

Table 1. Preparation of Photo-Cation Generatable Water-Soluble Copolymers and their Composition

Feed of MG ^a monomer (mol %)	Yield (%)	MG ^a content (mol %)	M_n^b ($\times 10^4$)	polydispersity	number of MG ^a / molecule
0.1	22	0.4	9.1	2.6	3.6
0.2	20	0.7	11.4	2.1	7.9
0.5	17	2.7	5.9	2.3	15.0

Polymerization conditions: initiator, AIBN; [monomer]/[initiator] = 200; Solvent; benzene; [monomer] = 0.7 mol/l; temp., 60°C; Polym. Time, 17 h. ^aMG means malachite green. ^bNumber-average molecular mass determined by gel-permeation chromatography (PLCO standard). ^cDetermined by absorption spectra at 620 nm.

diphenyl(4-vinylphenyl)methane leucohydroxide according to the previously reported method [32] (Fig. 2). The content of the photodissociable group, triphenylmethane leucohydroxide, in the copolymers was determined by absorption spectroscopy using the absorption coefficient at an absorption maximum (620 nm) of a malachite green carbinol base. Table I summarizes the preparation conditions and compositions of the copolymers. ¹H NMR spectra indicated that by repetition of sufficient reprecipitation no non-reactive monomer and initiator was detected completely in the all polymers obtained. Polymer yield was adjusted under about 20 % to obtain homogeneous copolymers with narrow distribution of copolymerization ratio. The malachite green contents in the copolymers of molecular weight about 0.6×10^5 , were 3.6 (copolymerization ratio; 0.4 mol %), 7.9 (0.7 mol %) and 15.0 (2.7 mol %) units per molecule.

Aqueous solutions of the three copolymers at pH 7.4 and 37 °C were light green before UV irradiation. Upon UV irradiation at a wavelength of between 290 and 410 nm, the aqueous solutions spontaneously turned to deep green with an increase in absorbance at 620 nm (Fig. 3) and exhibited a con-

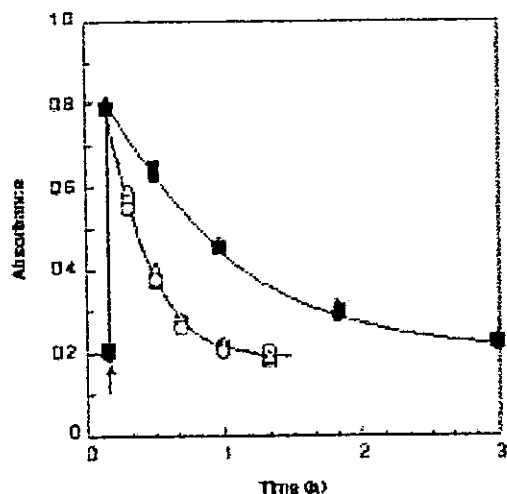


Fig. (3). Absorbance changes at 620 nm in aqueous solutions of photo-cation generatable water-soluble copolymers (malachite green content per molecule, 3.6: ○; 7.9: □; 15.0: △), and the polyplexes from the photo-cation generatable water-soluble copolymer (malachite green content, 3.6: ○; 7.9: □; 15.0: △) and DNA (pGL3-control plasmid, 0.5 μg). Arrow indicates the time of UV irradiation for 2 min.

siderably elevated pH to about 8.5. These were attributed to the generation of a triphenylmethyl cation according to Fig. 2. Within 1 min of UV irradiation almost all malachite green groups were converted to the cationic form. On cessation of the UV irradiation the absorbance at 620 nm reverted to the initial level (one quarter of the maximum level) within about 1 h regardless of the malachite green contents in the copolymers, indicating that three quarters of all cationic forms slowly reverted to the original leucohydroxide, nonionic form. Therefore, one quarter of the malachite green groups were present as cations at equilibrium state at pH 7.4 and 37 °C.

3.2. Polyplex Formation and Degradation

When DNA was added to Tris-HCl buffered solution of the cationic copolymers produced from the malachite green-derivatized copolymers by UV irradiation, a marked high scattering intensity in DLS measurements was immediately observed regardless of the malachite green contents of the copolymers (Table 2). In contrast, low scattering intensities were detected in saline solutions of DNA or the copolymers with or without UV irradiation, or even after mixing of DNA with the copolymers without UV irradiation (Table 2). For all copolymers, the scattering intensity was highest at C/A ratios between 0.5 and 1. An example in the use of the copolymer, with a malachite green content of 15.0, is shown in Fig. 4. The larger number and size of the particles caused a larger scattering intensity. Therefore, it can be said that the photo-cation-generated copolymers produced polyplexes upon mixing with DNA at the appropriate mixing ratio. The cumulant analysis of the DLS measurements showed that the diameter of the polyplexes produced at C/A ratios ranging from 0.25 to 5 was about 150 nm with low polydispersity (about 0.4) (Fig. 4). In addition, the polyplexes formation was visualized by fluorescent microscopic image because the malachite green is a fluorescent dye, where almost all polyplexes observed by exposure to light of wavelength 543 nm were in spherical shape (Fig. 5).

Upon incubation at 37 °C of the polyplex solutions, prepared from the copolymer with the lowest malachite green-content, the scattering intensities gradually decreased up to 3 h (Fig. 6), which was well synchronized with the change in absorbance of the malachite green groups (Fig. 3). After 3 h of incubation the scattering intensity had declined to one half that obtained immediately after mixing of the photo-cationized copolymer and DNA. In addition, in this time the cumulant diameter of the polyplexes decreased from approximately 150 to 100 nm. However, little change in the

Table 2. Scattering Intensity of Tris-HCl Buffered (pH 7.4) DNA and/or Malachite Green-Derivatized Copolymer (Malachite Green Content; 15.0) with or without UV Irradiation

Run	Solution condition			Scattering intensity
	DNA ^a	copolymer ^a	h ν ^a	
1	-	-	-	49.1 \pm 21.8
2	0	-	-	158.2 \pm 27.3
3	-	0	-	169.1 \pm 12.4
4	-	0	0	174.5 \pm 38.2
5	0	0	-	916.3 \pm 299.9
6	0	0	0	2345.2 \pm 97.3

^aKey: 0, presence; -, absence.

scattering intensity and the cumulant diameter were observed in the high malachite green content (7.9 and 15.0) copolymers (Fig. 6) despite a decrease in the amount of cations in the copolymer (Fig. 3). These results indicated that the polyplexes were formed immediately upon mixing of the photocationized copolymers and DNA for all the copolymers studied, and gradually dissociated only in the lowest malachite green-content copolymer to release of DNA without any damages, which was confirmed by the observation of the shift of DNA electrophoretic migration in agarose gel (data not shown).

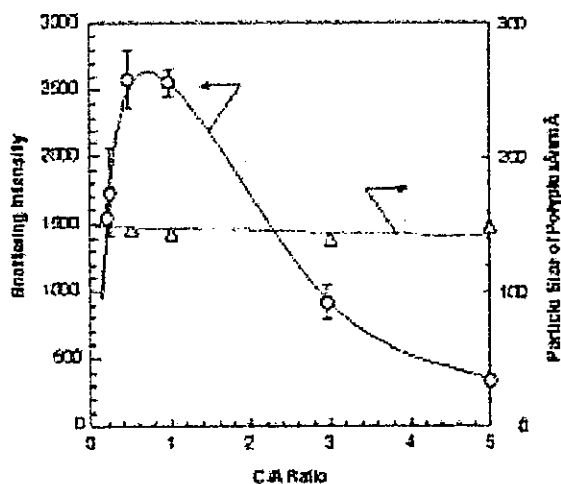


Fig. (4). Scattering intensity (○) and cumulant diameter (△) of an aqueous solution of the polyplexes prepared by mixing of photocation generatable water-soluble copolymer (malachite green content per molecule, 15.0) and DNA (pGL3-control plasmid, 0.5 μ g) in different ratios.

