

心臓移植後早期の管理で重要な点は、免疫抑制と感染対策である。また、慢性期に注意すべきも

のとして移植心冠動脈病変がある。

VI

心臓移植の予後に影響する因子

心臓移植の予後に影響する主な因子として、移植心不全、急性拒絶反応、感染症、悪性腫瘍、冠動脈病変がある。

① 移植心不全

ドナー心機能、心保存法、手術手技などが関係する。ドナー心機能評価は、先に述べたように強心薬が使用されている場合慎重に行う必要がある。心保存として、われわれは細胞外液タイプの St. Thomas 液を用いてきたが、最近では心臓移植用に開発された Celsior 液を用いている。また、虚血時間の短縮のために搬送時間が重要となり、小型ジェット機やヘリコプターが積極的に用いられ、概ね4時間以内に血流再開が行われている。

② 急性拒絶反応

移植後1年以内の頻度が高く、以後は減少傾向となる。軽度の拒絶反応では臨床的に無症状である場合が多い。このため、現時点で信頼できる唯一の診断法である心内膜心筋生検を定期的に行い、国際心臓肺移植学会の基準により判定する。免疫抑制療法としては、シクロスポリン（ネオラル®）あるいはタクロリムス（プロGRAF®）、ミコフェノール酸モフェチル（セルセプト®）とステロイド（プレドニン®）の3者併用療法が一般的に用いられる。また、移植後に腎機能障害を認める場合には抗胸腺抗体として、モノクローナル抗体の OKT3 あるいはポリクローナル抗体である ATG を用いた免疫抑制の導入が行われる。治療が必要な拒絶反応を認める場合には、ステロイドパルス療法を行う。

③ 移植後冠動脈病変

移植心冠動脈にびまん性の求心性内膜肥厚が進行するものである。徐神経された移植心では、虚血病変が進行しても胸痛を自覚しないため、突然心原性ショックを発症したり、不整脈による突然死を引き起こすことがある。定期的に冠動脈造影と血管内超音波検査（IVUS）を行い、内膜肥厚の早期発見に努める。また、移植後冠動脈病変はびまん性のため多くは血行再建術の適応とならず、重症例では再移植が必要となる。この病変の発生機序は今だ十分に解明されておらず、現在の心臓移植後の長期成績に大きく関係している。このため、発生機序の解明および治療法の開発に関する研究が精力的に進められている。

④ 感染症

免疫抑制療法を強力に行う移植後1年以内の頻度が最も高い。術後1ヵ月以内は細菌感染症が多く、その後はサイトメガロウイルス（CMV）や単純ヘルペスウイルスなどの日和見感染が増加する。このCMV感染は、移植後冠動脈病変の危険因子とされており、早期発見および治療が予後に大きく影響する。

⑤ 悪性腫瘍

免疫抑制療法を長期続けることにより、悪性腫瘍発生の危険性が高まる。移植後3から5年においては、その死因の21%を占めるようになり、とくに、悪性リンパ腫（Post transplant lymphoproliferative disorder：PTLD）と皮膚癌に注意が必要である。

VII

世界の成績⁶⁾

2003年の国際心肺移植学会統計では、1982年から2002年までに62,851例の心臓移植が行われている。1年生存率は80%で、50%の患者の生存期間は9.3年であった。生存率は移植1年以後年間約4%ずつほぼ直線的に低下している。また、移植後1年生存した症例での50%生存期間は12年であった。なお、生存率は免疫抑制療法などの進歩により上昇しており、1年生存率では1982~87年の76%から1998~2001年の82%

となっている。免疫抑制療法としては、サイクロスポリン（あるいはタクロリムス）、ミコフェノール酸モフェチル、プレドニンの三者併用療法が行われている。死亡原因は、急性期では移植心不全、急性拒絶反応が多くみられ、1年以後では移植後冠動脈病変や悪性腫瘍の頻度が増加している。また、身体活動に関しては、移植後5年までの調査において、90%以上が活動制限なしの生活を送っている。

VIII

わが国の成績³⁾

本年3月までに日本臓器移植ネットワークへ171人が登録され、19例（11%）の心臓移植が実施されたが待機中に55名（32%）が死亡した（表5）。

施行例は、本年5月に1例施行され、計20例となったが、その原疾患は、全例心筋症であった。待機状態は全例Status 1で、14例は左心補助人工心臓（LVAS）装着例であった。移植待機日数は当初比較的短期だったが、その後長期化し、平均472日で1年以上待機は13例に及んでいる。LVAS装着期間も長期化し、平均503日で、8例が1年以上であった。東洋紡-左室型が最も多いが、その平均補助期間も1年以上となっている。

移植後最長5年以上経過しているが、全例生存し、16例が社会復帰しており、良好な成績を示している（図2、表6）。日常生活では、とくに大きな生活制限を認めておらず、良好なQOLを示している。

表5 日本臓器移植ネットワークへの登録症例

登録待機中	74例*
移植	19例
取消し	12例
死亡	55例
海外渡航移植	11例
計	171例

(*: Status 1: 34例) (2004年3月1日現在)

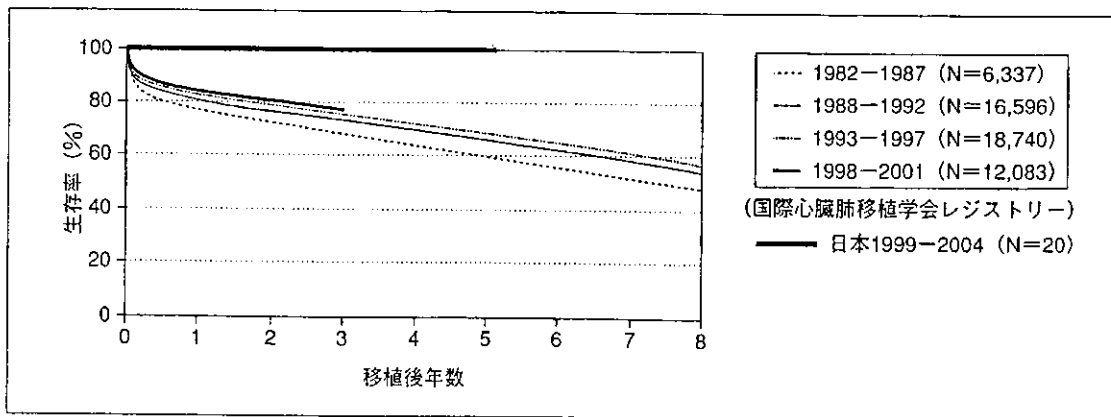


図2 心臓移植後の累積生存率

表6 わが国における心臓移植症例

移植症例数	20例	東洋紡一左室型	8例
年齢	8～55(平均37)歳	(21-812:平均411日)	
性別	男性:15例、女性:5例	Novacor型	2例(125, 1087日)
原疾患	拡張型心筋症:14例、拡張相肥大型心筋症:5例	HeartMate-IP	2例(518, 590日)
	薬剤性心筋症:1例	HeartMate-VE	1例(995日)
待機状況	Status1:全例	移植後	0.5ヵ月～4年3ヵ月(平均2年9ヵ月)
	補助人工心臓装着:14例	退院	19例(1例は移植後急性期)
	強心薬持続投与:6例	現状	社会復帰 16例
待機期間	29～995(平均472)日		リハビリ中 4例
	(1年以上:13例)	実施施設	国立循環器病センター:11例
補助人工心臓補助期間	21～1087(平均503)日		大阪大学:7例
	(1年以上:8例)		東京女子医科大学:2例
	東洋紡一左房型 1例(39日)		

IX わが国における心臓移植の問題点

表7にわが国と米国の心臓移植の状況を示す^{3,8)}。原疾患が米国では冠動脈疾患が半数を占めているが、わが国では全例心筋症である。また、待機時の状況では、わが国では現在のところ全例がStatus 1と緊急度の高い症例であるが、米国では四分の1が緊急度の低いStatus 2である。Medianの待機期間は、緊急度の高いStatus 1においてもわが国では549日であるが、米国ではStatus 2で517日で、Status 1では90日前後である。わが国では施行数が少なすぎるため、長期の待機を必要としている。また、図3は人口100

万人当たりの年間心臓提供者数をみたものであるが、わが国は米国の200分の1にすぎない⁹⁾。また、これまでに台湾では300例以上、韓国でも200例以上施行されているが、わが国はようやく20例が施行されたのみである。また、現在の法律では臓器提供が15歳以上に限られているため、体重の小さい小児例では渡航移植を考えざるを得ない状況である。また、成人例においてもわが国での待機期間が長過ぎるため、渡航を希望するものがあり、ネットワーク登録例においても11例

表7 わが国と米国の心臓移植の状況

	日本(1999-2004.5)	米国(2002)
症例数	17	2154
原疾患		
心筋症	100%	43.4%
冠動脈疾患	0%	42.2%
医学的緊急度		
Status 1	100%	1A: 39.6%
		1B: 35.0%
Status 2	0%	25.3%
待機期間(Median)(日)		
Status 1	549	1A: 94
		1B: 85
Status 2	—	517

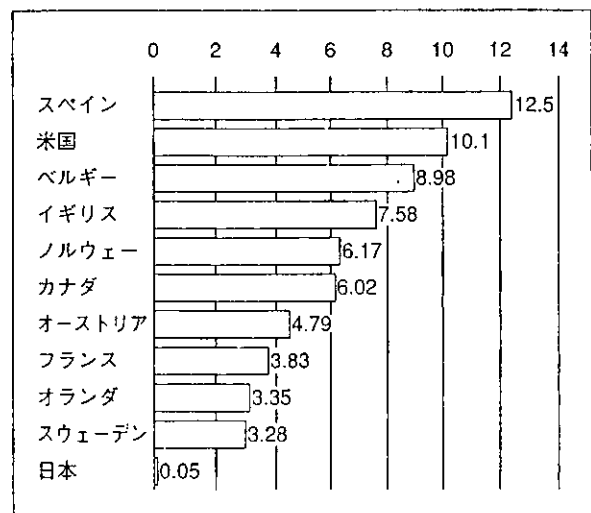


図3 欧米諸国とわが国の心臓・臓器提供者数 (人口100万人当たり年間提供者数)⁹⁾

が海外渡航移植を行っている。日本小児循環器学会臓器移植委員会の報告では、2003年夏までに成人および小児合わせて70例の渡航移植がなさ

れている。なお、その成績は、1年生存率95.7%、10年生存率65.8%と国際レジストリーより良好な結果を示している。

まとめ

心臓移植は末期心不全を対する治療手段として臓移植を組み込んだ重症心不全の治療体系を確立良好な成績を示しており、わが国においても、心臓移植を組み合わせる必要がある。

(参考文献)

- 1) Matsuda H, Fukushima N, Sawa Y, et al : First brain dead donor heart transplantation under new legislation in Japan. Jpn J Thorac Cardiovasc Surg, 47 : 499-505, 1999.
- 2) Kitamura S, Nakatani T, Yagihara T, et al : Cardiac transplantation under new legislation for organ transplantation in Japan. Jpn Circ J, 64 : 333-339, 2000.
- 3) 中谷武嗣, 北村惣一郎 : 日本の心臓移植の現状. 移植, 38 : 253-257, 2003.
- 4) 中谷武嗣 : レシピエント管理 (待機から移植へ) 外科管理. 循環器病専門医, 10 : 307-312, 2003.
- 5) 慢性心不全治療ガイドライン. Jpn Circ J, 64 suppl 4 : 1023-1079, 2000.
- 6) Taylor DO, Edwards LB, Mohacsi PJ, et al : The registry of the International Society for heart and Lung Transplantation : Twentieth official adult heart transplant report-2003. J Heart Lung Transplant, 22 : 616-624, 2003.
- 7) 日本臓器移植ネットワーク HP. <http://www.jotnw.or.jp/>
- 8) UNOS Annual Report. <http://www.optn.org/data/annualReport1.asp>
- 9) 北村惣一郎, 中谷武嗣, 花谷彰久 : 本邦における心臓移植と問題点. Annual Review 循環器 2003, 263-271, 2003.

