

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

血液製剤の安全性確保のための技術開発と
標準化及び血液製剤の精度管理法の開発に関する研究

平成19年度 総括研究報告書

主任研究者 山口 照英

平成20（2008）年4月

厚生労働科学研究費補助金（医薬品・医療機器等イノベーション・サイエンス総合研究事業）
平成19年度総括研究報告書

血液製剤の安全性確保のための技術開発と
標準化及び血液製剤の精度管理法の開発に関する研究

主任研究者 山口 照英 国立医薬品食品衛生研究所・生物薬品部・部長

研究要旨

血液製剤のウイルス安全性確保のための基盤技術開発を目的とした研究を実施し、以下のような成果が得られた。

- 1) 各国の血漿分画製剤のウイルス安全性に関する動向調査を行い、ウイルス不活化に関する動向を調査した。化学薬品処理、光増感剤と可視光や長波長紫外線を組み合わせた処理など、多くの方法が検討されてきている。それぞれ処理により、ウイルスゲノムやエンベロープの有無で効果が異なるが、少なくとも全てのウイルスが完全な不活化される条件は得られていない。
- 2) 効率的なウイルス不活化法やウイルス除去法の開発を目指し、ウイルス不活化法の開発として、ペンタデカフルオロオクタン酸(PFOA)によるウイルス不活化を検討した。その結果、エンベロープウイルス（HSV-1、VSV、Sindbis）について最大で6-7オーダーのウイルスクリアランスという有効な効果が認められた。一方、Poliovirus やブタパルボウイルスなどのベロープウイルスに対しては不活化効果が認められなかった。PFOA の作用条件を検討したところ、酸性条件で最も強い不活化効果が認められた。しかし、酸性条件下では不安定な生物薬品もあることから、不活化工程として PFOA を用いる場合には、製品の特性に応じた条件を選択する必要があると思われる。
- 3) E型肝炎ウイルスの安全性確保を目的として、NAT等の検出のためのHEV参照品作製に関する基盤研究を行った。すなわち、ブタにHEVを感染させた血漿を原料として、参照品を調製するためにポリエチレンジアミン(PEI)磁気ビーズへの結合について解析した。その結果、4種類のHEVサブタイプは、いずれもPEI磁気ビーズへ効率よく結合することを見出した。また、複数の細胞株を用いてHEVのインビトロ感染系の確立を目指した。

研究協力者

内田恵理子 国立医薬品食品衛生研究所
遺伝子細胞医薬部
村田充弘 JSR株式会社 筑波研究所
柚木幹弘 株式会社ベネシス 枚方研究所
生田和良 大阪大学 微生物病研究所

ウイルスの同定とその検出法の開発により着実に向上してきている。特に、1990年代後半より、血清学的検査や問診に加えて各国で原料血漿のウイルススクリーニングとして核酸増幅試験（NAT）が実施される様になり、その安全性は飛躍的に増してきている。しかしながら、NATのように現在最も感度が良いとされる検出法を用いても、非常にまれな頻度ではあるが、検査をすり抜けたウイ

A. 研究目的

血液製剤の安全性は長年にわたる病原ウ

ルス陽性血液製剤により感染が起こることが報告されてきている。また、ウインドウ期の HCV や HIV 陽性血漿では、現在最も高感度なウイルス検出手段とされる NAT を用いて個別検体の検査を行っても検出出来ないほど低濃度の混入でも、輸血による感染が成立することも報告されている。

また、S.D.処理やナノフィルトレーションなどいくつかの有効なウイルス不活化・除去法が、血液製剤の製造工程に導入され、その安全性は格段に増してきている。しかし、製品によってはこれらの処理が適さない場合等もあり、より有効なウイルス不活化・除去法が開発できれば製剤毎の製造工程の選択の幅が広がり、より合理的な安全性確保対策が可能になると考えられる。また、輸血用血液製剤では、血漿分画製剤に適用されているようなウイルス不活化工程を採用することが困難であり、全く異なるアプローチが必要であり、これまで、複数のウイルス不活化法が開発されてきている。

HEV に関しては血清学的及び NAT による検出手法が確立しているが、その輸血による感染リスクについてはここ数年いくつかの報告があるが、これまで十分なデータの蓄積がなかった。従って、HEV 検出試験法の標準化や検出手法の評価には、参照品やセロコンバージョンパネルの作成が望まれている。

E 型肝炎ウイルスの安全性確保を目的として、NAT 等の検出手法の標準化に用いるための参照品を作製する。このためにブタに HEV を感染させた血漿を原料として用いる。さらに、感染させたブタのセロコンバージョンパネルを作製する。これらの、参照品やセロコンバージョンパネルを用いて HEV の NAT 等による検出手法の評価等への適用について諸条件を明らかにする。

本年度は、血液製剤の安全性確保を目的として、ウイルス不活化法の開発動向について

文献を始め、様々な角度から検討を行った。また、新規ウイルス不活化法として、強い界面活性化剤としての作用をもつ PFOA の有用性について、モデルウイルスを用いた検討を行った。

また、HEV の参照品作成のための基盤研究として、SPF ブタに投与して得た複数の HEV 陽性試料の参照品としての有用性を確認すると共に、HEV 検出の高感度化を目的として、PEI 磁気ビーズを用いた HEV 濃縮法の適用について解析した。

B. 研究方法

1. 血液製剤のウイルス安全性に関わる国際的動向調査

ウイルス不活化に関する文献情報を始め、各種公開情報を用いて調査研究を行った。

2. パーフルオロオクタン酸(PFOA)によるウイルス不活化の検討

(1)モデルウイルス：エンベロープのある DNA ウイルスである単純ヘルペスウイルス I 型 (HSV-1)、エンベロープのある RNA ウイルスであるシンドビスウイルス (Sindbis) 及びウシ水疱性口内炎ウイルス (VSV)、エンベロープのない RNA ウイルスであるポリオウイルス (Poliovirus) sabin 1 型を用いた。

(2)ウイルス感染試験：各ウイルスを PFOA (濃度の検討時以外は 5mM) で処理した。タイムコースを検討する場合は、一定時間後に脱脂 BSA 1.5%を含む PBS を添加して反応を停止した。PFOA 処理後、ウイルスは 5 倍希釈列を作成した。Vero 細胞を 96 well plate に 8×10^3 細胞/well 播種して一晚培養後、ウイルス希釈液 100 μ l を添加して感染させ、2~3 日間培養した。培養後、最終濃度 0.01%のニュートラルレッドを加えてさらに 2,3 時間培養染色し、540 nm の吸光度測定により細胞変性効果 (CPE) を定量化し

て、TCID₅₀ を算出した。

3. RT-PCR

HEV のプライマー/プローブ (表 1) を用いる場合には、Qiagen Kit を使用し、反応温度: 50°C 30min, 95°C 15min のあと 95°C 15sec, 60°C 1min の通常のサイクル反応を行った。HEV-2 のプライマー/プローブを用いる場合には、反応温度: 50°C 30min, 95°C 15min のあと 95°C 15sec, 60°C 1min の通常のサイクル反応を行った。

4. ウイルスのポリエチレンイミン磁気ビーズによる濃縮

ポリエチレンイミン (PEI) 磁気ビーズは、カルボキシル基を持つ磁気ビーズに、水溶性カルボジイミド存在下、平均分子量 70,000 の PEI をカップリングして作製した。通常の実験では、100 μ L (5mg の磁気ビーズを含む) の PEI 溶液を種々の濃度のウイルス液 1mL ないしは 10mL に添加した。10 分後に磁気ビーズを含む懸濁液を磁性スタンドにセットし、10 分間静置した。10 分後、上清を分取し、磁気ビーズを含む残液 100 μ L 及び磁気ビーズを添加する前のウイルス液 100 μ L の各液にウイルスゲノム抽出液 (EX-R&D、ゲノムサイエンス社) を加え、添付プロトコールに従ってウイルスゲノムを抽出した (図 1)。

(倫理面への配慮)

本研究で用いた細胞はいずれも樹立された継代培養細胞であり、倫理面に関する問題はない。また、ヒト試料を用いた検討は研究倫理委員会の承認を受けた上で行った。また、ヒト正常血漿及びヒト正常血清は市販品を用いた。

C. 研究結果

1. 血液製剤のウイルス安全性に関わる国際

的動向

血液製剤のウイルス安全性の確保を目的とした基盤技術開発に関して、次のような研究を実施した。

血液製剤のウイルス安全性に関しては、問題となるウイルスの同定と検出法の開発、検出法の高感度化・高精度化を重ね、著しい進歩が見られている。特に、NAT の導入により、検出感度は飛躍的に向上している。また、生物由来原料基準の制定や、血液製剤の安全性に関する指針の発出等を通じて、制度的整備も進んでいる。

しかし、HIV、HCV、HBV、HTLV をはじめとした既知のウイルスであっても、NAT も含め検出の限界があり、ウインドウ期や低濃度キャリアの検出能に関しては依然として課題が残っている。また、全てのウイルスに対する試験を実施することは費用対効果の観点からも現時的ではない。さらには、近年いつアウトブレイクが起こるか懸念されている高病原性鳥インフルエンザウイルスや海外では既に常在化しているウエストナイルウイルスなど新興感染症の発症を考慮したとき、新たな対応を模索しておく必要がある。

ウイルス検出では、測定上の限界も存在することを考慮した場合に、求めるべきウイルス安全対策の一つの柱は、ウイルス不活化工程を如何に導入していくかであろうと考えられる。血漿分画製剤に関しては、製造に用いられる工程が如何にウイルスを除去、不活化出来るかというウイルスクリアランス能を評価する技術開発が 1990 年代から本格的に取り組みが行われ、指針にもその考え方が明確に述べられている。

