

磁気ビーズに HSV-1 や sindbis virus を吸着させ吸着分面に含まれるウイルスゲノム量を定量すると、図 1 のように濃縮されることが再確認された。

PEI はそれぞれ分子量の異なる製品が市販されている。そこで、PEI の分子量の違いが濃縮効果に及ぼす影響について検討した。表 3 に示すように、分子量 70,000 の PEI と分子量 1,800 の PEI を結合させた磁気ビーズを用いて 5×10^4 copy/0.1ml の HSV-1 を濃縮したところ、分子量 70,000 の PEI 磁気ビーズを用いた方が非常に高い濃縮効率が見られることが明らかになった。

次に、濃縮時の pH の影響について検討した。図 2 に示すように、低い pH では濃縮効率が低下することが明らかになった。ただ、pH9.0 では pH 調整を行っただけでウイルスゲノムコピーの低下が観測され、高 pH によるウイルスの破壊が起こったものと考えられた。従って、高 pH ではウイルスコピー数が低下した点を考慮するとより高い濃縮効率が見られたことになる。以上の結果は、高い pH でウイルスの破壊がなければ pH が高いほど PEI 磁気ビーズの濃縮効率は高いと考えられる。今後、pH を高くしてもウイルスが破壊されないような条件を検討していく予定である。

1. 2 PEI によるイムノグロブリンの濃縮

予備的検討から PEI 磁気ビーズの濃縮では IgG が濃縮されている可能性が想定されたことより、濃縮前と濃縮後で IgG 含量が変化しているか検討した。図 3 に示すように、濃縮前に比べて培養に用いている牛血清 IgG が濃縮されていることが示された。

そこで、PEI 磁気ビーズの濃縮時に抗ウイルス抗体を添加することにより濃縮効率が上昇するか検討した。図 4 に示すように、HSV-

1 の濃縮時に抗 HSV-1 抗体を添加するとその濃縮効率が飛躍的に改善された。

1. 3 ヒト感染性ウイルスへの適応

PEI 磁気ビーズのウイルス濃縮法をヒト感染性ウイルスである HBV 及び HCV に適応してみた。図 5 に示すように、Vero 細胞の上清に HBV を添加し、PEI 磁気ビーズを用いて濃縮を試みたところ、1ml 及び 10ml の上清からウイルス濃縮することが可能であり、また、抗 HBV 抗体を添加したところその濃縮効率がさらに上昇した。

また、図 6 に示すように PEI 磁気ビーズは HCV の濃縮にも適応可能であることが明らかになった。しかし、HCV に対する有用な抗体が無い場合、抗 HCV 抗体添加による濃縮効率の高める実験はできなかった。

2. サイトカインアレイを用いた細胞由来タンパク質解析

2. 1 モデル細胞を用いた解析

継代数を余り経ていない HL-60 細胞は、ダブリングタイムは 48 時間程度であるが、継代を重ねていくとダブリングタイムが早まる。ダブリングタイムが 35 時間になった HL-60 の培養上清では、サイトカインアレイで 6K の位置にある、Insulin-like growth factor binding proteins-2 の増加が認められた (図 7)。HL-60 細胞から樹立された高増殖株である HL-60 細胞でもこの Insulin-like growth factor binding proteins-2 の増加が認められた。また、Hepatocyte growth factor (HGF) は、HL-60RG 細胞に特異的に発現していることが明らかになった。一方、いくつかのサイトカインについて、ELISA による定量を試みた。表 4 に示すように、IL-6、IL-8、HGF、VEGF が測定可能であったが、それ以外のサ

イトカインは検出限界以下であった。特に、HGFはHL-60細胞で特異的に発現しており、プロテインアレイの結果と良く一致していた。以上の結果より、サイトカインアレイを用いた培養上清のサイトカイン産生解析が、細胞の増殖能が変化したときにそれと呼応して産生量が変わるサイトカインを検出するに適用できることを意味しており、サイトカインアレイが細胞治療薬の産生するサイトカインプロファイルの解析に有用であることが示唆された。

2. 血管内皮分化誘導系でのサイトカインアレイを用いた解析

次に、血管再生を目指した細胞治療で用いられることが期待されている血管内皮前駆細胞へサイトカインアレイが適応できるか検討した。すでに報告しているように、我々は、末梢血あるいは臍帯血AC133陽性細胞から血管内皮細胞を *in vitro* で誘導する系を確立している (J Cell Physiol. 2003, 195:119-129.)。図8に示すように、臍帯血AC133陽性細胞をTPO、VEGF、SCFを含むEBM2培養液中で培養する *in vitro* 分化系では、培養開始1週間目にはCD31強い発現が見られる。一方KDR/flk-1は培養2週間後に強い発現が観察された。培養1週間目のCD31を強く発現している細胞は、種々の解析から血管内皮前駆細胞としての特徴を良く表していることを報告している。また、2-3週間目の細胞は分化した血管内皮の特徴を持っていることを明らかにしている。この *in vitro* の培養下でその特性が変化するときの培養上清に産生されるサイトカインをアレイを用いて解析した (図8b)。

臍帯血由来AC133陽性細胞の血管内皮分化系の1週間目で発現しており、かつその後発

現が増加したサイトカインは、

Epithelial neutrophil-activating protein 78、GM-CSF、Growth Related Oncogene、I-309、IL-1 β 、IL-6、Monocyte Chemoattractant Protein 1、Macrophage Inflammatory Protein 1 β 、B-lymphocyte chemoattractant、tissue inhibitor of metalloproteinases-1の10種であった。

2週目で最大となっていたのは、HGF、tissue inhibitor of metalloproteinases-2であった。3週目まで変わらなかったのは、IL-8であった。Macrophage-derived Chemokineは、3週まで徐々に増えていた。

一方、末梢血由来AC133陽性細胞の血管内皮への分化系で培養上清中のサイトカイン分泌の変化を解析したところ、1週目に培養上清で検出され、その後培養経過とともに減少していたのは、Epithelial neutrophil-activating protein 78、GM-CSF、Growth Related Oncogene、IL-1 β 、IL-6、IL-10、Monocyte Chemoattractant Protein 1、Monocyte Chemoattractant Protein 2、Macrophage Inflammatory Protein 1 β 、regulated upon activation, normal T-cell expressed, and presumably secreted、EGF、PDGF-B、B-lymphocyte chemoattractantの13種であった。

2週目で最大となっていたのは、Macrophage Inflammatory Protein 1 δ 、Oncostatin M、tissue inhibitor of metalloproteinases-1であった。

HGF、Insulin-like growth factor binding proteins-2、tissue inhibitor of metalloproteinases-2は、2週目まで増えて3週目は2週目と同程度であった。

2週まで変わらず3週目で減少していたの

は、Neutrophil Activating Peptide 2 であった。また、3週目まで変わらなかったのは、IL-8 と Pulmonary and Activation-Regulated Chemokine であった。