バージャー病の難治性潰瘍に対する骨髄細胞移植の治療効果

知久 正明 西上 和宏 林 富貴雄 荻野 均¹ 松田 均¹ 湊谷 謙司¹
 佐々木啓明¹ 中谷 武嗣¹ 田口 明彦² 宮田 茂樹³ 亀井 政孝⁴
 田中 良一⁵ 盛 英三⁶ 宮武 邦夫 友池 仁暢

要 旨：難治性の重症末梢動脈閉塞症に対し、骨髄細胞移植治療による血管再生療法が本邦を中心に開始されている。安静時疼痛や間歇性跛行に対しては、良好な効果が認められているが、虚血性潰瘍に対しての効果は不十分とされている。今回、3例のバージャー病の難治性潰瘍に対し、骨髄細胞移植治療を施行し、著明な改善を認めた。(J. Jpn. Coll. Angiol., 2004, 44: 191-197)

Key words: Autologous bone marrow mononuclear cell implantation, Therapeutic angiogenesis, Buerger's disease

序 言

血管再生は、一般に既存の血管から血管内皮細胞が増殖、リモデリングし、新しい娘血管枝が形成される狭義の血管新生(angiogenesis)と主に胎生期に行われる血管内皮前駆細胞である血管芽細胞が集合、分化して血管が形成される血管発生(vasculogenesis)の2つが考えられている。近年、成人の末梢血液にも血管内皮細胞に分化しうる血管内皮前駆細胞の存在が明らかにされた。成人末梢血中のCD34陽性単核球の分画から血管内皮細胞へと分化しうる一群の細胞が得られることが証明された¹⁾。すなわち、成人においてもvasculogenesisによる血管再生が起こりうることを示された。CD34陽性の単核球は末梢血液より骨髄液に多く含まれるため、動物実験において、虚血肢に対する骨髄単核球移植治療が施行され、良好な効果が報告された²⁾。これに基づき、本邦ではTACT studyを始めとして、臨床においても重症下肢虚血患者に対し自己骨髄

細胞移植や末梢血幹細胞移植が開始された^{3,4)}。しかし、安静時疼痛や間歇性跛行に対しては、良好な効果が認められているが、閉塞性動脈硬化症に対する虚血性の皮膚潰瘍に対しての効果は不十分とされている。今回、バージャー病の難治性潰瘍に対する骨髄細胞移植治療の効果を検討した。

対 象

対象患者は、日常生活が著しく障害されている重症末梢動脈閉塞症で、他のいかなる治療にも反応せず今後回復が期待できなかった3症例。倫理審査委員会の審査のもと、詳細な説明文書にて十分に自己骨髄細胞移植治療で発生する合併症・効能・不利益・利益を説明し、患者みずからの意思および家族の理解と承諾に基づいて、骨髄細胞移植治療を希望する場合のみ施行するとした。治療前に、悪性腫瘍と網膜症のチェックを行い、これらの疾患を有する場合は対象から除外した(Table 1)。

方 法

薬物治療は試験期間を通じて継続し、易出血性を来す薬物は、手術前後一旦中止した。また、可能であれば、手術に先立ち自己末梢血を採取貯蔵し、手術中に返血した。

2004年1月22日受付 2004年4月23日受理

国立循環器病センター心臓血管内科

¹同心臓血管外科

²同脳血管内科

³同輸血管理室

⁴同麻酔科

⁵同放射線科

⁶同心臓生理部

Table 1 Indication of BM MNCs (bone marrow mononuclear cells) transplantation to peripheral artery disease in our hospital

Indication
<ul style="list-style-type: none"> ・ ASO or TAO ・ Fontaine grade III or IV ・ Sub-optimal indication to intervention because of peripheral and diffuse lesion ・ age: 20 to 80 years old
Exclusion
<ul style="list-style-type: none"> ・ Severe retinopathy by diabetes mellitus or current malignancy ・ Life expectancy is considered less than one year due to complications ・ High-risk of general anesthesia operation ・ Informed consent was not obtained ・ The patient was considered unsuitable

ASO: arteriosclerosis obliterans, TAO: thromboangiitis obliterans

自己骨髄細胞移植は、全身麻酔下にて腸骨より800 ml 前後の骨髄液採取を行い、比重遠心分離法にて骨髄単核球を分離し、約50 mlの骨髄単核球液を得た。骨髄単核球液は、1 mlの注射器に分注し、23G針を用いて、虚血下肢骨格筋(前脛骨筋、後脛骨、腓腹筋部)に0.5 mlずつ約80カ所に筋肉内注射を行った。

結 果

症例1は31歳の男性。2001年1月頃から下肢の安静時疼痛を認め、右足4趾に皮膚潰瘍が出現した。2002年1月に右足3趾にも潰瘍が出現し、近医から当院に紹介され、2002年3月に精査加療目的で入院となる。喫煙歴は1日20本10年間、1年前より禁煙。Ankle brachial pressure index (ABPI)は右0.38、左0.56と両側肢とも低下し、血管造影にて両側下腿三分枝以下が閉塞し、末梢は発達した側副血行路で造影され、パージャー病と診断された。皮膚潰瘍は内科的治療で改善しないため、5月28日に自己骨髄細胞移植を施行した。末梢血管エコーにて、あらかじめ前脛骨動脈、後脛骨動脈、腓骨動脈に血管走行をマーキングし、それに沿って0.5 mlずつ、さらに、足底にも筋肉内注射した。投与された単核球数は 4.7×10^9 個($CD34^+ : 13.8 \times 10^7$)であった (Table 2)。結果、ABPIは術後1週間で0.49まで改善したが、1カ月後には0.39まで低下し、さらにレーザードブラ、サーモグラフィー、arterial inflowでも改善しなかった (Fig. 1)。下肢血管造影でも、移植前後で明らかな変化は見られなかった (Fig. 2)。しかし

Table 2 The number of injection cells

	MNCs	CD34 ⁺
Case 1	4.7×10^9	13.8×10^7
Case 2	4.1×10^9	8.6×10^7
Case 3	2.0×10^9	6.8×10^7

MNCs: mononuclear cells

ながら、術後1週で安静時疼痛が改善し、2週間で皮膚潰瘍が改善した (Fig. 3)。1年後の現在も経過良好である。

症例2は52歳の男性。1991年に当院にてパージャー病と診断された。2001年、左下肢の疼痛と第1~3趾に潰瘍を形成し、その後自然脱落した。潰瘍部の治癒傾向なく2002年10月加療目的で入院となる。喫煙歴は1日20本30年間、2年前から禁煙。ABPIは右1.18、左0.68。2002年11月25日に自己骨髄細胞移植を施行した。症例1と同様に、下腿筋および足底筋に投与された単核球数は 4.1×10^9 個($CD34^+ : 8.6 \times 10^7$)であった (Table 2)。ABPIは術後1週間で0.70、1カ月後は0.67と変化しなかった (Fig. 1)。下肢血管造影でも有意な改善は見られなかった (Fig. 4)。術後2週頃から徐々に潰瘍が縮小し始め、全潰瘍部が上皮で覆われるのには3カ月かかった (Fig. 5)。

症例3は27歳の男性。2002年8月頃から左母趾痛を認めたが放置していた。同年10月に巻き爪による炎症と診断され、左母趾の爪先端部の一部を剥離・排膿さ

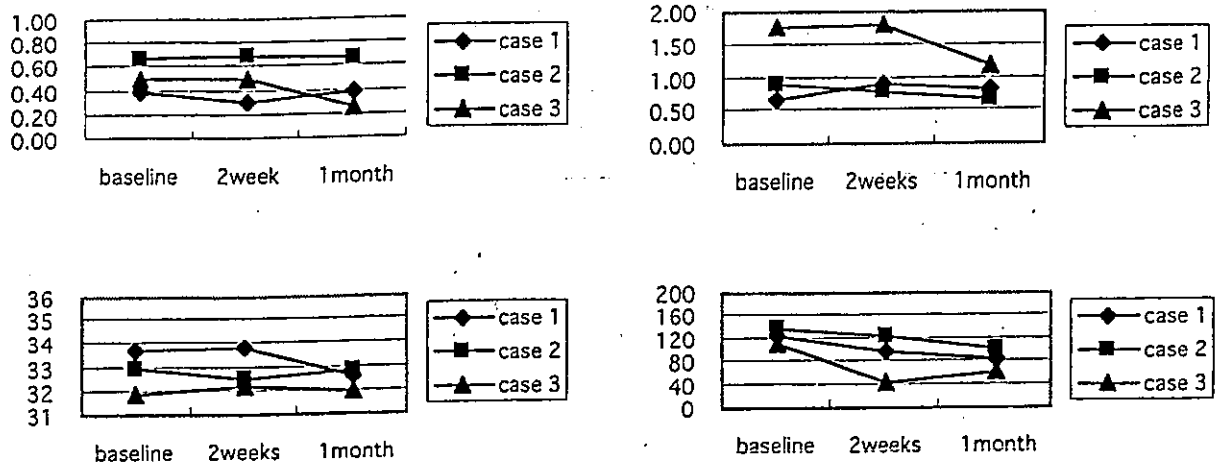


Figure 1
 A: Ankle brachial pressure index
 B: Laser Doppler (ml/min/100g)
 C: Thermograph (°C)
 D: Arterial inflow (ml/min)

A	B
C	D

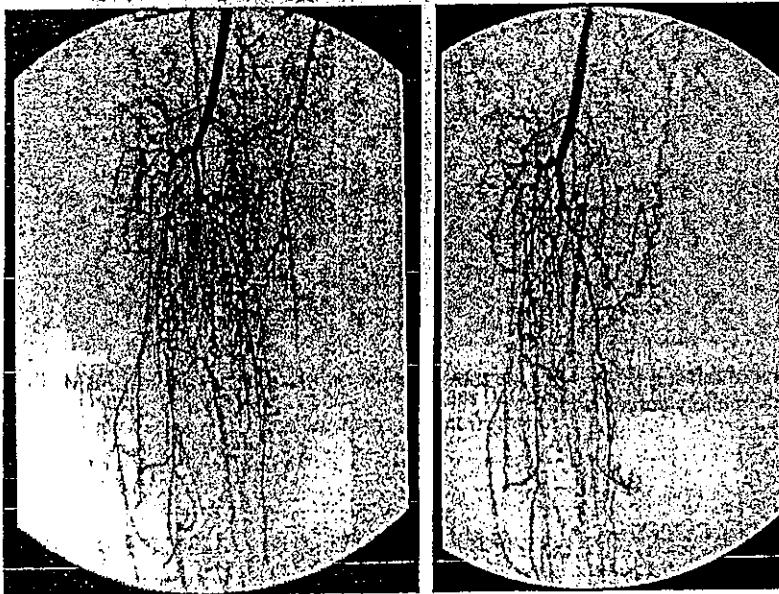


Figure 2 Angiography.
 There were no significant changes between vessels condition in baseline (left) and those in one month after bone marrow implantation (right) in limb angiography.