When 1-min UV irradiation of the polyplex solutions was repeated every 10 min the absorbance at 620 nm was maintained to some extent for the lowest malachite green content copolymer for up to 2 h (Fig. 7), indicating that almost all cationized malachite green groups existed without conversion

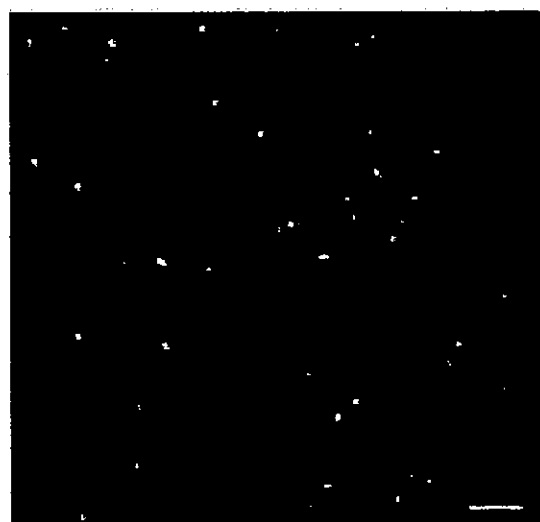


Fig. (5). Fluorescence microscopic image of the polyplexes from the photo-cation generatable water-soluble copolymer (malachite green content per molecule, 15.0) and DNA at C/A ratio of 1. Bar=10 μ m.

to the nonionic form due to the action of the intermittent UV irradiation. Simultaneously, under the same UV irradiation conditions, the scattering intensity derived from the polyplexes was also maintained at the initial value to some extent (Fig. 6), indicating the dissociation of the polyplexes was prevented under UV irradiation. However, upon cessation of UV irradiation the scattering intensities started to spontaneously decrease, due to disappearance of the cations (Fig. 6). Therefore, it can be said that the formation and dissociation of the polyplexes were photochemically controlled.

4. DISCUSSION

In this study, as a model compound as a vector for a proposed new gene delivery system a photoreactive water-soluble polymer derivatized with a photochromic compound, malachite green was molecularly designed [30,31]. Since malachite green can reversibly generate a cation as shown in (Fig. 2), the malachite green-derivatized water-soluble poly

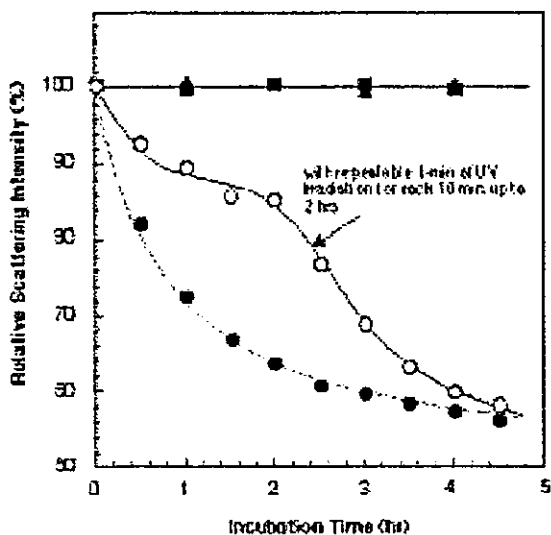


Fig. (6). Changes in scattering intensity of an aqueous solution of the polyplexes prepared by mixing photo-cation generatable water-soluble copolymer (malachite green content per molecule, 3.6: \square and \circ ; 7.9: \square ; 15.0: \circ) with 2-min of UV-irradiation, and DNA (0.5 μg) at C/A ratio of 1. (\square): 1-min of UV irradiation was performed repeatedly every 10 min up to 2h.

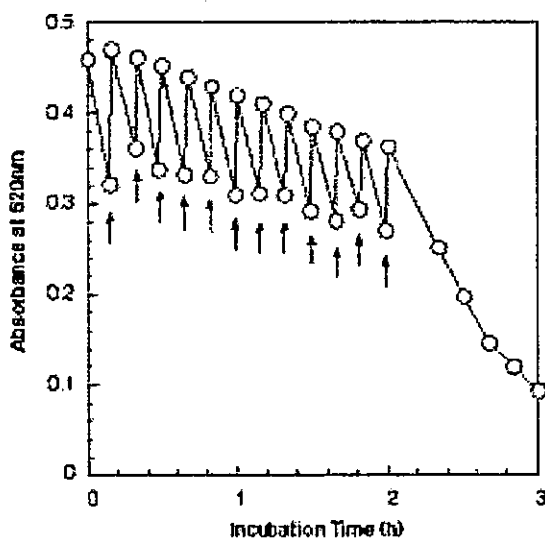


Fig. (7). Change in absorbance at 620 nm of an aqueous solution of the polyplexes prepared by mixing of photo-cation generated water-soluble copolymer (malachite green content; 3.6) and DNA at C/A ratio of 1. Arrows indicate the time of 1-min UV irradiation.

mers developed here can be reversibly converted from a nonionic to cationic form by UV irradiation. Therefore, the following three functions will be expected when using the polymers as a vector. Namely, cationization upon UV irradiation induces 1) acceleration of the formation of polyplexes with DNA and their subsequent cellular uptake due to en-

hancement of electrostatic interactions. Since malachite green exists as a stable cation under highly acidic conditions, the polyplexes are stably maintained in endosomal compartments. Therefore, 2) DNA can be protected from enzymatic degradation and hydrolysis in the endosome. If the polyplexes are released into the pH-neutral cytoplasm, thermal deionization of cations will occur, which causes: 3) dissociation of the polyplexes, resulting in the release of DNA. The last function, 3), may provide the most effective enhancement of the gene delivery to nuclei in addition to the others 1) and 2), both of which are usually present in other cationic copolymers designed as vectors.

The malachite green-derivatized water-soluble polymers synthesized in this study were radical copolymers of malachite green-derivatized vinyl monomer and a water-soluble monomer, *N,N*-dimethylacrylamide. Poly(*N,N*-dimethylacrylamide), is a widely used medical material, for biocompatible surface coatings for medical devices [34,35] and for the modification of drugs [36]. Malachite green has been studied as a functional material in drug delivery systems [32]. In addition, an affinity chromatography of DNA was developed by using A.T-base-pair-specific affinity of the chloride derivative of malachite green [37]. There have been few reports showing toxicity in these materials. In our previous study, there was little significant difference between the control and endothelial cells (ECs) after treatment with the copolymers synthesized here, regardless of the presence of UV irradiation in the exclusion test of trypan blue [32]. In addition, the long-range viability and integrity of the ECs were not altered from the control upon incubation with the copolymers at the concentration less than 1 mg/mL, which is about 10 times larger than that used in standard *in vitro* transfection experiments [32]. On the other hand, about 70 % of cell viability was reported in Exgen500, which is polyethylenimine, one of the commercially available cationic polymer vectors. Therefore, it can be said that the copolymers were biocompatible with little cytotoxicity. The copolymers will be excluded from the cells without any cellular damages because they can not degraded by hydrolysis *et al.*

In our previous study, cationized malachite green-derivatized water-soluble copolymers generated by UV irradiation were taken up in cells by electrostatic interactions, whereas the non-ionic form of the copolymers before irradiation displayed no detectable interaction with cell membranes [32]. The strength of interaction was increased by the amount of malachite green residues introduced into the copolymers and the irradiation time, i.e., the amount of generated cations. To obtain high interaction strength with cells, copolymers with many malachite green residues are required. However, to maintain the water-solubility of copolymers, the content of malachite green residues must be less than several mol % due to their hydrophobicity.

In this study, 3 kinds of photoreactive copolymers with 3.6 (content of malachite green residues; 0.4 mol %), 7.9 (0.7 mol %), and 15 (2.7 mol %) of malachite green groups per molecule were prepared. In all copolymers, upon mixing with DNA aqueous solutions and after irradiation there was a marked increase in scattering intensity (Table 2), indicating the generation of polyplexes by non-specific electrostatic interaction. The formation of the polyplexes was also con-

firmed by observation of CLSM. The diameter of the obtained polyplexes was approximately 150 nm, irrespective of the malachite green content (Fig. 4). The amount of malachite green cations in the polyplexes returned to the initial level, i.e., the level prior to irradiation, (about 25% of the entire malachite green groups) in about 3 h (Fig. 3). Since the amount of cations in an aqueous solution of the copolymers alone returned to the initial level in about 1 h (Fig. 3), binding of malachite green cations with hydroxyl anions may have been inhibited in the polyplexes. The scattering intensity of the polyplex solution prepared from the lowest malachite green content copolymer 3 h after irradiation was reduced to approximately 50% that immediately after irradiation (Fig. 6), indicating dissociation of the polyplexes. If the dissociation of the polyplexes occurs in the cytoplasm, gene delivery to nuclei will be enhanced.

