオキシコール酸以外にはほぼ同じ粒径を示すことがわかった。特記すべきは臨界ミセル濃度が非常に低い Triton X-100 も十分にリポソーム作成に使えるということであった。また透過電子顕微鏡写真によっても透析カラム法で作られたリポソームは単層ではなかったが、内部が中空の典型的なりポソーム形態を呈することがわかった (詳細は三枝分担者報告を参照)。

## 2) MDR1 プロテオリポソームの Digoxin 取り込み活性の測定.

プロテオリポソームは ATP 水解能からみて組み込んだ MDR1 タンパクの 80% 以上が内向きに配位していることが久保井分担者によって調べられ、また当グループによっても確認された。このプロテオリポソームを用いて基質である Digoxin の取り込みをみたところ、図5に示すように ATP が存在する場合に限り、また MDR1 を組み込んだリポソームに限り基質の内部移動が起きていることがわかった。

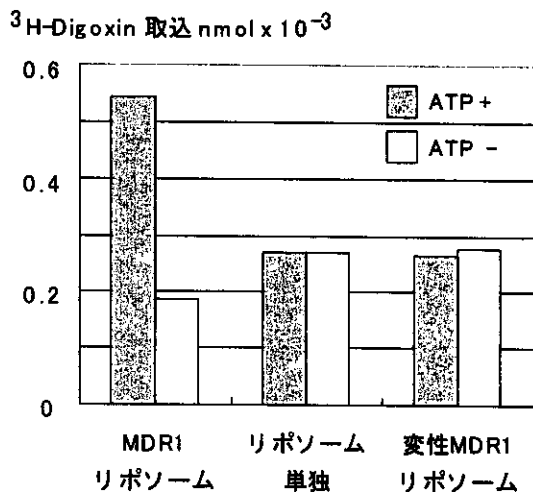


図5 MDR1 リポソームによる ATP 依存性の Digoxin 取り込み活性

トランスポーターは膜貫通型のタンパクであるが、基質結合部位が同タンパクの基部（生理的位置としての細胞質側）ではなさそうであるとされている。まだ基質結合部位が同定された訳ではなく、可能性としては細胞膜にとけ込んだ基質が側方移動して MDR1 に到達し、その後 ATP 依存性に排出されるという考察がなされている。今回の場合もリポソーム単独でもある程度 Digoxin が取り込まれることからこの考え方も成り立つが、ATP 依存性の取り込みが起こった方がさらに除去効率が上昇するということがわかった。この他、予備実験として ADP 存在下の活性を見た。この実験は ADP が MDR1 に結合した状態でのタンパクのコンホメーション変化が Digoxin の結合までは引き起こすかもしれない、という仮定に基づいたものだったが、特に変動がなかった。また、この実験ではリポソームの分離に超遠心を用いている為十分に分離が得られていない可能性

も否定できない。そこで、さらにリポソームだけを分離して放射活性を測定するために、ショ糖密度勾配遠心あるいはゲル濾過による分離を行っている。この方法によると図5に示すよりもさらにバックグラウンドレベルが低く、すなわちリポソーム単独ではほとんど取り込みが見られなくなっているようである。今後、さらにこの系を検討しトランスポーターの基質移動機構についても解析を行い、より能率的なプロテオリポソームの作出に役立てたいものと考えている。

### 3) $\beta$ -2-Microglobulin- Megalin 系の構築.

本研究では生体が有するアフィニティー機構を利用した新規な医療用デバイスの開発を目標としている。前述のように人工透析は人工臓器の中で完成度の高いものであり、腎不全患者も長期にわたって生命を維持することが可能となっている。それに伴い、次は生活の質を高めることが重要な課題である。長期透析患者が抱える大きな障害は透析アミロイドーシスである。症状としては関節痛で、組織学的には当該局所へのアミロイド沈着が見られる。近年の研究によりアミロイドの主な原因物質が  $\beta$ 2-M であることがわかった。 $\beta$ 2-M は他の血清タンパクと同様に腎糸球体ではほぼ 100% が濾過されたのち近位尿細管刷子縁の Megalin というレセプターによって再吸収されることがわかった。透析患者の場合は  $\beta$ 2-M の除去が悪く、徐々に血中濃度が上昇し、その結果関節などへのアミロイド沈着が生じると考えられている。最近、