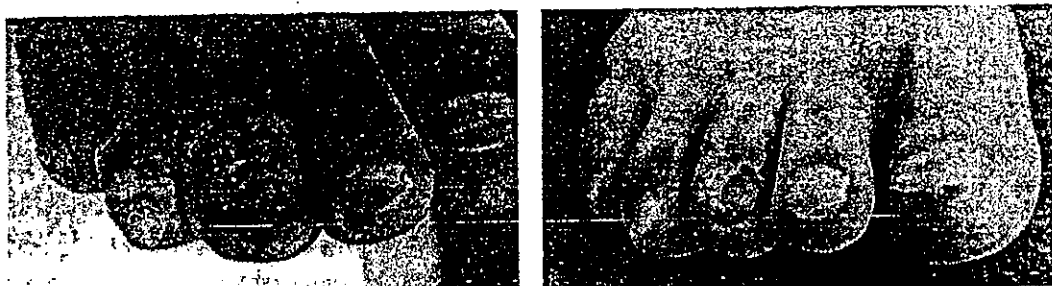


Figure 3 Skin ulcer.
 Ischemic skin ulcers were located on right 3rd and 4th toes in the first case (left). One month after the BM MNCs (bone marrow mononuclear cells) implantation, the ischemic skin ulcer improved (right).

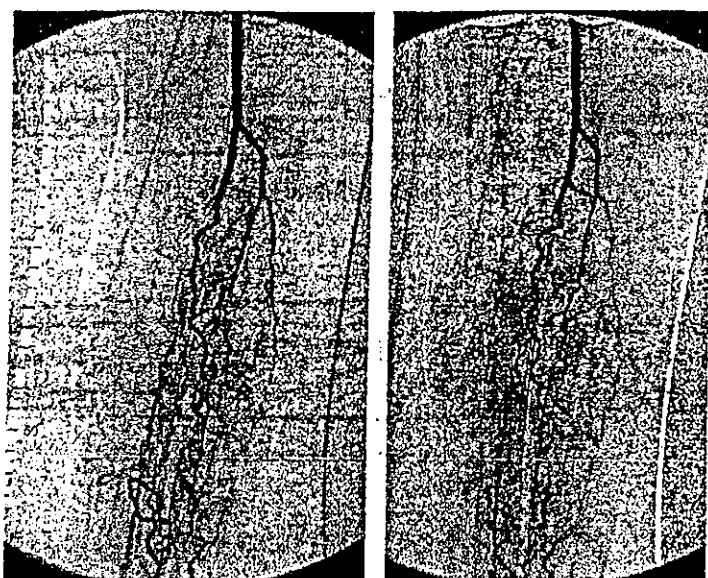


Figure 4 Angiography. There were no significant changes between vessels condition in baseline (left) and those in one month after bone marrow implantation (right) in limb angiography.

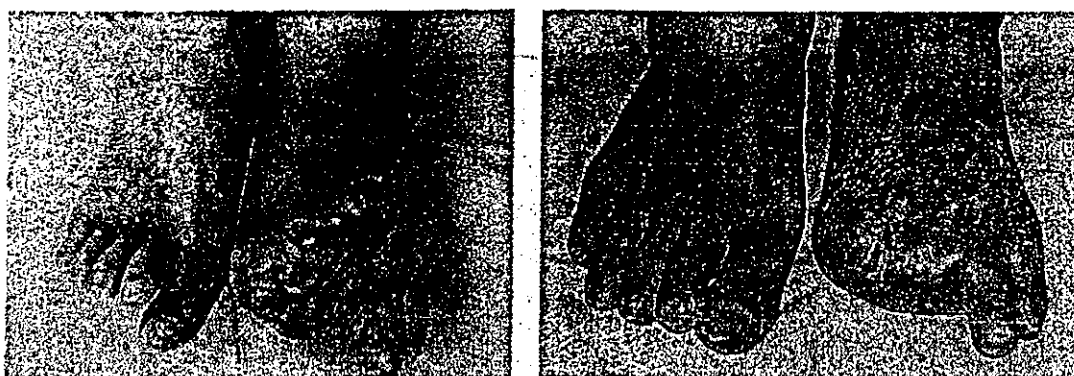


Figure 5 Skin ulcer. Serious skin ulcers were observed in the left leg (left), with the toes disappearing. Three months after BM MNCs implantation, skin was ulcer completely cured (right).

れた。難治性潰瘍のためバージャー病が疑われ、血管造影が施行された。下腿三分枝以下の血管の閉塞を認めバージャー病と診断され当院紹介となる。喫煙は1日20本13年間、1年半前から禁煙。ABPIは右0.80、左0.50。2003年7月31日に自己骨髄細胞移植を施行し、症例1、2と同様に、下腿筋および足底筋に単核球数は 2.0×10^9 個($CD34^+ : 6.8 \times 10^7$)であった(Table 2)。ABPIは術後1週間で0.50、1カ月後は0.26と低下した(Fig. 1)。下肢血管造影でも、有意な改善は見られなかった(Fig. 6)。しかし、皮膚潰瘍は術後1週頃から徐々に縮小し、1カ月で上皮に覆われ、安静時疼痛も消失した(Fig. 7)。

考 案

末梢動脈閉塞症は、閉塞性動脈硬化症(arteriosclerosis obliterans : ASO)とバージャー病の2つの疾患でほとんど占められる。これらに対する治療選択は①薬物治療、②カテーテル治療、③外科的バイパス術、④交感神経切除術が主な治療法である。当院における治療戦略として、比較的軽症例(Fontaine分類I~II度)に対しては経皮的血管形成術を含めた内科的治療が主体となり、下腿切断となる症例は少ない。しかし、重症例(Fontaine分類III~IV度)では内科的、外科的治療では解決しきれず、約13%の症例に下腿切断が施行されている(Table 3)。このように、血行再建が困難な重症例で

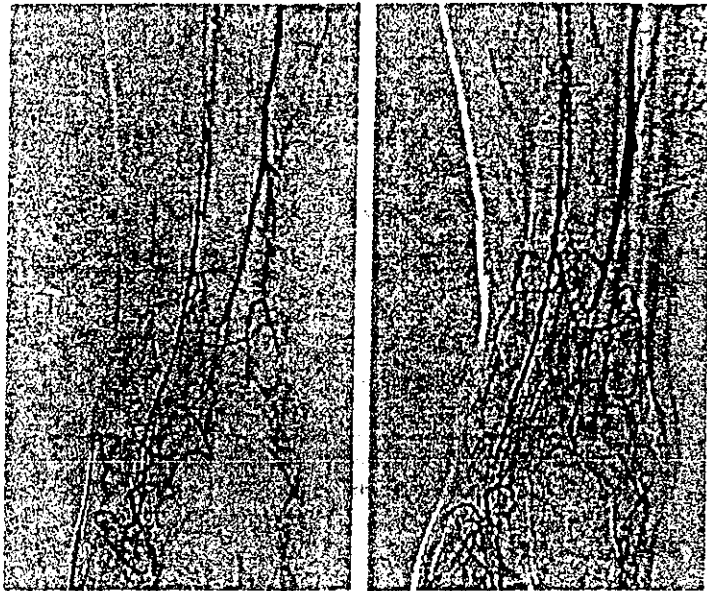


Figure 6 Angiography.
The number of vessels appeared to have increased in the angiographic image after the treatment (right) rather than baseline (left), but new vessels cannot be evaluated clearly in the images.

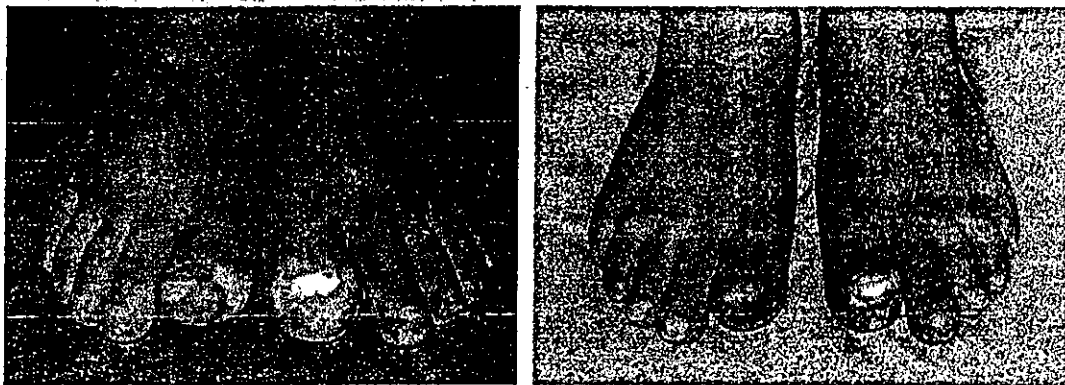


Figure 7 Skin ulcer.
There were skin ulcers in bilateral 1st toes (left). Right skin ulcer was completely cured and left skin ulcer also improved one month after the treatment (right).

