

厚生労働科学研究費補助金

医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業

幹細胞を利用した分化誘導培養による人工血液の開発に関する研究

平成17年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 千葉 滋

平成18年（2006）3月

# 目 次

## I. 総括研究報告

- 幹細胞を利用した分化誘導培養による人工血液の開発に関する研究  
東京大学医学部附属病院 千葉 滋 ..... 1

## II. 分担研究報告

### 1. 造血幹細胞の体外増幅に関する研究

- 東京大学医学部附属病院 千葉 滋 ..... 7  
東京大学大学院医学系研究科 神田 善伸  
東京大学大学院医学系研究科 鈴木 隆浩

### 2. ヒト ES 細胞からの造血細胞誘導に関する研究

- 東京大学大学院医学系研究科 小川 誠司 ..... 10  
東京大学大学院医学系研究科 鈴木 隆浩

### 3. 好中球の体外産生に関する研究

- 東京大学大学院医学系研究科 黒川 峰夫 ..... 12  
東京大学大学院医学系研究科 熊野 恵城

### 4. ヒト造血幹細胞の血球産生能・分化能の生体内評価法の開発

- 国立国際医療センター研究所 湯尾 明 ..... 14

### 5. 培養細胞の輸血製剤化の検討に関する研究

- 東京大学大学院医学系研究科 高橋 孝喜 ..... 16

### 6. 臍帯血の供給に関する研究

- 日本赤十字社中央血液研究所 十字 猛夫 ..... 19  
東京都赤十字血液センター 高梨 美乃子

## III. 研究成果の刊行に関する一覧表 ..... 21

## IV. 研究成果の刊行物・別刷 ..... 23

# I. 総括研究報告

厚生労働科学研究費補助金（医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業）  
総括研究報告書

幹細胞を利用した分化誘導培養による人工血液の開発に関する研究

主任研究者

千葉 滋 東京大学医学部附属病院 無菌治療部 助教授

研究要旨：

ヒト臍帯血から造血幹細胞を濃縮する際、従来のCD34陽性細胞選択ではなく、CD133陽性細胞選択の方が造血幹細胞を約5倍多く収集可能であることを明らかにした。NotchリガンドDelta 1-Fcキメラタンパク質を用い、無血清・無フィーダー条件でこれらCD133陽性細胞を培養することにより、NOD/SCIDマウスで長期造血可能な細胞幹細胞を約6倍に増幅した。培養・増幅したこれらの細胞が成熟T細胞への分化能を含めた完全な分化能を保持していることを、NOD/SCID/ $\gamma c^{null}$  (NOG)マウスへの移植で確認した。この結果は、移植医療への応用が期待される成果である。同時に、新たにヒト胚性幹細胞から血球を誘導する研究を開始した。KhES-3胚性幹細胞から胚様体を経由し造血細胞への分化を確認した。さらに、低純度ながらヒト胚性幹細胞からの好中球産生を確認した。一方、NOGマウスを用いた移植実験系によって、ヒト造血細胞の好中球への機能分化を正しく評価できる系を確立した。

また、フッ素添加効果ダイヤモンドライクカーボン膜が動的条件下でも血小板の接着を抑制することを明らかにした。本知見は、幹細胞由来血小板産生技術が完成した場合、産生された血小板の保存や輸送に使用できるばかりでなく、現行の輸血用血小板の輸送に有効に使用できる可能性を示唆する。

臍帯血バンク運営上、提供され調製保存施設に受け入れられる臍帯血のうち約30%を研究用に譲渡することができた。このことは本研究の推進にとっても重要な意義をもつ。

分担研究者

- 小川 誠司  
東京大学大学院医学系研究科  
造血再生医療寄付講座 客員助教授
- 黒川 峰夫  
東京大学大学院医学系研究科  
血液・腫瘍病態学 教授
- 神田 善伸  
東京大学大学院医学系研究科  
血液・腫瘍病態学 講師
- 鈴木 隆浩  
東京大学大学院医学系研究科  
造血再生医療寄付講座 客員助手
- 熊野 恵城  
東京大学大学院医学系研究科  
血液・腫瘍病態学  
研究拠点形成 特任研究員
- 湯尾 明  
国立国際医療センター  
血液疾患研究部 部長

- 高橋 孝喜  
東京大学大学院医学系研究科  
輸血医学 教授
- 十字 猛夫  
日本赤十字社血液研究所 所長
- 高梨 美乃子  
東京都赤十字血液センター  
臍帯血バンク 技術部長

A：研究目的

現在血液製剤は献血事業に依存しているが、献血による輸血医療は、量的質的な供給の不安定性、感染の危険性などの問題を孕んでおり、改善すべき点も多い。本研究ではこうした現状に対し、主に臍帯血や骨髄中に存在する体性造血幹細胞の自己複製能と多分化能を利用して、体外で赤血球・白血球・血小板などの各血球細胞の分化・増殖による人工血液産生法の開発を行い、供血者に依存する輸血医療を再構築することを目指すものである。

本年度は、幹細胞由来血球の製剤化に向け、次のような個々の分野について研究を推進することとし

た。すなわち、ヒト臍帯血造血幹細胞選択法の比較検討、Delta1-Fcキメラタンパク質を用いて体外増幅したヒト臍帯血造血幹細胞の分化能の詳細な解析、ヒト胚性幹細胞からの造血細胞分化誘導、ヒト胚性幹細胞からの好中球産生、ヒト造血幹細胞の血球産生能・分化能の生体内評価法の開発、生物由来の薬剤による補助を必要としない抗血栓性材料開発に向けたフッ素添加効果ダイヤモンドライカーボン膜の動的環境における抗血栓性評価、造血幹細胞研究の材料となる臍帯血供給システムの研究である。

## B：研究方法

人工血液産生システムの確立にあたっては、①体性幹細胞の効果的増幅（あるいは将来的にはヒト胚性幹細胞[ヒトES細胞]からの血球誘導）、②幹細胞から各血球への効果的な分化誘導、③誘導された血球の品質担保、の3テーマが最も重要である。本研究では主にこれら3つの研究テーマに分担研究者を配置し、これに④ヒト臍帯血の安定供給システムについての研究を加えた、計4テーマについて研究を行った。

### ① 造血幹細胞の効果的増幅：「造血幹細胞の体外増幅」および「ヒトES細胞からの造血細胞分化誘導」

ヒト臍帯血から造血幹細胞を選択する方法としてCD34磁気ビーズとCD133磁気ビーズのいずれが優れているか直接比較した。CD133陽性磁気ビーズ法で選択した細胞をDelta1-Fcを用いて培養しNOD/SCIDマウス(NODマウス)およびNOD/SCID/γc<sup>null</sup>マウス(NOGマウス)に移植した。10週以上経過後に解析することにより、造血幹細胞の増幅効率および増幅された造血幹細胞の詳細な分化能力を検討した。

ヒトES細胞研究では、京都大学で樹立されたKhES-3細胞を用いて研究を行った。供与を受けたKhES-3細胞を無血清法で培養し、未分化性を維持したまま増幅して大量に凍結保存した。次いで、中胚葉系細胞への分化を目的として胚様体(embryoid body, EB)を形成させた。10~25日目のEBから、血管系細胞表面抗原を指標に細胞を選択し、造血系サイトカイン存在下で培養し、血球の産生を観察した。

