

- (3) 直接支援区域を移動する場合の培養容器は、気密または密封容器を用いることが望ましい。
- (4) 直接支援区域への人の入退室頻度は制限されるよう設計すべきであり、管理区域内への立ち入り制限を行うための設備を設けることが望ましい。
- (5) 直接支援区域とその隣接する区域の間にはエアロック室を設け、室間差圧及び気流の逆転が起きないように十分な差圧を設けること。差圧の目安としては、各室の扉を閉めた状態で10～15Paまたはそれ以上の差圧を維持することが望ましい。
- (6) エアロック室は、インターロックシステムであること。機械式インターロックでない場合には、エアロック室の両側の扉が同時に開かないことを確実にする為の対応を実施すること。
- (7) 直接支援区域とその隣接する区域との間には、滅菌済み資材、滅菌が困難な資材等の受渡し及び必要な場合においては除染作業等のためのパスルームやパスボックスを設けること。

表2 環境微生物の許容基準（作業時）^{注1}

グレード	空中微生物		表面付着微生物	
	浮遊菌	落下菌 ^{注2}	コンタクトプレート	手袋
	(CFU/m ³)	(CFU/plate)	(CFU/24～30cm ²)	(CFU/5指)
A	<1	<1	<1	<1
B	10	5	5	5
C	100	50	25	----
D	200	100	50	----

(注1) 許容基準は、平均値評価とする。

(注2) 1枚当たりの測定時間は、最大4時間までとする。

第3 HEPA フィルター

HEPA フィルターは、一定の大きさの浮遊微粒子を一定の効率で除去することを目的に設計された微粒子捕捉フィルターであり、適切な管理のもとその性能を発揮する。以下の点に留意し、管理運営すること。

- (1) 重要区域に空気を供給する HEPA フィルター及び排気する HEPA フィルターは、据付時のフィルターの完全性試験によるリーク試験後、定期的に試験されなければならない。

- (2) 直接支援区域に空気を供給する HEPA フィルターは、据付時のリーク試験後、定期的にフィルターの圧力損失・室間差圧・浮遊微粒子測定等により監視されなければならない。
- (3) 重要区域のリーク試験の方法と頻度については、HEPA フィルターの設置環境や使用目的に応じて、適切に定めなければならない。
- (4) HEPA フィルターの完全性に影響を及ぼしかねない事象もしくは状況が生じた場合、又は空気の品質が劣化していると判断された場合においては、HEPA フィルターのリーク試験を行うこと。

第4 その他構造設備について

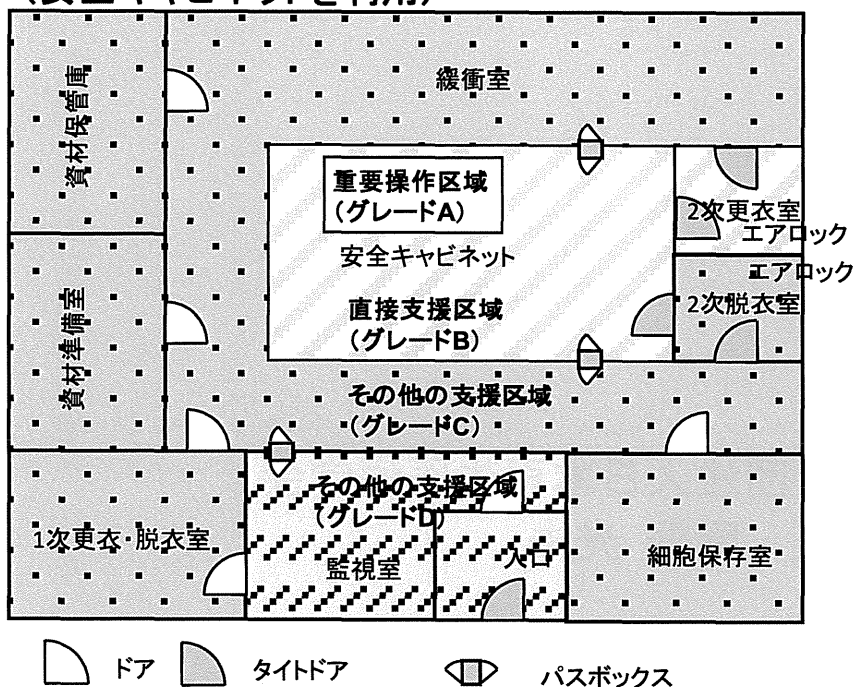
細胞調製施設を運営するに当たり、基本となる考え方を列挙した。以下の点に留意し、管理運営すること。

- (1) 細胞調製施設は、調製するのに適切な設備及び器具を備えていること。
- (2) 細胞調製作業を行うのに支障のないサイズ・構造・配置であること。
- (3) 設備レイアウトは、細胞調製従事者の快適性と動作に配慮し、円滑かつ適切な調製作業を行うのに支障のないような構造配置がなされており、かつ、日常の清掃及び定期的な保守が容易なものであって、天井、壁及び床の表面は、消毒液等による洗浄に耐えるものであること。
- (4) 清浄化及び維持管理が容易なものとし、設計意図に見合ったものであることを維持できるように定期的に点検を行うこと。特に部屋の密閉性を維持するために重要なシール部やパッキン類に注意すること。また、結露を防止するための断熱材についても有効に機能するよう注意すること。
- (5) 天井は効果的にシールされていること。
- (6) 微粒子あるいは微生物がたまったり気流を妨げたりする可能性のある凹凸構造、窓、扉周り等の横棧の設置は可能な限り避けること。やむを得ない場合は容易に清掃できる構造とすること。
- (7) 交差汚染防止の観点から、必要に応じて（例えば、直接支援区域など）、独立空調システムを使用する等の構造を採ること。
- (8) 各清浄度に適切な更衣室を設置すること。交差汚染防止の観点から、直接支援区域への更衣室は、入室と退室で分け一方向とすることが望ましい。同室で入退室の時間をずらすことで対応することも可能であるが、根拠ある十分な時間を設定すること。
- (9) 必要に応じて、温度、湿度、炭酸ガス濃度等について環境及び細胞調製従事者に悪影響を及ぼす異常な変化を速やかに検出可能な設備や体制を整えておくこと。
- (10) 採光及び照明は、調製作業に必要なして十分な照度を得られるように留意すること。

