

図1. Multiplex NAT試験におけるウイルスの同定と個別血液の同定

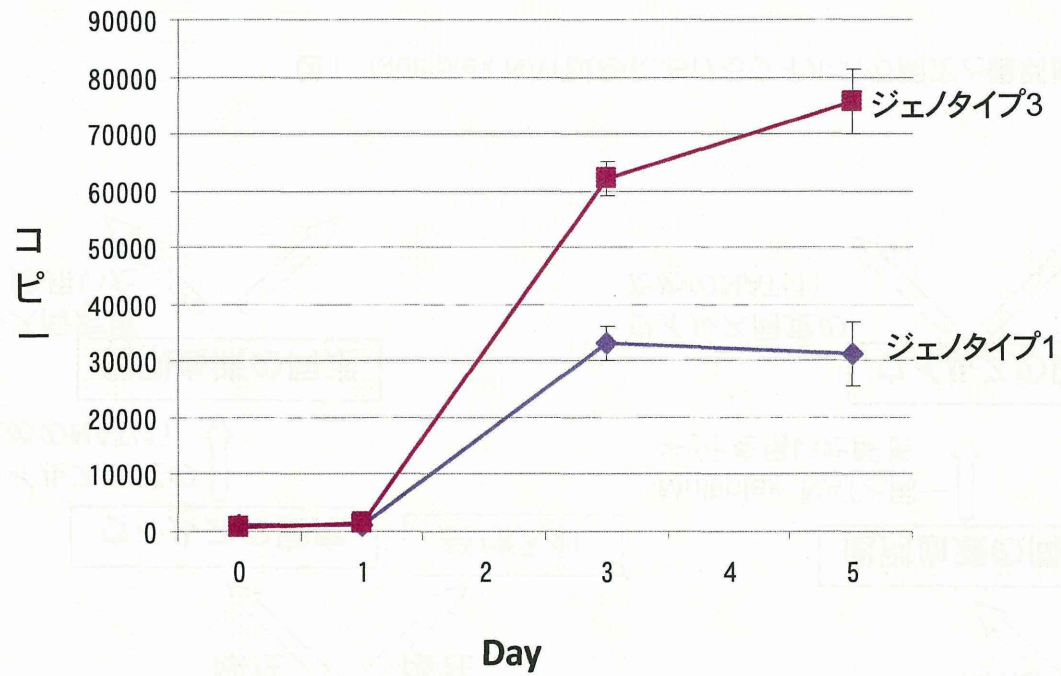


図2. Ku812 E2-4に2つのパルボウイルスB19ジェノタイプを感染させたときにコピー数の変化

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)

分担研究報告書

原料血漿におけるパルボウイルス B19 の規格値に関する研究

研究分担者 岡田義昭 国立感染症研究所 血液・安全性研究部 室長

研究要旨

ヒトパルボウイルス B19(以下 B19V)は、一過性の高いウイルス血症を呈するため血漿分画製剤の原料血漿の品質管理の上から重要なウイルスである。その一方で供血者の40%~50%が抗体陽性と言われ、B19Vの感染性を阻止する中和活性を有していることからB型肝炎ウイルスやC型肝炎ウイルス等とは異なる原料血漿の管理が、安全性や経済性、さらに血漿の有効利用において必要だと考えられる。そのために安全性確保の点から許容できる科学的なB19Vのウイルス量について検討することは重要である。我々は、免疫グロブリン製剤を用いた昨年度の研究によって免疫グロブリン製剤中に高いB19V中和活性を有していることを示したが、昨年度の測定系では評価範囲が狭いことや非血液系細胞株を用いたため過大に評価している危険性があった。そこで今年度は、B19Vに対して高感受性を示す人白血病細胞株を用いて中和活性を解析した。免疫グロブリン中に存在する中和活性から血漿分画製剤の原料血漿としてB19Vの規格値 10^4 IU/mLは適正な数値であることが示された。

A.研究目的

輸血用血液を含めた血液製剤の安全性向上にHBV、HCV、HIVを対象とした核酸増幅検査の貢献は、計り知れない。これらの検出感度は、検出試薬の感度を考慮して決定されていることが多い。一方、B19Vは一過性に高いウイルス血症を生じるが、抗体出現と共に感染性は著明に低下することが知られている。また、B19V感染の多くは、不顕性感染となり献血者の40~50%がB19V抗体陽性と考えられている。そのため、血漿分画製剤の原料血漿におけるB19Vの規格は中和抗体を考慮して決

定する必要がある。これまで、米国におけるS/D処理プラズマ(多くの新鮮凍結血漿をプールして製造)の治験中に発生したB19V感染事例において、B19Vのウイルス量が 10^4 コピー/mLを超えた血漿を輸血された患者が抗B19V抗体陽性となり、 10^4 コピー/mL以下の血漿では陽転化しなかった解析結果から、米国においては血漿分画製剤の原料血漿は 10^4 IU/mL以下と規制されている。昨年度、人免疫グロブリン製剤と非血液系細胞株を用いたin vitro感染系から免疫グロブリン製剤中に存在する中和抗体によって感染価が免疫グ

ロブリン 2.5 μ g 当り 4 Log 以上低下することから血漿中の免疫グロブリン量からすると比例計算で 7Log 以上感染価は低下すると推定した。従って 1000 倍のセーフティマージンを考慮しても原料血漿 1mL 当りの B19V 混入量が 10^4 IU/mL 以下であれば、中和されて感染性はなくなると考えられた。この数値は、米国の感染症例から出された値と一致した。昨年度の解析は、本来の標的細胞ではないこと、及び非常に低濃度の免疫グロブリンを用いた解析から単純計算したデータであり過剰に中和活性を評価している危険性があった。そこで今年度は、B19V の本来の標的細胞である血球系細胞株を用いて免疫グロブリン製剤中に存在する B19V に対する中和活性を測定し、前年度の結果と比較見当した。

B. 研究方法

1) B19V 感染性の評価

B19V は細胞に侵入すると DNA から RNA に転写され、B19V を構成する数種類のウイルスタンパクが作られる。その際に 全長の RNA は、数カ所でスプライシングされて最終的にタンパク質に翻訳される。この性質を利用して B19V を感染させた細胞から RNA を抽出し、RT-PCR によって B19 由来のスプライシングされた RNA を増幅・検出することによって感染性を評価することが可能である。抽出した RNA にウイルス由来の DNA も混入しているため、スプライシングされて取り除かれる塩基配列を挟み、増幅産物の大きさが 200~300 塩基となるように核酸増幅法のプライマーを設計した。ス

プライシング後の RNA はスプライシングで取り除かれた塩基数だけ短くなっており、核酸増幅後にウイルス由来の DNA とスプライシングされた RNA とを増幅産物の大きさから容易に区別できる。従って、スプライシングされた RNA が検出された場合に「感染性あり」と評価した。

2) ヒト免疫グロブリン製剤中の B19V 中和活性の測定

原料血漿が入手困難であるため市販されている筋注用ヒト免疫グロブリン製剤を代用として用いた。筋注用人免疫グロブリン製剤 100 μ L (IgG 量 15mg 含む) に 10^{-2} から 10^{-9} まで種々の濃度に希釈した B19V 陽性血漿 100 μ L を添加し、5%アルブミン製剤 800mL を加え 1mL とした。コントロールは、筋注用人免疫グロブリン製剤の代わりに 5%アルブミン製剤を加え、1mL とした。室温で 1 時間反応後 KU812 由来のクローン株である F10 (当研究室で分離・維持している) を 2×10^5 / 100 μ L に調製し、これに中和させた溶液 1mL から 100 μ L を添加した。ローテーターで回転させながら室温で 1 時間ウイルスを感染させた。感染後、1mL の 10% FCS-RPMI (エリスロポイチン 3 単位/mL 含む) を加え 2 日間培養し、遠心にて細胞を回収した。細胞に RNAsol を添加して RNA を抽出し、最終的に RNA は 15 μ L の蒸留水に溶解した。RT-PCR には、抽出した RNA 10 μ を用いて、one-step RT-PCR を行い、さらに増幅産物 2 μ L を用いて nested-PCR を行った。PCR 産物は電気泳動し、スプライシングされた RNA 由来の B19V 遺伝子の増幅の有無を解析した。

C. 研究結果

独立に 2 回の試験を実施したが、2 回とも陰性コントロールのアルブミン製剤では、 10^{-2} から 10^{-6} 希釈まで B19V の感染が認められた。一方、筋注用人免疫グロブリン製剤 15mg では最も高濃度である 10^{-2} においてもスプライシングされた RNA 由来の B19V 遺伝子の増幅は認められなかった(図 1)。IgG 15mg によって感染価は少なくとも 5 Log 減少することが明らかになった。