3週まで徐々に増えていたのは、Macrophage-derived Chemokine と MIPF-2 (Myeloid progenitor inhibitory factor-2) であった。

以上の結果より、臍帯血、末梢血由来の両者に共通した変化としては、1週目でもっとも強く発現しており、その後減少したのは、Epithelial neutrophil-activating protein 78、GM-CSF、Growth Related Oncogene、IL-1 β 、IL-6、Monocyte Chemoattractant Protein 1、Macrophage Inflammatory Protein 1 β 、B-lymphocyte chemoattractant であることが示された。これらの、サイトカインは血管内皮前駆細胞と出現している時期に高い値を示していることになる。IL-8 は、培養期間を通じて高い発現が維持されていた。また、Macrophage-derived Chemokine は、3週まで徐々に増えていくことが明らかになった。

3. 血管内皮前駆細胞の特性指標の解析に関する研究

3. 1 末梢血 AC133 陽性細胞をから血管内皮細胞分化過程における Cx 発現

末梢血の AC133 陽性細胞を VEGF、TPO、SCF 存在下、一週間培養した後、蛍光標識抗 CD31 抗体を用いて細胞を染色し、CD31 強陽性細胞をソーティングした。この CD31 強陽性細胞はすでに報告したように血管内皮前駆細胞としての特性をもっているが、この細胞をフィブロネクチン (FN) 上で更に 1 日あるいは 7 日間培養し、KDR の発現の変化を調べた。その結果、1 日目に比べ 7 日目に KDR が強く発現し

ていた(図 9、上段は顕微鏡画像、下段は同視野における蛍光画像)。この結果から、CD31 強陽性細胞は FN 上での培養初期には血管内皮の分化マーカーである KDR が殆ど発現しておらず、FN 上で 1 週間培養することにより分化マーカーが発現してくることを意味しており、言い換えれば CD31 強陽性細胞が血管内皮前駆細胞の特性を持つと考えている我々の結論を支持している。次に、各種コネクシン (Cx) の発現の変化を解析した。CD31 強陽性細胞を FN 上に培養した 1 日目と 7 日目の Cx の発現を比較すると、培養 1 日目では Cx37 と Cx40 が強く発現し(図 10)、7 日目では Cx40 の蛍光強度は殆ど変化しないかむしろ増強する傾向が認められた(図 11)。一方、Cx43 は FN 上で培養後 1 日目には殆ど発現が認められず(図 10)、培養 7 日目には強く発現してくることが明らかになった(図 11)。対照としてヒト臍帯内皮細胞をこれらの Cx で免疫染色した結果、Cx37 の発現は殆ど認められないが、Cx40 と Cx43 が強く発現している(図 12)ことが明らかになった。このことより、2つの Cx40 と Cx43 の発現と Cx37 が発現していないことが分化した血管内皮の指標と考えられた。また以上の結果から、血管内皮前駆細胞として我々が想定している CD31 強陽性細胞は、分化開始前には Cx37 と Cx40 を発現しているが分化成熟に従って、Cx37 の発現が消失し、代わりに Cx43 が発現してくるものと考えられた。これまでの結果から、血管内皮前駆細胞の特性指標としての細胞表面マーカーの発現は CD34^{Pr1}/KDR⁻/Cx37⁺/Cx40⁺/Cx43⁻と規定することができる。

3. 2 末梢血由来 AC133 陽性細胞における Cx37 発現の経時変化と Cx37 を表面マーカーとした磁気ビーズ分画後の CD31 発現解析

Cx37 が血管内皮前駆細胞に発現していることが明らかとなり、Cx37 が血管内皮前駆細胞を分画する新たな表面マーカーになる可能性が考えられた。末梢血由来 AC133 陽性細胞を分画後、タイプIVコラーゲン上で培養し血管内皮前駆細胞になるまでの1週間のCx37発現をフローサイトメーターで解析した。図13左に示すように、Cx37の発現は経時的に増加することが明らかになった。次に末梢血由来 AC133 陽性細胞を7日間培養した細胞をCx37陽性細胞とCx37陰性細胞に磁気ビーズを利用して分画し、分画した細胞のCD31の発現を調べた。その結果、どちらの分画もCD31陰性細胞を含むが、Cx37陽性細胞分画の方が、遙かに多くにCD31陽性細胞が含まれることが明らかになった(図13、右)。

3. 3 臍帯血及び末梢血の AC133 及び CD34 陽性細胞の含有率の比較

臍帯血及び末梢血の単核球中に含まれる AC133 及び CD34 陽性細胞についてフローサイトメーターで比較検討した。その結果、図14とその下の表に示すように、AC133⁺/CD34⁻細胞は臍帯血と末梢血でほぼ同程度の比率で存在し、AC133⁻CD34⁺細胞は3倍であるが、幹細胞をもっとも多く含むと考えられる AC133⁺/CD34⁺細胞の比率は臍帯血の方が11倍高いという結果が得られた。これは、臍帯血の多能性幹細胞の比率が末梢血に比べて多いとされる結果とよく一致している。

3. 4 臍帯血及び末梢血由来 AC133 陽性細胞の増殖能と CD31 強陽性細胞の出現能

臍帯血及び末梢血の AC133 陽性細胞からどの程度血管内皮前駆細胞が誘導されるかの明らかにする目的で、両細胞を同じ密度(図7に点線で示す)にコラーゲンタイプIVをコートしたディッシュに播種し、VEGF、TPO、SCF

存在下に6日間培養し、細胞増殖能及びCD31強陽性細胞の出現率を比較検討した。

その結果、末梢血 AC133 陽性細胞はこれらの増殖因子が存在しても殆ど細胞数が増加しないにもかかわらず、臍帯血 AC133 陽性細胞では顕著に細胞数が増加することが明らかになった(図15、 $p<0.001$)。

次に、臍帯血 AC133 陽性細胞をコラーゲンタイプIV上で6日間培養し、出現してくるCD31強陽性細胞を0日の臍帯血 AC133 陽性細胞とフローサイトメーターを用いて比較解析した。その結果、図16に示すように CD31 強陽性細胞は0.25%から10.79%に増加した。このCD31強陽性細胞出現の比率は末梢血 AC133 陽性細胞を用いても同様の結果が得られた。

臍帯血 AC133 陽性細胞由来 CD31 陽性・強陽性細胞を分画し VEGF 存在下ファイブロネクチン上で培養した結果、陽性細胞は殆ど接着する細胞が観察されなかったのに対し、強陽性細胞では多くの接着細胞が観察され(図17、上段)、これらの接着細胞が KDR 陽性、eNOS 陽性である(図17、下段)ことから接着細胞は血管内皮細胞と考えられた。これらの結果から、臍帯血を用いても末梢血と同様に CD31 強陽性細胞が血管内皮細胞前駆細胞と考えられた。また、臍帯血ではその増殖能が高いことに比例して血管内皮前駆細胞誘導能が高いことが明らかになった。