は既存の治療法では限界があり、新しい治療戦略として血管再生治療が期待されている。Asaharaらは成人末梢血中の単核球分画に血管内皮細胞に分化しうる内皮前駆細胞の存在を報告した¹⁾。単核球は主に骨髄に存在するため、骨髄単核球細胞移植をすることにより、血管新生や側副血行路が発達し、動物実験の虚血モデルで下肢血流量増加作用や心機能が改善することが確認された。これらの基礎および臨床結果に基づき、カテーテル治療や外科的バイパス術による血行再建が困難な重症末梢性動脈疾患に骨髄単核球細胞移植が臨床導入され、安静時疼痛の改善や歩行距離の増加など良好な効果が報告されている。近年、ASO症例は増加し、バージャー病は減少している (Table 4)。このた

Table 3 The trend of the patient with peripheral artery disease in our hospital (Jan. 2002~Sep. 2003)

Fontaine	I & II (n = 114)	III & IV (n = 45)
age (y/o)	70.4	71.2
CAD	33 (29%)	19 (42%)
DM	47 (41%)	23 (51%)
HD	3 (3%)	5 (11%)
Treatment		
Medication	29 (25%)	17 (38%)
PTA	70 (62%)	10 (22%)
Operation	15 (13%)	18 (40%)
Amputation	0 (0%)	6 (13%)

CAD: coronary artery disease, DM: diabetes mellitus, HD: hemodialysis, PTA: percutaneous transluminal angioplasty

Table 4 The trend of the patient with critical peripheral artery disease (Fontaine III or IV) in our hospital (Jan. 2002~Sep. 2003)

	ASO (n = 45)	TAO (n = 7)
age (y/o)	71.2	58.4
CAD	19 (42%)	1 (14%)
DM	23 (51%)	0 (0%)
HD	5 (11%)	0 (0%)
Treatment		
Medication	17 (38%)	3 (43%)
PTA	10 (22%)	0 (0%)
Operation	18 (40%)	0 (0%)
Amputation	6 (13%)	0 (0%)

ASO: arteriosclerosis obliterans, TAO: thromboangiitis obliterans, CAD: coronary artery disease, DM: diabetes mellitus, HD: hemodialysis, PTA: percutaneous transluminal angioplasty

め、骨髄細胞移植治療の多くは、ASO症例に対して施行されている。しかしながら、ASO患者は冠動脈疾患や脳血管疾患の合併が多く、全身麻酔下で大量の骨髄液を採取する骨髄細胞移植治療の侵襲性的のため、骨髄細胞移植治療が困難な症例が少ない (Table 5)。よって、ASO症例に対する骨髄細胞移植治療の適応は慎重に考慮すべきであり、より侵襲の少ない末梢血幹細胞移植³⁾、遺伝子治療、サイトカイン治療に期待される。

当院では骨髄細胞移植治療の対象にASOを含めていたが、実際に施行可能であったのは、今回提示したバージャー病の3例であった。高度の虚血性潰瘍が全例において、骨髄細胞移植治療により、皮膚潰瘍の改善が認められた。一般に、広範囲の潰瘍に対しては、骨髄細胞移植治療に加えて皮膚移植が併せて施行される場合が多いが、骨髄細胞移植単独で改善することができた。このことは、バージャー病の病態として中枢側の動脈は比較的正常であるため細胞移植をうける下肢の血流の改善のみで、ASO症例より治療効果が高くなると考えられた。また、バージャー病はASOに比し若年で、心血管や脳血管の合併症が少なく、侵襲性の高い骨髄細胞移植治療も比較的容易に施行することができた。

また、虚血性潰瘍に対する細胞移植の治療効果は、TACTの報告でも治療効果は60%と報告されている^{3,4)}。TACTでは骨髄細胞と末梢血幹細胞移植の前向き研究

Table 5 Results of progress in consideration to bone marrow transplantation in our hospital (Jan. 2002~Sep. 2003)

ASO	n = 15
BM-MNCs	0 (0%)
CAD	11 (73%)
Malignancy	3 (20%)
Infection	1 (7%)
TAO	n = 6
BM-MNCs	4 (66%)
Malignancy	1 (16%)
Reject	1 (16%)

BM MNCs: bone marrow mononuclear cells, ASO: arteriosclerosis obliterans, TAO: thromboangiitis obliterans

をしているが、正確に治療効果を判定するには二重盲比較試験が必要である。しかし、骨髄細胞を採取するので、プラセボを投与することは倫理的に困難であり、現段階では他治療と比較して判断している。よって、当院では最低1カ月内科的治療を施行してから、安静時疼痛や皮膚潰瘍が治癒しない症例のみを対象としている。

結 論

今回の検討では症例が3例と少数であるが、バージャー病の難治性皮膚潰瘍に対しての骨髄細胞移植治療は、良好な治療効果が期待できると考えられた。

本治療の問題点として、ABPIや血管造影などの一般検査では、皮膚潰瘍の改善にもかかわらず、有意な変化は見られなかった。一般検査所見と臨床症状との間に乖離が認められた理由として、血管再生治療で再生される血管は微小血管と推測され、一般の血管造影では描出できないためと考えられた。今後、微小血管造影法⁶⁾など、血管再生治療を適切に評価する方法の確立が望まれる。

文 献

- 1) Asahara T, Murohara T, Sullivan A et al: Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science*, 1997, 275: 964-966.
- 2) Shintani S, Murohara T, Ikeda H et al: Augmentation of postnatal neovascularization with autologous bone marrow transplantation. *Circulation*, 2001, 103: 897-903.
- 3) Inaba S, Egashira K, Komori K: Peripheral-blood or bone-

- marrow mononuclear cells for therapeutic angiogenesis? *Lancet*, 2002, 360: 2083.
- 4) Tateishi-Yuyama E, Matsubara H, Murohara T et al: Therapeutic angiogenesis for patients with limb ischemia by autologous transplantation of bone-marrow cells: a pilot study and a randomised controlled trial. *Lancet*, 2002, 360: 427-435.
- 5) Iba O, Matsubara H, Nozawa Y et al: Angiogenesis by implantation of peripheral blood mononuclear cells and platelets into ischemic limbs. *Circulation*, 2002, 106: 2019-2025.
- 6) Mori H, Hyodo K, Tobita K et al: Visualization of penetrating transmural arteries in situ by monochromatic synchrotron radiation. *Circulation*, 1994, 89: 863-871.

Effects of Therapeutic Angiogenesis Using Autologous Bone Marrow Mononuclear Cell Implantation to the Incurable Skin Ulcer with Buerger's Disease

Masaaki Chiku, Kazuhiro Nishigami, Tokio Hayashi, Hitoshi Ogino,^{*1} Hitoshi Matsuda,^{*1} Kenji Minatoya,^{*1} Hiroaki Sasaki,^{*1} Takeshi Nakatani,^{*1} Akihiko Taguchi,^{*2} Shigeki Miyata,^{*3} Masataka Kamei,^{*4} Ryouichi Tanaka,^{*5} Hidezo Mori,^{*6} Kunio Miyatake, and Hitonobu Tomoike

Division of Cardiovascular Medicine, National Cardiovascular Center

^{*1}Division of Cardiovascular Surgery, National Cardiovascular Center

^{*2}Division of Cerebrovascular Medicine, National Cardiovascular Center

^{*3}Division of Transfusion Medicine, National Cardiovascular Center

^{*4}Division of Anesthesia, National Cardiovascular Center

^{*5}Division of Radiology, National Cardiovascular Center

^{*6}Division of Cardiac Physiology, National Cardiovascular Center

Key words: Autologous bone marrow mononuclear cell implantation, Therapeutic angiogenesis, Buerger's disease

The therapeutic angiogenesis using autologous bone marrow mononuclear cell implantation has been implemented for cases with critical peripheral artery disease (PAD), for which conventional treatments proved ineffective. The results of those studies showed that the improvements of intermittent claudication or rest pain were significant, but ischemic skin ulcer in those patients failed to be cured fully. We treated three cases with ischemic skin ulcers by Buerger's disease using bone marrow mononuclear cell implantation. Consequently, skin ulcers in three patients improved completely. The present study suggested that the therapeutic angiogenesis using bone marrow mononuclear cell implantation was a good solution to Buerger's disease, still with skin ulcers. (J. Jpn. Coll. Angiol., 2004, 44: 191-197)

骨髄幹細胞の心筋細胞への分化

中谷 武嗣 富田 伸司

心筋障害が高度な心不全に対して、心臓移植は有力な治療手段でその治療成績も良好であるが、ドナー心の不足が問題である。心補助手段の一つとして、骨格筋を心臓周囲にまきトレーニングを行うことで心補助を行う心筋形成術が試みられた¹⁾。しかし、手術侵襲が大きい割にその補助効果が遅発性で、かつ限定的であるため、現在では行われなくなった。その研究の中で、骨格筋を細胞レベルに細分し心筋へ移植することで、移植細胞の心筋化を伴い、心機能改善効果を得られるのではないかとして、心臓への細胞移植の研究がスタートした²⁾。その後、移植する細胞種について種々の研究がなされたが、本稿では、細胞源としての骨髄幹細胞を中心に概説する。

① 外因性幹細胞移植

骨髄細胞は細胞移植に用いる細胞種として種々の利点を持っている。まず、細胞の採取法としての骨髄穿刺は臨床的な手技として確立している。また、自己組織を用いるため、免疫抑制の必要がなく、倫理的にも問題とならない。骨髄細胞の多くは造血幹細胞であるが、間葉系の幹細胞が存在し、条件により骨、軟骨、脂肪細胞へ分化誘導が可能である。骨髄細胞を経代培養すると、接着能の弱い造血幹細胞は除去され、線維芽細胞に似た“間葉系幹細胞”を含む集団となるが、この間葉系幹細胞を同定する方法が確立されていない。このため、間葉系幹細胞の研究が遅れている。

心筋細胞が 5-azacytidine 処理を行った骨髄細

胞から分化誘導されるとする報告が 1999 年に行われた^{3,4)}。さらに、経静脈的に移植された骨髄細胞も心筋細胞へ分化し得ることが報告され⁵⁾、心筋細胞移植の細胞源として骨髄が注目されるようになった。

多くの研究グループが心筋細胞、内皮細胞、平滑筋細胞などの表現型 (phenotype) を示す成人幹細胞の分離を試みてきた。Orlic らは Lin-C-kit⁺細胞が梗塞心筋細胞を再生すること⁶⁾を、また Jackson らは SP (side population) 細胞が虚血心筋を再生すること⁷⁾を報告した。最近では、Beltrami らが、Lin-C-kit⁺細胞を虚血心に注入すると、新生血管や心筋細胞を含む心筋を再構築されることから、Lin-C-kit⁺細胞が心幹細胞であると報告している⁸⁾。これに対して、Murry ら⁹⁾や Balsam ら¹⁰⁾は、造血幹細胞 (Lin-c-kit⁺細胞, Lin-c-kit⁺Scar⁺) は、心筋梗塞において心筋細胞に分化しないことを示した。多くの研究者が幹細胞を *in vitro* や *in vivo* で操作することを試みているが、現状では、ヒト心筋細胞や心筋芽細胞を効率よく臨床応用に十分な量を培養する技術は確立されていない。

細胞移植においては、ホスト細胞とドナー細胞が電気的結合を行い同期して収縮することにより心臓ポンプ機能を改善することを目指している。しかし、この電気的結合が不完全であると不整脈の誘引となることが問題視されている。2000 年にフランスの Menasche らは、自己骨格筋芽細胞を虚血心筋へ細胞移植を行う第 1 相の臨床試験を