Only the lowest malachite green content copolymer polyplexes were dissociated (Fig. 6). About 4 cations remained in the highest malachite green content copolymer approximately 3 h after irradiation and were sufficient to form polyplexes. Deionization of malachite green cations was prevented to some extent by repeated irradiation at intervals (Fig. 7). Therefore, maintaining the amount of cations through continuous irradiation could control the condition of the complex. These results suggested that generation and dissociation of the complex could be controlled by irradiation. However, amount of cations was gradually decreased even intermittent irradiation, which may be due to decreasing of malachite green molecules by photochemical side reaction, resulted in prevention of maintenance of stable polyplexes.

In the copolymer with 3.6 malachite green residues per molecule, in principle, less than 1 cation exists in a molecule in the dark. Therefore, it is expected that the copolymer cannot bind to more than 1 DNA molecule, indicating that no polyplex can be generated. However, complete dissociation of the polyplexes could not be achieved even in the use of the copolymer. This may be due to the relatively high polydispersity of the copolymer. To completely dissociate the polyplexes in neutral solution, it is necessary to design a new malachite green-derivatized polymer, in which the number of malachite green units is strictly controlled to 2-4 per molecule, or a functional molecule that is completely deionized in neutral solution. With regard to the former material, we have been investigating synthesis by controlled polymerization methods, such as living radical polymerization. With regard to the latter, since malachite green is converted into cations by dissociation of hydroxyl anions, it tends to be in the leuco form at equilibrium under alkaline conditions because of suppression of dissociation (Fig. 2). Therefore, even in the polyplex with the highest malachite green content, the scattering intensity was reduced to about 25% at pH 9 24 h after irradiation, and to about 10% at pH 10 within about 1 h after irradiation, whereas little change in the scattering intensity was observed at pH 6 (Fig. 8). At pH 10, the change in scattering intensity was well correlated with that in absorbance (Fig. 8). In other words, complete deionization of malachite green led to almost complete dissociation of the complex. The other approach to complete dissociation of the polyplexes is the synthesis of leuconitrile derivatives of malachite green as model compounds, which could exist in a complete

non-ionic form before irradiation, and would not be affected by the pH of the solution.

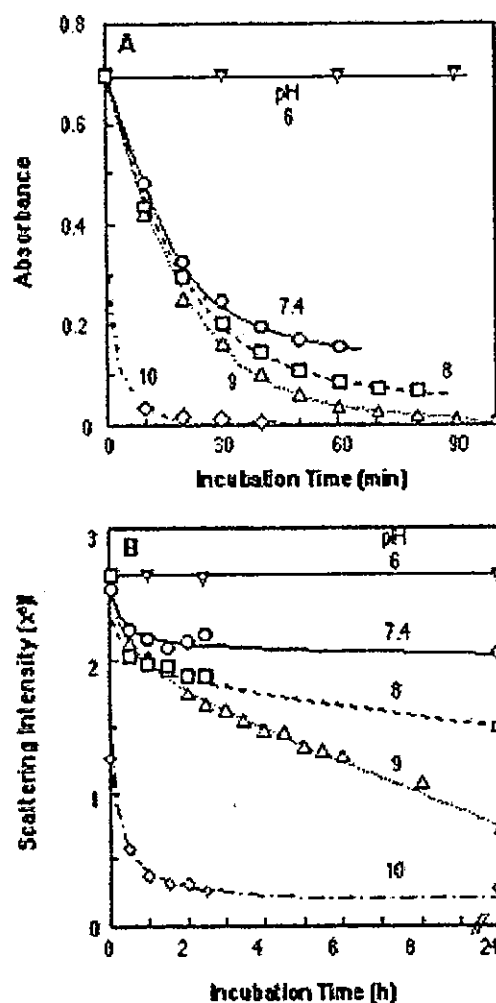


Fig. (8). Changes in absorbance (A) and scattering intensity (B) of an aqueous solution of the polyplexes of photo-cation generatable water-soluble copolymer (malachite green content per molecule, 15.0) and DNA at C/A ratio of 1 at different pHs.

This study indicated that generation and dissociation of polyplexes of water-soluble polymer and DNA was controlled to some extent using the specific photo/thermoreactivity of malachite green (Fig. 1). It can be said that a new model for gene delivery system into cells has been demonstrated. For the next stage of this study, we are planning to examine *in vitro* transfection efficiency. It is highly expected that only by mixing with the malachite green-derivatized copolymers after irradiation DNA will deliver effectively to inside of cells by endocytosis. The degree of delivery will be controlled easily by irradiation time and malachite green content. In addition, thermal dissociation ability of the photo-generated polyplexes after escaping from

endosomes will promote DNA delivery to nuclei, which will cause the enhancement of transfection efficiency. Such study will be reported in the near future.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors would like to thank Dr. Mariko Shiba for her helpful discussion and Ms. Keiko Jinno for her expert technical assistance in this study. This work was supported by "Research Grants for Advanced Medical Technology", "Human Genome, Tissue Engineering and Food Biotechnology", and "Aging and Health" from the Ministry of Health, Labour and Welfare of Japan, and by Grant-in-Aid for Scientific Research (B1-16390423) from the Ministry of Education, Science, Sports and Culture of Japan.