D. 考察

B19V は、一過性であるが 10^{10} IU/mL を超えるウイルス血症を引き起こすため、このような高濃度のウイルス陽性血漿のバッグが原料血漿プールに混入した場合、プール血漿全体が汚染されてしまう危険性が存在する。また、B19V の感染は一過性であるが末梢血から 1 年以上も核酸増幅法で B19V-DNA が検出されることもある。そのため、高感度の核酸増幅法を用いて献血者を調べると数百人に 1 人の頻度で B19V-DNA が検出されるとの報告もされている。B19V 感染では感染によって中和抗体が産生され B19V の再感染を阻止する。抗体保有率は、大人の 40~50%と言われており、多くの献血者が B19V に感染した既往があることになる。米国の S/D 処理した新鮮凍結血漿による B19V 感染事例から、 10^4 IU/mL 以下では感染が成立しなかったことが報告されている。そのため米国では 10^4 IU/mL 以下を原料血漿の規格値としている。しかし、経験から感染が成立

しなくても科学的にその根拠を明らかにしておくことは安全性を確保するために必要である。我々は、B19V の不活化の評価のために様々な細胞株を調べ、さらに最も感受性の高い細胞株からクローニングすることによって B19V に高感受性を有する細胞垂株を分離し、保存していた。高感受性の細胞株は人白血病由来の KU812 細胞株であり、我々は、赤芽球に分化する傾向の強い細胞をクローン株として選択した。従って、昨年使用した人胎児性細胞株よりも体内における B19V 感染を反映していると推定できる。筋注用人免疫グロブリンは、静注用製剤と異なり高濃度の IgG を含有し中性であるためコントロールとして 5%アルブミン製剤を用いた。そのためほぼ血漿蛋白に近いタンパク濃度で *in vitro* 感染実験を行うことができた。昨年度の検討では $2.5 \mu\text{g}$ という低濃度の IgG の評価から原料血漿 1mL 当り 10^7 IU/mL 以上のウイルスが中和できると推定したが、今回 15mg の免疫グロブリンを用いた評価からは 5 Log 以上が中和される計算となった。今回使用した IgG は製剤化され、中和活性を阻害するような成分が含まれていないためにそのまま血漿の評価に用いることは、慎重にしなければならないが、原料血漿における B19 は 10^4 IU/mL 以下という規格値は妥当な数値と言える。さらに実際の血漿分画製剤の製造工程では、2 種類以上の原理が異なる病原体の除去・不活化法が導入されており、最終製品の安全性は高いものになっている。

E. 結論

人免疫グロブリン製剤に存在する抗 B19 抗

体の B19 ウイルスに対する中和活性を解析した。製剤中に存在する IgG の量と中和活性から原料血漿における B19 中和活性を推定すると、 10^5 IU/mL 以上のウイルスを中和できる計算になった。従って原料血漿における B19 の 10^4 IU/mL 以下という規格値は、妥当な数値であることが in vitro の実験からも示唆された。

F. 健康危機情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Krayukhina E, Uchiyama S, Nojima K, Okada Y, Hamaguchi I, and Fukui K.: Aggregation analysis of pharmaceutical human immunoglobulin preparations using size-exclusion chromatography and analytical ultracentrifugation sedimentation velocity. *J. Biosci Bioeng.* 2013.115(19): 104-10.

2) Miyauchi K, Urano E, Takeda S, Murakami T, Okada Y, Cheng K, Yin H, Kubo M, and Komano J. Toll-like receptor (TLR)3 as a surrogate sensor of retroviral infection in human cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2012.424(3):519-23

3) Odaka C, Kato H, Ostubo H, Takamoto S, Okada Y, Taneich m, Okuma K, Sagawa K, Hoshi Y, Tasaki T, Fujii Y, Yonemura Y, Iwao N, Tanaka A, Okazaki H, Momose S, Kitazawa J, Mori H, Matsushita A, Nomura H, Yasoshima

H, Ohkusa Y, Yamaguchi K, and Hamaguchi I.: Online reporting system for transfusion-related adverse events to enhance recipient haemovigilance in Japan, A pilot study. *Transfus Apher Sci.* 2012 Sep.3

2. 学会発表

1) 岡田 義昭、野島 清子、浜口 功: 末梢血単核球から誘導した赤芽球のヒトパルボウイルス B19 に対する感受性の解析、第 60 回日本ウイルス学会、大阪、2012 年

2) 岡田 義昭: 血液製剤のウイルス感染症対策、第 60 回日本ウイルス学会、大阪、2012 年

3) 下池 貴志、野島 清子、脇田 隆字、岡田 義昭: 血液製剤における C 型肝炎ウイルスの不活化の検討、第 60 回日本ウイルス学会、大阪、2012 年

4) 水澤 左衛子、岡田 義昭: 核酸増幅試験法のための E 型肝炎ウイルスの WHO 国際標準品の制定のための共同研究と日本の国内標準品の作成について、第 60 回日本輸血細胞治療学会、郡山、2012 年

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

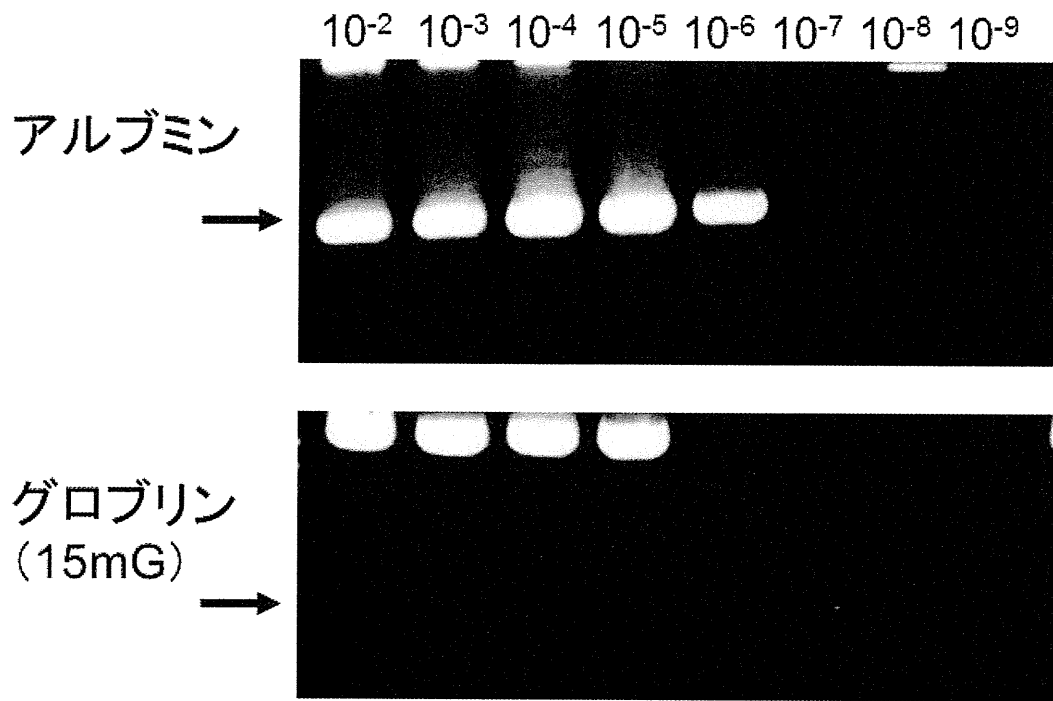


図1.グロブリン製剤によるB19Vの中和活性

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
内田 恵理子	こうすればできる 日本薬局方 微生物試験 7 日局生物薬品のウイルス安全性確保の基本要件	防菌防黴	40(7)	435-444	2012
Teruhide Yamaguchi Eriko Uchida	Oncolytic Virus: Regulatory Aspects from Quality Control to Clinical Studies	<i>Current Cancer Drug Targets</i>			印刷中
Yamaguchi T Kanayasu-Toyoda T Uchida E	Angiogenic cell therapy for severe ischemic diseases	<i>Chem.Pharm. Bull.</i>	36	176-181	2013
山口照英	バイオシミラーについて.	日本臨床	70 (suppl 8)	671-677	2012
山口照英	第十六局方第一追補に収載された生物薬品と関連する試験法について.	<i>PharmTech Japan</i>	28(14)	39-46	2012
山口照英	バイオ医薬品の効率的製造に向けた世界動向と規制状況	<i>BIO INDUSTRY</i>	30(1)	47-54	2013
Krayukhina E, Uchiyama S, Nojima K, Okada Y, Hamaguchi I, Fukui K.	Aggregation analysis of pharmaceutical human immunoglobulin preparations using size-exclusion chromatography and analytical ultracentrifugation sedimentation velocity.	<i>J. Biosci Bioeng.</i>	115(19)	104-110	2013
Miyauchi K, Urano E, Takeda S, Murakami T, Okada Y, Cheng K, Yin H, Kubo M, Komano J.	Toll-like receptor(TLR) 3 as a surrogate sensor of retroviral infection in human cells.	<i>Biochem Biophys Res Commun.</i>	424(3)	519-523	2012
Odaka C, Kato H, Ostubo H, Takamoto S, Okada Y, Taneichi M, Okuma K, Sagawa K, Hoshi Y, Tasaki T, Fujii Y, Yonemura Y, Iwao N, Tanaka A, Okazaki H. Momose S, Kitazawa J, Mori H, Matsushita A, Nomura H, Yasoshima H, Ohkusa Y, Yamaguchi K, Hamaguchi I.	Online reporting system for transfusion-related adverse events to enhance recipient haemovigilance in Japan, A pilot study.	<i>Transfus Apher Sci</i>	48	95-102	2013

