

解 説

新規バイオ・医療用高分子の熱分析

田中 賢, 佐藤 一博

山形大学 大学院理工学研究科バイオ化学工学

(受取日: 2012 年 8 月 25 日, 受理日: 2012 年 10 月 9 日)

Thermal Characterization of Novel Polymers for Biomedical Applications

Masaru Tanaka and Kazuhiro Sato
Department of Biochemical Engineering,
Graduate School of Science and Engineering,
Yamagata University

(Received Aug. 25, 2012; Accepted Oct. 9, 2012)

A number of polymeric biomaterials have been proposed, such as hydrophilic, phase-separated, and zwitterionic polymers. Also, new generation polymer: poly(2-methoxyethyl acrylate) (PMEA) shows excellent biocompatibility, and has been approved for medical use. It has not been clearly elucidated which mechanisms are responsible for the biocompatibility on a molecular level, although many theoretical and experimental efforts have been devoted to understand this mechanism. Water interactions have been recognized as a fundamental part of the biological response to contact with biomaterials. We have proposed the “*Intermediate water*” concept; the water exhibited clearly defined peaks for cold crystallization in the DSC chart. We found that the localized hydration structure consisting of three hydrated water in poly(2-methoxyethyl acrylate) (PMEA). We hypothesized that *intermediate water*, which prevents the proteins and blood cells from directly contacting the polymer surface or *non-freezing water* on the polymer surface, plays an important role in the excellent biocompatibility. Here, I will give an overview of the recent progress in the experimental description of mechanisms of biocompatibility driven by thermal analysis.

Keywords: biocompatibility, water structure, protein adsorption, cell adhesion, polymer, surface



田中 賢 Masaru Tanaka
E-mail: tanaka@yz.yamagata-u.ac.jp
<http://www.bio-material.jp/>



佐藤 一博 Kazuhiro Sato

1. はじめに

健康寿命の延伸を目的として、安全性が高く、患者の負担を最小限にする低侵襲な治療用機器や在宅での病気の診断用機器の開発が世界各国で進められている。医療事故がなく、患者の生活の質、病後の生活の質 (QOL) を向上し、健やかな生活が可能になるような製品開発に結びつく材料開発が必要とされている。

多くの医療製品は高分子材料から構成されており、生体に接触時に異物反応が少ない生体親和性が要求される。とりわけ、血液に直接接触する使用環境の場合には血液適合性が要求される。¹⁾ 血液適合性が求められる代表的な医療製品には、人工透析、人工血管、人工心肺、カテーテルなどの人工臓器やドラッグデリバリーシステムを代表とする治療用あるいは治療補助を目的とした製品が知られている。また、予防と診断を目的として、血液中の細胞や病気のマーカー物質のセンシング技術の需要も大きい。

血液が人工的に合成された材料と接触すると生体防御機構の免疫系が活性化される。したがって、材料表面に簡便に血液適合性を付与する技術があれば、医療製品の開発のみならず再生医療用の足場材料としても有用である。

これまでに、生体親和性高分子の表面としては、マイクロ相分離表面、親水性表面、両性イオン型分子を含む細胞膜類似表面など¹⁻¹⁰⁾の有効性が報告されている。近年、生命現象の主役であるソフトマテリアルが形成する3次元的な界面¹¹⁾の設計、構造制御、計測技術、理論計算が進展しているものの、生体親和性発現機構は解明されていない。

医療製品が生体 (血液や組織液) と接触すると、直ちに水分子やタンパク質が材料表面に吸着する。また、生命現象の反応場の観点から水分子に着目すると、この水分子はタンパク質や細胞の接着形態や機能発現の場を形成しており、この水分子の構造や運動性が医療用材料に要求される生体親和性に大きな影響を与えと考えられる。生きた細胞と人工的な材料との界面である“バイオ界面” (Fig.1) が細胞-材料間相互作用を規定する要因なので、その相互作用の本質の解明と界面材料設計が課題である。本稿では、poly(2-methoxyethyl acrylate) (PMEA)¹²⁾の優れた生体親和性の発現機構に関して、含水したPMEAの示差走査熱量計 (DSC) 測定によるアプローチについて解説する。

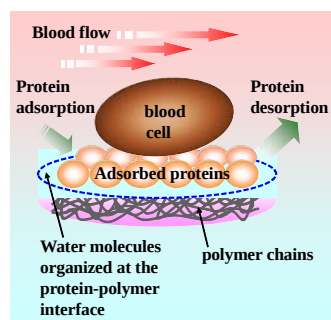


Fig.1 Schematic representation of the polymer and cell interface in blood.

2. PMEA が示す優れた生体親和性

PMEA の化学構造式とバイオマテリアルとしての特徴を Fig.2 に示す。PMEA は、非水溶性で粘着性を有する。PMEA

のコーティング層は剥離や溶出することがなく、様々な基材へのコーティング特性に優れ、流速の大きい環境下での使用も可能である。また、飽和含水量は 9 wt% であり、水の静的接触角は約 50° であることから、PMEA は極端な疎水性あるいは親水性のポリマーでなく、中間的な濡れ性を示す。表面電位は約 0 mV で非イオン性である。共重合性にも優れ、透明性が高く、低コストであることも利点である。PMEA 表面は、血液成分 (血小板、白血球、補体、凝固系) の各種血液適合性マーカーに対する活性化が軽微である。

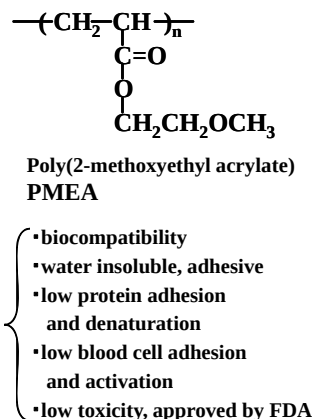


Fig.2 Chemical structure and properties of PMEA.