### ② 幹細胞から各血球への効果的な分化誘導法の開発：「好中球の体外産生」および「ヒト造血幹細胞の血球産生能・分化能の生体内評価法の開発」

マウス骨髄CD34陽性細胞を昨年報告した方法で培養して得た好中球の活性酸素産生能を測定した。

京都大学で樹立されたKhES-3細胞から胚様体(Embryoid Body; EB)を形成させ、これを造血サイトカイン中で培養。一定期間後に胚様体内で形成される血球細胞あるいは血球前駆細胞を分取し、好中球分化誘導培地中でさらに分化誘導を行った。

一方、ヒト臍帯血CD34陽性細胞をNOGマウスに移植したのち、ゼイモザン刺激による空気嚢炎を作成し、炎症巣に集積する好中球を解析した。

### ③ 誘導された血球の品質担保：「培養細胞の輸血製剤化の検討に関する研究」

幹細胞から誘導された血球を輸血製剤として利用するためには、得られた血球が実際に使用されるまで正常機能を有し続けることが必須である。抗血栓性が期待されているDLC-coating Polycarbonateへの血小板接着状態を昨年度に引き続き解析を進めた。昨年度は静的条件で検討したが、今年度は動的条件で検討を加えた。

### ④ ヒト臍帯血の安定供給システムの確立：「臍帯血の供給に関する研究」

臍帯血バンクへの臍帯血提供の同意には、移植に至らない場合の研究用使用も含まれている。ただし移植医療に貢献できる研究でなければならない。東京都赤十字血液センター臍帯血バンクでは、研究用譲渡を希望する研究者から提出された研究計画書、当該施設の倫理委員会での研究承認書類等を臍帯血バンク研究審査部会に回覧し、2/3以上の賛成多数をもって承認とした。あらかじめ承認した研究者に対して、臍帯血が研究用と判断した時点で連絡した。

#### (本研究における倫理面への配慮)

本研究は出産後の産婦から提供された臍帯血を利用するため、臍帯血の提供に当たり以下の事項を確認、その内容は東京大学医学系研究科倫理委員会の審査・承認を受けた上で研究を開始している。(承認番号：351)

また、動物実験については「東京大学動物実験実施マニュアル」に従った研究を行い、適切な動物実験が行われるよう配慮した。

さらにヒトES細胞研究については、その内容に関して東京大学および文部科学省の厳正な審査を経た上で大臣承認を得ている。そして研究にあたっては、実験を許可された者がガイドラインに従った厳しい管理の下でES細胞を扱い、ヒトES細胞研究に要求される高度な倫理意識を保ちながら適切な研究が行われるよう配慮した。

## C：研究結果

### ① 造血幹細胞の効果的増幅：

CD133磁気ビーズで選択した細胞集団にはCD34磁気ビーズで選択した細胞集団と比べ、約4.5倍の造血幹細胞が含まれることを明らかにした。

幹細胞因子(SCF), トロンボポエチン(TPO), Flt-3リガンド(FL), インターロイキン6-インターロイキン6受容体キメラタンパク質 (FP6), インターロイ

キン3 (IL-3)を組み合わせ、Delta1-Fcを培養皿にコーティングして無血清でヒト臍帯血CD133陽性細胞を培養することにより、NOD/SCIDマウスで長期造血可能なSRCが6倍に増幅できることを確認してきた。さらに、同様に培養した細胞をNOGマウスに移植することにより、NOD/SCIDへの移植で確認された各血球系への分化に加え、CD3陽性T細胞への分化を確認した。したがって21日間という長期間の培養後も分化能を失わず、厳密な意味で幹細胞の性質を保持していることが証明された

ES細胞からの造血細胞誘導研究では、我が国で樹立されたヒトES細胞としてKhES-3細胞を用いた。KhES-3細胞は、マウス胎児線維芽細胞上で未分化状態を維持したまま増殖させ、大量に冷凍保存することができた。そして、ディスパーゼを用いてKhES-3細胞コロニーを剥離し、24時間無血清培地中で培養し胚様体(EB)を形成させた。翌日、培地交換を行いSCF、TPO、FL、FP6、骨形成タンパク質4 (BMP4)を添加した培地中でEBを培養し中胚葉系への細胞分化を誘導した。10日後あるいは18日後、EBに酵素処理を行って単一細胞化し、フローサイトメーターでCD31、CD144陽性細胞を分取、これをOP9ストローマ細胞株上で培養したところ、血球様細胞が産生された。血球様細胞コロニーの一部は敷石様に増殖した。

## ② 幹細胞から各血球への効果的な分化誘導法の開発：

マウス骨髄CD34陽性細胞から体外で産生させた好中球は、腹膜炎誘発マウス腹腔に集積した好中球に比べ同等以上の活性酸素産生能を有していた。

ES細胞よりEBを形成させ、SCF、TPO、FL、FP6、血管内皮細胞増殖因子(VEGF)、BMP4を添加した培養液中で20日間培養したところ、血液細胞・未分化血液細胞を示すCD45あるいはCD34陽性細胞が10%程度誘導された。磁気ビーズ法を用いてこれらのCD45陽性あるいはCD34陽性細胞を分取し、顆粒球コロニー刺激因子(G-CSF)を含む培養液中で培養したところ、成熟好中球を多数含む血球が誘導された。

ヒト臍帯血CD34陽性細胞をNOGマウスに尾静注後6-10週間後に生着(骨髄と脾臓において90%前後の細胞がヒト血液細胞抗原CD45陽性)を確認し、空気嚢炎を作成して遊走してくる好中球の中にヒト好中球が存在するか否かを検討した。空気嚢から回収した細胞の90%はGr-1陽性マウス好中球であったが、10%前後はヒトCD45陽性のヒト細胞であった。実際、約2-4%の細胞がヒト好中球特異的抗原CD10、CD66b陽性であり、ヒト好中球であることを確認した。

## ③ 誘導された血球の品質担保：

昨年度は、静的環境においてはポリカーボネイト(PC) < ダイヤモンドライクカーボン (DLC) < フッ素添加DLC (F-DLC)の順で付着血小板の付着量および活性化が抑制されることを報告した。今年度は、動的環境(静脈系、動脈系を再現したせん断応力下)において評価した。この結果、静的環境においてもPC < DLC < F-DLCの順に血小板付着が抑制されることを確認した。

## ④ ヒト臍帯血の安定供給システムの確立：

臍帯血は容量が十分採取された場合に臍帯血バンクへ搬送される。さらに細胞数が十分あれば移植目的に保存可能と判断して、調製を開始する。保存されたのは受入数607件の55.2%、335件であった。これは、譲渡対象のうち75.8%が研究者に譲渡されたことを意味する。272件が保存にいたらなかったが、その理由は細胞数不足、クロット、受入までに24時間以上経過、母既往歴、家族歴、調製不良、感染症スクリーニング陽性、英国滞在歴および双胎であった。保存できない臍帯血272件のうち細胞数不足が223件(うち細胞数不足かつクロットが15件)、クロット形成を認める検体が37件であった。2005年10月より臍帯血バンクとして調製開始の細胞数基準を $9 \times 10^8$ にあげた為、保存率は減少し、細胞数不足に該当する臍帯血が前年度同時期の26.8%から36.7%に増加した。クロット形成を認める臍帯血では有核細胞回収率が低い可能性があったが、研究者の希望によっては研究用に提供した。また、この判定は臍帯血採取後24時間以内に行われるため、研究者への譲渡時点では臍帯血は採取後おおよそ24時間内外であった。