Differentiation of bone marrow derived stem cells to cardiac cells

Takeshi Nakatani [著者連絡先] 国立循環器病センター 臓器移植部 (〒565-8565 大阪府吹田市藤白台 5-7-1)

Shinji Tomita: オークランドシティー病院 心臓血管外科 (オークランド市, ニューゼーランド)

行ったが、10 例中 4 例において心室頻拍のため埋め込み型除細動器(AICD)の装着を行ったと報告している¹¹⁾。しかし、その後これらの AICD が不整脈による作動はみられなかった。われわれの動物実験での検討では、致死的な不整脈の発生を認めなかった¹²⁾。この不整脈の問題に関しては、今後さらに検討が必要である。

また、骨髄細胞による心臓血管系の再生に関して、Asahara らは、末梢血に骨髄からの血管内皮前駆細胞(endothelial progenitor cells : EPC)が存在し、虚血心筋において脈管新生(vasculogenesis)や血管新生(angiogenesis)に貢献していることを報告した¹³⁾。また、Shintani らは、骨髄単核球細胞(bone marrow mononuclear cell : BM-MNC)による虚血肢における血管新生を報告し¹⁴⁾、わが国において臨床応用が行われている。BMMNC の利用は、培養する必要がなく用いやすい。また、骨髄細胞からのサイトカインが血管新生に大きな役割を果たしていると考えられている¹⁵⁾。さらに、虚血心筋に対しても外科的に注入する方法が試みられている¹⁶⁾。これらは、骨髄細胞による vasculogenesis や angiogenesis により、虚血心臓を再生させようとするものである。

骨髄細胞を用いることの容易さもあり、種々の臨床研究が進められている^{17,18)}が、これらは、血管新生と心筋細胞の新生の二つを合わせようとするものである。骨髄細胞移植による心機能改善のメカニズムについては、未だ詳細は不明であり、今後の研究が必要である。

② 内因性幹細胞移植

これまで成人の心筋細胞は増殖再生しないとされてきた。1998 年頃から Anversa らのグループは、成人心筋細胞も分裂増殖することができ、体内に存在する幹細胞(内因性幹細胞)による病的心臓の自己再生能を報告した¹⁹⁾。外因性の細胞と異なり、外科的手術や増殖を行う必要がないため、汎用性は高いと考えられる。さらに、内因性幹細胞の働きを人為的に賦活化できれば、外部からの細胞移植は不要になる。

Olic らは、顆粒球コロニー刺激因子(G-CSF)と幹細胞因子(SCF)をマウス急性心筋梗塞モデル

に投与したところ、心機能の改善、生存率の改善を得られたと報告し、G-CSF と SCF による幹細胞の賦活化が示された²⁰⁾。しかし、再生された心筋がホストの心筋由来か骨髄由来かについては不明である。

そこで、著者らは、この内因性幹細胞は骨髄由来かどうかを確認するために、GFP 遺伝子組み換えマウス由来骨髄細胞(GFP-BMC)を放射線照射後の C57b6 マウスに移植し、キメラマウスを作製した。心筋梗塞モデルにおいて、心筋梗塞 1 ヶ月後には、G-CSF 投与群において生存率の改善傾向を認めた²¹⁾。また、心筋梗塞境界部では、G-CSF 群において、GFP-BMC 数がコントロール群より有意に増加した。さらに、その GFP-BMC のうち約 20%がトロポニン I 陽性細胞で、ネスチン陽性細胞も多数認めた。同様の結果は doxorubicin による心不全モデルにおいても確認された²²⁾。この結果から、再生心筋の細胞源のひとつは骨髄であり、G-CSF によりその効果が増強されることが示唆された。しかし、骨髄由来の心筋細胞数は少なく、心臓ポンプ機能の改善効果には限界があることが示されている²³⁾。また、G-CSF はさまざまな生理学的な役割を持っており、われわれは、G-CSF が病的な心筋に直接働き、G-CSF レセプターを介してトロポニン-I 陽性細胞の増殖を増強することを確認している²⁴⁾。最近 Beltrami らは、心臓幹細胞が心臓内に存在することを報告している⁹⁾。

2002 年に Sata らは、造血幹細胞が動脈硬化に寄与することと報告した²⁵⁾。また、韓国のグループが、急性心筋梗塞後に冠動脈内ステント挿入術が行われた患者に対して G-CSF 治療を行ったところ、高率でステント内再狭窄を認めたと報告している²⁶⁾。内因性幹細胞は、障害された心筋とともに動脈硬化巣にも遊走する可能性があることを警鐘している。今後、内因性幹細胞遊走の生理学的メカニズムが解明することができれば、心筋障害に対する内因性幹細胞を用いた治療を効果的に行うことが可能となる。

③ 心臓内環境因子

幹細胞の心筋への分化に環境因子(cardiac

milieu)が重要とされている^{27,28)}が、その詳細は不明である。

著者らは、細胞同士の直接接触が環境因子のひとつであるとして以下の実験を行った²⁹⁾。ラット新生児心筋細胞をホスト心筋(CM)とし、GFP遺伝子組み換えマウス由来骨髄細胞(GFP-BMC)を移植細胞とし、共培養実験系を作製した。GFP-BMCとCMとの間に隔壁をおいた double chamber 培養では、GFP-BMC に特に変化を認めなかった。これに対し、GFP-BMC と CM を混合した共培養系では、ある GFP-BMC は、2 日後から CM と同期収縮を開始するものが現れた。また、免疫組織染色では、myosin heavy chain-slow(1 日後から)、コネキシン 43 と心房性ナトリウム利尿ペプチド(ANP)(2 日後から)、トロポニン I(4 日後から)が経時的に発現し漸増した。5 日後には myosin heavy chain-slow 陽性細胞はおおよそ 2.5% になった。この結果、幹細胞の心筋分化には、ホストの心筋細胞との直接接触が重要な役割を果たしていることが明らかになった。また、循環血液中のヒト骨髄細胞が心筋細胞に分化することが報告されている³⁰⁾。2002 年に、細胞融合(cell fusion)の問題が報告された³¹⁾。この報告は、ES 細胞と GFP マウス由来骨髄細胞との共培養により、一見 GFP を発現した細胞が分化増殖するよう見えるが、その細胞の核内には ES 細胞由来の DNA も含んでいたとしている。しかし、細胞融合の割合が低いため、この現象は十分には解明されていない。Oh らは、成人心臓からの幹細胞抗原-1 を発現する心臓前駆細胞が、ホスト細胞との融合があってもなくても、ほぼ同等に心筋へ分化することを報告した³²⁾。融合が生理的過程として起こっているのであれば、今後の研究が必要となるであろう。

おわりに

心臓への細胞移植について種々の研究がなされており、その中で用いる細胞種の一つとして骨髄幹細胞がある。また、従来からの外因性細胞移植のみならず内因性細胞移植による心筋再生も注目されている。さらに、心筋への分化における環境因子に関しても検討されている。骨髄幹細胞は、

倫理的側面を含み臨床応用が行いやすい細胞種であり、今後さらに検討が進むものと考えられる。

●文 献

- 1) 中谷武嗣, 高野久輝: Cardiomyoplasty. 心臓血管外科, 川島康生(編), pp 846-850, 朝倉書店, 東京, 2000
- 2) Marelli D et al: *Cell Transplant* 1: 383-390, 1992
- 3) Makino S, Fukuda K, Miyoshi S et al: *J Clin Invest* 103: 697-705, 1999
- 4) Tomita S, Li RK, Weisel RD et al: *Circulation* 100(19 Suppl): II 247-II 256, 1999
- 5) Bittner RE, Schofer C, Weipoltshammer K et al: *Anat Embryol (Berl)* 199: 391-396, 1999
- 6) Orlic D, Kajstura J, Chimenti S et al: *Nature* 410: 701-705, 2001
- 7) Jackson KA, Majka SM, Wang H et al: *J Clin Invest* 107: 1395-1402, 2001
- 8) Beltrami AP, Barlucchi L, Torella D et al: *Cell* 114: 763-776, 2003
- 9) Murry CE, Soonpaa MH, Reinecke H et al: *Nature* 428: 664-668, 2004
- 10) Balsam LB, Wagers AJ, Christensen JL et al: *Nature* 428: 668-673, 2004
- 11) Menasche P, Hagege AA, Vilquin JT et al: *J Am Coll Cardiol* 41: 1078-1083, 2003
- 12) Fujii H, Tomita S, Nakatani T et al: *J Am Coll Cardiol* 43: 1299-1305, 2004
- 13) Asahara T, Murohara T, Sullivan A et al: *Science* 275: 964-967, 1997
- 14) Shintani S, Murohara T, Ikeda H et al: *Circulation* 103: 897-903, 2001
- 15) Tateishi-Yuyama E, Matsubara H, Murohara T et al: *Lancet* 360: 427, 2002
- 16) Hamano K, Li TS, Kobayashi T et al: *Ann Thorac Surg* 73: 1210-1215, 2002
- 17) Strauer BE, Brehm M, Zeus T et al: *Circulation* 106: 1913-1918, 2002
- 18) Assmus B, Schachinger V, Teupe C et al: *Circulation* 106: 3009-3017, 2002
- 19) Beltrami AP, Urbanek K, Kajstura J et al: *N Engl J Med* 344: 1750-1757, 2001
- 20) Orlic D, Kajstura J, Chimenti S et al: *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 10344-10349, 2001
- 21) Fukuhara S, Tomita S, Ohtsu Y et al: *Circulation* 106(suppl II): A 1870, 2002
- 22) Tomita S, Ishida M, Nakatani T et al: *J Heart Lung Transplant* 23: 577-584, 2004
- 23) Fukuhara S, Tomita S, Nakatani T et al: *J Heart Lung Transplant* (in press)
- 24) Hamamoto M, Tomita S, Nakatani T et al: *J Heart Lung Transplant* (in press)
- 25) Sata M, Saiura A, Kunisato A et al: *Nat Med* 8: 403-409, 2002
- 26) Kang HJ, Kim HS, Zhang SY et al: *Lancet* 363: 751-756, 2004

- 27) Wang JS, Shum-Tim D, Galipeau J et al : *J Thorac Cardiovasc Surg* **120** : 999-1006, 2000
- 28) Liechty KW, MacKenzie TC, Shaaban AF et al : *Nat Med* **6** : 1282-1286, 2000
- 29) Fukuhara S, Tomita S, Nakatani T et al : *J Thorac Cardiovasc Surg* **125** : 1470-1480, 2003
- 30) Badorff C, Brandes RP, Popp R et al : *Circulation* **107** : 1024-1032, 2003
- 31) Terada N, Hamazaki T, Oka M et al : *Nature* **416** : 542-545, 2002
- 32) Oh H, Bradfute SB, Gallardo TD et al : *Proc Natl Acad Sci USA* **100** : 12313-12318, 2003
-

