

厚生労働科学研究費補助金
医薬品・医療機器等レギュ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16年度～18年度

総合研究報告書

主任研究者 千葉 滋

平成19年（2007）3月

目次

I. 総合研究報告

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. 研究成果の刊行に関する一覧表 9

III. 研究成果の刊行物・別刷 17

I . 総合研究報告

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

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：

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、感染の危険性など克服の容易ならざる問題を残している。本研究ではこうした現状に対し、ヒト臍帯血や骨髄に存在する体性造血幹細胞、およびヒト胚性幹(ES)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。

具体的なテーマとして、ヒト臍帯血造血幹細胞の体外増幅、および体性造血幹細胞あるいはES細胞から機能的好中球の産生を目標にかかげ、さらに抗血栓性の高い生体医療用材料の開発および血液バンクにおける臍帯血の研究用利用支援システムの運営についても検討を加えた。

ヒト造血幹細胞の評価には、主にNOD/SCIDマウスにおける長期造血再構築細胞(SICD-repopulating cell, SRC)を、一部NOGマウスにおける長期造血再構築細胞とその分化能を用いた。SRCの数は限界希釈法により評価した。また、ヒト臍帯血からの造血幹細胞収集法を検討した。CD133陽性細胞選択法を用いることで、CD34陽性細胞選択法に比べ約5倍数のSRC収集が可能であった。ヒト臍帯血CD133陽性細胞を培養する際、可溶性NotchリガンドであるDelta1-Fcを培養皿にコーティングし、各種サイトカインとともに無血清・無フィーダーで化学組成の明らかな培養液を用いることにより、SRCを約6倍に増幅することに成功した。増幅した細胞は、NOGマウスに移植することによりT細胞を含む全ての系統の血球に分化可能であった。臨床応用可能な方法でSRCが6倍に増幅されており、この方法を取り入れた臍帯血移植の臨床試験を行うべきと考えられる。

ヒト胚性幹(ES)細胞(KhES3)を培養し、高純度の好中球を得ることに成功した。KhES3細胞由来好中球は、組織染色で好中球特有の染色像を示し、活性酸素産生能、酵母貪食能・殺菌能、遊走能などの機能アッセイにおいても、末梢血から分離した好中球と比べ遜色ない結果を示した。ヒトES細胞由来好中球の機能解析はこれまで報告がなく、今後の臨床応用にとって重要なステップである。

血液接触性材料には高い抗血栓性が求められるが、これは人工血液についても同様である。生体適合性に優れる炭素[カーボン]および水素の非結晶化合物の一つであるダイヤモンドライクカーボン(DLC)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(F-DLC)膜の研究を進めた。F-DLC膜により、素材への血小板および白血球の接着が抑制された。体内・外に用いる血液接触用医療材料への応用が期待される。

ヒト臍帯血の供給原は、臍帯血バンクで臨床に用いないことが決定されたユニットである。臍帯血バンクでは、提供され調製保存施設に受け入れられる臍帯血のうち細胞数の多い50-60%のみが移植用として調製保存される。臍帯血の有効活用のために、移植のための細胞数基準に至らない場合には研究用に活用すべく研究者とのネットワークを構築し、全体の約30%のユニットが研究用に譲渡され有効活用された。

分担研究者

- 小川 誠司
東京大学医学部附属病院
21世紀COE 特任助教授
- 黒川 峰夫

東京大学医学部附属病院
血液・腫瘍内科 教授

- 神田 善伸
東京大学医学部附属病院
血液・腫瘍内科 講師

- 鈴木 隆浩
東京大学医学部附属病院
無菌治療部 助手
- 熊野 恵城
東京大学医学部附属病院
無菌治療部 CREST研究員
- 増田 茂夫
東京大学医学部附属病院
血液・腫瘍内科 医員
- 原口 京子
東京大学医学部附属病院
無菌治療部 リサーチレジデント
- 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
東京大学医学部附属病院
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 製剤部長

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、感染の危険性など克服の容易ならざる問題を残している。本研究ではこうした現状に対し、ヒト臍帯血や骨髄に存在する体性造血幹細胞、およびヒト胚性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。具体的なテーマとして、ヒト臍帯血造血幹細胞の体外増幅、および体性造血幹細胞あるいはES細胞から機能的好中球の産生を目標にかかげた。前者は、臍帯血移植の適応範囲や安全性を高めることに応用し、また増幅した幹細胞を材料としてより大量の血球産生を可能にする技術開発に利用する。後者は、本来需要がありながら現行体制では困難である好中球輸血を可能にする技術開発に利用する。さらに抗血栓性の高い生体医療用材料の開発および血液バンクにおける臍帯血の研究用利用支援システムの運営についても検討を加える。

B：研究方法

1) 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、CD133磁気ビーズまたはCD34磁気ビーズを用いてCD133陽性細胞または

CD34陽性細胞を分離し、限界希釈後、NOD/SCIDマウス(NODマウス)に移植した。10週以上経過後にレシピエントマウス骨髄と末梢血中のヒト造血細胞を評価し、ヒト臍帯血から造血幹細胞を選択する方法として上記いずれの方法が優れているか直接比較した。

造血幹細胞の体外増幅法の検討に際し、当初から異種動物血清、ストローマ細胞を排除した培養系で研究を進めた。また、細胞を未分化のまま増幅させるために、可溶性Notchリガンドとしてヒト免疫グロブリンFc部分とキメラを形成した組換え型Delta1またはJagged1蛋白(Delta1-FcまたはJagged1-Fc)またはコントロールFcタンパク質を培養皿にコーティングした。いずれかの培養皿を用い、CD133陽性磁気ビーズ法で選択した細胞をstem cell factor (SCF)、thrombopoietin (TPO)、flt-3 ligand (FL)を含む無血清培地中で培養した。IL-6またはIL-6/可溶性IL-6受容体キメラ蛋白(FP6)およびIL-3の有無による修飾も検討した。1～3週間培養を行い、その間の混合コロニー形成未分化造血細胞(CFU-Mix)数の変化を観察し、効率的にCFU-Mixを増幅する培養条件を選択した。代表的な方法で培養した細胞をNOD/SCIDマウスに移植し、移植されたヒト細胞の分化能を検定すると共に、含まれる造血幹細胞数(SCID Repopulating Cell: SRC)を定量した。

さらに、もっとも効率よくSRCを増幅した方法で培養した細胞をNOD/SCID/ γ^c ^{null}マウス(NOGマウス)に移植し、10週以上経過後に増幅された造血幹細胞の詳細な分化能力を検討した。

また、ハイドロキシアパタイトビーズにヒトDelta1-Fcキメラタンパク質をコーティングしたD1-HAビーズを作製し、これを用いた培養も試みた。2) 好中球産生法開発のため、マウス骨髄CD34陽性細胞、およびヒトES細胞を初期材料として検討を行った。マウスCD34陽性細胞の分取は磁気ビーズ法で行い、CSF、TPO、IL-6、FL、IL-3、顆粒球コロニー刺激因子(G-CSF)を種々の組み合わせ、タイミングで加え培養した。産生された好中球について活性酸素産生能、貪食能を評価した。また、産生された好中球をマウス尾静脈より投与し、急性期副反応を観察した。