血液と接触する表面が大きく、長時間接触するような医療製品では生体防御系の活性化が引き金となって起こる術後臓器障害が危惧されている。この問題が指摘されている医療製品の一つとして人工心肺システムが挙げられる。

PMEA をコーティングした人工心肺は 2000 年 3 月に上市され、2006 年以降世界シェア第 1 位を記録している。ヒトや動物の血液をこの人工心肺に循環した場合の優れた血液適合性が、国内外の研究・臨床グループにより報告されている。¹³⁾ ノンコーティングおよびヘパリンコーティングの人工肺を比較対照とした。その結果、ノンコーティングに比べ、接触相、凝固系、白血球系、血小板、補体系等の生体防御機構の活性化が軽微であることがわかった。また、ヘパリンコーティングとほぼ同様の血液適合性を示した。ヘパリンコーティング表面はヘパリンの薬理活性による活性化の抑制であるのに対し、PMEA コーティング表面が優れた血液適合性を示すのは別の機構を考える必要がある。

次に、材料と細胞との界面に存在する血漿タンパク質に注目してその吸着試験を行った。^{14,15)} ヒト血漿を用いた吸着では PMEA 表面への吸着量は 0.26 μg/cm² と単層吸着を示唆するレベルであり、poly(2-hydroxyethyl methacrylate) (PHEMA) とほぼ同レベルであった。免疫電気泳動を行ったところ、アルブミン、フィブリノーゲン、IgG、フィブロネクチン、ビトロネクチンなどの吸着量も少なかった。ポリマー表面に吸着したアルブミンおよびフィブリノーゲンの円偏光二色 (CD) スペクトル測定から得られた α-ヘリックス含量を比較したところ、PMEA 表面に吸着したアルブミンやフィブリノーゲンは他のポリマーに吸着した場合と比較し α-ヘリックス含量が高く、ネイティブのタンパク質に近いものであった。^{14,15)} PMEA と PHEMA を比較した場合、先に述べたようにタンパク質吸着量という観点からは両者はほぼ同レベルにあったが、吸着タンパク質の変性の程度が大きく異なるので、血小板粘着を始めとした各種血液適合性指標に対する違いが現れたものと考えられる。以上のようなタンパク質の吸着およびコンフォメーション

ンに関する検討は静的な観察結果であり、実際の生体中での吸着は動的であることを考えると吸着挙動の速度論的考察も必要である。そこで水晶発振子マイクロバランス (QCM) を用い、アルブミンやフィブリノーゲンの PMEА, PHEMA に対する動的吸着挙動 (吸着速度 (k_1), 脱離速度 (k_1), みかけの結合速度 (Ka)) を調べた。^{14,15} 両タンパク質の吸着速度定数 (k_1) はいずれのポリマーも同レベルにあるのに対し、脱離速度定数 (k_1) は, PMEА が顕著に大きく、これより PMEА 表面では吸着したタンパク質が PHEMA 表面に比べ容易に脱離することがわかる。したがって、PMEА における結合定数は PHEMA 等のそれより小さい値となっている。上述の CD の結果を基にこの吸脱着挙動を考察すると、PMEА 表面に吸着したタンパク質が脱離しやすいのは吸着タンパク質の変性が少ないからと考えられる。以上のことから、PMEА 表面はタンパク質や血球細胞との相互作用が小さいことが示唆された。

走査型原子間力顕微鏡 (AFM) を用いて高分子-タンパク質間に作用する接着力の測定を様々な溶液条件で行った。PMEА-タンパク質間の弱い相互作用は、疎水性相互作用・親水性相互作用、静電的相互作用では説明できず、高分子およびタンパク質表面の水分子が重要な役割を果たしていることが明らかになった。¹⁶

3. 生体親和性とタンパク質吸着

血小板の活性化は、材料表面に吸着したタンパク質の量や構造と密接な関係があることが知られている。^{17,18} すなわち、血小板は血液中のネイティブなフィブリノーゲン (FNG) には粘着しないが材料表面に吸着した FNG には粘着することが知られている。¹⁹ このように、人工材料の血液適合性は、その表面に吸着する血漿タンパク質の吸着挙動が大きく影響していることが示唆されている。

以上のように、人工材料表面の血液適合性評価として、血液細胞やタンパク質吸着が調べられ、それらの吸着機構として材料表面の電荷、濡れ性、表面自由エネルギー、特異的な官能基の影響などが指摘されている。²⁰ 人工材料表面が血液と接触するとタンパク質が吸着する前に、水が吸着されると考えられる (Fig.1 参照)。²¹ 上述の材料表面のさまざまな物理化学物性が、材料表面や内部での水の組織化構造に影響を及ぼすと考えられる。しかし、血液と材料との界面で組織化された水の構造と血液適合性との相関関係については不明な点が多い。²²

4. 高分子の水和構造解析

PMEА 表面とタンパク質、血液成分との相互作用が小さい理由を解明するために、PMEА および PMEА 類似体に含水した水の構造について調べた。示差走査熱量計 (DSC) を用いた PMEА 中の水の構造測定から昇温過程で -40°C 付近で低温結晶形成 (Cold crystallization (CC)) を示す特異な水の存在が、含水量 3 wt% 以上で再現よく確認された (Fig.3)。²³⁻²⁹