巻頭言

重症心不全治療における心臓移植について

中 谷 武 嗣*

心臓病の治療成績は向上してきたが、重症心不全治療においてははまだ難渋することが多く、臓器機能置換としての心臓移植や人工心臓を考慮せざるを得ない。心臓移植は、国際レジストリーではこれまでに6万例以上施行され、1年生存率が80%強、半数がほぼ10年生存している。また、植え込み型左心補助人工心臓(LVAS)のHeartMateおよびNovacorは、4700例以上に適応され、外来管理が積極的に行われている。

わが国では、1997年の臓器移植法施行後、現在までに19例の心臓移植が施行され、最長5年経過するが全例生存している。しかし、待機数に比し施行数が非常に少ないため、その待機期間が極端に長くなり、最近では2年以上となっている。このため、19例中13例がLVAS装着にて待機となっている。当院においても、これまでに83例を日本臓器移植ネットワークへ登録してきたが、内52例はLVAS装着例で、その90%以上が体外設置型である。当初体外設置型LVASでの補助期間は一年程度と想定されていたが、待機を続けざるを得ず、心不全・移植病棟を開設し管理を一元化したところ、その平均補助期間は500日を越えるようになった。本年2月には800日を越えた体外設置型LVAS例および900日を越えるHeartMate例の同時心臓移植手術が行われたが、ともに50日後に退院し現在自宅にてリハビリを行っている。しかし、現在も30例が移植待機中で、内13例がLVAS装着、3例が強心薬投与中である。米国ではLVAS装着例では2ヵ月以内に移植が行われており、中には渡航移植を希望される方がおられるのが現状である。

心臓移植のドナー不足は欧米を含め世界的な問題

であり、心臓移植の代替手段として、薬物治療、外科手術、LVASに加え、両心室ペーシング、さらには細胞療法などの再生医療などの開発が行われている。また、LVAS補助例の一部では著明に心機能が回復しLVASから離脱する例もあり、我々も移植登録取消しに至った症例を既に3例経験している。さらに、心臓移植が対象とならない症例に対して欧米ではLVASがdestination therapyとして適応されるようになってきている。しかし、これらの効果には限界があり、現状では心臓移植へのつなぎとして位置付けられており、欧米では心臓移植を受け皿とした治療体系で臨床例での検討が積極的に進められている。これに対し、心臓移植が受け皿として現実的にないわが国での状況では、これらの新しい治療法の導入においてわが国で開発されたものであっても困難があり、諸外国での検討およびその評価を待たざるをえない。今後わが国が貢献すべき分野として期待される人工臓器や再生医療を、世界にリードして推進するためにも、グローバルスタンダードである心臓移植治療を組み込んだ重症心不全治療体系を持つことが必要であり、今一度わが国として心臓移植医療を考える時期と考える。

*国立循環器病センター臓器移植部

A highly sensitive strategy for SCID-repopulating cell assay by direct injection of primitive human hematopoietic cells into NOD/SCID mice bone marrow

Takashi Yahata, Kiyoshi Ando, Tadayuki Sato, Hiroko Miyatake, Yoshihiko Nakamura, Yukari Muguruma, Shunichi Kato, and Tomomitsu Hotta

To measure the ability of human hematopoietic stem cells (HSCs), the SCID-repopulating cell (SRC) assay has been widely used. Conventionally, human HSCs are transplanted into a nonobese diabetic/severe combined immunodeficient (NOD/SCID) mouse via a tail vein. However, those cells must go through various obstacles until they reach the mouse marrow environment, which could explain the generally low homing efficiency in this system. Thus, the capability of HSCs may not be studied accurately by this intravenous transplantation method. In our attempt to reveal actual SRC potential, ie, self-renewal and multilineage differentia-

tion in recipient bone marrow, we introduced cells into mouse marrow directly (intrabone marrow [iBM]) to minimize the effect of factors that may interfere with the homing of HSCs and compared the results obtained by intravenous and iBM methods. When cord blood CD34⁺CD38⁻ cells were transplanted in NOD/SCID mice by iBM, a 15-fold higher frequency of SRC, 1 in 44 CD34⁺CD38⁻ cells, was achieved compared with 1 in 660 by the intravenous method. Furthermore, the iBM transplant showed high levels of engraftment in the secondary transplantation. Pretreatment of CD34⁺ cells with antibodies that block either very late antigen 4

(VLA-4) or VLA-5 reduced engraftment partially, whereas blockage of both molecules resulted in complete inhibition of engraftment, which suggests that VLA-4 and VLA-5 are involved in different processes in engraftment or have complementary roles. Our results indicate that the iBM injection strategy is a more sensitive and direct way to measure the capability of human SRCs and is useful to investigate the interaction of HSCs and marrow environment in vivo. (Blood. 2003;101:2905-2913)

© 2003 by The American Society of Hematology

Introduction

Measurement of human hematopoietic stem cell (HSC) activity has been greatly facilitated by the development of xenotransplantation assay. Especially, nonobese diabetic/severe combined immunodeficient (NOD/SCID) mice have proven to be a reliable recipient for detecting human hematopoietic-repopulating cells that differentiate into multilineage mature cells and self-renew in mice.¹⁻³ Human hematopoietic-repopulating cells identified in this assay, operationally defined as SCID-repopulating cells (SRCs), have been shown to be enriched among an extremely rare CD34⁺CD38⁻ subfraction of lineage-depleted (Lin^{-low}) cells, and the frequency of SRCs was 1 in 617 Lin^{-low}CD34⁺CD38⁻ cord blood (CB) cells.⁴

This assay, however, quite possibly underestimates human hematopoietic-repopulating cell frequencies. When candidate human stem cells are transferred by intravenous injection, cells travel into the right atrium, ventricle, and lungs in which most of the cells are trapped, then to the systemic circulation and lodge in organs according to organ blood flow; therefore, only a small fraction of injected cells can lodge in bone marrow (BM).⁵⁻⁸ The marrow seeding efficiency of murine repopulating stem cells was reported around 20%,⁹⁻¹¹ and that of human stem cells in the sublethally irradiated NOD/SCID mouse was even lower than in the syngeneic murine situation. van Hennik et al¹² demonstrated that the seeding efficiencies of human CB CD34⁺ cells in NOD/SCID mice were 4.4% by week 6 cobblestone area-forming cell (CFAC) assay and

2.3% by flow cytometry analysis. Cashman and Eaves¹³ reported that the proportion of total injected human CB competitive repopulating units (CRUs) in the marrow of mice was 7%, as determined by limiting-dilution assays in NOD/SCID mice.

To exclude stem cell homing interference (eg, stem cell trapping in lung and/or liver, transendothelial migration step) and focus on the phases of the stem cell and BM stromal cell interaction, we carried out direct injection of human hematopoietic cells into mouse BM (intra-BM [iBM] injection), as previously reported by Kushida et al,¹⁴ and compared it with the SRC assay conducted by intravenous injection. iBM injection is revealed to be sensitive and adequate means to measure human HSC capability and enabled us to investigate the interaction of HSCs and marrow environment in vivo directly.

Materials and methods

Collection and purification of human CB CD34⁺ cells

CB samples were obtained from full-term deliveries according to the institutional guidelines approved by Tokai University Committee on Clinical Investigation. Mononuclear cells (MNCs) were isolated by Ficoll-Hypaque (Lymphoprep, 1.077 ± 0.001 g/mL; Nycomed, Oslo, Norway) density gradient centrifugation. Cells were washed and suspended in

From the Division of Hematopoiesis, Research Center for Regenerative Medicine, Department of Hematology, and Institute of Medical Sciences, Tokai University School of Medicine, Isehara, Kanagawa, Japan.

Submitted July 8, 2002; accepted October 24, 2002. Prepublished online as *Blood* First Edition Paper, October 31, 2002; DOI 10.1182/blood-2002-07-1995.

Supported by a grant-in-aid for a Research Grant of the Science Frontier Program from the Ministry of Education, Science, Sports, and Culture of Japan.

Reprints: Kiyoshi Ando, Department of Hematology, Tokai University School of Medicine Bohseidai, Isehara, Kanagawa 259-1193, Japan; e-mail: andok@keyaki.cc.u-tokai.ac.jp.

The publication costs of this article were defrayed in part by page charge payment. Therefore, and solely to indicate this fact, this article is hereby marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. section 1734.

© 2003 by The American Society of Hematology

phosphate-buffered saline (PBS) containing 0.1% of human serum albumin (HSA; Sigma, St Louis, MO). CD34⁺ cell fractions were prepared from Ficoll-separated MNCs using the CD34 Progenitor Cell Isolation Kit (Miltenyi Biotec, Sunnyvale, CA) according to the manufacturer's directions. For isolation of Lin^{-low}CD34⁺CD38⁻ and CD34⁺CD38⁺ cells, CD34⁺-enriched cells were stained with fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated antineuro-specific antigens; CD3 (UCHT1), CD41 (P2), glycophorin A (11E4B-7-6) (all Coulter/Immunotech, Marseille Cedex, France), CD4 (SK3), CD7 (4H9), CD14 (MφP9), CD16 (3G8), CD19 (SJ25C1) CD20 (2H7), CD33 (WM53), and CD56 (NCAM16.2) (all BD Biosciences, San Jose, CA), and phycoerythrin (PE)-conjugated anti-CD38 (HB7; BD Biosciences), phycoerythrin-Texas Red (ECD)-conjugated anti-CD34 (581; Coulter/Immunotech), and allophycocyanin (APC)-conjugated anti-CD45 (J.33; Coulter/Immunotech) monoclonal antibodies (mAbs). Cells were sorted using FACS Vantage flow cytometer (BD Biosciences) equipped with HeNe and argon lasers. CD38⁻ region was defined as below isotype control. The expression of CD34 and CD38 cell surface antigens on a representative Lin^{-low} population is shown in Figure 1A-B. Lin^{-low}CD34⁺CD38⁻ cells, which comprise 5% to 8% of total CD34⁺ population, was isolated with 97% to 99% (n = 16) purity using FACS Vantage (Figure 1C).

NOD/SCID mice

Male or female NOD/Shi-*scid* (NOD/SCID) mice were obtained from CLEA JAPAN (Tokyo, Japan) and were maintained until use in the animal facility of Tokai University School of Medicine in microisolator cages. Mice were fed ad libitum with autoclaved food and water. All experiments were approved by the animal care committee of Tokai University.