講座

こうすればできる 日本薬局方 微生物試験⁷

日局生物薬品のウイルス安全性確保の基本要件

内田恵理子

はじめに

ヒトや動物の生体組織・体液から得られる生物起源由来医薬品や、ヒトや動物由来培養細胞を用いて製造されるバイオ医薬品の安全性確保において、重要な懸念の一つにウイルス汚染のリスクが挙げられる。「日局生物薬品のウイルス安全性確保の基本要件」は、日局収載生物薬品及び将来収載される可能性のあるすべての生物薬品のウイルスに対する総合的な安全性確保のための基本的方策を示したものであり、日本薬局方に参考情報として収載されている。参考情報とは、新医薬品の開発や品質評価に必要となる試験法を積極的に収載することにより有用な医薬品の開発を支援し、また医薬品の安全性や品質を担保するという目的を持ち、試験を実施する上で参考になると考えられる情報を示したものであり、公定書としての規制的要件を記載したものではない。また、本参考情報は、生物薬品のウイルス安全性確保のために製造工程のどの段階でどのような試験、安全対策が必要かについての一般的留意事項を示しているが、必ずしも個々のウイルス試験の具体的な方法を示すものではない。本稿では、本参考情報の内容を概説するとともに、生物薬品のウイルス安全性確保に用いられるウイルス試験について紹介する。

1. 対象となる品目の種類

対象となる生物薬品は、国内で使用されるヒトや動物の血液や尿、組織に由来する生物薬品、及びヒト又は動物起源細胞株由来のタンパク質性医薬品（遺伝子組換え医薬品や細胞培養由来医薬品などのバイオ医薬品）である。ヒトの血液に由来する血漿分画製剤は局方ではなく生物学的製剤基準に収載されており、「血漿分画製剤のウイルスに対する安全性確保に関するガイドライン」¹⁾が適用されるので対象外とされている。また、生物起源由来物質であってもアミノ酸、糖類、グリセリンなどの比較的 low molecular weight の化合物や、高分子化合物でもゼラチンのようなものは、その製法や精製法からウイルス迷入の可能性が考えられないケースが多く、またタンパク質性医薬品であれば変性してしまうような加熱処理や強酸・強アルカリ、有機溶媒を用いてウイルス不活化が可能であることから、本参考情報の適用対象外である。

2. 生物薬品のウイルス安全性確保の基本考え方

生物薬品の一般的な製造工程とウイルス安全対策の例を図1に示す。生物薬品のウイルス汚染源としては、原材料の起源となるヒトや動物、医薬品製造基材となる培養細胞がウイルスに汚染されている可能性と、製造工程で使用する酵素や血清、

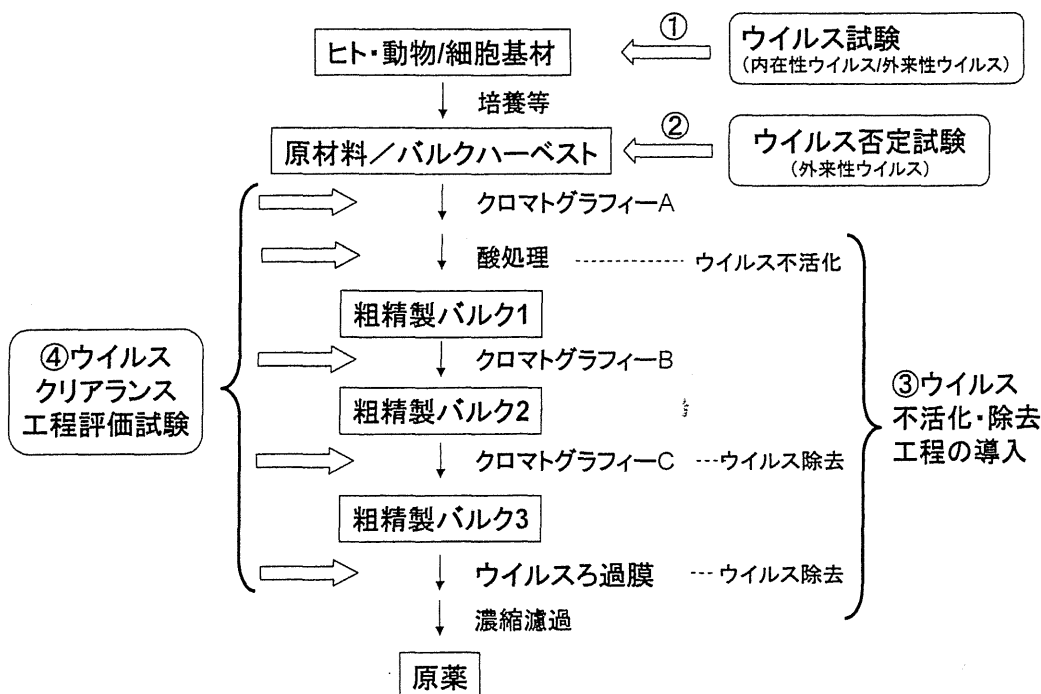


図1. 生物薬品の製造工程とウイルス安全対策の例

トリプシン、アルブミンなどの生物起源由来の試薬や添加物、精製工程中の迷入ウイルスなどが原因となる可能性が考えられる。生物薬品のウイルス安全性確保には、①適切な原材料や細胞基材、医薬品製造基材を選択し、徹底したウイルス試験を行うことはもちろんであるが、これだけでは十分ではない。製造過程でのウイルス迷入の可能性もあることから、②バルクハーベストなどの適切な製造段階でウイルス否定試験を実施することが必要となる。さらに、ウイルス試験には限界があり、たとえ高感度の試験で検出限界以下となってもウイルスがゼロであるとはいえないことや、用いる試料が採用したウイルス試験では感度、特異性において必ずしも適切ではなく検出できない場合などもある。そこで、ウイルス否定試験の実施に加えて、③製造工程に複数の適切なウイルス除去・不活化工程を導入すること、および④製造工程がどの程度のウイルス除去・不活化の能力をもつのかについてウイルスクリアランス試験を実施して工程評価を行うことにより、たとえウイルスが混入しても製造工程により十分にクリアランスできることを示す必要がある。生物薬品のウイルス安全性はこのように複数のウイルス安全対策を相互補完的にとることにより達成される。

3. 原材料・医薬品製造基材のウイルス安全性確保のためのウイルス試験

3.1. ヒト由来生物薬品のウイルス試験

ヒト由来生物薬品の原材料には血液や尿が用いられている。ヒト由来医薬品原料は「生物由来原料基準」²⁾に準拠する必要がある。ヒト由来医薬品原材料に混入する可能性があり、注意すべきウイルスにはヒト免疫不全ウイルス (HIV)、A型肝炎ウイルス (HAV)、B型肝炎ウイルス (HBV) (図2)、C型肝炎ウイルス (HCV)、E型肝炎ウイルス (HEV)、ヒトT細胞白血病ウイルス (HTLV-1,2)、ヒトパルボウイルス B19 (図3)、サイトメガロウイルスなどがある。原材料は健康な人から得たもので、可能な場合は個人毎に問診を行うとともに、少なくともHBV、HCV、HIVについては特異性と感度、精度が十分に評価された血清学的検査及び核酸増幅検査 (NAT) を実施し、これらウイルスの存在を否定する必要がある。原材料が尿などの場合は、プールされた原材料に対して特異性と感度、精度が十分に評価されたNATにより、少なくともHBV、HCV、HIVの存在を否定することが求められる。血液を原料とする場合、血清学的検査として