また、CC の出現直後に六方晶の氷晶の形成が X 線回折より観測されたことから (Fig.4)、この CC は、低温での氷の結晶形成現象であることが分かった。²⁷ 一方、ポリブチルアクリレートなどの血液適合性の悪い高分子ではこのような水の存在は認められなかった (Fig.5)。

次に、MEA と HEMA の共重合体を合成し、飽和含水量 (EWC) ポリマー中の水の構造と血小板粘着との関係を調べた。²⁸ DSC 分析の結果を Fig.6 に示す。HEMA 含量が 30 mol% 以下の共重合体については -50°C 付近の CC に由

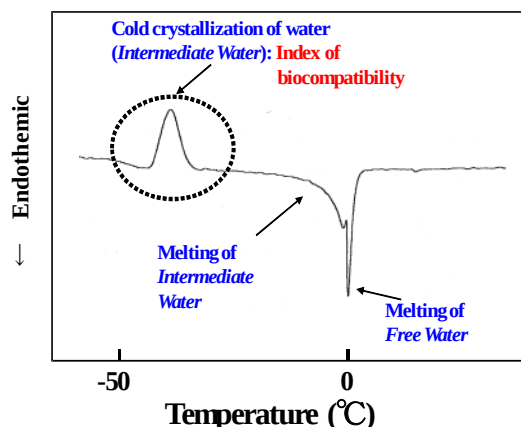


Fig.3 Differential scanning calorimetry (DSC) heating curve of PMEА-water system.

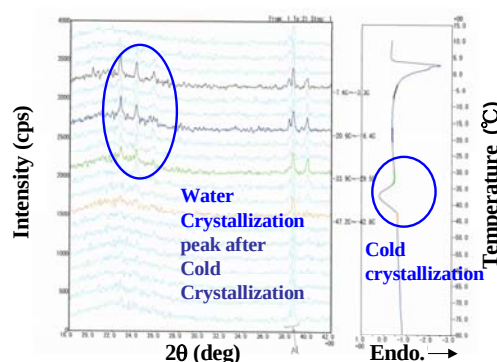


Fig.4 XRD-DSC curves of equilibrium hydrated PMEА. This cold crystallization is interpreted as the phase transition from the amorphous ice to the crystal ice.

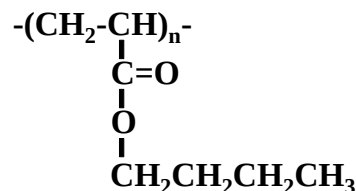
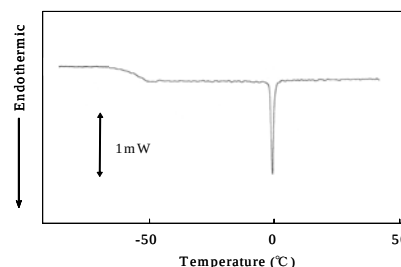


Fig.5 DSC heating curves of hydrated poly(butyl acrylate).

来する発熱ピークが明確に観察されたのに対し、40 mol% 以上ではこの発熱ピークはわずかに観察されるか、全く観察されなかった。これらの分析結果を基に各ポリマー中に存在する水の状態を不凍水、中間水、自由水の観点から定量化した。すなわち飽和含水量と Fig.6 における各転移における熱量から高分子中に存在する上記 3 種の水の量を以下の式に従い求めた。

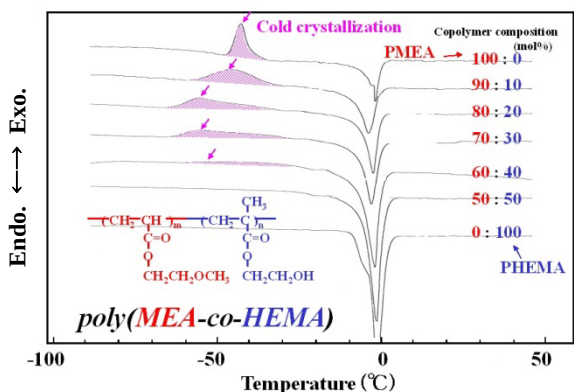


Fig.6 DSC heating curves of hydrated poly(MEA-co- HEMA).

本研究では、高分子に飽和含水した水のうち、i) *Non-freezing water* (不凍水) は、-100 °Cにおいても凍結しない水、ii) *Intermediate water* または *Freezing bound water* (中間水) は、0 °Cよりも低温で結晶形成 (CC) を示し、0 °Cよりも低温で融解する水、iii) *Free water* (自由水) は、0 °C付近で融解する水としてそれぞれ扱った。以上の定義を、Fig.7 にまとめた。