ヒトES細胞は、京都大学で樹立されたKhES-3細胞を用いた。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18日間培養し、胚様体(embryoid body, EB)を形成させた。EB形成細胞をシングルセルにし、マクロファージコロニー刺激因子(M-CSF)欠損マウスから樹立したストローマ細胞であるOP-9との共培養を、SCF、TPO、FL、FP6、IL-3の存在下で7日間行った。その後サイトカインをG-CSFに変更して約

10日間培養し、この間の好中球への分化の経時的変化と得られる好中球数を評価した。さらに、ピーク時に得られた好中球を用い、ペルオキシダーゼ染色、アルカリフォスファターゼ染色、NBT還元能、酵母貪食・殺菌能、遊走能を観察することにより、機能性を評価した。

3) 血液接触性機器には、より生体適合性に優れた抗血栓性素材の開発が求められる。幹細胞から誘導された血球が使用されるまで正常機能を保持し続けるためにも、同様の素材開発が求められる。抗血栓性が期待されているダイヤモンドライクカーボン(DLC)およびこのフッ素添加物であるフッ化ダイヤモンドライクカーボン(F-DLC)でポリカーボネイト基盤上に膜を作製し、基盤として用いた。静的状態および動的状态における血小板、白血球、各種血漿蛋白質の付着についてDLCおよびF-DLCの影響を検討した。

4) 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に移植医療に貢献できる研究用に使用することも含まれている。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確認を得ている。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) ヒト造血幹細胞の效果的増幅に関する研究では、CD34陽性細胞の選択分取よりもCD133陽性細胞の選択分取の方が、約5倍多くSCID-repopulating cells (SRC)が得られた。可溶型NotchリガンドであるヒトDelta1-Fcキメラタンパク質を培養皿にコーティングし、SCF、TPO、FLFP6、IL-3を含む無血清・無フィーダー細胞の条件でヒト臍帯血CD133陽性

細胞を培養することにより、CFU-mixを約200倍に、NOD/SCIDマウスで長期造血再構築可能なSRCを約6倍に増幅することに成功した。D1-HAビーズを混合したヒト臍帯血由来CD133陽性細胞の培養では、未熟細胞の割合が増加した。しかし、総細胞数は培養開始時の5倍までしか増えず、CFU-mix細胞の絶対数は培養開始前とほぼ同じであり、培養皿へのDelta1-Fcコーティングの方が優れていた。

2) マウス骨髓CD34陽性細胞からの好中球産生では、SCF、TPO、IL-3、FLを加えて培養を開始し、3日目にIL-3を、さらに5日目にG-CSFを加える培養法が、最も効率よく(初期細胞数の約1700倍、純度90%以上)好中球を産生させた。NBT還元能、ラテックスビーズ貪食能は、骨髓から採取した好中球と比べ同等ないしより良好であった。

ヒトES細胞からの好中球産生では、好中球の絶対数は、EB形成細胞の培養開始から11-14日目にピークとなった。好中球比率は18日目に80%以上に達した。これらは、酵素染色、NBT還元能、酵母貪食・殺菌能、遊走能のいずれの項目においても、正常人末梢血から調整した好中球とほぼ同等であった。すなわち、ヒトES細胞からはじめて機能的な好中球の産生に成功した。

3) DLC膜およびF-DLC膜ともにポリカーボネイト基盤への血小板および好中球の付着を阻害した。阻害効果はF-DLC膜の方がより大きかった。この抗細胞接着性作用は、F-DLCがフィブリノーゲン吸着を抑制するためであることを明らかにした。動的环境化でもF-DLCがもっとも血小板付着を阻害した。

4) 受け入れ臍帯血中移植目的に保存されたのは2004年度55.2%、2005年度60.7%、2006年度50.7%であった。移植用保存にいたらず、かつ譲渡可能と判定される臍帯血が移植用保存されない主な理由は細胞数不足であった。研究者への譲渡時点では臍帯血は採取後およそ24時間内外であった。受入臍帯血単位中、約30%が研究用に譲渡された。

D：考察

ヒト臍帯血から造血幹細胞を効率よく回収するには、CD34陽性細胞選択分取よりもCD133陽性細胞選択分取を用いるべきであることが示唆された。

Delta1-Fcを培養皿にコーティングして培養した場合、効率よくCFU-mixやSRCが増幅された。SRCの6倍増幅は、血清やフィーダー細胞を用いない方法で、直ちに臨床応用可能な方法で達成されたものである。今後臨床試験に向け調整を行う。

HAは骨の主成分であり、造血幹細胞の存在するニッチが骨表面にあることが明らかにされつつある。そこで、HAを用い、ここに造血幹細胞増幅効果のあるDelta1-Fcをコーティングすることにより、造血幹細胞に対してニッチと類似の環境を与える

ことができ、さらに造血幹細胞増幅効率が上がると期待した。しかし、少なくとも本研究期間中に取り組んだ方法では、CFU-mixの増幅が得られず、SRCが効率よく増幅されるという結果は得られないと考えられた。

ヒトES細胞から、はじめて機能的に評価可能な純度で好中球を産生させることに成功し、また実際に機能評価を行って、健康人末梢血好中球と比べて遜色ない機能を有することを示した。今後、より詳細に機能や形態について追求する必要がある。また、免疫不全マウスなど小動物に投与し、炎症巣への集積や感染防御能について検証することができれば、霊長類を含む大型動物での安全性や感染防御機能の検討を行う段階に入る。ただし、現在の方法と培養規模では、 10^5-10^6 の好中球数しか得ることができないため、より大量の好中球を得る方法を確立する必要がある。

DLC膜にフッ素を添加することにより、膜表面にフッ素の作用によって血小板のみならず、白血球の接着の抑制することが示された。これは、ポリカーボネイト基盤の撥水性向上とともに、基盤に吸着するアルブミン/フィブリノーゲン吸着比が上昇することが一因と考えられた。今後、血液接触性の医療器具さらには、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も有望と考えられる。

臍帯血が研究用に譲渡できるかは予測が困難である。研究者によっては研究曜日が限られており、指定曜日および前回譲渡からの時間経過を勘案して臍帯血バンクから研究者宛に連絡した。臍帯血バンク運営効率化の為に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ており、臍帯血採取に協力頂いても保存となる可能性が下がりつつある。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。臍帯血バンクでも各種調製保存手技のバリテーションのために一部が使用されるが、更に研究にも協力し、よって医療に貢献すべきと考える。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。

E：結論

(1) ヒト臍帯血からの造血幹細胞回収には、CD34陽性細胞分取よりもCD133陽性細胞分取の方が優れている。ヒト臍帯血CD133陽性細胞を培養し造血幹細胞の体外増幅を図るには、Delta1-Fcを培養皿にコーティングする方法がもっとも優れている。ただし、骨成分であるハイドロキシアパタイトを利用する培養法は、今後さらに検討を加える必要がある。