一方、輸血用血液製剤に関しては、必ずしも十分な取り組みが行われてきたわけではなかった。新鮮凍結血漿を含め、赤血球製剤や血小板製剤では、血漿分画製剤の様な効率的な精製工程や、製品の本質に影響しないよ

うなウイルス不活性化工程を導入することが非常に困難であったためと考えられる。しかし、古くからウイルスゲノムをターゲットする不活性化法などの開発が進められては来ていた。そこで、現在の輸血用血液製剤の不活性化工程に関する世界的動向について調査研究を行った。

1.1. 輸血用血液製剤のウイルス安全性に関わる国際的動向

輸血用血液製剤に関しては、新鮮凍結血漿や血小板製剤、赤血球製剤に関して様々な技術開発が行われている。新鮮血漿に関しては、solvent/detergent (S/D) 処理、メチレンブルー/光増感処理、ソラレン化合物 S59/UV 照射処理、リボフラビン/光増感処理などが行われている。また、血小板製剤に関しては、ソラレン化合物 S59/UV 照射処理、リボフラビン/光増感処理などの不活性化技術の開発が試みられている。赤血球製剤に関しては、リボフラビン/光増感処理や Dimethylmethylene blue/光増感処理などの開発が進められている。

Methyleneblue/光増感処理については既に EU の複数の国で承認され臨床にも使われている。これまで開発されてきている多くの方法が、ウイルスの核酸をターゲットとした反応であり、S/D 処理のようにエンベロープの有無には影響されないとされている。むしろ、ウイルスゲノムの長さが大きく影響するとされている。用いる試薬の除去や残存性などを含め、安全性に関する試験も実施されており、一般的な安全性試験で有望な結果も得られている場合がある。ただ、長期に渡る影響については、それほど長い期間でのデータが得られているわけではないために今後の重要な検討課題であると思われる。

1.2. Methylene blue/光増感処理

Methylene blue は可視光照射により励起

され、そのエネルギーを酸素分子に供与して一重項酸素を生成する Type II 反応と、基質にエネルギーが移動し、プロトンあるいは電子の移動を伴う Type I 反応により、ウイルスを不活化する。主としてウイルスの核酸が標的となり、ウイルス遺伝子に傷害を与えることで感染性を除去するとされている。

新鮮血漿の不活性化工程では、Methylene blue を終濃度 $1\mu\text{M}$ になるように添加し、十分に混和した後、白色蛍光灯光を照射し、再度急速凍結した後、保存する。この方法により、HIV ($> 2.7 \log_{10}$), vesicular stomatitis virus (VSV) ($> 5.7 \log_{10}$), herpes simplex virus (HSV) ($> 3.0 \log_{10}$), influenza virus ($> 5.5 \log_{10}$) の不活性化率が得られると報告されている。また懸念される新鮮血漿中の有効成分の活性に関しては、再度融解後の凝固因子活性は第 VIII, IX 因子等、ほぼ 80% 以上保持されていると言われている。

赤血球製剤に関しては、Methylene blue の代わりにより疎水性の高い Dimethyl methylene blue を用いた不活性化法が開発が行われている。Dimethyl methylene blue は、赤色光により活性化される光増感色素であり、DNA に対する親和性は Methylene blue の 10 倍であり、1 重項酸素は発生するための量子吸光係数も Methylene blue に比較して大きい。すなわち、Dimethyl methylene blue は DNA への強い親和性と、1 重項酸素を産生させてウイルス核酸障害がその不活性化の主たる機序と考えられている。

Dimethyl methylene blue による赤血球製剤の不活性化は、ヘモグロビンの吸収波長と重ならない 600nm 以上の光が有効であるとされている。通常の赤血球製剤はヘマトクリットが 60% であるため、いくら長波長の光を照射するとしても、そのままの状態では色素まで光が到達しない。そのため、病原体不活性化効果を得るためには、ヘマトクリットを

30% にまで低下させる必要があるとされている。その結果、種々の細胞内、細胞外ウイルスの不活化が可能となり、赤血球に及ぼす影響も、溶血率はコントロール群に比べ若干上昇するものの臨床上許容範囲内であり、形態スコア、カリウムイオン漏出、ATP および 2, 3-DPG レベルはコントロール群とほぼ同程度であるとされている。また、色素濃度を高くし、光源をエネルギーの大きい赤色発光ダイオードにすることにより、ヘマトクリット 45% においてもウイルス不活化が可能になったとされている。しかし、光エネルギーが大きいと赤血球膜への酸化傷害もより大きくなるため、カリウムイオンの漏出を防ぐことが出来ないとされ課題も残されている。

1.3. リボフラビン

リボフラビンを用いた光増感のウイルス不活化工程では、終濃度は $60\mu\text{M}$ のリボフラビンを添加し、波長 265~370nm の紫外線を 6.2J mL で約 8 分間照射するとされている。ウイルスや細菌、細胞内の核酸にインターカレートし、光増感作用により核酸に傷害を与え、遺伝子の複製や転写を阻害することにより、ウイルスを不活化することが知られている。

リボフラビンは生体由来成分であり、栄養素の一つであることから、その毒性は無いと考えられている。また光照射により分解産物であるルミクロームが生成するが、新生児黄疸の治療に光線療法が用いられてきた経験からしても、ルミクロームの毒性もほとんど無いと考えられている。Ames テストによる遺伝毒性やマウスによる急性毒性試験においても、ルミクロームは何の毒性も示さなかったことから、リボフラビン光処理した製剤からは、薬剤を除く必要が無いと考えられている。

血小板製剤に添加したウイルス不活化能

のデータとして、細胞内感染している HIV では $5.9\log_{10}$ 、PPV では $5.0\log_{10}$ 、ウエストナイルウイルス では $5.2\log_{10}$ 不活化されると報告されている。細菌についても、表皮ブドウ球菌で $>4.2\log_{10}$ 、大腸菌で $>4.4\log_{10}$ の不活化率が得られると報告されている。バフィーコート由来、アフエーシス由来の如何に関わらず処理後 1 日保存、5 日間保存した後の血小板数、pH、は減少し、乳酸値、グルコース消費量、形態スコア、P-セレクチン発現量 (活性化マーカー) が有意に上昇したと報告されている。

また、リボフラビン $30\mu\text{M}$ を含む血漿に 30~60 分間、長波長紫外線を照射することにより、canine parvovirus を $>4.7\log_{10}$ 、PPV を $>4.6\log_{10}$ 、HAV を $2.5\sim 3.6\log_{10}$ と、不活化が困難なノンエンベロープウイルスを不活化することができると報告されている。

1.4. ソラレン化合物

ソラレンはある種の高等植物に含まれる化合物で、多くの天然誘導体が存在する。ソラレンは RNA あるいは DNA の高次構造の研究に用いられる核酸の架橋剤で、一本鎖及び二本鎖の核酸に可逆的に挟み込まれるように結合する。その状態で長波長紫外線 ($320\sim 400\text{nm}$) を照射するとソラレンは核酸に共有結合し、ソラレンで修飾されたウイルスあるいは細菌のゲノムは、もはや転写や複製ができなくなり、したがって増殖不能となる。

Cerus 社では、100 種類以上の新たに合成されたソラレン化合物の中から、溶解性が高く、かつ細胞侵入性を持ち、核酸親和性が高い最もウイルス不活化効果の高い化合物として S-59 を見いだして、そのウイルス不活化工程への適用について検討を行っている。S-59 は当初、血小板製剤に対する病原体不活化法として検討されてきた薬剤であ

るが、血漿への応用も進められている。

血漿に S-59 を添加し長波長紫外線を照射することにより、HIV を $>6.4 \log_{10}$ 、WNV を $>6.7 \log_{10}$ 、マラリア原虫を $>7.4 \log_{10}$ を不活化することができると報告されている。患者を対象とした血漿交換における治療効果の評価を行う第 III 相臨床試験を含め、155 名の凝固異常患者に対する第 III 相臨床試験とともに、S-59 血漿の治療効果は通常血漿と同等であるという結果が得られているようである。

ソラレン類には発癌性、変異原性があることが分かっており、S-59 もそれらの毒性を持つことが危惧されていた。これまで出されている報告では、S-59 存在化に長波長紫外線処理を行ったものと、処理をしていない製剤との比較が行われ、急性毒性、反復投与毒性、腎、心臓系への毒性、生殖性毒性、遺伝毒性、発癌性、変異原性は認められなかったとされている。しかし、中枢神経系、心電図への影響や光毒性が見られたが、臨床使用の 30,000 倍もの過剰量で見られた現象であることから、毒性に関連する有害な作用は無いと結論されている。

EU で、103 名の血小板減少性患者に対し（テスト群 52 名、対照群 51 名）、S-59 及び長波長紫外線照射処理血小板製剤と標準血小板製剤に有効性及安全性に差異があるかどうか、第 III 相臨床試験が行われた。長期的回帰分析の結果、投与 1 時間および 24 時間後の血小板数増加補正值に両群間で差はなかったが、輸血血小板数、輸血前の血小板保存期間、輸血前患者血小板数、患者体重において、統計的有意差が見られたと報告されている。全ての患者において、S-59 処理血小板に対する抗体産生はみられなかった。血小板輸血に関連する既知の副作用（発熱、悪寒、発疹等）はみられたが、両群間で有意差は無かったとされている。これらのことから、S-59/長波長紫外線処理血小板はこれま