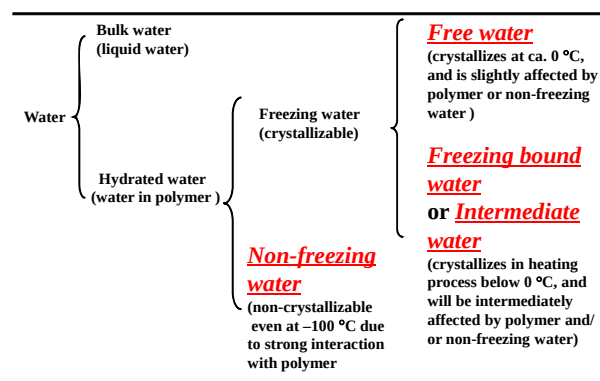


Fig.7 Classification of water in hydrated polymer based on DSC analysis. The hydrated water in PMEA can be classified into three types, non-freezing water, freezing bound water,

$$\text{飽和含水量 (EWC)} = W_{nf} + W_{fb} + W_f$$

$$W_{fb} = \Delta H_{cc} / C_p$$

$$W_f = (\Delta H_m / C_p) - W_{fb}$$

ここで、 W_{nf} ：不凍水量、 W_{fb} ：中間水量、 W_f ：自由水量、 C_p ：融解潜熱、 ΔH_{cc} ：低温結晶形成 (CC) した水におけるエンタルピー変化量、 ΔH_m ：-20~0 °Cで融解した水におけるエンタルピー変化量。

この各種水の存在割合を HEMA の共重合割合に対しプロットした結果を Fig.8 に示す。これより、HEMA 含量が 20 mol% までは中間水が最も多く、20 mol% では中間水と不凍水とはほぼ同量、それ以上では不凍水が多くなり、HEMA 含量が 50 mol% 以上では中間水は存在せず、不凍水と自由水のみからなっていることがわかる。

一方、これらの共重合体に対する血小板粘着試験の結果を Fig.9 に示す。血小板粘着数およびその形態は HEMA 含量が 30 mol% を超えると急激に増大し、偽足形成が認められた。この各水の存在割合と血小板粘着の HEMA 含量依存性とを合わせて考えると、中間水量あるいは不凍水量が血

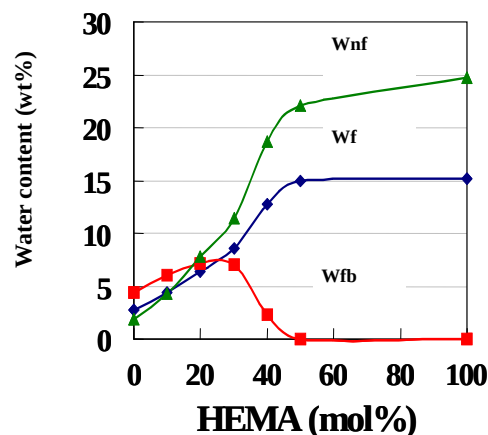


Fig.8 Relationship between the amounts of three types of water and HEMA content in poly(MEA-co-HEMA): Wf, free water; Wfb, freezing bound water; Wnf, nonfreezing water.

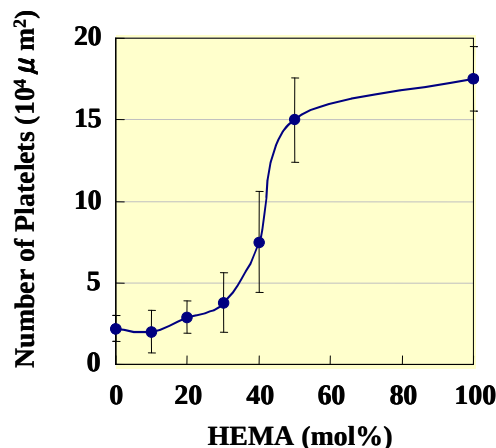


Fig.9 Number of adhered platelets onto the surface of poly(MEA-co-HEMA).

小板粘着・活性化に強く影響を及ぼしていることが示唆された。

次に、飽和含水した PMEA 類似体についても同様に解析を行った。²⁹⁾ PMEA のみ CC が観測されるため、不凍水、中間水、自由水の 3 種類に分類できた。PMEA に飽和含水した水の 50 % が中間水であることがわかった。CC が観測されない PMEA 類似体に飽和含水した水は、不凍水と自由水の 2 種類に分類できた。PHEMA や PHEA などのように、極性官能基を有する高分子は、不凍水の割合が高いことが明らかになった。血小板粘着・活性化に強く影響を及ぼしていることが示唆された。

5. 高分子表面の水の構造

生体親和性の評価においては、材料の表面と生体成分との相互作用が重要である。DSC は高分子全体に含水した水の状態を測定しているため、高分子表面の水の状態についても調べる必要があると考えられる。液滴法により測定した水の静的接触角は高分子の表面構造や表面自由エネルギーに依存するので、高分子表面の水の静的接触角と DSC 測定から得られた水の状態 (不凍水、中間水、自由水) との

相関関係を調べた。²⁹⁾ここでは、不凍水と中間水量の合計を結合水 (bound water) と定義した (Fig.7 参照)。Fig.10 に、接触角と自由水、結合水との相関関係を示す。この結果から、接触角は、自由水に比べて結合水の方が、良好な直線関係があることが明らかになった。これは、高分子中の結合水量 (不凍水+中間水) が接触角の値を決めていることを示唆する。つまり、自由水はバルク水と同様の構造をとっているため、お互いに交換しやすいが、中間水は高分子表面に安定に存在していることを意味していると考えられる。

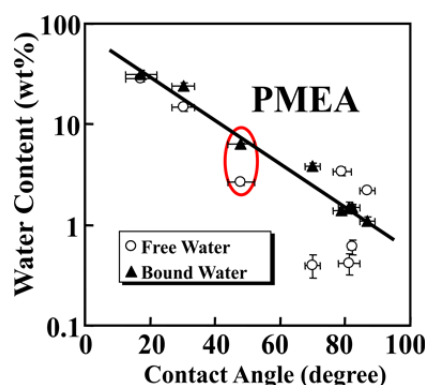


Fig.10 Relationship between contact angle and water in polymer. Plotted against free water and plotted against bound water (non-freezing water + intermediate water).

