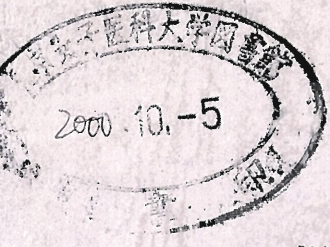


244



# 親水/疎水型ミクロ相分離構造表面での免疫細胞死 阻止機構の解明

(課題番号：10680804)

平成10年度～平成11年度科学研究費補助金(基盤研究C)(2)  
研究成果報告書



平成12年8月

研究代表者 阿部 一彦

(東京女子医科大学医学部助手)



親水/疎水型ミクロ相分離構造表面での免疫細胞死  
阻止機構の解明

(課題番号：10680804)

平成10年度～平成11年度科学研究費補助金(基盤研究C)(2)  
研究成果報告書

平成12年8月

研究代表者 阿部 一彦

(東京女子医科大学医学部助手)



## 目次

### はしがき

#### I. 研究課題名・研究組織・研究経費・研究発表

#### II. 研究成果

##### 1. 論文様式

- a. PHEMA-PSt-PHEMA ABA型 ブロック共重合体表面における接触リンパ球の壊死阻害
- b. PHEMA-PSt-PHEMA ABA型 ブロック共重合体表面に対するシアル酸除去リンパ球の超微形態学的評価
- c. 親水/疎水型のみクロドメイン構造表面のリンパ球細胞内への刺激伝達抑制に関する超微形態学的評価

##### 2. 学会発表様式

- a. 微細な相分離構造表面を有する親水/疎水型ブロック共重合体表面に粘着したリンパ球形質膜グリコカリックスの微細構造解析
- b. 高分子材料表面に対するneuraminidase処理リンパ球の粘着挙動の解析
- c. 相分離幅の異なる親水/疎水型ブロック共重合体表面に対する粘着リンパ球の超微形態学的評価
- d. 微細なラメラ幅の異なる親水/疎水型ブロック共重合体表面に対するリンパ球の粘着挙動の相違
- e. ラメラ状の相分離構造を有する親水/疎水型ブロック共重合体表面に対するジメチルスルホキシド処理リンパ球の粘着挙動の解析
- d. 親水/疎水型のみクロドメイン構造表面のリンパ球細胞内への刺激伝達抑制に関する超微形態学的評価

##### 3. 東京女子医科大学総合研究所紀要様式

- a. 親水/疎水型マイクロ相分離構造表面に対するneuraminidase処理リンパ球の超微形態学的解析

##### 4. 参考論文

- a. PHEMA-PSt-PHEMA ABA型 ブロック共重合体表面のリンパ球細胞死阻止能の超微形態学的評価

## はしがき

研究代表者 阿部 一彦 (東京女子医科大学医学部助手)

世界的な傾向としてドナー臓器の安定確保が困難な状況にあるのは衆知の事実である。このことから、信頼性のある人工臓器の開発推進に大きな期待が寄せられている。血液と接触して用いられる信頼性のある循環器系人工臓器の開発に際しては、その素材となる高分子材料表面と血液細胞との相互作用の解析結果の集積を踏まえた材料の分子設計の作業理論の構築が重要となる。

親水性のポリ(2-ヒドロキシエチルメタクリレート)(PHEMA)セグメントと疎水性のポリスチレン(PSt)セグメントが10~20nmの間隔で交互に規則的に配列するラメラ状のマイクロドメイン構造を有するPHEMA-PSt-PHEMA ABA型 ブロック共重合体(HSB)表面は卓越した抗血栓性を有する。

最近、ラメラ幅16nmの親水/疎水型のマイクロドメイン構造を有するHSB表面は免疫細胞(リンパ球)の壊死(ネクローシス)抑制能を有することを、超微形態学的解析手法及び画像処理解析手法を用いて明らかにした(人工臓器 27: 495-502, 1998)。

本研究は、このHSBのラメラ状のマイクロドメイン構造表面におけるリンパ球のネクローシスの抑制機構を明確にすることを目的とした。

平成10年度はHSBの親水/疎水型のラメラ状のマイクロドメイン構造表面に接触及び粘着したリンパ球形質膜Glycocalyx(GC)の微細構造を透過型電子顕微鏡(TEM)を用いて解析した。さらに、GC除去及び非除去すなわち、neuraminidaseを用いてシアル酸除去及び非除去の接触及び粘着リンパ球の超微形態変化について、走査型電子顕微鏡(SEM)及びTEMを用いて比較解析した。さらに、リンパ球及びその細胞内小器官ミトコンドリアのTEM像を画像処理解析装置(IA)を用いて定量的に評価した。

平成11年度はHSBの親水/疎水型のラメラ状のマイクロドメイン構造表面に対する形質膜貫通性のSurface Immunoglobulin Receptor(SIgR)のCapping形成を阻害及び非阻害の粘着リンパ球をSEM及びTEMを用いて解析した。さらに、リンパ球のミトコンドリアのTEM像をIAを用いて定量的に評価した。

この度の報告書は2年間の研究成果である。HSBの親水/疎水型のラメラ状のマイクロドメイン構造表面のリンパ球のネクローシスの抑制機構の解明に関して、わずかな部分しか解明に至っていない。しかしながら、リンパ球に対して走査型電子顕微鏡、透過型電子顕微鏡及び画像処理解析装置を駆使した解析は、「生体適合性材料の分子設計の作業理論の構築」に貴重な情報を提供するものと考えられる。今後、この「親水/疎水型マイクロ相分離構造表面での免疫細胞死阻止機構の解明」という課題を成し遂げるようさらに努力を続けたい。