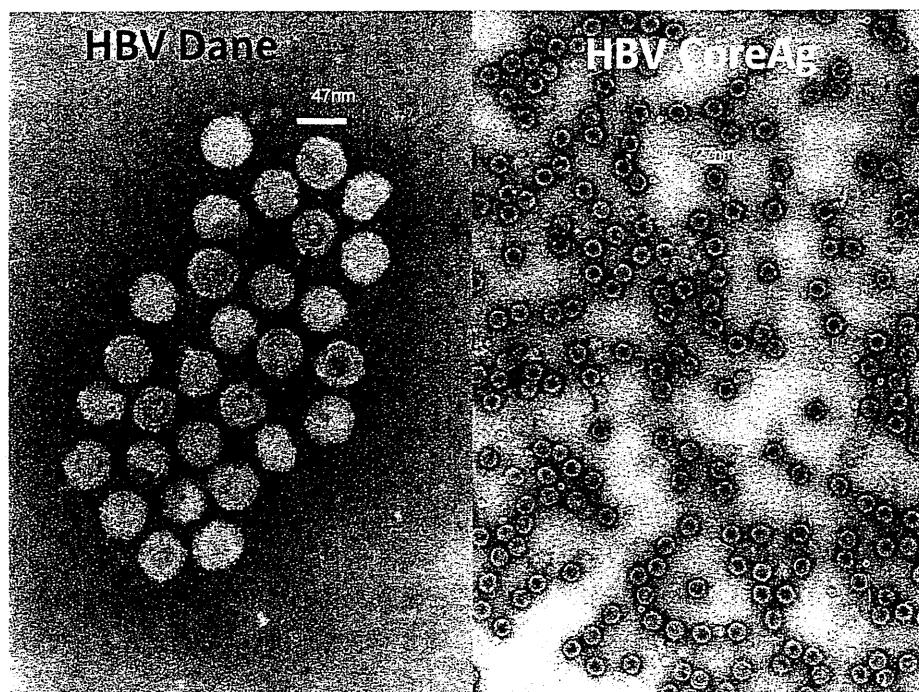


図2. HBVの電子顕微鏡写真

直径約47nmの球形ウイルス（左図）で、エンベロープで包まれた内部に、ウイルスDNAをヌクレオカプシドが包む直径約27nmのコア粒子（右図）が存在する二層構造をとる（左図）。遺伝子を持つ粒子はDane粒子と呼ばれる。HBV粒子のエンベロープタンパク質がHBs抗原、コア粒子の表面を構成するタンパク質がHBc抗原。（写真提供：東京女子医大 田中建志先生）

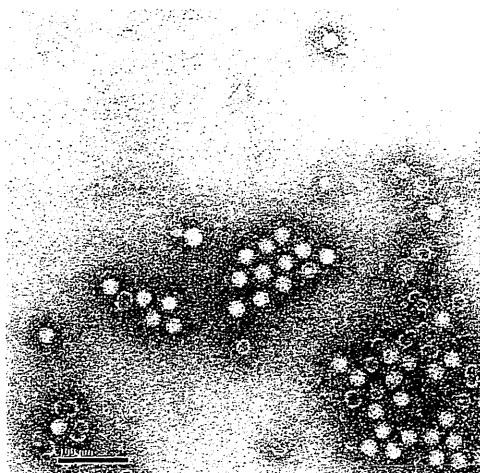


図3. ヒトパルボウイルスB19の電子顕微鏡写真

直径約20nmの正二十面体構造を形成する小型ウイルスでエンベロープを持たない。自然界に存在するウイルスの中で最も小さい部類に入る。（写真提供：東京女子医大 田中建志先生）

HBV 検査 (HBs 抗原, HBs 抗体, HBc 抗体),
HCV 検査 (HCV 抗体), HIV 検査 (HIV-1/2 抗体),
HTLV-1 検査 (HTLV-1 抗体), パルボウイルス B19 検査 (B19 抗原), NATとしてHBV

DNA, HCV RNA, HIV RNA などの検査が行われている。

核酸増幅検査 (NAT)

NATはウイルス核酸を増幅して検出する方法で、定量的PCR (Polymerase Chain Reaction) 法が良く用いられているが、他にもNASBA (Nucleic Acid Sequence-Based Amplification) 法, TMA (Transcription Mediated Amplification) 法, LAMP (Loop-Mediated Isothermal Amplification) 法など様々な核酸増幅法がある。NATは血清学的検査よりも感度が高く、ウイルス感染初期のウィンドウ期を大幅に短縮可能であるが、用いるプライマーに対応するウイルスしか検出できず、プライマーの選択によってはすべてのサブタイプが検出されとは限らないこと、高感度ではあっても検出限界が存在すること、偽陽性も出やすいことなどを認識する必要がある。測定には必ず陰性対照と陽性対照を含め、標準品や参照パネルを用いて測定法の検出

感度や特異性を確認することが必要である。NATによる測定 of 留意事項は「血液製剤のウイルスに対する安全性確保を目的とした核酸増幅検査 (NAT) の実施に関するガイドラインについて」³⁾に示されている。

3.2. ヒト以外の動物を用いて製造される生物薬品

動物由来の生物薬品は、ウシ、ブタ、ウマなどの血液や各種組織からヘパリンや性腺刺激ホルモンなどが製造されている。動物由来医薬品原料は「生物由来原料基準」²⁾に準拠する必要がある。製造には適切に管理された健康な動物を使用する。また、各動物種には特有のウイルスが知られ、特に人に感染性や疾病をもたらす人獣共通感染症の原因となるウイルス (表1) については、ウイルスが存在しないことを証明する当該国の certifi-

cate や WHO の資料等、その存在が否定できる科学的根拠を示すか、血清学的検査や NAT によりウイルスの存在を否定する必要がある。

3.3. ヒト又は動物起源細胞株由来のタンパク質性医薬品

ヒト又は動物起源細胞株由来のバイオ医薬品では、細胞株が医薬品製造基材となる。医薬品製造用にクローン化された細胞株から調製されたマスター・セル・バンク (MCB) やワーキング・セル・バンク (WCB) に関しては、ICH Q5A ガイドライン⁴⁾に従い、内在性ウイルス及び非内在性ウイルスによる汚染の有無を徹底的に検討する必要がある。Q5A には各細胞レベルで一度は実施すべきウイルス試験が示されている (表2)。

表1. 生物薬品の由来となる動物への感染が知られている人獣共通感染症ウイルスの例

ウイルス名	ウシ	ブタ	ウマ
牛痘ウイルス	○		
偽牛痘ウイルス	○	○	
マレーバレー脳炎ウイルス	○	○	
羊跳躍病ウイルス	○	○	
口蹄疫ウイルス	○	○	
日本脳炎ウイルス		○	
水胞性口炎ウイルス	○	○	○
ボルナ病ウイルス			○
狂犬病ウイルス	○	○	○
インフルエンザウイルス		○	
E型肝炎ウイルス		○	
脳心筋炎ウイルス	○	○	
ロタウイルス	○		
東部ウマ脳炎ウイルス, 西部ウマ脳炎ウイルス, ベネズエラウマ脳炎ウイルス			○
ウマモービリウイルス			○
ヘンドラウイルス		○	
ニパウイルス		○	○
伝染性胃腸炎ウイルス		○	
ブタ呼吸器コロナウイルス		○	
ブタ流行性下痢症ウイルス		○	
血球凝集性脳髄膜炎ウイルス		○	
ブタ繁殖呼吸器病症候群ウイルス		○	
ブタコレラウイルス		○	
パラインフルエンザ3型ウイルス		○	
エンテロウイルス1型		○	
レオウイルス		○	
内在性レトロウイルス		○	
ブタアデノウイルス1~4型		○	
ブタサーコウイルス		○	
ブタパルボウイルス		○	
ブタボックスウイルス		○	
ブタサイトメガロウイルス		○	
トロウイルス	○		

表 2. 各細胞レベルで一度は実施すべきウイルス試験

	MCB	WCB	CAL*1
レトロウイルス及び内在性ウイルス試験			
感染性試験	+	-	+
透過型電子顕微鏡観察 (TEM)	+	-	+
逆転写酵素活性*2	+	-	+
その他の細胞種特異ウイルス試験*3	適宜実施	-	適宜実施
非内在性ウイルス又は外来性ウイルス試験			
In vitro 感染性試験	+	-	+
In vivo 感染性試験	+	-	+
抗体産生試験	+	-	-
その他の細胞種特異ウイルス試験*4	+	-	-