- (1 1) 昆虫や鼠の侵入及び室内で発生する昆虫からの汚染を避けるために、防虫防鼠対策を施すこと。防虫の観点から、漏光を避けるため、屋外に直接面する出入り口や窓は設置しないことが望ましい。屋外に直接面する窓がある場合は、防虫フィルムを活用すること等も考えられる。
- (1 2) 細胞調製従事者、最終調製品及び資材、廃棄物等の流れ並びにそれらの管理が容易になるよう、かつ各動線の交錯が少なくなるような設備の配置を考慮すること。
- (1 3) 廃液を含む廃棄物の処理方法（オートクレーブ処理等）を定め、廃棄物が適切に処理される設備・機器を備えていること。
- (1 4) 直接支援区域内に、給水及び排水設備を設置しないこと。その他支援区域に設ける必要があれば、トラップ構造でかつ一般排水とは別に消毒できる構造とすること。
- (1 5) 微生物を含む廃液又は微生物に直接接触した廃液については、閉鎖系のタンク等において、適切な薬品消毒又は加熱滅菌等の処理後、適切に排水するか専門業者に廃棄を委託すること。
- (1 6) 直接支援区域内のスプリンクラー及び排煙設備の設置は、可能な限り避けること。
- (1 7) 感染性廃棄物は、「廃棄物の処理及び清掃に関する法律」に基づき、次のいずれかの方法で適切に処理すること。
 - ・ 適切な薬品消毒又は加熱滅菌等の処理後に管理区域外へ搬出し、自施設内あるいは外部委託により焼却処理する。なお、感染性廃棄物の処理の委託による処理は、「産業廃棄物管理票（マニフェスト伝票）」を作成し、管理を行うこと。
 - ・ 移動の途中で内容物が飛散・流出する恐れのない容器に入れ、当該容器の外部を消毒後、管理区域外へ搬出し、自施設内あるいは外部の専門業者への委託により焼却処理する。
 - ・ 閉鎖系の適切に管理された方法により管理区域内から直接焼却炉へ搬送するか、又は直接滅菌機へ搬送・滅菌し、自施設あるいは外部の専門業者への委託により焼却処理する。
- (1 8) 取り違い防止のための設備（バーコード管理システム等）の設置が望ましい。
- (1 9) 圧縮ガスは、直接支援区域の環境に影響を与えないことを確認した上で使用すること。
- (2 0) 原材料、資材、最終調製品を区分して、衛生的かつ安全に貯蔵すること。
- (2 1) 原料、培養工程中及び最終調製品の試験検査に必要な設備及び器具を備えていること。無菌試験を行う試験室の環境は、細胞を調製する環境に匹敵するレベルとすべきである。ただし、他の試験検査設備又は試験検査機関を利用して自己の責任において当該試験検査を行う場合であって、適切な試験検査を行うのに支障がないと認められるときは、この限りでない。

- (2 2) 指標菌を使用する検査やケミカルハザードが想定される検査は，必要に応じて別区域に検査室を設置する等，交差汚染を確実に防止する構造を採ること．
- (2 3) 施設の設計やバリデーション等を，エンジニアリング会社やメーカー等の協力を得て行う場合は，その役務範囲を明確にし，評価項目，目的，方法，判定基準等について十分協議した上で実施すること．

細胞調製従事者(着衣)が重要区域に入る場合
(安全キャビネットを利用)



細胞調製従事者(着衣)が重要区域に入らない場合
(アイソレータ技術の利用)

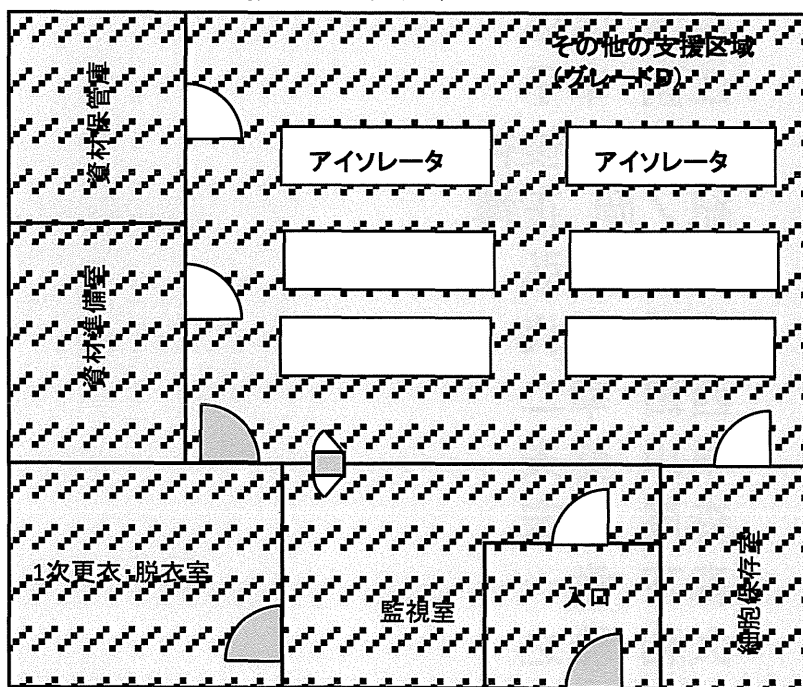


図1 細胞調製区域の例

一般社団法人日本再生医療学会
理事長：岡野 光夫

再生医療推進戦略委員会

委員長：澤 芳樹

委員（五十音順）：

梅澤 明弘

江副 幸子

大須賀 俊裕

紀ノ岡 正博

齋藤 充弘

高橋 政代

西田 幸二

早川 堯夫

森尾 友宏

森下 竜一

大和 雅之

2013年12月24日

細胞調製施設の構造設備について

東京医科歯科大学大学院発生発達病態学分野
同・医学部附属病院細胞治療センター



登録番号：JQA-QMA11047

登録事業者：
東京医科歯科大学医学部附属病院
細胞治療センター
東京都文京区湯島1-5-45

森尾友宏

1

本日の話題

- 1) 構造設備要件及び付随する運用・管理要件の検討体制
- 2) 細胞調製加工施設の構造要件
 - 細胞調製加工に必要な作業区域区分と清浄度
 - 空調システム及び環境モニタリング
(換気回数, 気流, 差圧, HEPA, 浮遊微粒子, 微生物,
温度, 相対湿度, 風量, …)
- 3) 製造機器類
 - セルプロセッシングアイソレータ
 - (機器の故障)

再生医療等の安全性の確保等に関する法律

(構造設備の基準)

第四十二条

細胞培養加工施設の構造設備は、厚生労働省令で定める基準に適合したものでなければならない。

(特定細胞加工物製造事業者の遵守事項)