(2) 京都大学で樹立されたヒトES細胞から高純度の好中球を産生した。機能解析の結果、健康人末梢血好中球と比べ全く遜色ない機能を有することが確認された。臨床応用への方向性が示された。

(3) DLC膜にフッ素を添加することにより、血小板だけでなく、好中球の基盤への接着も抑制された。これは、撥水性の向上とアルブミン/フィブリノーゲン吸着比の増大による考えられた。

(4) 臍帯血バンクの受入臍帯血のうち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。全受入数の約30%、保存されないものの約60%を研究者に譲渡した。

F：研究発表

論文発表

1. Yanada M, Emi N, Naoe T, Sakamaki H, Iseki T, Hirabayashi N, Karasuno T, Chiba S, Atsuta Y, Hamajima N, Takahashi S, Kato S. Allogeneic myeloablative transplantation for patients aged 50 years and over. *Bone Marrow Transplant* 34(1):29-35, 2004
2. Morishima Y, Ogura M, Nishimura M, Yazaki F, Bessho M, Mizoguchi H, Chiba S, Hirai H, Tauchi T, Urabe A, Takahashi M, Ohnishi K, Yokozawa T, Emi N, Hirano M, Shimazaki C, Nakao S, Kawai Y, Fujimoto M, Taguchi H, Jinnai I, Ohno R. Efficacy and safety of imatinib mesylate for patients in the first chronic phase of chronic myeloid leukemia: results of a Japanese phase II clinical study. *Int J Hematol* 80(3):261-266, 2004
3. Endo-Matsubara M, Ogawa S, Sasaki K, Takahashi T, Chiba S, Hirai H. Immature granulocyte fraction in the peripheral blood is a practical indicator for mobilization of CD34(+) cells. *Am J Hematol* 77(3):223-228, 2004
4. Yamaguchi Y, Kurokawa M, Imai Y, Izutsu K, Asai T, Ichikawa M, Yamamoto G, Nitta E, Yamagata T, Sasaki K, Mitani K, Ogawa S, Chiba S, Hirai H. AML1 is functionally regulated through p300-mediated acetylation on specific lysine residues. *J Biol Chem* 279(15):15630-15638, 2004
5. Sakata-Yanagimoto M, Kanda Y, Nakagawa M, Asano Y, Kandabashi K, Izutsu K, Imai Y, Hangaishi A, Kurokawa M, Tsujino S, Ogawa S, Aoki K, Chiba S, Motokura T, Hirai H. Predictors for severe cardiac complications after hematopoietic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant* 33(10):1043-1047, 2004
6. Ogawa N, Kanda Y, Matsubara M, Asano Y, Nakagawa M, Sakata-Yanagimoto M, Kandabashi K, Izutsu K, Imai Y, Hangaishi A, Kurokawa M, Tsujino S, Ogawa S, Aoki K, Chiba S, Motokura T, Hirai H.

- Increased incidence of acute graft-versus-host disease with the continuous infusion of cyclosporine A compared to twice-daily infusion. *Bone Marrow Transplant* 33(5):549-52, 2004
7. Kunisato A, Chiba S, Saito T, Kumano K, Nakagami-Yamaguchi E, Yamaguchi T, Hirai H. Stem cell leukemia protein directs hematopoietic stem cell fate. *Blood* 103(9):3336-3341, 2004
 8. Kojima R, Kami M, Nannya Y, Kusumi E, Sakai M, Tanaka Y, Kanda Y, Mori S, Chiba S, Miyakoshi S, Tajima K, Hirai H, Taniguchi S, Sakamaki H, Takaue Y. Incidence of invasive aspergillosis after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation with a reduced-intensity regimen compared with transplantation with a conventional regimen. *Biol Blood Marrow Transplant* 10(9):645-652, 2004
 9. Kawazu M, Kanda Y, Nannya Y, Aoki K, Kurokawa M, Chiba S, Motokura T, Hirai H, Ogawa S. Prospective comparison of the diagnostic potential of real-time PCR, double-sandwich enzyme-linked immunosorbent assay for galactomannan, and a (1-->3)-beta-D-glucan test in weekly screening for invasive aspergillosis in patients with hematological disorders. *J Clin Microbiol* 42(6):2733-2741, 2004
 10. Ichikawa M, Asai T, Saito T, Yamamoto G, Seo S, Yamazaki I, Yamagata T, Mitani K, Chiba S, Ogawa S, Kurokawa M, Hirai H. AML-1 is required for megakaryocytic maturation and lymphocytic differentiation, but not for maintenance of hematopoietic stem cells in adult hematopoiesis. *Nature Med* 10(3):299-304, 2004
 11. Haraguchi K, Takahashi T, Hiruma K, Kanda Y, Tanaka Y, Ogawa S, Chiba S, Miura O, Sakamaki H, Hirai H. Recovery of Valpha24(+) NKT cells after hematopoietic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant* 34(7):595-602, 2004
 12. Goyama S, Yamaguchi Y, Imai Y, Kawazu M, Nakagawa M, Asai T, Kumano K, Mitani K, Ogawa S, Chiba S, Kurokawa M, Hirai H. The transcriptionally active form of AML1 is required for hematopoietic rescue of the AML1-deficient embryonic para-aortic splanchnopleural (P-Sp) region. *Blood* 104(12):3558-3564, 2004
 13. Hosoya N, Qiao Y, Hangaishi A, Wang L, Nannya Y, Sanada M, Kurokawa M, Chiba S, Hirai H, Ogawa S. Identification of a SRC-like tyrosine kinase gene, FRK, fused with ETV6 in a patient with acute myelogenous leukemia carrying a t(6;12)(q21;p13) translocation. *Genes Chromosomes Cancer* 42(3):269-279, 2005
 14. Hori A, Kanda Y, Goyama S, Onishi Y, Komeno Y, Mitani K, Kishi Y, Ogawa S, Imataki O, Chiba S, Kojima R, Hamaki T, Sakiyama M, Kami M, Makimoto A, Tanosaki R, Takaue Y, Hirai H. A Prospective Trial to Evaluate the Safety and Efficacy of Pravastatin for the Treatment of Refractory Chronic Graft-Versus-Host Disease. *Transplantation* 79:372-374, 2005
 15. 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 β expression, and CD4/8 double-negative to CD4/8 double-positive transition in thymocyte development. *J Immunol* 174:3526-3533, 2005
 16. 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
 17. 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
 18. 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- β /Smad-mediated cell growth suppression via sequestration of co-activator p300. *Cancer Science* 96:274-282, 2005
 19. 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
 20. 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
 21. 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
 22. 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
23. 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
 24. 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
 25. 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
 26. Nakagawa K, Kanda Y, Yamashita H, Hosoi Y, Oshima K, Ohtomo K, Ban N, Yamakawa S, Nakagawa S, Chiba S. Preservation of ovarian function by ovarian shielding when undergoing total body irradiation for hematopoietic stem cell transplantation: a report of two successful cases. *Bone Marrow Transplant.* 37:583-587, 2006
 27. Hosoya N, Sanada M, Nannya Y, Nakazaki K, Wang L, Hangaishi A, Kurokawa M, Chiba S, Ogawa S. Genomewide screening of DNA copy number changes in chronic myelogenous leukemia with the use of high-resolution array-based comparative genomic hybridization. *Genes Chromosomes Cancer* 45:482-494, 2006
 28. Asano-Mori Y, Kanda Y, Oshima K, Watanabe T, Shoda E, Motokura T, Kurokawa M, Chiba S. Pharmacokinetics of ganciclovir in haematopoietic stem cell transplantation recipients with or without renal impairment. *J Antimicrob Chemother* 57:1004-1007, 2006
 29. Yamashita H, Izutsu K, Nakamura N, Shiraishi K, Chiba S, Kurokawa M, Tago M, Igaki H, Ohtomo K, Nakagawa K. Treatment results of chemoradiation therapy for localized aggressive lymphomas: a retrospective 20-year study. *Ann Hematol* 85:523-529, 2006
 30. Haraguchi K, Takahashi T, Nakahara F, Matsumoto A, Kurokawa M, Ogawa S, Oda H, Hirai H, Chiba S. DC1d expression level in tumor cells is an important determinant for antitumor immunity by natural killer T cells. *Leuk Lymphoma* 47:2218-2223, 2006
 31. Suzuki T, Yokoyama Y, Kumano K, Takanashi M, Kozuma S, Takato T, Nakahata T, Nishikawa M, Sakano S, Kurokawa M, Ogawa S, Chiba S. Highly efficient *ex vivo* expansion of human hematopoietic stem cells using Delta1-Fc chimeric protein. *Stem Cells* 24:2456-2465, 2006
 32. Nakagawa M, Ichikawa M, Kumano K, Goyama S, Kawazu M, Asai T, Ogawa S, Kurokawa M, Chiba S. AML1/Runx1 rescues Notch1-null mutation-induced deficiency of para-aortic splanchnopleural hematopoiesis. *Blood* 108:3329-34, 2006
 33. Oshima K, Kanda Y, Nakahara F, Shoda E, Suzuki T, Imai Y, Watanabe T, Asai T, Izutsu K, Ogawa S, Motokura T, Chiba S, Kurokawa M. Pharmacokinetics of alemtuzumab after haploidentical HLA-mismatched hematopoietic stem cell transplantation using in vivo alemtuzumab with or without CD52-positive malignancies. *Am J Hematol.* 81:8750879, 2006
 34. Chiba S. Notch signaling in stem cell systems. *Stem Cells* 24:2437-2447, 2006
 35. Nitta E, Izutsu K, Sato T, Ota Y, Takeuchi K, Kamijo A, Takahashi K, Oshima K, Kanda Y, Chiba S, Motokura T, Kurokawa M. A high incidence of late-onset neutropenia following rituximab-containing chemotherapy as a primary treatment for CD20-positive B-cell lymphoma: a single institution study. *Ann Oncol* 18: 364-369, 2007
 36. Hasebe T, Yohena S, Kamijo A, Okazaki Y, Atsushi H, Takahashi K, Suzuki T. Fluorine doping into diamond-like carbon coatings inhibits protein adsorption and platelet activation. *J Biomed Mater Res Part A* (in press)
 37. Hasebe T, Ishimaru T, Kamijo A, Yoshimoto Y, Yoshimura T, Yohena S, Kodama H, Hotta A, Takahashi K, Suzuki. Effect of surface roughness on antithrombogenicity of diamond-like carbon films. *Diamond Relat Mater* (in press)
 38. 高梨美乃子. 臍帯血造血幹細胞の評価方法とその標準化. 臍帯血移植(編集:原 宏), 2006, 新興出版社, 東京pp47-56
 39. 高梨美乃子. 臍帯血バンク、組織活動と内容. 血液・腫瘍科[特別増刊号「造血幹細胞移植のすべて」]. (in press)
- H：知的財産権の出願・登録状況
該当なし