I. 研究課題名・研究組織・研究経費・研究発表

[研究課題名]

親水/疎水型ミクロ相分離構造表面での免疫細胞死阻止機構の解明

[研究組織]

研究代表者 阿部 一彦 (東京女子医科大学医学部助手)

[研究経費]

平成10年度	900千円
平成11年度	700千円
計	1,600千円

[研究発表]

学会誌・抄録誌・紀要

- 1) 阿部一彦、菊池明彦、伊藤悦子、岡野光夫、桜井靖久、堀江俊伸、笠貫宏: PHEMA-PSt-PHEMA ABA型ブロック共重合体表面における接触リンパ球の壊死阻害. 人工臓器 28: 230-236, 1999
- 2) 阿部一彦、長尾博明、菅原基晃: 微細な相分離構造表面を有する親水/疎水型ブロック共重合体表面に粘着したリンパ球形質膜グリコカリックスの微細構造解析. 医学検査(第48回日本臨床検査学会抄録集) 48: 631, 1999
- 3) 阿部一彦、菅原基晃: 高分子材料表面に対するneuraminidase処理リンパ球の粘着挙動の解析. 医学検査(第48回日本臨床検査学会抄録集) 48: 632, 1999
- 4) 阿部一彦、菅原基晃、堀江俊伸、笠貫 宏、伊藤悦子、岡野光夫、桜井靖久: 相分離幅の異なる親水/疎水型ブロック共重合体表面に対する粘着リンパ球の超微形態学的評価. 高分子学会予稿集(第48回高分子年次大会) 48: 574, 1999
- 5) 阿部一彦、笠貫 宏、菊池明彦、岡野光夫: PHEMA-PSt-PHEMA ABA型ブロック共重合体表面に対するシアル酸除去リンパ球の超微形態学的評価. 人工臓器 29: 217-224, 2000
- 6) 阿部一彦、菅原基晃、迫村康成、笠貫 宏、菊池明彦、岡野光夫: 親水/疎水型ミクロ相分離構造表面に対するneuraminidase処理リンパ球の超微形態学的解析. 東京女子医科大学総合研究所紀要 20: 2000 in print
- 7) 阿部一彦、長尾博明、菅原基晃: 微細なラメラ幅の異なる親水/疎水型ブロック共重合体表面に対するリンパ球の粘着挙動の相違. 医学検査(第49回日本臨床検査学会抄録集) 49: 553, 2000
- 8) 阿部一彦、菅原基晃: ラメラ状の相分離構造を有する親水/疎水型ブロック共重合体表面に対するジメチルスルホキシド処理リンパ球の粘着挙動の解析. 医学検査(第49回日本臨床検査学会抄録集) 49: 553, 2000
- 9) 阿部一彦、笠貫 宏、菊池明彦、岡野光夫: 親水/疎水型のミクロドメイン構造表面のリンパ球細胞内への刺激伝達抑制に関する超微形態学的評価. 第38回日本人工臓器学会大会発表予定(2000年9月、名古屋)

# 親水/疎水型のマイクロドメイン構造表面のリンパ球細胞内への刺激伝達抑制に関する超微形態学的評価

阿部一彦、笠貫 宏\*、菊池明彦\*\*、岡野光夫\*\*

東京女子医科大学附属日本心臓血管研究所基礎循環器科、\*東京女子医科大学附属日本心臓血管研究所循環器内科、\*\*東京女子医科大学・医用工学研究施設

## I. 緒言

これまで、親水性のポリ(2-ヒドロキシエチルメタクリレート)(PHEMA)セグメントと疎水性のポリスチレン(PSt)セグメントが10~20nmの間隔で交互に規則的に配列するラメラ状のマイクロドメイン構造表面を有するPHEMA-PSt-PHEMA ABA型 ブロック共重合体(HSB)は、in vitro、in vivo実験を通じて優れた抗血栓性を有することを明らかにしてきた<sup>1-21)</sup>。

最近、PHEMAセグメントとPStセグメントが均一に分散している構造表面を有するPHEMA-PSt ランダム共重合体(HSR)及び疎水性の均一表面を有するPStは共にリンパ球の激しい壊死(ネクロシス)を生じるのに対して、HSB表面はリンパ球のネクロシスを抑制することを明らかにした<sup>22-25)</sup>。

そして、超微形態学的解析手法及び画像処理解析手法を用いたin vitro実験によるHSB表面のリンパ球のネクロシスの抑制機構の解明に際して、HSB表面は、1)リンパ球形質膜のグリコカリックス(GC)の微細構造を正常のリンパ球形質膜のそれと同様に良好に保持する<sup>23-24)</sup>。2)リンパ球形質膜にある糖蛋白質のシアル酸に影響を及ぼさない<sup>25)</sup>。3)リンパ球の外形変化及びその細胞内小器官ミトコンドリアの膨化を抑制することなどを明らかにした<sup>22-23)</sup>。これらの結果から、HSBのラメラ状のマイクロドメイン構造表面はリンパ球の形質膜を安定に保持することによりリンパ球のネクロシスを抑制することが示唆された。