## D：考察

ヒト造血幹細胞の選択にあたっては、従来から行われてきたCD34陽性細胞選択ではなく、CD133陽性細胞選択を用いるべきであることが強く示唆された。

ウシ胎児血清やマウスストローマ細胞など異種動物血清や細胞を培養系に含まない培養系で、T細胞を含むあらゆる血球に分化可能な幹細胞が高い効率で体外増幅されることをはじめて示し、移植医療への利用可能性を明確にした。

ヒトES細胞から未分化な血球細胞が誘導されていることが示唆された。今後さらにこれらの細胞の性状を解析する必要がある。

マウス骨髄由来造血前駆細胞から、十分な機能を持つ好中球を体外で産生し得ることが示された。今後ヒト造血前駆細胞からの研究を進める必要がある。

ヒトES細胞からの好中球産生が確認されたが、さらに効率的な産生法を見出し、十分な純度で多数の好中球を得て機能を解析する必要がある。

NOGマウスがヒト造血幹細胞の生体内における増殖・分化評価系として極めて優れた動物モデルであることを明らかにし、霊長類のES細胞から誘導された造血細胞の成体内分化能の評価系として期待できる。

DLC膜にフッ素を添加することにより撥水性が向上した。F-DLCは幹細胞由来血球用素材としてものみならず、血液接触性の医療器具あるいは人工臓器や血管内埋め込みデバイスの表面コーティングとして有望と考えられ、その実用化が望まれる。

臍帯血バンクでは、細胞数の多い臍帯血のみを保存する方針が全国的にとられ、臍帯血採取に協力頂いても保存される割合が下がりつつある。臍帯血バンクに協力する妊産婦の意思を尊重し、産科スタッフの意欲を保つ為にも臍帯血が保存基準に満たない場合には有効活用を図るべきである。今年度の研究用譲渡利用率は昨年と同程度であったが、提供絶対数は前年後同時期の126件より56%増加した。臍帯血が移植目的に保存されない理由のうちクロットについても、研究によっては活用できる事が分かった。

#### E：結論

(1) ヒト臍帯血造血幹細胞はCD133磁気ビーズ選択法が優れている。ただちに臨床応用可能な培養法で完全な能力を持つヒト臍帯血造血幹細胞の増幅を証明した。

(2) 京都大学で樹立されたヒトES細胞から未熟造血細胞が誘導され、性状解析を進めている。

(3) マウス造血前駆細胞から十分な殺菌能を有する好中球が体外で産生された。

(4) ヒトES細胞からの好中球産生を確認した。純度・効率を上げる方法を見出し、機能解析を行う必要がある。

(5) NOGマウスを用いた移植実験系によって、ヒト造血細胞の好中球への機能分化を正しく評価できる系を確立した。

(6) せん断応力下においても、ポリカーボネイトと比較してDLCおよびF-DLC膜の有意な抗血栓性が示された。

(7) 臍帯血バンクの受入臍帯血の内、細胞数基準およびクロットにより保存できない臍帯血を採血後24時間内外で研究用に譲渡する事が可能である。組織的に譲渡対象のうち75.8%を研究者に譲渡した。

#### F：健康危険情報

特に認められない。

#### G：研究発表

##### 1. 論文発表

1. Kawazu M, Asai T, Ichikawa M, Yamamoto G, Saito T, Goyama S, Mitani K, Miyazono K, Chiba S,

Ogawa S, Kurokawa M, Hirai H. Functional domains of Runx1 are differentially required for CD4 repression, TCR $\beta$  expression, and CD4/8 double-negative to CD4/8 double-positive transition in thymocyte development. *J Immunol* 174:3526-3533, 2005

2. Kanda Y, Oshima K, Asano-Mori Y, Kandabashi K, Nakagawa M, Sakata-Yanagimoto M, Izutsu K, Hangaishi A, Tsujino S, Ogawa S, Motokura T, Chiba S, Hirai H. In vivo alemtuzumab enables haploidentical HLA-mismatched hematopoietic stem cell transplantation without ex vivo graft manipulation. *Transplantation* 79:1351-1357, 2005

3. Kanda Y, Komatsu Y, Akahane M, Kojima S, Asano-Mori Y, Tada M, Oshima K, Isayama H, Ogawa S, Motokura T, Chiba S, Ohtomo K, Omata M, Hirai H. Graft-versus-tumor effect against advanced pancreatic cancer after allogeneic reduced-intensity stem cell transplantation. *Transplantation* 79:821-827, 2005

4. Masuda S, Kumano K, Shimizu K, Imai Y, Kurokawa M, Ogawa S, Miyagishi M, Taira K, Hirai H, Chiba S. The Notch1 oncoprotein antagonizes TGF- $\beta$ /Smad-mediated cell growth suppression via sequestration of co-activator p300. *Cancer Science* 96:274-282, 2005

5. Crcareva A, Saito T, Kunisato A, Kumano K, Suzuki T, Sakata-Yanagimoto M, Kawazu M, Stojanovic A, Kurokawa M, Ogawa S, Chiba S. Hematopoietic stem cells expanded by fibroblast growth factor-1 are excellent targets for retrovirus-mediated gene delivery. *Exp Hematol* 33:1459-1469, 2005

6. Haraguchi K, Takahashi T, Matsumoto A, Asai T, Kanda Y, Kurokawa M, Ogawa S, Oda H, Taniguchi M, Hirai H, Chiba S. Host-residual invariant NK T cells attenuate graft-versus-host immunity. *J Immunol* 175:1320-1328, 2005

7. Lee SY, Kumano K, Masuda S, Hangaishi A, Takita J, Nakazaki K, Kurokawa M, Hayashi Y, Ogawa S, Chiba S. Mutations of the Notch1 gene in T-cell acute lymphoblastic leukemia: analysis in adults and children. *Leukemia* 19:1841-1843, 2005

8. Saeki K, Yasugi E, Okuma E, Breit SN, Nakamura M, Toda T, Kaburagi Y, Yuo A. Proteomic analysis on insulin signaling in human hematopoietic cells: identification of CLIC1 and SRp20 as novel downstream effectors of insulin. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 289:E419-E428, 2005

9. Hasebe T, Kamijo A, Hotta A, Takahashi K, Suzuki T. Diamond-like carbon and fluorinated diamond-like carbon films for cardiovascular medical devices. *J Surface Finishing Society Jap* 56:897-905, 2005

10. Hasebe T, Matsuoka Y, Kadama H, Saito T, Yohena S, Kamijo A, Shiraga N, Higuchi M, Kuribayashi S, Takahashi K, Suzuki T. Lubrication performance of diamond-like carbon and fluorinated diamond-like carbon coatings for intravascular guidewires, *Diamond and Related Materials* 15:129-132, 2006

11. Saito T, Hasebe T, Yohena S, Matsuoka Y, Kamijo A, Takahashi K, Suzuki T. Antithrombogenicity of

fluorinated diamond-like carbon films. *Diamond and Related Materials* 14:1116-1119, 2005