第四十四条

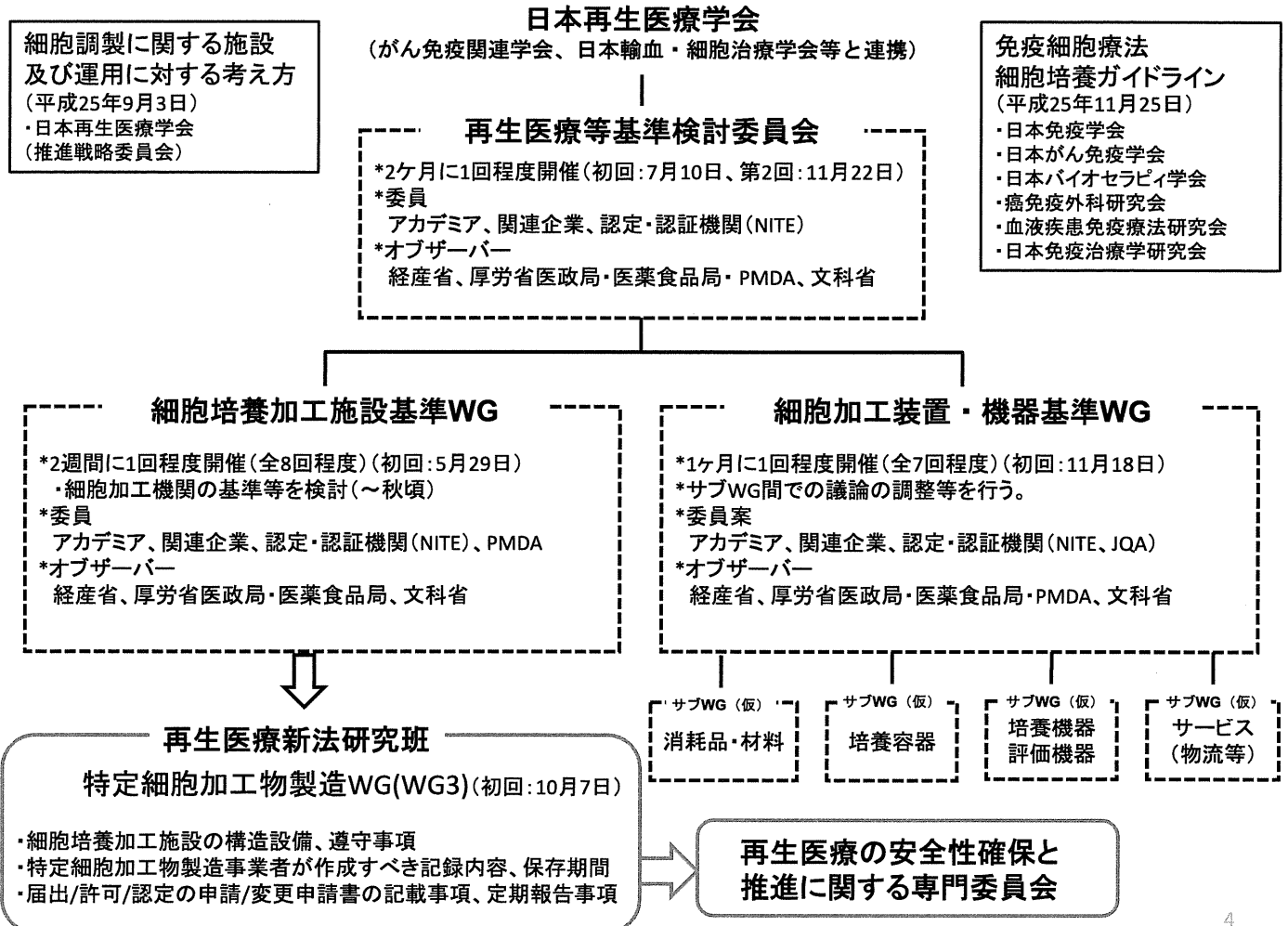
厚生労働大臣は、厚生労働省令で、細胞培養加工施設における特定細胞加工物の製造及び品質管理の方法、試験検査の実施方法、保管の方法並びに輸送の方法その他特定細胞加工物製造事業者がその業務に関し遵守すべき事項を定めることができる。

(立入検査等)

第五十二条

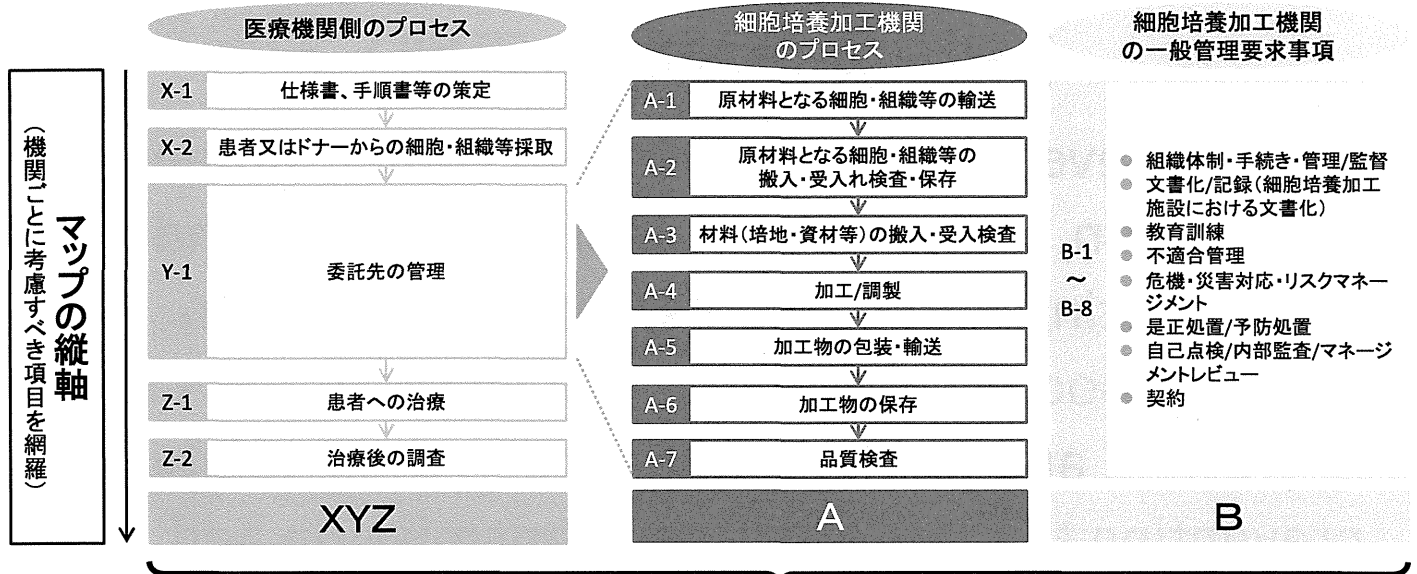
厚生労働大臣は、許可事業者又は届出事業者が設置する当該許可又は届出に係る細胞培養加工施設の構造設備が第四十二条の基準に適合しているかどうかを確認するため必要があると認めるときは、当該許可事業者若しくは届出事業者に対し、必要な報告をさせ、又は当該職員に、当該細胞培養加工施設若しくは事務所に立ち入り、その構造設備若しくは帳簿、書類その他の物件を検査させ、若しくは関係者に質問させることができる。

3



4

細胞培養加工プロセスマップの構造



医療機関、細胞培養加工機関における各項目 (X-1、X-2、Y-1、Z-1、Z-2、A-1～A-7、B-1～B-8) について、議論の細かさによって「オレンジ枠」「青枠」に分け、それぞれに求められる内容・論点を整理