本研究は、HSB表面におけるリンパ球のネクロシスの抑制機構をより明確にするために、HSB表面におけるリンパ球の形質膜貫通性のSurface Immunoglobulin Receptor (SIgR)のCapping形成抑制能に着目した。リンパ球形質膜貫通性のSIgRは微小糸(micro-filament)と連結し、リンパ球が刺激を受け活性化するとSIgRはCappingを形成する<sup>26)</sup>。このことは細胞骨格系の再配列を意味し、とりわけリンパ球の細胞内への刺激伝達を意味する。

ジメチルスルホキシド(DMSO)はリンパ球形質膜のSIgRと微小糸との連結を解離することにより、SIgRのCapping形成を阻害する<sup>27)</sup>。本研究はこのDMSOの薬理作用を利用して、HSB表面に対するSIgRのCapping形成を阻害した場合のリンパ球の粘着挙動について、超微形態学的解析手法及び画像処理解析手法を用いて評価した。そして、得られた結果を既報のリンパ球の認識応答性の結果<sup>22-25)</sup>と対比しながら考察を加えた。対照群として、PSt及びHSR表面を用いた。

## II. 方法

### 1. DMSO添加ラットリンパ球浮遊液の調製:

ウィスターラット(5週令)をペントバルビタールにて麻酔したのち、ディスポーザブルシリンジを用いて心臓穿刺採血により脱血した。腹部を開き、腸間膜リンパ節をCa<sup>2+</sup>、Mg<sup>2+</sup> freeのHanks平衡塩溶液(HBSS)(pH7.3)に採取した。二枚のスライドガラスの間にリンパ節を挟み、リンパ球をHBSS中にマイルドに押し出したのち、HBSSにて濃度約1×10<sup>10</sup>個/0のリンパ球浮遊液に調製した。室温に1時間静置したのち、リンパ球浮遊液にDMSO(関東化学(株))を10%添加した。室温に10分間静置したのち実験に供した。

## 2. ポリマービーズのカラム内最密充填

①疎水性の均一表面を有するPSt、②ラメラ幅16nmの親水/疎水型のマイクロドメイン構造表面を有するHSB [平均分子量(Mn)は10600であり、このうちPHEMAセグメントのMnは5100、PStセグメントのMnは5500である。アニオンリビング重合法により合成したポリマーをジメチルホルムアミドに溶解し、キャスト後、ラメラ構造を形成させた。ラメラの繰り返し周期は16nm程度である。]<sup>28)</sup>、③HSBと組成が同一であり、PHEMAとPStとが均一に分散している構造表面を有するHSRの3種類のポリマービーズ( $\phi$ 150 $\mu$ m)を準備した。但し、②、③のポリマーはポリグリシジルメタクリレートビーズ( $\phi$ 150 $\mu$ m)に溶媒留去法によってコートしたのち実験に供した。三方活栓を付けたポリ塩化ビニル製のカラム(長さ10cm; 内径3mm)にポリマービーズを最密充填したのち、生理食塩水でカラムを満たし1晩室温に静置した。実験直前にカラム中の生理食塩水をHBSS (pH 7.3)にて置換した。

### 3. DMSO添加コントロールリンパ球の透過型電子顕微鏡(TEM)解析

3%グルタルアルデヒド・0.1Mカコジル酸緩衝液(pH7.3)を入れたF-スピッツ管に、実験方法1.で調製したDMSO添加コントロールリンパ球をデスポーザブルシリンジを用いて静かに入れ1時間、前固定(4 $^{\circ}$ C)を行った。1000 r.p.m.(4 $^{\circ}$ C)で5分間遠心処理を行い、リンパ球ペレットを作製したのち上澄みの前固定液を捨て、0.1Mカコジル酸緩衝液(pH7.3)(4 $^{\circ}$ C)にてリンパ球ペレットを十分に洗浄した。次に、1%四酸化オスミウム・0.1Mカコジル酸緩衝液(pH7.3)にて1時間、後固定(4 $^{\circ}$ C)を行った。0.1Mカコジル酸緩衝液(pH7.3)(4 $^{\circ}$ C)にて十分に洗浄後、リンパ球ペレットを試料ビンに移し50%~100%のエタノール濃度系列による脱水、酸化プロピレンによる置換、エポキシ樹脂のリンパ球の細胞内浸透等の処理を行い、エポキシ樹脂に包埋した。エポキシ樹脂を60 $^{\circ}$ Cで熱重合したのち、超薄切片を作製し酢酸ウラニルとクエン酸鉛で電子染色などの常法処理を行った。その後、DMSO添加コントロールリンパ球の内部構造をTEM (JEM1200EX/JEOL)にて解析した。

### 4. DMSO添加粘着リンパ球の外形変化の走査型電子顕微鏡(SEM)解析

マイクロスフィアカラム法<sup>29)</sup>を用いて、カラムにDMSO添加コントロールリンパ球を流速0.5ml/分で3分間流した。そのカラムを室温に3時間静置したのち、カラムからポリマービーズを取り出し、3%グルタルアルデヒド・0.1Mカコジル酸緩衝液(pH7.3)で1時間、前固定(4 $^{\circ}$ C)を行った。0.1Mカコジル酸緩衝液(pH7.3)(4 $^{\circ}$ C)でポリマービーズを十分に洗浄後、1%四酸化オスミウム・0.1Mカコジル酸緩衝液で5分間、後固定(4 $^{\circ}$ C)を行った。0.1Mカコジル酸緩衝液(pH7.3)(4 $^{\circ}$ C)でポリマービーズを十分に洗浄したのち、50%~100%のエタノール濃度系列による脱水処理を行い臨界点乾燥を行った。カーボンペーストを塗ったSEM試料台にビーズをばらまきペースト乾燥後、金(Au)蒸着を行った。その後、粘着リンパ球の外形変化をSEM(S-800/Hitachi)にて解析した。