3. 5 臍帯血由来 AC133 陽性細胞における Lox-1 発現の経時変化と Lox-1 を表面マーカーとした磁気ビーズ分画後の CD31 発現解析

Lox-1 は酸化 LDL の内皮細胞上のレセプターとして同定された分子であり血管内皮細胞に特異的に発現していることが知られている。そこで、血管内皮細胞への分化過程での発現変化について解析し、有用な指標となりうる

かを検討した。末梢血由来 AC133 陽性細胞を分離後、タイプIVコラーゲン上で培養し CD31 強陽性細胞が多く出現してくるまでの培養後 8 日間の Lox-1 発現をフローサイトメーターで解析した。図 1 8 左に示すように、Lox-1 の発現は経時的に増加し、培養 4 日目に最大に達した。更に Lox-1 と CD31 の 2 重免疫染色を行いフローサイトメーターで解析すると、Lox-1 の発現と CD31 の発現が相関しており、Lox-1 陽性細胞/CD31 強陽性細胞の集団が存在することが明らかとなった(図 1 8、右上)。従って、Lox-1 も Cx37 と同様に血管内皮前駆細胞の特性指標となる可能性が考えられた。そこで末梢血由来 AC133 陽性細胞を 5 日間培養し、Lox-1 に対する抗体を用いて磁気ビーズ分画を行い、Lox-1 陽性細胞分画と Lox-1 陰性細胞分画を分離した。その結果、Lox-1 陽性分画には CD31 強陽性細胞の比率が非常に高いことが明らかになり、Lox-1 は特性指標として有用なばかりでなく血管内皮前駆細胞の分離のにも有用であることが示唆された(図 1 8、右下)。

D. 考察

1. PEI 磁気ビーズを用いたウイルス濃縮の検討

昨年度までの検討で、新たに開発した PEI 磁気ビーズがウイルス濃縮に非常に有用であることを示してきた。しかし、PEI 磁気ビーズはいくつかの非エンベロープウイルスには適応不能であることから、2 価イオンとスルホン酸磁気ビーズを用いた手法を開発した。しかし、複数の手法を用いるより一つの手法でウイルス濃縮が可能であれば操作も簡便になると期待される。また、PEI 磁気ビーズの濃縮機構を明らかにすることができれば、

より最適な濃縮条件を設定することが可能となり、ひいては濃縮効率の上昇が期待された。本年度は、この PEI 磁気ビーズを用いたウイルス濃縮に及ぼす pH の影響や PEI の分子量の違いについて検討を行った。その結果、pH が低いと濃縮効率が低下すること、高分子量の PEI を用いる方が濃縮効率が高いことが明らかになった。これらの結果より、PEI の陽イオン解離基が重要な役割を果たしていること、またその解離基の密度が高いほど濃縮効率が高いと考えられた。

一方、PEI 磁気ビーズに結合する血清タンパク質の解析から、IgG がウイルスとともに濃縮されることが明らかになった。そこで、抗ウイルス抗体を添加して PEI 磁気ビーズによるウイルス濃縮を検討したところ、抗ウイルス抗体添加によりウイルス濃縮効率が飛躍的に向上することが明らかになった。

PEI 磁気ビーズを用いてヒト感染性ウイルスへの適応についても検討を行い、HCV や HBV への適応が可能であることを明らかにした。また、HBV 濃縮においても抗 HBV 抗体を添加することにより濃縮効率が上昇することが明らかになり、PEI 磁気ビーズ濃縮において、抗ウイルス抗体の添加が非常に有用であることが明らかになった。しかし、抗ウイルス抗体を直接結合した磁気ビーズでは、PEI 磁気ビーズを用いるのに比べて遙かに低い濃縮効率しか得られなかった(データは示さず)。これは、PEI の高い枝分かれ構造や解離基の多さが加わり効率よくウイルスをトラップできるのに対して、抗体を直接つけたビーズではそういった効果が無いためではないかと想定される。

2. サイトカインアレイにより細胞由来サイ

トカインプロファイル測定への適応

サイトカインアレイによる解析は、迅速・簡便な操作で少量の培養上清で一度に79種類のサイトカインの解析が出来る。細胞組織利用医薬品の特性解析法として有用な手法であると考えられる。しかし、現在のプロトコルでは定量範囲や検出感度についてさらに改良が必要と考えられる。同時に解析した、モデル細胞を用いた検討でいくつかのサイトカインの検出結果がELISAによる検出結果と異なっていた。例えば、ELISAを用いてHL-60細胞とHL-60RG細胞はともにかなりのVEGFを産生していることを明らかになったが、サイトカインアレイでは検出することができていない。また、ELISAによってHL-60RG細胞は検出限界以上のIL-6を産生していることが示されているが、サイトカインアレイでは検出できていない。TNF- α は、ELISAでは検出できないがサイトカインアレイではHL-60RG細胞の産生を認めている。これらの差異は、用いている抗体も異なっている可能性が高く、それぞれサイトカインに対する抗体の親和性も異なるための想定される。

今後サイトカインアレイを細胞特性解析に適応していくためには、イメージ解析などによりそれぞれのシグナルを定量できるようにするとともに、シグナル強度からサイトカインの定量が可能のように改良をしていく必要があると考えられる。また、より高密度なプロテインアレイを構築することができれば、サイトカインばかりでなく、細胞産生タンパク質プロファイル解析に適応可能と考えられ、今後高密度化にも取り組んでいく。

3. 血管内皮前駆細胞の特性指標の解析に関

する研究

本研究では、末梢血あるいは臍帯血の血液幹細胞を分離し、その血管内皮細胞への分化誘導系を確立するとともに、その分化過程を詳細に解析することにより、血液幹細胞としての有用性をあらかじめ判定できるような細胞指標の提示を試みようとしている。これまでの研究成果から、末梢血においても臍帯血においてもAC133陽性細胞から血管内皮細胞に分化する過程でCD31が比較的初期に発現してくることを明らかにした。さらに、この培養後1週間ほどで出現してくるCD31強陽性細胞が血管内皮前駆細胞の特性を持っているとの仮説を立てて検討を行っている。

本年度は、末梢血AC133陽性細胞から誘導したCD31強陽性細胞の分化誘導過程におけるコネクシン(Cx)の発現変化を解析した。特に、ギャップ結合を構成するタンパク質Cxのなかで血管内皮細胞に発現するとされているCx37、Cx40、Cx43の発現変化を詳細に検討した。その結果、Cx37及びCx40はFN上で誘導直後にすでに発現しており、その後、Cx37は培養時間が経過するとともに発現が低下することが明らかになった。一方、Cx4は分化誘導直後は発現が認められないが、培養後1週間で発現してくることが明らかになった(図2、3)。培養後1週間の細胞では、Cx40とCx43が発現している点は、ヒト臍帯血管内皮細胞とも一致している(図4)。これらの結果より、培養初期のCx37とCx40が発現している細胞は血管内皮前駆細胞としての性質をもち、1週間目の細胞は分化した血管内皮の性質を示しているものと想定された。Cx37とCx40をダブルで欠損したマウスが血管障害のため生後2日で致死するAlexanderらの報告(Developmental Biol. 2002)もあり、Cx37と