Ⅱ.研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表（論文）

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻名	ページ	出版年
Saito T, Hasebe T, Yohena S, Matsuoka Y, Kamiyo A, Takahashi K, Suzuki T.	Antithrombogenicity of fluorinated diamond-like carbon films.	Diamond & Related Materials	14	1116-1119	2005
Hosoya N, Qiao Y, Hangaishi A, Wang L, Nannya Y, Sanada M, Kurokawa M, Chiba S, Hirai H, Ogawa S.	Identification of a SRC-like tyrosine kinase gene, FRK, fused with ETV6 in a patient with acute myelogenous leukemia carrying a t(6;12)(q21;p13) translocation.	Genes Chromosomes Cancer	42	269-279	2005
Hori A, Kanda Y, Goyama S, Onishi Y, Komeno Y, Mitani K, Kishi Y, Ogawa S, Imataki O, Chiba S, Kojima R, Hamaki T, Sakiyama M, Kami M, Makimoto A, Tanosaki R, Takaue Y, Hirai H.	A prospective trial to evaluate the safety and efficacy of pravastatin for the treatment of refractory chronic graft-versus-host disease.	Transplantation	79	372-374	2005
Yanada M, Emi N, Naoe T, Sakamaki H, Iseki T, Hirabayashi N, Karasuno T, Chiba S, Atsuta Y, Hamajima N, Takahashi S, Kato S.	Allogeneic myeloablative transplantation for patients aged 50 years and over.	Bone Marrow Transplantation	34	29-35	2004
Morishima Y, Ogura M, Nishimura M, Yazaki F, Bessho M, Mizoguchi H, Chiba S, Hirai H, Tauchi T, Urabe A, Takahashi M, Ohnishi K, Yokozawa T, Emi N, Hirano M, Shimazaki C, Nakao S, Kawai Y, Fujimoto M, Taguchi H, Jinnai I, Ohno R.	Efficacy and safety of imatinib mesylate for patients in the first chronic phase of chronic myeloid leukemia: results of a Japanese phase II clinical study.	Int J Hematol.	80	261-266	2004
Endo-Matsubara M, Ogawa S, Sasaki K, Takahashi T, Chiba S, Hirai H.	Immature granulocyte fraction in the peripheral blood is a practical indicator for mobilization of CD34(+) cells.	Am J Hematol	7	223-228	2004
Yamaguchi Y, Kurokawa M, Imai Y, Izutsu K, Asai T, Ichikawa M, Yamamoto G, Nitta E, Yamagata T, Sasaki K, Mitani K, Ogawa S, Chiba S, Hirai H.	AML1 Is Functionally Regulated through p300-mediated Acetylation on Specific Lysine Residues.	J Biol Chem.	279	15630-15638	2004
Sakata-Yanagimoto M, Kanda Y, Nakagawa M, Asano Y, Nakagawa M, Sakata-Yanagimoto M, Kandabashi K, Izutsu K, Imai Y, Hangaishi A, Kurokawa M, Tsujino S, Ogawa S, Aoki K, Chiba S, Motokura T, Hirai H.	Predictors for severe cardiac complications after hematopoietic stem cell transplantation.	Bone Marrow Transplant	33	1043-1047	2004