## 2. 学会発表

### <海外学会>

1. "Absolute *in vitro* Expansion of Human Cord Blood Hematopoietic Stem Cells by the Use of Recombinant Delta1-Fc Chimeric Protein." Suzuki T, Ogawa S, Kumano K, Kurokawa M, Nishikawa M, Sakano S, Hirai H, Chiba S. International Society for Stem Cell Research 3rd Annual Meeting, June 23-25, 2005, San Francisco, CA, USA
2. "In vitro hemodynamic evaluation of inferior vena cava (IVC) filters using particle imaging velocimetry (PIV)." Hasebe T, Saito T, Yohena S, Kamijo A, Takahashi K, Kuribayashi S, Suzuki T, Tanishita K. Cardiovascular and Interventional Radiological Society of Europe (CIRSE), 2005, Niece, France
3. "XPS depth profiling of fluorinated diamond-like carbon film and the inhibition effect of topmost surface fluorine on platelet adhesion and activation" Saito T, Hasebe T, Yohena S, Matsuoka Y, Kamijo A, Takahashi K, Suzuki T. The 10th International Conference on New Diamond Science and Technology (ICNDST-10), May, 2005, Tsukuba, Japan
4. "Platelet adhesion and activation on fluorinated amorphous carbon films" Yohena S, T. Hasebe T,

Saito T, Matsuoka Y, Kamijo A, Takahashi K, Suzuki T. The 10th International Conference on New Diamond Science and Technology (ICNDST-10), May, 2005, Tsukuba, Japan

### <国内学会>

1. 「Notch リガンドを用いた臍帯血造血幹細胞増幅の試み」鈴木隆浩、小川誠司、熊野恵城、黒川峰夫、西川光郎、坂野誠治、平井久丸、千葉滋。2005年4月 第3回幹細胞シンポジウム（兵庫、淡路島）
2. 「フッ素添加ダイヤモンドライクカーボン(F-DLC)膜上での白血球付着傾向の評価」吉村泰一、長谷部光泉、上條亜紀、石丸哲也、吉本幸洋、饒平名智士、斉藤俊哉、堀田篤、鈴木哲也、高橋孝喜。2005年11月24-25日 第19回ダイヤモンドシンポジウム（大阪府）
3. 「Diamond-like carbon(DLC)の抗血栓性メカニズムの解明：Transmission electron microscopy(TEM)による試料界面での血小板活性化過程の詳細検討」吉本幸洋、長谷部光泉、斉藤俊哉、饒平名智士、石丸哲也、吉村泰一、堀田篤、上條亜紀、高橋孝喜、鈴木哲也。2005年11月24-25日 第19回ダイヤモンドシンポジウム（大阪府）学会最優秀ポスター賞

H：知的財産権の出願・登録状況  
該当なし



## II. 分担研究報告

分担研究報告書

造血幹細胞の体外増幅に関する研究

分担研究者

千葉 滋 東京大学医学部附属病院 無菌治療部 助教授  
神田 善伸 東京大学大学院医学系研究科 血液・腫瘍病態学 講師  
鈴木 隆浩 東京大学大学院医学系研究科 造血再生医療講座 助手

研究要旨：

ヒト臍帯血から造血幹細胞を濃縮する際、従来のCD34陽性細胞選択ではなく、CD133陽性細胞選択の方が造血幹細胞を約5倍多く収集可能であることを明らかにした。これらのCD133陽性細胞を無血清・無フィーダー条件下Delta1-Fcキメラ蛋白質を加えて培養することにより、長期造血再構築可能な造血幹細胞をこれまでの報告の中でもっとも効率よく増幅することに成功した。このようにして培養された細胞をNOD/SCID/ $\gamma c^{null}$ 免疫不全マウスに移植したところ、T細胞を含む全血球系への分化が認められ、培養後の造血幹細胞は全血球系への分化能力を保持していることが確認された。本培養システムは異種動物血清を含まない安全性の高い培養法であり、造血幹細胞由来血球の大量産生システム開発の基盤になるものと期待される。現在マイクロビーズにDelta1-Fcキメラ蛋白質をコーティングして培養することにより、さらに効率を高められないか検討している。

A：研究目的

ヒト臍帯血からの造血幹細胞選択法としてCD34磁気ビーズ法およびCD133磁気ビーズ法を直接比較し、いずれの方法が優れているか検討すること、およびDelta1-Fcを用いて体外増幅した造血幹細胞の特性について解析を進めることを目的とした。

B：研究方法

インフォームドコンセントを得て提供された臍帯血から単核球を分離し、CD34磁気ビーズあるいはCD133磁気ビーズを用いてCD34陽性細胞あるいはCD133陽性細胞を選択した。これらの細胞を限界希釈法により、NOD/SCIDマウスに直接移植し、各々の集団に含まれる造血幹細胞数を比較した。

幹細胞因子(SCF)、トロンボポエチン(TPO)、Flt-3リガンド(FL)、インターロイキン6-インターロイキン6受容体キメラタンパク質 (FP6)、インターロイキン3 (IL-3)を含む無血清培地を用い、フィブロネクチンと共にDelta1-Fcキメラタンパク質を固相化した培養皿で、ヒト臍帯血由来CD133陽性細胞を21日間培養した。培養後の細胞を限界希釈し、NOD/SCID免疫不全マウスに移植（尾静脈投与）し、10～12週間後にレシピエントマウス末梢血、骨髓、脾臓の

細胞をフローサイトメーターで解析した。フローサイトメーターで感度以上のヒト細胞（ヒトCD45陽性細胞）が観察された場合に、造血幹細胞（SRC）が移植されたと定義した。移植細胞数と生着したマウスの割合をプロットし、ポアソン解析によりSRCの頻度を算出した。

さらに、培養後の細胞を近年樹立されたNOD/SCID/ $\gamma c^{null}$ マウス（NOGマウス：本マウスはヒト細胞の生着率が高く、さらに通常のNOD/SCIDマウスへの移植では実現しない、T細胞への分化も検討することができる）に移植し、10週以上経過後に解析することにより、増幅された造血幹細胞の分化能力を詳細に検討した。

（本研究における倫理面への配慮）

本研究は出産後の産婦から提供された臍帯血を利用するため、臍帯血の提供に当たり以下の事項を確認、その内容は東京大学医学系研究科倫理委員会の審査・承認を受けた上で研究を開始している。（承認番号：351）

①提供者の人権保護

東京大学医学部附属病院で臍帯血の提供を受ける場合は、対象者本人に研究の趣旨を理解してもらい、

臍帯血の提供は本人の自由意志によつてのみ行われるものとする。提供を拒否した場合も何ら臨床的不利益を蒙らないことを保障する。説明同意文書の内容を本人に極力分かり易い言葉で説明し、説明同意文書2部を作製して本人に渡したうえで文書による同意を得る。説明同意文書に本人の自由意志で同意の署名がなされた後に、この文書の1部を本人に提供する。

提供者の個人を特定できる情報は、いかなる場所にも公表されない。学会会議および学術誌上での結果の発表が行われる場合でも、提供者個人を特定し得る情報は完全に守秘される。

東京都赤十字血液センターが提供を受ける臍帯血についても、同血液センター医学倫理委員会承認済の同様の倫理的配慮に基づいて処理が行われている。

## ②対象者に対する不利益・危険性

提供者である産婦・新生児に危険が生じることはない。臍帯血採取に当たり身体的不快は全くなく、娩出後の胎盤に接続している臍帯から血液を採取するが、実際に産婦はこの光景を見ることにはならないため、直接的精神的不快もない。

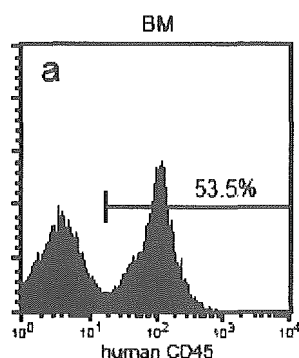
また、動物実験については「東京大学動物実験実施マニュアル」に従った研究を行い、適切な動物実験が行われるよう配慮した。