REFERENCES

- [1] Somia, N.; Verma, I.M. *Nat. Rev. Genet.*, 2000, 1, 91-99.
- [2] Anderson, W.F. *Nature*, 1998, 392, 25-30.
- [3] St George, J.A. *Gene Ther.*, 2003, 10, 1135-1141.
- [4] Miyake, S.; Makimura, M.; Kanegae, Y.; Harada, S.; Sato, Y.; Takamori, K.; Tokuda, C.; Saito, I. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1996, 93, 12320-12324.
- [5] Wang, Q.; Finer, M.H. *Nat. Med.*, 1996, 6, 714-716.
- [6] Kotin, R.M. *Hum. Gene Ther.*, 1994, 5, 793-801.
- [7] Finer, M.H.; Dull, T.J.; Qin, L.; Farson, D.; Roberts, M.R. *Blood*, 1994, 83, 43-50.
- [8] *Hum. Gene Ther.*, 1990, 1, 327-362.
- [9] Niidome, T.; Huang, L. *Gene Ther.*, 2002, 9, 1647-1652.
- [10] Thomas, M.; Klibanov, A.M. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2003, 62, 27-34.
- [11] Gebhart, C.L.; Kabanov, A.K. *J. Control. Release*, 2001, 73, 401-416.
- [12] Nishikawa, M.; Huan L. *Hum. Gene Ther.*, 2001, 12, 861-870.
- [13] Oh, Y.K.; Suh, D.; Kim, J.M.; Choi, H.G.; Shin, L.; Ko, J.J. *Gene Ther.*, 2002, 9, 1627-1632.
- [14] Boussif, F.; Lezoualc'h, M.A.; Zanta, M.D.; Mergny, D.; Scherman, B.; Demeneix, J.P.; Behr, J.P. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1995, 92, 7297-7301.
- [15] Itaka, K.; Yamauchi, K.; Harada, A.; Nakamura, K.; Kawaguchi, H.; Kataoka, K. *Biomaterials*, 2003, 24, 4495-4506.
- [16] Jeon, E.; Kim, H.D.; Kim, J.S. *J. Biomed. Mater. Res.*, 2003, 66A, 854-859.
- [17] Kihara, F.; Arima, H.; Tsutsumi, T.; Hirayama, F.; Uekama, K. *Bioconjug. Chem.*, 2003, 14, 342-350.
- [18] Arima, H.; Kihara, F.; Hirayama, F.; Uekama, K. *Bioconjug. Chem.*, 2001, 12, 476-484.
- [19] Lim, D.W.; Ycom, Y.I.; Park, T.G. *Bioconjug. Chem.*, 2000, 11, 688-695.
- [20] Cheng, J.Y.; van de Wetering, P.; Talsma, H.; Crommelin, D.J.; Hennink, W.E. *Pharm. Res.*, 1996, 13, 1038-1042.
- [21] Zanta, M.A.; Boussif, O.; Abdennaji, A.; Behr, J.P. *Bioconjugate Chem.*, 1997, 8, 839-944.
- [22] Diedold, S.S.; Kursa, M.; Wagner, E.; Cotton, M.; Zenke, M. *J. Biol. Chem.*, 1999, 274, 19087-19094.
- [23] Kircheis, R.; Kichler, A.; Wallner, G.; Kursa, M.; Ogris, M.; Felzmann, T.; Buchberger, M.; Wagner, E. *Gene Ther.*, 1997, 4, 409-418.
- [24] Wojda, U.; Miller, J.L. *J. Pharm. Sci.*, 2000, 89, 674-681.
- [25] Li, S.; Tan, Y.; Viroonchatapan, E.; Pitt, B.R.; Huang, L. *Am. J. Physiol.*, 2000, 278, L504-L511.
- [26] Hui, S.W.; Stoicheva, N.; Zhao, Y.L. *Biophys. J.*, 1996, 71, 1123-1130.
- [27] Kuo, J.H.; Jan, M.S.; Sung, K.C. *Int. J. Pharm.*, 2003, 257, 75-84.
- [28] Kurisawa, M.; Yokoyama, M.; Okano, T. *J. Control. Release*, 2000, 69, 127-137.
- [29] Nagasaki, T.; Taniguchi, A.; Tamagaki, S. *Bioconjugate Chem.*, 2003, 14, 513-516.
- [30] Bertelson, R.C. in Brown, G.H. (ed.), *Photochromism. Techniques of Chemistry*, Vol. III, Wiley-Interscience, New York, 1971; p. 294.
- [31] Iric, M.; Kungwachakun, D. *Macromolecules*, 1986, 19, 2476.
- [32] Nakayama, Y.; Matsuda, T. *J. Control. Release*, 2003, 89, 213-224.
- [33] Kimura, K.; Yokota, G.; Yokoyama, M.; Uda, R.M. *Macromolecules*, 2001, 34, 2262-2268.
- [34] Nakayama, Y.; Takatsuka, M.; Matsuda, T. *Langmuir*, 1999, 15, 1667-1672.
- [35] Matsuda, T.; Nagase, J.; Ghoda, A.; Hirano, Y.; Kidoaki, S.; Nakayama, Y. *Biomaterials*, 2003, 24, 4517-4527.
- [36] Masuda, T.; Nakayama, Y. *J. Med. Chem.*, 2003, 46, 3497-3501.
- [37] Bunemann, H.; Muller, W. *Nucleic Acids Res.*, 1978, 5, 1059-1074.
- [38] Erbacher, P.; Bettinger, T.; Brion, E.; Coll, J.L.; Plank, C.; Behr, J.P.; Remy, J.S. *J. Drug Target.*, 2004, 12, 223-236.

光反応によるバイオマテリアル界面の精密創製

国立循環器病センター研究所 生体工学部

中山泰秀

『ナノバイオエンジニアリングマテリアル』

2004年3月 フロンティア出版刊 抜刷

第2章 光反応によるバイオマテリアル界面の精密創製

中山泰秀*

1 はじめに

光反応は、微細加工に適した以下に示す優れた特徴を有している。すなわち、①レンズ、シャッター、電圧等によってエネルギー量を変化できるので、反応量を容易に調節することができる(量制御能) ②照射時のみに反応を起こさせることができるので、時間を限定して反応させることができる(時間制御能) ③照射波長を調節することで、種を特定して反応させることができる(選択能) ④室温下、大気中での穏和な条件下で反応させることができる(低障害能)。さらに、⑤フォトマスクや光ファイバーを用いて照射領域を制限することで、領域を限定して反応させることができる(空間制御能)、などがあげられる。

これらの特徴を生かして、光反応は、これまで半導体や記録媒体の開発など、主に電子情報分野の発展を支える超精密加工技術として大きく貢献してきた。また最近では、DNAチップやタンパクチップに端を発して、さらに複雑な化学システムやバイオシステムをマイクロチップ上に集積化する精密基盤の作製技術としても利用され、ナノマイクロ化学実験空間が現実のものとなりつつある。これらのマイクロチップ化技術は、既にゲノム解析、遺伝子診断、プロテオーム解析などに応用されている。また、人体の構造情報や機能情報を視覚的に把握するために、光透視や光CTなど、光の性質を利用したより低侵襲な画像化機器の開発も進められている。さらに、molecular imagingに代表される分子遺伝子細胞レベルを対象とした可視化技術は、光分子プローブの開発によって細胞内情報を解析する手法として絶大な威力を発揮して分子生物学の発展に貢献し、病態の解明などに応用が期待されている。いずれにおいても光は、次世代医療の診断領域における要素技術として欠かすことができないであろう。

このように、光の利用は医療分野においてすでに身近なものとなりつつあり、治療領域においても、レーザーアブレーションによる狭窄血管病変の血管形成術や、光感受性薬剤と組み合わせたレーザー癌治療など光そのものの性質を利用した治療法が開発されている。また、光反応の利用は、1980年代より治療デバイスの表面に機能性や生体適合性を付与するための表面修飾・改質法として、使用する光反応性化合物の開発に基づいて検討されてきている。本稿では治療デバイスの素材として主に用いられている高分子バイオマテリアルを対象として、その生

* Yasuhide NAKAYAMA 国立循環器病センター研究所 生体工学部 室長

体成分との接触界面における，光反応を用いた精密創製に焦点をあて，循環器領域での治療デバイスへの応用例を交えて紹介する。

2 界面設計に使用されている光反応性化合物

医療分野において界面設計に利用されている光反応性化合物の代表例を図1に示す。いずれも医療目的に特別に開発されたものではないが，毒性を含めた生体適合性が使用する第一の選択理由となっている。それらを光反応機構別に分類すると，二量化するタイプとラジカルを発生するタイプに大きく分けられる。前者にはシナモンの構成成分であるケイ皮酸やクマリンなど α, β -不飽和カルボニル類が含まれる。これらは紫外光照射によって不飽和結合部が分子間で付加環化反応を起こし二量化する。また核酸の構成成分の一つであるチミンも同様な環化二量化反応を起こすことが知られている。一方，後者には紫外光照射によって解裂反応を起こしてラジカルを生成するフェニルアジド類，可逆的にラジカルを生成するジチオカルバメート類，紫外光照射によって水素引き抜き反応を起こしてラジカルを発生するベンゾフェノンやアセトフェノンなどの芳香族ケトン類，さらには可視光照射でラジカルを発生するカンファキノン類，ならびにフルオレセインやエオシン，ローズベンガルなどの食用色素を含むキサントゲン系色素が含まれる。その他，ビタミンB₁₂であるリボフラビンも可視光でラジカルを発生することが報告されている。

3 従来の界面設計方法

良好な成型加工性を有する高分子バイオマテリアルは，人工臓器を含む医療デバイスの素材として広く用いられている。例えば，高分子エラストマーであるセグメント化ポリウレタンは，伸縮耐久性に優れているため，拍動による大きな形状変化を持続的に伴う人工心臓の基材として極めて有用である。しかし，このウレタン素材を含めて医療デバイスに使用されている高分子マテリアルは，そのほとんどが汎用の工業用マテリアルを医療用に純度を高めたものとして提供されている。つまり，素材として選択する際には生化学的性質より機械的性質が重視されているため，医療デバイス化して使用する場合には，炎症や拒絶反応を防ぐために薬物投与が必要となる。

そこで，高分子マテリアルの機械的性質を大きく損なうことなく生体に適合化させるために，さまざまな表面修飾や改質が検討されてきた。これまでに，電子線照射やコロナ放電，プラズマ処理，薬品処理など物理的あるいは化学的手法によって，ぬれ性や接着性など特定の機能の向上が図られている。しかし，これらの方法はいずれも，表面層の高分子を化学的に反応させて極性基など特定種の官能基を無作為に導入しているため，制御された界面設計は極めて困難である。