6. 水の構造と血液適合性との相関

これまでに、高分子表面の水が血液適合性に大きく影響を及ぼすことが指摘されてきたが、統一的な見解を得るには至っていない。例えば、Bruck ら³⁰⁾は、PHEMA やポリアクリルアミドハイドロゲルの血液適合性発現のためには適切な含水量が存在することを示した。Andrade³¹⁾や Ratner ら³²⁾は、血液適合性発現には表面に吸着した水の量だけでなく吸着した水の構造も重要因子であると提案している。丹沢ら³³⁾は、poly(ethyleneglycol methacrylate)ハイドロゲル中の水や高分子鎖の分子運動性の重要性を指摘している。Lu ら³⁴⁾は、高分子表面の水とタンパク質表面の水の交換がタンパク質吸着に影響することを述べている。Israelachvili ら³⁵⁾は材料表面の水の安定性、密度、配向がタンパク質や細胞の吸着に対する材料の能力の違いをもたらすと報告している。また、Grunze ら³⁶⁾は、PEG の薄膜界面に存在する水の層の安定性がタンパク質の吸着を抑制する因子の1つであることを予測している。片岡ら³⁷⁾は、飽和含水量から不凍水量を引いた水の量が血液適合性発現にとって重要であると提案している。石原ら³⁸⁾は、リン脂質に類似したメタクリロイルホスファチジルコリン(MPC)とブチルメタクリレート共重合体がタンパク質の吸着が少なく、吸着タンパク質の2次構造が維持され、血小板適合性に優れる理由として、この共重合体中の自由水の割合が多いことを理由に挙げている。最近、MPC ポリマーの結合水の割合に注目した報告例もある。³⁹⁾

我々は、PMEA 類似体中の水の状態と血小板粘着との関係について調べた。²⁹⁾高分子中の自由水ならびに結合水量 (不凍水+中間水) と血小板粘着数との相関関係を Fig.11(a), (b) に示す。飽和含水量のうちの50%を占める中間水を有する PMEA の表面への血小板粘着数は、他の高分子の表面に比べて極めて少なかった。以上の結果は、高分子表面の不凍水量では説明がつかず、中間水の存在により

PMEA が優れた血液適合性を示すことが示唆された。上述の MEA-HEMA 共重合体の水の状態解析²⁸⁾で得られた、共重合体中の HEMA 組成の増大にともない、血小板適合性が減少 (Figs.8, 9) するのは、不凍水量の増大よりも中間水量の減少が効いていると考えられる。

7. 生体親和性を有する合成高分子と天然高分子との共通点：中間水

本稿で定義した CC として観測される中間水は、血液適合性高分子の代表例であるポリエチレングリコール (PEG) やポリビニルピロリドン (PVP)、ポリメチルビニルエーテル (PVME)、ゼラチンやアルブミン、チトクローム C などのタンパク質、ヒアルロン酸、アルギン酸、ペクチン、セルロース誘導体、アラビアガム、キサンタンガム、タラガム、グアーガム、ジェランガム、ローカストビーンガムなどの多糖にも共通して観測された。⁴⁰⁻⁴²⁾最近、MPC ポリマーにも CC が観測されることを見出した。⁴³⁾また、長崎らにより PHEMA-graft-phema に CC が観測されることが確認されている。¹⁾さらに、PMEA と同様の中間水を有する高分子 (Fig.12) : poly(tetrahydrofurfuryl acrylate) (PTHFA)^{44,45)}

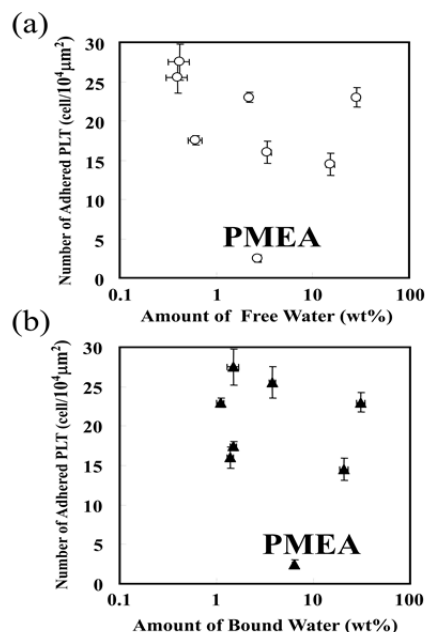


Fig.11 Effect of water type on platelet adhesion. a) free water, b) bound water (non-freezing water + intermediate water),

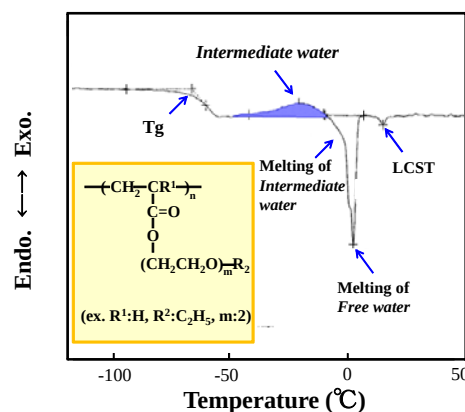


Fig.12 DSC heating curve of hydrated poly(oligo ethylene glycol (meth) acrylate).