## C：研究結果

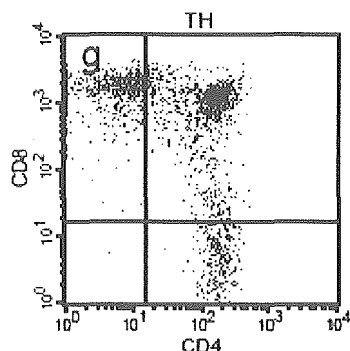
CD133磁気ビーズで選択した細胞集団にはCD34磁気ビーズで選択した細胞集団と比べ、約5倍の造血幹細胞が含まれることを明らかにした。

SCF、TPO、FL、FP6、IL-3を組み合わせ、Delta 1-Fcを培養皿にコーティングして無血清でヒト臍帯血CD133陽性細胞を培養することにより、NOD/SCIDマウスで長期造血可能なSRCが6倍に増幅できることを確認した。さらに、同様に培養した細胞をNOGマウスに移植することにより、NOD/SCIDへの移植で確認された各血球系への分化に加え、CD3陽性T細胞への分化を確認した。したがって21日間という長期間の培養後も分化能を失わず、厳密な意味で幹細胞の性質を保持していることが証明された。

(図)



a) 増幅幹細胞を移植されたNOGマウスの骨髄内においてヒト細胞は53.5%ものキメラ率で生着が認められた。



b) レシピエントNOGマウスの胸腺では正常と同様の分化を示すヒトT細胞の生着が認められた。

## D：考察

ヒト造血幹細胞の選択にあたっては、従来から行われてきたCD34陽性細胞選択ではなく、CD133選択を用いるべきであることが強く示唆された。

ウシ胎児血清やマウスストローマ細胞など異種動物血清や細胞を培養系に含まない培養系で、T細胞を含むあらゆる血球に分化可能な幹細胞が高い効率で体外増幅されることをはじめて示し、移植医療への利用可能性を明確にした。

## E：結論

ヒト臍帯血造血幹細胞はCD133磁気ビーズ選択法が優れている。ただちに臨床応用可能な培養法で完全な能力を持つヒト臍帯血造血幹細胞の増幅を証明した。

## F：健康危険情報

特に認められない。

## G：研究発表

### 1. 論文発表

1. Kawazu M, Asai T, Ichikawa M, Yamamoto G, Saito T, Goyama S, Mitani K, Miyazono K, Chiba S, Ogawa S, Kurokawa M, Hirai H. Functional domains of Runx1 are differentially required for CD4 repression, TCR $\beta$  expression, and CD4/8 double-negative to CD4/8 double-positive transition in thymocyte development. *J Immunol* 174:3526-3533, 2005
2. Kanda Y, Oshima K, Asano-Mori Y, Kandabashi K, Nakagawa M, Sakata-Yanagimoto M, Izutsu K, Hangaishi A, Tsujino S, Ogawa S, Motokura T, Chiba S, Hirai H. In vivo alemtuzumab enables haploidentical HLA-mismatched hematopoietic stem cell transplantation without ex vivo graft manipulation. *Transplantation* 79:1351-1357, 2005
3. Kanda Y, Komatsu Y, Akahane M, Kojima S, Asano-Mori Y, Tada M, Oshima K, Isayama H, Ogawa S, Motokura T, Chiba S, Ohtomo K, Omata M, Hirai H. Graft-versus-tumor effect against advanced pancreatic cancer after allogeneic reduced-intensity stem cell transplantation. *Transplantation* 79:821-827, 2005
4. Masuda S, Kumano K, Shimizu K, Imai Y, Kurokawa M, Ogawa S, Miyagishi M, Taira K, Hirai H, Chiba S.

The Notch1 oncoprotein antagonizes TGF- $\beta$ /Smad-mediated cell growth suppression via sequestration of co-activator p300. *Cancer Science* 96:274-282, 2005

5. Crcareva A, Saito T, Kunisato A, Kumano K, Suzuki T, Sakata-Yanagimoto M, Kawazu M, Stojanovic A, Kurokawa M, Ogawa S, Chiba S. Hematopoietic stem cells expanded by fibroblast growth factor-1 are excellent targets for retrovirus-mediated gene delivery. *Exp Hematol* 33:1459-1469, 2005

6. Haraguchi K, Takahashi T, Matsumoto A, Asai T, Kanda Y, Kurokawa M, Ogawa S, Oda H, Taniguchi M, Hirai H, Chiba S. Host-residual invariant NK T cells attenuate graft-versus-host immunity. *J Immunol* 175:1320-1328, 2005

7. Lee SY, Kumano K, Masuda S, Hangaishi A, Takita J, Nakazaki K, Kurokawa M, Hayashi Y, Ogawa S, Chiba S. Mutations of the Notch1 gene in T-cell acute lymphoblastic leukemia: analysis in adults and children. *Leukemia* 19:1841-1843, 2005

## 2. 学会発表

### <国際学会>

“Absolute *in vitro* Expansion of Human Cord Blood Hematopoietic Stem Cells by the Use of Recombinant Delta1-Fc Chimeric Protein.” Suzuki T, Ogawa S, Kumano K, Kurokawa M, Nishikawa M, Sakano S, Hirai H, Chiba S. International Society for Stem Cell Research 3rd Annual Meeting, June 23-25, 2005, San Francisco, CA, USA

### <国内学会>

「Notch リガンドを用いた臍帯血造血幹細胞増幅の試み」鈴木隆浩、小川誠司、熊野恵城、黒川峰夫、西川光郎、坂野誠治、平井久丸、千葉滋. 2005年4月 第3回幹細胞シンポジウム（兵庫、淡路島）

H：知的財産権の出願・登録状況  
該当なし

分担研究報告書

ヒトES細胞からの造血細胞誘導に関する研究

分担研究者

小川 誠司 東京大学大学院医学系研究科 造血再生医療講座 助教授  
鈴木 隆浩 東京大学大学院医学系研究科 造血再生医療講座 助手

研究要旨：

京都大学で樹立されたヒト胚性幹細胞KhES-3を、未分化性を維持したまま増殖させ冷凍保存した。KhES-3細胞から分化培養系で胚様体を形成させ、さらに胚様体形成細胞を造血系サイトカインを加えOP9ストローマ細胞上で培養することにより、未熟造血細胞に分化させ得ることを確認した。KhES-3細胞は、知的財産権などの問題で米国の研究所から供与を受けているヒト胚性幹細胞に比べ有利な点が多い。産生された未分化造血細胞の性状解析を進めるとともに、造血細胞誘導法に改良を加え、将来的な臨床応用を目指した研究を推進する。

A：研究目的

体性造血幹細胞に由来する血球産生技術の最大の障害は、産生される血球の量的な制限と医療用幹細胞ソースの問題である。1990年代後半から樹立がはじまったヒト胚性幹細胞（ヒトES細胞）は、未分化性を保持したまま培養皿で無限に増殖し、かつあらゆる細胞への分化が可能な細胞である。従って目的とする血球への分化技術が完成すれば、上記のような体性造血幹細胞が包含する問題は解決される。我が国では、京都大学の中辻博士らによってヒトES細胞KhES-1, KhES-2, KhES-3が樹立され、配布が開始されている。今年度我々はKhES-3細胞を用いて、造血細胞誘導が可能かを検討した。