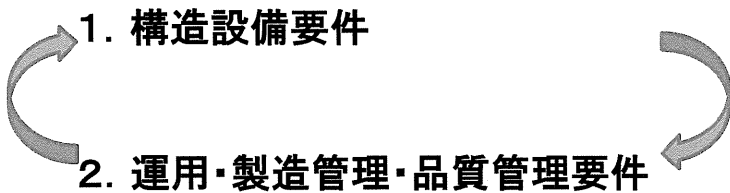
【オレンジ枠】

- ※既存の省令・指針及びcGTP、EMA Bioを参照し抽出した最大公約数的要件。項目によりさらに議論と絞り込みが必要
- ※個別の要件に左右されない上位概念であり、個別のケースによって変わる内容は下記の青枠で整理
- 哲学 ⇒ 項目ごとに必ず達成すべきと考えられる上位概念
- ハード面 ⇒ 哲学を達成する上で考慮すべきハード面(設備等)での要件
- ソフト面 ⇒ 哲学を達成する上で考慮すべきソフト面(手順等)での要件

【青枠】

- 細胞の種類、生産規模、開発段階、加工施設(医療機関・企業)など、個別のケースに即して考慮すべき要件・論点を整理

細胞培養加工施設基準WG検討事項



サブWG

- ・環境モニタリング
- ・チェンジオーバー
- ・交差汚染

3. 特定細胞加工物の製造委託に当たっての留意点

- 安全・品質確保のための哲学は、再生医療新法も改正薬事法も同じ又は近い。しかし、その運用には最終製品の性質等に応じた差があってしかるべき。
- 施設及び製造・品質管理の基準には、共通して最低限守るべき部分と細胞の種類等の状況・条件により上乗せすべき要求事項がある。
- 特定細胞加工物では、感染因子の混入、細胞の取り違え、クロスコンタミネーション、(感染の伝播)、プロトコルの混同などは、特に留意すべきリスク。
- 何が必要な基準かを論理的に考える必要がある。コストがかかるから行わないという観点はない。
- 目的を達成する方法・やり方に関しては柔軟性を持たせるべきである。ただし、その際はリスク評価を伴った正当化が必要である。

構造要件の3原則

(細胞製剤調製の原則) 感染性因子

“FDA believes that, together with establishment registration, HCT/P listing, donor screening and donor testing requirements, requirements for current good tissue practice will increase the safety of HCT/Ps, and public confidence in their safety, by preventing the introduction, transmission and spread of communicable disease. The agency's actions are intended to improve protection of the public health while minimizing regulatory burden.”

<http://www.fda.gov/BiologicsBloodVaccines/TissueTissueProducts/QuestionsaboutTissues/ucm102994.htm>

+取り違え防止(ドナー識別、動線、手順書、教育)

構造要件(細胞製剤調製の原則)

細胞調製施設は、無菌環境維持による雑菌汚染の防止、封じ込めによる汚染拡大の防止、チェンジオーバーにおける適切な運用による交叉汚染の防止を考慮する必要がある、構造（ハード）と管理（ソフト）の両者の対応により、安全な運用が成り立つ。

(再生医療学会・考え方)

薬局等構造設備規則

(昭和三十六年二月一日)

(厚生省令第二号)

平成22年度厚生労働科学研究(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)
医薬品の微生物学的品質確保のための新規試験法導入に関する研究

主任研究者: 室井正志(武蔵野大学薬学部, 環境衛生学)

無菌操作法による無菌医薬品の製造に関する指針

構造要件(細胞製剤調製の原則)

「微生物汚染(持ち込み)」、「交差汚染」、「作業者等への感染伝播」を防ぐために

構造要件

1. ゾーニング・動線計画
2. 空調システム
(温度, 湿度, 風量, 換気回数, 気流, 差圧, HEPA, 浮遊微粒子, 微生物…)
3. 各清浄度維持(清掃)に適した構造, 給排水構造

運用(清浄環境の維持)

1. 環境モニタリング
2. チェンジオーバー(作業毎の手順)
3. 環境維持
4. 作業者訓練及び手順書
(5. 取り違え防止)

9

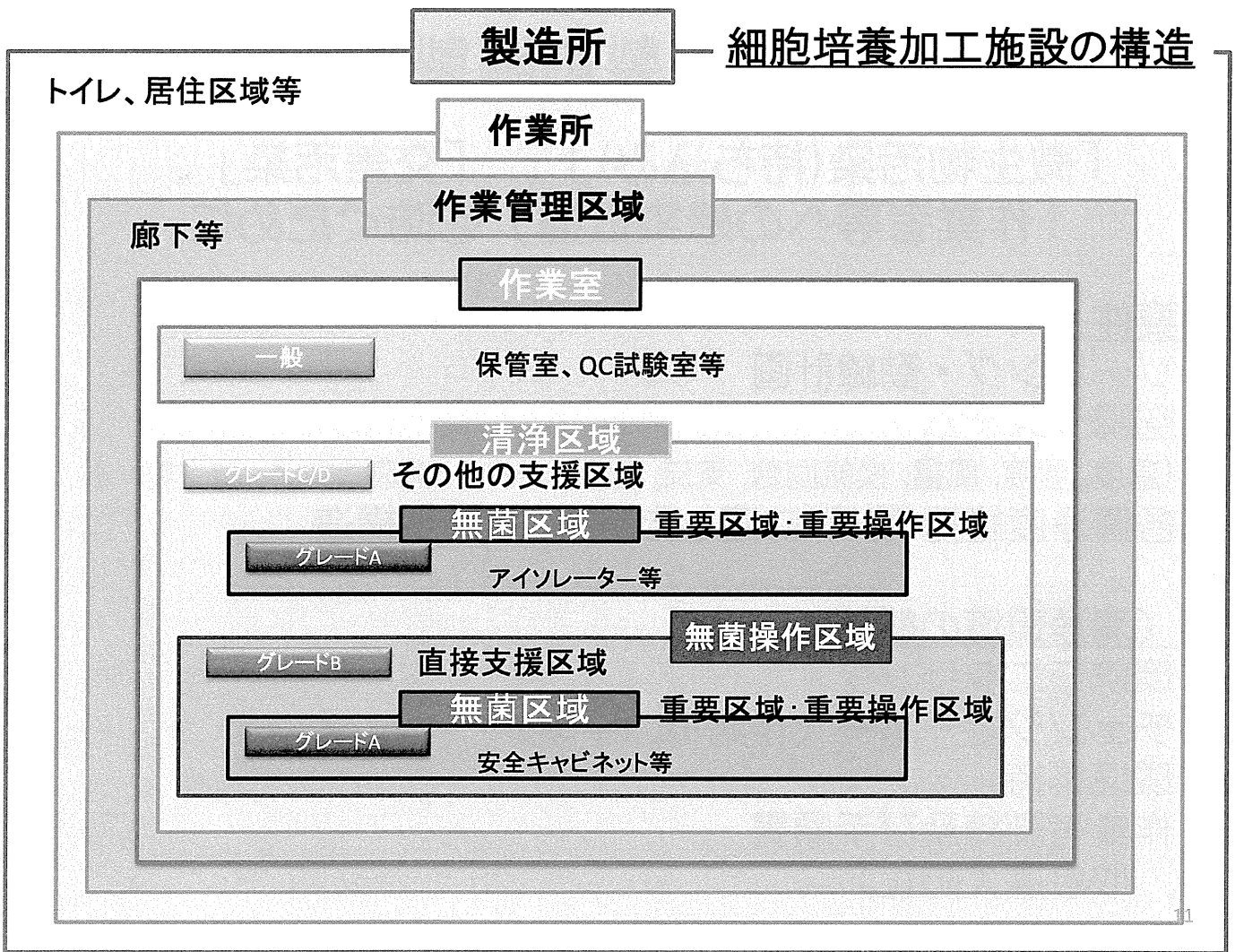
構造要件(細胞製剤調製の原則)