での血小板と同等であると結論づけられている。

2. パーフルオロオクタン酸(PFOA)によるウイルス不活化の検討

血液製剤のウイルス安全性確保の一つとして適切な不活化工程の導入があげられる。製造において適切なウイルスの不活化、除去工程を採用することが重要である。血漿分画製剤では、ウイルス不活化工程のひとつとして S/D（有機溶媒/界面活性剤）処理がエンペローブウイルスの不活化に効果的な工程として用いられているが、より広範な医薬品に適用可能なウイルス不活化法を開発できれば血液製剤の安全性上意義が高い。パーフルオロオクタン酸(PFOA)は様々な基材の耐水性表面加工原料として用いられている界面活性剤で、そのポリマーは耐水性に優れ、界面活性作用が強い。PFOA は S/D 処理で用いられる界面活性剤に代わるウイルス不活化作用を持つ可能性があることから、PFOA のウイルス不活化作用を検討した。

まず、PFOA によるウイルス不活化の濃度依存性を検討した (Fig. 2)。その結果、モデルウイルスのうち、HSV-1、Sindbis virus は 3mM 以上で、また VSV では 5mM でウイルスによる細胞変性の阻害が観察され、PFOA による不活化が認められた。一方、Poliovirus については PFOA による不活化効果は認められなかった。

次に、PFOA による不活化の time course を検討した (Fig. 3)。その結果、HSV-1 は PFOA で 10sec 処理するだけで感染性が完全に消失したが、Sindbis virus や VSV では PFOA 処理 1min 程度までは感染性の低下がほとんど認められず、処理時間を延長するに従い徐々に感染性が低下するが、完全な不活化には 10 分以上の処理が必要であった。

さらに、PFOA で処理する際の pH について検討した (Fig. 4)。HSV-1 では pH4-8 で

同様の強い不活化効果が認められ pH による影響は観察されなかった。一方、VSV の場合、pH4-6 で強い不活化が認められたが、pH7、8 では PFOA の効果は低く、弱酸性条件下で不活化効果が高いことが判明した。

一方、血漿分画製剤と異なり、精製工程や分画工程によりウイルスの除去や不活化を行うことは、輸血用血液製剤においては困難が伴う。上述したようにいくつかのウイルス不活化工程が、開発中であるが必ずしも満足できるデータが得られているわけではない。今回の検討した PFOA は、血球成分に対しては適用が困難かもしれないが、新鮮凍結血漿には適用かのかかもしれない。何なら PFOA を除去する工程が必要となると考えられるが、その特性からカラム等での除去も可能と思われる。また、PFOA 関連物質の検討も有用かもしれない。

3. E 型肝炎ウイルス (HEV) NAT 参照品作製のための基盤研究と HEV 濃縮法の開発

HEV の安全性確保を目的として、HEV NAT 参照品を作成するための基盤研究を行った。SPF ブタに感染させた糞便より部分精製した HEV を DMEM 培地で希釈し、リアルタイム RT-PCR により検出したところ、HEV-1 のプライマープローブを用いることにより検出することが可能であった。次に、HEV の PEI 磁気ビーズによる濃縮が可能か検討した。図 5 に示すように、PEI 磁気ビーズを用いることにより 1ml のウイルス液から効率よく HEV が濃縮可能であったが、10ml からではむしろ 1ml より濃縮効率が低下した。さらに、濃縮時の pH の影響についても検討を行ったところ、pH4.0 が最も濃縮効率が高く、pH6 が最も低いという結果になり、他のウイルスと挙動が大きく異なっていた。

HEV 参照品作製に関する基盤研究の一環として、サブタイプの異なる HEV に PEI 磁気ビーズが適用可能か検討を行った。その結果、4 種類の HEV サブタイプ (ジェノタイプ III 3 種類、ジェノタイプ IV 3 種類) は、いずれも PEI 磁気ビーズへ効率よく結合することを見出した (Fig. 6)。

また、複数の細胞株を用いて HEV のインビトロ感染系の確立を目指した。その結果、HuH7 や A549 細胞への感染が認められた。また、PEI 磁気ビーズを用いて強制的に細胞内へ HEV を感染させる系の開発を行った。その結果、A549 細胞や HuH7 細胞で効率的な HEV の感染が認められた。

D. 考察

1. 血液製剤のウイルス安全性に関わる国際的動向

輸血用血液の安全性を確保するためウイルス不活化が大きな注目を集めている。しかし、現時点で実用化されているのは血漿製剤に対する S/D 法及び MB/光照射法であり、血小板製剤に対しては S-59/長波長紫外線照射があげられる。しかし、赤血球製剤については臨床治験に入っているものもあるが、中止になったり未だ前臨床試験段階であったりと、実用化には今しばらく時間を要するのではと考えられる。特定の製剤のみ不活化が可能であるとしても、それは輸血用の血液製剤のウイルス安全性が担保されるとは言えないであろう。また、現行の方法に変わる技術開発や、現行法のさらなる向上も試みられている。

一方、これらの開発されている手法は、必ずしもウイルスの完全な不活化につながる手法ではないことも注意しなければならない。また、費用対効果についても十分検討を行う必要がある。さらに、一般の毒性試験についてはある程度の担保ができていよう

ではあるが、長期に渡る安全性やヒトでの臨床経験が十分に蓄積しているわけではないことも改めて注視しておく必要がある。

血液製剤のウイルス安全性は長年の課題であり、不活化工程の開発動向に今後とも調査を続けていく必要がある。

2. パーフフルオロオクタン酸(PFOA)によるウイルス不活化の検討

生物由来製品のウイルス不活化法の開発として、ペンタデカフルオロオクタン酸(PFOA)によるウイルス不活化を検討した。その結果、エンベロープウイルス(HSV-1、VSV、Sindbis)について最大で6-7オーダーのウイルスクリアランスという有効な効果が認められた。一方、非エンベロープウイルス(Poliovirus および PPV ; データは示さず)に対しては不活化効果が認められなかった。これは PFOA が界面活性剤であり、ウイルスエンベロープを溶解することがその作用機序であることを考えると妥当である。PFOA の作用条件を検討したところ、酸性条件で最も強い不活化効果が認められた。しかし、酸性条件下では不安定な生物製品もあることから、不活化工程として PFOA を用いる場合には、製品の特性に応じた条件を選択する必要があると思われる。

PFOA によるウイルス不活化のタイムコースはウイルスにより大きく異なり、PFOA の感受性の高い HSV-1 では 10sec の処理で完全に失活したが、VSV や Sindbis virus では有効な不活化には 5 分以上の時間が必要であることが判明した。耐性の高いウイルスを不活化するには処理時間を十分に取る必要があることが示唆された。

ここでは示さなかったが、PFOA は HCV、HBV、HIV に対してもウイルスの不活化効果が認められるという予備的データを得ており、PFOA によるウイルス不活化は生物由来製品のウイルス不活化工程として有用で

ある可能性が考えられる。今後、他の溶剤との併用を含め、さらに検討を行う予定である。

3. HEV NAT 参照品作製のための基盤研究と HEV 濃縮法の開発

また、HEV 参照品作製に向けた検討を行い、SPF ブタに感染させた糞便より部分精製した HEV の有用性を明らかにすることができた。また、PEI 磁気ビーズの HEV の濃縮に適用出来る可能性が示され、この点についても今後検討を進めていく予定である。

E. 結論

①輸血用血液製剤のウイルス不活化法の開発動向について調査を行い、いくつかの製品の有用性が示されていると考えられた。しかし、不活化工程として期待されているウイルス安全性については以前改良の余地があると思われる、今後の開発動向に注視する必要があると思われる。

②効率的なウイルス不活化法やウイルス除去法の開発を目指し、PFOA を用いたウイルス不活化能についてモデルウイルスを用いて検討を行った。PFOA は試みたエンベロープウイルスに対しては効果的な不活可能を持つことが示された。さらに、不活化の最適条件を検討すると共に、PFOA 以外の関連化合物の効果についても今後検討する予定である。

③HEV の NAT 参照品作成を目的としてブタ由来ウイルス陽性検体を用いることが可能と考えられた。さらに、HEV 検出の高感度化について PEI 磁気ビーズの有用性が示唆された。

F. 健康危険情報

特になし。

G.業績

論文発表

- 1) 山口照英：ヒト細胞治療薬の品質と安全性確保について. *Bio Clinica*, 27, 67-74 (2007)
- 2) N. Kawasaki, S. Itoh, T. Yamaguchi: LC/MSn for glycoproteome analysis: Glycosylation analysis and peptide sequencing of glycopeptides, *Methods in Molecular Biology*, (in press)
- 3) S. Itoh, D. Takakura, N. Kawasaki, T. Yamaguchi: Glycopeptide analysis using LC/MS and LC/MS/MS, in *The Protein Protocols Handbook* (John Walker, ed.) Humana, Totowa, NJ. (in press)
- 4) N. Kawasaki, S. Itoh, T. Yamaguchi: LC/MS of oligosaccharides. *Glycoscience Lab. Manual.*, Ed. Naoyuki Taniguchi, (in press)
- 5) N. Mukai, T. Akahori, M. Komaki, T. Kanayasu-Toyoda, A. Ishii-Watabe, A. Kobayashi, T. Yamaguchi, M. Abe, T. Amagasa, I. Morita: A comparison of the tube forming potentials of early and late endothelial progenitor cells. *Exp. Cell Res.* 314(3):430-440. (2008)
- 6) 石井明子、鈴木琢雄、川西 徹、山口照英、早川堯夫：植物を用いた医薬品の現状と品質・安全性の確保. *バイオ医薬品の品質・安全性評価 (増補改訂版)* 印刷中
- 7) 山口照英、内田恵理子：日米 EU 医薬品規制調和国際会議遺伝子治療専門家会議の活動と遺伝子治療薬の規制に於ける国際動向. *Drug Delivery System* 22, 651-659 (2007)
- 8) Uchida E, Kogi M, Oshizawa T, Furuta B, Satoh K, Iwata A, Murata M, Hikata M, Yamaguchi T. Optimization of the virus concentration method using