### 5. DMSO添加粘着リンパ球の内部構造変化のTEM解析

マイクロスフィアカラム法<sup>29)</sup>を用いて、カラムにDMSO添加コントロールリンパ球を流速0.5ml/分で3分間流した。そのカラムを室温に3時間静置したのち、カラムからポリマービーズを取り出し、3%グルタルアルデヒド・0.1Mカコジル酸緩衝液(pH7.3)で1時間、前固定(4 $^{\circ}$ C)を行った。0.1Mカコジル酸緩衝液(pH7.3)(4 $^{\circ}$ C)でポリマービーズを十分に洗浄後、1%四酸化オスミウム・0.1Mカコジル酸緩衝液で5分間、後固定(4 $^{\circ}$ C)を行った。0.1Mカコジル酸緩衝液(pH7.3)(4 $^{\circ}$ C)でポリマービーズを十分に洗浄したのち、実験方法3.のDMSO添加コントロールリンパ球のTEM解析法と同様の処理を行い粘着リンパ球の内部構造変化をTEMにて解析した。

### 6. DMSO添加粘着リンパ球のミトコンドリアのTEM像の画像処理解析

方法5.で得られた粘着リンパ球のミトコンドリアのTEM像を撮影順にTEMネガフィルムからモノクロカメラを通じて画像処理解析装置(LUZEX 3U/Nikon)に入力した。画像改善、2値化(計測対象構造体が網羅できる濃度段階で抽出)、2値化像の修正(計測対象構造体以外の抽出構造を除去及び切り離し)等を行ったのち<sup>30)</sup>、粘着リンパ球のミトコンドリアに対して周囲長、最大長、面積の3つのパラメーターについて計測した。実験方法



3.で得られたDMSO添加コントロールリンパ球のミトコンドリアのTEM像も同様に計測した。この計測値を基にしてscheffe's-testによる統計学的有意差検定を行い、 $p < 0.05$ を有意差ありと判定した。

### III. 結果

#### 1. DMSO添加コントロールリンパ球のTEM解析(Fig. 1)

DMSO添加コントロールリンパ球は球状形を呈し、ミトコンドリア等の細胞内小器官を含む細胞質及び核の微細構造は良好に保持されていた。しかし、DMSO添加によってリンパ球は少し膨化する傾向にあった。これはリンパ球形質膜SIgRと微小糸との連結が解離するためと考えられる。

#### 2. DMSO添加粘着リンパ球のSEM解析(Fig. 2)

PSt、HSR、HSB表面に粘着したDMSO添加リンパ球は材料の違いを問わず、球状形として観察された。

#### 3. DMSO添加粘着リンパ球のTEM解析(Fig. 3)

PSt、HSR、HSB表面表面に粘着したDMSO添加リンパ球のミトコンドリア等の細胞内小器官を含む細胞質及び核の微細構造は、材料の違いを問わず、DMSO添加コントロールリンパ球と同様に良好に保持して観察された。

#### 4. DMSO添加粘着リンパ球のミトコンドリアのTEM像の画像処理解析による定量評価(Table 1)

PSt、HSR、HSB表面に粘着したDMSO添加リンパ球のミトコンドリア及びDMSO添加コントロールリンパ球のミトコンドリアに対する周囲長、最大長、面積の統計学的有意差検定において、4群間に有意差は認められなかった。

### IV. 考察

in vitro実験でのHSBのミクロドメイン構造表面におけるリンパ球のネクローシスの抑制機構の解明に際して、材料表面と相互作用したリンパ球の接触及び粘着挙動について、超微形態学的手法及び画像処理解析手法を用いて解析を進めてきた。その結果、以下のことが明らかになった：HSB表面はリンパ球形質膜を被っている異物認識のサイトであるGC層を欠損もなく良好に保持する<sup>23-24</sup>。HSB表面はリンパ球形質膜の糖蛋白質のシアル酸を安定に保持する<sup>25</sup>。HSB表面はリンパ球の外形変化及びその細胞内小器官ミトコンドリアの膨化を抑制する<sup>22-23</sup>。

本研究は、HSB表面におけるリンパ球のネクローシスの抑制機構をより明確にするために、HSB表面のリンパ球の形質膜にあるSIgRのcapping形成抑制能に着目した。SIgRはリンパ球形質膜貫通性であり、微小糸と連結している。リンパ球が刺激を受け活性化するとSIgRはCappingを形成する<sup>26</sup>。このことは細胞骨格系の再配列を意味し、とりわけ刺激のリンパ球細胞内への伝達を意味する。DMSOはSIgRと微小糸との連結を解離させ、SIgRのCapping形成を抑制する<sup>27</sup>。このDMSOの薬理作用を利用し、HSBのミクロドメイン構造表面に対してDMSO添加したリンパ球の粘着挙動について、超微形態学的解析及び画像処理解析手法を用いて解析した。そして、既報の未添加リンパ球の結果<sup>22-25</sup>と比較し考察を加えた。