「微生物汚染(持ち込み)」、「交差汚染」、「作業者等への感染伝播」を防ぐために

特定細胞加工物(あるいは再生医療・細胞治療用調製細胞)の特殊性

- 原材料は非無菌である：内在性ウイルス、細菌・真菌
- 細胞培養を伴い、長期的・継続的に行っている。
- 多くの場合細胞は、抗菌薬を含む培養液内にて培養される。
- 重要区域には、作業者の腕のみが侵入する。

清浄環境の維持→無菌的操作



清浄区域設定と環境モニタリング

1. 浮遊微粒子、微生物

清浄区域の分類

名称		空気の 清浄度レベル ^{注1)}	最大許容微粒子数(個/m ³)			
			非作業時		作業時	
			≥0.5 μm	≥5.0 μm	≥0.5 μm	≥5.0 μm
無菌操作 区域	重要区域	グレードA (ISO 5)	3,520	20	3,520	20
	直接支援区域	グレードB (ISO 7)	3,520	29	352,000	2,900
その他の支援区域		グレードC (ISO 8)	352,000	2,900	3,520,000	29,000
		グレードD	3,520,000	29,000	作業形態 による ^{注2)}	作業形態 による ^{注2)}

注1) 括弧内の ISO クラスは、作業時の微粒子数に対応したものである。

注2) 最大許容微粒子数を規定しないケースもある。

(無菌操作法指針、再生医療学会・考え方、免疫細胞培養ガイドライン)

13

微生物管理に係わる環境モニタリング頻度

グレード	空中浮遊 微粒子	空中微生物	表面付着微生物		
			装置, 壁など	手袋, 作業衣	
A	作業中	作業シフトごと	作業終了後	作業終了後	
B	作業中	作業シフトごと	作業終了後	作業終了後	
C, D	製品や容器が 環境に曝露さ れる区域	月1回	週2回	週2回	----
	その他の区域	月1回	週1回	週1回	----

環境微生物の許容基準(作業時)

グレード	空中微生物		表面付着微生物	
	浮遊菌 (CFU/m ³)	落下菌 ^{注2)} (CFU/plate)	コンタクトプレート (CFU/24~30cm ²)	手袋 (CFU/5指)
A	<1	<1	<1	<1
B	10	5	5	5
C	100	50	25	----
D	200	100	50	----

注1) 許容基準は平均値評価とする。

注2) 1枚あたりの測定時間は、最大4時間までとし、作業時間中測定を行う。

(無菌操作法指針、再生医療学会・考え方、免疫細胞培養ガイドライン)

表3 クリーンルームの面積に対応した最少サンプリング数

クリーンルームの面積(m ²) ^{※1}	最少ポイント数
1	1
2	1
4	2
6	3
8	4
10	5
24	6
28	7
32	8
36	9
52	10
56	11
64	12
68	13
72	14
76	15
104	16
108	17
116	18
148	19
156	20
192	21
232	22
276	23
352	24
436	25
500	26

直接支援区域での測定（作業中や作業シフトごと）が負担（スペース，労力）になる。

※1 面積は、表示された数値未満又は等しい値である。

無菌医薬品製造区域の環境モニタリング法

本法は、無菌医薬品製造区域の清浄度評価方法及び評価基準値を示す。本法の主な目的は、①無菌医薬品製造区域がそれぞれ設計された清浄度、微生物制御を達成し、維持していることを確認すること、及び②無菌医薬品製造環境中の微粒子数、微生物数が適切に制御されていることを確認することである。

本法に示す評価方法及び評価基準値を参考に、製造設備ごとにリスクアセスメントを実施し、リスクに応じた基準値を設定すること。また測定方法については、合理的な根拠に基づき代替法を用いることができる。

http://www.pmda.go.jp/public/pubcome_201106_2.html

細胞培養加工施設の環境モニタリング法 (問題意識)

重要区域における環境モニタリング：

- 作業中の管理：浮遊微粒子測定および落下菌測定の必要性
(安全キャビネット内の一方流により、機器の点検を行う意味でグレードCレベルでの管理でも良いか)
- 作業シフトの定義：チェンジオーバーごと（消毒・除染操作？、検体交代ごと？、重要区域内に入る作業者ごと？）

空中微生物（浮遊菌, 付着菌, 落下菌ごと）の測定基準

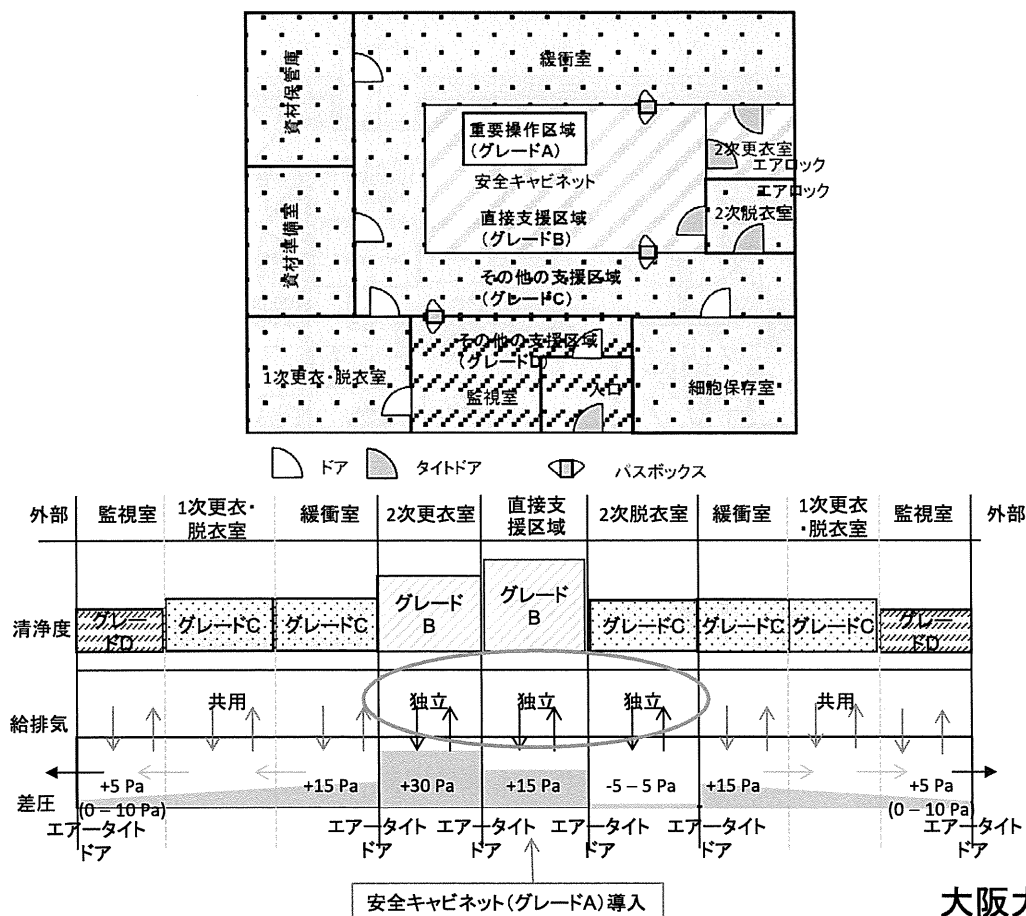
- 直接支援区域では測定頻度はグレードCと同等とし、サンプリングポイントを減らすことは可能か？