- polyethyleneimine-conjugated magnetic beads and its application to the detection of human hepatitis A, B and C viruses. *J Virol Methods.* Jul;143(1):95-103. (2007)
- 9) Kanayasu-Toyoda,T, Suzuki,T., Oshizawa,T., Uchida,E., Hayakawa,T., Yamaguchi T : Granulocyte Colony-Stimulating Factor Promotes The Translocation of Protein Kinase C α in Neutrophilic Differentiation Cells, *Journal of Cellular Physiology.* 211, 189-196 (2007)
- 10) N. Hashii, N.Kawasaki, Y. Matsuishi, M. Toyoda, Y. Katagiri, S. Itoh, A.Harazono, A. Umezawa, T.Yamaguchi: Study on the quality control of cell therapy product: Determination of N-glycolylneuraminic acid incorporated into human cells by nano-flow liquid chromatography/Fourier transformation ion cyclotron mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*, , 1160, 263-269 (2007)
- 11) Yamaguchi, T. Uchida,E. : Regulatory Aspects of Oncolytic Virus Products. *CCDT Journal*, 7, 203-208 (2007)
- 12) Mizuguchi H., Funakoshi N., Hosono T., Sakurai F., Kawabata K., Yamaguchi T., Hayakawa T. Rapid construction of small interfering RNA-expressing adenovirus vectors on the basis of direct cloning of short hairpin RNA-coding DNAs. *Hum. Gene Ther.*, 18, 74-80 (2007)
- 13) Ishii-Watabe,A., Kobayashi,T., Suzuki,T. Yamaguchi,T., Kawanishi,T.: Influences of the recombinant artificial cell adhesive proteins on the behavior of human umbilical vein endothelial cells in serum-free culture. *Biologicals*, 35,

247-257 (2007)

14) Kanayasu-Toyoda T, Ishii-Watabe A, Suzuki T, Oshizawa T, and Yamaguchi T. A new role of thrombopoietin enhancing ex vivo expansion of endothelial precursor cells derived from AC133 positive cells. *J Biol Chem.*, 282, 33507-33514 (2007)

15) Niimi, S., Harashima, Y., Yamaguchi, T.: Study of hepatocytes using RNA interference. *Journal of Organ Dysfunction*, 3, 164-182 (2007)

16) 川崎ナナ, 伊藤さつき, 原園 景, 橋井則貴, 山口照英: 液体クロマトグラフィー/質量分析法を用いた糖タンパク質構造解析. *実験医学増刊号*, 25, 1127-1136 (2007)

17) 川崎ナナ, 橋井則貴, 伊藤さつき, 山口照英: 細胞治療薬の品質・安全性評価における糖鎖解析の重要性と LC/MS の応用可能性. *News Letter 糖鎖フラッシュ号, Functional Glycomics*, 9, 35-41 (2007)

18) 川崎ナナ, 伊藤さつき, 山口照英: 抗体医薬品の LC/MS. 「抗体医薬品の最前線」植田充美監修, シーエムシー出版, 東京, (2007)

19) 山口照英: Gene Therapy Discussion Group の動向について. *医薬品研究*, 38, 50-59, (2007)

20) 内田恵理子, 石井(渡部)明子, 山口照英: 遺伝子治療薬及び細胞治療薬のウイルス安全性確保. *臨床ウイルス学会誌*, 35, 278-290 (2007)

21) 山口照英, 石井明子: 次世代バイオ医薬品の開発にあたっての非臨床・臨床試験について - TGN1412 事故が医薬品開発に与えたインパクト. 「谷本学校毒性質問箱」, サイエンティスト社, 東京, 10, 1-34, (2007)

学会発表

1) 山口照英: 先端技術応用医薬品のウイルス等の安全性確保. 第 47 回日本臨床ウ

イルス学会、特別講演 (2007.6.3.) 東京

2) 川崎ナナ, 高倉大輔, 中島 紫, 橋井則貴, 伊藤さつき, 原園 景, 山口照英: LC/MSn を用いた糖鎖抗原付加タンパク質の同定. 日本ヒトプロテオーム学会第 5 回大会 (2007, 7, 30-31) 東京

3) 橋井則貴, 川崎ナナ, 伊藤さつき, 中島 紫, 原園 景, 山口照英: LC/MSn による目的部分糖鎖構造を持つ糖タンパク質の特異的同定. 第 27 回日本糖質学会年会 (2007, 8, 1-3) 福岡

4) 豊田淑江, 石井明子, 鈴木孝昌, 押澤正, 山口照英. トロンボポエチン(TPO)による, in vitro での血管内皮前駆細胞(EPC)の増幅作用. 第 28 回日本炎症・再生医学会 (2007.8.3.) 東京

5) 山口照英: バイオ医薬品の新しい潮流. 第 1 回医薬品評価フォーラム (2007.8.10.) 東京

6) 山口照英: 核酸増幅法(NAT)によるウイルス検出とそのバリデーション - HEV 検出への NAT 法開発にあたっての留意点 - . 酪農学園大学ハイテクリサーチセンタープロジェクト公開シンポジウム (2007.9.3.) 江別

7) 豊田淑江, 石井明子, 鈴木孝昌, 押澤正, 山口照英. トロンボポエチン(TPO)による, in vitro での血管内皮前駆細胞(EPC)の増幅作用. 第 80 回日本生化学大会 (2007.12.) 横浜

8) 内田恵理子, 山口照英: バイオ医薬品/生物医薬品のウイルス安全性に関する国際動向. 第 6 回医薬品等ウイルス安全性シンポジウム (2007.12.1.) 東京

9) 山口照英: 細胞の品質管理の立場から. 第 30 回日本造血細胞移植学会総会 (2008.2.29-3.1) 大阪

10) 豊田淑江, 石井明子, 山口照英: トロンボポエチン (TPO) の血管内皮前駆細胞 (EPC) 増幅作用における新しい役割. 第 7

回日本再生医療学会総会（2008.3.13-14）名古屋

11) 内田恵理子、小木美恵子、村田充弘、日方幹雄、佐藤功栄、岩田明子、鈴木和博、山口照英：医薬品のウイルス安全性確保のためのヒト肝炎ウイルスの濃縮・高感度検出法

の開発 . 日本薬学会第 128 年会
(2008.3.26-28) 横浜

H. 知的財産権の出願・登録状況
なし

表 1. HEV 検出に用いたプライマー及びプローブ

HEV 1 (J. Virol. Methods 131, 65 (2006))

Forward: JVHEVF: 5'-GGTGGTTTCTGGGGTGAC-3'

Reverse: JVHEVR: 5'-AGGGGTTGGTTGGATGAA-3'

Probe: JVHEVP: 5'-FAM-TGATTCTCAGCCCTTCGC-BHQ1-3'

HEV 2 (J. Medical Virol. 78, 1076 (2006)を一部改変)

Forward: HEV-F:5'-GGCCGG(T/C)CAGCCGTCTGG-3' T/C=Y

Reverse: HEV-R:5'-CTGAGAATCAACCC(G/T)GTCAC-3' G/T=K

Probe:HEV-P:5'-FAM-CGGT(G/A)CCGGCGGTGGTTTCT-TAMRA-3' G/A=R

図1. 2価イオンとスルホン酸(SO)磁気ビーズによるウイルス濃縮操作

操作法

- 1 ml ウイルス陽性血漿に種々の濃度の2価イオンを添加
- 5 mg SO磁気ビーズを添加
- 10分間反応
- 磁場に反応チューブを設置し、10分間反応
- 上清の血漿を除去し、ウイルスゲノムをSmitest EX R&Dにて抽出
- Real time PCRにてウイルスゲノム量を測定。あるいはPCR反応により検出