B：研究方法

ヒトES細胞から血液細胞が分化する過程においては、未分化胚細胞（ES細胞）→未分化中胚葉・血管血液前駆細胞→血液細胞の順で分化が進行すると考えられる。そこで効率的な血球誘導を行うため、研究は①中胚葉・血管血液前駆細胞の効率的な誘導、②中胚葉・血管血液前駆細胞から血液細胞への効率的な誘導のそれぞれについて、培養環境、培養条件などを多面的に検討した。

（本研究における倫理面への配慮）

本研究は全能性幹細胞であるヒトES細胞を用いるものであり、ES細胞は万一ヒト胚に戻された場

合には個体発生も理論上可能であるため、研究を行う場合はその内容について厳しい倫理審査を経ることが義務づけられている。本研究は所定の手続き・審査を経て、東京大学および文部科学大臣の承認を受けている。そして研究にあたっては、実験を許可された者がガイドラインに従った厳しい管理の下でES細胞を扱い、ヒトES細胞研究に要求される高度な倫理意識を保ちながら適切な研究が行われるよう配慮した。

C：研究結果

KhES-3細胞の培養と保存：無血清条件下、マウス胎児線維芽細胞上でKhES-3細胞を培養し、形態（図1）および細胞表面抗原SSEA1, SSEA3, SSEA4, TRA-1-60の発現から未分化性が維持されていることを確認しつつ増殖させた。増殖させたKhES-3細胞を十分に凍結したのち、造血細胞への分化培養を開始した。

KhES-3細胞から胚様体(EB)形成：デイスパーゼを用いて未分化KhES-3細胞（図1）を剥離し、24時間程度無血清培地中で培養しEBを形成させた。（図2）

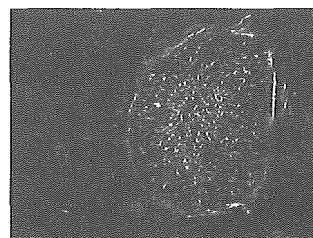


図1 未分化ヒトES細胞（KhES-3）

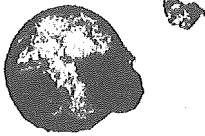


図2 ES細胞より形成された胚様体 (EB)

翌日培地交換を行い幹細胞因子(SCF), トロンボポエチン(TPO), Flt-3リガンド(FL), インターロイキン6-インターロイキン6受容体キメラタンパク質 (F P6)、インターロイキン3 (IL-3)、骨形成タンパク質4 (BMP4)を添加した培地中で胚様体を培養し中胚葉系への細胞分化を誘導した。10日後あるいは18日後、EBに酵素処理を行って単一細胞化し、フローサイトメーターでCD31, CD144陽性細胞を分取、これをOP9ストローマ細胞株上で培養したところ、造血細胞様のコロニーが観察された。コロニーの一部は敷石様を呈しており、未分化な造血細胞が誘導されていることが示唆された。(図3)

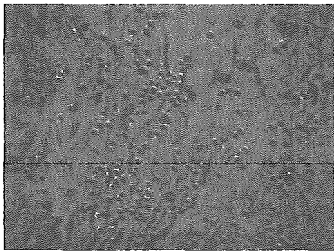


図3 KhES-3細胞由来EB形成細胞からOP9細胞との共培養を経て誘導された未分化造血細胞

#### D：考察

京都大学で樹立されたヒト胚性幹細胞KhES-3から造血細胞が誘導され得ることをはじめて示した。今後さらにこれらの細胞の性状を解析する必要がある。KhES-3細胞は、知的財産権などの問題で同時にわれわれが米国WiCell研究所から供与を受けているヒトES細胞であるH9などと比べ有利な点が多い。産生された造血細胞の性状解析を進める。

#### E：結論

京都大学で樹立されたヒトES細胞から未熟造血細胞が誘導された。性状解析を進めている。

#### F：健康危険情報

特に認められない。

#### G：研究発表

1. 論文発表  
該当なし
2. 学会発表  
該当なし

#### H：知的財産権の出願・登録情報

該当なし

分担研究報告書

好中球の体外産生に関する研究

分担研究者

黒川 峰夫 東京大学大学院医学系研究科 血液・腫瘍病態学 教授  
熊野 恵城 東京大学大学院医学系研究科 血液・腫瘍病態学 研究拠点形成 特任研究員

研究要旨：

マウス骨髄CD34陽性細胞1個あたり、90%以上の純度で約1700倍個の成熟好中球を得た。これらの好中球について昨年引き続き機能解析を行い、貪食能に加え十分な殺菌能を有することを確認した。一方、京都大学で樹立されたヒト胚性幹細胞KhES-3から、好中球が誘導されることを確認した。

A：研究目的

昨年度はマウスCD34陽性細胞1個あたり1,700個の好中球を高純度で体外産生させる培養法開発を報告した。このようにして体外で作成した好中球につき、昨年度に引き続き機能解析を行い、体外産生好中球の性状を一層明らかにする。また、京都大学で樹立されたヒト胚性幹細胞KhES-3から好中球誘導が可能かについて検討する。

B：研究方法

若年マウス骨髄より抗CD34抗体磁気ビーズを利用してCD34陽性細胞を分離し、幹細胞因子(SCF)、トロンボポエチン(TPO)、インターロイキン6 (IL-6)を加えて培養を開始した。3日後に初期分化サイトカインとしてFlt3リガンド(FL)、インターロイキン3 IL-3、5日後に後期分化サイトカインとして顆粒球コロニー刺激因子(G-CSF)を加え10日目に細胞を回収して活性酸素産生能を解析した。

ヒトES細胞からの好中球誘導にあたっては、ヒトES細胞から胚様体(Embryoid Body; EB)を形成させこれをSCF, TPO, FL, FP6, 血管内皮細胞増殖因子(VEGF), 骨形成タンパク質4 (BMP4)を添加した培養液中で20日間培養した。その後、EB内で形成されるCD45陽性あるいはCD34陽性細胞を分取し、好中球分化誘導培地中でさらに分化誘導を行った。

(本研究における倫理面への配慮)

本研究はマウスを扱った動物実験を行う。動物実

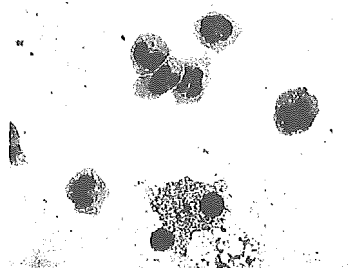
験については「東京大学動物実験実施マニュアル」に従った研究を行い、適切な動物実験が行われるよう配慮した。

また、ヒトES細胞研究については、その内容に関して東京大学および文部科学省の厳正な審査を経た上で大臣承認を得ている。そして研究にあたっては、実験を許可された者がガイドラインに従った厳しい管理の下でES細胞を扱い、ヒトES細胞研究に要求される高度な倫理意識を保ちながら適切な研究が行われるよう配慮した。

C：研究結果

マウス骨髄CD34陽性細胞から体外で産生させた好中球は、腹膜炎誘発マウス腹腔に集積した好中球に比べ同等以上の活性酸素産生能を有していた。

KhES-3細胞からは、容易にEBが形成された。24時間後から、SCF, TPO, FL, FP6, 血管内皮細胞増殖因子(VEGF), 骨形成タンパク質4 (BMP4)を加え20日培養後、CD45陽性あるいはCD34陽性を好中球誘導培地で培養したところ、成熟好中球を多数含む血球が誘導された。(図)