#### (1) DMSO添加及び未添加粘着リンパ球のSEM解析より：

未添加粘着リンパ球<sup>22</sup>：PSt及びHSR表面での粘着リンパ球は、いずれの場合も長く伸びた線維状の構造を形成していた。一方、HSB表面に粘着したは未添加コントロールリンパ球の形態と同様に球状形として観察された。

DMSO添加粘着リンパ球：材料表面に粘着したリンパ球は、いずれの場合もDMSO添加コントロールリンパ球の形態と同様に球状形として観察された(Fig. 2)。

このことから、PSt及びHSR表面とは異なり、HSB表面は未添加及びDMSO添加リンパ球を問わず、粘着リンパ球の外形変化を抑制することが明らかになった。

(2) DMSO添加及び未添加粘着リンパ球のTEM解析及びミトコンドリアのTEM像の画像処理解析より：

未添加粘着リンパ球<sup>22)</sup>：PSt及びHSR表面ではリンパ球の超微形態をとどめておらず、激しいネクローシスを生じていた。一方、HSB表面でのリンパ球の細胞質及び核などの超微形態は、未添加コントロールリンパ球と同様に良好に保持して観察された。両者のリンパ球の細胞内小器官ミトコンドリアの画像計測値について統計学的検定を行うと、両者間に有意差は認められなかった。

DMSO添加粘着リンパ球：リンパ球の細胞質及び核などの超微形態は、いずれの材料表面においも、DMSO添加コントロールリンパ球と同様に良好に保持して観察された (Fig. 3)。リンパ球のミトコンドリアの画像計測値とコントロールリンパ球の画像計測値に対して、統計学的有意差検定を行うと、4群間に有意差は認められなかった (Table 1)。

このことから、PSt及びHSR表面とは異なり、HSB表面は未添加及びDMSO添加に関わらず粘着リンパ球のネクローシスを抑制することが明らかになった。

以上の結果と既報の結果<sup>22-25)</sup>から、HSBの親水/疎水型のラメラ状のマイクロドメイン構造表面は異物認識のサイトであるリンパ球形質膜から細胞内への刺激伝達を抑制し、さらに形質膜の流動性を抑制することが示された。そして、このことによりHSB表面はリンパ球のネクローシスを抑制することが示された。

## V. 結語

HSBの親水/疎水型のラメラ状のマイクロドメイン構造表面のリンパ球のネクローシス抑制機構をより明確にするために、HSB表面におけるリンパ球形質膜貫通性のSIgRのCapping形成抑制能に着目した。リンパ球のSIgRは微小糸と連結している<sup>26)</sup>が、DMSOによりこの解離が可能である<sup>27)</sup>。対照群として、PSt及びHSR表面を用いた。DMSO添加したリンパ球では、いずれの材料表面において、リンパ球のネクローシスは抑制されていた。リンパ球を用いた既報の実験結果<sup>22-25)</sup>との比較から、HSB表面は異物認識のサイトであるリンパ球形質膜から細胞内への刺激伝達を抑制し、さらに形質膜の流動性を抑制することが示された。このことにより、HSB表面はリンパ球のネクローシスを抑制することが示された。

## 文献

- 1) Okano T, Nishiyama S, Shinohara I, Akaike T, Sakurai Y, Kataoka K, Tsuruta T: Effect of hydrophilic and hydrophobic microdomains on mode of interaction between block polymer and blood platelets. *J Biomed Mater Res* 15: 393-402, 1981
- 2) Okano T, Kataoka K, Abe K, Sakurai Y, Shimada M, Shinohara I: *In vivo* evaluation of antithrombogenicity of block copolymers with hydrophilic and hydrophobic microdomains by arteriovenous shunts. *Prg Artif Organs* 7: 863-866, 1983
- 3) Okano T, Aoyagi T, Kataoka K, Abe K, Sakurai Y, Shimada M, Shinohara I: Hydrophilic-hydrophobic microdomain surfaces having an ability to suppress platelet aggregation and their *in vitro* antithrombogenicity. *J Biomed Mater Res* 20: 919-927, 1986
- 4) Nojiri C, Okano T, Grainger D, Pard KD, Nakahama S, Suzuki K, Kim SW: Evaluation of nonthrombogenic polymers in a new rabbit A-A shunt model. *Trans Am Soc Artif Intern Organs* 33: 596-601, 1987
- 5) Nojiri C, Okano T, Jacobs HA, Pard KD, Mohammad SF, Oleson DB, Kim SW: Blood compatibility of PEO grafted polyurethane and HEMA/Styrene block copolymer surfaces. *J Biomed Mater Res* 24: 1151-1171, 1990