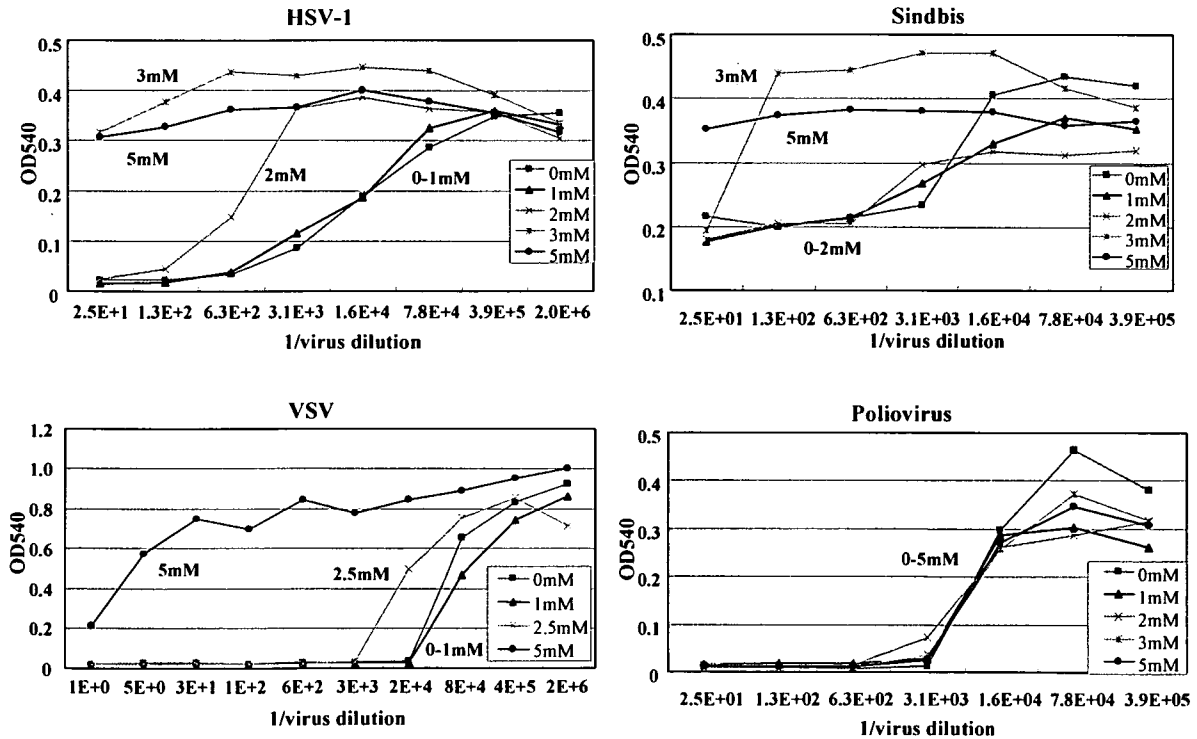
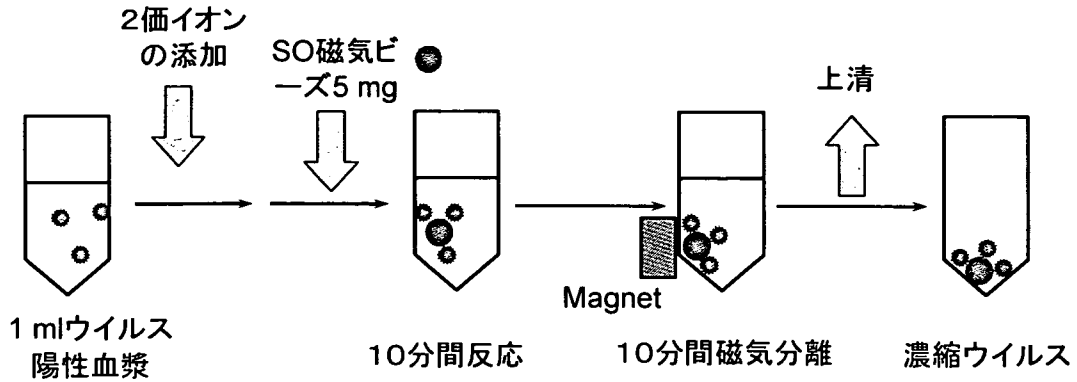


Fig. 2 PFOAによるウイルス不活化の濃度依存性

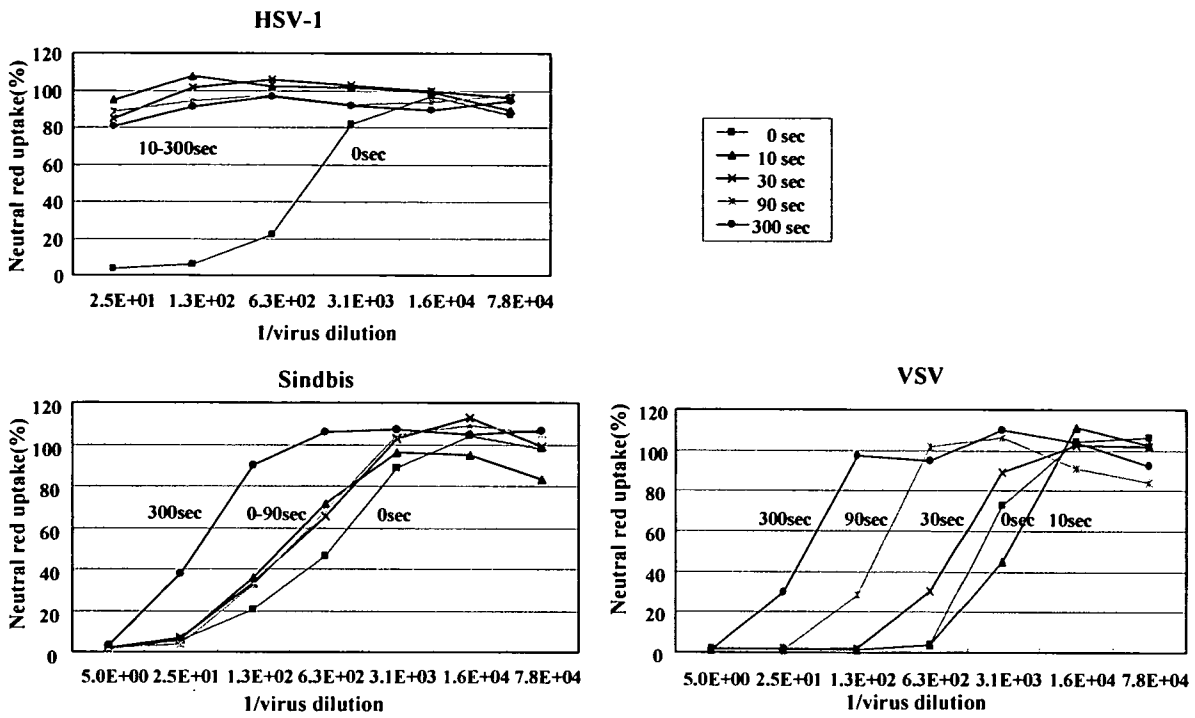


Fig. 3 PFOAによるウイルス不活化の時間依存性

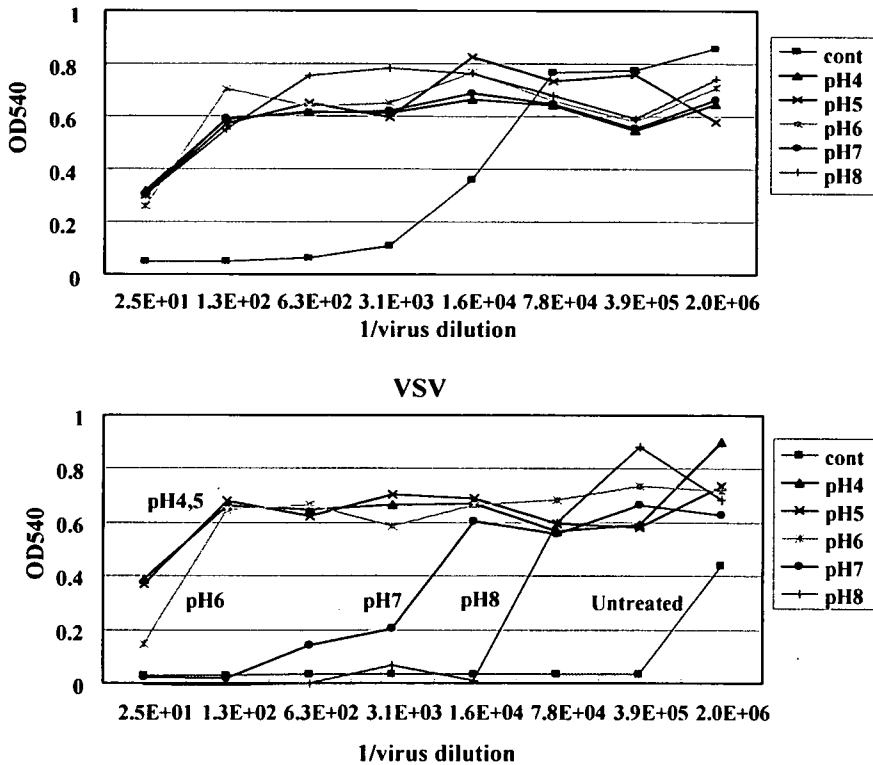


Fig. 4 PFOAによるウイルス不活化に対するpHの影響

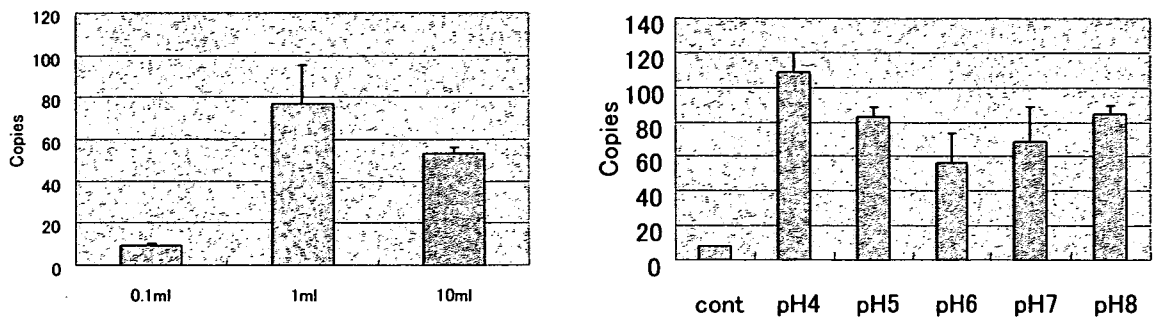


図5. PEI磁気ビーズを用いたHEVの濃縮と濃縮時のpH依存性

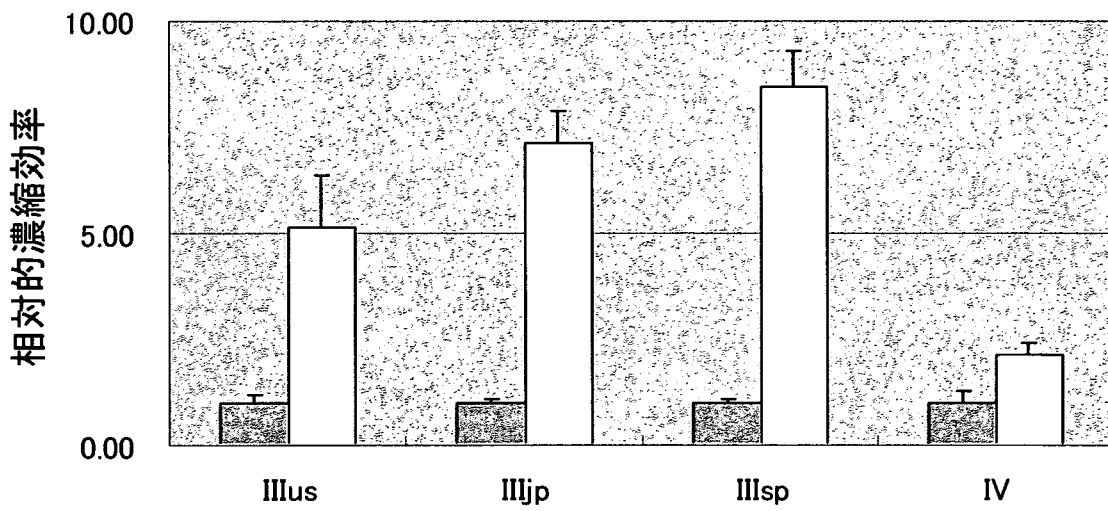


Fig.6. HEV各サブタイプの濃縮効率(青:濃縮前、黄:濃縮後)