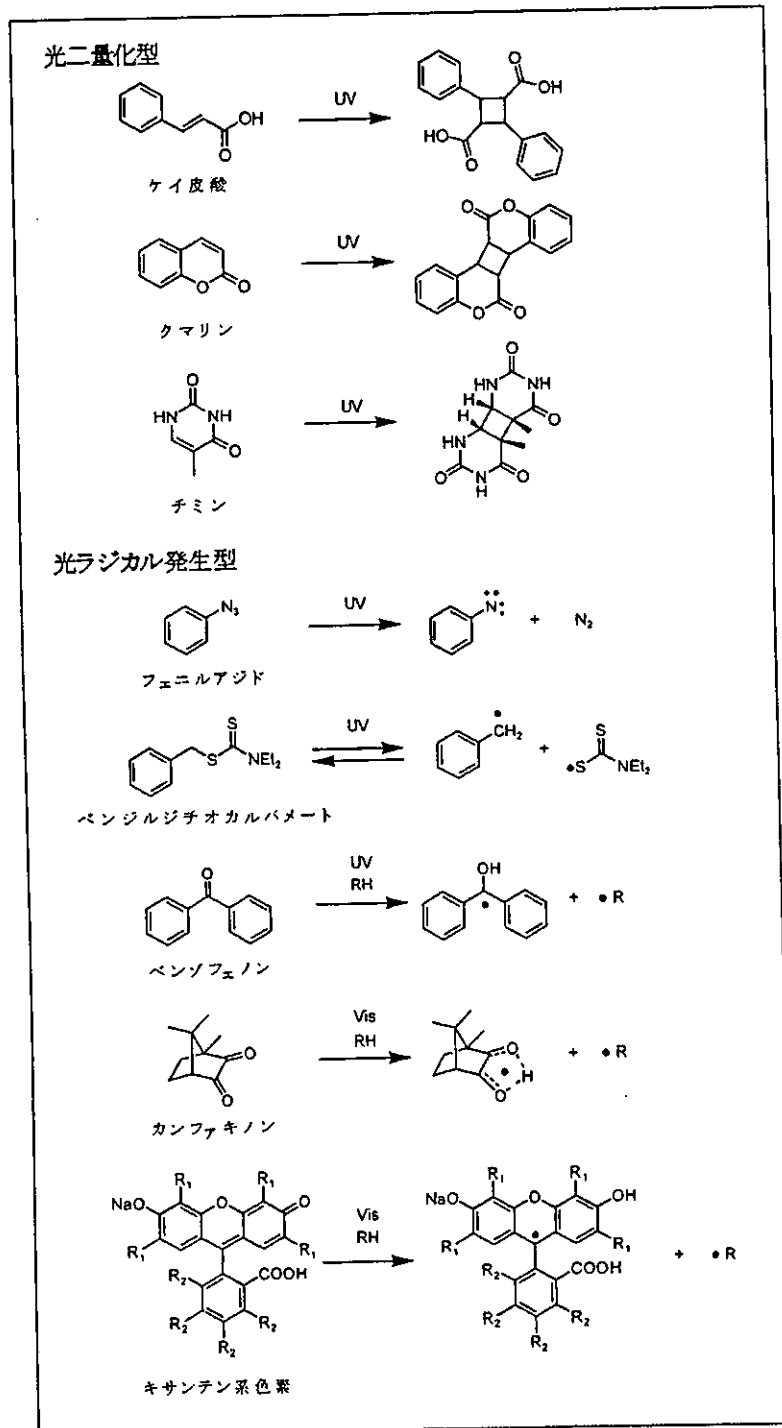


図1 界面設計に利用されている光反応性化合物

4 光グラフト化による界面設計

光反応は照射時に照射領域のみに限定して起こさせることができるので、任意の微細領域のみの界面を設計することができる。また、単純な官能基の導入に加えて、生理活性物質や、タンパク質、糖などの生体高分子、さらには合成高分子を任意の微細領域に固定化させて、機能性表面や生体適合性表面を創製することが可能である。この目的のために、フェニルアジドの光反応が多用されている。まず、固定化させたい生理活性物質や高分子にフェニルアジド基を導入することによって光反応性化合物が合成されている。これら光反応性化合物を高分子マテリアル表面にコーティングし紫外光照射することによって、フェニルアジド基に生成した高反応性のピラジカル（ナイトレン）が、高分子マテリアルの表面から水素を引き抜くと同時に共有結合を形成して基材と架橋反応を起こし、目的化合物がマテリアル表面に固定化される。

例えば、細胞接着性タンパク質（フィブロネクチン、ラミニンなど）の細胞接着活性部位である arginine-glycine-aspartic acid (RGD) を含むオリゴペプチドの末端にフェニルアジド基を導入した光反応性ペプチドは、コーティングした後に紫外光を照射するだけで、容易に基材表面に固定化されている¹⁾。この表面では積極的な細胞接着性が獲得されている。また、Chungらは、生体高分子であるキトサンの表面にRGDペプチド鎖の光固定を行い、キトサン表面を細胞接着性に改変している²⁾。この方法は、他の生理活性物質の固定化にも利用されており、例えば、伊藤らは、細胞成長因子(EGF)を微細領域に固定化させると、限定した固定化領域内でのみで細胞の増殖を促進できることを報告した³⁾。この際、細胞成長因子の機能発現は、表面へ固定された状態においても十分に発揮することが示された。従って、発現にはそれらが必ずしも細胞内に取り込まれる過程を必要としないことが明らかとなり、さらには触媒反応的に繰り返し機能させられることも明らかにされた。その他、神経成長因子(NGF)や腫瘍壊死因子(TNF- α)を固定化させることによって各種細胞の分化やアポトーシスの誘導が観測されている。一方、Kooleらは、高度な生体適合性を付与することを目的として細胞膜の主構成成分であるリン脂質の極性基の一種であるフォスファチジルコリン(PC)基の固定化を行っている⁴⁾。

紫外光照射は、基材に対して固定化層となる最外面部を除いてバルクの性質にほとんど影響を与えない。一方、固定化物に対しては、直接照射を受けるため一部に障害を受ける可能性が指摘されている。そこで、固定化物への障害を回避する工夫が考案されている。つまり、Cassらは、ビオチン化フェニルアジドを合成し、先ずこれを基材表面に光固定した⁵⁾。次いで、表面をアビジン化させた後に、ビオチン化した酵素やタンパク質を作用させると、ビオチン-アビジン-ビオチン架橋を介してほぼ非侵襲で目的物を固定化させることを可能とした。

生理活性物質以外にも合成高分子材料の固定化による基材表面の改質が検討されている。例えば、Kooleらは、フェニルアジド基を側鎖に多数有するアジドスチレン共重合体を接着層と

してポリウレタン基材の表面にあらかじめコーティングしておき、その上にさらに固定化させたい目的とする高分子、例えば、ポリ(*N*-ビニルピロリドン)をコーティングし、紫外光照射することで目的高分子を固定化させている⁶⁾。この方法は接着層が基材と目的高分子の両者に光架橋反応できるため、固定させる高分子種に特に制約はなく汎用性の高い界面設計法といえる。

一方、固定化を目的とする高分子の中にあらかじめフェニルアジドを導入しておく、耐久性にすぐれ、かつ微細加工性を有する界面設計が可能となる。このためにアジドスチレンと各種ビニルモノマーとのラジカル共重合反応によって、親水性や疎水性など物性の異なる種々の光反応性高分子が分子設計されている⁷⁾。この光反応性高分子中のアジドスチレンの共重合比を高くすると一般に光反応効率が高くなるが、高分子の物性を保持させるため、アジドスチレン部の共重合比は約10mol%以下に調整されている。また、親水性高分子を合成する別の方法としてポリエチレングリコール(PEG)を主鎖に用いて末端にフェニルアジド基を導入することも行われている。これら光反応性の親水性高分子を基材表面にコーティングした後に紫外光を照射すると、照射領域のみが親水性化される。また、疎水性の光反応性高分子を用いると逆に照射領域のみが疎水性化される。このように、光反応性高分子を分子設計することで任意の物性を基材表面に容易に付与することが可能であり、またフォトマスクなどで照射領域を規制することによって親水-疎水パターン化回路などが自由に設計されている。この回路は細胞の2次元パターン組織体を作製する基材として利用されており、さらに、神経細胞のパターン化によって神経回路網の作製などへの応用も検討されている⁸⁾。また、フェニルアジドと同様に光照射によってラジカル発生能を有するベンゾフェノンやジチオカルバメートなどの光反応性化合物も同様な光固定化に利用されている。