Cx40 の発現が血管内皮前駆細胞の特性を示すものと考えられる。我々の今回のデータは血管内皮前駆細胞の特性指標としてこれらの Cx 発現が非常に有用であると考えられる。現在臍帯血 AC133 細胞の血管内皮細胞誘導系を用いても Cx の発現変化を解析しており、Cx の発現の有用性について詳細な検討を行っている。

次に臍帯血は、AC133 陽性細胞及び CD34 陽性細胞の比率が高く(図 6)、臍帯血は血液幹細胞の比率が多いとする報告を良く一致していた。このように、臍帯血は血液幹細胞を多く含むとすれば血管内皮前駆細胞の誘導も多いのではないかと想定し、末梢血 AC133 細胞と比較した。その結果、臍帯血と末梢血を SCF、TPO、VEGF 存在下で培養した時の増殖能は、臍帯血のほうがはるかに高いが(図 7)、培養 6 日目では、CD31 強陽性細胞の比率は臍帯血と末梢血で差異は認められなかった(図 8)。また、臍帯血由来 AC133 細胞由来 CD31 強陽性細胞をソーティングし、ファイブロネクチン上で培養を続けると血管内皮細胞の出現率は CD31 陽性細胞に比べ顕著に多いことが明らかになった(図 9)。以上の結果より、臍帯血 AC133 陽性細胞は末梢血に比べ細胞の増殖性が高く、その増殖性の高さに故に、より血管内皮前駆細胞を誘導できることが示された。

血管内皮の特異的な酸化LDLレセプターであるLox-1の特性指標としての有用性について検討を行い、Lox-1がAC133陽性細胞を培養後顕著に発現が増加するとともに、培養後5日目にLox-1陽性細胞を分離したところ、非常にCD31強陽性細胞を含むことが明らかになった。現在Lox-1陽性細胞と陰性細胞の血管内皮分化能の比較を行い、その特性指標としての有用性を確認しているところである。

E. 結論

(1) ウイルス等の感染性危険因子の高感度検出のための基盤技術の開発や評価方法に関する研究として、新たに開発した PEI 磁気ビーズによるウイルス濃縮法の機構解析を行い、陽イオン解離基を高密度に持つ PEI が濃縮に有用であること、抗体が同時に濃縮されることなどを明らかにした。また、これらの解析結果の応用として抗ウイルス抗体を添加して濃縮を行うことがさらなる高感度化につながる事が明らかになった。さらに、PEI 磁気ビーズはヒトウイルスである HBV や HCV の濃縮にも適応可能であることを明らかにした。

(2) 細胞特性評価の一環として、サイトカインアレイの細胞由来タンパク質プロファイリングへの有用性を評価するために、モデル細胞及び血管内皮前駆細胞等への適応について解析した。サイトカインアレイは細胞が産生するサイトカインの網羅的解析が可能であり、簡便・迅速性にも優れていることを明らかにした。しかし、細胞特性解析法としては、定量性や個々のサイトカインの検出感度等を評価等さらなる改良が必要であることも明らかになった。

(3) ヒト血液幹細胞から血管内皮前駆細胞への分化誘導系の解析より、血管内皮前駆細胞の細胞指標として、CD31 に加え Lox-1 やコネクシン 37、コネクシン 40 が有用であることを明らかにした。

F. 研究発表

1. 論文発表及び著書

- 1) Kanayasu-Toyoda T, Yamaguchi T, Oshizawa T, Uchida E, Hayakawa T: The role of c-Myc on granulocyte colony-stimulating factor-dependent neutrophilic proliferation and differentiation of HL-60 cells. *Biochem.*

- Pharmacol.* 66:133-140, 2003
- 2) Iwata,A., Satoh,K., Murata,M., Hikata,M., Hayakawa,T., Yamaguchi,T.; Virus concentration using sulfonated magnetic beads to improve sensitivity in nucleic acid amplification tests. *Biol. Pharm. Bull.* 26, 1065-1069 (2003)
 - 3) Kanayasu-Toyoda T, Yamaguchi T, Oshizawa T, Hayakawa T: CD31 (PECAM-1)-bright cells derived from AC133-positive cells in human peripheral blood as endothelial-precursor cells. *J Cell. Physiol.* 195:119-129, 2003.
 - 4) Niimi, S., Oshizawa, T., Yamaguchi, T., Harashima, M., Seki, T., Ariga, T., Kawanishi, T., Hayakawa, T.: Specific expression of annexin III in rat-small-hepatocytes. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 300, 770-774 (2003)
 - 5) Iwata,A., Satoh,K., Yamaguchi,T., Tomoda,A.; Antiviral activity of 2-amino-4,4a-dihydro-4a-7-dimethyl-3H-phe noxazine-3-one on polyiovirus. *Tohoku J. Exp. Med.* 200, 161-165, 2003
 - 6) Oshizawa,T., Yamaguchi,T., Suzuki,K., Yamamoto,Y., Hayakawa,T.; Possible Involvement of Optimally Phosphorylated L-plastin in Activation of Superoxide Generating NADPH Oxidase. *J. Biochem.*, 134, 827-834 (2003)
 - 7) Sakurai F, Mizuguchi H, Yamaguchi T, Hayakawa T. Characterization of in vitro and in vivo gene transfer properties of adenovirus serotype 35 vector. *Mol. Ther.*, 8, 813-821 (2003)
 - 8) Koizumi,N., Mizuguchi,H., Sakurai,F., Yamaguchi,T., Watanabe,Y., Hayakawa,T.; Reduction of natural adenovirus tropism to mice liver by fiber-shaft exchange in combination with both CAR- and v integrin-binding ablation. *J Virol.* 77, 13062-13072 (2003)
 - 9) Satoh,K., Iwata,A., Murata,M., Hikata,M., Hayakawa,T., Yamaguchi,T.; Virus Concentration Using Polyethyleneimine-conjugated Magnetic Beads for Improvement of Sensitivity in Nucleic Acid Amplification Tests. *J Virol, Methods*, 114, 11-19, 2003
 - 10) Ishii-Watabe1,A., Uchida,E., Iwata,A., Nagata,R., Satoh,K., Fan,K., Murata,M., Mizuguchi,H., Kawasaki,N., Kawanishi,T., Yamaguchi,T., Hayakawa,T.; Detection of Replication-Competent Adenoviruses Spiked into Recombinant Adenovirus Vector Products by Infectivity-PCR Combined with Glass Beads-Based DNA Extraction. *Mol. Therapy*, 8, 1009-1016 (2003)
 - 11) Tomofumi Fujino, Yoji Sato, Mizuho Une, Toshie Kanayasu-Toyoda, Teruhide Yamaguchi, Koichi Shudo, Kazuhide Inoue, and Tomoko Nishimaki-Mogami; In vitro farnesoid X receptor ligand sensor assay using surface plasmon resonance and based on ligand-induced coactivator association. *J Steroid. Biochem. Molec. Biol.* In press
 - 12) Xu,Z., Mizuguchi,H., Sakurai,F., Koizumi,N., Hosono,T., Kawabata,K., Watanabe,Y., Yamaguchi,T., Hayakawa,T. : Approaches to Improving the kinetics of adovirus-delivered genes and gene products. *Adv Drug Del Rev.* In press.
 - 13) 山口照英、内田恵理子：生物薬品のウイルス安全性を目的とした核酸増幅検査 (NAT) のフィージビリティースタディー. *医薬品研究*, 34, 763-769 (2003)