研究成果の刊行に関する一覧表（論文）

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻名	ページ	出版年
Ogawa N, Kanda Y, Matsubara M, Asano Y, Nakagawa M, Sakata-Yanagimoto M, Kandabashi K, Izutsu K, Imai Y, Hangaishi A, Kurokawa M, Tsujino S, Ogawa S, Aoki K, Chiba S, Motokura T, Hirai H.	Increased incidence of acute graft-versus-host disease with the continuous infusion of cyclosporine A compared to twice-daily infusion.	Bone Marrow Transplant	33	549-552	2004
Kunisato A, Chiba S, Saito T, Kumano K, Nakagami-Yamaguchi E, Yamaguchi T, Hirai H.	Stem cell leukemia protein directs hematopoietic stem cell fate.	Blood	103	3336-3341	2004
Kojima R, Kami M, Nannya Y, Kusumi E, Sakai M, Tanaka Y, Kanda Y, Mori S, Chiba S, Miyakoshi S, Tajima K, Hirai H, Taniguchi S, Sakamaki H, Takaue Y.	Incidence of invasive aspergillosis after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation with a reduced-intensity regimen compared with transplantation with a conventional regimen.	Biol Blood Marrow Transplant	10	645-652	2004
Kawazu M, Kanda Y, Nannya Y, Aoki K, Kurokawa M, Chiba S, Motokura T, Hirai H, Ogawa S.	Prospective comparison of the diagnostic potential of real-time PCR, double-sandwich enzyme-linked immunosorbent assay for galactomannan, and a (1→3)- β -D-glucan test in weekly screening for invasive aspergillosis in patients with hematological disorders.	J Clin Microbiol	42	2733-2741	2004
Ichikawa M, Asai T, Saito T, Yamamoto G, Seo S, Yamazaki I, Yamagata T, Mitani K, Chiba S, Ogawa S, Kurokawa M, Hirai H.	AML-1 is required for megakaryocytic maturation and lymphocytic differentiation, but not for maintenance of hematopoietic stem cells in adult hematopoiesis.	Nature Med.	10	299-304	2004
Haraguchi K, Takahashi T, Hiruma K, Kanda Y, Tanaka Y, Ogawa S, Chiba S, Miura O, Sakamaki H, Hirai H.	Recovery of Valpha24(+) NKT cells after hematopoietic stem cell transplantation.	Bone Marrow Transplant	34	595-602	2004
Goyama S, Yamaguchi Y, Imai Y, Kawazu M, Nakagawa M, Asai T, Kumano K, Mitani K, Ogawa S, Chiba S, Kurokawa M, Hirai H.	The transcriptionally active form of AML1 is required for hematopoietic rescue of the AML1-deficient embryonic para-aortic splanchnopleural (P-Sp) region.	Blood	104	3558-3564	2004
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, TCRb expression, and CD4/8 double-negative to CD4/8 double-positive transition in thymocyte development.	J Immunol	174	3526-3533	2005

研究成果の刊行に関する一覧表（論文）

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻名	ページ	出版年
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
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
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- β /Smad-mediated cell growth suppression via sequestration of co-activator p300.	Cancer Science	96	274-282	2005
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
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
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
Saeki K, yasugi E, Okuma E, Breut SN, Nakamura M, Toda T, Kaburagi Y, You A.	Proteomic analysis on insulin signaling in human hematopoietic cells: identification of CLIC1 and SRp20 as novel downstream effectors of insulin.	Am J Physiol EndocrinolMetab	289	E419-428	2005
Hasebe T, Kamiyo 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

研究成果の刊行に関する一覧表（論文）

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻名	ページ	出版年
Hasebe T, Matsuoka Y, Kadama H, Saito T, Yohena S, Kamiyo 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
Saito T, Hasebe T, Yohena S, Matsuoka Y, Kamiyo A, Takahashi K, Suzuki T.	Antithrombogenicity of fluorinated diamond-like carbon films.	Diamond and Related Materials	14	1116-1119	2005
Nakagawa K, Kanda Y, Yamashita H, Hosoi Y, Oshima K, Ohtomo K, Ban N, Yamakawa S, Nakagawa S, Chiba S.	Preservation of ovarian function by ovarian shielding when undergoing total body irradiation for hematopoietic stem cell transplantation: a report of two successful cases	Bone Marrow Transplantation	37	583-587	2006
Hosoya N, Sanada M, Nannya Y, Nakazaki K, Lili Wang, Hangaishi A, Kurokawa M, Chiba S, Ogawa S.	Genomewide screening of DNA copy number changes in chronic myelogenous leukemia with the use of high-resolution array-based comparative genomic hybridization	Genes, Chromosomes Cancer	45	482-494	2006
Mori-Asano Y, Kanda Y, Oshima K, Watanabe T, Shoda E, Motokura T, Kurokawa M, Chiba S.	Pharmacokinetics of ganciclovir in haematopoietic stem cell transplantation recipients with or without renal impairment	J Antimicrob Chemother	57	1004-1007	2006
Yamashita H, Izutsu K, Nakamura N, Shiraishi K, Chiba S, Kurokawa M, Tago M, Igaki H, Ohtomo K, Nakagawa K.	Treatment results of chemoradiation therapy for localized aggressive lymphomas: a retrospective 20-year study	Ann Hematol	85	523-529	2006
Haraguchi K, Takahashi T, Nakahara F, Matsumoto A, Kurokawa M, Ogawa S, Oda H, Hirai H, Chiba S.	CD1d expression level in tumor cells is an important determinant for antitumor immunity by natural killer T cells	Leuk Lymphoma	47	2218-2223	2006
Suzuki T, Yokoyama Y, Kumano K, Takanashi M, Kozuma S, Takato T, Nakahata T, Nishikawa M, Sakano S, Kurokawa M, Ogawa S, Chiba S.	Highly efficient <i>ex vivo</i> expansion of human hematopoietic stem cells using Delta1-Fc chimeric protein	Stem Cells	24	2456-2465	2006

研究成果の刊行に関する一覧表（論文）

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻名	ページ	出版年
Nakagawa M, Ichikawa M, Kumano K, Goyama S, Kawazu M, Asai T, Ogawa S, Kurokawa M, Chiba S.	AML1/Runx1 rescues Notch1-null mutation-induced deficiency of para-aortic splanchnopleural hematopoiesis	blood	108	3329-3334	2006
Oshima K, kanda Y, nakahara F, Shoda E, Suzuki T, Imai Y, Watanabe T, Asai T, Izutsu K, Ogawa S, motokura T, Chiba S, Kurokawa M.	Pharmacokinetics of alemtuzumab after haploidentical HLA-mismatched hematopoietic stem cell transplantation using in vivo alemtuzumab with or without CD52-positive malignancies	Am J Hematol	81	875-879	2006
Nitta E, Izutsu K, Sato T, Ota Y, Takeuchi K, Kamijo A, Takahashi K, Oshima K, Kanda Y, Chiba S, Motokura T, Kurokawa M.	A high incidence of late-onset neutropenia following rituximab-containing chemotherapy as a primary treatment of CD20-positive B-cell lymphoma: a single-institution study	Ann Oncol	18	364-369	2007
Chiba S.	Notch signaling in stem cell systems	Stem Cells	24	2437-2447	2006