*1: CAL (Cells at the limit), In vitro 細胞齢の上限まで培養された細胞。

*2: レトロウイルス感染性試験が陽性の時は不要。

*3: 細胞株個々の起源・由来から存在が予測されるウイルスの検出に適した試験。

*4: ヒト由来細胞株, ヒト以外の霊長類由来細胞株, げっ歯類以外の動物由来細胞株の場合, 各細胞株に適切な試験を適宜実施する。

3.3.1 レトロウイルス及び内在性ウイルス試験

(1) 感染性試験

レトロウイルスの感染性試験としては、指標細胞としてラット XC 細胞を用いた XC プラークアッセイ (同種指向性レトロウイルスの検出)、ミンク S+L-細胞を用いた S+L-フォーカスアッセイ (異種, 両種指向性レトロウイルスの検出) を実施する。試験は被験細胞との共培養を行うか、細胞の培養上清を用いて感染させ、一定期間培養後に XC 細胞ではプラークの形成, S+L-細胞ではフォーカスと呼ばれる特有の細胞凝集塊の形成を顕微鏡で観察する。

(2) 透過型電子顕微鏡観察 (TEM)

細胞の超薄切片及び培養上清を検体として電子顕微鏡で観察することにより、ウイルス及びウイルス様粒子を検出することができる。レトロウイルス以外のウイルス粒子も検出できるが、感度は高くない。

(3) 逆転写酵素活性試験

レトロウイルスが RNA を DNA に変換する逆転写酵素を持っていることを利用し、培養上清の逆転写酵素活性の測定によりレトロウイルスを検出する方法である。試験では、試料に RNA とプライマーを添加し、逆転写反応による cDNA の生成を検出する。生成された cDNA をリアルタイム PCR により増幅して検出する高感度逆転写酵素活性試験 (PERT) が簡便で高感度な方法と

して用いられている。

3.3.2 非内在性ウイルス及び外来性ウイルス試験

(1) In vitro 試験

広範囲のウイルスを検出することができる指標細胞を用いる方法で、ウイルス感染による細胞変性効果 (CPE) を指標とする方法や赤血球凝集で判定する方法がある。指標細胞には、ヒトウイルスに感受性があり広範囲のウイルスが感染する霊長類由来 Vero 細胞やヒト MRC-5 細胞などの複数の細胞を用いる。動物由来ウイルスの混入の可能性がある場合は、動物由来細胞を用いた試験を追加する。試験は、培養細胞にウイルスを含む試料を添加して 2 週間培養し、その培養上清又は細胞破砕液を新しい細胞で継代してさらに 2 週間培養後、ウイルスの感染により出現する CPE を観察する。CPE の形態はウイルスの種類により異なる (図 4)。赤血球凝集反応は CPE をおこさないウイルスを検出するために用いる。

(2) In vivo 試験

In vivo 試験は、in vitro 試験では検出できないウイルスを検出するための試験であり、発育鶏卵、成熟マウス、乳飲みマウス、モルモット等に細胞溶解液又は培養液を接種して行う。具体的な試験方法については省略するが、動物への接種では感染による死亡、発育鶏卵への接種では尿膜腔液の血液凝集反応を指標としてウイルスを検出する。

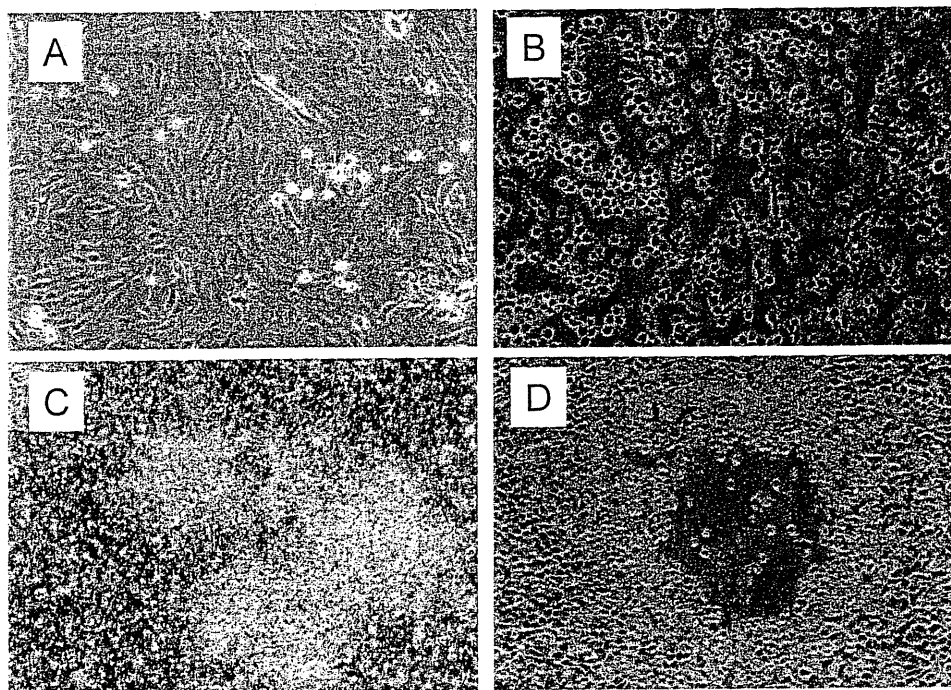


図4. ウイルス感染による細胞変性効果 (CPE) の例

A: 感染前の Vero 細胞。

B: Vero 細胞に HSV-1 を感染後48時間の様子。CPE により細胞が丸くなり浮き上がっている。

C: ポリオウイルスに感染した Vero 細胞のプラーク。

D: ウシ水胞性口炎ウイルスに感染した Vero 細胞のプラーク。

(写真 C, D 提供: 日本ケミカルリサーチ)

(3) 抗体産生試験

げっ歯類由来細胞株に存在する可能性がある種特異的ウイルスに対する試験として、マウス抗体産生試験 (MAP)、ラット抗体産生試験 (RAP)、ハムスター抗体産生試験 (HAP) などを実施する。ウイルスフリーの動物に細胞溶解液又は培養液を接種し、一定期間後、被験動物の血清中に抗体産生が認められるかどうかによりウイルスの有無を判定する。

4. 適切な製造段階でのウイルス否定試験の実施

細胞株由来のタンパク質性医薬品の場合、原材料は細胞培養後にハーベストされた細胞や培養上清となる。医薬品製造基材となる細胞バンクレベルで徹底したウイルス試験を行っても、培養中に外来性ウイルスの迷入により汚染が起こる可能性がある。ウイルスが迷入した場合、未加工・未精製バルクに最も高濃度で存在する可能性があるため、可能な限り未加工・未精製バルクについてウ

イルス試験を実施することが望ましい。未加工・未精製バルクで一般的に用いられる試験は、一種類又は数種類の細胞株を用いる in vitro でのスクリーニング試験であり、最低3ロットに対して実施する必要がある。外来性ウイルスが検出されたバルクハーベストは医薬品製造に用いるべきではないとされる。

最終製品や精製バルクでのウイルス試験の必要性は、原材料や医薬品製造基材の種類及びこれらに対するウイルス検査結果、製造工程におけるウイルスの除去・不活化の評価試験の結果、及び製造工程におけるウイルス迷入の可能性がどの程度あるかなどに依存する (表3)。げっ歯類のレトロウイルスまたはレトロウイルス様粒子のみが細胞又は未加工・未精製バルクに確認された場合 (ケース B) では精製バルクにおいて当該ウイルスに対する高い特異性と感度を有する検出系を用いて試験を行う必要があるが、CHO, C127, BHK 等の細胞株の内在性レトロウイルス様粒子のように、十分に解析されており、また後述のクリアランス試験により適切なクリアランスが示さ

表 3. ウイルスクリアランス工程評価と精製バルクでのウイルス試験実施要領 (ICH Q5A より抜粋)

	ケース A	ケース B
[細胞や未精製バルクでのウイルス試験結果]		
ウイルスの存在	-	-
ウイルス様粒子の存在	-	-
レトロウイルス様粒子の存在	-	+
ウイルスの分離同定の可否	適用外	+
ウイルスのヒトへの感染性	適用外	-
[必要な対応]		
ウイルススクリアランスに関する工程特性解析試験 (非特異的モデルウイルスを用いたクリアランス能評価)	必要	必要
ウイルススクリアランスに関する工程評価試験 (特異的モデルウイルスを用いたクリアランス能評価)	不要	必要
精製バルクでのウイルス否定試験	適用外	必要*

*: 内在性レトロウイルス様粒子が十分に解析され、適切なクリアランスが示されている場合の CHO 細胞などの例では、非病原性レトロウイルス様粒子に関する試験は、通常、不要