A New Role of Thrombopoietin Enhancing *ex Vivo* Expansion of Endothelial Precursor Cells Derived from AC133-positive Cells*

Received for publication, May 14, 2007, and in revised form, September 5, 2007. Published, JBC Papers in Press, September 7, 2007, DOI 10.1074/jbc.M703919200

Toshie Kanayasu-Toyoda[‡], Akiko Ishii-Watabe[‡], Takayoshi Suzuki[§], Tadashi Oshizawa[§], and Teruhide Yamaguchi^{‡1}

From the Divisions of [‡]Biological Chemistry and Biologicals, and [§]Cellular and Gene Therapy Products, National Institute of Health Sciences, Kamiyoga 1-18-1, Setagayaku, Tokyo 158-8501, Japan

We previously reported that CD31^{bright} cells, which were sorted from cultured AC133⁺ cells of adult peripheral blood cells, differentiated more efficiently into endothelial cells than CD31⁺ cells or CD31⁻ cells, suggesting that CD31^{bright} cells may be endothelial precursor cells. In this study, we found that CD31^{bright} cells have a strong ability to release cytokines. The mixture of vascular endothelial growth factor (VEGF), thrombopoietin (TPO), and stem cell factor stimulated *ex vivo* expansion of the total cell number from cultured AC133⁺ cells of adult peripheral blood cells and cord blood cells, resulting in incrementation of the adhesion cells, in which endothelial nitric oxide synthase and kinase insert domain-containing receptor were positive. Moreover, the mixture of VEGF and TPO increased the CD31^{bright} cell population when compared with VEGF alone or the mixture of VEGF and stem cell factor. These data suggest that TPO is an important growth factor that can promote endothelial precursor cells expansion *ex vivo*.

Neovascularization is an important adaptation to rescue tissue from critical ischemia. Postnatal blood vessel formation was formerly thought to be primarily due to the migration and proliferation of preexisting, fully differentiated endothelial cells, a process referred to as angiogenesis. Recent studies provide increasing evidence that circulating bone marrow-derived endothelial progenitor cells (EPCs)² contribute substantially to adult blood vessel formation (1–5). Cell therapy using EPCs is widely performed to rescue tissue damaged due to critical ischemia.

Although EPCs have been thought to be derived from many kinds of cells, cells characterized as CD34⁺ (6), AC133⁺ (7, 8),

and CD14⁺ (9) are also thought to differentiate to EPCs. The main role of EPCs has been thought to be the release of angiogenic factors such as interleukin-8 (IL-8), granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF), hepatocyte growth factor, and vascular endothelial growth factor (VEGF) (9). To obtain a sufficient number of EPCs for the treatment may be very important in cell therapy for critical ischemia.

On the other hand, EPCs are mobilized from bone marrow by many substances such as G-CSF (10), granulocyte macrophage-colony stimulating factor (GM-CSF) (5), VEGF (3), erythropoietin (11–13), and statins (14, 15) *in vivo*. To get as many EPCs as possible without unduly burdening the patient, it is desirable to establish efficient expansion methods for EPCs *in vitro*.

Thrombopoietin (TPO), initially identified as the primary regulator of platelet production (16), plays an important and nonredundant role in the self-renewal of and expansion methods for hematopoietic stem cells (17–19). Recently, TPO has been found to exert a proangiogenic effect on cultured endothelial cells (20). The mechanism by which hematopoietic cytokines support revascularization *in vivo*, however, remains unknown. TPO has increased the number of colony-forming units-granulocyte-macrophage (21) and of burst-forming units-erythroid (22) *in vivo* and leads to a redistribution of colony-forming units-erythroid from marrow to spleen. Moreover, TPO acts in synergy with erythropoietin to increase the growth of burst-forming units-erythroid and the generation of colony-forming units-erythroid from marrow cells (21, 23, 24).

In our previous study (25), we isolated AC133⁺ cells and examined their endothelial differentiation *in vitro*. CD31(PECAM-1)⁺ and CD31^{bright} cells appeared at an early stage of the *in vitro* differentiation of AC133⁺ cells, and CD31^{bright} cells derived from AC133⁺ cells were identified as the precursors of endothelial cells because CD31^{bright} cells had differentiated more efficiently to endothelial cells than others. Therefore, we conclude that CD31^{bright} cells derived from AC133⁺ cells possess the typical character of EPCs. In this study, we analyzed the effects of TPO on the appearance of CD31^{bright} cells from AC133⁺ cells, and we show that TPO plays an important role in *in vitro* EPC expansion.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Reagents—Recombinant TPO and recombinant stem cell factor (SCF) were kindly provided by Kirin-Amgen Inc. (Thousand Oaks, CA). Recombinant human VEGF was purchased from Strathmann Biotec AG (Hamburg, Germany). The AC133

* This work was supported in part by a grant-in-aid for health and labor science research from the Japanese Ministry of Health, Labor, and Welfare, and in part by a grant-in-aid for Research on Health Sciences focusing on Drug Innovation from the Japan Health Sciences Foundation. The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

¹ To whom correspondence should be addressed. Tel.: 81-3-3700-9064; Fax: 81-3-3707-6950; E-mail: yamaguch@nihs.go.jp.

² The abbreviations used are: EPCs, endothelial precursor cells; VEGF, vascular endothelial growth factor; FN, fibronectin; PBS, phosphate-buffered saline; FITC, fluorescein isothiocyanate; PE, phycoerythrin; TPO, thrombopoietin; SCF, stem cell factor; G-CSF, granulocyte colony-stimulating factor; GM-CSF, granulocyte macrophage-colony stimulating factor; IL, interleukin; PI3K, phosphatidylinositol 3-kinase; VEcad, vascular endothelial cadherin; eNOS, endothelial nitric oxide synthase; FBS, fetal bovine serum; STAT, signal transducers and activators of transcription; JAK, Janus kinase; KDR, kinase insert domain-containing receptor.

Ex Vivo Expansion of EPC by TPO

magnetic cell sorting kit and phycoerythrin (PE)-conjugated anti-CD133/2 antibody were from Miltenyi Biotec (Gladbach, Germany). Allophycocyanin-conjugated anti-CD110 (TPO receptor) antibody, fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated anti-CD31 monoclonal antibody, FITC-conjugated anti-CD34 monoclonal antibody, and anti-STAT3 monoclonal antibody were from Pharmingen. Phycoerythrin-conjugated vascular endothelial cadherin (VEcad/CD144) antibody was from Beckman Coulter (Marseilles, France). Anti-vascular endothelial growth factor receptor-2 (Flk-1/KDR) monoclonal antibody (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA) and anti-human endothelial nitric oxide synthase (eNOS) rabbit polyclonal antibody (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI) were obtained. Anti-phospho-Akt (Ser-473) antibody, anti-Akt antibody, and anti-phospho-STAT3 (Tyr-705) antibody were from Cell Signaling Technology (Beverly, MA). Fibronectin (FN)- and type IV collagen-coated dishes were purchased from Iwaki Co., Tokyo, Japan. Phycoerythrin-conjugated anti-CD14 antibody was from DakoCytomation (Glostrup, Denmark).

Preparation of Peripheral Blood Mononuclear Cells—Human cord blood was kindly supplied by the Metro Tokyo Red Cross Cord Blood Bank (Tokyo, Japan) with informed consent. The buffy coat fraction was prepared from voluntary donated human blood of Saitama Red Cross of Japan (Saitama, Japan). The blood sample was diluted with phosphate-buffered saline (PBS) containing 2 mM EDTA and was loaded on a Lymphoprep™ tube (Axis-Shield PoC AS, Oslo Norway) (density = 1.077). After being centrifuged for 20 min $800 \times g$ at 18 °C, mononuclear cells were collected and washed with sorting solution (PBS supplemented with 2 mM EDTA and 0.5% bovine serum albumin).

Flow Cytometric Analysis of AC133 and CD34 Expression in Mononuclear Cells—To eliminate the dead cells, dead cells were stained with 7-amino actinomycin D. Mononuclear cells were labeled with PE-conjugated anti-AC133 monoclonal antibody and FITC-conjugated anti-CD34 monoclonal antibody simultaneously at 4 °C for 30 min. After washing with the sorting solution, flow cytometric analysis was performed with a FACSCalibur (BD Biosciences).