Ⅲ. 研究成果の刊行物・別刷

Antithrombogenicity of fluorinated diamond-like carbon films

T. Saito^{a,1}, T. Hasebe^{a,b,*}, S. Yohena^a, Y. Matsuoka^a, A. Kamijo^c, K. Takahashi^c, T. Suzuki^a

^aCenter for Materials Science, Department of Mechanical Engineering, Keio University School of Science and Technology, 3-14-1 Hiyoshi, Kohoku-ku, Yokohama, Kanagawa 223-8522, Japan

^bDepartment of Radiology, Tachikawa Hospital, 4-2-22 Nishiki-cho, Tachikawa, Tokyo 190-8531, Japan

^cDepartment of Transfusion Medicine, the University of Tokyo Hospital, 7-3-1 Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8655, Japan

Available online 6 November 2004

Abstract

Effects of doping with fluorine to diamond-like carbon (DLC) films on the antithrombogenicity were investigated by changing its content. Fluorinated DLC (F-DLC) films were prepared on silicon (Si) substrates using radio frequency (RF) plasma enhanced chemical vapour deposition (CVD) by changing the ratio of hexafluoroethane (C₂F₆) and acetylene (C₂H₂). The contact angle measurements of human whole blood droplet on Si, DLC and F-DLC were 24.2°, 60.8° and 95.3°, respectively. Furthermore, the static evaluation of F-DLC films incubated with platelet-rich plasma (PRP) showed dramatic reduction of platelet adhesion and activation on the surface. It was found that the addition of fluorine into DLC films much improved antithrombogenicity, which was clearly shown by scanning electron microscopy (SEM) with statistical analysis. F-DLC coating can be a great candidate for developing antithrombogenic surfaces in blood contacting materials.

© 2004 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Fluorinated diamond-like carbon; Hydrophobicity; Platelet adhesion; Antithrombogenicity

1. Introduction

Biomaterial implants such as vascular grafts, artificial heart valves or interventional devices (stents, guidewires and catheters) have been gaining widespread use with development of medical engineering. Thrombogenic complication remains as one of the main problems for blood contacting implants, which triggers the life-threatening device failure. For example, it has been reported that the restenosis after coronary stenting statistically occurs 20% to 40% [1–4]. Recent study has shown that the thrombus formation after intraarterial stent implantation provides a stimulus for neointimal hyperplasia and, if excessive, can result in stent thrombosis at sites of coronary stenting in humans [4]. Surface modification techniques are indispensable for

improving both the mechanical and physical properties of these implants in direct contact with the blood and tissue.

Recently, diamond-like carbon (DLC) films have received much attention because of their antithrombogenicity, which inhibits platelet adhesion and activation [5–7]. However, the blood coagulation mechanism on DLC films in biological environment has not been well understood so far. There have been several reports that cell adhesion on DLC films is related to surface energy and wettability [8–12]. They suggested that hydrophobic surface tends to inhibit blood cell adsorption. As for hydrophobic property, it is well known that fluorocarbon polymers present great water-shedding characteristics. Thus, we consider that the addition of fluorinate has potential to develop haemocompatibility of materials.

2. Experimental

2.1. Film preparations and characterization

Conventional DLC and fluorinated DLC (F-DLC) films were prepared on Silicon (Si) substrates using radio

* Corresponding author. Center for Materials Science (Suzuki lab.), Department of Mechanical Engineering, Keio University School of Science and Technology, 3-14-1 Hiyoshi, Kohoku-ku, Yokohama, Kanagawa 223-8522, Japan. Tel.: +81 45 563 1141; fax: +81 45 566 1495.

E-mail address: teru_hasebe@hotmail.com (T. Hasebe).

frequency (RF) plasma enhanced chemical vapour deposition (CVD) method by changing the ratio of hexafluoroethane (C_2F_6) and acetylene (C_2H_2). The RF (13.56 MHz) power and total pressure were fixed at 200 W and 13.3 Pa, respectively. DLC films were deposited from C_2H_2 and F-DLC films from a mixture of C_2H_2 and C_2F_6 , and the thickness of DLC and F-DLC films was 40 to 50 nm, respectively. According to partial pressure of C_2F_6 , each F-DLC film was denoted as follows: for example, F-DLC20 indicates that F-DLC films were deposited under partial pressure of C_2F_6 at 20% of the total pressure.

Surface chemical compositions and bonding states of DLC and F-DLC films were measured by the X-ray photoelectron spectroscopy (XPS; JPS-9000MX, JEOL). The wettability of Si, DLC and F-DLC80 were evaluated by measuring the static contact angles between a droplet of human whole blood (10 μ l) and the samples surfaces.

2.2. Platelet adhesion and activation

Human whole blood (45 ml) from a healthy volunteer without any medication for at least 10 days was collected and mixed with 5 ml of acid-citrate-dextrose (ACD), and then the blood was centrifuged at 180 $\times g$ for 10 min to separate the blood corpuscles, and the resulting platelet-rich plasma (PRP) was prepared. Subsequently, the rest of whole blood was centrifuged at 2000 $\times g$ for 20 min to obtain the platelet-poor plasma (PPP). The density of platelets in PRP was adjusted to a concentration of 2×10^5 cells/ μ l by diluting with PPP. After rinsing samples with phosphate-buffered saline (PBS), the samples disks with a surface area of 100 mm² were incubated in a 24-wells plate with 2 ml of adjusted PRP for 60 min with 5% of CO_2 gas at 37 $^\circ C$ ($n=5$ disks for each sample). Thereafter, the supernatant was discarded, and the samples were washed with PBS. The adherent platelets were then fixed with 1 ml of freshly prepared 1.0% of glutaraldehyde for 60 min at room temperature. After fixation, the

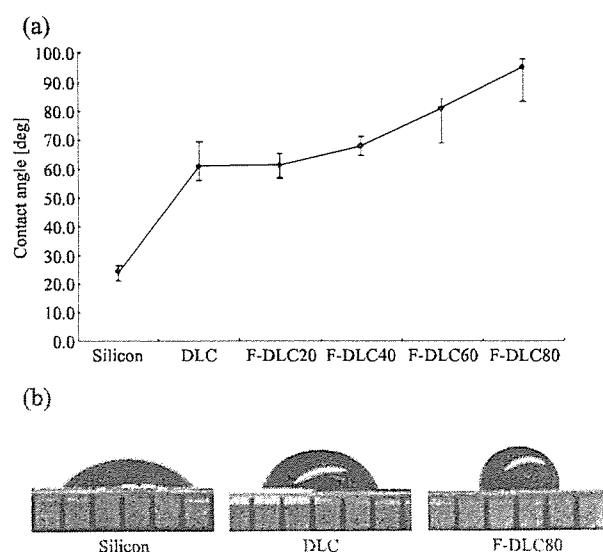


Fig. 2. Contact angle measurements of 10- μ l whole human blood droplet on the sample surface (wettability). The values of contact angle dramatically increased with increasing the ratio of doped fluorine (a). F-DLC80 showed the most hydrophobic property (b).

samples were washed and dehydrated in a graded ethanol series (20%, 40%, 60%, 80%, 100% and 100% for 15 min each), as described previously [13]. Dehydrated materials were put in a vacuum chamber and dried overnight. The entirely dried materials were coated with gold and investigated by a scanning electron microscopy (SEM; S-3100H, HITACHI).