5 ハイドロゲルの表面固定化による界面設計

ハイドロゲルは高い含水率を有するため、その表面ではタンパク質の吸着や細胞の接着がおこりにくい。従って、短期使用目的のデバイスの表面を生体適合化するのに適しているといえる。医療目的でハイドロゲルを光反応で作成する代表的な方法として、エオシンやアセトフェノンなどの光ラジカル重合開始剤が用いられ、主にPEGをベースとするジアクリレート体の3次元架橋が行われている。このシステムを用いてHubbellらは、創傷治癒促進剤への応用を検討している。そこでは、血管内腔の損傷部位で光ゲル形成させ、皮膜化することで、バルーンカテーテルやステントを用いた経皮的冠動脈形成術(PTCA)後の血栓形成と内膜肥厚の抑制への有効性を示している⁹⁾。

一方、光ラジカル発生基を側鎖に有する光反応性高分子を利用すると、ハイドロゲルの形成と同時にバイオマテリアル表面上に固定化させることが可能である。例えば、ポリ(*N,N*-ジメ

チルアクリルアミド) などの水溶性高分子と光ラジカル発生基との複合体を基材表面にサブmm以下の厚さでコーティングしておく、照射によって光反応性基に発生したラジカルの再結合が分子間で起こり、水溶性高分子が形成されると同時に、基材との界面においては、連鎖移動によって基材表面に発生したラジカルと水溶性高分子側鎖のラジカルとの再結合が起こり、生成した水溶性高分子が基材表面に固定化される¹⁰⁾。ここで、コーティング層内にあらかじめ薬物を混合させておくと、生成したゲルの内部に薬物を包埋させることができる。

また、水溶性高分子を生体内吸収性とするために、コラーゲンの熱変性体であるゼラチンを主鎖に用いてその側鎖にベンゾフェノン基を導入した光反応性ゼラチンが合成されている¹¹⁾。この光反応性ゼラチンは小口径人工血管やステントグラフトの界面機能化材料として利用されている。両デバイスとも内腔の血液接触界面では抗血栓性が要求される。そのために、光反応性ゼラチンをコーティングする際にヘパリンやウロキナーゼなどを混合させておき、光形成されるゼラチン水溶性高分子内にそれらを包埋させている¹²⁾。一方、外側面には使用目的部位の要求に応じた機能を発揮する薬物が包埋されている。例えば、人工血管では、内腔面の内皮化を促進させることを目的として血管内皮増殖因子 (VEGF) の包埋が行われている¹³⁾。また、ステントグラフトを用いた狭窄病変の血管形成術においては、平滑筋細胞の増殖抑制を目的として免疫抑制剤として知られているFK506や細胞外マトリックス分解酵素阻害剤(MMPI)などを、プラークの安定化・縮退化のためにはスタチンの包埋が検討されている¹⁴⁾。さらに、動脈瘤を閉鎖治療する場合には、瘤内での組織形成の促進を目的としてb-FGFなどの細胞成長因子が包埋されている。可視光に吸収帯域を有するキサンテン系色素を光ラジカル発生基として導入すると、可視光照射によって水溶性高分子を固定化させることも可能である。

高分子どうしのラジカル再結合反応によって水溶性高分子を作製する方法は、高分子上に発生したラジカルどうしが出会う必要があり、また、不均化反応などによってラジカルが消失する可能性も有るため、必ずしも効率の良いゲル化方法とはいえない。そこで、照射によって発生したラジカルを開始点としてラジカル重合によってゲルを固定化させる方法が考案された。そのための要素材料として、ゼラチンの側鎖にラジカル重合性基であるスチレン基を多数導入したスチレン化ゼラチン(ゼラチンマクロマー)が分子設計された¹⁵⁾。また、重合開始剤には歯科領域における光重合レジンの開始剤として実用化されているカンファキノンが選択された。これらの混合水溶液に歯科用のハロゲンランプからの青色光を照射すると、1分間ほどでゲルを生成した。可視光は紫外光に比べて物質透過性が極端に高いため、cmオーダーの立体光造形も可能であった。照射波長を400~500nmに制限して、さらに光量を低下させれば可視光に伴う熱の影響はほぼ無視できる。従って、紫外光硬化に比べて包埋物に与える障害性を大幅に低減させることができる。その結果、薬物以外にも、タンパク質やアデノウイルス、細胞

などをハイドロゲル内にはほぼ非侵襲で包埋させることが可能となっている。薬物を包埋させた場合、用いる光反応性高分子内の光反応性基の導入量や照射時間を変化させると、ハイドロゲル内の架橋量が調節できるので、ハイドロゲルからの薬物の放出挙動を制御することができる。

この方法を利用して、血管壁内への遺伝子導入デバイスへの応用が試みられている。すなわち、このスチレン化ゼラチンにLacZ遺伝子を組み込んだアデノウイルスを混合させて、ステントのストラット表面に光コーティングされた¹⁶⁾。これを兔の頸動脈に留置すると、1ヵ月間にわたってLacZ遺伝子の発現が認められた。これはゲル内に包埋されたアデノウイルスがゲルの分解に伴って徐々に放出され、長期間にわたる持続的な遺伝子発現が起こったためと考えられる。また、このゼラチンマクロマーは細胞を包埋させることができるので、組織再生医療の分野において、*in situ* 硬化性の軟骨再生用のスキャホールド材、さらに組織接着剤への応用が検討されている。

6 光表面リビンググラフト重合による界面の3次元設計

高分子基材に高強度の紫外線を照射すると、 γ 線やグロー放電、コロナ放電処理した場合と同様に基材表面にパーオキシドなどの高反応性基が生成する。従来この生成した高反応性種をラジカル重合開始種として表面グラフト重合が行われ、表面改質法として利用されてきた。しかし、この場合、複雑な形状を有するデバイスの内面を均質に、あるいは限定した特定部位のみを修飾することは困難である。また、高強度の紫外光照射などは基材内部の損傷や物性変化を伴う場合もある。さらに、一般にラジカルは多くのビニルモノマーの高分子化に有効な重合法であるが、フリーラジカルを連鎖てい伝体とする連鎖反応機構で進行するため、通常高分子表面への精密構造設計は極めて困難である。

ジチオカルバメートは、1980年代初めに大津らによって開発された光ラジカル重合開始剤の一種であり、これを用いるとスチレンやメタクリル酸メチルなどのビニルモノマーの光重合が見かけ上リビングラジカル重合機構で進行し、照射条件によってラジカル生長が制御できることが報告されている¹⁷⁾。このジチオカルバメートは重合開始剤 (*initiator*)、連鎖移動剤 (*transfer agent*)、停止剤 (*terminator*) として機能することから、イニファタ (*iniferter*) と名付けられている。イニファタの一種であるベンジルジチオカルバメートに紫外光を照射すると、ベンジル炭素と硫黄間の結合が可逆的に解離され、ベンジルラジカル ($\text{Ph-CH}_2\cdot$) とジチオカルバミルラジカル ($\cdot\text{SCSNEt}_2$) が生成する。ここで、ベンジルラジカルのみがビニルモノマーの重合開始剤として機能し、重合末端では常にジチオカルバミルラジカルによるキャッピングが起こる。従って、光照射時にのみモノマーを重合させることができ、照射条件 (強度, 時間) や溶液条件 (モノマー濃度, モノマー/開始剤比) を選択すれば多くのモノマーに対してリビング

的にラジカル重合を進行させることができる。つまり、重合鎖長は照射時間によって、鎖の成分はモノマーの組成によって、また重合領域は照射領域によって規制することが可能であり、バイオマテリアル界面の3次元での精密設計に応用されている。