や poly [2-(2-ethoxyethoxy)ethyl acrylate] (PEEA) などの poly(oligo ethylene glycol (meth) acrylate) とその類似体を合成した。⁴⁶⁾ それらの表面は、血液細胞をはじめ各種血液適合性マーカーに対し活性化が低く、優れた生体親和性を示すことを見出した。PEEA およびその類似体は下限臨界共溶温度 (LCST) を有することがわかり、生体親和性と温度応答性を併せ持つ高分子が合成できた。

8. PMEa が有する中間水の構造と運動性

血液適合性発現は、タンパク質の吸着脱離／変性が関与する動的なものであることを考えると、運動性の観点から水の状態を考察することは重要と考えられる。中間水の構造や運動性を明らかにするために、界面選択的な分光法である和周波発生分光 (SFG) ⁴⁷⁻⁴⁹⁾ や固体 NMR, ^{50,51)} 赤外分光, ⁵²⁻⁵⁴⁾ 表面自由エネルギー²⁹⁾ などによる測定を行った。その結果、赤外分光や固体 NMR 測定の結果からも CC の存在が確認された。また、(1) 高い分子運動性を有する PMEa 鎖に弱く束縛され、低温下でも分子運動性の高い水の存在、(2) 中間水は自由水と不凍水の間のものである、(3) 中間水は高分子表面にも安定に存在することが示唆された。

最近、時間分解赤外分光法により、PMEa の官能基レベルでの水和構造が明らかになった。⁵⁵⁻⁵⁷⁾ O-H 伸縮振動領域には、不凍水、中間水、自由水に帰属されるバンドが、それぞれ異なる水の吸着時間で観察された。不凍水が観察された吸着初期では、PMEa 側鎖カルボニル基の水素結合バンドがあらわれ、不凍水はカルボニル基と水素結合していることがわかった。中間水が観察された吸着中期の時間領域では、側鎖末端メトキシ基に帰属される O-CH₃ ロッキングバンドにシフトがみられたことから、中間水は側鎖末端メトキシ基と相互作用していることがわかった。吸着後期では、バルク水と類似した水素結合構造を持つ水が吸着しており、自由水の吸着が示唆された。また、吸着の中期段階でみられた 3400 cm⁻¹ 付近のバンドは、自由水ほど大きなクラスターではないが、不凍水ほど孤立していない中間的な大きさの水和構造を示し、中間水の存在が示唆された。

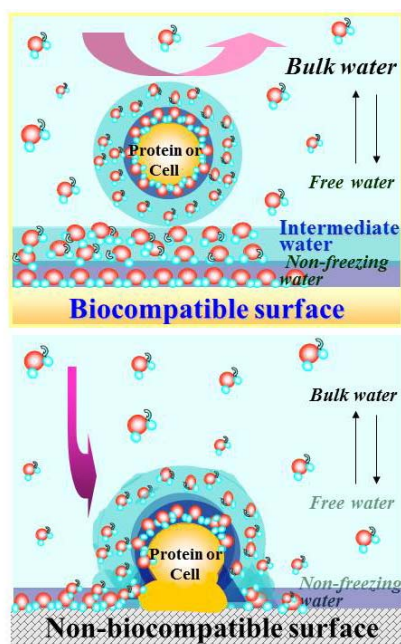


Fig.13 Imaginative water state on polymer. (a) biocompatible polymer, (b) non-biocompatible polymer.

以上の結果から、我々は PMEa がタンパク質などの生体成分との相互作用が小さい理由は、この中間水の存在にあると考えている。血液中の細胞やタンパク質は不凍水、凍結水、自由水からなる水和殻を持ち、この水和構造によって安定に存在できることが知られている。⁵⁸⁻⁶¹⁾ タンパク質などの生体成分は血液中で水和殻を形成し安定化されているが、材料表面の不凍水などが直接この水和殻に接触し、これを攪乱あるいは破壊すると、生体成分の材料表面への吸着・活性化の引き金となる。PMEa などの血液適合性表面では中間水が、生体成分の水和殻と材料表面の不凍水層の間に存在し両者が直接触れることを阻害するため、異物認識が起きないと考えられる (**Fig.13**)。なお、中間水は生体成分の水和層を破壊するほどの特異な水素結合構造は有していないものの、高い分子運動性を有する高分子鎖と弱く相互作用した水であるため、自由水と不凍水との界面に安定に存在できると考えられる。⁶²⁻⁶⁴⁾ 高分子鎖の運動性 (高分子のダイナミクス) と高分子と水の分子間相互作用とのバランスにより中間水の量と組成が決定される可能性がある。

9. まとめ

本稿では、PMEa の生体親和性発現メカニズムの解明を行うために高分子に含水した水分子の役割に着目し、熱分析により水の構造を3種類に分類した。とりわけ中間水は、生体親和性を示す合成高分子および天然高分子に共通して観測された。中間水が、生体成分の水和殻と材料表面の不凍水層の間に存在し両者が直接触れることを阻害するため、生体親和性が発現するものと考えられる。

謝 辞

鶴田禎二東大名誉教授、畠山立子博士 (リグノセル)、岸証様 (リガク)、赤池敏宏教授 (東工大)、北野博巳教授 (富山大)、三輪優子博士 (東レリサーチセンター)、望月明教授 (東海大)、森田成昭助教 (名大)、林智弘准教授 (東工大)、テルモ株式会社の諸氏に心よりお礼申し上げます。