Adhering platelets were manually counted on photographs per unit area (6000 μm^2). Results of the experiments are expressed as means of counts/unit area and standard error (SE). Values were compared statistically by unpaired t test. Results with $P < 0.05$ were considered to be statistically significant. Additionally, the morphological shape changes were categorized to Goodman et al. and

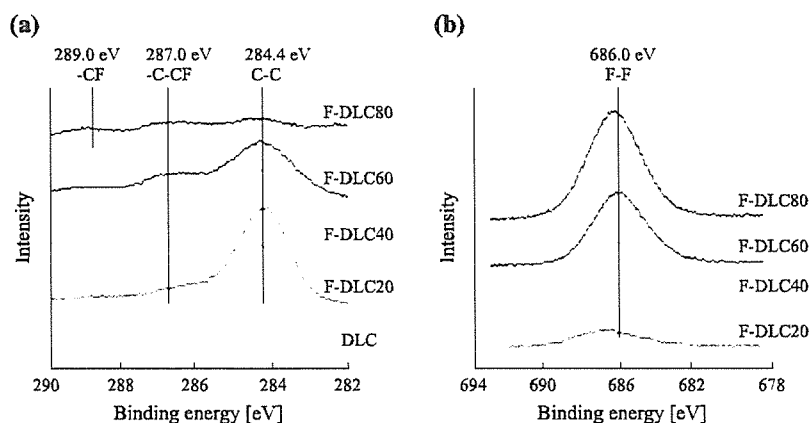


Fig. 1. XPS spectra of DLC, F-DLC20, F-DLC40, F-DLC60 and F-DLC80. (a) C1s XPS. (b) F1s XPS.

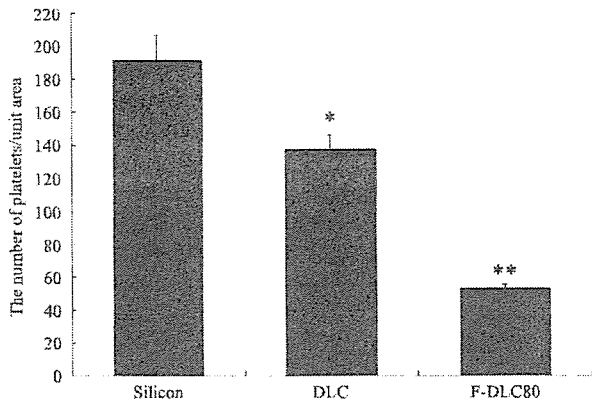


Fig. 3. The number of adhering platelets counted on Si substrate, DLC and F-DLC80. The number of platelets per unit area ($6000 \mu\text{m}^2$) was counted. The values are the mean of five areas of each sample, while the error bars denote the standard deviation. * denotes significant difference from control Si substrate (* $P < 0.05$), ** denotes significant difference from Si or DLC (** $P < 0.001$).

Allen et al. [14,15] as (I) round or discoid, (II) dendritic or early pseudopodial, (III) spread-dendritic or intermediate pseudopodial, (IV) spreading or late pseudopodial and (V) fully spread.

3. Results and discussion

3.1. Chemical compositions and bonding

Fig. 1(a) and (b) shows the local spectra of C1s and F1s for DLC, F-DLC20, F-DLC40, F-DLC60 and F-DLC80 by XPS. The horizontal axis corresponds to binding energy [eV] and the vertical axis to intensity. By taking curve fitting to each spectrum, they were well decomposed into main three peaks, which centered at ~ 284.4 , ~ 287.0 and ~ 289.0 eV, respectively. Due to the surface contamination and charging effect during XPS analysis, it is very complex and also still controversial to identify these peaks.

As shown in Fig. 1, the peak intensity for C–C bond (284.4 eV) gradually decreased (Fig. 1(a)) and the peak intensity for F–F bond (686.0 eV) gradually increased (Fig. 1(b)) with increasing pressure of C_2F_6 gas during deposi-

tion. This indicates that the pressure of C_2F_6 influences the ratio of fluorine on the topmost surface of films. Furthermore, in the spectra of F-DLC films, there were some peaks indicating bonds of carbon and fluorine. The spectra of F-DLC20, F-DLC40 and F-DLC60 showed the existence of C–CF bond (287.0 eV) as well as C–C bond. The spectrum of F-DLC80 showed the existence of C–F bond (289.0 eV) in addition to C–CF and C–C bonds. Bonding structures of carbon and fluorine show low polarizability, which leads to low surface energy with increasing the hydrophobicity of F-DLC films.

3.2. Contact angle measurements

Fig. 2 shows the results of contact angle measurements for three different samples. These results indicated the dramatic improvement of wettability for DLC and F-DLC films. The contact angles of human blood on Si, DLC and F-DLC80 were 24.2° , 60.8° and 95.3° , respectively. For the DLC films, the contact angle increased by 2.51 times compared to that of Si substrate. In particular, F-DLC80 is the most hydrophobic, and the contact angle for F-DLC80 increased by 3.94 times compared to that of Si.

The more hydrophobic a surface is, the higher the interfacial free energy between the solid and liquid phases. The interfacial free energy determines the wetting characteristics and hence the wall shear stress generated when the liquid comes into contact with the surface. It is considered that the polarization of C–F and C–CF bonds on the topmost surface of F-DLC80, proven by the XPS analysis, can lower the surface energy and the results in the increase in contact angles.

3.3. Platelet adhesion and activation

Platelets play a pivotal role in thrombogenicity of biomaterials in blood contacting applications, and the reduction of platelet adhesion and activation is determinant for the eventual success of any application. The initial local response to foreign surface in the body is mainly catalyzed by surface-absorbed proteins, which trigger numerous processes such as cellular activation, inflammatory and complement activation and attraction of circulating platelets.