製造設備ごとにリスクアセスメントを実施し、
リスクに応じた基準値を設定

17

細胞培養加工施設における清浄区域設定(例1)

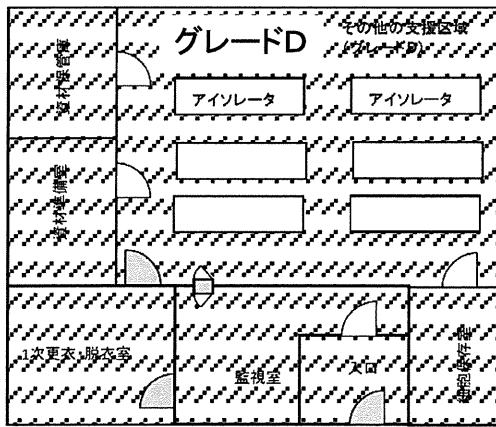
操作者(着衣)が重要区域に入る場合（安全キャビネットを利用）



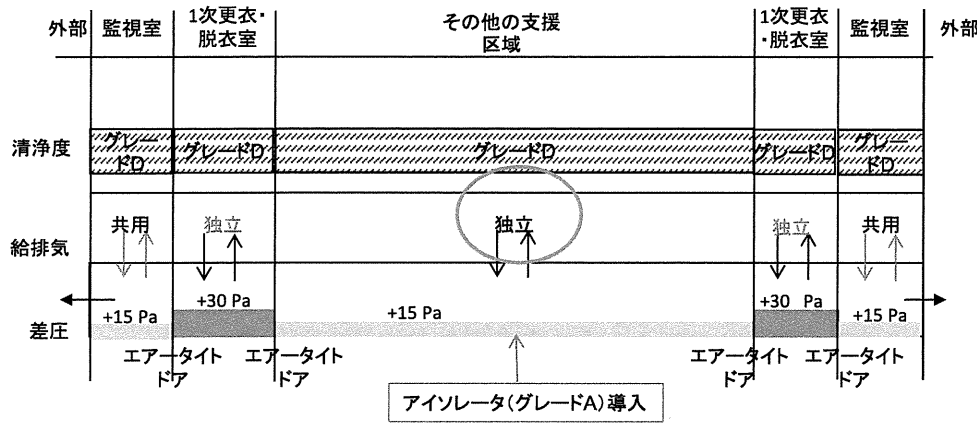
18

細胞培養加工施設における清浄区域設定(例2)

操作者(着衣)が重要区域に入らない場合(アイソレータ技術の利用)