基材としてジチオカルバメート基を側鎖に有するポリスチレンのコーティング膜を用いて、モノマー溶液中で紫外光照射を行うと、基材表面に導入されたジチオカルバミル基から重合が起こる。水晶発振子 (QCM) 上で行うと、グラフト重合は光の照射時のみに限定して起こり、重合量はモノマー濃度と照射強度の増大に伴って増大し、さらに、重合速度はモノマーのQ値が約0.8で極大値をとることが報告されている¹⁹⁾。従って、モノマー種に応じて重合挙動をある程度推定することができる。

照射領域はフォトマスクなどでサブミクロンレベルの精度で容易に規制することができるため、任意の微細領域のみで光重合を起こさせることができる。これを利用してWardらは、光リソグラフ技術を組み合わせることで、5~80ミクロン幅の構造物を作製している²⁰⁾。また、照射領域を段階的に横にずらせながらモノマー種を変化させて照射を繰り返すと、領域ごとに連続的に物性の異なる高分子鎖をグラフトすることが可能であり、異種高分子鎖のグラフトパターン表面が作製された²¹⁾。デバイスの生体適合性は最表面層の性状と形状に依存することが知られており、目的に応じた生体適合性を獲得するためには適切な性状を有する高分子種を選択する必要がある。マイクロパターン化表面では微細領域ごとに化学組成を任意に変化させることが可能である。従って、タンパク質や細胞との相互作用の表面化学依存性を一度に同じ条件下で評価することができる。このパターン化表面を利用してAndersonらは、細胞応答性に関して表面化学依存性を調べており、マクロファージのアポトーシスは非イオン性、またはアニオン性の親水性表面において増加することなどが明らかにされ、医療デバイスの表面化学の最適化設計が検討されている²²⁾。また、照射量を調節することでグラフト重合のZ軸、つまり高さ方向の制御が可能である。例えば、一定時間毎に照射領域を段階的に、あるいは連続的に拡大させることで、それぞれ数十ナノメートルの段差を有する階段状の構造物や、高低差が数百ナノメートルのスロープ状の3次元構造物が作製されている。その他、グラフト鎖の密度や表面ブロック化 (積層化) も実現されている²³⁾。

一方、イニファタのマルチ化とグラフト鎖長の制御能を組み合わせることによってグラフト鎖の分岐度と鎖長を自由に設計することが可能となり、多分岐型グラフト鎖が作製されている²⁴⁾。すなわち、基材表面に導入したジチオカルバミル基から光重合させる際にコモノマーとしてクロロメチルスチレンを共重合させておく。幹として形成されたグラフト鎖の側鎖に導入されたクロライド基は容易にジチオカルバミル基に置換できる。この後、先と同様に光共重合とジチオカルバミル化を繰り返すことで、枝さらに小枝となる分岐グラフト鎖が逐次的に形

成される。この方法を用いてデバイス表面を加工すれば、グラフト鎖の空間密度を自在に設計できることから、血液や体液中の蛋白質等の吸着を大幅に抑制し、細胞非接着性を長期間維持させることができると期待される。

また、この光ブロックイニフタ重合を溶液系で進めることによって、表面吸着剤の分子設計が行われている。PEGの末端からスチレンを重合すれば組成比が厳密に調整された親水-疎水ブロック共重合体が得られる²⁴⁾。これをバイオマテリアル表面に吸着させると、親水性のブラシ表面が容易に得られ、タンパク質の吸着や細胞の接着は大幅に抑制された。また、イニフタに細胞膜の構成成分であるフォスファチジルコリン(PC)基を長鎖アルキルを介して導入し、次いで親水性-疎水性モノマーの順でグラフト重合すれば、PC基を末端に有する親水-疎水ブロック共重合体が得られた²⁵⁾。これを吸着させると、長鎖アルキル鎖の自己組織化にともなってPC基の配列による疑似細胞膜表面が得られた。また、ヘパリンやゼラチンに感温性高分子であるポリ(*N*-イソプロピルアクリルアミド)(PNIPAM)をグラフトすることで、それぞれに感温性が付与されている。両者ともに水溶液からの温度変化によってマテリアル表面に吸着させることができ、前者の場合は抗血栓性表面、後者の場合は細胞接着性表面として機能している²⁶⁾。一方、可視光を用いて、複雑な形状をした医療デバイスの内面(血液接触面)を修飾する方法が開発されている。すなわち、先に示したカンファキノンを入面に含浸させておくと、デバイスの外面からの可視光照射によって内面でグラフト重合させることを可能としている²⁷⁾。

7 レーザーアブレーションを利用した界面設計

エキシマレーザーは紫外域に発振波長を有する紫外光レーザーであり、組み合わせるガス種(主に希ガスとハロゲン)の種類によって発振波長を紫外域で段階的に調節することができる。代表的なKrFレーザーの場合、発振波長は248nmであり、114kcal/molの光子エネルギーを有する。この値は炭素単結合(約80 kcal/mol)や炭素-水素結合(約98 kcal/mol)より高く、被照射物がレーザー発振波長域に吸収帯を有すればこれらの分子間結合を一光子吸収により切断することが可能である。また、ArFレーザーは193 nmで発振し、148 kcal/molの光子エネルギーを有する。これは炭素二重結合の結合エネルギー(約145 kcal/mol)に相当する。従って、エキシマレーザーによる加工は光化学反応により主として非熱過程により進行できる。また、レーザー光のパルス幅は10~20ns程度であるが、ピーク出力は数十メガワットと極めて高い。

このエキシマレーザーをある一定のしきい値(通常100mJ程度)以上の高出力で高分子マテリアルの表面に照射すると、アブレーションと呼ばれる吸収熱による蒸発や多光子吸収によるプラズマ発光と衝撃音を伴った固体表面層の爆発的な剥離が起こる。アブレーションによる加工の一般的な特徴として、①高精度の寸法安定性を有すること、ならびに②加工部およびその

周囲に熱的な影響をほとんど与えず、加工跡に焼け焦げや溶融跡を残さないこと、などがあげられる。近年、このアブレーションは医療分野において眼科、胸部血管外科、歯科、整形外科など様々な領域で生体組織の形成・加工法として応用が検討されている。特に眼科領域では、すでに近視や乱視の矯正を目的とした角膜切開や角膜移植に応用されている。著者らは、人工血管やカバーステントの基材として用いているセグメント化ポリウレタン製薄膜の多孔質化設計の手段として利用している¹¹⁻¹⁶⁾。また、CVD (Chemical Vapor Deposition) の技術を応用してアブレーションによって飛散した高分子片をマテリアル表面で補足することによって高分子の転写を行っている。転写はレーザーの照射領域に限定されるため、レーザー光を絞ることによってミクロンレベルでの微細加工性が得られている²⁰⁾。

一方、エキシマレーザー光をアブレーションが起こるしきい値以下の低エネルギーで照射すると高分子表面の改質を行うことが可能である。側鎖に水酸基やアミノ基などの官能基を有する高分子に照射すると吸光係数の低い主鎖の結合は開裂されず、側鎖に局在化した光吸収が起こり官能基のみを選択的に除去できる²⁰⁾。また、除去時には高分子表面にラジカルなどの反応性種が生成するので、これを利用すると種々のガス性低分子を高分子表面に導入、または表面重合させることが可能である。一方、逆にガス性低分子をレーザー光分解させ高分子表面に導入させることも可能である。矢部らは、レーザー照射で生じるヒドラジンの活性種を利用してテフロン表面へのアミノ基の導入を行っており、親水性と接着性を向上させている²⁰⁾。

8 おわりに

ここで記したように、光反応を利用したバイオマテリアルの界面創製は、主に治療デバイスの表面設計のための方法として開発されてきた。そこでは、光有機合成化学の分野において開発されてきた様々な光反応性化合物が目的に応じて選択され、マイクロレベルでの位置的な選択性に加えて、ナノレベルでの量的な制御を伴って、任意の生理活性物質や有機化合物、高分子を固定化する(グラフト化、レーザー転写など)、成長させる(グラフト重合など)、あるいは削除する(レーザーアブレーションなど)ことなどが可能となっている。現在の医療においては、従来の開頭や開腹を伴う標準的の外科手術から、内視鏡下手術やX線透視下で行う血管内手術を含む経皮的手術へと、低侵襲治療が先端医療の1つとして開発され、患者のQuality of Life (QOL) をより高く保つ治療技術が提供されている。血管内治療においては、皮膚に開けた針穴ほどの切開創を通して、ほぼ全身の血管病変(狭窄、瘤、奇形)を対象として扱うことが可能となりつつある。そのために、口径がわずか数mm以下の細い血管の中を自由に操作することのできるマイクロカテーテルなどの血管内治療デバイスが開発されている。今後、血管内治療のさらなる推進のためには、治療デバイスのより小型化・高集積化・多機能化が要求さ