Intrabone marrow or Intravenous injection of human hematopoietic cells

NOD/SCID mice (7-9 weeks old) were irradiated with 300 cGy X-rays and thereafter received acidified water containing 1.1 g/L neomycin sulfate and 131 mg/L polymyxin B sulfate (Sigma). Within a few hours after irradiation, the mice were injected intravenously or by iBM with human CB Lin^{-low}CD34⁺CD38⁻ cells along with 10⁴ irradiated (15 Gy) CD34⁺CD38⁺ cells as carrier cells to support engraftment and expansion of immature CD34⁺CD38⁻ cells.^{15,16} IBM injection was carried out as described previously with slight modifications.¹⁴ In brief, a 29-gauge needle was inserted into the joint surface of the right tibia of anesthetized mice, and human hematopoietic cells in 40-μL suspension were injected into the BM cavity. For the punctures and injections, 1-mL insulin syringe with fixed 29-gauge needle (Terumo, Tokyo, Japan) was used. The advantage of this needle is the absence of dead space at the connection between the needle and the syringe, which minimizes the loss of samples.

For in vivo blocking experiments, column-enriched whole CD34⁺ cells (> 95% purity, n = 10) were preincubated with 20 μg/mL antihuman-CXCR4 (12G5; BD Biosciences), antihuman-VLA-4 (HP2/1; Coulter/Immunotech), or antihuman-VLA-5 (SAM-1; Coulter/Immunotech) mAbs for 30 minutes on ice. After washing, 2 × 10⁵ or 2 × 10⁴ CD34⁺ cells were injected into mice intravenously or by iBM, respectively. All blocking antibodies used in this study were nontoxic to human CD34⁺ cells as determined by colony-forming assays and our stromal cell-dependent culture system as described previously (data not shown).¹⁷ For cell surface

analysis, column-enriched CD34⁺ cells were again stained with APC-conjugated antihuman CD34 mAb and with FITC-conjugated antihuman-VLA-4, -VLA-5 mAbs, or PE-conjugated antihuman CXCR4 mAb. Cells labeled with mouse isotype control antibodies were used as negative control. Fluorescence-activated cell sorter (FACS) analysis was performed using FACSCalibur (BD Biosciences).

Tracing of intrabone marrow-injected CD34⁺ cells

Column-enriched CB CD34⁺ cells (> 95% purity, n = 16), washed once with PBS, were suspended in PKH diluent, and the PKH26 dye (Sigma) at 20 μM was added. Cells were incubated at room temperature for 3 minutes with gentle agitation. Fetal calf serum (FCS; 2 mL) was added to cell suspension to stop the reaction, and then cells were centrifuged and washed twice with alpha-minimal essential media containing 10% FCS. PKH26-stained cells, 10⁶ cells per animal, were injected iBM or intravenously into irradiated NOD/SCID mice. Aliquots of cells were reserved for staining control. At 5 minutes and 20 hours after transplantation, BM samples were aspirated from the human cell noninjected side tibia through the knee joint, as previously described.^{18,19} Peripheral blood (PB) was aspirated from retroorbital sinus. After washing and hemolysis, samples were suspended in PBS containing propidium-iodide (PI) for flow cytometric analysis using FACSCalibur (BD Biosciences). Dead cells stained with PI were excluded from the analysis.

Flow cytometric analysis

Six to 9 weeks after transplantation, mice were killed, and BM, spleen, and PB were collected for analyzing the presence of human cells by flow cytometry. Human hematopoietic cells were distinguished from mouse cells by the expression of human CD45. BM cells were collected separately from tibia of human cell-injected side and noninjected side and suspended in PBS using a 27-gauge needle. Spleen was teased apart. PB was aspirated from retroorbital sinus. Samples were prepared as single cell suspensions in PBS containing 0.1% HSA and passed through a nylon filter to remove debris. Cells were stained with mAbs to human leukocyte differentiation antigens. FITC-conjugated antihuman CD34 (Coulter/Immunotech), CD14, CD19, CD33, CD56 (all BD Biosciences) mAbs, PE-conjugated antihuman CD38 (BD Biosciences), and APC-conjugated antihuman CD45 mAbs (Coulter/Immunotech) were used. Four-color flow cytometric analysis was conducted using FACSCalibur or FACS Vantage (BD Biosciences). Quadrants were set to include at least 97% of the isotype-negative cells. Dead cells stained with PI were excluded from the analysis.

Analysis of human cell engraftment in mice receiving transplants by polymerase chain reaction (PCR)

Genomic DNA was isolated from the BM of mice receiving transplants by standard extraction protocols. DNA samples (100 ng) were subjected to PCR to detect a 1171-bp fragment of human chromosome 17-specific α-satellite using the primers: forward 5'-ACACTCTTTTTCAG-GATCTA-3' and reverse 5'-AGCAATGTGAACTCTGGGA-3' under the following conditions: 94°C for 2 minutes (1 cycle); 94°C for 1 minute, 65°C for 1 minute, 72°C for 2 minutes (30 cycles); and 72°C for 7 minutes (1 cycle). PCR was performed using the RNA PCR kit (TAKARA SHUZO, Tokyo, Japan). PCR products were separated on 1.0% agarose gel and visualized by ethidium bromide staining. The level of human cell engraftment was determined by comparing the characteristic 1171-bp PCR product with that of human/mouse DNA mixture control (detection limit of 0.001% human DNA).

Analysis of the integration site of lentivirally marked CD34⁺ cells

Transduction of enhanced green fluorescent protein (EGFP) encoded gene to CD34⁺ cells by recombinant lentivirus infection was carried out as described previously.²⁰ Briefly, CB CD34⁺ cells were prestimulated by incubating in StemPro-34 medium (Invitrogen, Carlsbad, CA) containing cytokines at 37°C in 5% CO₂ for 24 hours. Recombinant human thrombopoietin (TPO; 50 ng/mL; kindly donated from Kirin Brewery, Tokyo,

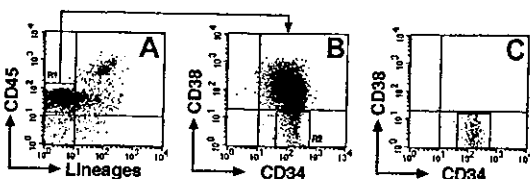


Figure 1. Representative FACS profile of sorted CB Lin^{-low}CD34⁺CD38⁻ cells. (A) Column-enriched CD34⁺ cells were stained with anti-CD45 mAb and antineuro-specific mAb cocktail and were gated on lineage marker-negative and/or low expression region (R1). (B) R1 cells were further gated on CD34⁺CD38⁻ region (R2). (C) Re-analysis of isolated CD34⁺CD38⁻ cells from R2 (99.8% purity).

Japan), stem cell factor (SCF; 50 ng/mL; donated from Kirin Brewery), and Flk-2/Flt-3 ligand (FL; 50 ng/mL; R&D Systems, Minneapolis, MN) were used. Prestimulated CD34⁺ cells were cultured for 12 hours under the same conditions in the presence of highly concentrated lentiviral supernatant at an MOI (multiplicity of infection) of 500. Lentiviral-infected CD34⁺ cells were transplanted into irradiated NOD/SCID mice by iBM injection. Genomic DNA was extracted from the injected side tibia, noninjected side tibia, and spleen of mice receiving transplants at 8 weeks after transplantation. DNA (10 µg) was digested with *EcoRI*, which recognizes a unique site in viral genome, and was electrophoresed on 0.7% agarose gel. After transferring to nylon membranes, DNA was hybridized with ³²P-labeled random-primed EGFP probe.

Secondary transplantation

BM cells were obtained from tibiae and femurs of highly engrafted primary mice that received iBM transplants (23%-87% chimerism of human CD45⁺ cells, *n* = 10) at 6 weeks after transplantation, and cells were injected intravenously or by iBM into irradiated secondary NOD/SCID recipients. Six weeks after transplantation, presence of transplanted human cells in recipient tibiae was analyzed by flow cytometry, as was described for primary recipients.

Statistical analysis

Engraftment was determined positive when more than 0.01% human CD45⁺ cells in FACS or 0.01% human satellite PCR products in PCR were detected. For limiting dilution analysis, results of mice that received transplants scored positive by both methods were used. The data from several limiting dilution experiments were combined and used for analysis. The frequency of SRCs in the test BM sample was calculated by applying Poisson statistics to the proportion of negative recipients at different dilutions using L-Calc software (StemCell Technologies, Vancouver, BC, Canada). Data are represented as mean ± SD. The 2-sided *P* value was determined, testing the null hypothesis that the 2 population medians are equal. *P* < .05 was considered significant.

Results

Tracking Intravenous or iBM transplanted human primitive hematopoietic cells

We first examined the distribution of infused human primitive hematopoietic cells. PKH26-stained CB CD34⁺ cells (10⁶ cells per mouse) were transplanted to irradiated NOD/SCID mice by direct injection into a BM cavity (iBM) or conventional tail vein infusion (intravenous). PB from retroorbital sinus and BM cells from noninjected side tibia were aspirated from each animal at 5 minutes and 20 hours after transplantation. The donor cells were detected by PKH26 fluorescence using FACS analysis (Figure 2A). As expected, PKH26⁺ donor cells appeared in the blood stream of intravenously injected animals at 5 minutes (0.6% ± 0.39%) and, albeit fewer, at 20 hours after transplantation (0.047% ± 0.025%). However, in the BM, intravenously injected donor cells could be detected only at 20 hours after transplantation (0.078% ± 0.016%) (Figure 2B). Because one tibia contains approximately 5% of the total BM cellularity of a mouse,²¹ a calculated seeding efficiency of intravenously injected PKH26⁺ donor cells at 20 hours after transplantation is 1.56% ± 0.32% and is consistent with a previous report by van Hennik et al.¹² However, in mice receiving iBM transplants, very few donor cells were present in the blood stream at both time points analyzed: 5 minutes (0.008% ± 0.008%), 20 hours (0.002% ± 0.004%). In addition, none, at 5 minutes, or very few, 0.006% ± 0.005% at 20 hours, of donor cells were detected in the noninjected side tibia (Figure 2B). The levels of iBM-

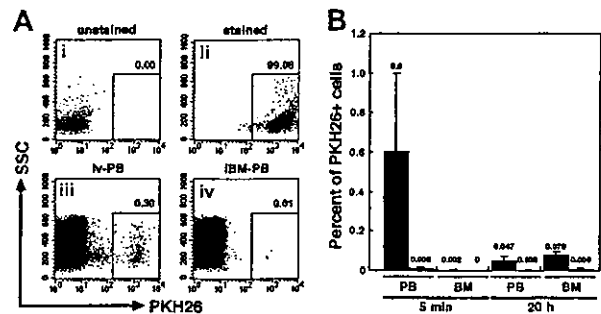


Figure 2. Tracing of intravenously or iBM-injected PKH26-labeled CB CD34⁺ cells. (A) Representative FACS analysis of PKH26-labeled cells. Column-enriched CB CD34⁺ cells (i) were stained with PKH26 (ii) and were transplanted into irradiated NOD/SCID mice by intravenous (iii) or iBM (iv) injection. Five minutes later, PKH26⁺ cells circulating into peripheral blood stream were identified by flow cytometry. The number at each panel represents the percentage of PKH26 bright cells detected. (B) Comparison of the percentage of PKH26⁺ cells detected in PB and BM from intravenous (filled bars; ■) or iBM (open bars; □) injected NOD/SCID mice at 5 minutes and 20 hours after transplantation. BM cells were aspirated from left (noninjected side) tibia. Fifty thousand events were acquired to calculate the proportion of PKH26⁺ cells. Data shown are the mean ± SD values of 3 independent experiments (*n* = 5). The number above each bar represents the mean percentage of PKH26⁺ cells.