れている場合は、精製バルクでの試験は通常不要とされている⁴⁾。

5. 製造工程へのウイルス除去・不活化工程の導入

生物薬品の製造工程に適切なウイルス除去・不活化工程を導入することにより、ウイルス安全性を高めることができる。代表的なウイルス除去・不活化工程を表 4 に示した。生物薬品、特にタンパク質性医薬品の場合、強力なウイルス不活化工程を導入することはタンパク質の変性、失活につながるため難しい。一方、ウイルス除去工程としてのウイルスろ過膜の性能は飛躍的に向上しており、最も小さいマウス微小ウイルス (MMV) などでも十分なクリアランス能が得られるようになっている。生物薬品のウイルス安全性を高めるためには、製造工程に機序の異なる複数のウイルス除去・不活化工程を導入することが必要である。

表 4. 代表的なウイルス不活化・除去工程

- | |
|---|
| ① 加熱処理 (55~60℃, 30分の処理で多くのウイルスは不活化。血液や尿由来では液状60℃, 10~24時間処理を行うこともある。) |
| ② 有機溶媒/界面活性剤 (S/D) 処理 (脂質膜を有するウイルスに有効) |
| ③ 膜ろ過 (15~40nm) |
| ④ 酸性処理 |
| ⑤ 放射線処理 (γ線照射) |
| ⑥ カラムクロマトグラフィー (アフィニティークロマトグラフィー, イオン交換クロマトグラフィー等) |
| ⑦ 沈殿分画 (有機溶媒分画, 硫酸分画等) |
| ⑧ 抽出処理 |

6. ウイルスクリアランスに関する工程評価試験

ウイルススクリアランス工程評価試験は、生物薬品の各製造工程がどの程度のウイルス除去・不活化能を持つかを定量的に評価するもので、原材料へのウイルスの混入や製造工程での迷入が起こった場合でも、その後の製造工程によりウイルスを十分に除去・不活化できることを証明するのに必要である。必ずしもすべての工程について実施する必要はなく、十分に有効な除去・不活化能を持つと考えられる機序の異なる工程を2つ以上選んで評価すればよい。クリアランス試験では、評価すべき工程に一定量のウイルスを意図的に添加 (スパイク) し、工程処理によりどの程度ウイルス量が減少したかを定量的に評価する。試験には性質 (DNA ウイルスか RNA ウイルスか、エンベロープの有無、ウイルスサイズ、物理的・化学的処理への耐性) の異なる複数のモデルウイルスを使用する (表 5)。原料に存在する可能性のあるウイルス、例えばバイオ医薬品の製造に繁用されるげっ歯類細胞の CHO 細胞には内在性レトロウイルス様粒子の存在が確認されているので、マウス白血病ウイルス (MuLV) などを「特異的モデルウイルス」として用いる。複数のモデルウイルス候補がある場合は、より耐性が強いものを選択する。高タイターのウイルスが得られるものがモデルウイルスに適しているが、高濃度でウイルス凝集が起こると除去工程が過大評価される可能

表5. ウイルスクリアランス試験に用いられるウイルスの例

ウイルス名	宿主	ゲノム	エンベロープ	サイズ(nm)	形状	耐性*
水溶性口炎ウイルス	ウシ ブタ ウマ	RNA	有	70×150	弾丸形	低
パラインフルエンザウイルス	多種	RNA	有	100~200超	多様/球形	低
マウス白血病ウイルス (MuLV)	マウス	RNA	有	80~110	球形	低
HIV-1 (HIV1,2 モデルウイルス)	ヒト	RNA	有	100~120	球形	低
シンドビスウイルス	ヒト	RNA	有	60~70	球形	低
ウシ下痢症ウイルス (BVDV) (HCVモデルウイルス)	ウシ	RNA	有	50~70	多様	低
仮性狂犬病ウイルス (PRV) (HBV, HSV モデルウイルス)	ブタ	DNA	有	120~200	球形	中
ポリオウイルス Sabin 1 型	ヒト	RNA	無	25~30	正20面体	中
脳心筋炎ウイルス	マウス	RNA	無	25~30	正20面体	中
レオウイルス 3 型	多種	RNA	無	60~80	球形	中
SV40	サル	DNA	無	40~50	正20面体	高
イヌパルボウイルス ブタパルボウイルス (HAV, B19 モデルウイルス)	イヌ ブタ	DNA	無	18~24	正20面体	高

* 物理的・化学的処理に対する抵抗性

性や、不活化工程が過小評価される可能性もあるので注意が必要である。モデルウイルスの選択には、試験従事者の安全確保も考慮する必要がある。ウイルス汚染を引き起こすため、実際の製造工程をそのままウイルスクリアランス評価に用いることはできないが、可能な限り実製造を反映してスケールダウンした工程について評価を行う必要がある。

6.1. ウイルスクリアランス能の評価法の概略

- ① 試料に一定量のモデルウイルスを添加（スパイク）する。
- ② 評価したい製造工程によりモデルウイルスを添加した試料を処理する。
- ③ 工程処理前後の試料溶液に含まれるウイルス量を感染性試験や NAT により定量的に評価する。
- ④ ウイルスクリアランス指数（ウイルス力価の減少度を対数で表したもの：LRV）を以下の式により求める。

$$LRV = \text{Log} \left[\frac{(V1 \times T1)}{(V2 \times T2)} \right]$$

V1：工程処理前の試料の容量

T1：工程処理前のウイルス濃度（力価）

V2：工程処理後の試料の容量

T2：工程処理後のウイルス濃度（力価）

たとえば、ウイルス力価 10^8 IU/ml の試料 1 ml をカラムにアプライし、得られた 10ml の溶出液中のウイルス力価が 10^3 IU/ml であった場合、LRV は 4 となる。一般に、4 以上のクリアランスが得られる工程を有効な頑健性のあるウイルス除去・不活化工程として評価することができる。製造工程全体のウイルスクリアランス能は、各工程のLRVの合計により算出するが、機序が同じ工程は合算できない。図1の製造工程に当てはめた表6の①、②のケースでは、総LRVは①のほうが高いが、①の製造工程には十分なクリアランスが得られない工程が含まれ、特にLRVが1以下の工程を合算することは妥当ではない。②のケースではLRV4以上の工程が3つ含まれ、

表6. ウイルスクリアランス工程評価の例

製造工程	LRV	
	ケース①	ケース②
クロマトグラフィーA	2.7	ND
酸処理	3.5	4.2
クロマトグラフィーB	2.1	4.0
クロマトグラフィーC	0.9	ND
ナノフィルトレーション	4.5	4.3
総LRV	12.7	12.5

総 LRV は12.5としてよい。CHO 細胞などでは内在性のレトロウイルス様粒子が存在 ($>10^8$) するが、表6がレトロウイルスのクリアランス評価結果の場合、安全係数として4 Log を加えて総 LRV が12あれば、最終的な原薬からウイルスが十分に除去されると考えられ、②の製造工程はレトロウイルスに対する安全性が確保されていると判断できる。

6.2. ウイルス力価の測定法

ウイルス力価（感染価）の測定法には定量法と半定量法がある。定量法には培養細胞を用いたプラーク法などがあり、1プラークが1感染単位（プラーク形成単位：PFU）に相当する。半定量法とは動物を用いた感染性試験や培養細胞を用いた TCID₅₀（50% Tissue Culture Infectious Dose; 50%細胞変性終末点）法において、感染の有無のスコアを基に定量する方法である。プラーク法と TCID₅₀法の操作の概略を以下に示す。

(1) プラーク法によるウイルス力価測定の操作例

- ①指標細胞の懸濁液を調製し、6穴培養プレートに播種してCO₂インキュベータでサブコンフルエントまで培養する。
- ②測定試料（ウイルス液）を培地で希釈し、10倍段階希釈液を調製する。
- ③培地を除去し、希釈したウイルス液1 mlを各穴に入れ、数時間培養して感染させる。

- ④ウイルス液を除去し、寒天培地を入れて固まるまで放置する。
- ⑤数日間培養後、ニュートラルレッドを加えた染色用寒天培地を重層し、プラーク（図5）が観察されるまで6～24時間培養する。
- ⑥培養後、各穴のプラークを数える。希釈倍数10^kのプラーク数がN₁、N₂、N₃の時（同一希釈が3穴の場合）、以下の式によりウイルス感染価を求める。

$$\text{感染性ウイルス (PFU/ml)} = \frac{(N_1 + N_2 + N_3) \times 10^k}{3}$$

(2) TCID₅₀法による力価測定の操作例

- ①指標細胞の懸濁液を調製し、96穴培養プレートに播種してサブコンフルエントまで培養する。
- ②測定試料（ウイルス液）を適度に希釈（図6の例では100倍希釈）し、新しいプレートの2列目に入れ、他の穴には希釈用無血清培地を入れる。
- ③8連ピペットを用いてプレート上で段階希釈列を作製する（図6の例では5倍希釈列）。
- ④細胞培養プレートから培地を除去し、ウイルス希釈列のプレートから細胞プレートに100 μl ずつ移し、数時間培養して感染させる。
- ⑤培地を添加し、数日間培養する。
- ⑥各穴のCPEの出現を顕微鏡観察により判定