文 献

- 1) a) T. Tsuruta, *Adv. Polym. Sci.* **126**, 1-51 (1996); b) T. Tsuruta, *J. Biomat. Sci. Polym. Ed.* **21**, 1831-1848 (2010); c) 中林宜男, 石原一彦, 岩崎泰彦, バイオマテリアル, コロナ社 (1999); d) 石原一彦, 畑中研一, 山岡哲二, 大矢裕一, バイオマテリアルサイエンス, 東京化学同人 (2003); e) 赤池敏宏, 生体機能材料学, コロナ社 (2005); f) 石原一彦, ポリマーバイオマテリアル, コロナ社 (2009).
- 2) T. Okano, S. Nishiyama, I. Shinohara, T. Akaike, Y. Sakurai, K. Kataoka, and T. Tsuruta, *J. Biomed. Mater. Res.* **15**, 393-403 (1981).
- 3) T. Kajiyama, and A. Takahara A. *J. Biomater. Appl.* **6**, 42-71 (1991).
- 4) T. Furuzono, K. Senshu, A. Kishida, T. Matsumoto, and M. Akashi, *Polym. J.* **29**, 201-209 (1997).
- 5) J. M Harris, editor. *Poly(ethylene glycol) chemistry, biotechnical and biomedical applications*. New York: Plenum Press (1992).
- 6) E. Kulik, and Y. Ikada, *J. Biomed. Mater. Res.* **30**, 295-304 (1996).
- 7) T. Ueda, K. Oshida, K. Kurita, K. Ishihara, and Y. Nakabayashi, *Polym. J.* **24**, 1259-1269 (1992).
- 8) H. Kitano, T. Mori T, S. Tada, M. Gemmei-Ide, Y.