2. 学会発表

- 1) 藤野智史、宇根瑞穂、豊田淑江、山口照英、井上和秀、最上（西巻）知子：表面プラズモン共鳴センサーを用いた核内受容体 FXR リガンド結合の測定. 日本薬学会 123 年会. (2003. 3. 23、長崎)
- 2) Kanayasu-Toyoda, T., Oshizawa, T., Suzuki, T., Uchida, E., Hayakawa, T. and Yamaguchi, T: Role of PKC ϵ on G-CSF signaling pathway in differentiating HL-60 cells into neutrophils. The 6th World Congress on Inflammation. (2003. 8. 5 Vancouver, Canada).
- 3) Kanayasu-Toyoda, T., Oshizawa, T., Suzuki, T., Uchida, E., Hayakawa, T. and Yamaguchi, T Role of PKC ϵ on G-CSF signaling pathway in differentiating HL-60 cells into neutrophils. 第 76 回日本生化学大会. (2003. 10. 16、横浜)
- 4) Fujino T, Sato Y, Une M, Kanayasu-Toyoda T, Yamaguchi T, Shudo K, Inoue K and Nishimaki-Mogami T : In vitro FXR ligand sensor assay using surface plasmon

resonance and based on ligand-induced
coactivator association. 第 76 回日本生化学大会. (2003. 10. 17、横浜)

- 5) 有川稔多加、豊田淑江、山口照英、小村健、早川堯夫、森田育男；血管内皮細胞

化に伴う各種コネクシンの発現変化 第
24 回日本炎症・再生医学会. (2003. 11.
26、京都)

表1. リアルタイム PCR 及び RT-PCR によるウイルスゲノム定量に用いてプライマー及びプローブ

	Primer and probe set
HSV-1	5'-GCGTCATGGTCATGGCAAG-3' 5'-TTGACTCTACGGAGCTGGCC-3' FAM-labeled 5'-TGGAGCTGATGCCGTAGTCGG-3'
Sindbis virus	5'-CAGGACGTCTATAACGCTCC-3' 5'-GAGAACATGAACTGGGTGGTGTC-3'
HBV	5'-ACTCTTGGACTCBCAGCAATG 5'-CTTTATACGGGTCAATGTCCA FAM-labeled 5'-CTTTTTACCTCTGCCTAATCATTCWTGTCA
HCV	5'-TGCGGAACCGGTGAGTACA 5'-CTTAAGGTTTAGGATTTCGTGCTCAT FAM-labeled 5'-CACCTATCAGGCAGTAACCAC AAGGCC

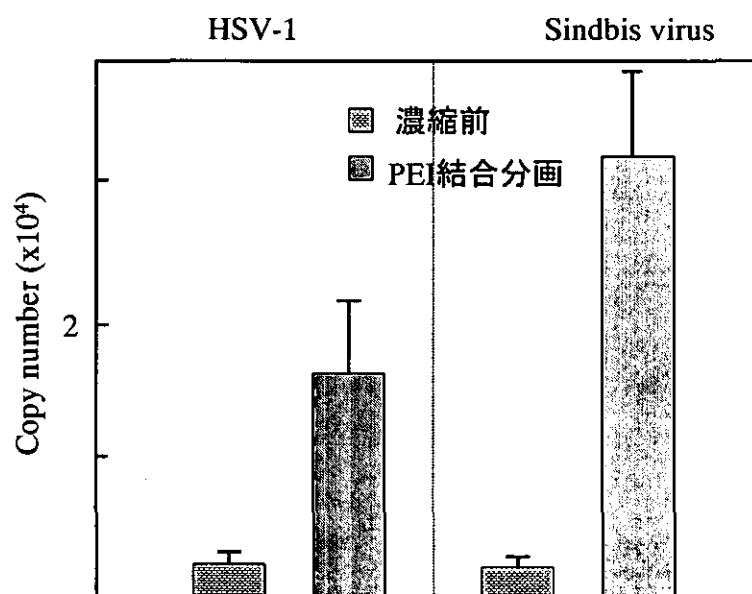


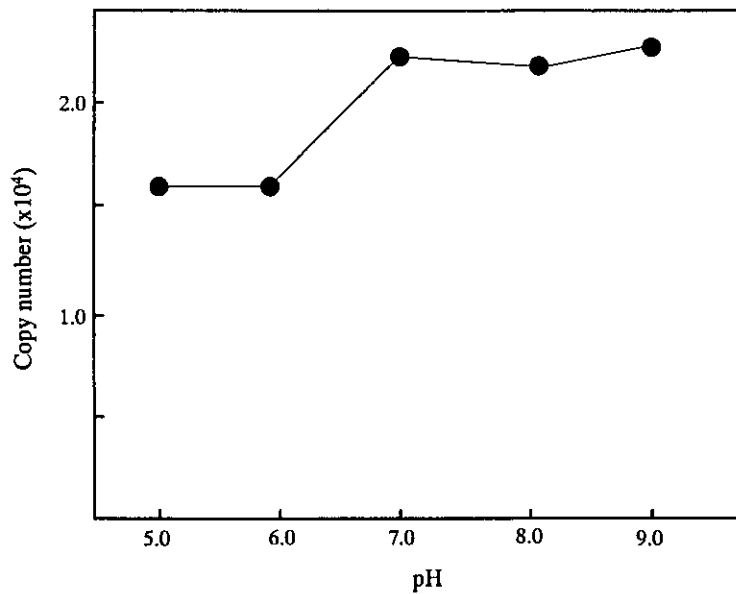
図1 HSV-1 及び sindbis virus の PEI 磁気ビーズによる濃縮

表2. PEIの分子量の違いによる濃縮効率の差異
(copy number $\times 10^4$)

	MW70,000	MW 1,800
-serum	4.26 \pm 0.48	1.95 \pm 0.67
+serum	3.46 \pm 0.24	1.0 \pm 0.1