Magnetic Cell Sorting of AC133⁺ Cells—Mononuclear cells were labeled with magnetic bead-conjugated anti-AC133 antibodies according to the protocol directed by the manufacturer. After the brief wash with the sorting solution, the cells were separated by a magnetic cell separator (autoMACS, Miltenyi Biotec, Gladbach, Germany), and the positive cells were then collected.

Culture of AC133⁺ Cells—Isolated AC133⁺ cells were cultured in EBM-2 (Cambrex Corp., East Rutherford, NJ) medium containing 20% heat-inactivated FBS and 30 mg/liter kanamycin sulfate at 37 °C under moisturized air containing 5% CO₂ with 50 ng/ml VEGF as control medium. Control medium containing VEGF was added with TPO, SCF, or both. Cells were plated on FN- or type IV collagen-coated dishes at a cell density of $\sim 10^6$ cells/ml. We have previously shown that EPCs can tightly adhere to an FN-coated dish but weakly to type IV collagen-coated dish (25). Analysis of adherent EPCs was performed on FN-coated dish and that of suspended EPCs on type IV collagen-coated dish. Half of the medium was exchanged

once every 3–4 days with fresh medium. Adherent cells on FN-coated dish were fixed with ethanol chilled to -20 °C and then subsequently subjected to an immunostaining procedure or other treatments. Cells on type IV collagen-coated dish were subsequently subjected to flow cytometric analysis.

Immunostaining of Adherent Cells—After fixation with chilled ethanol (-20 °C), the cell layer was washed three times with PBS. Cells were incubated with 1% bovine serum albumin in PBS (–) for 1 h at 4 °C for blocking and then with each first antibody in 1% bovine serum albumin in PBS (–) for 1 h at 4 °C. After washing with PBS, the cells were incubated with FITC-conjugated anti-mouse IgG antibody or rhodamine-conjugated anti-rabbit IgG antibody for 1 h at 4 °C. Cells were washed with PBS and then examined using a Zeiss LSM 510 microscope with an excitation wavelength of 488 nm and an emission of 530/30 nm for FITC or 570/30 nm for rhodamine.

In every experiment, we used nonspecific immunoglobulin corresponding to the first antibody species as a control and confirmed that the cells were not stained with control immunoglobulin. The fluorescence intensity of 20 randomly selected cells was calculated using the Scion Image program within the linear range for quantitation.

Analysis of Cytokines in the Supernatant of CD31^{bright} and CD31⁺ Cells—The expression of CD31 on cultured AC133⁺ cells was determined with a flow cytometer. After AC133⁺ cells were cultured for several days on either FN-coated or collagen type IV-coated dishes, both adherent and nonadherent cells were collected. The collected cells were labeled with FITC-labeled anti-CD31 antibody for 15 min at 4 °C. After a brief wash with 0.5% bovine serum albumin in PBS, flow cytometric analysis was performed. CD31^{bright} and CD31⁺ cells were sorted from cultured AC133⁺ cells with FACSAria (BD Biosciences). Sorted cells of both populations were subsequently cultured in EBM-2 supplemented with 20% FBS in the absence of any cytokines. After 5 days, the collected supernatant of cells was frozen at -20 °C. Cytokines were measured by a BD™ cytometric beads array Flex set system (BD Biosciences) according to the manufacturer's protocol.

Flow Cytometric Analysis of Various Cell Surface Markers in Cultured AC133⁺ Cells—After AC133⁺ cells were cultured for the indicated period, cells were co-stained with FITC-labeled anti-CD31 antibody and PE-labeled anti-CD14 antibody or PE-labeled VEcad antibody. Cells were also stained with FITC-labeled anti-CD31 antibody, allophycocyanin-labeled anti-CD110 antibody, and PE-labeled anti-AC133 antibody triply and then subjected to flow cytometry. Dead cells were eliminated by staining with 7-amino actinomycin D.

Calculation of the Absolute Number of CD31^{bright} Cells—The absolute number of CD31^{bright} cells was multiplied by the total cell number of each well, and the ratio of CD31^{bright} cells was analyzed by fluorescence-activated cell sorter.

Preparation of Cell Lysates and Immunoblotting—After cell sorting, AC133⁺ cells were suspended in 20% FBS-EBM2 and cultured for 3 days in the presence of VEGF and TPO. Cells were collected and incubated in 2% FBS-EBM2 for 1 h. Cells were stimulated by 50 ng/ml TPO, 50 ng/ml VEGF, or both for 15 min. Cells (1×10^6) were collected and lysed in lysis buffer containing 1% Triton X-100, 10 mM K₂HPO₄/KH₂PO₄ (pH

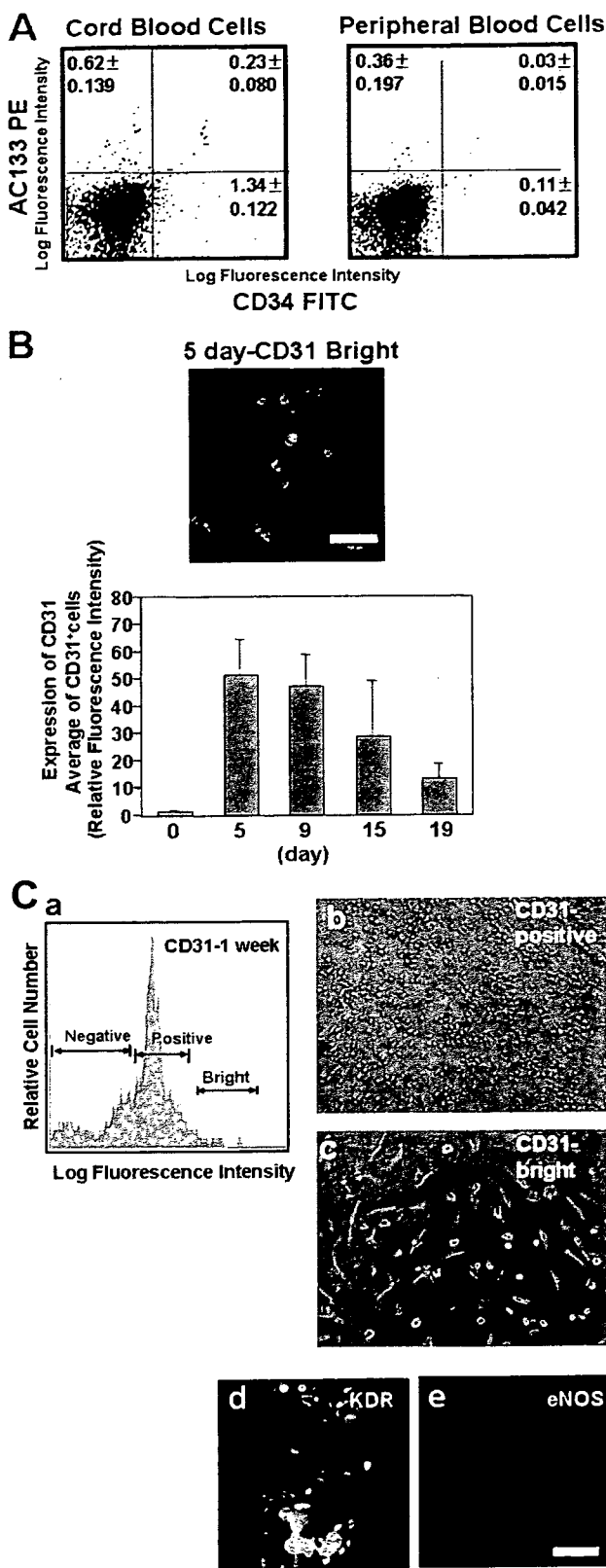


FIGURE 1. *In vitro* differentiation of AC133⁺ cells of cord blood into endothelial cells. **A**, expression of AC133 and CD34 cells in human cord blood and peripheral blood mononuclear cells was analyzed by staining with AC133-PE (vertical axis) and CD34-FITC (horizontal axis). The numbers in the flow cytometric dot plots indicates the percentage of each population ± S.D. **B**, when AC133⁺ cells were cultured for 19 days in the presence of VEGF on FN-coated dishes, the appearance of CD31⁺ cells was analyzed. The upper panel shows the fluorescent photomicrograph of adhesion cells stained with FITC-conjugated

7.5), 1 mM EDTA, 5 mM EGTA, 10 mM MgCl₂, and 50 mM β-glycerophosphate, along with 1/100 (v/v) protease inhibitor mixture (Sigma) and 1/100 (v/v) phosphatase inhibitor mixture (Sigma). The cellular lysate of 5 × 10⁵ cells/lane was subjected to Western blotting analysis.

Statistical Analysis—Statistical analysis was performed using the unpaired Student's *t* test, and the dose response of TPO was compared between the four groups by one-way analysis of variance and the Tukey test using Prism 4 software. Values of *p* < 0.05 were considered to indicate statistical significance. Each experiment was repeated three times, and the representative data are indicated.

RESULTS

We previously reported that during the *in vitro* differentiation of peripheral blood AC133⁺ cells into the endothelial cells, the expression of CD31 was the earliest marker among all of the tested markers (25). Moreover, by analyzing the ability of differentiation into endothelial cells, CD31^{bright} cells were shown to exhibit EPC character when compared with the CD31⁺ fraction. Since cord blood is a rich source of blood stem cells such as CD34⁺ and AC133⁺ cells, it is expected to be a useful source for CD31^{bright} cells. At first, we attempted to determine whether the CD31^{bright} fraction derived from cord blood AC133⁺ cells contained EPCs. As shown in Fig. 1A, the populations of AC133⁺ CD34⁻ cells, AC133⁻ CD34⁺ cells, and AC133⁺ CD34⁺ cells in cord blood were approximately four times greater than those in peripheral blood (Fig. 1A). After 5 days of cultivation of AC133⁺ cells on an FN-coated dish, adherent CD31-positive cells were observed (Fig. 1B, upper panel). Analysis of the fluorescence intensity of CD31-positive cells revealed that the average fluorescence intensity in CD31⁺ cells was highest on day 5 (Fig. 1B, lower panel), corresponding to the results of peripheral blood cells.