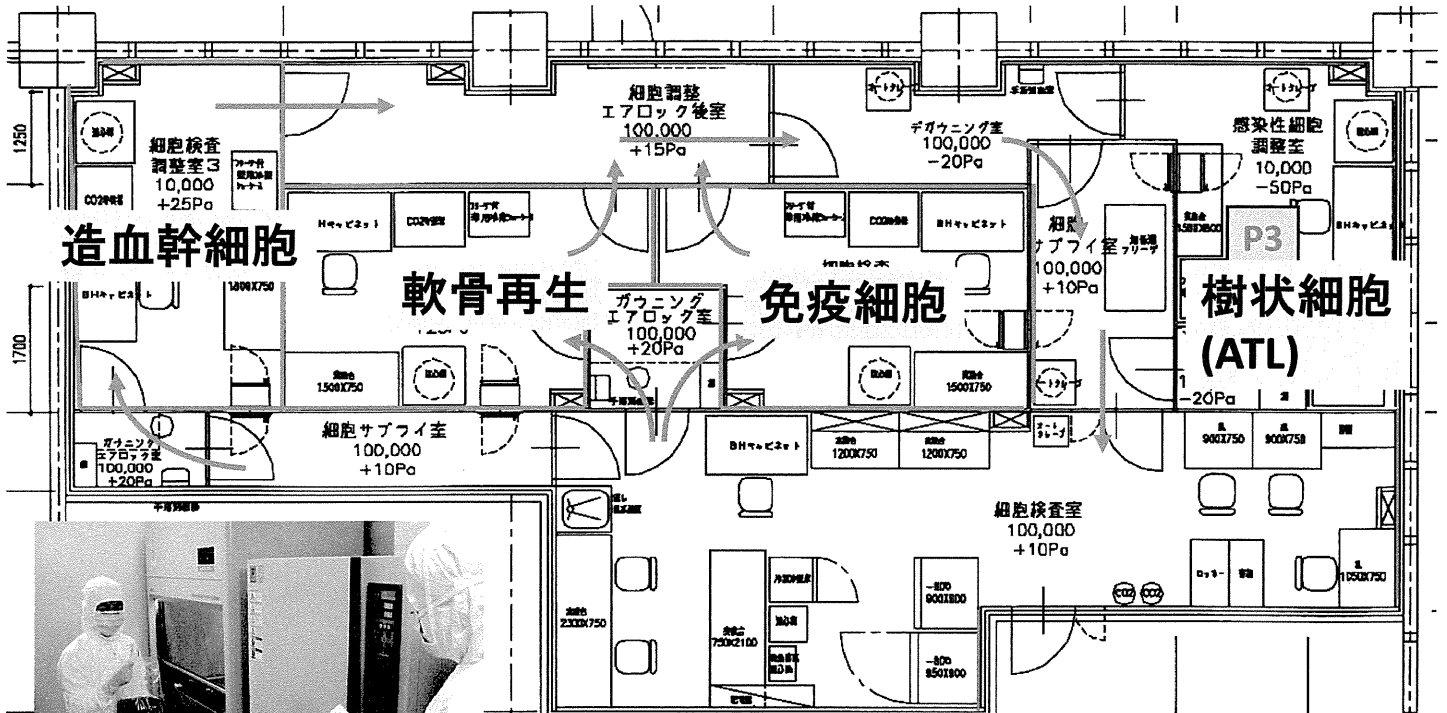


セルプロセッシングアイソレータ



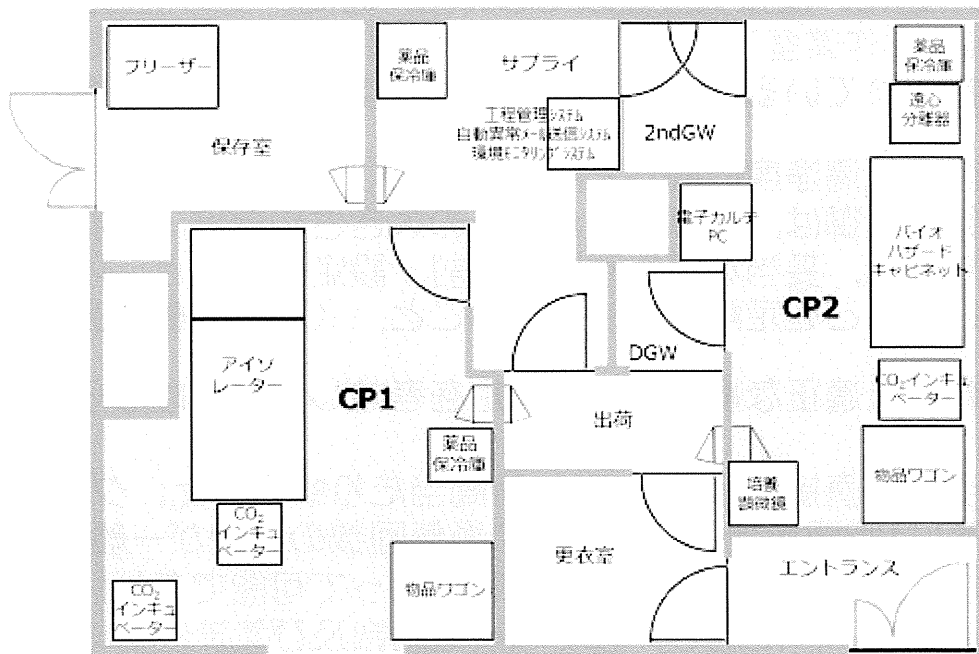
大阪大学紀ノ岡先生より

東京医科歯科大学医学部附属病院 細胞治療センター(施設:例3)



臍帯血移植後活性化DLI, ATLに対する樹状細胞療法
 血管再生医療、間葉系幹細胞による神経再生医療
 滑膜由来間葉系幹細胞による軟骨再生医療
 腸管上皮再生医療

横浜市立大学再生細胞治療センター(施設:例4)



http://www.yokohama-cu.ac.jp/sensin/reg_cell/index.html

21

細胞培養加工施設構造と環境モニタリング(微生物)

2. 層流と乱流

3. 換気回数

無菌操作区域の製造作業室及び更衣室においては、作業内容の製品に対する汚染リスクを評価し、定められた清浄度レベルを維持するために適切な換気回数を設定すること。通常、直接支援区域では30回/時間、その他の支援区域の内、グレードCに相当する作業室では20回/時間を確保することが望ましい。所定の換気回数が維持されていることを定期的に検査すること（無菌操作法指針）

適正な換気回数は空気清浄度に応じて設定されなければならない。また、適切な換気回数及び気流制御は、クリーンルームの大きさや機器、細胞調製従事者の存在等に依存する為、妥当な換気回数を検討・設定すること。所定の換気回数が維持されていることを定期的に検査すること。（再生医療学会・考え方）

- ・空気清浄度に応じた適正な換気回数の設定を考慮しなければならない。

<具体例>

グレードBに相当する直接支援区域では1時間当たり30回以上、グレードCのその他支援区域では1時間あたり20回以上の換気回数の設定が一般的な許容レベルである。また、調製室内のレイアウト等によって可能であれば下方気流を設定することが望ましい。ただし、適切な換気回数及び気流制御は、クリーンルームの大きさや機器、調製従事者の存在等に依存する為、妥当な換気回数を検討・設定すること。

- ・所定の換気回数が維持されていることを定期的に確認することを考慮すること。（免疫細胞培養ガイドライン）

23

4. HEPAフィルター

1 重要区域に空気を供給するHEPAフィルター及び排気するHEPAフィルターは、据付時のフィルターの完全性試験によるリーク試験後、最低でも1年に1回の頻度で試験されなければならない。

2 直接支援区域に空気を供給するHEPAフィルターは、据付時のリーク試験後、定期的にフィルターの圧力損失（フィルターの上流側と下流側の差圧）、室間差圧、及び浮遊微粒子測定等により監視されなければならない。

3 重要区域のリーク試験の方法と頻度については、HEPAフィルターの設置環境や使用目的に応じて、適切に定めなければならない。

4 HEPAフィルターの完全性試験でエアロゾルを使用する場合には、PAO（ポリアルファオレフィン）を使用することが望ましい。その他のエアロゾルを使用する場合は、微生物の発育を助長しないことを確認した上で使用すること。

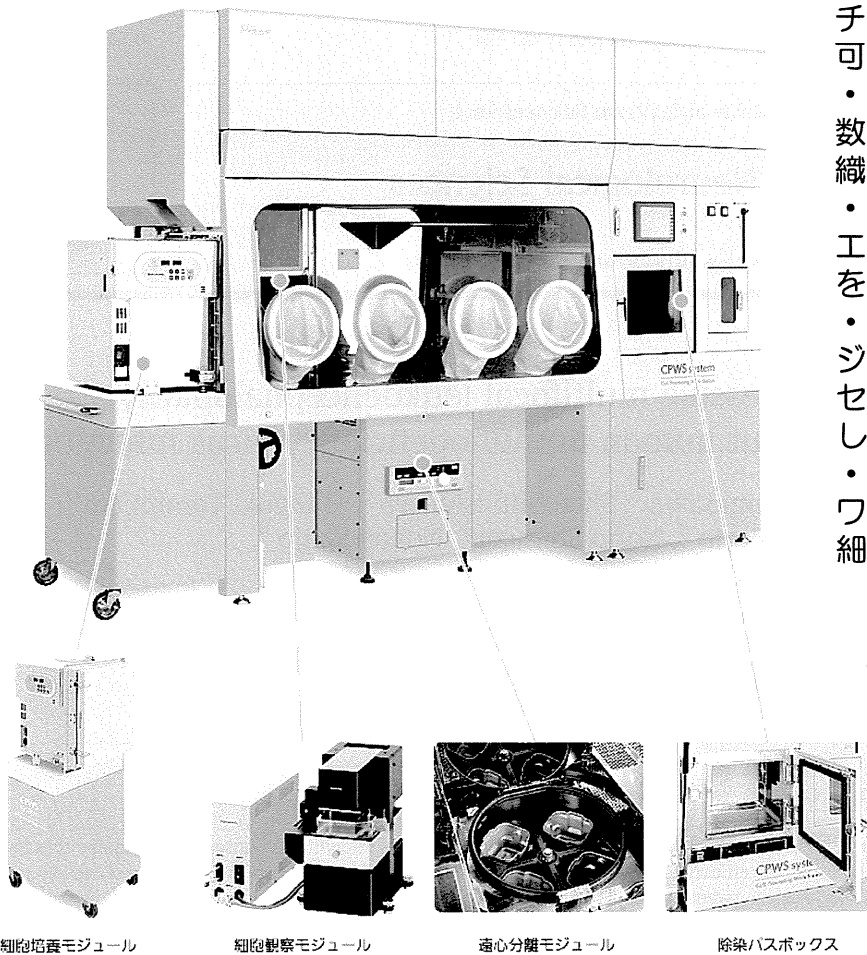
5 HEPAフィルターの完全性に影響を及ぼしかねない事象若しくは状況が生じた場合、又は空気の品質が劣化していると判断された場合においては、HEPAフィルターのリーク試験の実施を考慮すること。