transplanted PKH26⁺ cells in PB and left (noninjected side) BM were significantly lower than those of intravenously transplanted cells on either time points (*P* < .01). The results confirmed that there was little, if any, leakage of the injected cells when iBM strategy was used.

iBM Injection of CB Lin^{-low}CD34⁺CD38⁻ cells resulted in the higher frequency of engrafting human hematopoietic cells in NOD/SCID mice

No or very little leakage of injected cells in iBM method may result in more efficient engraftment than intravenous transplantation. To compare the frequency of CB Lin^{-low}CD34⁺CD38⁻ cells capable of engrafting NOD/SCID mice, cells were transplanted by iBM or intravenous injection for limiting dilution assay. In the human-specific PCR-based method, mice were scored positive for engraftment when more than 0.01% human DNA was detected in the murine BM (detection limit of human DNA is 0.001%) (Figure 3C). In FACS analysis, more than 0.01% of human CD45⁺ dots was considered positive. Statistical analysis was performed using data from 84 recipients receiving transplants of pooled CB from multiple donors (Figure 3; Table 1), and the frequency of human cells capable of engraftment was calculated as described.^{4,22} As determined by FACS and human DNA measurements, the frequency of CB Lin^{-low}CD34⁺CD38⁻ cells capable of engrafting NOD/SCID mice was 1 in 44 by iBM injection (95% confidence intervals, 1 in 27 to 1 in 70). In contrast, the frequency by intravenous injection (95% confidence intervals, 1 in 289 to 1 in 1510) was 1 in 660 Lin^{-low}CD34⁺CD38⁻ cells, which is consistent with the previous report by Bhatia et al.⁴ By using the iBM transplantation method, more than 15-fold higher frequency of human SRCs could be detected in NOD/SCID mice.

Higher levels of human hematopoietic cell engraftment by iBM injection

The level of hematopoietic repopulation is a critical parameter in stem cell transplantation. Therefore, we compared the engraftment levels of mice that received transplants in both injection strategies using the same number of Lin^{-low}CD34⁺CD38⁻ cells. Transplantation of CB Lin^{-low}CD34⁺CD38⁻ cells into NOD/SCID mice by

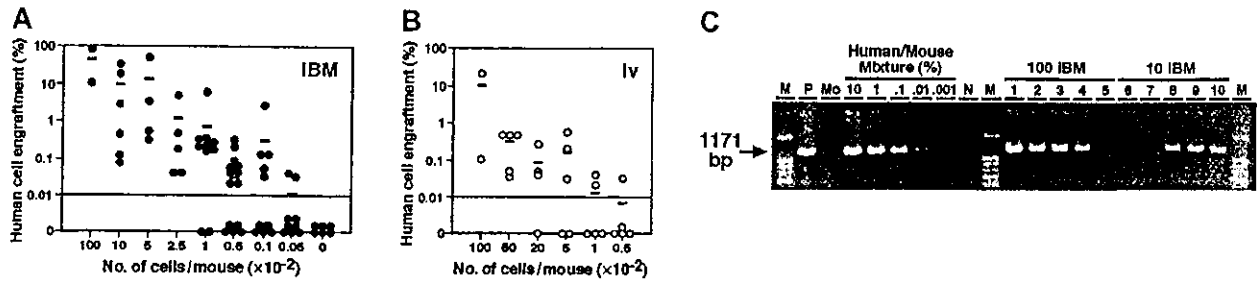


Figure 3. Summary of human cell engraftment levels in the BM of NOD/SCID mice. (A-B) NOD/SCID mice were given transplants of CB Lin^{-low}CD34⁺CD38⁻ cell fractions by iBM (●) (A) or intravenous (○) (B). Eight weeks after transplantation, BM cells obtained from NOD/SCID mice were analyzed by FACS and PCR. Numbers indicate the dose of Lin^{-low}CD34⁺CD38⁻ cells transplanted. Number "0" means mice were given transplants of 10⁴ irradiated CD34⁺CD38⁺ carrier cells alone. Each dot represents 1 mouse, and bars indicate the average levels of engraftment. The horizontal lines indicate threshold of positive engraftment. (C) Representative PCR analysis of individual NOD/SCID mice given transplants of CB Lin^{-low}CD34⁺CD38⁻ cells by iBM (lanes 1-5 indicate 100 cells injected, lanes 6-10 indicate 10 cells injected). DNA was extracted from the BM cells 8 weeks after transplantations and amplified using a human chromosome 17 α -satellite specific primer. Representative PCR analysis of 5 independent experiments is shown. M, size marker; P, 100% human DNA; Mo, 100% mouse DNA; N, distilled water (DW).

iBM injection achieved higher levels of engraftment than by intravenous injection in NOD/SCID mice (Figure 3; injected cell number, 500 cells, $P < .04$; 100 cells, $P < .03$; 50 cells, $P < .05$). Furthermore, the engraftment level of mice injected with 1000 cells by iBM was significantly higher than those injected intravenously with 2000 or 5000 cells (2000 cells, $P < .02$; 5000 cells, $P < .05$).

Multilineage differentiation and distribution of human hematopoietic cells in NOD/SCID mice that received transplants by iBM injection

Multilineage differentiation of iBM-injected SRCs was observed in the injected side BM of NOD/SCID mice that received transplants, which included lymphoid CD45⁺CD19⁺ B cells, CD45⁺CD56⁺ natural killer (NK) cells (Figure 4Aiii,v), and myeloid CD45⁺CD14⁺, CD45⁺CD33⁺ cells (Figure 4Aii,iv). In addition, presence of primitive Lin^{-low}CD34⁺CD38⁻ cells were evident in the marrow of these mice (Figure 4Avi,vii). To examine the distribution of reconstituted human hematopoietic cells in iBM or intravenously injected NOD/SCID mice, BM cells were collected separately from injected (right leg) and noninjected (left leg) side

of tibia. Lymphoid, myeloid, and stem/progenitor cell lineages are defined as CD19⁺/CD45⁺ cells, CD33⁺/CD45⁺ cells, and CD34⁺/CD45⁺ cells, respectively. As shown in Table 2, human hematopoietic cells with the ability of lymphomyeloid differentiation were detected not only in the injected side tibia but also in the noninjected side tibia, spleen, and PB in all animals analyzed (Figure 4B; Tables 2-3). Multilineage differentiation was also detected in mice with low chimerism of human cell (Table 2, mouse iBM-injected mice 1, 8, 9). In the spleen, lymphoid cells were 85.64% \pm 6.31% (iBM) and 90.65% \pm 5.91% (intravenous), and myeloid cells were 1.85% \pm 1.13% (iBM) and 2.064% \pm 1.59% (intravenous). In the PB, lymphoid cells were 71.19% \pm 6.23% (iBM) and 74.84% \pm 14.51% (intravenous), and myeloid cells were 4.16% \pm 2.63% (iBM) and 8.21% \pm 4.22% (intravenous) (data not shown). Although 10 times more CD34⁺ cells were transplanted by intravenous injection (2×10^5 cells), the levels of engraftment were the same as the cases of iBM injection (2×10^4 cells) (Table 2; iBM injected right tibia, 45.51% \pm 26.96% versus intravenously injected BM, 27.98% \pm 13.56% [mean percentage

Table 1. Comparison of the frequency of SRCs by limiting dilution assay

Route	No. cells injected	No. engrafted mice	No. transplantations
iBM	10 000	2	2
	1 000	6	6
	500	4	4
	250	5	5
	100	8	10
	50	7	12
	10	5	10
Intravenous	5	2	9
	10 000	2	2
	5 000	5	5
	2 000	3	4
	500	3	5
	100	2	5
	50	1	5

NOD/SCID mice (n = 84) were transplanted with various numbers of Lin^{-low}CD34⁺CD38⁻ CB cells by iBM or intravenous injection. Engraftment in murine BM was analyzed at 8 weeks. Mice were considered to be engrafted when they were determined positive by both FACS and PCR analysis. The frequency of engrafting cells in CB Lin^{-low}CD34⁺CD38⁻ cells transplanted by iBM and intravenously was found to be 1 in 44 Lin^{-low}CD34⁺CD38⁻ cells (95% confidence limits, 1 in 27 to 1 in 70) and 1 in 660 Lin^{-low}CD34⁺CD38⁻ cells (95% confidence limits, 1 in 289 to 1 in 1510), respectively. SRC frequencies were calculated using Poisson statistics and the method of maximum likelihood with the assistance of the L-Calcul software (StemCell Technologies).

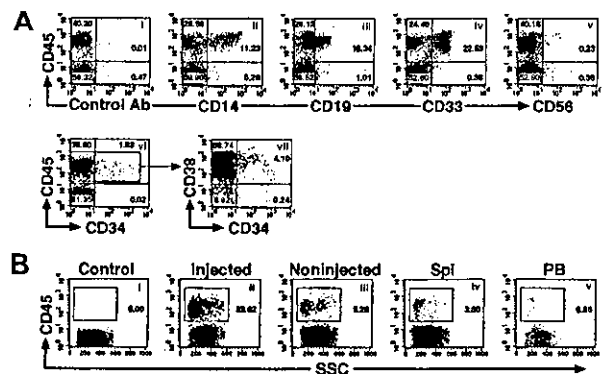


Figure 4. Representative FACS profile of human multilineage engraftment in a NOD/SCID recipient given transplants of Lin^{-low}CD34⁺CD38⁻ cells by iBM. (A) At 8 weeks after transplantation of 500 Lin^{-low}CD34⁺CD38⁻ human CB cells, BM cells were removed from iBM-injected side tibia of a NOD/SCID mouse and analyzed for the presence of human CD45⁺ cells (i). Human lineage-specific mAbs were used to detect lymphoid CD45⁺CD19⁺ (iii), CD45⁺CD56⁺ (v), myeloid CD45⁺CD14⁺ and CD45⁺CD33⁺ (ii,iv), and immature CD34⁺CD38^{-low} (vi,vii) progenitor cells in the marrow of engrafted NOD/SCID mice. (B) Distribution of human hematopoietic cells in iBM-injected NOD/SCID mice. Eight weeks after transplantation, BM cells (ii,iii), spleen cells (iv), and PB (v) of NOD/SCID mice were stained with antihuman CD45 mAbs and analyzed by flow cytometry. BM cells were collected separately from injected (ii) and noninjected (iii) tibiae. BM cells that were injected with irradiated CD34⁺CD38⁺ (used as carrier cells in these experiments) alone were used as negative control (i). The relative frequencies of each population are indicated. Representative FACS analysis of 5 independent experiments is shown.