ヒトES細胞から誘導された好中球。高頻度で成熟好中球が認められる。

D：考察

マウス骨髄由来造血前駆細胞から、十分な機能を持つ好中球を体外で産生し得ることが示された。今後ヒト造血前駆細胞を利用した研究を進める必要がある。

ヒトES細胞からの好中球産生が確認された。しかし、単球系細胞の混入が依然認められるため、今後は好中球の純度向上に向けて培養条件を更に改善していく必要がある。また、十分な純度で多数の好中球を得て機能を解析する必要がある。

E：結論

マウス造血前駆細胞から十分な殺菌能を有する好中球が体外で産生された。一方、ヒトES細胞から

の好中球産生を確認した。純度・効率を上げる方法を見出し、機能解析を行う必要がある。

F：健康危険情報

特に認められない。

G：研究発表

1. 論文発表
  2. 学会発表
- 該当なし

H：知的財産権の出願・登録情報

該当なし



分担研究報告書

ヒト造血幹細胞の血球産生能・分化能の生体内評価法の開発

分担研究者

湯尾 明 国立国際医療センター研究所部長

研究要旨：

胚性幹細胞から造血幹細胞を生産したり更にここから成熟血球を分化誘導する際に、もしくは、体性幹細胞としての造血幹細胞機能を評価したり体性幹細胞から分化させる場合に、生体内での評価の系（in vivoの系）が極めて重要である。この問題の解決をはかるために、免疫不全マウス（(NOD/SCID)/ $\gamma c^{null}$  (NOG)マウス）体内でのヒト好中球の産生（分化誘導）の系の確立を試みた。NOGマウスに対するヒト臍帯静脈血CD34陽性細胞の移植実験を行ったところ、ヒト血球尾静注後6-10週間後には骨髄と脾臓において90%前後の細胞がヒト血液細胞抗原CD45陽性となり、極めて良好な生着をえることが出来た。ここでさらに空気嚢炎を作成して遊走してくる好中球の中にCD45陽性のヒト好中球が存在するか否か検討したところ、空気嚢から回収した細胞の中に10%前後のヒトCD45陽性のヒト好中球と思われる細胞を検出した。さらに、これを確認するために、ヒト好中球特異的抗原CD10, CD66bの組み合わせでの2カラーフローサイトメトリー解析を行い、約2-4%のヒト好中球の存在を確認した。以上から、NOGマウスを用いた移植実験系によって、ヒト造血細胞の好中球への機能分化を正しく評価できる系を確立した。

A：研究目的

胚性幹細胞から造血幹細胞を生産したり、さらにそこから成熟血球を分化誘導する際に、もしくは、体性幹細胞としての造血幹細胞機能を評価したりそこから分化させる場合に、生体内での評価の系（in vivoの系）が極めて重要である。とりわけ、胚性幹細胞から由来する造血幹細胞が本当に体性幹細胞に匹敵する造血能を有するか否かの評価には、このようなin vivoの系が必須である。しかしながら、現時点では胚性幹細胞から誘導した未熟な血液細胞の生体内での増殖・分化は極めて困難である。

分担研究者らは従来より成熟好中球の機能に関して詳細な研究行ってきており、将来的には、幹細胞からの好中球産生を目指しているが、これに関するin vivoの系も開発されていない。本年度は免疫不全マウス体内でのヒト好中球の産生（分化誘導）の系の確立を試みた。

B：研究方法

ヒト造血幹細胞は、購入した臍帯血CD34陽性細胞を用いた。ヒト細胞を移植する免疫不全マウスは、実験動物中央研究所から購入した(NOD/SCID)/ $\gamma c^{null}$  (NOG)マウスを用いた。マ

ウス体内のヒト血液細胞の検出と評価は、ヒト血液細胞もしくはヒト好中球特異的抗原（CD34, CD45, CD10, CD66b）に対するモノクローナル抗体を用いてフローサイトメトリーにより解析した。一方、マウス好中球はマウス顆粒球特異抗原Gr-1に対するモノクローナル抗体で評価した。生体内での遊走能（走化性）の評価は、ザイモザン刺激による空気嚢炎モデルによった。好中球活性酸素産生能は、スーパーオキシド産生をシトクロムC還元法により測定した。

C：研究結果

まず、NOGマウスにおいても通常のマウスと同様の空気嚢炎が誘導できるか否かを検討した。その結果、空気嚢から回収された白血球のほとんどは形態上はマウス好中球でしかもマウス好中球抗原Gr-1が94%陽性であった。回収された好中球数は正常マウスの場合より少なかったが活性酸素産生能は正常であった。

次に、NOGマウスに対するヒト臍帯静脈血CD34陽性細胞の移植実験を行った。ヒト血球を尾静注後6-10週間後には骨髄と脾臓において90%前後の細胞がヒト血液細胞抗原CD45陽性となり、極めて良好な生着をえることが出来た。

このような状態において空気嚢炎を作成して遊走してくる好中球の中にCD45陽性のヒト好中球が存在するか否か検討した。空気嚢から回収した細胞の90%はGr-1陽性マウス好中球であったが、ヒト血球移植マウスにおいてのみ、10%前後のヒトCD45陽性のヒト好中球と思われる細胞を検出した。

最後に、ヒト血球移植マウス空気嚢炎モデルにおける好中球の中にヒト好中球が間違いなく存在することを確認するために、ヒト好中球特異的抗原CD10, CD66bの組み合わせでの2カラーフローサイトメトリー解析を行い、約2-4%のヒト好中球の存在を確認した。

#### D：考察

NOGマウスを用いた移植実験を行い、このマウスがヒト造血幹細胞の生体内における増殖と分化を評価する極めて優れた動物モデルであることが明らかになった。

さらに今回の空気嚢炎モデルを組み合わせた検討によって、生着して分化したヒト血液細胞の中に好中球も含まれることが明らかになったのみならず、マウス体内でできあがったヒト好中球が炎症巣にむかって走化性を発揮することができることも証明できた。

以上のようなモデルは、今後、霊長類（サルもしくはヒト）の胚性幹細胞から誘導された造血細胞の成体内分可能の評価系として極めて有

用と考えられる。現時点では、霊長類胚性幹細胞から分化誘導した未分化造血細胞がマウス体内で有効に増殖、分化して十分な数の成熟血球になったという報告は皆無で、この分野への応用が望まれる。また、今回の系を更に改善して、移植の際に尾静脈注入ではなく生着効率の高い骨髓内注入を行う予定である。

#### E：結論

NOGマウスを用いた移植実験系によって、ヒト造血細胞の好中球への機能分化を正しく評価できる系を確立した。

#### F：健康危険情報

なし

#### G：研究発表

Saeki K, Yasugi E, Okuma E, Breit SN, Nakamura M, Toda T, Kaburagi Y, Yuo A. Proteomic analysis on insulin signaling in human hematopoietic cells: identification of CLIC1 and SR p20 as novel downstream effectors of insulin. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 289:E419-E428, 2005.