れている。また、ナノテクノロジーに基づく超微細精密構造化の波は、医療分野においてはナノメディシンとして展開され、医用マイクロマシンの開発などの大きな推進力となっている。光反応を用いた超精密創製技術は、バイオマテリアルの生体との接触界面の構造や物性をマイクロ・ナノレベルで厳密に制御できる可能性があるため、上記のマイクロ構造化された治療デバイスの実現化に大きく貢献するものと期待される。

文 献

- 1) Sugawara T *et al.*, *J Biomed Mater Res*, 29, 1047-1052 (1995).
- 2) Chung TW *et al.*, *Biomaterials*, 23, 4803-4809 (2002).
- 3) Ito Y *et al.*, *Proc Natl Acad Sci USA*, 93, 3598-3601 (1996).
- 4) van der Heiden AP *et al.*, *J Biomed Mater Res*, 37, 282-290 (1997).
- 5) Hengsakul M *et al.*, *Bioconjug Chem*, 7, 249-254 (1996).
- 6) Wetzels GM *et al.*, *Biomaterials*, 20, 1879-1887 (1999).
- 7) Sugawara T *et al.*, *J Biomed Mater Res*, 29, 749-756 (1995).
- 8) Matsuda T *et al.*, *Trans Am Soc Artif Intern Organs*, 38, M243-M247 (1992).
- 9) Hubbell JA *et al.*, *Polym Prepr*, 34, 846-847 (1993).
- 10) Nakayama Y *et al.*, *ASAIO J*, 39, M754-M757 (1993).
- 11) Nakayama Y *et al.*, *J Biomed Mater Res*, 48, 511-521 (1999).
- 12) Doi K *et al.*, *J Biomed Mater Res*, 31, 27-33 (1996).
- 13) Masuda S *et al.*, *ASAIO J*, 43, M530-M534 (1997).
- 14) Nakayama Y *et al.*, *Cardiovasc Rad Med*, 4, 77-82 (2003).
- 15) 中山泰秀他, *人工臓器*, 4, S-84 (2000).
- 16) Nakayama Y *et al.*, *J Biomed Mater Res*, 57, 559-566 (2001).
- 17) Otsu T *et al.*, *Makromol Chem Rapid Commun*, 3, 127 (1982).
- 18) Nakayama Y *et al.*, *Macromolecules*, 32, 5405-5410 (1999).
- 19) Ward JH *et al.*, *J Biomed Mater Res*, 56, 351-360 (2001).
- 20) Nakayama Y *et al.*, *Langmuir*, 15, 2080-2088 (1999).
- 21) Brodbeck WG *et al.*, *Proc Natl Acad Sci USA*, 93, 3598-3601 (1996).
- 22) Nakayama Y *et al.*, *Langmuir*, 15, 5560-5566 (1999).
- 23) Nakayama Y *et al.*, *Langmuir*, 18, 2601-2606 (2002).
- 24) Nakayama Y *et al.*, *Biomaterials*, 20, 963-970 (1999).
- 25) Matsuda T *et al.*, *Biomaterials*, 24, 4517-4527 (2003).
- 26) Ohya S *et al.*, *Biomacromolecules*, 2, 856-863, (2001). Morikawa N *et al.*, *J Biomater Sci Polym Ed*, 13, 167-183 (2002).
- 27) Nakayama Y *et al.*, *Trans MRS Jpn*, 25, 923-926 (2000).
- 28) Nakayama Y *et al.*, *J Appl Phys*, 80, 505-508 (1996).
- 29) 中山泰秀他, *人工臓器*, 24, 74-78 (1995).
- 30) Niino *et al.*, *Appl Phys Lett*, 63, 3527 (1993).

Reprint from

H. Mori, H. Matsuda (Eds.)
Cardiovascular Regeneration Therapies
Using Tissue Engineering Approaches

© Springer-Verlag Tokyo 2005
Printed in Japan. Not for Sale.

 Springer

Biotube Technology for a Novel Tissue-Engineered Blood Vessels

Hatsue Ishibashi-Ueda¹ and Yasuhide Nakayama²

¹Department of Pathology, National Cardiovascular Center Hospital, 5-7-1 Fujishiro-dai, Suita, Osaka 565-8565, Japan

² Department of Bioengineering, National Cardiovascular Center Research Institute, 5-7-1 Fujishiro-dai, Suita, Osaka 565-8565, Japan

Summary. Autologous tubular tissues as small caliber vascular prostheses were created in vivo using tissue engineering. We named them “Biotubes”. The six kinds of polymeric rods made of polyethylene (PE), polyfluoroacetate (PFA), poly-methyl methacrylate (PMMA), segmented polyurethane (PU), polyvinyl chloride (PVC) and silicone (Si) as a mold were embedded in the dorsal skin of six of New Zealand White rabbits. Biotubes were formed after 1 month by fibrous tissue encapsulation around the polymeric implant except PFA. None of the Biotubes were ruptured when a hydrostatic pressure was applied up to 200 mmHg. The wall thickness of the Biotubes ranged from 50 to 200 μm depending on the implant materials in the order PFA<PVC<PMMA <PU<PE. The tissue mostly consisted of fibroblasts and collagen-rich extracellular matrices. The tissue created by Si rod was relatively firm and inelastic and the one created by PMMA was relatively soft. For PMMA, PE and PVC the stiffness parameter (β value; one of the indexes for compliance) of the Biotubes was similar to those of the human coronary, femoral and carotid arteries, respectively. Biotubes, autologous tubular tissues, can be applied for use as small caliber vessels and are ideal prostheses because of avoidance of immunological rejection.

Keywords. Graft prosthesis, Tissue engineering, Autologous transplant, Small caliber vessel

Introduction

In vivo, the encapsulation of foreign materials by own fibrous tissue has been well documented as a biological reaction of self-defense system since the 1930's. Peirce et al. attempted to utilize capsular tissues as artificial vascular vessels (Knott I, et al. 1973, Peirce EC II, 1953). Sparks et al. examined the clinical application of grafts consisting of a combination of capsular tissues and Dacron tubes in the latter half of the 1960's (Hallin RW and Sweetman WR 1976, Sparks CH, 1972). Recently, Campbell et al. studied capsular tubular tissues obtained by implantation of silicone rods into animal peritoneal cavities (Campbell JH, et al. 1999). Tubular tissues possessed a wall with several layers of myofibroblasts and collagen-rich extracellular matrices covered with a single layer of peritoneal mesothelium. By inverting the tubular tissues, mesothelial cells became internal lining cells within tubes like endothelial cells. Autotransplantation of these tubes as grafts resulted in high patency for several months, suggesting the possible application of capsular tissue prosthesis for arteries.

The patency rate of small caliber artificial grafts is much worse than medium to large diameter artificial grafts because of thrombosis in the early stage and of neointimal hyperplasia in the chronic stage. Among the many factors determining the patency of small caliber artificial grafts, the compliance mismatch between the native artery and grafts has been discussed as a major detrimental factor of graft failure (Abbott WH, et al. 1987, Kinley CE and Marble AE 1980, Pevac EC II, et al. 1992, Stewart SF and Lyman DJ 1992).

In this study, the mechanical properties of the tubular tissues were investigated for small caliber blood vessels. Various polymeric rods were implanted in subcutaneum of the dorsal skin of rabbits. Then, own tubular tissues by encapsulation were obtained and we called them "Biotubes". The mechanical properties including pressure resistance, pulse followability and compliance of the Biotubes were measured after histological analysis of their components. The designs of the matrix including luminal surface, mechanics and shape of the Biotubes were discussed.