- 6) Okano T, Suzuki K, Yui N, Sakurai Y, Nakahama S: Prevention of changes in platelet cytoplasmic free calcium level by interaction with 2-hydroxyethyl methacrylate/styrene block copolymer surfaces. *J Biomed Mater Res* 27: 1519-1525, 1993
- 7) Nojiri C, Okano T, Takemura N, Senshu K, Kido T, Koyanagi H, Kim SW, Akutu T: Improved patency of HEMA/Styrene block copolymer-coated small vessel prosthesis without neointima formation. *Artificial Heart* 4, ed by Akutu T and Koyanagi H. Springer-Verlag Tokyo, 1993, 53-60
- 8) Nojiri C, Nakahama S, Senshu K, Okano T, Kawagoishi N, Kido T, Sakai K, Koyanagi H, Akutsu T: A new amphiphilic block co-polymer with improved elastomeric properties for application in various medical devices. *ASAIO Journal*. 39, M322-M326, 1993
- 9) 阿部一彦、鈴木 憲、岡野光夫、桜井靖久、堀江俊伸: 新しい“具象化表現法”として期待されるハイクオリティ・フルカラー画像処理-マイクロドメイン構造表面に粘着した血小板の透過型電子顕微鏡像HSR表面の応用-. *映像情報 Medical* 22: 1236-1238, 1990
- 10) 阿部一彦、鈴木 憲、岡野光夫、桜井靖久、菅原基晃、堀江俊伸: HEMA-Stブロック共重合体表面における長時間血小板活性化抑制. *人工臓器* 21: 162-168, 1992
- 11) 阿部一彦、鈴木 憲、岡野光夫、桜井靖久、菅原基晃、堀江俊伸: HEMA-Stブロック共重合体表面における能動的血小板活性化の抑制. *人工臓器* 22: 380-385, 1993
- 12) 阿部一彦、鈴木 憲、岡野光夫、桜井靖久、堀江俊伸: 優れた抗血栓性を有する HEMA-Stブロック共重合体表面における血小板微小管脱重合の抑制. *人工臓器* 23: 740-747, 1994
- 13) 阿部一彦、鈴木 憲、岡野光夫、桜井靖久、菅原基晃、堀江俊伸: HEMA-StABA型ブロック共重合体表面に対する10時間粘着血小板応答の電顕画像処理解析による定量評価. *人工臓器* 24: 79-84, 1995
- 14) 阿部一彦、鈴木 憲、岡野光夫、桜井靖久、菅原基晃、堀江俊伸: HEMA-StABA型ブロック共重合体表面における粘着血小板形質膜グリコカリックスの微細構造の良好保存. *人工臓器* 24: 52-58, 1995
- 15) 阿部一彦、鈴木 憲、岡野光夫、桜井靖久、堀江俊伸: ポリ(2-ヒドロキシエチルメタクリレート)-ポリスチレンABA型ブロック共重合体及びBiomer表面における粘着血小板の超微形態変化抑制能のコンピュータ定量比較. *人工臓器* 25: 707-713, 1996
- 16) 阿部一彦、鈴木 憲、岡野光夫、桜井靖久、堀江俊伸: ポリ(2-ヒドロキシエチルメタクリレート)-ポリスチレンABA型ブロック共重合体表面における膜骨格解離粘着血小板の超微形態学的解析. *人工臓器* 25: 406-411, 1996
- 17) Abe K, Sugawara M, Horie T, Suzuki K, Okano T, Sakurai Y: Analysis of plasma membrane glycocalyx and/or of quantitative computerized cytological image of platelets adhered to HEMA-St ABA type block copolymer surfaces with good antithrombogenicity: *Advanced Biomaterials in Biomedical Engineering and Drug Delivery Systems*, ed by Ogata N et al., Springer Tokyo 1996, 257-258
- 18) 阿部一彦、鈴木 憲、岡野光夫、桜井靖久、堀江俊伸: PHEMA-PSt-PHEMA ABA型ブロック共重合体表面における44℃浸せき粘着血小板の超微形態学的解析. *人工臓器* 26: 476-484, 1997
- 19) 阿部一彦、鈴木 憲、岡野光夫、桜井靖久、堀江俊伸: ミクロドメイン幅の異なる PHEMA-PSt-PHEMA ABA型ブロック共重合体表面に粘着した血小板透過型電子顕微鏡像の画像処理解析による定量評価. *人工臓器* 26: 485-491, 1997
- 20) Ito E, Suzuki K, Yamato M, Yokoyama M, Sakurai Y, Okano T: Active platelet movements on hydrophobic/hydrophilic microdomain-structured surfaces. *J Biomed Mater Res* 42: 148-155, 1998
- 21) 伊藤悦子、大和雅之、権 吾亮、桜井靖久、岡野光夫: 抗血栓性材料: HEMA-St-PHEMA ABA型ブロック共重合体表面における血小板運動とその機序. *人工臓器* 28:

326-332, 1999

22) 阿部一彦、菊池明彦、伊藤悦子、岡野光夫、桜井靖久、堀江俊伸: PHEMA-PSt-PHEMA ABA型ブロック共重合体表面のリンパ球細胞死阻止能の超微形態学的評価. 人工臓器 27: 495-502, 1998

23) 阿部一彦、菊池明彦、伊藤悦子、岡野光夫、桜井靖久、堀江俊伸、笠貫 宏: PHEMA-PSt-PHEMA ABA型ブロック共重合体表面における接触リンパ球の壊死阻害. 人工臓器 28: 230-236, 1999

24) 阿部一彦、長尾博明、菅原基晃: 微細な相分離構造表面を有する親水/疎水型ブロック共重合体に粘着したリンパ球形質膜グリコカリックスの微細構造解析. 医学検査(第48回 日本臨床検査学会抄録集) 48: 631, 1999

25) 阿部一彦、笠貫 宏、菊池明彦、岡野光夫: PHEMA-PSt-PHEMA ABA型ブロック共重合体表面に対するシアル酸除去リンパ球の超微形態学的評価. 人工臓器 29: 217-224, 2000