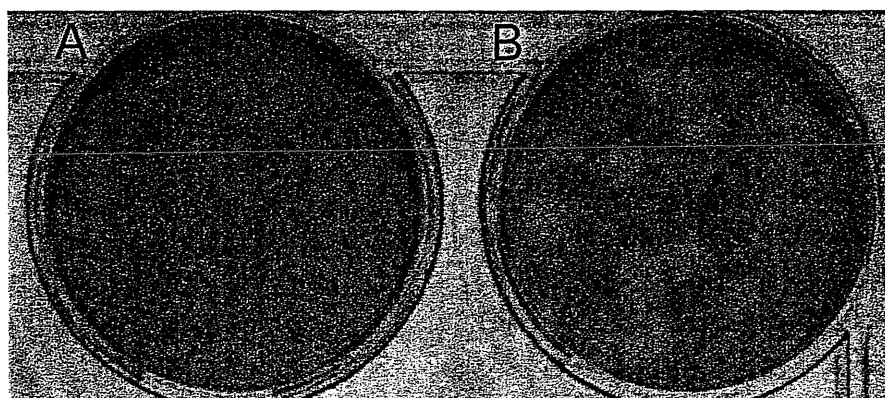


図5. ウイルスのプラーク

HAV を感染させた FRhK-4 細胞を感染5日目に固定、染色した。A：非感染細胞，B：ウイルス感染細胞。Bではウイルス感染によるCPEが同心円状に広がり、白く抜けたプラークとして観察される。（写真提供：日本ケミカルリサーチ）

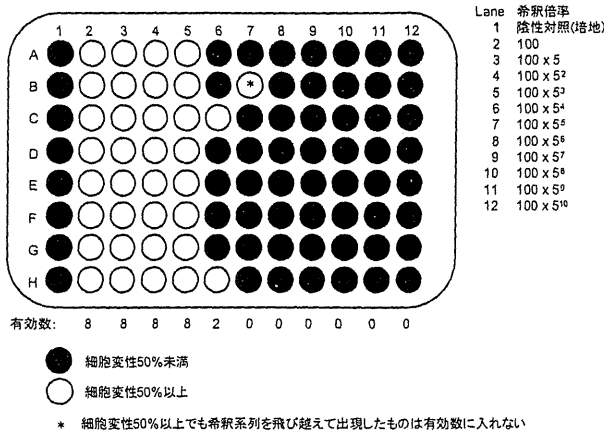


図6. TCID₅₀の実験例

し、記録する。

⑦以下の Karber の式を用いて TCID₅₀を計算する。

$$TCID_{50} = (2 \text{ 列目の希釈率}) \times (\text{希釈率})^{\Sigma - 0.5}$$

但し、

$$\Sigma = (\text{各希釈段階での CPE 数}) / (\text{各希釈段階の検体数})$$

図6の例では、

$$\Sigma = 8/8 + 8/8 + 8/8 + 8/8 + 2/8 = 4.25$$

$$TCID_{50}/\text{ml} = (10^2 \times 5^{(4.25-0.5)}) / 0.1 (\text{ml}) = 4.2 \times 10^5$$

となる。TCID₅₀は PFU とほぼ一致するとされる。

(3) ウイルスクリアランスの NAT による定量法

感染性試験ではなく NAT によりウイルス核酸量を力価に置き換えてクリアランス評価に用いる場合もある。NAT を適用すると、感染性試験よりも迅速・高感度に測定が可能であり、また感染価測定と核酸検出法の組合せによりウイルスの除去と不活化を区別して測定できるという利点がある。一方、NAT は測定試料中の感染性のない核酸断片を検出するため、ウイルス除去能を過小評価する可能性があることや、NAT の阻害因子に

も注意が必要など、特徴をよく知ったうえで利用することが必要である。NAT を採用する場合には、十分なバリデーションが不可欠である。

おわりに

生物薬品のウイルス安全性確保は、さまざまな手段を相互補完的に組み合わせることにより達成され、また多様なウイルス試験が用いられている。紙面の関係もあり、ウイルス試験のすべてについて詳しく紹介することはできなかったが、興味のある方は他の総説等^{5,6)}も参考にさせていただきたい。また、本稿で例示した試験法は必ずしも一般的、標準的な方法を示したものではなく、あくまで試験の概略をイメージするための一例として取り上げたものであり、実際には様々な方法が用いられていることをご理解いただければ幸いである。

参 考 資 料

- 1) 「血漿分画製剤のウイルスに対する安全性確保に関するガイドライン」平成11年8月30日医薬発第1047号厚生省医薬安全局長通知
- 2) 「生物由来原料基準」2005年3月31日改正、平成17年厚生労働省告示第177号
- 3) 「血液製剤のウイルスに対する安全性確保を目的とした核酸増幅検査 (NAT) の実施に関するガイドラインについて」平成16年8月3日薬食発第0803002号厚生労働省医薬食品局長通知
- 4) 「ヒト又は動物細胞を用いて製造されるバイオテクノロジー応用医薬品のウイルス安全性評価」平成12年2月22日医薬審第329号厚生省医薬安全局審査管理課長通知
- 5) 川俣 治 (2011) バイオ医薬品等ウイルス安全性試験 in 医薬品の品質管理とウイルス安全性 (日本医薬品等ウイルス安全性研究会編), pp 124-145, 分光堂, 東京.
- 6) 横手公幸 (2010) 細胞基材のウイルス試験, ウイルスクリアランス評価 in 先端バイオ医薬品の評価技術 (山口照英監修), pp133-150, シーエムシー出版, 東京.

Current Topics

Stem Cell Research for Regenerative Medicine/Personalized Medicine

Angiogenic Cell Therapy for Severe Ischemic Diseases

Teruhide Yamaguchi,* Toshie Kanayasu-Toyoda, and Eriko Uchida

*Division of Biological Chemistry and Biologicals, National Institute of Health Sciences;
1-18-1 Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan.*

Received November 21, 2012

Cell therapies for severe ischemic diseases such as limb ischemia, acute myocardial infarction, and cerebral ischemia have been developed through *in vitro* and *in vivo* animal and clinical studies. Active cells for angiogenic cell therapy are believed endothelial progenitor cells (EPCs). EPCs have been extensively investigated to clarify their origin and biology. Many sources of EPCs have been proposed, including mononuclear cells (MNCs) fraction containing CD34⁺ or CD133⁺ (AC133⁺), isolated CD34⁺ and AC133⁺ cells, and induction and differentiation of EPCs from hematopoietic stem cells (HSCs). However, *in vivo* mechanisms by which EPCs contribute to neovascularization should be clarified. Many *in vitro*, *in vivo*, and clinical studies have been performed using these cells; angiogenic cell therapy will become an important regimen for severe ischemic diseases.

Key words endothelial progenitor cell; cell therapy; angiogenesis; CD34; AC133

1. INTRODUCTION

Over the past one and a half decades, cell therapies (therapeutic angiogenesis) for ischemic disease caused by arterial infarction such as acute myocardial infarction, severe limb ischemia, Buerger disease, and cerebral infarction have been developed. First of all, the finding of endothelial progenitor cells (EPCs) in peripheral blood is a key topic for therapeutic angiogenesis.¹⁾ EPCs were first isolated as CD34⁺ cells in mononuclear cells (MNCs) from adult blood.^{1,2)} Asahara *et al.*¹⁾ reported that putative endothelial cell (EC) progenitors or angioblasts were isolated from human peripheral blood by magnetic bead selection on the basis of cell surface antigen (CD34) expression. These cells differentiated into ECs *in vitro*. In animal models of ischemia, heterologous, homologous, and autologous EC progenitor cells incorporate into sites of active angiogenesis. They concluded that EC progenitors might be useful for augmenting collateral vessel growth to ischemic tissues.

In response to tissue ischemia, EPCs are believed mobilized from bone marrow to peripheral blood, and then migrate into specific ischemic regions such as sites of nascent neovascularization. Multiple sources of EPCs have been reported such as MNC fraction of peripheral blood, bone marrow MNCs, and granulocyte-colony stimulating factor (G-CSF)-mobilized CD34⁺/AC133⁺ cells.³⁾

2. MONONUCLEAR CELL THERAPY FOR ANGIOGENESIS

Target diseases of cell therapy for angiogenesis vary from ischemic limb, myocardial infarction, and cerebral infarction. EPCs or stem cells for EPC are believed suitable as cell sources for the treatment of these diseases. Autologous MNCs

derived from bone marrow or peripheral blood are often used to treat ischemic diseases. MNCs from peripheral blood of patients pre-treated with G-CSF are also used in angiogenesis cell therapy. Whatever resource of mononuclear cells is used, it is expected that the cells contain EPCs or stem cells for EPCs.