（免疫細胞培養ガイドライン）

24

セルプロセッシングアイソレータ

- ・過酸化水素蒸気発生装置を搭載し、チェンジオーバー時に高レベル除染が可能
- ・細胞培養モジュールは着脱式で、台数の追加により複数ドナーの細胞・組織を取り扱い可能
- ・除染パスボックスを装備し、ワークエリアに持ち込む試薬・器具類の外装を過酸化水素蒸気により除染
- ・細胞培養モジュール、遠心分離モジュールがドッキングし、セルプロセッシングの一連の工程を無菌を維持したまま実現
- ・ジョイントボックスの採用により、ワークエリアの無菌を維持しながら、細胞培養モジュールの入替が可能



25

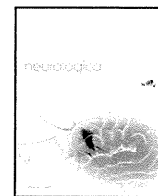
セルプロセッシングアイソレータ

・適切に設計されたアイソレータは高度な無菌性環境が達成されるが、完全に密閉された空間ではない。通常の無菌医薬品に係る製品の製造においては、内部が陽圧に保持されたアイソレータが用いられる。また、製品の無菌性を高度に保証するためには、HEPAフィルター、グローブ、ハーフスーツ及び各種シール部の保守・点検を含む包括的な予防保全プログラムが必要である。

・無菌医薬品に係る製品の製造を目的とするアイソレータを設置する環境の空気の清浄度レベルは、少なくともグレードDとすること。

(無菌操作法指針)

26



Short communication

Failure of mefloquine therapy in progressive multifocal leukoencephalopathy: Report of two Japanese patients without human immunodeficiency virus infection

Zen Kobayashi ^{a,*}, Miho Akaza ^{a,1}, Yoshiyuki Numasawa ^a, Shoichiro Ishihara ^b, Hiroyuki Tomimitsu ^a, Kazuo Nakamichi ^c, Masayuki Saijo ^c, Tomohiro Morio ^d, Norio Shimizu ^e, Nobuo Sanjo ^b, Shuzo Shintani ^a, Hidehiro Mizusawa ^b

^a Department of Neurology, JA Toride Medical Center, Ibaraki, Japan

^b Department of Neurology and Neurological Science, Tokyo Medical and Dental University, Tokyo, Japan

^c Department of Virology I, National Institute of Infectious Diseases, Tokyo, Japan

^d Department of Pediatrics and Developmental Biology, Tokyo Medical and Dental University, Tokyo, Japan

^e Department of Virology, Division of Virology and Immunology, Medical Research Institute, Tokyo Medical and Dental University, Tokyo, Japan

ARTICLE INFO

Article history:

Received 24 August 2012

Received in revised form 3 November 2012

Accepted 6 November 2012

Available online 22 November 2012

Keywords:

Mefloquine

JC virus

Progressive multifocal leukoencephalopathy

Human immunodeficiency virus

Blood–brain barrier

CD4

ABSTRACT

Although progressive multifocal leukoencephalopathy (PML) cases showing responses to mefloquine therapy have been reported, the efficacy of mefloquine for PML remains unclear. We report on the failure of mefloquine therapy in two Japanese patients with PML unrelated to human immunodeficiency virus. One of the patients was a 47-year-old male who had been treated with chemotherapy for Waldenström macroglobulinemia, and the other was an 81-year-old male with idiopathic CD4⁺ lymphocytopenia. Diagnosis of PML was established based on MRI findings and increased JC virus DNA in the cerebrospinal fluid in both patients. Mefloquine was initiated about 5 months and 2 months after the onset of PML, respectively. During mefloquine therapy, clinical and radiological progression was observed, and JC virus DNA in the cerebrospinal fluid was increased in both patients. Both patients died about 4 months and 2 months after initiation of mefloquine, respectively. Further studies are necessary to clarify the differences between mefloquine responders and non-responders in PML.

© 2012 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Progressive multifocal leukoencephalopathy (PML) is a brain disorder caused by JC polyomavirus, which causes death in one-half of patients within 1 year [1]. Primary infection usually occurs during childhood and is often asymptomatic. The initial site of JC virus (JCV) infection is thought to be the tonsils, and it is then carried by lymphocytes to the kidneys and bone marrow. Reactivation of JCV occurs due to severe cellular immunodeficiency, and the virus crosses the blood–brain barrier (BBB) and infects oligodendrocytes, causing widespread demyelinating lesions. A recent study revealed promyelocytic leukemia nuclear bodies as an intranuclear target of JCV [2].

A study of 9675 cases of PML between 1998 and 2005 showed that 82% of patients had human immunodeficiency virus (HIV), 8.4% hematologic malignancies, 2.83% solid organ cancers, and 0.44% rheumatologic diseases [3]. Recently, a new category of PML patients has emerged among patients treated with immunomodulatory medications including natalizumab, rituximab, and efalizumab. PML may

also occur in patients with minimal or occult immunosuppression including idiopathic CD4⁺ lymphocytopenia [4]. In Japan, the proportion of hematological malignancies or rheumatologic diseases as underlying diseases is relatively high, whereas that of HIV infection is low [5,6].

The estimated probability of survival at 1 year is reported to be 52% in HIV related PML [1] and variable in PML unrelated to HIV among reports. Some patients with PML do survive for extended periods of time after diagnosis [7,8]. Survival in PML is influenced by the presence of JCV-specific cytotoxic T-lymphocytes, CD4⁺ cell counts, or JCV DNA levels [1,9]. One study reported that estimated 1-year survival was 48% in patients with HIV related PML with CD4⁺ cell counts < 200/μl at PML diagnosis compared to 67% in those with CD4⁺ cell counts > 200/μl [1]. Another study showed that JCV DNA levels > 4365 copies/ml of cerebrospinal fluid (CSF) correlated significantly with shorter survival in patients with HIV related PML not receiving highly active antiretroviral therapy (HAART) [9].

To date, although antiviral drugs such as cytarabine and cidofovir show activity against JCV *in vitro* [10,11], large clinical studies have failed to establish the efficacies of these drugs in the treatment of PML [12–14]. The reason for this may be that these drugs are not able to cross the BBB and accumulate throughout the entire brain parenchyma at a dose sufficient to suppress JCV proliferation [15].

* Corresponding author at: Department of Neurology, JA Toride Medical Center, 2-1-1 Hongo, Toride, Ibaraki 302-0022, Japan.

E-mail address: zen@bg7.so-net.ne.jp (Z. Kobayashi).

¹ The first two authors equally contributed to this work.