- Yokoyama, and M. Tanaka, *Macromol. Biosci.* **5**, 314-321 (2005).
- 9) S. Tada, C. Inaba, K. Mizukami, S. Fujishita, M. Gemmei-Ide, H. Kitano, A. Mochizuki, M. Tanaka, and T. Matsunaga, *Macromol. Biosci.* **9**, 63-70 (2009).
 - 10) H. Kitano, S. Tada, T. Mori, K. Takaha, M. Gemmei-Ide, M. Tanaka, and M. Fukuda, *Langmuir* **21**, 11932-11940 (2005).
 - 11) 高原淳, 栗原和枝, 前田瑞夫, ソフトマター, 丸善, 東京 (2009).
 - 12) M. Tanaka, T. Motomura, M. Kawada, T. Anzai, Y. Kasori, T. Shiroya, K. Shimura, M. Onishi and A. Mochizuki, *Biomaterials* **21**, 1471-1481 (2000).
 - 13) X. M. Mueller, D. Jegger D, M. Augstburger, J. Horisberger, and L.K. von Segesser, *Int. J. Artif. Organs.* **25**, 223-229 (2002).
 - 14) M. Tanaka, A. Mochizuki, T. Motomura, K. Shimura, A. Onishi, and Y. Okahata, *Colloids. Surf. A* **193**, 145-152 (2001).
 - 15) M. Tanaka, A. Mochizuki, T. Shiroya, T. Motomura, K. Shimura, M. Onishi, and Y. Okahata, *Colloids. Surf. A* **203**, 195-204 (2002).
 - 16) T. Hayashi, M. Tanaka, S. Yamamoto, M. Shimomura, and M. Hara, *Biointerphase* **2**, 119-128 (2007).
 - 17) T. Matsuda, H. Takano, K. Hayashi, Y. Taenaka, and S. Takaichi, *Trans. ASAI* **30**, 353-356 (1984).
 - 18) Y. Ito, M. Shishido, and Y. Imanishi, *J. Biomed. Mater. Res.* **24**, 227-242 (1990).
 - 19) 由井伸彦, 血液適合性表面の進歩ー血小板の活性化を抑制するー, 表面 **32**, 504-513 (1994).
 - 20) T. A. Horbett and J. L. Brash, editors. *Proteins at interfaces II. Fundamental and applications*, ACS Symposium Series 602, American Chemical Society: Washington, DC (1995).
 - 21) M. Morra, editor. *Water in Biomaterial Surface Science*. New York: Wiley (2001).
 - 22) B. D. Rathner, *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* **11**, 1107-1119 (2000).
 - 23) M. Tanaka, T. Motomura, N. Ishii, K. Shimura, M. Onishi, A. Mochizuki, and T. Hatakeyama, *Polym. Int.* **49**, 1709-1713 (2000).
 - 24) M. Tanaka, *Biomed. Mater. Eng.* **14**, 427-38 (2004).
 - 25) E. Hirota, K. Ute, Mi. Uehara, T. Kitayama, M. Tanaka, and A. Mochizuki, *J. Biomed. Mater. Res.* **76A**, 540-550 (2006).
 - 26) E. Hirota, M. Tanaka, and A. Mochizuki, *J. Biomed. Mater. Res.* **81A**, 710-719 (2007).
 - 27) A. Mochizuki, A. Kishi, and M. Tanaka, *J. Appl. Poly. Sci.* **111**, 476-481 (2009).
 - 28) M. Tanaka, A. Mochizuki, N. Ishii, T. Motomura, and T. Hatakeyama, *Biomacromolecules* **3**, 36-41 (2002).
 - 29) M. Tanaka and A. Mochizuki, *J. Biomed. Mater. Res.* **68A**, 684-695 (2004).
 - 30) S. D. Bruck, *J. Biomed. Mater. Res.* **7**, 387-404 (1973).
 - 31) J. D. Andrade, H. B. Lee, M. S. Jhon, S. W. Kim, and J. B. Hibbs, *Trans. Am. Soc. Artif. Intern. Organs.* **19**, 1-6 (1973).
 - 32) B. D. Ratner, A. S. Hoffman, S. R. Hanson, L. A. Harker, and J. D. Whiffen, *J. Polym. Sci.* **66**, 363-375 (1979).
 - 33) N. A. Yamada, K. Ishikiriya, M. Todoki, and H. Tanzawa, *J. Appl. Polym. Sci.* **39**, 2443-2452 (1990).
 - 34) D. R. Lu, S. J. Lee, and K. Park, *J. Biomat. Sci. Polym. Ed.* **2**, 127-147 (1991).
 - 35) J. Israelachvili and H. Wennerstrom, *Nature* **379**, 219-225 (1996).
 - 36) K. Feldman, G. Hahner, N.D. Spencer, P. Harder, and M. Grunze, *J. Am. Chem. Soc.* **121**, 10134-10141 (1999).
 - 37) K. Kataoka, H. Ito, H. Amano, Y. Nagasak, M. Kato, T. Tsuruta, K. Suzuki, T. Okano, and Y. Sakurai, *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* **9**, 111-129 (1998).
 - 38) K. Ishihara, H. Nomura, T. Mihara, K. Kurita, Y. Iwasaki, and N. Nakabayashi, *J. Biomed. Mater. Res.* **39**, 323-329 (1998).
 - 39) T. Morisaku, J. Watanabe, T. Konno, M. Takai, and K. Ishihara, *Polymer* **49**, 4652 (2008).
 - 40) T. Hatakeyama, H. Kasuga, M. Tanaka, and H. Hatakeyama, *Thermochim Acta* **465**, 59-66 (2007).
 - 41) T. Hatakeyama, M. Tanaka, and H. Hatakeyama, *J. Biomat. Sci. Polym. Ed.* **21**, 1865-1875 (2010).
 - 42) T. Hatakeyama, M. Tanaka, A. Kishi, and H. Hatakeyama, *Thermochim. Acta* **532**, 159-163 (2012).
 - 43) T. Hatakeyama, M. Tanaka, and H. Hatakeyama, *Acta Biomaterialia* **3**, 6091-6099 (2009).
 - 44) A. Mochizuki, T. Hatakeyama, Y. Tomono, and M. Tanaka, *J. Biomat. Sci. Polym. Ed.* **20**, 591-603 (2009).
 - 45) M. Tanaka and A. Mochizuki, *J. Biomat. Sci. Polym. Ed.* **21**, 1849-1863 (2010).
 - 46) M. Tanaka, JP Patent 4746984 (2011).
 - 47) S. Ye, S. Morita, G. Li, H. Noda, M. Tanaka, K. Uosaki, and M. Osawa, *Macromolecules* **36**, 5694-5703 (2003).
 - 48) G. Li, S. Morita, S. Ye, M. Tanaka, and M. Osawa, *Anal. Chem.* **76**, 788-795 (2004).
 - 49) G.F. Li, Y. Shen, S. Morita, T. Nishida, and M. Osawa, *J. Am. Chem. Soc.* **126**, 12198-12199 (2004).
 - 50) Y. Miwa, H. Ishida, H. Saitô, M. Tanaka, and A. Mochizuki, *Polymer* **50**, 6091-6099 (2009).
 - 51) Y. Miwa, M. Tanaka, and A. Mochizuki, *Koubunshi Ronbunshu* **68**, 133-146 (2011).
 - 52) H. Kitano, K. Ichikawa, M. Fukuda, A. Mochizuki, and M. Tanaka, *J. Colloid Surface Sci.* **242**, 133-140 (2001).
 - 53) K. Ichikawa, T. Mori, H. Kitano, M. Fukuda, A. Mochizuki, and M. Tanaka, *J. Polym. Sci. B: Polym. Phys.* **39**, 2175-2182 (2001).
 - 54) M. Ide, T. Mori, K. Ichikawa, H. Kitano, M. Tanaka, A. Mochizuki, H. Oshiyama, and W. Mizuno, *Langmuir* **19**, 429-435 (2003).
 - 55) S. Morita, M. Tanaka, and Y. Ozaki, *Langmuir* **23**, 3750-3761 (2007).
 - 56) S. Morita, M. Tanaka, I. Noda, and Y. Ozaki, *Appl. Spec.* **61**, 867-872 (2007).
 - 57) A. Tanabe, S. Morita, M. Tanaka, I. Noda, and Y. Ozaki, *Appl. Spec.* **62**, 46-50 (2008).
 - 58) C. F. Hazlewood, B. L. Nichols, and N. F. Chamberlain, *Nature* **222**, 747-750 (1969).
 - 59) I. D. Kuntz Jr, T. S. Brassfield, G. D. Law, and G. V. Purcell, *Science* **21**, 1329-1331 (1969).
 - 60) H. Uedaira, *Water in biological systems*. In: Pullman B, Yagi K, editors. Tokyo: Japan Scientific Societies Press; 47-56 (1980).
 - 61) S. K. Pal, J. Peon and A.H. Zewail, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* **99**, 1763-1768 (2002).
 - 62) M. Tanaka, *Biochimica et Biophysica Acta* **1810**, 251-258 (2011).
 - 63) I. Javakhishvili, M. Tanaka, K. Jankova, and S. Hvilsted, *Macromol. Rapid Commun.* **33**, 319-325, (2012).
 - 64) T. Hayashi, Y. Tanaka, Y. Koide, M. Tanaka, and M. Hara, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **14**, 10194-10206 (2012).