On the other hand, not only MNCs but also selected CD34⁺ cells have been used for the treatment of ischemic diseases. While CD34 is a general marker of hematopoietic stem cells (HSC), EPCs also express CD34 antigen and are differentiated from CD34⁺ cells derived from either bone marrow or peripheral blood cells. Since it seems not feasible efficiently to purify EPCs from MNC fraction or whole blood, many clinical studies using MNCs containing CD34⁺ cells have been conducted. Asahara *et al.* reported that chemically labeled CD34⁺ cells integrated into new capillaries that selectively form into ischemic leg using murine model of limb ischemia, suggesting that injected CD34⁺ cells integrated into vascularization.

2.1. Cell Therapy for Limb Ischemia Matoba *et al.*⁴⁾ attempted angiogenic cell therapy by intramuscular injection of autologous bone marrow MNCs (BM-MNCs) in patients with peripheral artery disease (PAD) and critical limb ischemia. Feasibility was shown by the randomized controlled Therapeutic Angiogenesis by Cell Transplantation (TACT) study. They reported that angiogenic cell therapy using BM-MNCs could induce long-term improvement in limb ischemia, leading to extension of amputation-free interval. Implantation of BM-MNCs, including CD34⁺ EPCs, into ischemic limbs has been examined to increase collateral vessel formation in preclinical and clinical studies. Takeishi-Yuyama reported efficacy and safety of autologous implantation of BM-MNCs in patients with ischemic limb due to PAD.⁵⁾ Their primary outcomes were safety and feasibility of treatment, based on ankle-brachial index (ABI) and rest pain, and analysis was per protocol. ABI was calculated by measuring two blood pressures (*Pleg*: the systolic blood pressure of dorsalis pedis

The authors declare no conflict of interest.

*To whom correspondence should be addressed. e-mail: yamaguch@nihs.go.jp

or posterior tibial arteries; and *Parm.* the highest of the left and right arm brachial systolic blood pressure); $ABI_{leg} = P_{leg} / P_{arm}$. They suggested that autologous implantation of BM-MNCs could be safe and effective for achievement of therapeutic angiogenesis, because of the natural ability of bone marrow cells to supply EPCs and to secrete various angiogenic factors or cytokines.

Collection of BM-MNCs incurs a risk and is invasive for patients. Several attempts to collect CD34⁺ cells from peripheral blood of patients have been conducted. Since G-CSF is well known to mobilize HSCs from bone marrow to peripheral blood, peripheral blood MNC fraction containing G-CSF-mobilized CD34⁺ cells has been used for the treatment of ischemic disease.⁶⁻⁸ Huang *et al.* reported a randomized trial designed to compare patients implanted with G-CSF-mobilized MNCs (group A) *versus* BM-MNC (group B) over a follow-up period of 12 weeks. Comparative analysis revealed that at 12 weeks after cell implantation, improvement of ABI, skin temperature, and rest pain was significantly better in group A patients than group B patients. There was no significant difference between the groups for pain-free walking distance, transcutaneous oxygen pressure, ulcers, and rate of lower limb amputation. They concluded that autologous transplantation of either G-CSF-mobilized peripheral blood (PB)-MNC or BM-MNC significantly promotes improvement of limb ischemia.

Horie *et al.*⁸ described the clinical effects of G-CSF-mobilized autologous PB-MNC in patients with critical limb ischemia. To investigate the long-term clinical outcomes of PB-MNC implantation, they reviewed data for 162 consecutive patients with limb ischemia who received this treatment at 6 hospitals. Significant negative prognostic factors associated with overall survival were concurrent ischemic heart disease and collection of a small number of CD34⁺ cells.

2.2. Mononuclear Cells and Myocardial Infarction
Myocardial infarction is a typical ischemic disease. Dimmeler *et al.*⁹ reported that in patients with acute myocardial infarction, clinical studies preferentially used adult bone marrow-derived cells. Most of the studies suggested that cell therapy reduced infarct size and improved cardiac contractile function.

Flow cytometry analysis revealed¹⁰ that circulating lineage-committed EPCs and CD34⁺ cell counts significantly increased in patients with acute myocardial infarction ($n=16$), peaking on day 7 after onset, whereas they were unchanged in control subjects ($n=8$) who had no evidence of cardiac ischemia, suggesting that lineage-committed EPCs and CD34⁺ cells, their putative precursors, are mobilized during an acute ischemic event in humans. Kocher *et al.*¹¹ showed that bone marrow from adult humans contains endothelial precursors with phenotypic and functional characteristics of embryonic hemangioblasts, and that these can be used directly to induce new blood vessel formation in the infarct-bed (vasculogenesis) and proliferation of preexisting vasculature (angiogenesis) after experimental myocardial infarction. The use of G-CSF-mobilized autologous human bone-marrow-derived angioblasts for revascularization of infarcted myocardium has the potential significantly to reduce morbidity and mortality associated with left ventricular remodeling.

3. CELL THERAPY FOR ISCHEMIC DISEASES WITH SELECTED CELLS

Schatteman *et al.*¹² using diabetic mouse as vascularization model reported that CD34⁺ cells derived from type 1 diabetic humans produced fewer differentiated endothelial cells in culture than did their type 2 diabetic- or non-diabetic-derived counterparts. Li *et al.*¹³ compared the effects of G-CSF-mobilized PB-MNCs and CD34⁺ cell-depleted G-CSF-mobilized PB-MNCs in an ischemia model of athymic nude mice. The capillary density was markedly increased and the rate of limb loss significantly reduced in cell-transplanted groups compared with control. In comparison with G-CSF-mobilized PB-MNCs, the therapeutic efficacy of G-CSF-mobilized PB-MNCs deprived of CD34⁺ cells was impaired, suggesting usefulness of CD34⁺ cells in neovascularization. Therefore selected CD34⁺ cells may be expected to contribute to vascularization in the treatment of other ischemic diseases such as peripheral ischemia (limb) or cerebral ischemia.

While the active cells in bone marrow-derived and G-CSF-mobilized MNCs for the treatment of limb ischemia or myocardial infarction are believed CD34⁺ cells or CD34⁺/KDR⁺ EPCs, these MNCs contain heterogeneous blood cells. Yoon *et al.*¹⁴ conducted an experiment in rats receiving intra-myocardial injection of either 7×10^5 DiI-labeled total BM cells (TBMCs), the same number of DiI-labeled, clonally expanded BM multipotent stem cells, or the same volume of phosphate-buffered saline in the peri-infarct area. Histological examination with hematoxylin and eosin staining and von Kossa staining confirmed the presence of extensive intra-myocardial calcification, suggesting that direct transplantation of unselected BM cells into the acutely infarcted myocardium may induce significant intra-myocardial calcification in TBMCs rat. Rosenzweig¹⁵ struck a note of warning against using intra-coronary BM-MNCs in acute myocardial infarction.

Kawamoto *et al.*¹⁶ suggested that in myocardial infarction CD34⁺ cells exhibit superior efficacy for preserving myocardial integrity and function than unselected circulating MNCs. Similarly, two clinical trials comparing unselected MNCs with selected CD34⁺/CXCR4⁺ cells (EPCs) in patients with acute myocardial infarction (AMI)^{17,18} were conducted. In patients with AMI who despite timely and successful treatment with primary PCI developed impairment of the left ventricular ejection fraction (LVEF), treatment with either selected or non-selected BMCs did not lead to significant improvement of LVEF. There was, however, a trend in favor of cell therapy, particularly in patients with most severely impaired LVEF and longer delay between the symptoms and revascularization, which is considered the high-risk group. Use of selected CD34⁺/CXCR4⁺ cells in patients with significantly reduced LV function is safe, feasible, and warrants further investigation.

On the other hand, a recent *meta-analysis* of 18 randomized controlled trials attempted to define the long-term impact of progenitor cell therapy in the treatment of myocardial infarction.¹⁹ A total of 980 patients from 18 studies were analyzed. Following BM-MNC transplantation, regional myocardial anatomy displayed statistically and clinically significant improvements compared with controls, albeit without functional changes. BM-MNC transplantation for myocardial infarction was able to deliver benefits over regular therapy even at 18-month follow-up, particularly when used to treat AMI. CD34⁺