26) Braun J, Unanue ER: Surface immunoglobulin and the lymphocyte cytoskeleton. Federation Proc 42: 2446-2451, 1983

27) Filosa MF, Fukui Y: Dimethyl sulfoxide inhibits capping of surface receptors. Cell Biology International Reports 5: 575-579, 1981

28) Hirao A, Kato H, Yamaguchi K, Nakahama S: Polymerization of monomers containing functional groups protected by trialkylsilyl groups. 5. Synthesis of poly(2-hydroxyethylmethacrylate) with a narrow molecular weight distribution by means of anionic living polymerization. Macromolecules 19: 1294-1299, 1986

29) Kataoka K, Maeda M, Nishimura T, Nitadori Y, Tsuruta T: Estimation of cell adhesion on polymer surfaces with the use of "column-method". J Biomed Mater Res 14: 817-823, 1980

30) 朴杓允: 画像計測. 電子顕微鏡と周辺機器(宮澤七郎、相原 薫監修)、医学出版センター、東京、1994、389-393

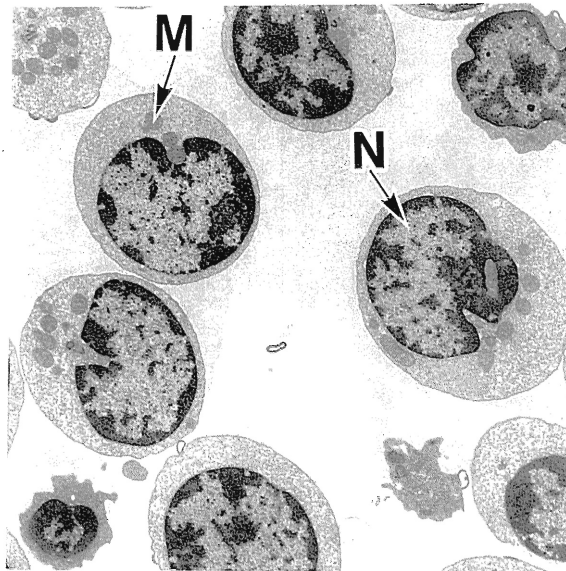


Fig. 1. Transmission electron micrograph of DMSO-treated control lymphocytes. x 3,900. M, mitochondria; N, nucleus.