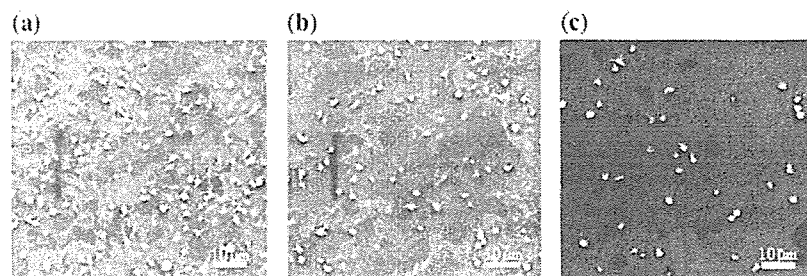


Fig. 4. Morphology of adherent platelets on (a) Si, (b) DLC and (c) F-DLC80 surfaces (60 min incubation in PRP) observed using SEM. Si substrate: dense platelet layers (categories IV and V). DLC: lower density of platelets compared to Si (categories III to V). F-DLC80: a few platelets (categories uniformly I to V).

During activation, the platelets attach to the sample surface, and they change in shape in developing pseudopodia versus their activation level [12]. Thus, the investigation of platelet adhesion must support the thrombogenicity evaluation of biomaterials.

Fig. 3 shows the adherent platelets counts on the three different samples by SEM. This result clearly demonstrated that the number of platelets per unit area for DLC or F-DLC80 was significantly smaller compared to that of Si substrate ($P<0.05$ and $P<0.001$, respectively). In addition, the number of platelets on F-DLC80 was significantly smaller than that of DLC ($P<0.001$). The morphology of the attached platelets after 60 min of incubation is displayed as shown in Fig. 4. Si substrate showed a dense platelet layer with predominantly spread platelets (categories IV and V) (Fig. 4(a)), whereas, on F-DLC80, a few platelets adhered, and the categories of platelets uniformly varied between I to V (Fig. 4(c)). DLC films showed that almost all the platelets were categorized into III to V (Fig. 4(b)).

In this present study, DLC and F-DLC coatings could suppress the adhesion and activation of platelets compared to Si substrate. The surface that promoted the greatest spreading of platelets, i.e., the Si substrate, is the most hydrophilic in the tested samples. In contrast, F-DLC coating, which caused less activation, was most hydrophobic in the tested samples. This suggests that the wettability of a biomaterial surface determines in part its blood compatibility. However, it has been described to be influential that blood compatibility is not solely determined by wettability and also the specific chemical composition, interfacial free energy and a higher ratio of albumin/fibrinogen adsorption of biomaterial surfaces [16,17]. The mechanism of biomaterial-associated thrombosis is not fully clear. It is very complicated to determine all factors that contributed to novel antithrombogenic properties of F-DLC films in this study. Further in vitro and in vivo studies are needed to investigate all of the factors related with biomaterial-associated thrombosis.

4. Conclusion

We have presented an engineering analysis of fluorine-doped DLC films and quantitative and morphological studies on platelet adhesion to DLC films or F-DLC coated Si and bare Si substrate incubated in PRP. In this study, we described a novel antithrombogenic effect by doping with fluorine into DLC films compared to Si substrate and conventional DLC. Our experiments showed that an addition of fluorine into DLC films enhanced the water-

shedding properties. The number of platelets per unit area decreased in order of Si, DLC and F-DLC80. It was found that F-DLC showed the best antithrombogenicity among the tested samples. In addition, DLC and F-DLC coating inhibited the platelets activation, as well as the number of platelets on the film surface.

The presented F-DLC appears to be a promising candidate coating material for blood contacting devices, such as interventional devices, artificial organs and pacemakers. However, more basic study and long-term implantation are needed.

References

- [1] D.L. Fischman, M.B. Leon, D.S. Baim, R.A. Schatz, M.P. Savage, I. Penn, K. Detre, L. Veltri, D. Ricci, M. Nobuyoshi, M. Cleman, R. Heuser, D. Almond, P.S. Teirstein, R.D. Fish, A. Colombo, J. Brinker, J. Moses, A. Shklovich, J. Hirshfeld, S. Bailey, S. Ellis, R. Rake, S. Goldberg, *N. Engl. J. Med.* 331 (1994) 496.
- [2] P.W. Serruys, P. de Jaegere, F. Kiemeneij, C. Macaya, W. Rutsch, G. Heyndrickx, H. Emanuelsson, J. Marco, V. Legrand, P. Materne, J. Belardi, U. Sigwart, A. Colombo, J.J. Goy, P. van den Heuvel, J. Delcan, M. Morel, *N. Engl. J. Med.* 331 (1994) 489.
- [3] P. Rubartelli, L. Niccoli, E. Verna, C. Giachero, M. Zimarino, A. Fontanelli, C. Vassanelli, L. Campolo, E. Martuscelli, G. Tommasini, *J. Am. Coll. Cardiol.* 32 (1998) 90.
- [4] R. Komatsu, M. Ueda, T. Naruko, A. Kojima, A.E. Becker, *Circulation* 98 (1998) 224.
- [5] L.A. Thomson, F.C. Law, N. Rushton, J. Franks, *Biomaterials* 12 (1991) 37.
- [6] J. Dion, X. Roques, C. Baquey, E. Baudet, B. Basse Cathalinat, N. More, *Bio-Med. Mater. Eng.* 3 (1993) 51.
- [7] H.S. Tran, M.M. Puc, C.W. Hewitt, D.B. Soll, S.W. Marra, V.A. Simonetti, J.H. Cilley, A.J. DelRossi, *J. Invest. Surg.* 12 (1999) 133.
- [8] M.I. Jones, I.R. McColl, D.M. Grant, K.G. Parker, T.L. Parker, *Diamond Relat. Mater.* 8 (1999) 457.
- [9] M.I. Jones, I.R. McColl, D.M. Grant, K.G. Parker, T.L. Parker, *J. Biomed. Mater. Res.* 52 (2000) 413.
- [10] T.I. Okpalugo, A.A. Ogwu, P.D. Maguire, J.A. McLaughlin, *Biomaterials* 25 (2004) 239.
- [11] P. Yang, N. Huang, Y.X. Leng, J.Y. Chen, R.K. Fu, S.C. Kwok, Y. Leng, P.K. Chu, *Biomaterials* 24 (2003) 2821.
- [12] N. Nurdin, P. Francois, Y. Mugnier, J. Krumeich, M. Moret, B.O. Aronsson, P. Descouts, *Eur. Cell. Mater.* 5 (2003) 17.
- [13] R.D. Frank, H. Dresbach, H. Thelen, H.G. Sieberth, J. Biomed. Mater. Res. 52 (2000) 374.
- [14] S.L. Goodman, T.G. Grasel, S.L. Cooper, R.M. Albrecht, J. Biomed. Mater. Res. 23 (1989) 105.
- [15] R.D. Allen, L.R. Zacharski, S.T. Widirstky, R. Rosenstein, L.M. Zaitlin, D.R. Burgess, *J. Cell Biol.* 83 (1979) 126.
- [16] B.J. Hunt, R. Parratt, M. Cable, D. Finch, M. Yacoub, *Blood Coagul. Fibrinolysis* 8 (1997) 223.
- [17] H.T. Spijker, R. Bos, H.J. Busscher, T.G. von Kooten, W. von Oeveren, *Biomaterials* 23 (2002) 757.