After 1 week of cultivation of AC133⁺ cells on a collagen type IV-coated dish, on which cells adhered more loosely when compared with the FN-coated dish, cells were collected and sorted into CD31⁺ and CD31^{bright} fractions, as shown in Fig. 1C, panel a, and both cell types were cultured on an FN-coated dish for 1 week after the sorting. The number of cells adhering and spreading was higher in the CD31^{bright} fraction (Fig. 1C, panel c) than in the CD31⁺ fraction (Fig. 1C, panel b), and these adhering cells are apparently KDR- (Fig. 1C, panel d) and eNOS-positive (Fig. 1C, panel e). The large areas of intense green fluorescence represent the colonies of CD31^{bright} cells. These data indicate that CD31^{bright} cells derived from AC133⁺ cells of both peripheral blood and cord blood are EPCs.

anti-CD31 antibody after a 5-day culture. Quantitation of the fluorescence intensity of 20 CD31-positive cells was analyzed as described under "Experimental Procedures." Columns and bars represent the means ± S.D. from 20 cells (B, lower panel). C, the CD31-negative, positive, and bright cell populations prepared after 1-week cultivation of AC133⁺ cells are shown in a representative histogram stained with FITC-conjugated anti-CD31 antibody. The x axis represents the log fluorescence intensity of CD31-FITC, y axis relative cell number (panel a). Panels b and c show phase-contrast microscopic photographs of cultured CD31-positive and bright cells, respectively, subsequently cultured for 1 week after cell sorting. The bottom panels d and e show the fluorescent photomicrographs of adhesion cells from the CD31^{bright} fraction stained with anti-KDR antibody and anti-eNOS antibody, respectively. Scale bar, 100 μm.

Ex Vivo Expansion of EPC by TPO

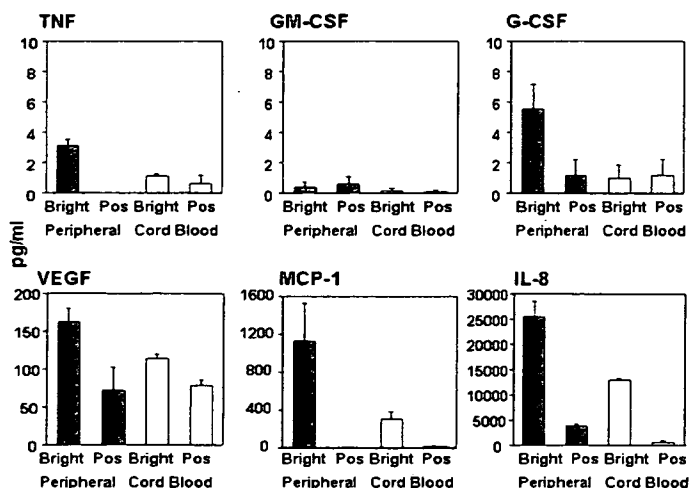


FIGURE 2. Various cytokines released from CD31⁺ cells and CD31^{bright} cells. Production of various cytokines from CD31⁺ cells and CD31^{bright} cells derived from AC133⁺ cells cultivated for 5 days was measured. Gray columns indicate the cytokine production by cells from peripheral blood and open columns from cord blood. Columns and bars represent the means \pm S.D. from three separate experiments. *TNF*, tumor necrosis factor; *Pos*, positive; *MCP-1*, monocyte chemoattractant protein-1.

Several reports have shown that EPCs produce cytokines (9, 26, 27), but the ability of CD31⁺ or CD31^{bright} cells derived from AC133⁺ cells to produce cytokines is not known. After cell sorting, quantitative analysis of cytokines released by CD31⁺ cells and CD31^{bright} cells was carried out at 5 days after the cultivation. As shown in Fig. 2, IL-8 was markedly produced by CD31^{bright} cells from both peripheral blood and cord blood when compared with CD31⁺ cells. The production of monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) by CD31^{bright} cells was also higher than that of CD31⁺ cells. The production of VEGF was higher by CD31^{bright} cells than by CD31⁺ cells but not significantly. The production of all cytokines by CD31^{bright} cells from peripheral blood was higher than that from cord blood. Tumor necrosis factor- α , GM-CSF, and G-CSF were hardly produced by CD31^{bright} and CD31⁺ cells. These data indicate that CD31^{bright} cells derived from AC133⁺ cells have a strong ability to produce chemokines.

It has been reported that TPO and SCF are potent stimulators of multipotent cell proliferation (17, 19). Next, the effects of both growth factors on EPC growth and differentiation in our culture system were determined. After the addition of both TPO and SCF for 2 weeks, the expression of eNOS and KDR in adhered cells was analyzed (Fig. 3A). Fig. 3A clearly indicates that AC133⁺ cells from both peripheral blood and cord blood differentiate into eNOS⁺ and KDR⁺ cells more efficiently in the presence of the mixture of TPO, SCF, and VEGF than of VEGF alone. Flow cytometric analysis revealed that the ratio of CD31^{bright} CD14⁻ cells increased in the presence of the mixture of TPO, SCF, and VEGF when AC133⁺ cells were cultured on collagen type IV-coated dish for 1 week (Fig. 3B).

We next examined which growth factor is dominant in the induction and proliferation of CD31^{bright} cells. The total cell number of cultured AC133⁺ cells from both peripheral blood (Fig. 4A, upper panel) and cord blood (Fig. 4A, lower panel) significantly increased in the presence of TPO, SCF, or both growth factors when compared with that of VEGF alone during

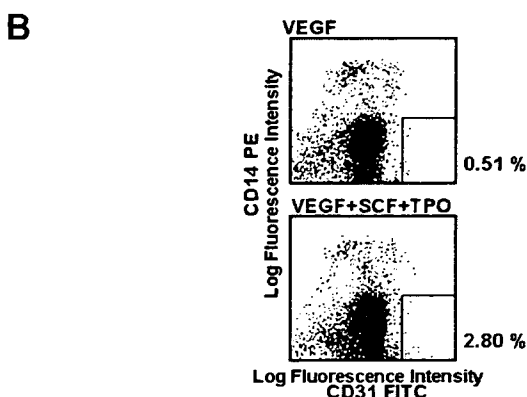
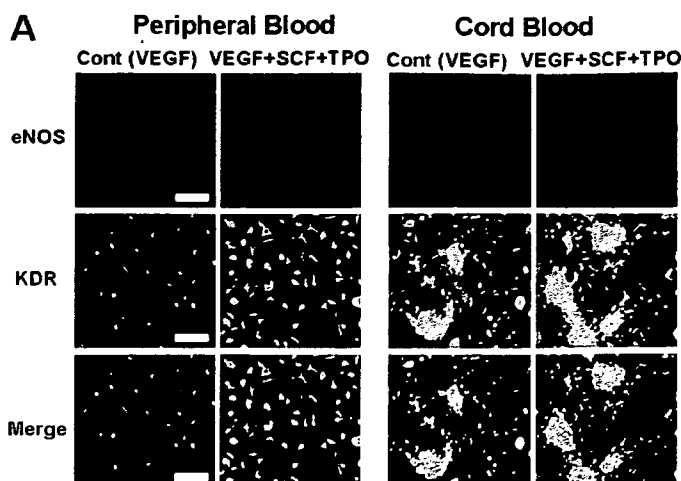


FIGURE 3. Increment of EPCs from AC133⁺ cells in the presence of TPO and SCF. A, AC133⁺ cells were differentiated for 2 weeks in the presence of either VEGF alone or the combination of TPO, SCF, and VEGF on an FN-coated dish. The upper and middle panels indicate the fluorescent photomicrographs of cells stained with anti-eNOS antibody and anti-KDR antibody, respectively. The bottom panels indicate the merged images of both antibodies. From the left side, control (Cont) and the mixture of peripheral blood, control, and the mixture of cord blood. Scale bar, 100 μ m. B, CD14 and CD31 expression in cultured AC133⁺ cells for 1 week was stained with CD14-PE (vertical axis) and CD31-FITC (horizontal axis). The upper panel indicates cells treated with VEGF alone, and the lower panel indicates cells treated with the mixture of VEGF, SCF, and TPO. The number on the right side of the flow cytometric dot blot indicates the percentage of the CD14⁻ CD31^{bright} population.

a 1-week period. As shown in Fig. 4B, however, the increment in the ratio of the CD31^{bright} cell population was observed only in the presence of TPO. The absolute number of CD31^{bright} cells, calculated by the total cell number and the ratio of the CD31^{bright} cell population, was markedly increased by TPO (Fig. 4C). In contrast, SCF induced the increase in total cell number to the same level as TPO (Fig. 4A), but it did not induce the increase in either the ratio of the CD31^{bright} cell population (Fig. 4B) or the number of CD31^{bright} cells (Fig. 4C). Next, we examined whether TPO and VEGF can synergistically affect the induction of CD31^{bright} cells during a 1-week cultivation. As shown in Fig. 4D, although VEGF had no effects on the total cell number (Fig. 4D, panel a), it increased the ratio of the CD31^{bright} cell population to 1.4-fold higher than that of the control (Fig. 4D, panel b), resulting in a slight increase in the number of CD31^{bright} cells (Fig. 4D, panel c). Thrombopoietin alone induced an increase in not only the total cell number (Fig. 4D, panel a) but also the ratio of the CD31^{bright} cell population (Fig. 4D, panel b), resulting in an \sim 24-fold increment of the absolute