5×10^4 コピー/mlのウイルス液1mlをEPI磁気ビーズに結合させた。

図2. Effect of pH on the concentration of HSV-1 by PEI-beads



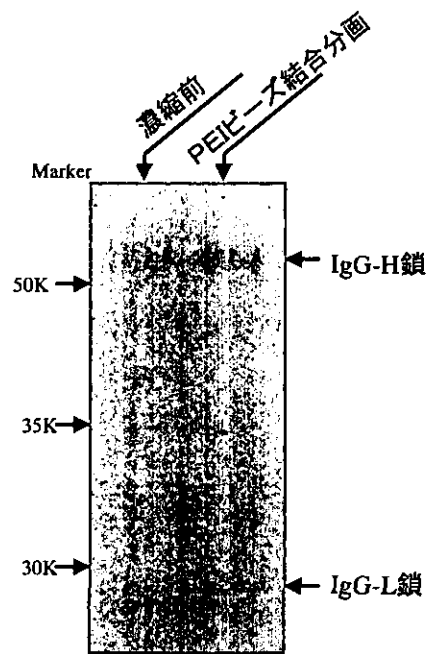


図3. PEI 磁気ビーズによる IgG の濃縮

図4. 抗HSV-1抗体のPEI磁気ビーズによるウイルス濃縮への影響

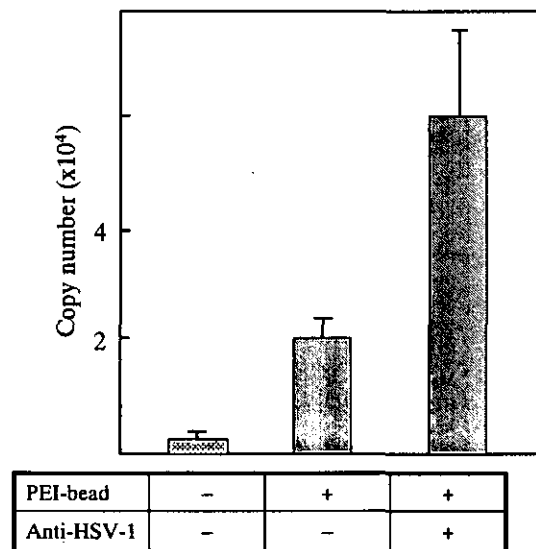


図5. PEI磁気ビーズによるHBVの濃縮と抗HBV抗体の影響

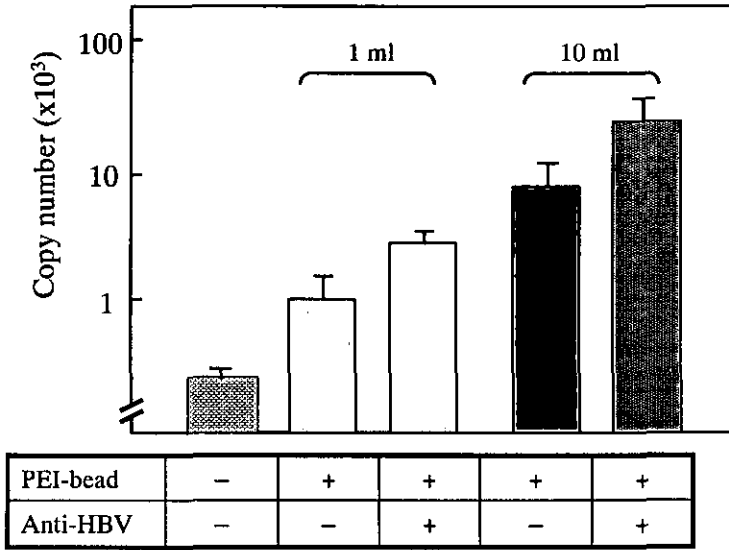


図6. PEI磁気ビーズによるHCVの濃縮

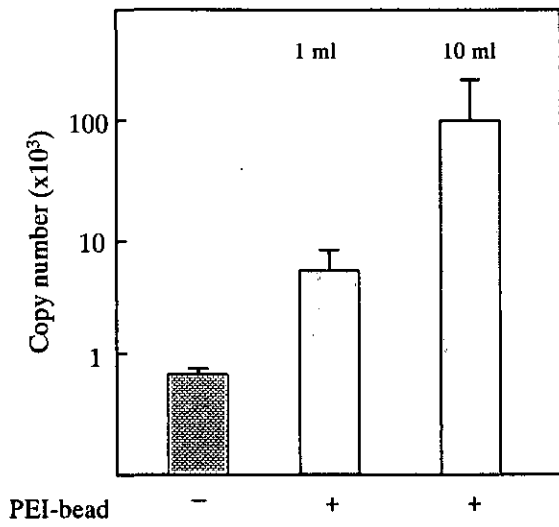


表 3. アレイ上のサイトカインの位置と名称

position	cytokines	
1A	Pos	positive control
1B	Pos	positive control
1C	Pos	positive control
1D	Pos	positive control
1E	Neg	negative control
1F	Neg	negative control
1G	ENA-78	Epithelial neutrophil-activating protein 78
1H	GCSF	Granulocyte-colony stimulating factor
1I	GM-CSF	Granulocyte-macrophage colony stimulating factor
1J	GRO	Growth Related Oncogene
1K	GRO- α	Growth Related Oncogene-Alpha
2A	I-309	I-309
2B	IL-1 α	Interleukin 1 Alpha
2C	IL-1 β	Interleukin 1 Beta
2D	IL-2	Interleukin 2
2E	IL-3	Interleukin 3
2F	IL-4	Interleukin 4
2G	IL-5	Interleukin 5
2H	IL-6	Interleukin 6
2I	IL-7	Interleukin 7
2J	IL-8	Interleukin 8
2K	IL-10	Interleukin 10
3A	IL-12	Interleukin 12
3B	IL-13	Interleukin 13
3C	IL-15	Interleukin 15
3D	IFN- γ	Interferon gamma
3E	MCP-1	Monocyte Chemoattractant Protein 1
3F	MCP-2	Monocyte Chemoattractant Protein 2
3G	MCP-3	Monocyte Chemoattractant Protein 3
3H	MCSF	Macrophage-colony Stimulating Factor
3I	MDC	Macrophage-derived Chemokine
3J	MIG	Monokine induced by gamma interferon
3K	MIP-1 β	Macrophage Inflammatory Protein 1 Beta