#### H：知的財産権の出願・登録状況

なし

分担研究報告書

培養細胞の輸血製剤化の検討に関する研究

分担研究者

高橋孝喜 東京大学医学部附属病院 輸血部 教授

研究要旨：

近年、医療用治療器具や医療用インプラント機器などが急速的に開発され普及している。しかしその一方で材料表面における血栓生成を抑制するヘパリンなどの生物由来の抗凝固剤投与による重篤な副作用や死亡事故が報告されている。また折しもBSE問題や人畜共通の感染症の問題により、生物由来の薬剤による補助を必要としない抗血栓性材料の開発が求められている。人工血小板または、分化誘導によって得られた血小板、白血球等血液細胞の培養保存に関しても、これらの活性化を抑制させる医療材料の開発が要求される。

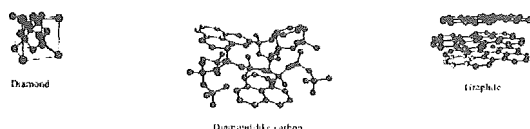
生体適合性に優れる炭素化合物 ダイヤモンドライクカーボン（DLC）膜はその形成を抑制することが報告されている。本研究ではDLC膜、およびこれへのフッ素添加によって製造されるフッ素添加DLC（以下F-DLC）膜を作製した。本研究において昨年度は静的環境における血小板接着抑制、および活性化抑制を示した。本年度はさらに、動的環境下における血小板付着の抑制効果を検証し、これらが共に抑制されることを示した。

A：研究目的

ダイヤモンドライクカーボン（DLC）膜、F-DLC膜の動的環境における血小板付着抑制効果の検証

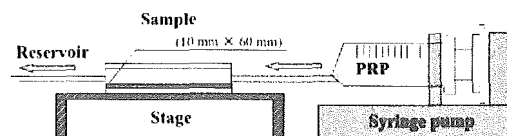
B：研究方法

成膜は高周波プラズマ化学蒸着法により、フロン116 (C<sub>2</sub>F<sub>6</sub>) およびアセチレン (C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>) を原料ガスとすることで、フッ素添加量の異なる種々のF-DLC膜を作製した。成膜条件は全て高周波出力200 W、成膜真空度13 Paとし、膜厚が約50 nmとなるようにプラズマ照射時間を制御した。成膜基板およびコントロールには、ポリカーボネイト（以下PC）を用いた。



<Fig1> ダイヤモンド・ダイヤモンドライクカーボン・グラファイトの模式図

動的環境における抗血栓性の評価：健常人全血を作動流体とし、各種せん断応力下（0 s<sup>-1</sup>、3 0 0 s<sup>-1</sup>、1 0 0 0 s<sup>-1</sup>）における血小板の付着量および活性化度を測定評価した。自作システムモデル図を示す。



<Fig2> 自製の平行平板型フローモデルの写真および概略図

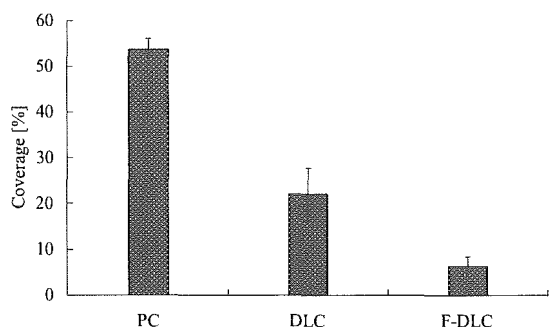
（倫理面への配慮）

健常人からの採血にあたり、本人の同意を取得した。採血実施前には健康状態につき問診、診察を行った。

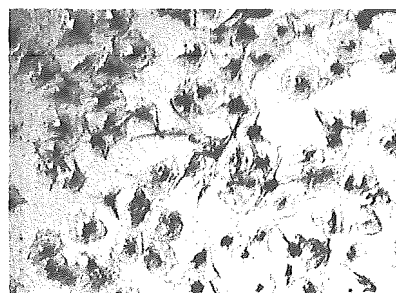
### C：研究結果

#### 動的環境下に置ける血小板付着実験

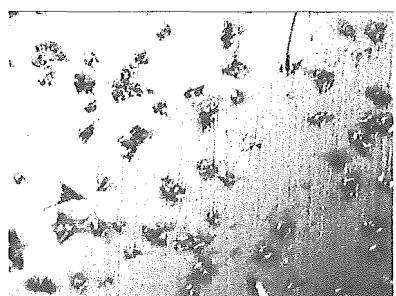
静的環境においてはPC>DLC>F-DLCの順で付着血小板の付着量および活性化が抑制されたことを報告した。今回、動的評価（静脈系、動脈系を再現したずり速度を使用）においても同様の傾向を示し、DLC膜により血小板付着が抑制されF-DLC膜によりさらに付着が抑制された。下記、せん断応力 $300\text{ s}^{-1}$ における、基板単位面積あたりの血小板付着面積（%）および付着数の代表図である。



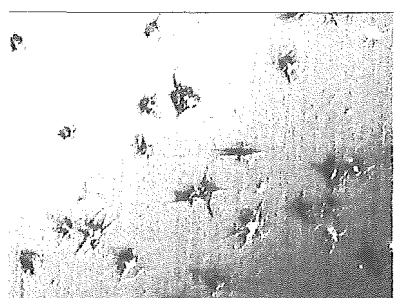
<Fig3> せん断応力下 ( $300\text{ s}^{-1}$ ) における血小板付着面積



(a) PC



(b) DLC



(c) F-DLC

<Fig4> せん断応力下 ( $300\text{ s}^{-1}$ ) におけるF-DLC膜の血小板付着抑制効果

### D：考察

DLC膜にフッ素を添加することにより、膜表面にフッ素が局在し、撥水性が向上した。せん断応力下においても静的環境と同様、F-DLC膜の有意な抗血栓性が示された。本研究の総括として、F-DLC膜の *in vitro* の動的環境下における抗血栓性はDLC膜のそれよりも優れていた。これはフッ素添加効果により、膜の表面エネルギーが低下したことが原因と考えられる。

本研究の総括として、F-DLC膜の抗血栓性は、静的あるいは動的体外環境下 (*in-vitro*) のいずれにおいてもDLC膜のそれよりも優れており、血液接触性の医療器具あるいは人工臓器や血管内埋め込みデバイスの表面コーティングとして有望と考えられ、その実用化が望まれる。

### E：結論

DLC膜にフッ素を添加することにより、膜表面にフッ素が局在し、撥水性が向上した。撥水性の向上のみならず、アルブミン・フィブリノーゲン吸着比が増大していたことから (data not shown)、フッ素添加による物理的性質が、生物学的な変化に直接的な影響を及ぼしていると肝がえらる。また、静的環境のみならず、せん断応力下においても、ポリカーボネイトと比較してDLCおよびF-DLC膜の有意な抗血栓性が示された。

### F：研究発表

#### 1. 論文発表

- Hasebe T, Matsuoka Y, Kadama H, Saito T, Yohena S, Kamijo A, Shiraga N, Higuchi M, Kuribayashi S, Takahashi K, Suzuki T. Lubrication performance of diamond-like carbon and fluorinated diamond-like carbon coatings for intravascular guidewires. *Diamond and Related Materials*, 15:129-132, 2006.
- Hasebe T, Kamijo A, Hotta A, Takahashi K, Suzuki T. Diamond-like carbon and fluorinated diamond-like carbon films for cardiovascular medical devices. *Journal of The Surface Finishing Society of Japan*, 56:897-905, 2005.
- Saito T\*, Hasebe T\*, Yohena S, Matsuoka Y, Kamijo A, Takahashi K, Suzuki T. Antithrombogenicity of fluorinated diamond-like carbon films. *Diamond and Related Materials*, 14: 1116-1119, 2005.