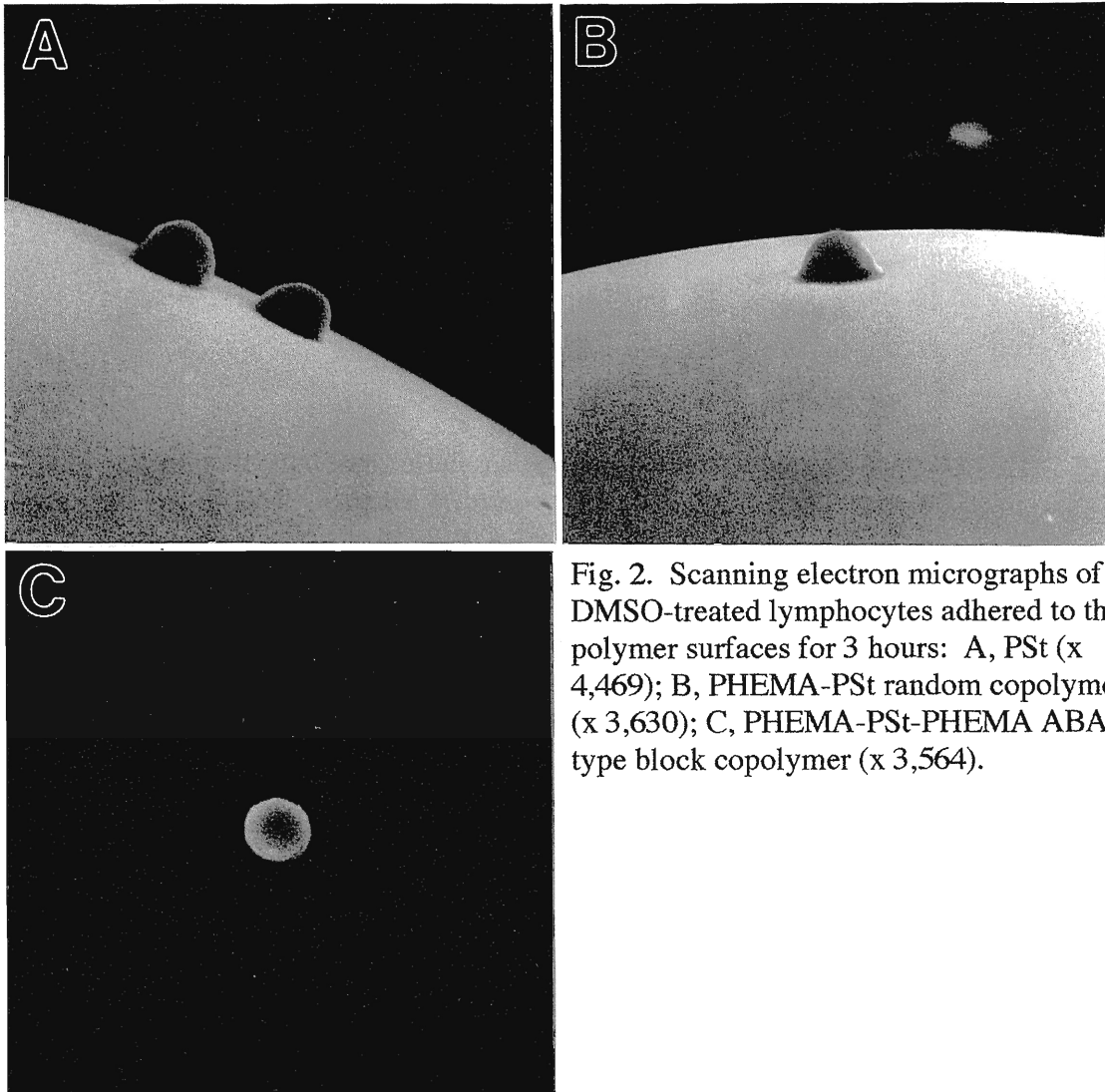


Fig. 2. Scanning electron micrographs of DMSO-treated lymphocytes adhered to the polymer surfaces for 3 hours: A, PSt (x 4,469); B, PHEMA-PSt random copolymer (x 3,630); C, PHEMA-PSt-PHEMA ABA-type block copolymer (x 3,564).



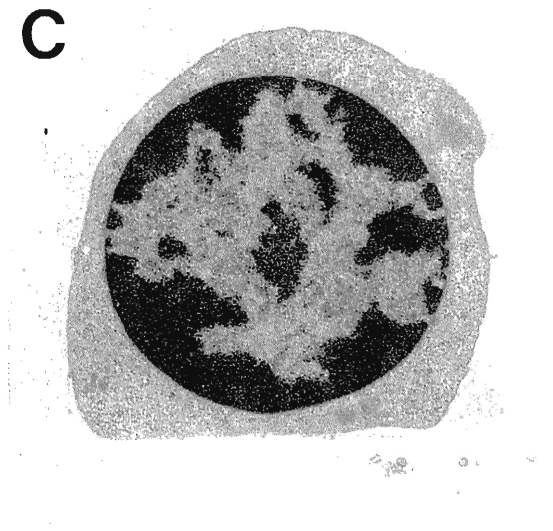
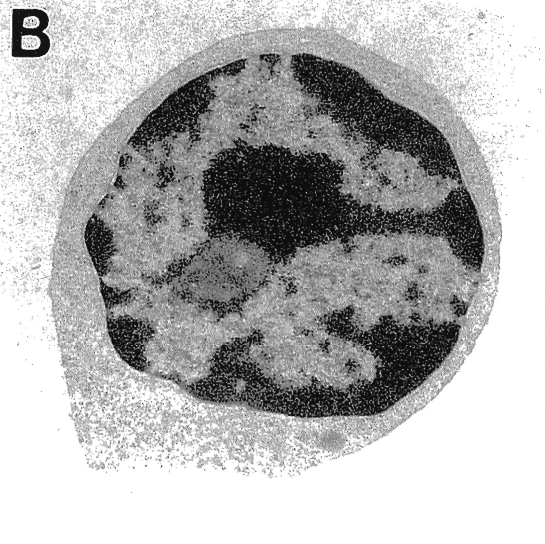
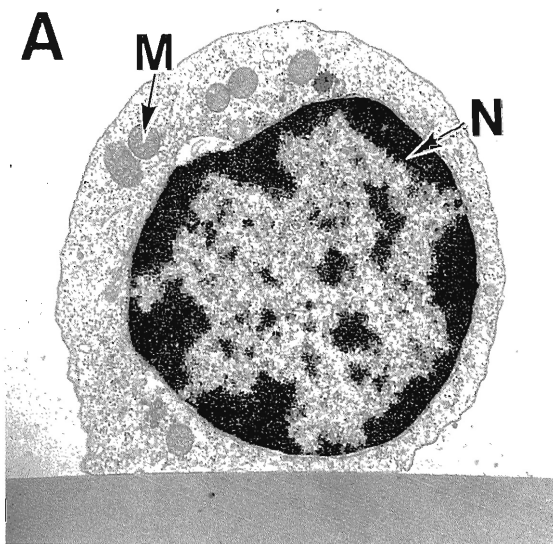


Fig. 3. Transmission electron micrographs of DMSO-treated lymphocytes adhered to the polymer surfaces for 3 hours: A, PSt (x 10,800); B, PHEMA-PSt random copolymer (x 12,000); C, PHEMA-PSt-PHEMA ABA-type block copolymer (x 12,600). M, mitochondria; N, nucleus.

Table 1. Computerized transmission electron microscopic image analysis of mitochondria of DMSO-treated lymphocytes adhered to the polymer surfaces for 3 hours.

Specimens / Measured parameters	PSt	PHEMA-PSt random copolymer	PHEMA-PSt-PHEMA ABA type block copolymer (16nm)	DMSO-treated control lymphocytes
Perimeter ( $\mu\text{m}$ )	$1.37 \pm 0.25$	$1.43 \pm 0.25$	$1.33 \pm 0.23$	$1.38 \pm 0.35$
Maximum length ( $\mu\text{m}$ )	$0.48 \pm 0.10$	$0.49 \pm 0.09$	$0.46 \pm 0.09$	$0.49 \pm 0.15$
Area ( $\mu\text{m}^2$ )	$0.14 \pm 0.05$	$0.16 \pm 0.06$	$0.13 \pm 0.05$	$0.15 \pm 0.07$

Each value indicates mean  $\pm$  S.D.  
N.S. indicates no significant difference.