4A	MIP-1 δ	Macrophage Inflammatory Protein 1 Delta
4B	RANTES	regulated upon activation, normal T-cell expressed, and presumably secreted
4C	SCF	Stem Cell Factor
4D	SDF-1	Stromal cell-driven factor
4E	TARC	Thymus and Activation-Regulated Chemokine
4F	TGF- β 1	Transforming growth factor-beta 1
4G	TNF- α	Tumor necrosis factor-alpha
4H	TNF- β	Tumor necrosis factor-beta
4I	EGF	Epidermal growth factor
4J	IGF-I	Insulin-like growth factor-1
4K	Ang	Angiogenin
5A	OSM	Oncostatin M
5B	TPO	Thrombopoietin
5C	VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
5D	PDGF-B	Platelet-derived Growth Factor-B
5E	Leptin	Leptin
5F	BDNF	Brain-derived neurotrophic factor
5G	BLC	B-lymphocyte chemoattractant
5H	Ck β 8-1	Chemokine-beta-8
5I	Eotaxin	Eotaxin
5J	Eotaxin-2	MPIF-2 (Myeloid progenitor inhibitory factor-2)
5K	Eotaxin-3	MIP-4-alpha (macrophage inflammatory protein-4-alpha)
6A	FGF-4	Fibroblast growth factor-4
6B	FGF-6	Fibroblast growth factor-6
6C	FGF-7	Fibroblast growth factor-7
6D	FGF-9	Fibroblast growth factor-9
6E	Flt-3 Ligand	fms-like tyrosine kinase-3 ligand
6F	Fractalkine	Fractalkine
6G	GCP-2	Granulocyte Chemotactic Protein-2
6H	GDNF	Glial-derived Neurotrophic Factor
6I	HGF	hepatocyte growth factor
6J	IGFBP-1	Insulin-like growth factor binding proteins-1
6K	IGFBP-2	Insulin-like growth factor binding proteins-2
7A	IGFBP-3	Insulin-like growth factor binding proteins-3

7B	IGFBP-4	Insulin-like growth factor binding proteins-4
7C	IL-16	Interleukin 16
7D	IP-10	Interferon gamma inducible protein-10
7E	LIF	Leukemia Inhibitory Factor
7F	LIGHT	LIGHT
7G	MCP-4	Monocyte Chemoattractant Protein 4
7H	MIF	mesoderm inducing factor
7I	MIP-3 α	Macrophage Inflammatory Protein-3 alpha
7J	NAP-2	Neutrophil Activating Peptide 2
7K	NT-3	neurotrophin-3
8A	NT-4	neurotrophin-4
8B	Osteoprotegerin	Osteoprotegerin
8C	PARC	Pulmonary and Activation-Regulated Chemokine
8D	PIGF	Placenta growth factor
8E	TGF- β 2	Transforming growth factor-beta 2
8F	TGF- β 3	Transforming growth factor-beta 3
8G	TIMP-1	tussue inhibitor of metalloproteinases-1
8H	TIMP-2	tussue inhibitor of metalloproteinases-2
8I	Neg	negative control
8J	Pos	positive control
8K	Pos	positive control

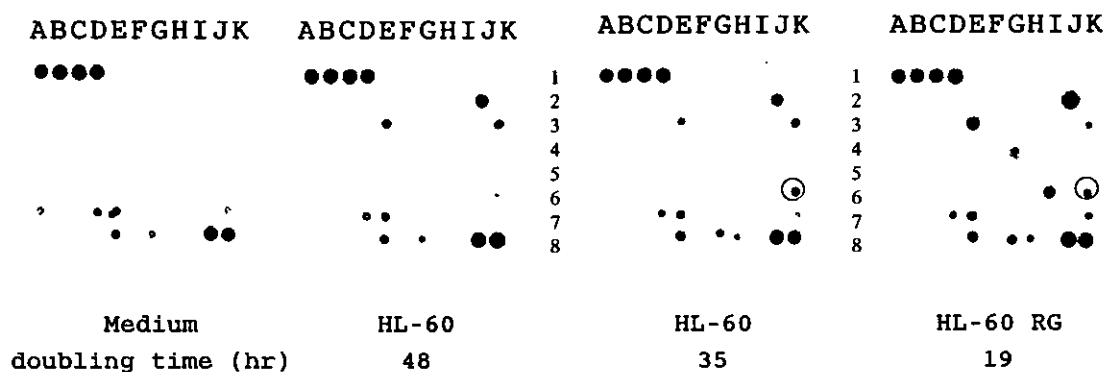


図7. HL-60 と HL-60RG の培養上清のサイトカインアレイによる解析

表4. ELISAによるHL-60細胞及びHL-60R/G細胞の産生する各種サイトカインの定量

	IL-2	IL-4	IL-5	IL-6 (pg/ml)	IL-8 (pg/ml)	IL-10	HGF (pg/ml)	VEGF (pg/ml)	TNF- α	IFN- γ	M-CSF	GM-CSF
HL-60R/G細胞	ND	ND	ND	15.8 \pm 3.2	139 \pm 30	ND	4560 \pm 672	389 \pm 26	ND	ND	ND	ND
HL-60細胞	ND	ND	ND	ND	286 \pm 12	ND	ND	185 \pm 6	ND	ND	ND	ND

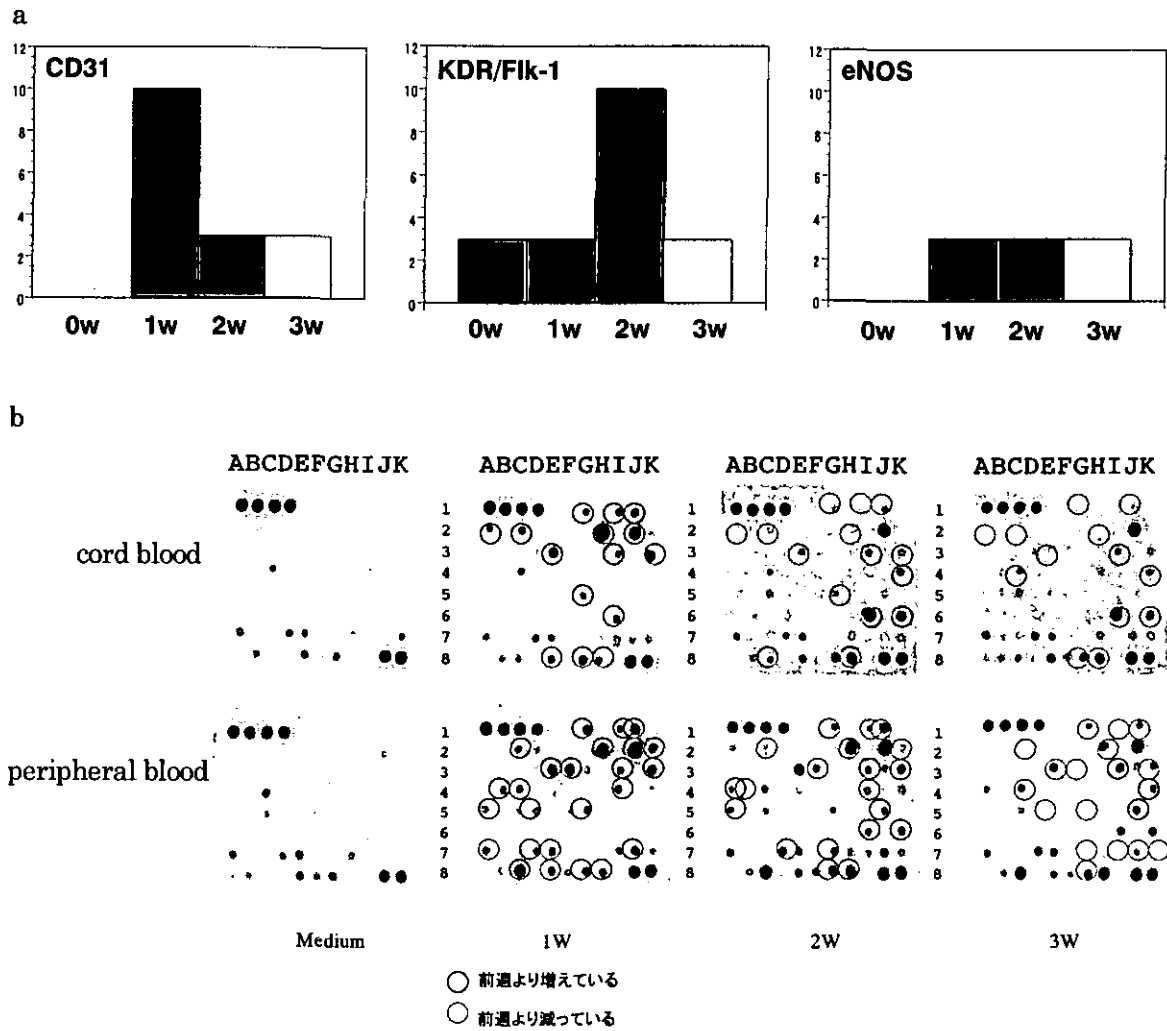


図 8. 臍帯血、末梢血由来の AC133 陽性細胞の培養上清のサイトカインアレイによる解析

図9. ファイブロネクチン上で培養した末梢血由来血管内皮前駆細胞のKDR発現の変化

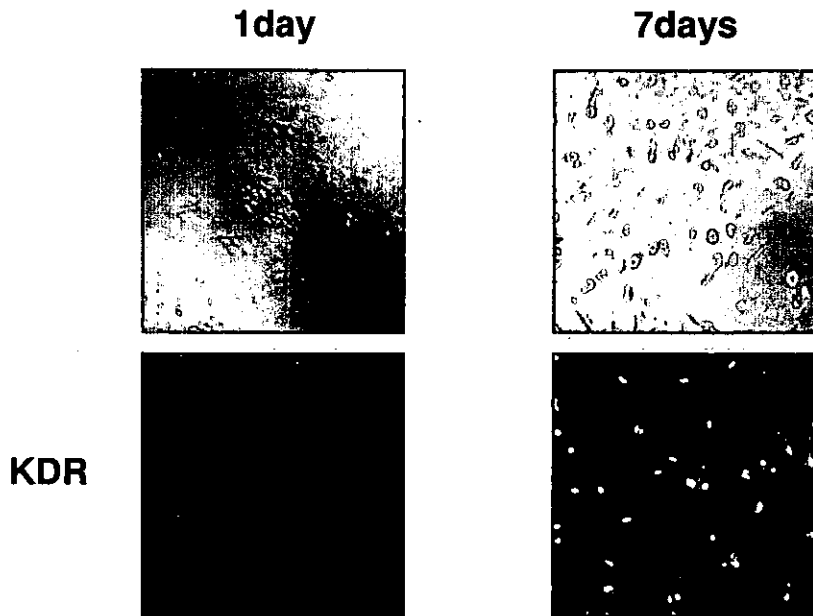


図10. 末梢血由来血管内皮前駆細胞の培養1日目におけるCx37、Cx40、Cx43の発現

免疫染色 (1day):

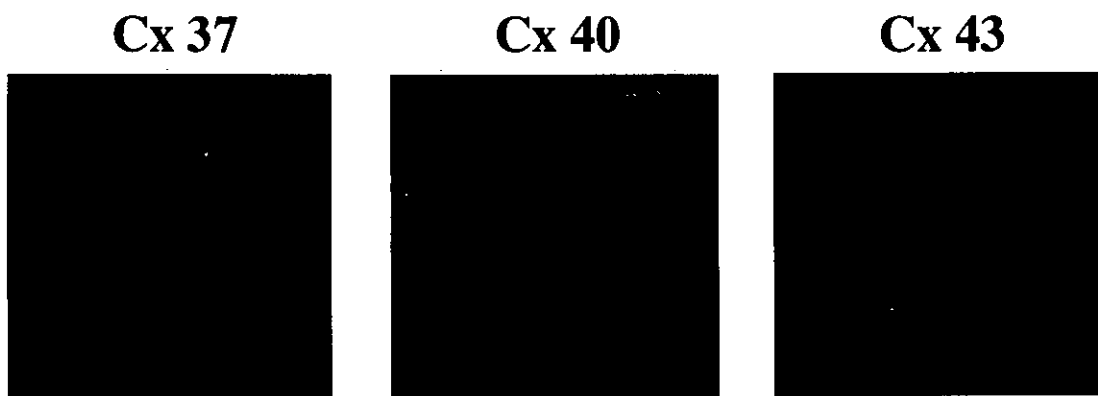


図11. 末梢血由来血管内皮前駆細胞から分化した
内皮細胞のCx37、Cx40、Cx43の発現

免疫染色 (7day):

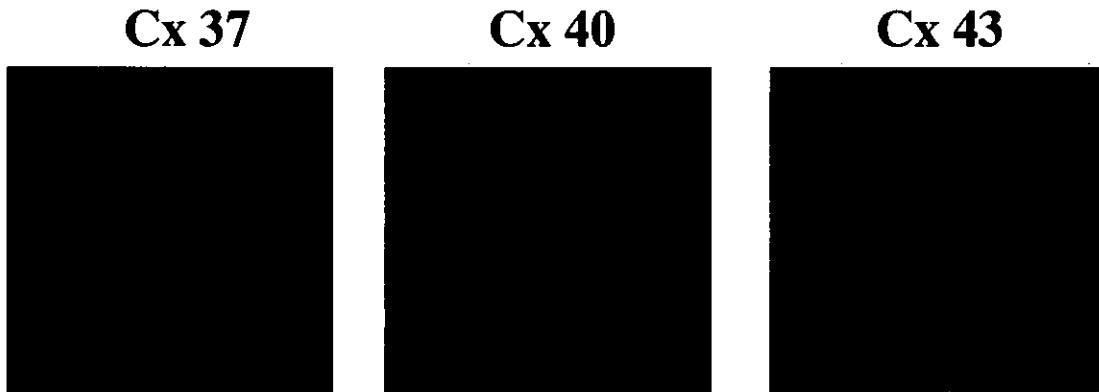


図12. ヒト臍帯内皮細胞における
Cx37、Cx40、Cx43の発現

免疫染色:

