

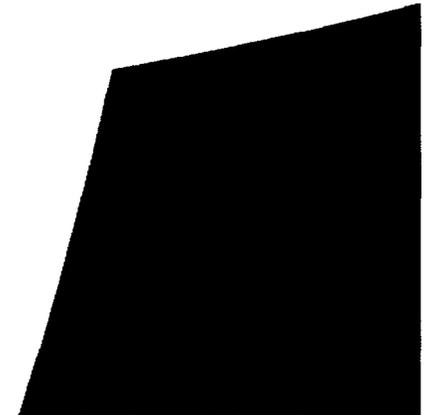
参考資料4

BCT Japan 株式会社
(旧ガンブロ株式会社)
提出資料(再配布)

Mirasol 病原体不活化技術
薬事・食品衛生審議会 (PAFSC)
委員会へのプレゼンテーション

2008年4月8日・東京

Bill Mercer、副社長兼統括責任者
Gambro BCT APAC



プレゼンテーションの概要

- Mirasol病原体不活化技術（PRT）を支援する企業
- Mirasol PRTシステムー製品概要
- 毒性学的安全性
- 病原体不活化性能
- Mirasol処理血小板の品質と有効性
- 血液センターの業務と物流管理に与える影響
- コストに関する考慮点
- 質疑応答

Gambro BCT

献血事業における成分採血



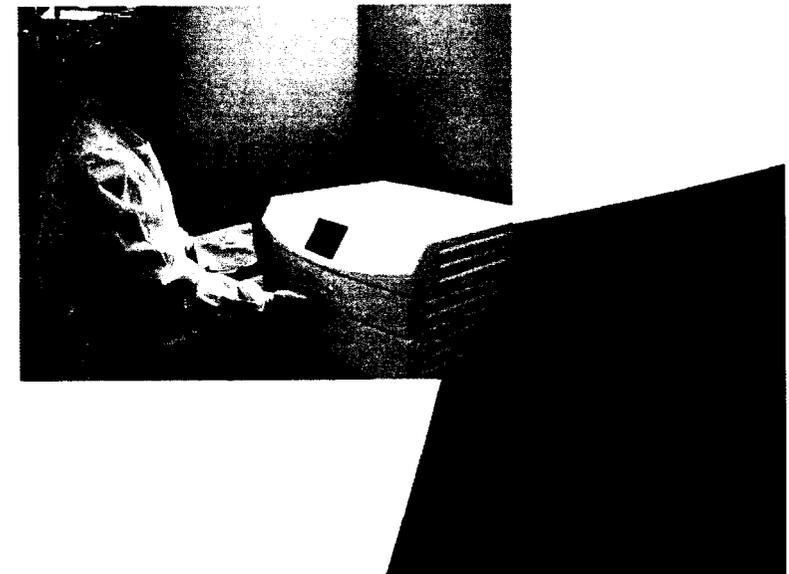
全血処理



治療分野



病原体不活化技術

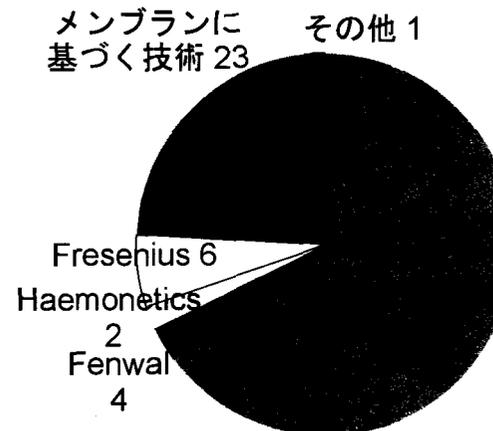
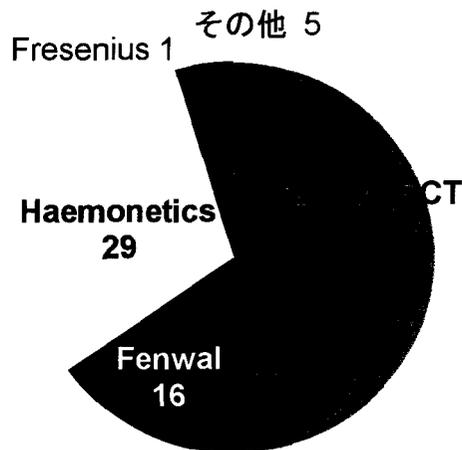


Gambro BCTの存在と実績

献血関連事業

治療関連事業

市場シェア
(%)



市場価格

600米国ドル

160米国ドル

成長率
(金額)

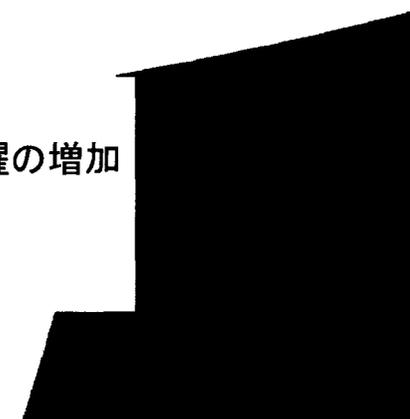
6%

4%

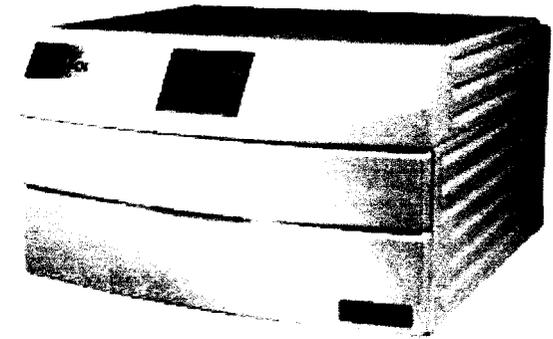
重要な
市場の傾向

- 制約された輸血用血液
- 規制基準の増大
- 品質と安全性に関する要求の増大

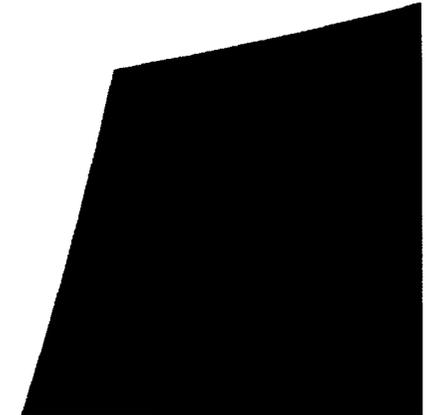
- 新たな医学的適用
- 幹細胞研究における活躍の増加



MIRASOL PRTシステム 概要



- 作用機序はリボフラビン（ビタミンB2）
＋紫外線の使用に基づく
- 広範なウイルス、細菌および寄生虫、ならびに
白血球に対する有効性が示されている
- 広範囲な安全性評価によると、残留リボフラビン
およびその光分解生成物の除去は不要である
- 1つの技術を3成分のすべてに適用できる
 - ❖ 血小板－CEマーク取得済み（2007年）
 - ❖ 血漿－CEマーク取得審査中（2008年）
 - ❖ 赤血球（Mirasol処理全血から分離）
－米国で人体実施可能性試験を計画中（2008年）



MIRASOL PRT発売までのスケジュール



血小板

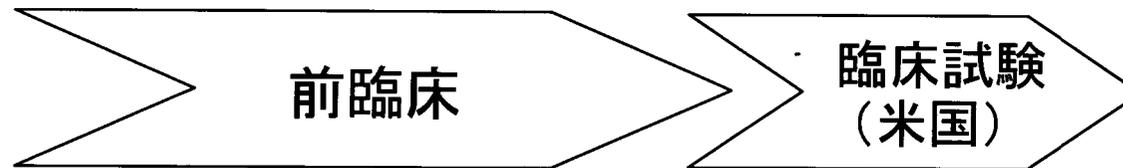
☼ CEマーク取得
Mirasol血小板
(第一世代)

☼ CEマーク取得
Mirasol血小板
(第二世代)

血漿

☼ CEマーク取得
Mirasol血漿

全血



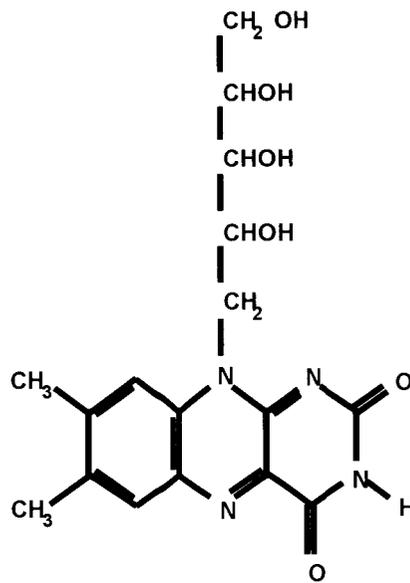
MIRASOL PRTシステムの原理： リボフラビン+紫外線

- リボフラビンは核酸と結合し、光照射により内部構造を変化させる^{1,2,3}

➢ 血液に適用すると、このメカニズムにより病原体が複製不能となる

- リボフラビンとその光分解生成物は無毒⁴かつ非変異原性^{4,5}であり、正常な血液中に自然に存在する⁶

➢ 輸血用血液に新たな「未知の化合物」は取り込まれない



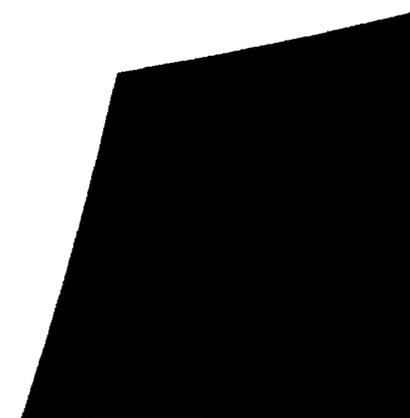
血液製剤への適用に関する MIRASOL PRTシステムの安全性



In vitro[†]およびIn vivo*毒性試験

✓ 急性毒性*	陰性
✓ 新抗原性*	陰性
✓ エームズ変異原性 [†]	陰性
✓ CHO染色体異常誘発性 [†]	陰性
✓ 細胞毒性 [†]	陰性
✓ 生殖毒性*	陰性
✓ 亜慢性毒性*	陰性
✓ MMN遺伝毒性*	陰性
✓ 血液適合性 [†]	合格
✓ 浸出性および抽出性 [†]	合格

- Mirasolシステムの安全性は以下によって実証済み
 - 広範なin vitroおよびin vivo毒性試験
 - ランダム化多施設共同臨床患者試験（フランス、2005～2007年）
- MIRASOL PRT処理では輸血前のリボフラビンとその光分解生成物の除去が不要である



MIRASOL PRTの有効性



活性病原体負荷の減少	典型的成績	参考文献
ウイルス (エンベロープあり、なし； 細胞内、細胞外)	~3-6 log (99.9-99.9999%)	Ruane et al. 2004, Goodrich et al. 2006, Navigant data on file
細菌 (グラム陽性、陰性)	~2-5 log (99.0-99.999%)	Ruane et al. 2004, Goodrich et al. 2006
寄生虫	> 5.0 (>99.999%)	Cardo et al. 2006, Cardo et al. 2007, Rentas et al. 2006, Tonnetti et al. 2007

白血球の不活化	典型的成績	参考文献
白血球不活化	> 6.0 (>99.9999%)	Fast et al. 2006a (in-vitro)
サイトカインの産生と発現	予 防	Fast et al. 2006a (in-vitro)
移植片対宿主病	予 防	Fast et al. 2006b (動物モデル)
同種免疫と移植片拒絶	予 防	Asano et al. 2007 (動物実験)

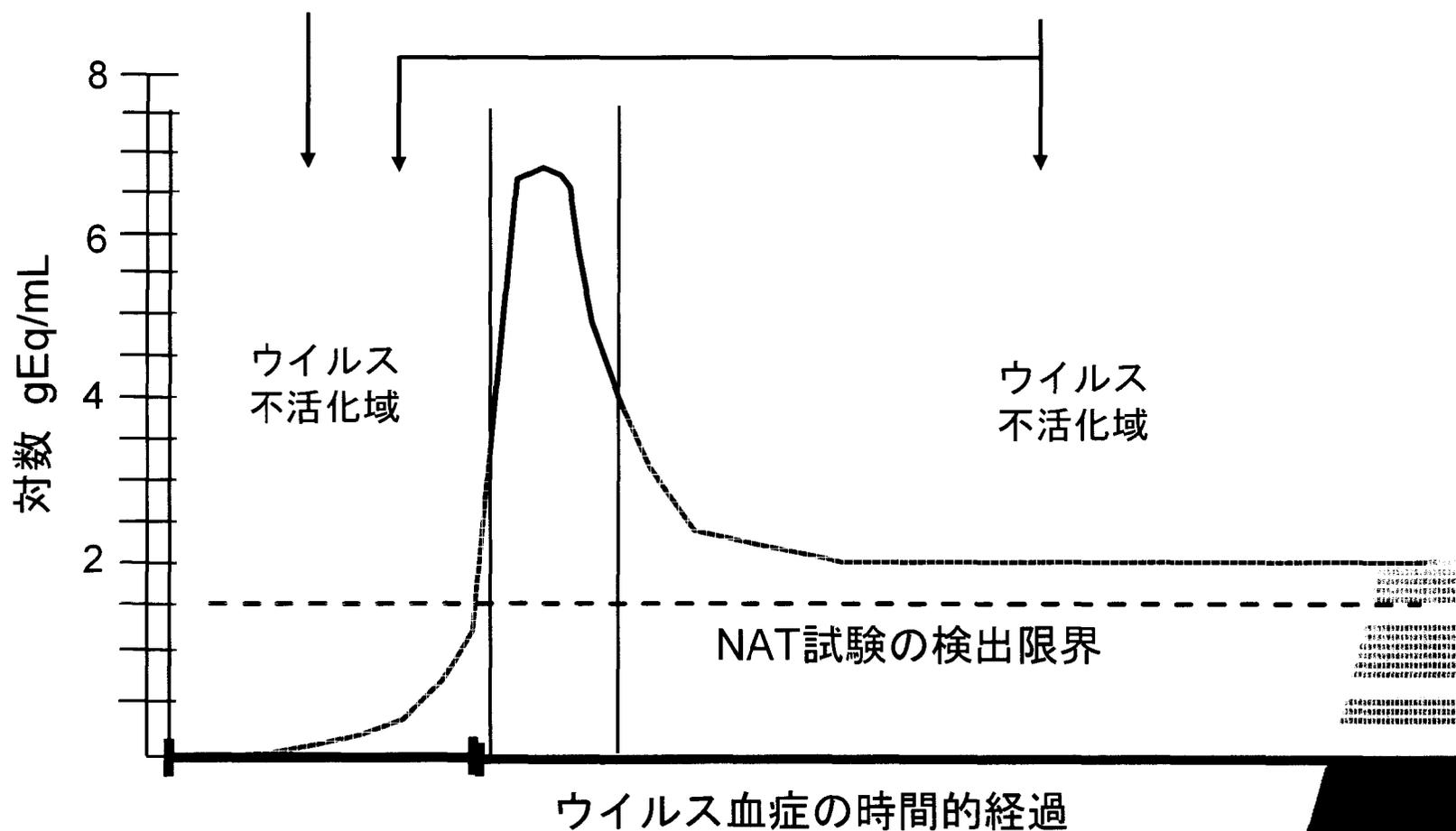
ウイルス減少の有効性 (TCID₅₀)

病原体	使用モデル	減少対数値	タイプ
HIV、活性	細胞内ヒトHIV	5.9	エンベロープあり
HIV、潜在	細胞結合ヒトHIV	4.5	エンベロープあり
C型肝炎ウイルス 西ナイルウイルス	西ナイルウイルス	5.2	エンベロープあり
	シンドビスウイルス	3.2	エンベロープあり
B型肝炎ウイルス	ヒトHBV	(現在進行中)	エンベロープあり
	オーエスキー病ウイルス	2.5-3.0	エンベロープあり
狂犬病ウイルス	水疱性口内炎ウイルス	> 6.3	エンベロープあり
インフルエンザウイルス トリインフルエンザウイルス	A型インフルエンザウイルス	> 5.3	エンベロープあり
サイトメガロウイルス	ヒトCMV	(現在進行中)	エンベロープあり
	ウシ伝染性鼻気管炎ウイルス	3.0-3.4	エンベロープあり
ヒトB-19ウイルス	ブタパルボウイルス	> 5.0	エンベロープなし
A型肝炎ウイルス	ヒトHAV	2.0	エンベロープなし
	ウシ腸内ウイルス	3.0	エンベロープなし

試験および非試験ウイルスの 感染性伝播に対する付加的防御

試験ウイルスの潜伏期間
伝染に対する防御

非試験ウイルスの伝染に対する防御
(ピークウイルス血症期外)



細菌減少の有効性 (TCID₅₀)

病原体	使用モデル	減少対数値	タイプ
S. aureus	ATCC 25923	3.6	グラム陽性
S. aureus	ATCC 700787	4.8	グラム陽性
S. epidermidis	ATCC 12228	4.2	グラム陽性
B. cereus	ATCC 7064	1.9	グラム陽性
B. cereus	NI-0001	2.7	グラム陽性
S. mitis	ATCC 6249	3.7	グラム陽性
P. aeruginosa	ATCC 43088	> 4.5	グラム陰性
P. aeruginosa	ATCC 27853	> 4.7	グラム陰性
E. coli	ATCC 25922	> 4.4	グラム陰性
S. marcescens	ATCC 43862	4.0	グラム陰性

上記の菌はサーベイランス研究で報告のあった敗血症事象の86%以上を占める

➤ Mirasolは、汚染ユニットの輸血を防ぐために現在実施されている細菌スクリーニング法よりも効果的である (50%に対して90%超) 17

寄生虫減少の有効性 (TCID₅₀)

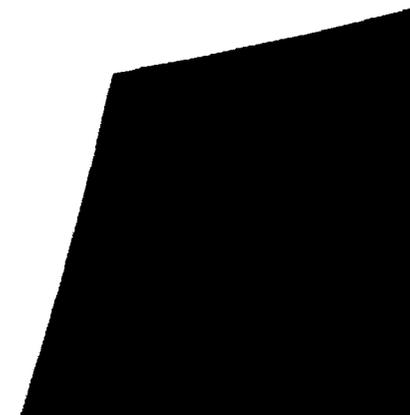
疾患	病原体	減少対数値	試験物質
リーシュマニア症	<i>Leishmaniasis donovani infantum</i>	>5.0	血小板、血漿
マラリア	<i>Plasmodium falciparum</i>	>3.0	赤血球
シャーガス病	<i>Trypanosoma cruzi</i>	>6.0	血小板、血漿
バベシア症	<i>Babesia microti</i>	>5.0	血小板、血漿
ツツガムシ病	<i>Orientia tsutsugamushi</i>	>6.0	血小板、血漿、赤血球

すべての病原体が検出限界にまで不活化される。

MIRASOL処理血小板製剤の臨床的有効性



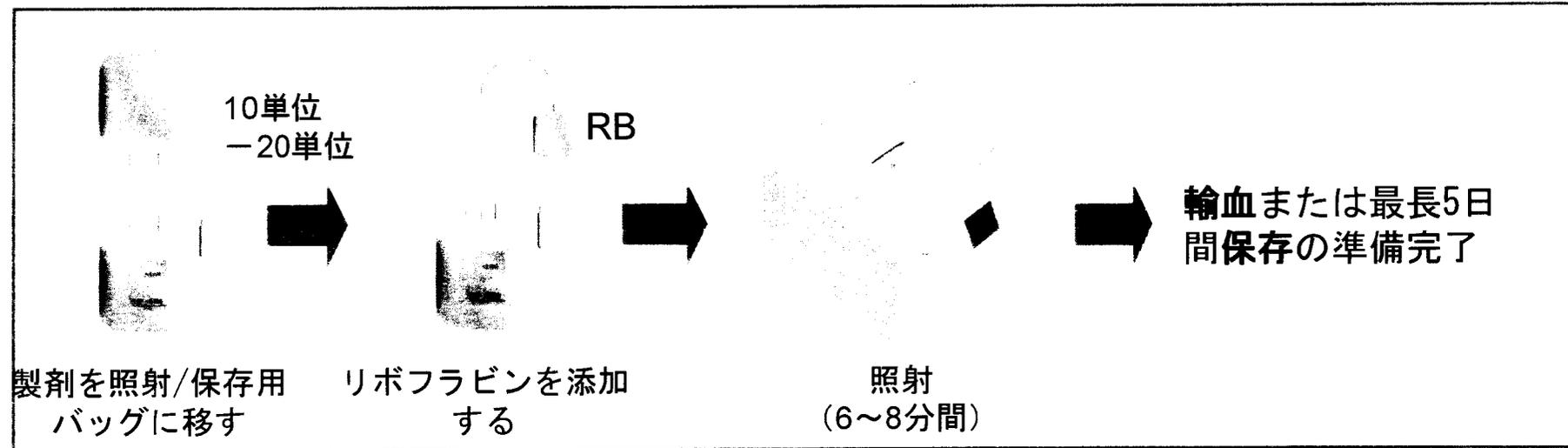
- Mirasol処理血小板の安全性と有効性を評価するための、約100例の患者を対象としたランダム化対照臨床試験が欧州で完了した（2005～2007年）
 - ー有害事象と血小板の有効性の臨床的測定値を査定（出血事象、数の増加、輸血の間隔など）
 - ーデータは2008年5月の公表後に入手可能となる
- 中間分析での好ましい結果が、このシステムに対するCEマーク申請の根拠となった
 - ーデバイス関連の重大有害事象は認められなかった
 - ーデータはMirasol処理血小板の臨床的有効性を裏付けている
- このシステムは現在、欧州・中東・アフリカの7か国で継続的に使用されている



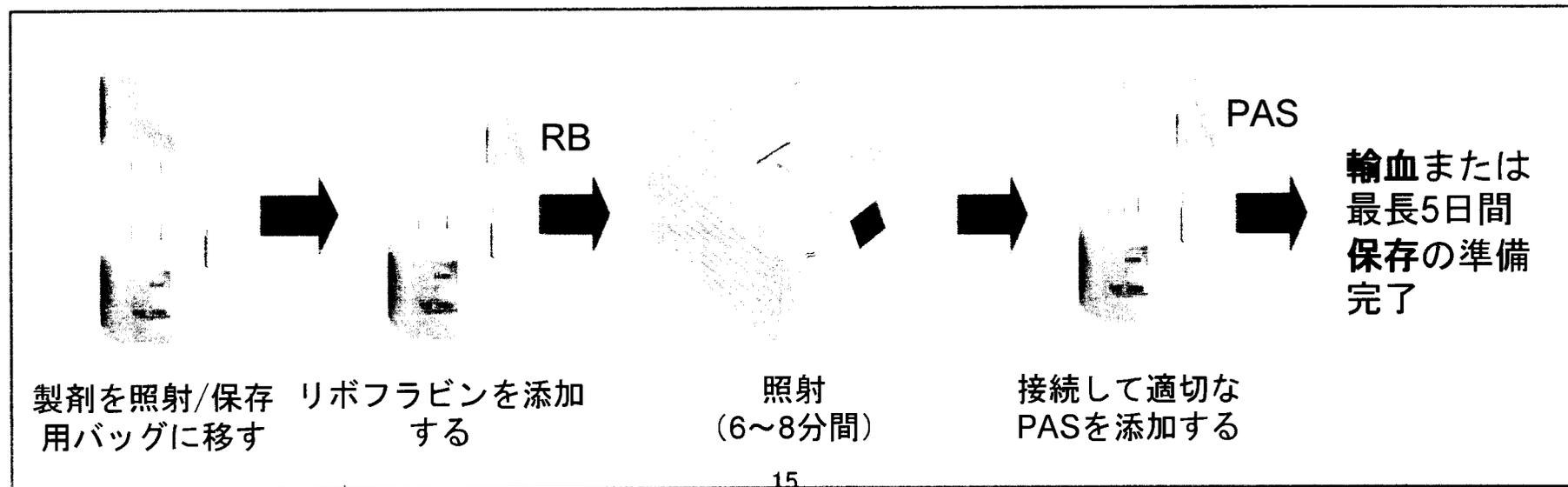
血小板用MIRASOL PRT処理



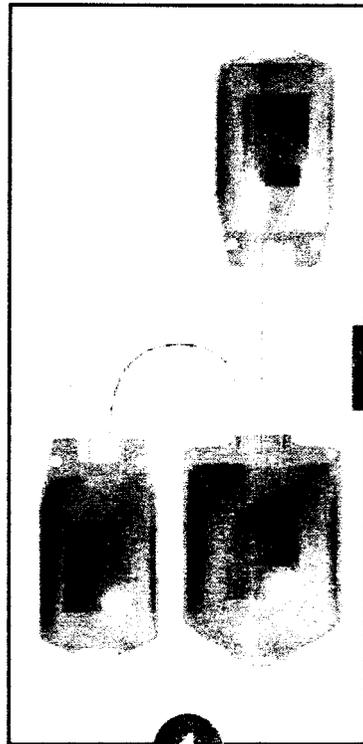
標準的血小板プロトコル—Mirasol第一世代



血漿除去血小板（PPC）プロトコル—Mirasol第二世代

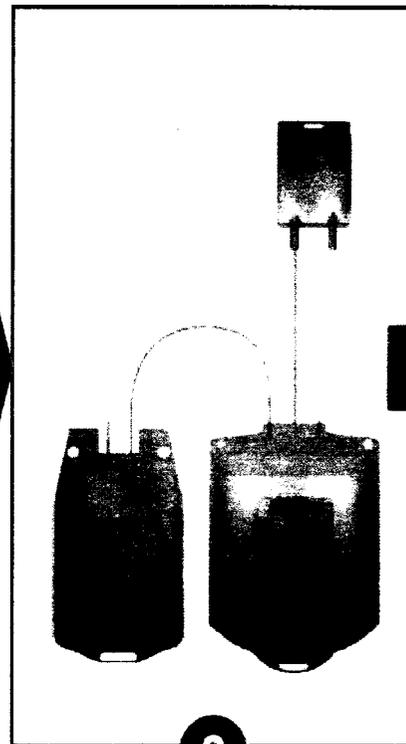


血漿用MIRASOL PRT処理



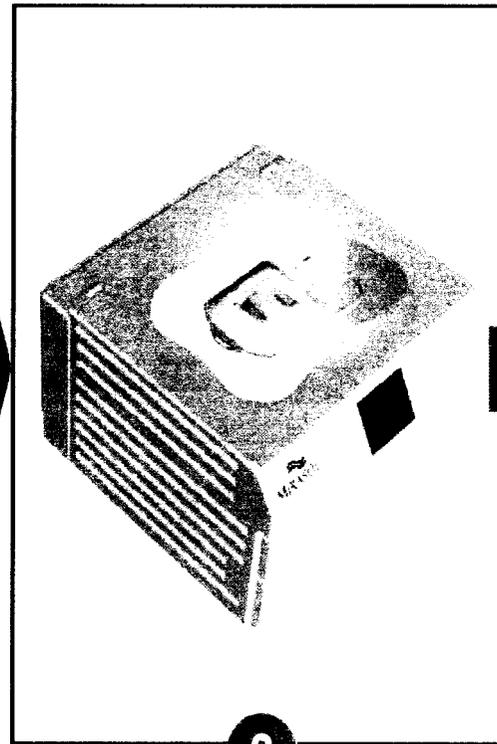
1

接続して
血漿製剤を移す



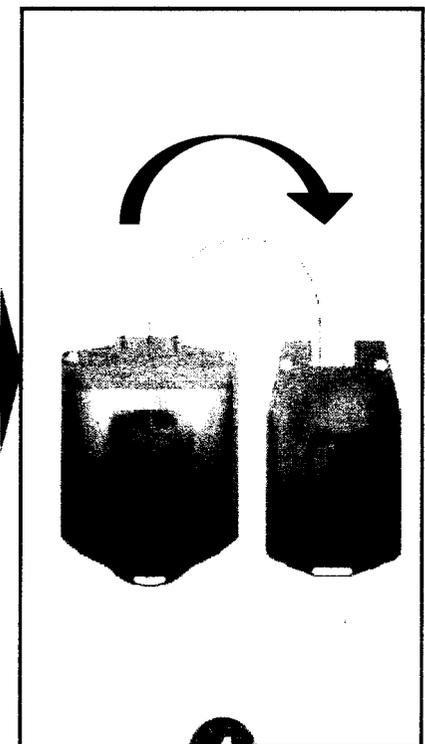
2

接続して
リボフラビン溶液を
添加する



3

4-6分間
照射



4

取付済みの
最終保存バッグに
血漿を移す

血液センターの業務と物流管理に 与える影響（血小板処理）

影響する領域	Mirasolの影響
血小板生成法	<ul style="list-style-type: none"> ・多様なアフエレーシスシステムに適合 ・保存媒質として血漿またはPASの利用が可能
血小板収量	血小板の処理損失は2%未満
労力	手作業の時間は合計5分未満
スタッフの訓練	処理が容易であるため最小限で足りると予想される
製剤出荷	最小限の遅延：全処理時間は15分未満
ワークフロー	処理後の追加作業がないため影響は最小限 (化合物除去作業なし)
必要スペース	年間25,000～35,000ユニット*の生産で約3 m ² (前処理室と2台の照明器の場所を含む)

*1日8時間シフト、労働能率80%、
操業260～360日と仮定

コストに関する考慮点

追加コスト

- 装置とディスプレイ
ザブル製品のコス
ト
- 追加労働
(Mirasolによる増大はほと
んどないと予想される)

病院側には追加コスト
の影響はないと予想さ
れる

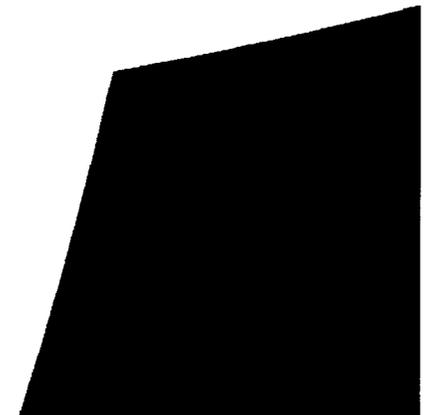
コスト節減の可能性

- 以下の回避/排除による直接的
節減：
 - 細菌スクリーニング
 - ガンマ線照射
- 血小板の有効期限の延長
- 以下の低減/回避による間接的
節減：
 - 感染性疾患の伝播
 - 細菌による敗血症の発生
 - 白血球による非感染性
輸血合併症

References

1. Kuratomi & Kobayashi, *Biochim Biophys Acta* 1977;476:207-217
2. Speck et al., *Pediatr Res* 1975;9:150-153
3. Korycka-Dahl & Richardson, *Biochim Biophys Acta* 1980;610:229-230
4. Piper J et al., *Int J Toxicology* 2001;20:404
5. Kale et al., *Mutat. Res.* 1992;298:17-23
6. Hardwick et al., *Photochem Photobiol* 2004;80:609-615
7. Ruane, et al., *Transfusion* 2004; 44: 877-885.
8. Goodrich, et al., Chapter 5: *In Flavins: Photochemistry and Photobiology*, The Royal Society of Chemistry, 2006, 83-113.
9. Cardo, et al., *Vox Sanguinis* 2006;90: 85-91.
10. Cardo, et al., *Transfusion and Apheresis Science* 2007;37: 131-137.
11. Rentas, et al., *Transfusion* 2007;47: 240-247.
12. Tonnetti, et al., *Transfusion* 2007;47: (3S): 133A.
13. Fast, et al., *Transfusion* 2006;46: 642-648.
14. Fast, et al., *Transfusion* 2006; 46:1553-1560.
15. Asano, et al., *Transplantation* 2007; 84: 1174-1182.
16. Goodrich et al., A Laboratory Comparison of Mirasol Pathogen Reduction Technology Treatment and Culture of Platelet Products for Addressing Bacterial Contamination Concerns, *Transfusion (submitted)*

質疑応答



MIRASOL®

病原体不活化技術：

Mirasol PRT システム

A Novel Approach to Blood Safety

前書き

海外旅行の増加は、通常的生活環境を越えて病原体の広まりを生じさせている。例えば、FDA がシャーガス病に対する初めてのスクリーニング検査を認可してから 10 ヶ月で、米国で採血された 241 件の血液はクルーズ・トリパノソーマに対し陽性であり、献血者が病原体に晒されたことを示唆していた。これは、西ナイル・ウィルスなどの新しい病原体の出現と共に、血液供給の安全性に対するリスクの増大を示している。

人々は、当然、感染症リスクの高い輸血は受けたくないと要求する。それにより、病原体不活化技術などのより改善された血液安全対策の実施に、政府と行政当局側が積極的に資金を提供するよう促している。

Gambro BCT の完全所有子会社である Navigant Biotechnologies LLC 社は、献血血液製剤の質を改善する仕事が委託されている。Navigant Biotechnologies LLC 社によって開発された Mirasol®PRT 装置は、献血血液製剤中の病原体と残存白血球を不活化するためにリボフラビンと紫外線を利用している。この装置は広範囲において試験され、信頼できる機関によって科学的に実証されている。新しい病原体が血液供給中に導入されることは無く、処理過程は安全、簡単、効果的である。

本論文より、Mirasol PRT 装置の安全性と有効性を担保する重要なデータの概観を示す。

目次

- 第1章：病原体不活化に関する背景：技術とドライバー
- 第2章：Mirasol：プロセス
- 第3章：Mirasolによる処理の安全面
- 第4章：病原体不活化の性能
- 第5章：病原体不活化技術（Mirasol PRT）による白血球の不活化
- 第6章：Mirasol 処理した血小板製剤の品質
- 第7章：Mirasol 処理した血漿の品質
- 第8章：臨床試験と将来における製品開発
- 第9章：血液の安全性にかかるコスト

第 1 章

病原体不活化に関する背景情報：技術とドライバー

MIRASOL®

病原体不活化技術

病原体不活化に関する背景：技術とドライバー

Mirasol病原体不活化技術(PRT)装置は、輸血用の献血血液成分中の病原体負荷を減らし、残存白血球の不活化を意図して設計されている。本Mirasol装置は紫外線(UV)とリボフラビン(ビタミンB2)に基づく技術を応用している。血小板用のMirasol PRT装置はCEマークを受け、市場導入された最初のMirasol製品である。同じ技術は、現在、血漿と白血球適用に向けて開発中である。

Mirasol PRT 装置

血小板用の Mirasol PRT 装置は、再使用可能な照射器、および滅菌リボフラビン溶液バッグと滅菌照射・保存バッグを含むディスプレイセットからなる。処理の間、血液成分は照射・保存バッグに送られ、リボフラビン溶液が添加された後、照射器に移される。照射器は、マイクロプロセッサ制御式の電気機械装置であり、照射及び、血小板成分とリボフラビンの混合を調整する。照射器はまた、血小板の質が確実に維持されるように温度をモニターし調整する。照射中、血液成分は、その量にもよるが、約6分間から10分間紫外線にさらされるが、照射中の光エネルギーは6.2 J/mLである。照射完了後、処理した血液成分は保存され、血液バンクにより管理される。

血液の安全性の簡単な歴史

歴史的に、輸血関連の肝炎のリスクはずっと以前から分かっていたことだが、ヒト免疫不全ウイルス(HIV)の出現までは、厳しい血液の安全対策が導入されることはなかった。1981年のエイズの最初の症例の発症から数年以内に、この疾患は血液由来のウイルスが病因であることが明らかになったが、その時すでに数千人の人々が感染していた。血友病患者は、第Ⅷ因子製剤(当時は数1,000単位のヒト血漿を貯留して製造していた)の定期的な注射が必要であったことから、特に大きな被害を受け、米国の多数の血友病患者がHIVに感染した。

HIVの最初の血清(抗体)検査は1985年血液バンクによって実施されたが、献血血液や血液成分に未知の病原体が混入しているかもしれないという知識は輸血の安全性に対する態度を著しく変化させた。これらの懸念に対処するため、輸血業務では様々な方法が用いられている。

HIV感染は、血液に由来する病原体からの血液成分の危険性を際立たせた。

血液供給の安全性の向上のための現在のアプローチ

献血者の選択

献血者の選択は、通常、血液バンクのスタッフによる面接や質問表に基づいており、伝染性病原体のキャリアーであるリスクが高い人(例えば高リスクの性的行為を行った人、静

脈麻薬を使用した人、マラリアなどの風土病が流行する地域へ旅行し、検査を受けていない人)からの献血を受け付けないことを目的としている。

過去 20 年間、この献血者の選択は汚染献血件数を減らすのに最も有効な手段であった。しかし、この方法は、献血者が除外基準を無視したり理解できないようであれば役に立たない。

血清検査と核酸増幅テスト

次の防御方法は、血清検査および／または核酸増幅テスト(NAT)による病原体についての献血血液の検査である。血清検査のルーチン使用は輸血による HIV 感染症の発症率を有意に減少させた。1990 年代後半での NAT の導入はさらに検査の精度を向上させ、潜伏期間(感染してから、検出可能な抗体またはウィルスマーカーの出現までの時間)を 22 日から 13-15 日に減少させた。しかし、検査により実質的にリスクは減少したものの、特に複数回輸血を受けた患者の、輸血を介した感染症など限定的リスクは、依然として存在する。

細菌検出

ウィルスの脅威にさらされる危険性があるにもかかわらず、(先進国における)輸血による最大の伝染性疾病リスクに細菌性敗血症がある。血小板および赤血球の細菌汚染の発生率は輸血血液 3,000 単位当たりで約 1 単位であり、また 25,000 回の血小板輸血当たり約 1 回、25,000 回の赤血球輸血当たり 1 回は、輸血に関連した敗血症を発症している。現在までに行われた、骨髄移植を受けた患者の血小板輸血に関する唯一のプロスペクティブ研究は、16 人中 1 人、輸血症例 350 症例中 1 症例、血小板 2000 単位中 1 単位に症候性菌血症のリスクがあったことを示した。これらの発症頻度は、毎年米国だけで 9 百万単位以上の血小板濃厚液が輸血されていることを考えると、無視できない値である。このリスクを減らすためには様々な手段、細菌感染のリスクを考慮するような献血者選択基準を修正することや、採取した血液の処理段階および白血球不活化処理の最中に、一般向けおよび特定対象向けに衛生対策を実施することが含まれる。しかし、細菌性敗血症のリスクを減じる目的で最も広く適用されている方法は細菌検出であり、この方法によって血小板製剤は、検査結果が陰性であるということに基づき、市場に供給される。

白血球不活化

多数の国で実施されている一般的な白血球不活化処理の適用は、輸血の安全性に大きな影響を与え、ヒト白血球抗原(HLA)免疫化の発症率と患者の有害反応の発症率を劇的に減少させた。さらに、これにより細胞由来感染性病原体の伝染を減らしている。

ガンマ線照射

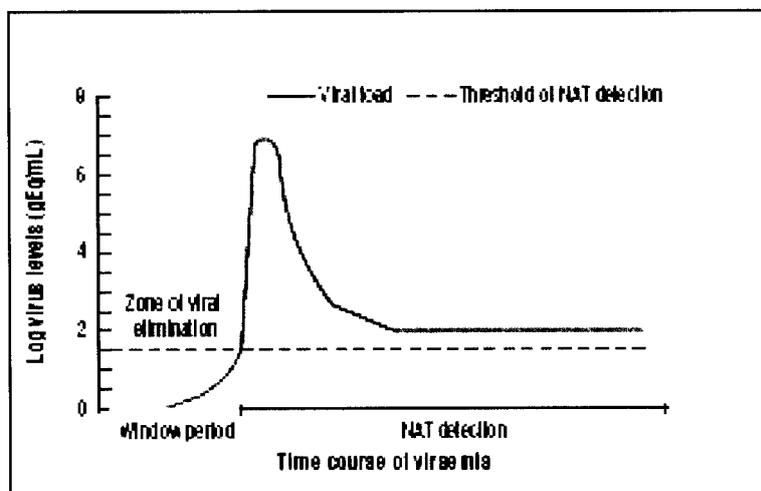
ガンマ線照射は、稀ではあるが、非常に重度の輸血合併症（例えば、同種造血幹細胞移植レシピエントなどの重度免疫障害患者で見られるが、HLA 単一同一血液成分を投与された非免疫障害患者の一部にも生じる免疫輸血関連移植片対宿主病(TA-GVHD))を予防するのに適用されている。

血液の安全性の満たされていない要求

血液の安全性に対する現在の重層化介入アプローチは、血液成分のウィルス汚染のリスクを顕著に減少させた。しかし、細菌汚染のリスクと新しい病原体の予期せぬ出現は、未だに主要な懸念事項である。スクリーニングと検査では潜在的なヒト病原体を全て除外することはできない。血液供給の安全性を向上させるために積極的な対策を講じることが必要である。

現在の血液の安全性手順により血液と血液製剤はより安全なものとなってきたが、リスクはまだ存在している。

図 1. 核酸増幅検査(NAT)の有用性と限界



核酸増幅テストの限界

輸血による感染症の全体的リスクは低いですが、有意なリスクはまだ存在している。血清学的検査は3週間以上の潜伏期間のために限界がある。NATはこのリスク期間を減らしたが、それを取り除いたわけではない(図1参照)。さらに、NATは少量の病原体でさえ検出することができるが、それは特異的な病原体に対してのみである。HIV、B型肝炎ウィルス(HBV)、C型肝炎ウィルス(HCV)などの良く知られたウィルスはルーチンに検査されているが、一連の検査に挙げられていないウィルスのリスクについて検査することは不可能である。新し

い検査法を開発することは、費用がかかり時間が要る。例えば、新しい病原体の確認から適切な検査のルーチン化までには3年かかる。さらに、検査がもっと迅速に開発できても、早期の低ウイルス負荷のウイルスはまだ検出できないかもしれない。NATは費用がかかり、比較的裕福な西洋諸国でもその費用効果性に関してまだ議論の余地がある。

新しく出現した病原体と未知の病原体のリスク

血液バンクは、血液供給の安全性に対するリスクの出現・再出現について益々慎重になってきているが、検査は、事前の策を講じるのではなく、事後の処理であり、未知の病原体を検査することは不可能である。新しい病原体が確認される時までには、血液供給がすでに汚染されてしまっているかもしれない。残念ながら、そのような病原体は多くある。西ナイル・ウイルス(WNV)、クルーズ・トリパノソーマ、プラスモジウム spp、バベシア spp、パルボ・ウイルス B19、デングウイルス、変異型クロイツフェルト・ヤコブ病(vCJD)の病因となるプリオンが含まれる。ヒト・ヘルペス・ウイルス 8 (カボシ肉腫)、ボレリア(ライム病)、鳥インフルエンザ・ウイルスなどの他の病原体も輸血で伝染するかもしれない。

新たな病原体の危険性は、蚊由来のウイルスの顕著な地理的な広がりによって説明されている。米国で WNV によって生じた重度の神経学的疾患の発生はよく知られているが、それに加えて、以前アフリカやアジアでのみ生じたチキングニアウイルスがイタリアで 2007 年 9 月、突発的に発生した。血液供給経路に侵入する新生病原体や再出現病原のリスクを最小限にするために、新しい積極的な対策が必要である。

細菌検査の限界

細菌検査も完全であると言えるにはほど遠い。最初に陰性を検査する血小板の培養は、長期保存で陽性を検査できるが、それは細菌のスクリーニングが輸血由来の全ての細菌感染症を防げるわけではないことを示している。細菌検出法は血小板単位の検査合格リリースの遅れと保存期限の短縮を生じさせ、結果的に期限切れの率を増加させている。さらに、血液成分の細菌検査が陽性である場合、それはしばしばすでにリリースされて輸血されてしまっている。偽陰性の血小板もまだ生じており、致死的な敗血症の発症の原因になっている。

白血球に対する挑戦

白血球不活化法は、残存白血球と関連合併症のリスクを完全には取り除くことはできず、サイトメガロウイルス(CMV)とヒトT細胞好リンパ球ウイルス(HTLV)などの細胞関連ウイルスや潜在的に致死的な免疫輸血関連移植片対宿主病(TA-GVHD)からのリスクに抵抗力の無い患者をさらしてしまう。

血液の安全性を向上させるため、より良い技術が早急に必要である。

病原体不活化技術の見込み

病原体不活化は、血液成分輸血の安全性の向上に対する別の方法である。病原体不活化の優位性は溶剤洗浄処理の血漿分画の処理で示されてきた。しかし、この特別の処理はエンベロープを持たないウイルス（A型肝炎ウイルスなど）には効果が無い。既知及び未知の病原体に対する広範囲に有効な病原体不活化処理は、血液の安全性の現在と将来の要求を満たすだろう。しかし、血液の安全性の向上には相当の代償を払う必要がある。PRT技術の適用に要する費用には、ハードウェアと必要物品、他のバッグへの移し変えと混合物吸収装置の除去処理による血液成分抽出減少の可能性、より少ない修正カウント増加(CCI)や血漿タンパクで観察される成分の質、臨床的效果（より高い耐熱性や赤血球利用）への出費が含まれる。PRT技術を適用する前に、この装置の性能と対費用効果は、特定のPRT技術を適用することの全体的有益性が全般的経費を確実に超えないようにするために評価されなければならない（第9章参照）。

病原体不活化技術は、現在と将来の病原体への危険に対する保護となることによって血液供給の安全性をさらに増強し得る。

要約

- HIV感染症は、血液由来病原体からの血液成分への危険性を際立たせた。
- 現在の血液安全性手順により血液と血液成分はより安全なものになってきたが、リスクはまだ存在している。
- 血液の安全性を向上させるため、より良い技術が早急に必要である。
 - NATは全潜伏期間をなくす事ができない（異なる検査法には同じウイルスについて異なる潜伏期間がある）。
 - 新生病原体はいつも危険となる。
 - 細菌検査は細菌感染症の伝染を防ぐのに100%効果があるわけではない。
 - 残存白血球はまだ重度の有害反応を生じ得る。
- 病原体不活化技術は、現在及び将来の危険に対する保護となることによって血液供給の安全性をさらに増強し得る。

References

1. Brookmeyer R, Goedert JJ. Censoring in an epidemic with an application to hemophilia-associated AIDS. *Biometrics*. 1989;45:325-335.
2. Janatpour KA, Holland PV. A brief history of blood transfusion. In: Hillier CD, Silberstein LE, Ness PM, et al., eds. *Blood Banking and Transfusion Medicine: Basic Principles and Practice*. 2nd ed. Philadelphia, PA: Churchill Livingstone Elsevier; 2007:3-11.
3. Havig T. Where will pathogen inactivation have the greatest impact? *ISBT Science Series*. 2007;2:25-29.
4. Chamberland ME. Emerging infectious agents: do they pose a risk to the safety of transfused blood and blood products? *Clin Infect Dis*. 2002;34:797-805.
5. Soldan K, Barbara J. The risks of infection transmission by blood transfusions in England. *J Clin Pathol*. 1999;52:405-408.
6. Blajchman MA, Beckers EA, Dickmeiss E, et al. Bacterial detection of platelets: current problems and possible resolutions. *Transfus Med Rev*. 2005;19:259-272.
7. Chiu EKW, Yuen KY, Lie AKW, et al. A prospective study of symptomatic bacteremia following platelet transfusion and of its management. *Transfusion*. 1994;34:950-954.
8. Sullivan MT, McCullough J, Schreiber GB, Wallace EL. Blood collection and transfusion in the United States in 1997. *Transfusion*. 2002;42:1253-1260.
9. Andreu G, Morel P, Forestier F, et al. Haemovigilance network in France: organization and analysis of immediate transfusion incident reports from 1994 to 1998. *Transfusion*. 2002;42:1356-1364.
10. The Trial to Reduce Alloimmunization to Platelets Study Group. Leukocyte reduction and ultraviolet B irradiation of platelets to prevent alloimmunization and refractoriness to platelet transfusions. *N Engl J Med*. 1997;337:1861-1869.
11. Andreu G, Dewailly J. Prevention of HLA alloimmunization by using leukocyte-depleted components. *Curr Stud Hematol Blood Transfus*. 1994;60:29-40.
12. Anderson NA, Gray S, Copplestone JA, et al. A prospective randomized study of three types of platelet concentrates in patients with haematological malignancy: corrected platelet increments and frequency of non haemolytic febrile transfusion reactions. *Transfus Med*. 1997;7:33-39.
13. Enright H, Davis K, Gernsheimer T, et al. Factors influencing moderate to severe reactions to PLT transfusions: experience of the TRAP multicenter clinical trial. *Transfusion*. 2003;43:1545-1552.
14. Thaler M, Shamiss A, Orgad S, et al. The role of the blood from HLA-homozygous donors in fatal transfusion associated graft-versus-host disease after open heart surgery. *N Engl J Med*. 1989;321:25-28.
15. Wagner FF, Flegel WA. Transfusion-associated graft-versus host disease: risk due to homozygous HLA haplotypes. *Transfusion*. 1995;35:284-291.
16. Seghatchian J, de Sousa G. Pathogen-reduction systems for blood components: the current position and future trends. *Transfus Apher Sci*. 2006;35:189-196.
17. Pelletier JPR, Transue S, Snyder EL. Pathogen inactivation techniques. *Best Pract Res Clin Haematol*. 2006;19:205-242.
18. Moeremans K, Warie H, Annemans L. Assessment of the economic value of the INTERCEPT blood system in Belgium. *Transfus Med*. 2006;16:17-30.
19. Weusten JJ, Van Drimelen HA, Lelie PN. Mathematic modeling of the risk of HBV, HCV and HIV transmission by window-phase donations not detected by NAT. *Transfusion*. 2002;42:537-548.
20. Alter HJ, Stramer SL, Dodd RY. Emerging infectious diseases that threaten the blood supply. *Semin Hematol*. 2007;44:32-41.
21. Watson R. Europe witnesses first local transmission of chikungunya fever in Italy. *BMJ*. 2007;335:532-533.
22. Eder AF, Kennedy JM, Dy BA, et al. American Red Cross Regional Blood Centers. Bacterial screening of apheresis platelets and the residual risk of septic transfusion reactions: the American Red Cross experience (2004-2006). *Transfusion*. 2007;47:1134-1142.
23. Akahoshi M, Takanashi M, Masuda M, et al. A case of transfusion-associated graft-versus-host disease not prevented by white cell-reduction filters. *Transfusion*. 1992;32:169-172.
24. Visconti MR, Pennington J, Garner SF, et al. Assessment of removal of human cytomegalovirus from blood components by leukocyte depletion filters using real-time quantitative PCR. *Blood*. 2004;103:1137-1139.
25. Pennington J, Taylor GP, Sutherland J, et al. Persistence of HTLV-I in blood components after leukocyte depletion. *Blood*. 2002;100:677-681.
26. Roberts P. Resistance of vaccinia virus to inactivation by solvent detergent treatment of blood products. *Biologicals*. 2000;28:29-32.

第2章

Mirasol : プロセス

MIRASOL®

病原体不活化技術

Mirasol : プロセス

Mirasol 病原体不活化技術 (PRT) は、光と自然界に存在するリボフラビン (ビタミン B2) を用いて血液製剤中の病原体を除去し、白血球を不活化する技術である。リボフラビンは紫外線下で核酸と反応し、不可逆的な変化を引き起こす光増感剤として用いられる。なお、リボフラビンは薬剤ではなく、薬用効果を意図して導入される訳ではない。本技術は 40 年以上もの研究を経て開発されたものであり、化学、毒物学、体外および体内でのリボフラビンの核酸への光増感反応に関する膨大なデータ蓄積に基づいている。

リボフラビン

人体における役割

リボフラビンは人体に不可欠な栄養素で、牛乳、卵、パン、葉野菜など、多くの食材に含まれている (図 1)。平均的な成人の 1 日当たり推奨摂取量は 1.3 mg [男性]/1.1 mg [女性] (授乳中の女性は最大で 1.6 mg)。そうした栄養価と毒性に関する網羅的データの蓄積も、血液製剤への利用にとって好都合である。

リボフラビンは、数多くの生化学反応に係る重要なコエンザイムの前駆体となっている。遺伝毒性が無いことは体外で実証済みで、米国食品医薬品局 (FDA) により「一般に安全と認められる物質 (GRAS 物質)」に分類されている。

リボフラビンは人体の生化学プロセスにおいて重要な役割を果たす、必須ビタミンである。

リボフラビンの光化学反応

リボフラビンの光増感性が最初に発見されたのは 1932 年、Warburg 博士と Christian 博士による。リボフラビンによる核酸の光増感反応は 1976 年、Speck 博士らにより提唱された。可視光・紫外線下でのリボフラビン使用によるウィルスとバクテリアの不活化は、1960 年代と 1970 年代の研究により有効性が示唆されたが、さらに 1980 年代の研究によって、病原体除去、光増感剤反応、光活性化時の核酸融合・分解におけるリボフラビンの可能性が実証された。

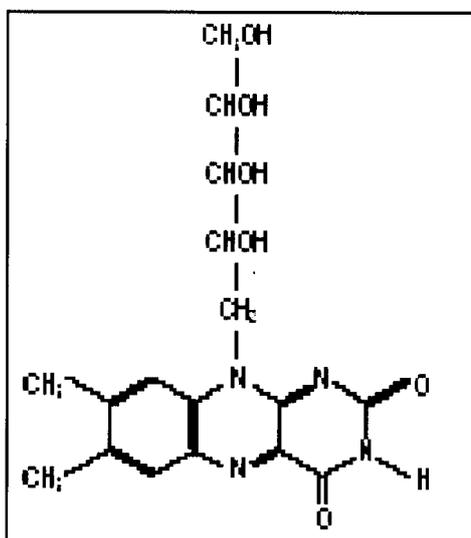


図 1. リボフラビン(ビタミン B2) 必須栄養素

リボフラビンの中性水溶液に自然光を当てると、リボフラビンはルミクロム (LC) に変化する。LC は人体におけるリボフラビン代謝分解物としても知られている。フラビン体の光分解生成物はすべて特定済みで、自然界におけるリボフラビン酵素分解の代謝産物の特色も特定されている。さらに、リボフラビンの光分解生成物 (主に 2'-キトフラビン、4'-キトフラビン、フォルミルメチルフラビン、LC の 4 つ) はすべて通常の代謝産物であり、未処理のアフェレーシス血小板にも含まれている。リボフラビンの代謝産物となり得るルミフラビン等は人体における通常の pH 環境では発生しない。

Mirasol PRT は 40 年以上もの研究成果に基づいて開発された技術である。

リボフラビンは 30 年以上も前から新生児黄疸の光線療法に用いられてきた。新生児に光を当てることで、黄疸の原因となるビリルビンを分解するだけでなく、新生児の血中に元から存在するリボフラビンを分解する療法であるが、臨床時における副作用の報告はこれまでもなく、治療後 9 年の経過を見たレトロスペクティブ分析でも問題は報告されていない。

現時点で商品化されている不活化システムの幾つかは、有害の可能性のある光増感物質を除去するための吸収装置 (CAD) を必要とする。それに対し、安全性が確立されたリボフラビンの場合、その光分解生成物も未処理の血液サンプル中に通常に存在するようなものであるため、処理後の血液製剤からこれらを除去・吸収することなく、そのまま投与することができる。

Mirasol 処理後の血液製剤は、リボフラビンとその光分解生成物を除去せずに投与できる。
†

反応メカニズム

Mirasol PRT システムは照射器 (および付属部品) とディスプレイの照射/保存キットから成る。ディスプレイキットは 35 ミリリットルのリボフラビン溶液と照射/保存用袋が付いている (図 2)。いずれも滅菌処理済である。

Mirasol プロセスでは、まず血液製剤にリボフラビンを混合した後に、265~370 nm 波長域の紫外線に短時間 (通常 10 分未満) さらす。紫外線照射により、DNA と RNA の複製を妨げる化学反応が起き、そうしてウィルス、バクテリア、その他真核細胞 (例えば、白血球) が不活化される。ゲノム核酸を持たない赤血球、血小板、血漿は影響を受けない。

リボフラビンと紫外線による核酸分解は、2 つの異なるメカニズムを通じて起きる (図 3)。

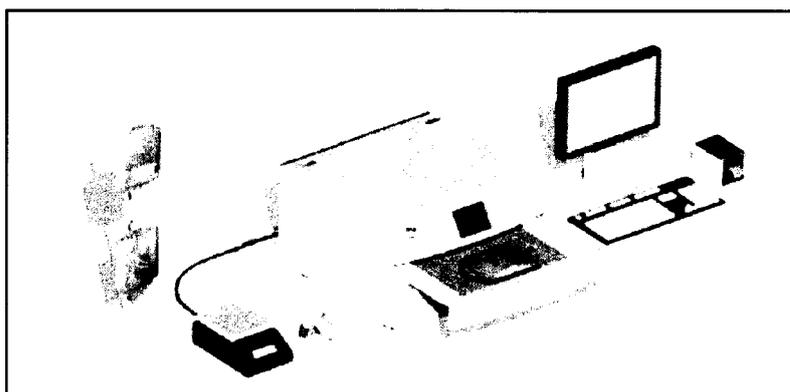


図 2. Mirasol PRT システム

主要部品: (A) 照射器、(B) 照射／保存用袋、リボフラビン溶液

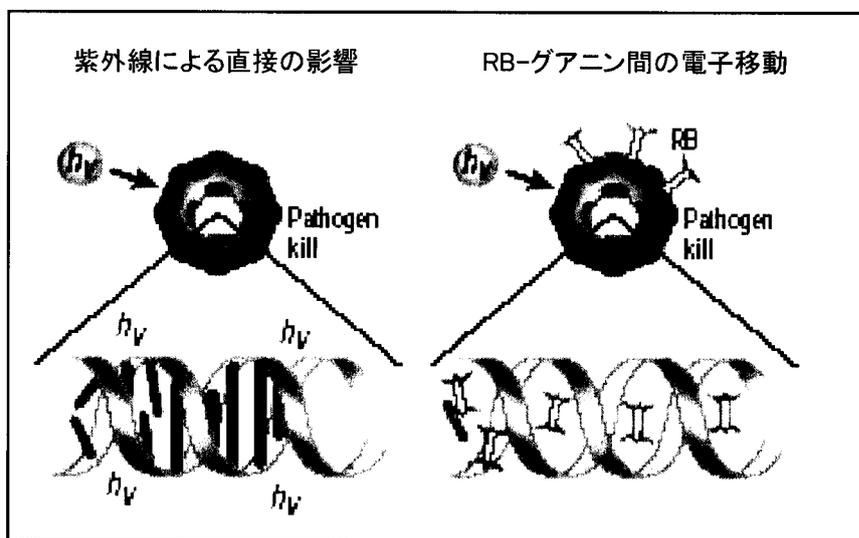
付属部品: (C) バーコード・リーダー、(D) 計り、(E) Mirasol システム管理用 PC、
(F) ラベル・プリンター

2つのメカニズムとは、

- ・ 紫外線独自の DNA 損傷効果
- ・ 光励起リボフラビンと核酸塩基対との接触による電子移動反応

Mirasol RPT は 2つの異なるメカニズムによって病原体を不活化する。

図 3. Mirasol PRT システムの 2つの主な反応



低波長光線の吸収によって、血液製剤中のウイルス、バクテリア、寄生生物、白血球の核酸が損傷する。

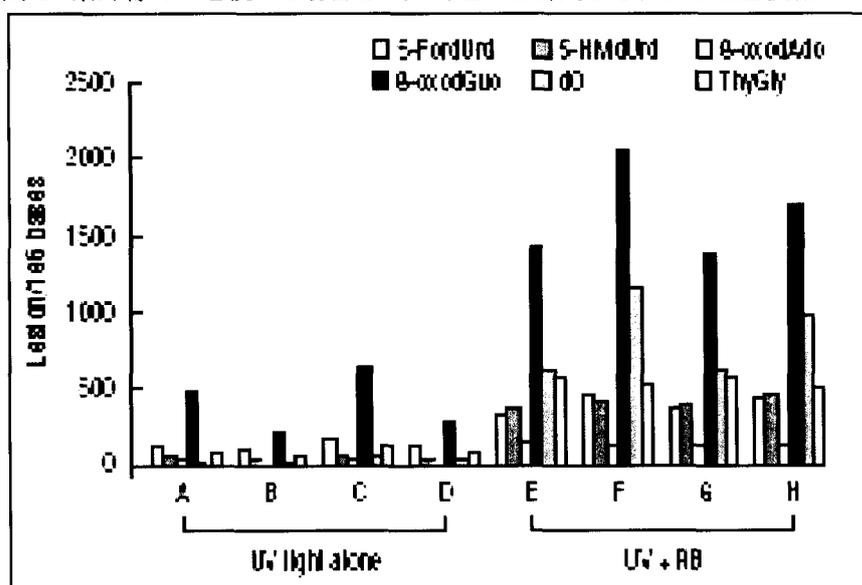
さらにリボフラビンと核酸との化学反応では、リボフラビン-グアニン間の電子移動反応によって、不可逆的な損傷が引き起こされる。

RB: リボフラビン UV: 紫外線

リボフラビン（Riboflavin）は光照射によって活性酸素種が発生する可能性もあるが、それは非特異的反応であるため望ましくない。Mirasol システムでは、処理前に袋を真空状態にし、未結合ではなく結合した状態でリボフラビンを活性化させる波長の光を選択することでこれを防ぐことができる。

リボフラビンは、塩基対（主にグアニン塩基対）の不可逆的な変形を引き起こすことで病原体の複製を阻止する。また、インターカレーション（挿入）等によって核酸と結合することも知られている。さらに、I 型、II 型の光化学反応のいずれでも DNA 連鎖を切断することが実証されている。

図 4. 紫外線のみを使った場合とリボフラビンを併用した場合の塩基損傷



各棒グラフは個別実験の数値。損傷のパターンは似ているが、リボフラビンを併用することで損傷数が大幅に増えていることがわかる。
RB: リボフラビン UV: 紫外線

つまり、本システムにおけるリボフラビン使用は、紫外線独自の滅菌効果を増強するだけでなく、病原体が紫外線の影響をより受けるような素地を作る効果（光増感効果）をもたらす。それによって、紫外線のみを使用した場合より多くの塩基損傷を引き起こし、またその損傷を不可逆的なものにする。紫外線のみの場合、損傷の一部は DNA の修復メカニズムにより無効化される。それに対し、2つのメカニズムを組み合わせた Mirasol PRT システムは、広範的かつ徹底的な病原体除去を可能にする（図 4）。

さらに、リボフラビンの光増感反応による微生物核酸の変性度合いについて検証を重ね、23 リボフラビンと光線への暴露がウイルス、バクテリア、寄生生物、白血球に及ぼす影響を評価した（第 4 章と第 5 章を参照）。

光増感剤としてリボフラビンを使用することで、紫外線のみを使った場合と比べて、より多くの不可逆的な塩基損傷を引き起こすことが出来る。不可逆的な塩基損傷は病原体を確実に死滅させる上で重要である。

要約

- ・ Mirasol PRT システムはリボフラビンと紫外線を用いる
- ・ リボフラビンは人体の生化学反応において重要な役割を果たす、必須ビタミンである
- ・ Mirasol PRT は 40 年以上もの研究成果を基に開発された
- ・ Mirasol 処理後の血液製剤は、リボフラビンとその光分解生成物を除去せずに投与できる
- ・ Mirasol RPT は 2 つの異なるメカニズムによって病原体を不活化する
- ・ 光増感剤としてリボフラビンを使用することで、紫外線のみを使った場合と比べて、より多くの不可逆的な塩基損傷を引き起こすことが出来る
- ・ 不可逆的な塩基損傷は病原体を確実に死滅させる上で重要である

† Mirasol PRT System for Platelets に対する現行の CE マーク規格認定による。

References

1. Kumar V, Lockertie O, Keil SD, et al. Riboflavin and UV-light based pathogen reduction: extent and consequence of DNA damage at the molecular level. *Photochem Photobiol*. 2004;80:15–21.
2. World Health Organization. Thiamine, riboflavin, niacin, vitamin B6, pantothenic acid, and biotin. In: *Vitamin and Mineral Requirements in Human Nutrition*. 2nd ed. 2004;Section 9.3.3:172.
3. Scientific Committee for Food (SCF) (2000). Tolerable upper intake level of vitamin B2. (Opinion expressed on 22 November 2000.)
4. Rivlin SR. Riboflavin metabolism. *N Engl J Med*. 1970;283:463–472.
5. Kale H, Hankumar P, Nair PM, Netravali MS. Assessment of the genotoxic potential of riboflavin and lumiflavin. *Mutat Res*. 1992;298:9–16.
6. United States Food and Drug Administration (FDA) Center for Food Safety and Applied Nutrition (CFSAN) Priority-based Assessment of Food Additives (PAFA). EAFUS: A Food Additive Database. Available at <http://vm.cfsan.fda.gov/~7Edms/efalus.html>. Accessed November 2007.
7. Warburg VO, Christian W. Über das neue Oxydationsstament. *Naturwissenschaften*. 1932;20:990–991.
8. Speck WT, Rosenkranz S, Rosenkranz HS. Further observations on the photo-oxidation of DNA in the presence of riboflavin. *Biochim Biophys Acta*. 1976;435:39–44.
9. Oster G, Bellin JS, Holmstrom B, et al. Photochemistry of riboflavin. *Experientia*. 1962;18:249–253.
10. Tsujita A, Okada Y, Uehara K. Photosensitized inactivation of ribonucleic acids in the presence of riboflavin. *Biochim Biophys Acta*. 1965;103:360–363.
11. Speck WT, Chen CC, Rosenkranz HS. In vitro studies of effects of light and riboflavin on DNA and HeLa cells. *Pediatr Res*. 1975;9:150–153.
12. Kuratomi K, Kobayashi Y. Studies on the interactions between DNA and flavins. *Biochim Biophys Acta*. 1977;476:207–217.
13. Korycka-Dahl M, Richardson T. Photodegradation of DNA with fluorescent light in the presence of riboflavin and photoprotection by flavin triplet-state quenchers. *Biochim Biophys Acta*. 1990;610:229–230.
14. Cairns WL, Metzler DE. Photochemical degradation of flavins. VI. A new photoproduct and its use in studying the photolytic mechanism. *J Am Chem Soc*. 1971;93:2772–2777.
15. Hardwick CC, Herivel TR, Hernandez SC, et al. Separation, identification and quantification of riboflavin and its photoproducts in blood products using high-performance liquid chromatography with fluorescence detection: a method to support pathogen reduction technology. *Photochem Photobiol*. 2004;80:609–615.
16. Sisson TR. Photodegradation of riboflavin in neonates. *Federation Proc*. 1987;46:1883–1885.
17. Olsen JH, Hertz H, Kjaer SK, et al. Childhood leukemia following phototherapy for neonatal hyperbilirubinemia (Denmark). *Cancer Causes Control*. 1996;7:411–414.
18. Goodrich RP, Edrich RA, Goodrich LL, et al. The antiviral and antibacterial properties of riboflavin and light: applications to blood safety and transfusion medicine. In: *Comprehensive Series in Photochemical & Photobiological Sciences*. 2006;6:83–113.
19. Martin CB, Willing E, Ruane P, et al. An action spectrum of the riboflavin-photosensitized inactivation of lambda phage. *Photochem Photobiol*. 2005;81:474–480.
20. Dardare H, Platz MS. Binding affinities of commonly employed sensitizers of viral inactivation. *Photochem Photobiol*. 2002;75:561–564.
21. Joshi PD. Ultraviolet radiation-induced photodegradation and ^{18}O , O_2 production by riboflavin, lumichrome and lumiflavin. *Indian J Biochem Biophys*. 1989;26:186–189.
22. Data on file. Navigant Biotechnologies LLC.
23. Goodrich RP, Edrich RA, Li J, et al. The Mirasol™ PRT system for pathogen reduction of platelets and plasma: an overview of current status and future trends. *Transfus Apher Sci*. 2006;35:5–17.

第3章

Mirasol による処理の安全面

MIRASOL®

病原体不活化技術

Mirasol による処理の安全面

血液に関する新しい安全技術に対する包括的な毒物学的評価は、その安全技術が輸血プロセスに悪影響を与えないことを実証するために不可欠である。そのため、Mirasol による処理は広範囲にわたって検査されている。紫外線に関連したリボフラビンの利用に関する大量の史料に加え、広範囲にわたる毒物学的検査によって血液成分の光化学処理の安全性が裏付けられている。

治療分野におけるリボフラビンのアプリケーション

必要不可欠なビタミンとしてのリボフラビン

リボフラビン（ビタミン B2）は 13 種類の必須ビタミンのうちの 1 つで、栄養補助食品および認可を受けた食品着色料として幅広く使用されている。リボフラビンは、欧州食品科学委員会（European Scientific Committee on Food¹）により認可されており、米国食品医薬品局（United States Food and Drug Administration）により GRAS（Generally Recognized as Safe: 一般に安全であると認められる）に分類されている。リボフラビンの RDI（Recommended Daily Intake: 1 日当たりの推奨摂取量）は、平均的な成人の場合約 1.3 mg/日（男性）および約 1.1 mg/日（女性）で、授乳中の女性の場合は最大 1.6 mg/日である。リボフラビン欠乏症に対する推奨薬用量は、平均的な成人の場合 ≤ 30 mg/日。リボフラビンの安全性は、経口投与、皮下投与、腹腔内投与および静脈内投与において実証されている。

新生児黄疸の治療におけるリボフラビン

リボフラビンおよびビリルビンの光吸収スペクトルがオーバーラップするため、光線療法が促進するビリルビンの除去により新生児黄疸の新生児が一時的にリボフラビン欠乏症になる可能性がある。そのため、1970 年代までは、このように体の弱い病人には光線療法を受けている間はリボフラビンを投与することが推奨されていた。

リボフラビンおよび新生児に対する直接光線療法の毒性に関する可能性について解説されてきたが（光の存在する場で発生する可能性のある DNA への作用に関する理論的な考察および簡略化された試験管内検査システムにおける実験結果に基づく）、臨床的環境における副作用（AE）のレポートはまだない。しかし実際に、光線療法を受けた 55,000 人を超える幼児に関する大規模な遡及的分析により、平均 9 年間の追跡調査期間における小児白血病の発生率が過剰ではないということが証明され、リボフラビンの投与は、広範囲にわたる臨床治療で利用されている。

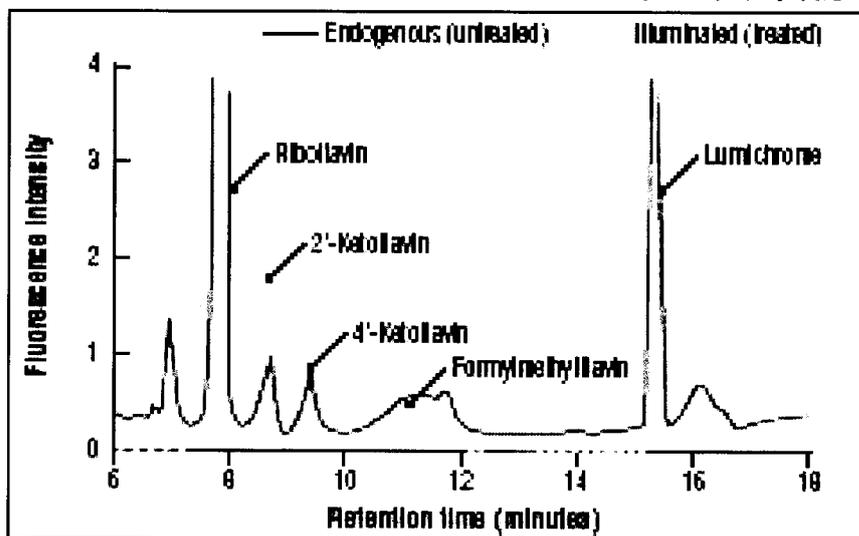
リボフラビンの安全性は、体の弱い人々に対する使用など、長年にわたる経験を通じて最終的に証明された。

リボフラビンの光化学

添加剤を利用した血液に関する新技術の導入における重大な懸念事項は、その添加物を輸血用血液に入れることによる副作用の可能性である。理論上は、添加剤がもたらすリスクが状況によっては血液成分により病気感染が発生するリスクを上回る可能性もある。Mirasol 処理で利用される添加剤は、自然に発生する物質であるリボフラビンであり、リボフラビンは、安全であると知られているにもかかわらず、光の照射を受けて多くの光化学反応の生成物へと薄められ、これらの生成物も輸血用血液に入れられる可能性がある。リボフラビンの 4 つの主要な光化学反応生成物（2'-ケトフラビン、4'-ケトフラビン、フォルミルメチルフラビンおよびルミクロム）は、分離され、その特性を示す。これらは主に親モジュールにおけるリビチル側鎖の分解を通じて形成される。光化学反応の生成物はそれぞれ標準的な代謝産物であり、各生成物は未処理のアフェレーシス血小板から検出される。

献血されたばかりで照射されていない血液成分にこれらの光化学反応の生成物が存在するという事実は、リボフラビンを基盤とする病原体不活化処理の利用によって輸血用血液に新たな化学物質が取り入れることはないということを示している（図 1 参照）。さらに、これらの生成物はすべて人間の血液からなる天然成分であるため、Mirasol 処理後にそれらを血液成分から取り除く必要はないということに注意することが重要である。

図 1. 処理済の血液および未処理の血液中のリボフラビンおよび光化学反応の生成物



未処理の血小板におけるこれらの生成物の濃度は Mirasol 処理済血小板の濃度よりも低いですが、処理済血液成分の濃度は患者の血流に注入される際に 16~20 倍薄められ、循環血液中に自然発生したものに対して処理済の血小板の濃度を著しく減少させる。さらに別の光化学反応生成物であるルミフラビンが形成される可能性についても、懸念されてきた。これ

は非常に高い（非生理学的な）pH（9-3）、言い換えれば標準的な血液および血液成分の pH をはるかに超える pH 値においてのみ形成される。

ルミフラビンによりもたらされたりボフラビンの遺伝的な作用の可能性に関するレポートがあるが、これはその後の調査において再現されていない（広範囲にわたる毒物学的なデータベースの研究に基づく）。さらに、ルミフラビンは一般に普及している食品にも見られる。Mirasol 処理の毒性評価中に、ルミフラビンの活性調査は陰性だった。高性能液体クロマトグラフィー（HPLC）または質量分析法のいずれにおいても、血液成分からルミフラビンは検出されなかった。

リボフラビンが光を浴びた後に形成される光化学反応生成物は安全であり、血液や血液成分中にも見ることができる。

リボフラビンは極めて安全なプロファイルを示す

Mirasol PRT System におけるリボフラビンの暴露

ドナーの成分に対して Mirasol 処理を使用することにより、潜在的にレシピエントをリボフラビンおよびその光化学反応生成物の両方にさらす可能性がある。臨床的環境において起こりうるレシピエントに対するリボフラビンの暴露は、平均的なレシピエントの体重が 70kg、標準的なリボフラビンの溶解濃度が 500 μ M、平均的なリボフラビンのフォトコンバージョンが 18%、および平均的なリボフラビンの溶解体積が 35 mL であるという前提のもとで、輸血される成分単位当たり 0.077 mg/kg と算出されている。

リボフラビンのLD₅₀を定義する

人体への使用を目的とするその他の製品と同様に、LD₅₀を特定することは重要である。LD₅₀とは、試験の対象となる集団の 50%に死をもたらす服用量である。LD₅₀は重要だが、LD₅₀および患者に投与される薬用量の比率はさらに重要である。この比率が大きければ大きいほど、その製品は安全になるのである。

リボフラビンのLD₅₀を測定するため、複数の調査が行われてきた（Reddy et al.19 に概要記載）。一部の調査においてはLD₅₀の測定が可能だったが、その他の多くの調査では極めて高用量（10,000 mg/kgまたはそれ以上）の場合であっても不可能であった（表 1 参照）。輸血ごとの暴露レベルである 0.077 mg/kgを、報告されているマウスの静脈内のリボフラビンに対するLD₅₀、50-100 mg/kgと比較すると、その安全性は少なくとも 649 倍（50/0.077）になる。

表 1. リボフラビンのLD₅₀を確立するための調査概要

調査の種類	種	経路	結果
急性	ラット	腹腔内	LD ₅₀ = 560 mg/kg ⁷
急性	ラット	皮下	LD ₅₀ >5000 mg/kg ⁷
急性	ラット	経口	LD ₅₀ >10,000 mg/kg ⁷
急性	マウス	腹腔内	LD ₅₀ >340 mg/kg ¹¹
亜慢性 (4 日間)	マウス	腹腔内	1000 mg/kg/日 ¹¹ で死亡率 2/6

LD₅₀: 試験の対象となる集団の 50%に死をもたらすと推量される服用量。

表 2. Mirasol 処理済血液成分に対して行われた毒性評価の概要。

対象	方法	露出	結果
急性毒性	ラットおよび犬の雄および雌に対する 2 件の急性毒性調査: 死亡率、毒性の兆候、血液学、臨床化学、食料消費、一般行動および体重増加の観察。	IV 注入	毒物学的に重要な結果はなし
亜慢性毒性	犬の雄および雌に対する調査: 死亡率、毒性の兆候、臨床化学、血液学、体重、食料消費、組織の病理学および組織病理学の観察。	1 週間に 6 日間、13 週間以上投与、カテーテルと併せて IV 注入	毒物学的に重要な結果はなし
生殖毒性	ラットの胎児の発育: 臨床的観察、体重および食料消費。20 日目に検死。着床、黄体、再吸収および胎児の調査。	懐胎中に IV 注入 6~17 日	発達毒性は観測されなかった
遺伝毒性	1. 細菌を使用した復帰突然変異試験法 (Ames 試験): 細菌における生体外遺伝子突然変異 2. CHO 細胞における染色体異常: 哺乳類の細胞における生体外染色体異常誘発 (染色体の崩壊) 3. 哺乳類赤血球小核試験: 大腿部から吸引された生体内骨髓に対する染色体異常誘発試験	Mirasol 処理済血小板およびルミクロムに対する Ames 試験 IP 投与	処理済血小板または制御ヒト血小板あるいはルミクロムに対する Ames 試験では変異原性は観測されなかった。 Mirasol 処理済ヒト血小板は、すべての遺伝毒性実験において陰性の結果を出した。
新抗原性試験	1. 生体外実験: 血小板および血漿タンパク質に対する 14C-リボフラビン結合の評価および血小	貯蔵してから 1 日後および 5 日後のキャプチャ-P 試験	血小板または血漿成分に対するリボフラビンの結合およびその光化

	<p>板に対する IgG の結合を評価するためのキャプチャ-P 試験</p> <p>2. オクタロニー法を利用した生体内試験: 制御および Mirasol 処理済ヒト血小板を投与したうさぎの免疫反応の比較抗体産生の評価</p>		<p>学反応生成物は検出されなかった</p> <p>新抗原形成の兆候はなかった</p>
血液適合性試験	<p>1. 溶血試験: 人間の血液に直接接触</p> <p>2. 血小板の機能に関する調査: 第 6 章に記載されている一連の実験において評価されている</p>	該当なし	<p>溶血は観測されなかった</p> <p>第 6 章の結果を参照</p>
薬物動態試験	<p>雄の CD ラットの生体内評価: 尿および糞便、全血および血漿の事前投与の検査、および実験の最後に、検死後に収集された皮膚、尾の皮膚、小腸、大腸、脾臓、腎臓、肝臓、リンパ系組織および骨髄の検査</p>	単回投与 IV 注入	<p>投与された放射能の約 95%が投与後 260~275 時間以内に除去された</p> <p>曲線下の観測範囲に基づき、全体的な暴露は高いほうから順番に以下のとおり: 肝臓>腎臓>大腸>小腸>脾臓>大腿部の骨髄>リンパ管</p>
浸出物および抽出物	<p>血小板成分に直接入り込む可能性のある混合物を特定および定量化するために行われる分析: ガスクロマトグラフィーおよび質量分析法を利用</p>	該当なし	<p>治療状態にさらされる前後で著しい違いはなかった。</p> <p>FTIR により Mirasol 処理済または未処理の血小板抽出物から高分子材料は検出されなかった。Mirasol 処理済の血小板抽出物から検出されたすべての金属は、未処理の血小板抽出物にも同様な量だけ含まれていた</p>

CD: Cri:CD® (SD)ラット; CHO: チャイニーズハムスター卵巣; FTIR: フーリエ変換赤外分光; IgG: 免疫グロブリン G; IP: 腹腔内; IV: 静脈内; NA: 該当なし。

現時点では、リボフラビンの「中毒作用が発生しないレベル」は依然として不明である。従って、Mirasol 処理済血液成分の輸血によりもたらされるリボフラビンおよびその光化学反応生成物への暴露レベルが何らかの中毒作用を引き起こすということを予測する根拠はない。てんかん発作の感作および発作を増大させる可能性について、数ヶ月（たとえば>5 mg/kg/日を 6 ヶ月以上）に渡って毎日リボフラビンを高用量投与した後に個別の題材で報告されてきたが、これらのレポートはピアレビューを受けた資料により実証されていない。20 体の人体における高用量の経口投与および親の服用に関するその他のレポートにおいて、毒性作用は記載されていない。実際に、6 ヶ月以上>200 mg/日を安全に経口服用している人々に関するレポートがあり、標準的な服用量を超えると速やかに排出されるようである。

Mirasol PRT System の安全プログラム

リボフラビンの安全性については広範囲に渡って研究され、文書によっても証明されているが、Mirasol 処理におけるリボフラビンの使用はさらなる評価を保証した。そのため、国際標準化機構（ISO: International Organization for Standardization）のガイドラインに従って Mirasol 処理に対して広範囲にわたる臨床前毒性評価が実施された。大部分の調査レポートにおける被験物質および制御物質は、Mirasol 処理済血液成分または未処理の血液成分だった。一部の調査では、混じりけのないリミクロム（リボフラビンの主な光化学反応生成物）または光分解されたリボフラビン溶液が使用された。Mirasol 処理済血液成分の検査では、リボフラビンおよび制御された光照明の追加から処理後の血液成分に対する存続可能性の評価まで、全工程を検査した。評価には、細胞および血漿蛋白質への作用、リボフラビン本体およびその光化学反応生成物の毒性、処理に使用される医療用プラスチック製コネクタおよびバッグなどのその他のシステムコンポーネントに対する影響が含まれていた。毒性の評価に使用される方法およびこれらの試験の結果の要約は、表 2 に記載されている。

すべての調査において、ガンマ線照射の Mirasol 処理済血液成分を使用した結果は、ガンマ線非照射の Mirasol 処理済血液成分から得られる結果と同一だった。Mirasol 処理済血液成分に対して実現可能な最大限の暴露を伴う投与を繰り返した後でさえも、主な生理的システムの機能に対する有害な影響の兆候または標的臓器における毒物の生成はなかった。試験により、Mirasol 処理済血液成分または蛋白質には検出可能な抗原は存在せず、調剤によって抗体または自己抗体の形成を促すことはないということが明らかとなり、また、毒性試験により、あらゆる遺伝毒性のリスクや妊娠中の動物および胎児の発達に関する中毒作用が排除された。IV を注入した場所の部分的な耐性も良好であることが分かった。処理済血小板の調剤により、細胞毒性が示されたり、システムで使用される容器およびコネクタから不要な物質の浸出が発生したりすることはなかった。亜慢性試験やその他の試験における腫瘍発性効果を与える可能性の欠如や、リボフラビンおよびその光化学反応生成物

の遺伝毒性および化学的性質の欠乏により、さらなる発癌性試験の必要性が除去された。歴史的な研究におけるリボフラビンの発癌性試験はこれらの調査結果と一致しており、また、この複合物は発癌性物質の可能性がないことを示している。

リボフラビンおよびその光化学反応生成物は、Mirasol 処理後に血液成分から除去する必要がないため、単純で簡単に使用することができる。

上記の調査結果は、Mirasol 処理を行った場合でも輸血する前に処理済血液成分からリボフラビンおよびその光化学反応生成物を除去する必要がないという事実を示す。これは、バッグの運搬および/または複合物の除去処理による成分の損失を最小限に抑え、病原体不活化処理が大いに必要とする簡易性を提供する。

要約

- ・リボフラビンは必要不可欠なビタミンである。
- ・リボフラビンの安全性は、体の弱い人々に対する使用を含む長年にわたる経験を通じて最終的に証明された。
- ・包括的な臨床前の毒性に関するプログラムが実施され、リボフラビンおよびその光化学反応生成物の優れた安全プロファイル、およびそれらの Mirasol 処理への使用の適合性が証明された。
- ・Mirasol 処理済成分を受容する患者に対するリボフラビンの予想される暴露は、輸血される血液成分の単位当たり 0.077 mg/kg である。この服用量は、報告されている LD₅₀ の最低値よりも少なくとも 649 倍低くなっている。
- ・リボフラビンが照射された後に形成される光化学反応生成物は安全であり、血液および血液成分中に自然に存在する。
- ・安全性に関する調査により、Mirasol 処理後に血液成分からリボフラビンおよびその光化学反応生成物を除去する必要がなく、病原体不活化処理が簡易化されているということが裏付けられた。
- ・毒性に関するプログラムが好ましい結果をもたらしたことにより、広範囲に渡る臨床試験プログラムの実施が可能になった。

Mirasol PRT System for Platelets の現在の CE マーク規格認定に準じる。

References

1. Scientific Committee for Food (SCF) (2000). Tolerable upper intake level of vitamin B2. (Opinion expressed on 22 November 2000.)
2. US Food and Drug Administration. Department of Health and Human Substances. Direct Food Substances Affirmed as Generally Recognized as Safe; Riboflavin. 21 CFR 184.1635. 2001.
3. World Health Organization. Thiamine, riboflavin, niacin, vitamin B6, pantothenic acid, and biotin. In: *Vitamin and Mineral Requirements in Human Nutrition*. 2nd ed. 2004;Section 9.3.5:172.
4. Martindale W, Sweetman SC, eds. *The Complete Drug Reference*. 33rd ed. London: Pharmaceutical Press; 2002:1386.
5. Urna K, Grestin JG. Studies on the toxicity and pharmacology of riboflavin. *J Pharmacol*. 1942;76:75-80.
6. Studer A, Zbinden G, Uehlinger E. Die pathologie der avitaminosen und hypervitaminosen. In: Buchner F, Letterer E, Roulet F, eds. *Handbuch der Allgemeinen Pathologie*. Berlin: Springer Verlag; 1962 (Band III):734-987.
7. Muñoz N, Hayashi M, Bang LJ, et al. Effect of riboflavin, retinol, and zinc on micronuclei of buccal mucosa and of esophagus: a randomized double-blind intervention study in China. *J Natl Cancer Inst*. 1987;79:667-691.
8. Hayashi M, Kishi M, Sofuni S, et al. Micronucleus tests in mice on 39 food additives and eight miscellaneous chemicals. *Food Chem Toxicol*. 1988;26:487-500.
9. Sisson TR. Photodegradation of riboflavin in neonates. *Fed Proc*. 1987;46:1883-1885.
10. Gromisch DS, Lopez R, Cole HS, et al. Light (phototherapy)-induced riboflavin deficiency in the neonate. *J Pediatr*. 1977;90:118-122.
11. Speck WT, Rosenkranz HS. Phototherapy for neonatal hyperbilirubinemia - a potential environmental health hazard to newborn infants: a review. *Environmental Mutagenesis*. 1979;1:321-336.
12. Olsen JH, Hertz H, Kjaer SK, et al. Childhood leukemia following phototherapy for neonatal hyperbilirubinemia (Denmark). *Cancer Causes Control*. 1996;7:411-414.
13. Treadwell GE, Cairns WL, Metzler DE. Photochemical degradation of flavins. V. Chromatographic studies of the products of photolysis of riboflavin. *J Chromatogr*. 1968;35:376-388.
14. Cairns WL, Metzler DE. Photochemical degradation of flavins. VI. A new photoproduct and its use in studying the photolytic mechanism. *J Am Chem Soc*. 1971;93:2772-2777.
15. Oka M, McCormick DB. Urinary lumichrome-level catabolites of riboflavin are due to microbial and photochemical events and not rat tissue enzymatic cleavage of the ribityl chain. *J Nutr*. 1985;115:496-499.
16. Hardwick CC, Herivel TR, Hernandez SC, et al. Separation, identification and quantification of riboflavin and its photoproducts in blood products using high-performance liquid chromatography with fluorescence detection: a method to support pathogen reduction technology. *Photochem Photobiol*. 2004;80:609-615.
17. Kale H, Hanikumar P, Nair PM, et al. Assessment of the genotoxic potential of riboflavin and lumiflavin. A. Effect of metabolic enzymes. *Mutat Res*. 1992;298:9-16.
18. Huang R, Choe E, Min DB. Kinetics for singlet oxygen formation by riboflavin photosensitization and the reaction between riboflavin and singlet oxygen. *J Food Sci*. 2004;69:C726-C732.
19. Reddy et al. *Transfusion*. Manuscript in press, April 2008.
20. BBRPA. Riboflavin and its Derivatives: Toxicity Profile. 1990:1-7. Available at: <http://www.bibra-information.co.uk> Accessed 28 November 2007.
21. Fouty B, Freman F, Reeves R. Riboflavin to treat nucleoside analogue-induced lactic acidosis. *Lancet*. 1998;352:291-292.
22. Schoenen J, Jacquy J, Lenaerts M. Effectiveness of high-dose riboflavin in migraine prophylaxis: a randomized controlled trial. *Neurology*. 1998;50:466-470.
23. Luzati R, Del Bravo P, Di Perri G, et al. Riboflavin and severe lactic acidosis. *Lancet*. 1999;353:901-902.
24. Expert Group on Vitamins and Minerals. Safe Upper Levels for Vitamins and Minerals. May 2003. Available at: <http://www.food.gov.uk/multimedia/pdfs/vitamin2003.pdf> Accessed 23 November 2007.
25. Zempleni J, Galloway JR, McCormick DB. Pharmacokinetics of orally and intravenously administered riboflavin in healthy humans. *Am J Clin Nutr*. 1996;63:54-66.
26. International Organization for Standardization. ISO 10993-1:2003.

第4章

病原体不活化の性能

MIRASOL®

病原体不活化技術

病原体不活化の性能

ウイルス、細菌および寄生虫の一般および代表的な集団に対する、Mirasol PRT Systemの有効性が広範囲にわたって評価されてきた。

病原体不活化の評価

血漿から派生する生物薬剤学における病原体不活化の基準は定着しており、それに相応して血液成分における病原体不活化の評価に採用されてきた。病原体不活化の範囲は、通常「ログ・リダクション」に置き換えて表される。これは、 10^x mL^{-1} の単位で表される始点力価から、同様に 10^x mL^{-1} の単位で表される処理後の力価を引いたものとして報告されている。サンプルの容量は処理の前後で一定であるため、容量の単位は相殺され、レポートにあるログ・リダクション値が導き出される。たとえば、サンプルの始点力価が mL につき 10^6 個のウイルス粒子で、処理後の力価が mL につき 10^2 個のウイルス粒子である場合は、報告されるログ・リダクションは 10^4 または4ログになると推量される。これは、ウイルスのレベルが99.99%減少することに相当する。値はログ単位で報告されるため、100%減少することはない。

ログ・リダクション調査の結果を解釈する際には、実験的方法論を理解することが非常に重要である。

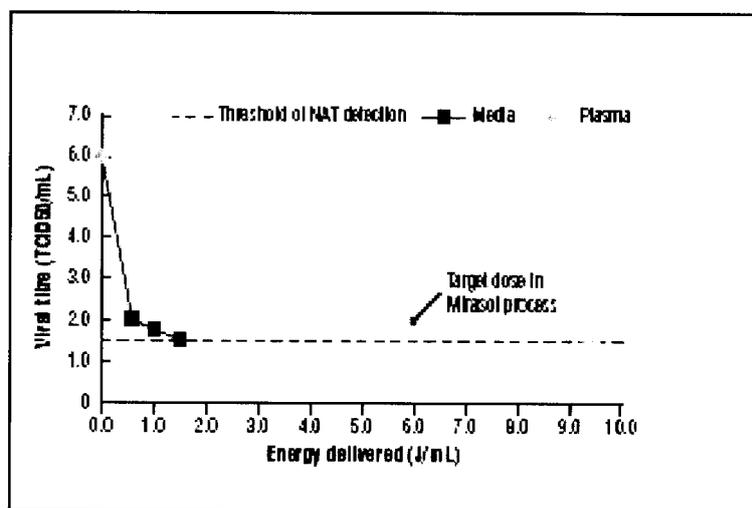


図1. 血漿および媒体における脳心筋炎 (EMC)ウイルスの不活化動力学: Mirasol処理利用時のウイルス不活化率。

たとえば、実験に使用される媒体は、実験結果に多大な影響を与える可能性がある。病原体不活化の比率および範囲のどちらとも、媒体および血漿の間で大きく変化する (図1参照)。Navigant Biotechnologies LLCにより実施された特異ウイルス性因子、細菌性因子、寄生性因子および白血球因子に対する効能に関するあらゆる調査は、利用規格に適合する条件の下で血液成分に対して実施されていることに注意することが重要である。

さらに、ログ・リダクションの値は関連する臨床状況に分類される必要がある。図2は代表的なウイルス感染の経時変化を表している。感染の初期段階、特に潜伏期間における病原体不活化が重要であることは明白である。感染の段階におけるウイルス力価は低い、それでもなお十分に感染を引き起こす可能性があり、既存の分析では検出できない場合がある。反対に、ウイルス血症が最大限の間は明白な症状が表わされる可能性が高く、ドナーに提供させないようにするほどだ。表1はウイルス性病原体に関するウイルス血症の様々な段階におけるウイルス力価の要約を示している。

図2. 代表的なウイルス血症期間の概要図

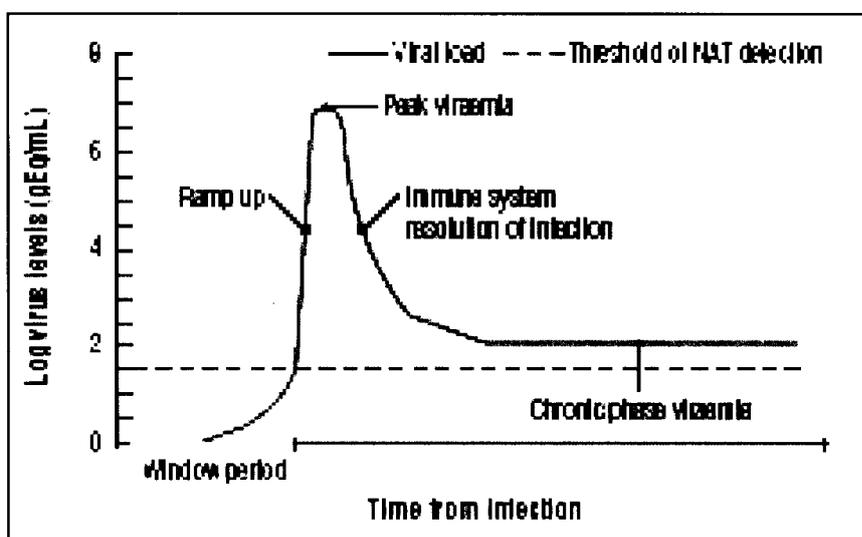


表1. 輸血製剤のウイルス汚染レベル

作用因子	感染段階	ウイルス血症の最大値
HIV、HCV、HBV	WP w/MP-NAT WP w/SD-NAT WP wo/NAT 慢性感染症	<10 ³ <10 ¹ 10 ⁶ ~10 ⁸ 10 ⁴ ~10 ⁶
CMV、EBV HTLV	WP 慢性感染症	10 ⁴ ~10 ⁶ <10 ² ~10 ⁴
パルボ・ウイルス	WP 慢性感染症	10 ⁸ ~10 ¹² <10 ² ~10 ⁴

†mLまたは 10⁶ PBMCごとのgEq。

CMV: サイトメガロ・ウイルス; EBV: エプスタインバーウイルス; gEq: 核酸相当数; HBV: B 型肝炎ウイルス; HCV: C 型肝炎ウイルス; HIV: ヒト免疫不全ウイルス; HTLV: ヒト T 細胞性白血病ウイルス; MP: ミニプール; NAT: 核酸試験; PBMC: 末梢血単核細胞; SD: シングルドナー; w: あり; wo: なし; WP: 潜伏期間。

病原体不活化処理の有効性を明確にするために必要とされる要件や性能限界を、完全に説明することのできる血液成分のウイルス不活化はない。また、ウイルス不活化の有効性が、ウイルス血症が最大限の時に、すべてのウイルスに見られるレベルに達していない場合でも、それが病気感染の可能性を減少させることのできない方法であるということにはならない。

ウイルス因子に関して重要な点は、その測定方法である。

すべての結果において、私たちは mL ごとの核酸相当数 (gEq) について報告されているウイルスのレベルを示す。これは、一般に採用されている NAT 方法論でスクリーニングされる特異遺伝子配列に基づくサンプルにおいて検出される粒子の数と一致する。この特異遺伝子配列が存在するという事は、ウイルス粒子またはウイルス粒子の一部が存在するということを意味し、すなわちそれは病気の指標になる。しかし、このレベルが必ずしも感染性ウイルス粒子の存在にそのまま結びつくわけではない。たとえば、このウイルス特有の特異遺伝子配列に基づいて粒子とみなされるウイルスは、完璧なゲノムを持っているかもしれないが、宿主細胞および病気の伝染に結合するために必要なウイルス・エンベロープ蛋白質が欠如している。そのため、私たちが行ったようなウイルス因子の測定は、サンプルに残されたウイルスの伝染力を大幅に過大評価する可能性がある。

以下のテキストに挙げられている実験では、ログ・リダクション因子は医薬品委員会 (CHMP: Committee for Medicinal Products for Human Use、以前は Committee for Proprietary Medicinal Products [CPMP]) および US FDA のガイドラインに従って算出された。

ウイルスの不活化研究

ウイルスの選択

調査用の病原体は、米国血液銀行協会 (AABB: American Association of Blood Banks) の病原体優先順位リスト、WHO、国際輸血学会 (ISBT: International Society of Blood Transfusion)、および CHMP のガイドラインに基づいて選択された。CHMP は、欧州医薬品審査庁 (EMA: European Medicines Agency) 向けに人体に利用するための医薬品に関するあらゆる質問に対する見解を準備する責任がある。CHMP のガイドライン 4 は、ク

リアランス評価および処理特性調査のためにはウイルスの 3 つのカテゴリについて詳しく調査することを勧めている：

- ・ 関連ウイルス言い換えれば、細胞基質または生産処理に使用されるその他のあらゆる試薬または物質を汚染することで知られている、またはその可能性のある実際のウイルスあるいは同じ種の一種
- ・ 特異モデルウイルス言い換えれば、ウイルスとして知られているまたはその疑いがあるものと密接に関連するウイルスおよび物理化学特性を備えたウイルス
- ・ 非特異モデルウイルス

特異モデルウイルスは、関連ウイルスが入手不可能な場合、または研究室の状況下で適切に維持することができない場合に使用される。非特異モデルウイルスは、一般的にウイルスを除去および／または不活化するためのシステムの能力の特性を示すため、すなわちクリアランス処理の強固さの特性を示すために使用される。ウイルスクリアランス特性に関する調査は、異なる物理化学特性を備えた非特異モデルウイルスを使用して実施されなければならない。

Mirasol 処理は CHMP ガイドラインに含まれる様々なウイルスについて評価されてきた。

ウイルス不活化の調査

Mirasol PRT System は最初に優先純度の高いウイルスに対する不活化について評価される。最初に調査対象となったウイルスは、ヒト免疫不全ウイルス (HIV)、豚パルボ・ウイルス (PPV; ヒト B19 パルボ・ウイルスのモデルとして[B19]) および西ナイル・ウイルス (WNV) である。さらなる詳しい調査により、CHMP が推奨するその他のクラスのウイルスについても不活化能力が評価されている。完了済みのウイルス・ログ・リダクション調査の結果の要約は、表 2 に記載されている。

すべてのウイルス不活化調査は、Trima®アフェレーシス装置を使用したアフェレーシスにより収集されたシングルドナー血小板成分を使用して実施された。サンプルはMirasol処理の前にスパイクされる。多くの場合、血小板成分は直接ウイルスにスパイクされ、例外はすべて下記に記載されているが、サンプルは、ログ・リダクション値を計算するために使用される最初および最後のウイルス力価を得るために、照射直前および直後に試験される。感染培養液は加湿されたCO₂ 5% の培養器の中で7日間 37°Cで培養され、細胞病理学的効果について毎日検査される。ログ・リダクション結果は、感染性に関する標準的な生体外検定法により取得される (TCID₅₀)。† 上記に記載されているように、核酸相当数により定量化された高度なウイルス力価を含む溶液には、病気を伝染させることのできるウイルス粒子はわずかしか存在しない可能性がある。そのため、組織培養感染検査はウイルス因

子が病気を伝染および発生させる能力の間接的測定方法として使用される。

次の試験は、これらの優先度の高いウイルス、HIV、B19—モデルとして PPV を使用—および WNV、および現在の血液の安全性に関する技術に特別な課題を提示する他の 2 つの重要な病原体 (A 型肝炎ウイルス [HAV] および サイトメガロ・ウイルス) に関する、現在完了済みのウイルス不活化調査の主な結果を要約している。

‡ TCID50: 組織培養検査 (ウイルス因子が病気を伝染および発生させる能力の間接的測定方法) で測定される感染性のウイルス因子の数

ヒト免疫不全ウイルス (HIV)

Mirasol 処理は様々なウイルスの型に対して評価された。無細胞の HIV および細胞を有する HIV に対してシステムを評価するために、HIV に感染しているリンパ球 (H9 細胞) を使用して準備されたサンプルが使用された。これらの細胞には、活発に複製を行ったり、成長媒体中で制限なく出芽しているなどの様々な型のウイルスが含まれている。プロウイルス型である細胞内 HIV (HIV_i) に対する試験には、ACH-2 感染細胞が利用される。HIV_i は、感染細胞のゲノムに統合されるウイルスの型である。AXH-2 感染細胞は、非複製で感染性のあるウイルス・ゲノムを含むリンパ細胞に血液製剤が感染している可能性のある場合の代表的なものである。Mirasol 処理は、すべての型のウイルスのウイルス力価を効果的に削減し、4.5~5.9 log/mL のログ・リダクション値を実現する (表 2 参照)。

Mirasol 処理は HIV の細胞内および細胞外の両方の型のウイルス力価を効果的に削減する。

ヒト B19 パルボ・ウイルス (B19)

B19 はプールされた血漿または血漿派生物の一般的な汚染物質で、20,000 人に 1 人のドナーの血液に存在すると予測されており、この値は流行期間には 260 人に 1 人にのぼる。この事実にもかかわらず、B19 は標準的な血液スクリーニング法の一部として定期的に試験されていない。人体におけるその存在は、免疫不全の被験者における骨髓機能不全および妊娠第二期の女性の自然流産と関連してきた。CHMP のガイドライン⁴に従い、Mirasol 処理は特異モデルウイルス、豚パルボウイルス (PPV) を使用して評価された。>5 log/mL の削減値が達成された (表 2 参照)。

Mirasol 処理の結果として、ヒト B19 の特異モデルウイルスである PPV の力価の大幅な (>5 log) 削減に繋がる。

西ナイル・ウイルス(WNV)

WNV は、人間に病気や死をもたらす可能性のある蚊媒介性のウイルスである。2002 年のアメリカにおける流行期間中の輸血に関連した WNV 感染の伝染は、WNV ウイルス血症用に献血された血液のスクリーニングのための核酸試験 (NAT) 検定法の急速な発展を促した。試験が可能な一方で、「偽」陰性の結果に関するレポートがあり、感染をもたらしてきた。WNV (ATCC #VR-1510) に血小板濃厚液が追加され、mL 当たり $7.06 \pm 0.26 \log \text{TCID}_{50}$ の初期力価を達成した。

照射前および照射後のサンプルは、連続的にハンクス緩衝食塩液で希釈され、ペロ細胞に塗布された (ATCC #CCL-81)。Mirasol を利用した処理は、5.2 のログ・リダクションを実現した。

Mirasol 処理は WNV の力価を大幅に削減する。

A 型肝炎ウイルス(HAV)

従来の病原体不活化技術 (PRT) は、HAV を不活化することができない。複合物が核酸に近づくために蛋白質皮膜に浸透することが困難で、小型の HAV ゲノムは不活化の目標がほとんどないため、それは不活化するのが困難なウイルスである。この困難なウイルスの *Mirasol* 処理により、約 2.3 のログ・リダクション値がもたらされた。現在まで、*Mirasol* 処理は HAV のウイルス力価を削減すると報告されている唯一の技術である。

現在まで、*Mirasol* 処理はヒト HAV のウイルス力価を削減すると報告されている唯一の技術である。

表 2. ウイルス・ログの調査結果

対象ウイルス	使用モデル	種類	ログ・リダクション	モデル対象	参考
HIV 活性 HIV 潜在	細胞内のヒト HIV 細胞を有するヒト HIV	ssRNA 皮膜を有する	5.9 4.5	その他のレトロウイルス	発表済みデータ
HIV、WNV チクングニ	WNV チクン	ssRNA 皮膜を有する	5.2 計 画中	その他のフラビウイルス	発表済みデータ 保留中

ヤ	グニヤ				
狂犬病ウイルス	VSV	ssRNA 皮膜を有する	>6.3	その他のラブドウイルス 大型 RNA ウィルス	発表済みデータ
HCV WNV	シンドビスウイルス BDV	ssRNA 皮膜を有する	3.2 最大 4.0 まで	その他のトガウィルス	ファイル・データ
CMV ヒト CMV	IBRV HHV	dsDNA 皮膜を有する	3.0 ~ 3.4 進行中	その他のヘルペス・ウィルス	その他のヘルペス・ウィルス ファイル・データ ファイル・データ
HBV	ヒト HBV 仮性狂犬病ウイルス	ssDNA 皮膜を有する	進行中 2.5 ~ 3.0		ファイル・データ
インフルエンザ・ウィルス 鳥インフルエンザ・ウィルス	インフルエンザ A ウィルス	ssRNA 皮膜を有する	>5.3	その他のオルトミクソウィルス	ファイル・データ
ヒト B-19 ウィルス	PPV	ssDNA 皮膜を有さない	>5.0	その他のパルボ・ウィルス	発表済みデータ
HAV	HAV EMCV BEV	ssRNA 皮膜を有さない	2.0 3.2 3.0	その他のピコルナ・ウィルス ポリオウィルス	ファイル・データ

⁹ファイル・データはNavigant Biotechnologies LLCが保持しており発表期限は 2008 年。

BDV: 牛下痢性ウイルス; BEV: 牛エンテロウイルス; CMV: サイトメガロ・ウィルス; EMCV: 脳心筋炎ウイルス; HAV: A 型肝炎ウイルス; HBV: B 型肝炎ウイルス; HCV: C 型肝炎ウイルス; HHV: ヒト・ヘルペス・ウィルス; HIV: ヒト免疫不全ウイルス; IBRV: 牛伝染性鼻気管炎ウイルス; PPV: 豚パルボ・ウィルス; SS: 単一ストランド; VSV: 水泡性口内炎ウイルス; WNV: 西ナイル・ウィルス

サイトメガロ・ウイルス (CMV)

CMV は血液中に存在する時は、白血球に結び付けられている。白血球除去は白血球媒介感染を削減するが、複数の発表によると、白血球除去は最高でも感染率の低下における血清 CMV 試験と同程度の効果しかないということが示唆されている。現在、様々な CMV のモデルが存在し、これらのモデルには、感染したヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) またはモデル牛伝染性鼻気管炎ウイルス (IBRV) の使用が含まれる。HUVEC は輸血における CMV 感染を引き起こすわけではないが、効果的に高レベルのウイルスを算出するため使用される。

私たちは IBRV モデルシステムを利用して Mirasol 処理を評価し、ウイルス力価が 3.0~3.4 log/mL 削減されたことを実証した。しかし、このモデルで達成されたログ・リダクションとその結果生じた白血球媒介感染の間には、説得力のある相関性はなかった。従って、Mirasol 処理による CMV の不活化の効果を実証するために CMV に感染したヒト白血球を使用したモデルの開発を進めている。

Mirasol 処理は、CMV のモデルである IBRV を効果的に不活化する。CMV に感染した白血球を使用したモデルについては調査中である。

細菌の不活化

輸血による細菌感染症 (TTBI) は、輸血に関して何よりも第一に認識される致命的な危険要因である。実際に、細菌による血小板成分の汚染は、血液成分の輸血に関連する最も重大なリスクの一つとして確認されてきた。このリスクに対する懸念から、細菌に汚染された成分の輸血を削減または廃止する試みとして、細菌培養の実施およびスクリーニング方法が推奨される一方で、現在この環境で PRT の有効性を評価することに対する特定の推奨はない。

細菌の選択

現在、PRT の評価対象となる細菌種に関する標準的な指定パネルは存在しない。そのため、私たちは中心的な臨床専門家と共同で、発表されている文献または血液安全監視体制に関するレポートで特定されている主な病原体について代表的な細菌パネルを編成した。また、私たちは以下に記載されている細菌不活化性能を計測するための 2 つの補完的な試験方法も開発した。

遡及的な調査研究において、報告された事象の 70%以上を一般的な細菌である表皮ブドウ球菌および黄色ブドウ球菌の 2 種が占めていた。さらに別の 3 種、大腸菌、緑膿菌および

セレウス菌も、頻度は下がるが輸血に関する致命的な事象に関連していた。さらに、輸血に関連する敗血症の原因として、一般的な血小板汚染物質であるセラチア・マルセッセンスがヘモビジランスに関する多数のレポートに見られる。これらの6種の細菌は、これらの研究で報告されている文書化された血小板輸血に関する敗血症の事象（およびすべての死亡事象）の約86%に相当する（表3参照）。そのため、Navigant Biotechnologies LLCは、これら6種が Mirasol PRT System の性能を実証する対象となる受容可能な最初の細菌パネルであると考えた。現在進行中の研究では26種を超える幅広いパネルに対するシステム性能を評価しており、それら26種を合わせると輸血に関する深刻な感染の98%を占めている。これらの追加研究の結果は、完了後に報告する。

表 3. 血小板輸血に関連する敗血症事象

有機組織体	グラム染色	特徴	観測総数	致死率	頻度 (%)
表皮ブドウ球菌	グラム+	頻繁に皮膚が感染；輸血に関連する致死量に関与	35	1	61.4
黄色ブドウ球菌	グラム+	体温で急速に成長 起源は多数ある；輸血に関連する致死量に関与	6	3	10.53
大腸菌	グラム-	標準的なヒトフローラ；輸血に関する致死量に関与	1	1	1.75
緑膿菌	グラム-	輸血に関する致死量に関与	2	2	3.51
セレウス菌	グラム+	時々皮膚が感染；輸血に関連する致死量に関与	3	0	5.26
セラチア・マルセッセンス	グラム-	日和見性の環境汚染；輸血に関連する敗血症に関与	2	0	3.51
その他の全種	-		8	0	14.04
合計	-		57	7	100

細菌のログ・リダクション研究

細菌の不活化に関する研究には、適切なスパイク・レベルの選択が不可欠だ。ほとんどの研究が高度な細菌力価（例: 1000~10,000 organisms/mL）を使用するが、汚染された成分の力価が 0.03~0.3 organisms/mL（単位当たり 10~100organisms）を超えることはほとんどない。そのため、病原体不活化技術に関する最も適切な結果の基準は、高力価を不活化させる能力ではなく、低力価を不活化させて成分の有効期限を通じてこれらの微生物の成長を抑制する能力である。私たちは、細菌の負荷の削減における Mirasol システムの有効性を評価するための2つの補完的な試験、高スパイクおよび低スパイク試験を使用した。どちらの方法も、Mirasol 処理およびそれに続く細菌の存在の測定を受けて周知の力価の細菌を血小板成分に注入することを伴う。8 高スパイク実験の目的は、ひどく汚染された血小板成分に対するシステムの包括的な細菌不活化能力を判断することである。これらの研究は（上述されているように）臨床状況を代表するものではないが、一般的に PRT の評価に使用される。低スパイク実験の目的は、5日間の保存期間の経過を通じて処理済血小板成分を評価し、それが培養陰性を維持して輸血の解除基準を満たすかどうかを判断することである。このアプローチでは、実際の臨床的環境において予想されるよりも実質的に高度な課題をもたらす状況下で、Mirasol 処理の細菌不活化能力を評価する。

Mirasol PRT System は、2つの補完的な試験方法を使用して広範囲に渡る細菌病原菌を包括的に評価してきた。

高スパイク細菌力価実験

これらの実験では、Trima アフェレーシス装置を使用して収集され、5~6 log コロニー形成単位 (CFU) /mL のバクテリアでスパイクしたシングルドナー血小板成分が使用される。収集されたばかりの汚染された血小板は、通常<100 CFU/成分を含んでいるため、高スパイク調査で使用されるレベルは、代表的な臨床的環境において予期されるよりも 10,000~100,000 倍高くなる。スパイク後すぐに、血小板成分は Mirasol システムで処理され、初期および最後の力価間で達成された不活化を算出することによって総合的な病原体不活化性能が判断される。これらの実験では、力価は照射の直前および直後に判断され、保管期間はない。表 4 は高スパイク細菌力価実験の公表結果を表示しており、それには多くの高耐性菌が含まれる。これらの調査は、高細菌力価における Mirasol 処理の有効性を実証された。

Mirasol PRT System は、高耐性菌を含む広範囲にわたる細菌に対して、高細菌力価を見事に削減する。

低スパイク細菌力価実験

低スパイク細菌力価調査は、保管期間中の血小板成分の無菌性を監視しながら、より低く臨床的に適切な細菌力価（0.5～2.0 log/mL）で能力を評価します。スパイク後、血小板サンプルはMirasolシステムで処理され、通常の血液を構築する状況下で保管される。最低でも5日間保管した後で、成分の見本が採取され培養される。サンプルは、血液成分用自動培養システム（BioMerieuxにより開発されたBacT/ALERT[®]）を使用して監視され、このシステムは、試験サンプルにおける細菌の存在を監視するためにヨーロッパ全域で広く使用されている。結果は、Mirasol処理は保管期間全体を通じて培養陰性成分を産出するということを実証している。

Mirasol PRT System は、通常の血液を構築する状況下で5日間の保管期間全体を通じて培養陰性成分を産出する。

表 4. 細菌ログ・リダクション結果

病原体	耐性菌	ログ・リダクション	種類	コメント
黄色ブドウ球菌	ATCC 25923	3.6	グラム+	
黄色ブドウ球菌	ATCC 700787	4.8	グラム+	MRSA 耐性菌
表皮ブドウ球菌	ATCC 12228	4.2	グラム+	
セレウス菌*	ATCC 7064	1.9	グラム+	耐性菌
セレウス菌*	NI-0001	2.7	グラム+	献血された血液から分離
連鎖球菌	ATCC 6249	3.7	グラム+	
緑膿菌	ATCC 43088	>4.5	グラム-	
緑膿菌	ATCC 27853	>4.7	グラム-	耐性菌
大腸菌	ATCC 25922	>4.4	グラム-	
セラチア・マルセッセンス	ATCC 43862	4.0	グラム-	

* バチルス種 頻繁に孢子形状で発生する。

MRSA: メチシリン耐性黄色ブドウ球菌

BacT/ALERT を使用した細菌培養試験における Mirasol 処理の有効性を比較する組織内データは、BacT/ALERT が理想的な状況下で実施される際にはどちらの方法も同様に効果的（約 90%）であることを示唆している。しかし、臨床環境においては、Mirasol 処理の有効性は 90%を超える状態を維持すると予測される一方で、BacT/ALERT の有効性は約 50%にまで落ち込む（表 5 および 6 参照）。

表 5. Mirasol PRT System および BacT/ALERT 方法の総合的な有効性の比較

有機組織体	ATCC 番号	発生	頻度 (%)
表皮ブドウ球菌	12228 14990 700578 35984	20	33
大腸菌	25922	8	13
セレウス菌	NI-0001	7	11
黄色ブドウ球菌	29213 10832 25923 27217	6	10
B 群連鎖球菌 連鎖球菌 化膿連鎖球菌	70046 6249 BAA-1064	5	8
エンテロバクター菌	29005	4	7
グラム陽性菌	51277	3	5
セラチア・マルセッセ ンス	43862	3	5
肺炎桿菌	8045	2	3
非発酵陰性桿菌	17961	1	2
陰性桿菌	試験対象外	1	2
エルシニア感染症	23715	1	2

表 6. BacT/ALERT 比較調査において評価された有機組織体の総括表

有機組織体のタイプ	グラム +/-	ATCC 番号	検出までの 培養時間 (平均時間)	接種力価 (CFU/製 剤)	7日間の積極 抑制力価の 成長 (CFU/ 製剤)
非発酵陰性桿菌	-	17961	7.6±1.1	61	3.6×10 ⁸
セレウス菌	+	該当なし	4.4±1.1	103	6.5×10 ⁶
エンテロバクター 菌	-	29005	5.9±0.5	41.3	1.5×10 ⁹
大腸菌	-	25922	6.6±2.3	65	2.7×10 ⁸
肺炎桿菌	-	8045	12.6±0.7	55	6.2×10 ⁸
グラム陽性菌	+	51277	106.7±45.8	596	<1.0
セラチア・マルセ ッセンス	-	43862	4.3±0.2	79	>3.0×10 ⁹
黄色ブドウ球菌	+	29213	9.7±1.1	75	2.2×10 ⁸
黄色ブドウ球菌	+	10832	14.4±0.9	63	3.8×10 ⁸
黄色ブドウ球菌	+	25923	9.3±0.3	68	4.3×10 ⁸
黄色ブドウ球菌	+	27217	9.0±0.6	70	5.3×10 ⁸
黄色ブドウ球菌	+	29213	12.1±2.1	14	4.0×10 ⁸
表皮ブドウ球菌	+	12228	17.3±1.7	54	3.6×10 ⁸
表皮ブドウ球菌	+	14990	19.0±1.9	57	1.2×10 ⁸
表皮ブドウ球菌	+	700578	23.2±1.7	23	2.9×10 ⁸
表皮ブドウ球菌	+	35984	19.4±1.5	39	2.7×10 ⁷
表皮ブドウ球菌	+	12228	19.1±0.8	11	1.8×10 ⁸
表皮ブドウ球菌	+	12228	該当なし	<3	1.7×10 ⁸
B群連鎖球菌	+	700046	9.1±0.8	54	6.1×10 ⁶
連鎖球菌	+	6249	16.2±2.9	28	2.9×10 ⁷
化膿連鎖球菌	+	BAA-1064	10.2±0.6	42	4.4×10 ⁵
エルシニア感染症	-	23715	10.1±2.3	76	8.5×10 ⁸

CFU: コロニー形成単位; NA: 該当なし

細菌で汚染されている代表的な血小板成分には、全体で約 10~100 の有機組織体が含まれている可能性がある。高スパイク調査および低スパイク調査を合わせたデータは、実際の臨床的環境において予想されるよりも実質的に高度な課題をもたらす状況下における、

Mirasol 処理の細菌不活化能力を実証する。これらの細菌不活化レベルは、細菌感染リスクの対応不活化における非常に高い限界点を示唆している。

これらの結果にもとづき、Mirasol 処理は処理済血液成分を介した細菌感染を削減する結果をもたらすと期待されている。1:3000 という血小板成分の細菌汚染の頻度を考えると、この環境における患者の罹患率および死亡率に対する潜在的な利点は重要である。

臨床的環境において予想されるよりも大幅に高度な課題をもたらす状況下における Mirasol PRT System による細菌不活化の印象的な結果は、Mirasol 処理により輸血による細菌感染が減少するということを強く示唆している。

寄生虫の不活化

旅行や移住の増加により、熱帯地方特有の寄生虫症がそれ以外の国々の献血者にも見られる。現在では、血液成分を通じて感染する可能性のある多数の寄生虫に対する十分な献血者のスクリーニングが存在せず、シャーガス病（クルーズ・トリパノソーマ）、内臓リーシュマニア症（ドノヴァン・リーシュマニア）およびマラリア（プラスモディウム・ファルシバルム）を含む、輸血に関連する寄生虫感染が近年数多く報告されている。

そのため、寄生虫の不活化は PRT のもう一つの魅力的な特性であるが、細菌に関しては、PRT の試験対象となる標準的な病原体パネルが存在しない。Mirasol PRT System はどのような病原体に対しても利用される可能性があるため、寄生虫の感染を予防する効果的なオプションを提供する。私たちは現在様々な寄生虫に対してシステムの試験を行っている。現在までに得られた結果は、表 7 に要約する。

Mirasol PRT System は、輸血用血液に重大な脅威を与える様々な寄生虫を効果的に不活化させることが明らかになった。

表 7. 寄生虫のログ・リダクション結果

病気	病原体	ログ・リダクション	試験対象
リーシュマニア	小児ドノヴァン・リーシュマニア	>5.0 ³²	血小板、血漿
マラリア	プラスモディウム・ファルシバルム	>2.0 ^{2,33}	赤血球
シャーガス病	クルーズ・トリパノソーマ	>6.0 ²	血小板、血漿
ツツガ虫病	オリエンティア・ツツガ	>6.0 ³⁴	血小板、血漿、赤血球

	ムシ		
バベシア症	バベシア・ミクロテイ	>5.0 ²	血小板、血漿

††ファイル・データはNavigant Biotechnologies LLCが保持しており発表期限は2008年

要約

- ・ウイルス、細菌および寄生虫に対する Mirasol PRT System の有効性を評価するために、厳しい基準を採用した
- ・ガイドラインが利用可能な場合は、推奨される病原体の全機能について Mirasol PRT System の試験を実施した
- ・ガイドラインが利用可能でない場合は、Navigant Biotechnologies LLC は適当な血液製剤汚染に関する公開データを利用した
- ・Mirasol PRT System を使用した処理は、処理済血液製剤からの病気感染の可能性を減少させ、Mirasol PRT System の有効性に関する代表的な試験を保証することを目的としている
- ・Mirasol PRT System の有効性は細菌（グラム陽性およびグラム陰性の両方）、ウイルス（RNA および DNA、皮膜を有する場合と有さない場合）および寄生虫に対して実証されている
- ・Mirasol PRT System は病気感染の可能性が極めて低くなるレベルまでウイルス力価を削減する
- ・PPV に関する不活化調査の結果に基づき、観測されたウイルス不活化のレベルは、HIV-1 の潜伏期間および人体における全体的なウイルス血症期間を終わらせるために必要とされるレベル、およびヒト B-19 パルボ・ウイルスの慢性的段階感染の潜伏を終わらせる可能性のあるレベルを超えている
- ・Mirasol 処理は IBRV（CMV のモデル）ウイルス力価を大幅に削減する
- ・Mirasol PRT System は、HAV のレベルを削減することが証明されている唯一の技術である
- ・Mirasol PRT System は、高耐性菌を含む広範囲にわたる細菌の高細菌力価を削減する
- ・Mirasol PRT System は、通常の血液を構築する状況下における 5 日間の保管期間を通じて溶液陰性製剤を産出する
- ・臨床的環境において予想されるよりも大幅に高度な課題をもたらす状況下における Mirasol 処理の細菌不活化の結果は、Mirasol 処理が輸血による細菌感染を削減するということを強く示唆している
- ・Mirasol PRT System は、輸血用血液に重大な脅威を与える様々な寄生虫を効果的に不活化させることが明らかになった

References

1. FDA Guidance for Industry: QSA Viral safety evaluation of biotechnology products derived from cell lines of human or animal origin. September 1998.
2. Data on file at Navigant Biotechnologies LLC.
3. Goodrich RP, Keil S, Busch MP. Pathogen inactivation in blood components and the definition of adequacy in performance. Manuscript in preparation.
4. Committee for Proprietary Medicinal Products Guidelines CPMP/ICH/295/95 – Guidance for Industry: QSA Viral safety evaluation of biotechnology products derived from cell lines of human or animal origin. March 4 1997.
5. Simer S. Project lead: Emerging Infectious Disease Project. American Association of Blood Banks. Personal communication. September 2006.
6. World Health Organization guidelines: WHO technical report. Series No. 924 2004:61–162.
7. Ruane P, Edrich R, Gampp D, et al. Photochemical inactivation of selected viruses and bacteria in platelet concentrates using riboflavin and light. *Transfusion*. 2004;44:877–885.
8. Goodrich RP, Edrich RA, Li J, Seghatchian J. The Mirasol™ PRT system for pathogen reduction of platelets and plasma: an overview of current status and future trends. *Transfus Apher Sci*. 2006;35:5–17.
9. Piatak M Jr, Saag MS, Yang LC, et al. High levels of HIV-1 in plasma during all stages of infection determined by competitive PCR. *Science*. 1993;259:1749–1754.
10. Brown KE, Young NS, Alving BM, Barbosa LH. Parvovirus B19: implications for transfusion medicine. Summary of a workshop. *Transfusion*. 2001;41:130–136.
11. Syndou G, Skevaki C, Kafetzis DA. Intrauterine infection with parvovirus B19 and CMV: implications in early and late gestation fetal demise. *Expert Rev Ant Infect Ther*. 2005;3:651–661.
12. West Nile virus activity – United States, October 10–16, 2002, and update on West Nile virus infections in recipients of blood transfusions. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. 2002;51:929–931.
13. Pealer LN, Martin AA, Petersen LR, et al. Transmission of West Nile virus through blood transfusion in the United States in 2002. *N Engl J Med*. 2003;349:1236–1245.
14. Stramer SL, Fang CT, Foster GA, et al. West Nile virus among blood donors in the United States, 2003 and 2004. *N Engl J Med*. 2005;353:451–459.
15. Busch MP, Caglioti S, Robertson EF, et al. Screening the blood supply for West Nile virus RNA by nucleic acid amplification testing. *N Engl J Med*. 2005;353:460–467.
16. Macedo De Oliveira A, Beecham BD, Montgomery SP, et al. West Nile virus blood transfusion-related infection despite nucleic acid testing. *Transfusion*. 2004;44:1685–1699.
17. Kusov Y, Kanda T, Palmenberg A, et al. Silencing of hepatitis A virus infection by small interfering RNAs. *J Virol*. 2006;80:5599–5610.
18. Strauss RG. Leukocyte-reduction to prevent transfusion-transmitted cytomegalovirus infections. *Pediatr Transplant*. 1999;3(Suppl 1):19–22.
19. Vamvakas EC. Is white blood cell reduction equivalent to antibody screening in preventing transmission of cytomegalovirus by transfusion? A review of the literature and meta-analysis. *Transfus Med Rev*. 2005;19:181–199.
20. Ness P, Braine H, King K, et al. Single-donor platelets reduce the risk of septic platelet transfusion reactions. *Transfusion*. 2001;41:657–661.
21. Engelbret CP, Feesink HW, Blajchman MA, et al. Bacterial contamination of blood components. *Vox Sang*. 2000;78:59–67.
22. Brecher M, Holland PV, Pineda AA, et al. Growth of bacteria in irradiated platelets: implications for bacterial detection and the extension of platelet storage. *Transfusion*. 2000;40:1308–1312.
23. Goodrich RP, Gilmour D, Hovenga N, Keil SD. A laboratory comparison of Mirasol PRT treatment and culture of platelet products for addressing bacterial contamination concerns. Unpublished manuscript.
24. Foley MJ, Doherty C, Salami A, et al. Re-testing platelet concentrations for bacterial contamination at day 4 prior to extended storage for 7 days. *Transfusion*. 2007;47(Suppl 36A):566–04E1.
25. Eder AF, Kennedy JM, Dy B, et al. Bacterial screening of apheresis platelets and the residual risk of septic transfusion reactions: the American Red Cross experience (2004–2006). *Transfusion*. 2007;47:1134–1142.
26. Blajchman MA, Beckers EAM, Dickreiss E, et al. Bacterial detection of platelets: current problems and possible resolutions. *Transfus Med News*. 2005;19:259–272.
27. Leiby DA, Rentas FJ, Nelson KE, et al. Evidence of *Trypanosoma cruzi* infection (Chagas' disease) among patients undergoing cardiac surgery. *Circulation*. 2000;102:2978–2982.
28. Kelly DJ, Richards AL, Temenak J, et al. The past and present threat of rickettsial diseases to military medicine and international public health. *Clin Infect Dis*. 2002;34:S145–S169.
29. Young C, Loskoff P, Chawla A, et al. Transfusion-acquired *Trypanosoma cruzi* infection. *Transfusion*. 2007;47:540–544.
30. Dey A, Singh S. Transfusion transmitted leishmaniasis: a case report and review of literature. *Indian J Med Microbiol*. 2006;24:165–170.
31. Kitchen AD, Chiodini PL. Malaria and blood transfusion. *Vox Sang*. 2006;90:77–84.
32. Cardo LJ, Rentas FJ, Ketchum L, et al. Pathogen inactivation of *Leishmania donovani*, *infantum* in plasma and platelet concentrates using riboflavin and ultraviolet light. *Vox Sang*. 2006;90:85–91.
33. Lippert L, Watson R, Osane S, et al. Inactivation of *P. falciparum* by riboflavin and light. *Vox Sang*. 2002;83:163.
34. Rentas F, Harman R, Gomez C, et al. Inactivation of *Orientia tsutsugamushi* in red blood cells, plasma, and platelets with riboflavin and light, as demonstrated in an animal model. *Transfusion*. 2007;47:240–247.

第5章

病原体不活化技術（Mirasol PRT）による白血球の不活化

MIRASOL®

病原体不活化技術

Mirasol病原体不活化技術（Mirasol PRT）による白血球の不活化

不安定な血液製剤に残存している白血球は、輸血に伴う副作用の原因のなかでもっとも一般的であり、かつ危険なものである。このため白血球は、不活化における重要なターゲットとなっている。

同種異型白血球の輸血に関連するリスク

以下に記述するのが、もっとも一般的な副作用である。また、これらをまとめて示したのが下記の表1である。

輸血に起因する移植片対宿主病

輸血に起因する移植片対宿主病（TA-GVHD）においては、輸血された白血球が輸血を受けた患者に対して免疫攻撃を開始する。TA-GVHDの臨床兆候としてみられるのは、肝臓、皮膚、粘膜ならびに消化管に対する選択的損傷によって引き起こされる発熱、発疹、肝機能障害、下痢などである。TA-GVHDは骨髄形成不全に関連したものであることから、これらの経過は急性であり、また劇症となる。一般的には発現の頻度は低いものとされているが、ウイルス感染や医薬品の副作用などその他の状態と類似した特徴を示すことから、実際の罹患率は未確認である。

TA-GVHDを発症した患者は90%以上が死亡に至っており、輸血に関連する死因においては最大の割合を占めている。主な死因は、感染または汎血球減少症に由来する出血である。輸血された白血球に対し宿主対移植片攻撃を行うことができない免疫不全の患者、ならびに未熟児に主として見られる死因であるが、血縁ドナーと共有するヒト白血球抗原（HLA）のハプロタイプにヘテロ接合の免疫応答性を持った輸血を受けた患者にもみられる死因である¹。この後者のケースにおいては、輸血を受けた患者の免疫系が移植された白血球を自身のもの以外であると認識できず、一方で移植されたドナー側の細胞がこれを認識し、輸血を受けた患者の細胞組織に対する攻撃を始めるのである。

マイクロキメリズム

マイクロキメリズムは、宿主において少数ながら宿主以外のものである細胞が安定して存在し続けることと定義される。たとえば、輸血を受けた患者の血液中において、輸血後もドナーの白血球が長期にわたって活着することなどである。こうした状態の継続は、慢性自己免疫疾患の発症と関連している可能性がある。患者のなかには、数か月間のうちにキメラ細胞を失ってしまうものもいるが、その他の患者の場合においては、ドナーの白血球数が無期限ではないにしても、何年間にもわたって維持されるのである。また、こうした現象は白血球不活化、あるいは標準的な血液製剤を使用した場合において、同程度の頻度で発生している。

同種免疫

同種免疫は、赤血球や白血球、血小板抗原に対する抗体など、抗体の発生によって特徴づけられるものである。輸血された血液製剤に含まれている白血球のHLAクラスII抗原に対する同種免疫は、以下の原因となる場合がある：

- 同種抗体—同種移植片の拒絶を誘因
- 同種抗体—出血傾向を増長させる血小板不応を誘因

表1. 不安定血液製剤による潜在的副作用

反応	原因物質
TA-GVHD	ドナーのT-リンパ球
マイクロキメリズム	ドナーの白血球（リンパ球）
HLA-同種免疫	ドナーの白血球（主に抗原提示細胞）
TRALI	ドナーの抗HLAクラスI抗体またはクラスII抗体、もしくは抗好中球抗体 ドナーのBRMs
FNHTR	ドナーによって生成されたサイトカイン 保存された白血球
TRIM	ドナーによる免疫修飾 T-リンパ球および血漿
輸血感染症	細胞結合型の感染物質

BRM: 生物反応修飾物質、FNHTR: 発熱性非溶血輸血反応、HLA: ヒト白血球抗原、
TA-GVHD: 輸血による移植片対宿主病、TRALI: 輸血関連急性肺障害、TRIM: 輸血による免疫修飾: 白血球

輸血関連急性肺障害

輸血関連急性肺障害（TRALI）は、輸血によって引き起こされる合併症のなかでも、もっとも深刻なもののひとつである。臨床的兆候には、息切れ、低酸素血症、低血圧、発熱、非心臓性肺浮腫などが含まれる。症状は通常、輸血から1-2時間以内、血漿を含有する血液製剤の輸血の場合は必ず6時間以内に発症する。たいていは一時的な症状であるが、患者の

6-10%にとっては致命的なものとなる。

TRALIの正確な発症頻度は未確認であり、TA-GVHDについては、おそらく大幅に過小評価されているとみられる。文献に報告されている罹患率は、以下のとおりである——新鮮凍結血漿の場合は7,900ユニットに1例、血液および血液製剤は5,000ユニットに1例、血漿含有血液製剤は2,000ユニットに1例、全血由来血小板は432ユニットに1例。発症数は増加しているとみられており、TRALIは輸血関連の死亡例のなかでも主要な死因となっている⁵。TRALIの病態生理学には、免疫学的および非免疫学的メカニズムのいずれもが関連しているとみられるが、明確なメカニズムは不明であり、患者によって異なるものであると考えられている。TRALIの発症においては、複数の重要な要因があると考えられている：

- 第一に、自身の白血球が対応する抗原を保有している患者に対し、抗HLAクラスI抗体、またはクラスII抗体、もしくは抗好中球抗体を輸血した場合に引き起こされる免疫反応、または抗体媒介性のメカニズムがある。抗体——抗原の相互作用が補足的に肺分画症と多形核球好中球の活性化（顆粒球）を引き起こし、その結果としてTRALIが発症する。
- 第二に、非免疫介在性の反応がある。これは、“two-event model”と呼ばれるものである。：最初の現象は、肺内皮の活性化ならびにPMN集積によって患者に発症する臨床症状である。そして、次に起こる現象が、付随的PMNを活性化し、内皮障害や毛細血管漏出、TRALIを誘発する抗顆粒球抗体、脂質、CD40リガンドなどの生物学的修飾物質（BRMs）の輸注である。

発熱性非溶血輸血反応

発熱性非溶血輸血反応（FNHTRs）は、血液成分の貯蔵中に生成されたサイトカインによって引き起こされるものである。FNHTRの臨床症状としてみられるのは、輸血後の24時間以内に起こる発熱と悪寒であり、複数回にわたる輸血を受けている患者、あるいは妊娠経験のある患者にもっとも頻繁に発生する。

FNHTRの発生率は、赤血球輸血の場合で6.8%、非白血球不活化血小板輸血の場合で30.8%と推定されている。白血球は、FNHTRの原因として重視すべきものである——保存された濃厚血小板においては、白血球細胞によってサイトカインの活性合成が起こり、白血球由来の炎症性サイトカインの含有量が増加する。濃厚血小板製剤は保存中に溶解性CD40リガンドを蓄積することがわかっており、これによって、発熱を誘引するものとして知られるプロスタグランジンE₂（PGE₂）が生成されるのである。FNHTRは生死にかかわるものではないが、コスト面ならびに患者のコントロールの側面において重大な影響を持っている（血液培養に関する要件、溶血反応の可能性が否定されるまで輸血を停止する必要性、入院期間の長期化の可能性など）。

輸血関連免疫修飾

ドナーのT-リンパ球によるTRIMは、輸血後の一時的な免疫抑制によって発生するものである。これは、細菌感染ならびにガン再発のリスクの増加に関連するものである。冠動脈バイパス手術の後に同種血輸血を受ける患者の場合には、敗血症、術後感染、心臓への感染などといった感染リスクがより高くなる。

病原体の直接感染

白血球が細胞結合感染因子、なかでもとくに、サイトメガロ・ウイルス（CMV）やヒトT細胞性白血病ウイルス（HTLV）などに感染している場合もある。

血液製剤に残存している白血球は、もっとも一般的であり、また危険な輸血副作用（TRIMやTA-GVHD、FNHTRなど、そして頻度は下がるもののTRALI）の原因である。したがって、白血球は不活化における重要なターゲットである。

白血球由来の危険性削減に向けた現在の戦略における限界

ドナーの白血球を不活化するために一般的に利用されるのが、ガンマ線照射である。適正な放射線量でこれを実施した場合には、TA-GVHDの発生が抑制される。しかしながら、使用されているガンマ線照射のレベルは、より小さく、低感受性遺伝子である非白血球性病原体（ウイルスなど）を不活化するには不十分なものである。

さらに、照射はクローン性増殖の進行を抑制し得るものの、必ずしも白血球を殺すものではない。このため、白血球はFNHTRやTRALIを引き起こすのに十分なだけのサイトカインを生成し続ける可能性がある。

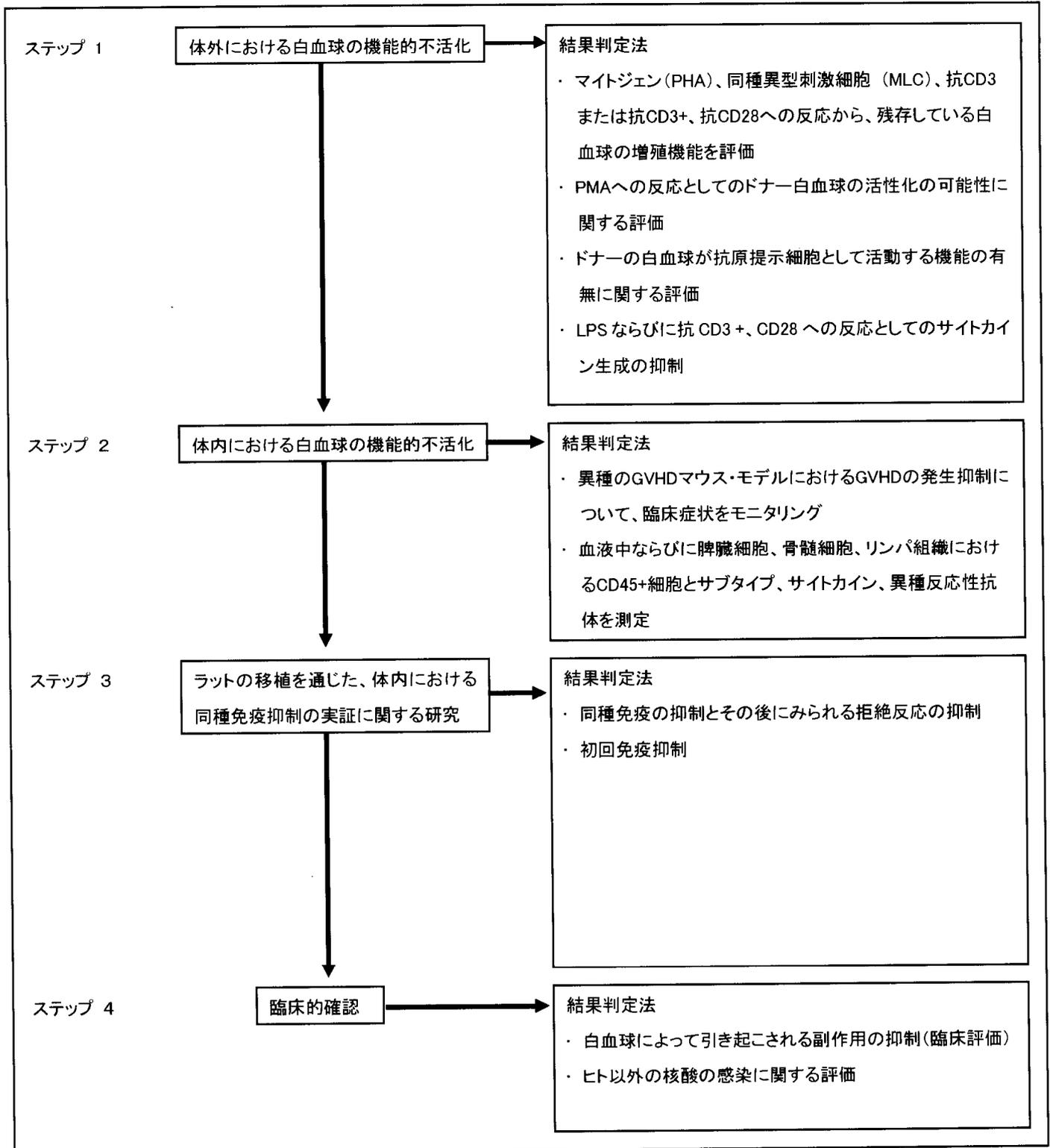
リスクを軽減する目的で使用されているもうひとつの一般的な方法が、ろ過（赤血球除去または赤血球不活化）である。しかしながら、以下を抑制するためのものとしては100%有効なものではない。a) FNHTR、b) ウイルス感染、c) マイクロキメリズム。

さらに、残存している白血球には増殖機能が維持されており、ガンマ線照射をしていない白血球減損の製剤を輸血した後でのTA-GVHDが報告されている。

現在のところ、白血球由来の副作用を削減するために使用されている方法は複雑なものであり、完全に有効なものではない。そしてまた、血液製剤の製造過程を複雑なものにしている。

白血球に由来するリスクに対応するための現在の戦略は、100%有効なものではない。残存している白血球の不活化は、深刻な輸血副作用を防ぐために不可欠なものである。

図 1. Mirasol 不活化処理後における白血球由来の副作用削減についての調査



GVHD: 移植片対宿主病、LPS: リポ多糖、MLC: 白血球混合培養、PHA: ファイトヘマグルチニン、

PMA: ホルポールミスチン酸アセテート、白血球: 白血球

白血球に由来するリスクの軽減におけるMirasol PRTシステムの有効性

私たちは、白血球に由来する病変の発生抑制におけるMirasol処理の有効性を調査するための包括的戦略を採用した（図1を参照）。

結果:体外における白血球の機能的不活化(ステップ 1)

ステップ1では、ヒトの単核細胞に対するMirasol処理の有効性について、体外における研究を行った。それぞれの実験には、処理済み、未処理のサンプルを一組みずつ使用した。Mirasol処理は、すべての分析試験において反応を抑制した¹³。処理によって抑制された反応は、具体的には下記に示すとおりである。

- ホルボールミリスチン酸アセテート（PMA）に対する反応としての活性化
- マイトジェン（PHA）、抗CD3および抗CD3+、抗CD28、ならびに同種異型の刺激細胞に対する反応としての増殖
- 抗原提示機能
- リポ多糖（LPS）または抗CD3+ 抗CD28への反応としてのサイトカインの生成。

これらの結果は、全血ユニットにおいて確認されたものである。赤血球、血小板、または血漿製剤に対する副作用は一切発生しなかった。

Mirasol PRT処理によって、体外においては白血球を不活化することに成功した。

結果:体内における白血球の機能的不活化(ステップ 2)

ステップ 2においては、TA-GVHDのモデルとして、B-、T-、ならびにNK細胞が欠如している遺伝的免疫不全のマウスの腹膜にヒトの単核細胞（Mirasol処理済み、および未処理）を注入した。

この研究により、以下が明らかになった。：

- Mirasol処理済みの細胞を注入したグループのマウス（N=14）のうち、異種 GVHDの症状を発症したものはなかった。一方で、Mirasol未処理の細胞を注入したマウスは14匹のうち、12匹が異種GVHDの症状を発症した。後者のグループにおいてはTA-GVHD のケースと同様、細胞溶解反応に伴う末期の異種GVHDが見られた。これは、ヒトCD4+ならびにCD8+細胞の存在に特徴づけられるものである。
- 双方のグループにおいて、ドナーの白血球の分布は類似したものであった
- Mirasol未処理の細胞を注入したレシピエントのマウスの血漿においては、ヒトサイトカイン（インターフェロン- γ ならびにインターロイキン-10を含む）およびヒト免疫グロブリン

ンのみが検出された

- 未処理の細胞を注入されたグループにおいてのみ、キメラ現象が検知された
- 未処理のドナー細胞は、同種異型ならびに異種の刺激細胞に対する反応として増殖することが可能であった；処理済み細胞にはみられなかった
- 未処理のグループにおいては脾臓の重量が増加し、一方でヘマトクリット（Hct）値が大幅に減少した

この研究によって、ここで採用されたTA-GVHDモデルにおいては、Mirasol処理が異種における移植片対宿主反応を排除することが示された¹⁵。本論の著者は、「血液製剤に対するMirasol PRT処理の実施は、TA-GVHDの発生を抑制するものである」と結論づけた。

Mirasol処理によって、ヒトのTA-GVHDのモデルとして使用したネズミの異種GVHDに発生の抑制がみられた。

結果：同種免疫およびその他の白血球関連の副作用が抑制された(ステップ3)。

同種免疫

In vivo研究では、同種免疫の発生に対するMirasol処理の効果について調査を行った。レシピエントであるラットには複数回にわたって、ドナー・ラットから血小板50 mLおよび高濃度の白血球 [10⁶/mL]を含有する輸血を行った。

以下の3つのグループについて、評価を実施した。：

- 第一グループには生理食塩液のみを与えた。
- 第二グループにはMirasol処理済みの血液を輸血した。
- 第三グループにはMirasol未処理血液を輸血した。

10週間後、ドナー・ラットの心臓をレシピエント・ラットに移植したところ、移植臓器の生着とともに免疫反応が見受けられた。：

- 未処理のグループにおいては、高度の免疫反応が観測された——IgMのピークが高水準で確認され、続いてIgG値も上昇した（図2を参照）。
- Mirasol処理済みの血液のグループにおいては、IgM反応は観測されず、1匹のマウスのみにおいて非常に軽度のIgG反応が観測された（図2を参照）。
- 生理食塩液のみのグループにおいては、何の反応も観測されなかった。
- Mirasol処理済みの血液のグループにおいては、移植を受けたすべてのマウスが生存し、未処理のグループにおいてはすべてが死亡した（図3を参照）。

本論の著者は、Mirasol処理は「血液製剤の免疫原性を減少させるという、さらに重大な利点を持つ可能性がある。感作の原因を大幅に削減することから、こうした効果はとくに移植患者にとって重要なものである」と結論づけた。

Mirasol処理は、動物モデルにおける同種免疫を抑制し、血液製剤中の免疫原性を減少させた。

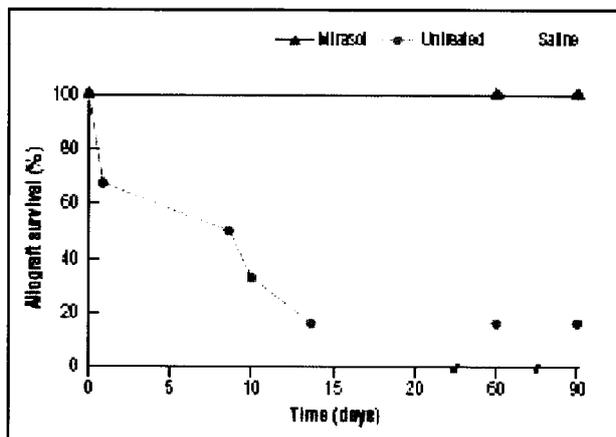
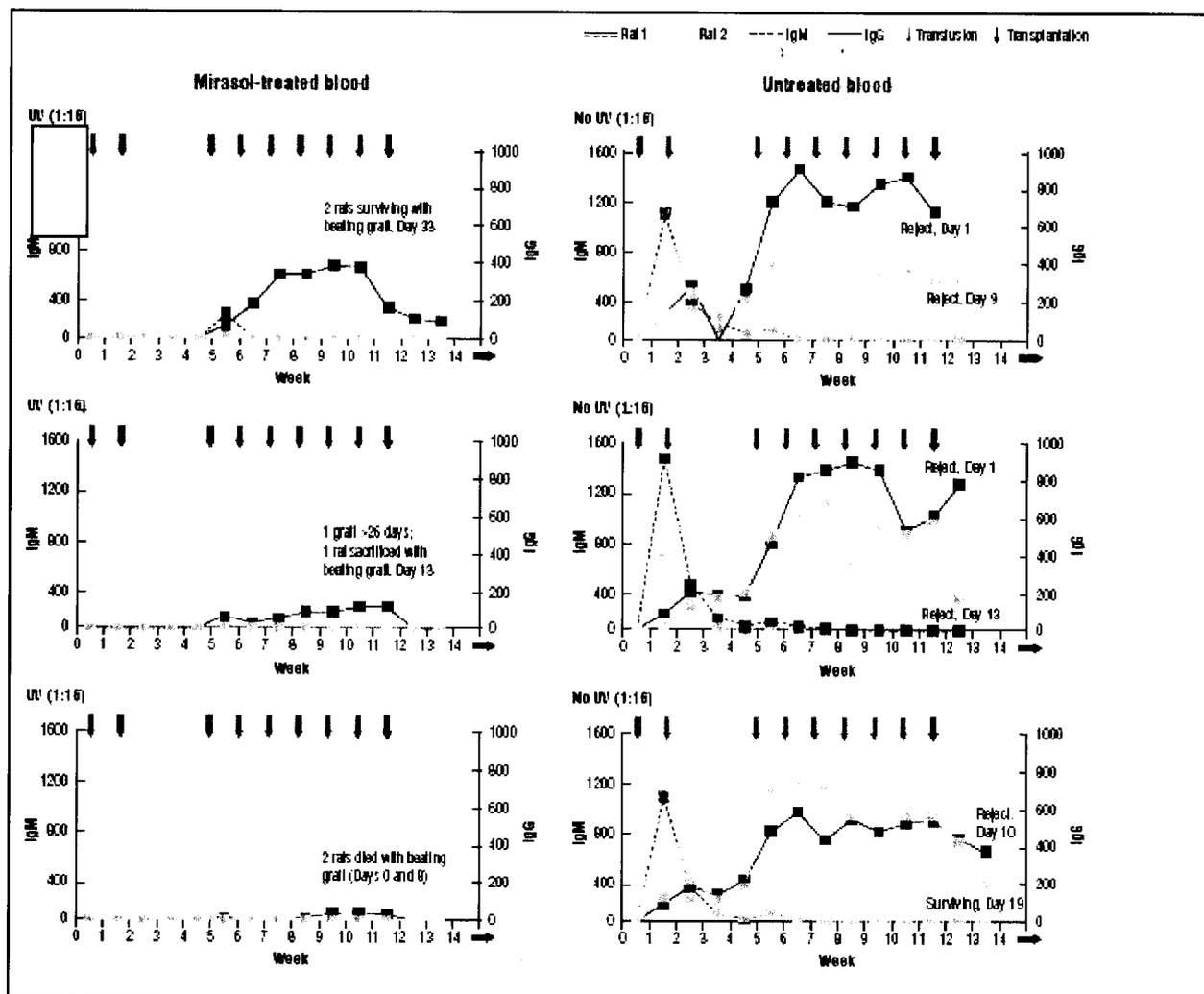


図3. ラットにおける同種免疫移植の生存率に関する研究

図2. ラットにおける同種免疫移植のIgM値およびIgG値に関する研究



2匹のラットについての結果を表すそれぞれのグラフは、IgM反応ならびにIgG反応を示したものである。右手のパネルには、未処理の血液を輸血したラットの結果が示されている——急速なIgM反応の出現と、それに続く強いIgG反応がみられる。左手のパネルは、Mirasol処理済みの血液を輸血したラットの結果である——IgM反応はみられず、6匹中1匹にのみ、後期に入ってから軽度のIgG反応がみられた。 Ig:免疫グロブリン、UV:紫外線

表2. 白血球不活化ならびにガンマ線照射と比較した場合のMirasol PRTシステムの利点

	白血球不活化	ガンマ線照射	Mirasol PRTシステム
メカニズム	ろ過により白血球を不活化	核酸損傷を発生	リボフラビンと核酸の間に不可逆の付加体を形成
白血球不活化	不完全	>5ログ削除 (25 Gy)	>6ログ削除
サイトカイン生成、発現可能性	可能性あり	可能性あり	予防された
GVHD	可能性なし	予防された	予防された
病原体感染	無細胞病原体または低レベルの細胞結合型病原体にかかる問題には対応しない	可能性あり	予防された

CMV: サイトメガロ・ウイルス、GVHD: 移植片対宿主病、白血球: 白血球

免疫に起因するその他の副作用

TRALIやTRIMといったその他の免疫反応を軽減させる機能に関してMirasol処理の評価を行うため、さらなる研究を実施した。血液製剤の保存期間中にはBRMsが生成された。前述のとおり、これはTRALIの発症機序に関連があるとみられている。

赤血球ならびに血小板製剤の保存中におけるこれら合成物の蓄積に対するMirasol処理の効果について、評価を行った。Mirasol処理済みのサンプルと未処理の血液製剤について、それぞれが健康なドナーから好中球の白血球遊走因子(fMLP)-誘発型呼吸バーストを増進させ

る能力を測定するため、これらの分析を行った。

赤血球および血小板のMirasol処理によって、通常は保存期間中に起こり、プライミング脂質を含めたBRMsの生成を示唆するものであるプライミング活性の生成が抑制された。細胞を含む血液製剤のMirasol処理は、TRALIに関連する病原体のひとつを不活化できる可能性がある。

現在、Mirasol処理がTRIMの発生を抑制する可能性に関して研究が進行中である。この研究実験においては、ラットに毎週一回、Mirasol処理済み全血、または未処理の全血、もしくは生理食塩液のいずれかを輸血し、その後、細菌への反応などについての調査を行う。評価項目は生存率である。

Mirasol処理は潜在的に、TRALIの発症とのかかわりが指摘されてきた生物反応修飾物質の生成を抑制するものである。

結果：臨床試験による確認(ステップ4)

現在の、そして将来における臨床プログラムによって、ヒトにおける上記のような副作用の発生、ならびに抑制の可能性に関するデータが作成されることになるだろう。フランスでMirasolに関する臨床研究(MIRACLE試験)が実施されたが、このとき実施施設は、Mirasol処理済みの血小板を提供するにあたって、ガンマ線照射を行うか否かを自由に決定することができた。臨調研究者の大半は、ガンマ線照射を行わないことを選択した。この研究においては、TA-GVHDのケースは報告されていない。

結論

Mirasol処理が持つ白血球不活化の能力について評価を行うため、私たちは4つのステップを経る戦略を採用した。プロセスは現在も進行中であり、現在もin vivo研究ならびに臨床研究を継続している。これまでに、細胞を含有した血液製剤のMirasol処理が輸血に関連した拒絶免疫反応の排除に役立つか否かについて、in vitroならびにin vivo研究を行っている(表2参照)。

Mirasol PRTシステムを用いた処理によって、残存している白血球および関連する病原体を不活化できることが示されている。この技術は、現在の白血球抑制プロセスにおける重大な利点である(表2参照)。Mirasol処理は、生存能力を持った白血球の輸注、蓄積された炎症メディエーターによる汚染、ならびに細胞関連ウイルスへの感染の可能性を効果的に抑制する。この技術が持つこうした機能は、患者ならびに担当医にとって、臨床上の大きな利点であると考えられることができる。

要約

- 残存している白血球は深刻な輸血関連の反応（TRIMやTA-GVHD、FNHTRなど、また低い頻度におけるTRALI）の抑制に不可欠である。したがって、白血球は不活化における重要なターゲットである。
- 白血球由来のリスクに対応するための現在の戦略は、100%有効なものではない。残存している白血球の不活化は、深刻な輸血関連の反応の抑制に不可欠である。
- Mirasol処理は、体内において白血球の不活化に成功した。
- ヒトTA-GVHDのモデルとしたマウスにおいて、Mirasol処理は異種GVHDの発生を抑制する。
- Mirasol処理は同種免疫を抑制し、また血液製剤の免疫原性を減少させる。
- Mirasol処理は、TRALIの発生に関連するとみられるBRMsの生成を抑制する。
- Mirasol技術は、生存能力を持った白血球の輸注、蓄積された炎症メディエーターによる汚染、ならびに細胞関連ウイルスへの感染の可能性を効果的に抑制する。こうした機能は、臨床においても重要な利点であると考え得る。

References

1. Schroeder ML. Transfusion-associated graft-versus-host disease. *Br J Haematol*. 2002;117:275-287.
2. Lee TH, Pagliaroni T, Utter GH, et al. High-level long-term white blood cell microchimerism after transfusion of leukoreduced blood components to patients resuscitated after severe traumatic injury. *Transfusion*. 2005;45:1280-1290.
3. Utter GH, Reed WF, Lee TH, Busch MP. Transfusion-associated microchimerism. *Vox sang*. 2007;93:188-195.
4. Toy P, Popovsky MA, Abraham E, et al. Transfusion-related acute lung injury: definition and review. *Crit Care Med*. 2005;33:721-726.
5. Silliman CC. The two-event model of transfusion-related acute lung injury. *Crit Care Med*. 2006;34(5 Suppl):S124-S131.
6. Heddle NM, Klama LN, Griffith L, et al. A prospective study to identify the risk factors associated with acute reactions to platelet and red cell transfusions. *Transfusion*. 1993;33:794-797.
7. Yazer MH, Podlosky L, Clarke G, et al. The effect of prestorage WBC reduction on the rates of febrile nonhemolytic transfusion reactions to platelet concentrates and RBC. *Transfusion*. 2004;44:10-15.
8. Rogers MA, Blumberg N, Saint SK, et al. Allogeneic blood transfusions explain increased mortality in women after coronary artery bypass graft surgery. *Am Heart J*. 2006;152:1028-1034.
9. Council of Europe Expert Committee in Blood Transfusion Study Group on Pathogen Inactivation of Labile Blood Components. Pathogen inactivation of labile blood components. *Transfusion Med*. 2001;11:149-175.
10. Ibojje J, Greiss MA, Urbaniak SJ. Limited efficacy of universal leucodepletion in reducing the incidence of febrile nonhaemolytic reactions in red cell transfusions. *Transfusion Med*. 2002;12:181-185.
11. Vamvakas EC. Is white blood cell reduction equivalent to antibody screening in preventing transmission of cytomegalovirus by transfusion? A review of the literature and meta-analysis. *Transfus Med Rev*. 2005;19:181-199.
12. Akahoshi M, Takamashi M, Masuda M, et al. A case of transfusion-associated graft-versus-host disease not prevented by white cell-reduction filters. *Transfusion*. 1992;32:169-172.
13. Fast LD, DiLeone G, Li J, et al. Functional inactivation of white blood cells by Mirasol treatment. *Transfusion*. 2006;46:642-646.
14. Fast LD, Marschner S, DiLeone G, et al. Inactivation of human WBCs in RBC products using the Mirasol® system for whole blood. In: Abstracts of the American Society of Hematology 49th Annual Meeting and Exposition December 8-11, 2007; Atlanta, GA, USA.
15. Fast LD, DiLeone G, Cardarelli G, et al. Mirasol PRT treatment of donor white blood cells prevents the development of xenogeneic graft-versus-host disease in Rag2-/-gammac-/- double knockout mice. *Transfusion*. 2006;46:1553-1560.
16. Data on file. Navigant Biotechnologies LLC.
17. Sachs UJ, Hattar K, Weissmann N, et al. Antibody-induced neutrophil activation as a trigger for transfusion-related acute lung injury in an ex vivo rat lung model. *Blood*. 2006;107:1217-1219.
18. Ambuso DR, Thurman G, Marschner S, et al. Mirasol™ pathogen reduction of packed red blood cells (PRBCs) and apheresis platelet (Aplii) concentrates decreases neutrophil priming activity generated during storage. In: Abstracts of the American Society of Hematology 49th Annual Meeting and Exposition December 8-11, 2007; Atlanta, GA, USA.
19. Pelszynski MM, Morell G, Luban NL, et al. Effect of gamma irradiation of red blood cell units on T-cell inactivation as assessed by limiting dilution analysis: implications for preventing transfusion-associated graft-versus-host disease. *Blood*. 1994;83:1683-1689.
20. Luban NL, Drobler D, Morell G, Quinones R. Irradiation of platelet components: inhibition of lymphocyte proliferation assessed by limiting-dilution analysis. *Transfusion*. 2000;40:348-352.

第 6 章

Mirasol 処理した血小板製剤の品質

MIRASOL®

病原体不活化技術

Mirasol 処理した血小板製剤の品質

血小板輸血の主目的は、患者の止血機能を回復させるために十分な機能のある血小板を供給することにある。紫外線（UV）光を利用した病原体不活化技術（PRT）はいずれも血小板の生理に影響を及ぼすので、PRT 処理した血小板が生存能と機能性を確実に保持しているようにすることが極めて重要である。採取後の血小板の二次的取扱は、*in vitro* 試験で認められているとおり、どんなものであっても活性化を誘発し、血小板の生化学的および細胞学的状態の複合的变化である血小板保存損傷を加速化し得る。この損傷の程度は、*in vivo* での血小板のリカバリーと生存性ならびに輸血後の止血活性の低下と相関するとされている。

In vitro 試験の結果

In vivo アッセイの複雑さと費用を考えると、血小板の生存能と止血機能を定期的に直接測定するためにこれを利用することは不可能である。このように定期的な直接試験を行えないということは、血液の安全性のための処理が血小板機能を損なわないことが証明されていなければならないことを意味する。私たちはこれまで、Mirasol 処理後の血小板の品質を評価するために広範にわたる細胞品質アッセイパネルを利用してきた。このパネルは部分的に、BEST（Biomedical Excellence for Safer Transfusions；より安全な輸血のための生物医学的卓越性）委員会の勧告や血小板検査に関するその他の業界ガイドラインに基づいている。

Mirasol 処理した血小板については *in vitro* および *in vivo* の評価が行われてきており、また Mirasol 処理血小板の臨床成績が現在、血小板減少症患者の大規模臨床試験で評価されている。本章で述べる結果はいずれも血漿中の血小板について得られたものであり、血小板添加溶液（PAS）中の血小板を評価する試験が現在進行中である。

血小板の品質と性能

単一の *in vitro* パラメータで血小板の *in vivo* 生存能を予測できるものは存在しないが、多くの標準的パラメータをモニターすれば、血小板品質の全体像を把握することが可能である。血小板品質を評価するための特異的 *in vitro* 検査の利用についてはまだコンセンサスが得られていないが、正常な円盤形からの形状変化の程度を光度計で測定した形態や低張ショック反応（HSR）といった一定の特徴は、実際に *in vivo* 生存能とよく相関する。これらのアッセイはまずまずの感度で、確実かつ再現性のある実施が可能であることが複数の研究によって示されている。また、乳酸塩の産生と pH が放射標識した血小板のリカバリーおよび生存性と高度に相関することが、健康な被験者において確認されている。

Mirasol処理血小板の研究は、Trima®アフェレーシス血小板濃厚液（APC）とバフィーコート血小板濃厚液（BCPC）の両方を用いての5日間の保存を通じたin vitro細胞品質試験として実施されている。実施アッセイには、平均血小板容積（MPV）の変化、血液ガス（pO₂およびpCO₂）、pH、乳酸塩とグルコースの濃度、P-セレクチン発現、血小板スワーリング、HSRおよびESCが含まれる。いずれのアッセイも、標準的なバリデーション済みのプロトコルに従って実施された。その結果を表1にまとめている。

代謝に関する結果

- Mirasol 処理血小板は5日間の保存を通じて標準的な pH 基準に適合する。
- Mirasol 処理血小板は未処理の血小板と比較して高い代謝率を示し、グルコースの消費と乳酸塩の産生が多い。この結果は APC と BCPC で同様である。
- Mirasol処理血小板は、pO₂レベルが大気レベルを下回り、最低 10 mmHgを超えていることで示されているとおり、酸素を消費し続け、酸化的呼吸によるATP産生能を保持する。

In vitro 試験の結果は、Mirasol 処理血小板が品質と性能を維持し、輸血の時点で求められる *in vitro* の pH 基準を満たすことを実証している。

表 1. 5 日間保存後の in vitro 結果のまとめ

細胞品質パラメータ	単位	対照 APC (N=20)	Mirasol 処理 APC (N=12)	対照 BCPC (N=6)	Mirasol 処理 BCPC (N=12)
代謝パラメータ					
pH (22°C)	NA	7.48 ± 0.06†	7.14 ± 0.09	7.44 ± 0.07	7.06 ± 0.23
乳酸塩産生率	mmol/10 ¹² /hour	0.032 ± 0.006	0.059 ± 0.012	0.023 ± 0.003	0.075 ± 0.025
グルコース消費率	mmol/10 ¹² /hour	0.019 ± 0.004	0.034 ± 0.005	0.04 ± 0.009	0.042 ± 0.012
pO ₂	mmHg	54 ± 15	48 ± 20	61 ± 27	41 ± 22
pCO ₂	mmHg	26 ± 3	28 ± 5	25 ± 6	32 ± 8
活性化パラメータ					
P-セレクチン発現	%	17.9 ± 7.0	57.8 ± 14.8	11.7 ± 2.6	57.3 ± 9.6
形態パラメータ					
スワーリング	NA	3 ± 0‡	3 ± 0	3 ± 0	3 ± 0
HSR	%	72.3 ± 10.9	67.0 ± 7.3	ND	65.3 ± 9.3
ESC	%	24.7 ± 4.3§	20.4 ± 4.8	ND	17.8 ± 3.8
MPV	fL	6.4 ± 0.6	6.5 ± 0.6	ND	8.1 ± 0.6

[†]表中の数値は平均±標準偏差である; ^{*}N=17; [‡]N=36。

APC: アフェレーシス血小板濃厚液; BCPC: バフィーコート血小板濃厚液; ESC: 形状変化程度;
HSR: 低張ショック反応; MPV: 平均血小板容積; NA: 該当なし; ND: 測定せず。

活性化に関する結果

- Mirasol 処理血小板では P-セレクチン濃度がわずかに上昇しており、これは活性化レベルの上昇を示すが、そのレベルは輸血時点で通常認められる範囲に収まっている。

他のパラメータに関する結果

- Mirasol 処理血小板の 5 日間保存後の平均 ESC 値は 15~20% である。ESC が 10~30% であれば *in vivo* リカバリー範囲が 40~70% となることから、Mirasol 処理血小板の *in vivo* リカバリーは臨床的性能の許容範囲内に収まっているといえる。
- Mirasol 処理血小板と対照血小板の 5 日間保存後の平均 HSR 値はともに 65~70% である。40~50% の HSR は 40~70% の *in vivo* リカバリーと相関するため²、Mirasol 処理血小板の *in vivo* リカバリーは臨床的性能の許容範囲内に収まっているといえる。

血小板の機能性

血小板が機能性を維持するためには、その凝固活性化能と同時に接着性と凝集性が保持されていなければならない (表 2 を参照)。血小板の機能性維持の調査には、フローサイトメトリーと灌流という 2 つの方法が用いられた。

フローサイトメトリーによる一次評価

この試験では、輸血に通常用いられる標準的血小板濃厚液と同等の抗原および活性化指標の変化が示された (表 2 および 3 ならびに図 1A~E を参照)。

灌流による二次評価

血小板機能の調査方法として確立している灌流試験でも血小板の評価が行われた。健康なボランティアから採取した血液に抗凝固剤を添加し、白血球と血小板を除去した。Mirasol 処理および対照血小板のサンプルを添加し、*in vivo* の循環条件をシミュレートするため、血液を灌流システム (酵素的に剥離した家兔大動脈の断片を備えた中心ポンプを含むチャンバー) に 10 分間循環させた。

次いで大動脈断片を組織学的に検査し、処理および未処理血小板と大動脈の内皮下層との相互作用を判定した。

その結果は以下のとおりであった (結果は血小板が血管表面を覆っているパーセンテージ

で表されている)。

- 0 日目：未処理の血小板で実施した灌流試験は、大動脈断片の血小板被覆率が 25.7%であることを示した。Mirasol 処理血小板では血小板被覆率が 5.19%のなだらかな低下を示した (図 2 参照)。
- 5 日目：Mirasol 処理血小板では未処理血小板と比較して内皮下層に対する血小板の反応性がわずかに上昇していた。

表 2. 血小板の機能性に関連する要因

特性	評価パラメータ
接着性	F21 血小板 GPIIb vWF
凝集性	血小板 GPIIb-IIIa 血小板 GPIV フィブリノーゲン vWF フィブロネクチン
凝集メカニズム活性化能	P-セレクチン (活性化抗原) LIMP (活性化抗原) アネキシン V 結合 (アポトーシスマーカー) 第 Va 因子 (アポトーシスマーカー)

GP: 糖タンパク質; LIMP: ライソゾーム完全膜タンパク質; vWF: フォン・ヴィレブランド因子。

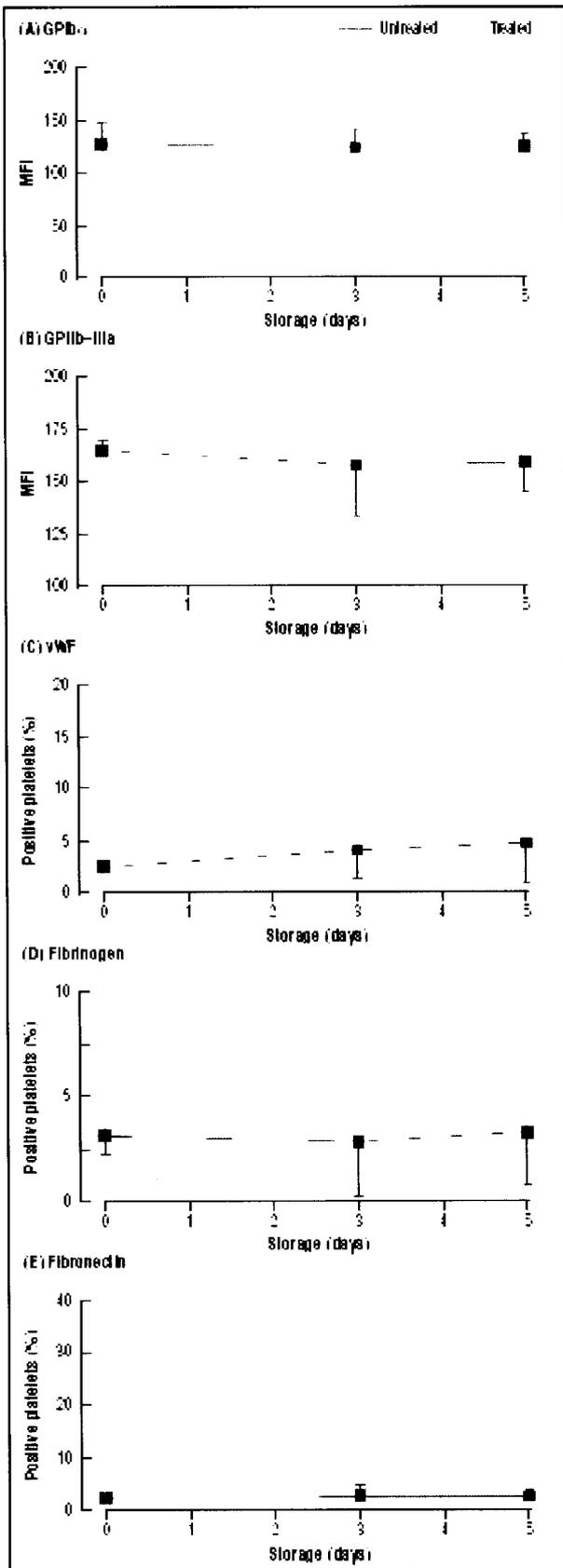


図 1A~E. 5 日間保存中の未処理および Mirasol 処理血小板に対する (A) GPIb α ; (B) GPIIb-IIIa; (C) vWF; (D) フィブリノーゲン; (E) フィブロネクチン存在下でのフローサイトメトリー試験 (平均 \pm SD, n=8)。

フローサイトメトリーと灌流試験は、Mirasol 処理血小板が未処理血小板と同等の接着性および凝集性を保持していることを示している。5 日目には Mirasol 処理血小板の接着機能が未処理血小板と比較してわずかに上昇していた。

ミトコンドリアの完全性と機能性

ミトコンドリアはアポトーシスに重要な役割を果たすことが示されており、少なくとも 1 つのアポトーシスカスケードはミトコンドリア膜電位の破綻が引き金になることが知られている。これは、血小板保存損傷に関連する多くのアポトーシス現象の基礎にミトコンドリア機能の変化が存在し得ること⁹、およびミトコンドリアの機能性維持が血小板保存損傷の最小化にとって重要な要因となることを示唆している。

Mirasol 処理は解糖流量を増加させることが以前の研究によって示されており、これはミトコンドリアの損傷および/またはアデノシン三リン酸 (ATP) 消費の増加が原因であるという仮説が立てられていた。これにはさらなる研究が必要であったところ、Mirasol 処理血小板におけるミトコンドリア機能と酵素活性を 7 日間という保存期間にわたり評価する試験が、いくつかの方法 (JC-1 シグナル、MTT アッセイ、pH および血小板 ATP 含量) を用いて実施された。

その結果は以下のとおりであった。

- JC-1 シグナルはミトコンドリア膜電位測定値であり、分極と脱分極のパーセンテージを評価する。保存中の対照および Mirasol 処理血小板のミトコンドリア膜電位に有意差は認められなかった (図 3 を参照)。
- ミトコンドリアの酵素活性の測定に用いられる MTT アッセイでは、Mirasol 処理血小板における活性測定値が 1 日目と比較して保存終了時には 15% 低下していることが示された。この低下は保存中のもっと早い時点では明らかではなかった。対照の未処理血小板に対する MTT アッセイでは、1 日目と比較して 7 日目には活性が約 10% 上昇していることが示された。ただし、この結果はミトコンドリアの酵素活性の上昇を示しているのではなく、単にアッセイ方法のばらつきによるものである可能性がある。とは言え、この結果はミトコンドリアの酵素活性が Mirasol 処理の直後から最大保存 7 日目まで保持されることを示唆している (図 4 を参照)。
- Mirasol 処理血小板は、対照血小板と比較して中等度であるが有意な pH 低下促進と ATP 含量の減少を示した (表 4 を参照)。

表 3. In vitro 試験: フローサイトメトリーの結果。

因子	対照	Mirasol 処理 (6.2 J/mL)	有意差
GPIIb	0 日目から 5 日目まで安定	0 日目から 5 日目まで安定	有意差なし
GPIIb-IIIa、GPIV	0 日目から 5 日目まで安定	0 日目から 5 日目まで安定	有意差なし
vWF、フィブリノーゲン、フィブロンectin	0 日目から 5 日目まで安定	0 日目から 5 日目まで安定	有意差なし
P-セレクチン、LIMP	保存中に進行性かつ有意に上昇 曝露後に有意に上昇	保存中に進行性かつ有意に上昇	活性化パラメータ発現率が有意に上昇
アネキシン V 結合レベル	0 日目から 5 日目まで安定	0 日目から 5 日目まで安定	有意差なし
第 Va 因子	保存中に進行性かつ有意に上昇	保存中に進行性かつ有意に上昇	有意差なし

GP: 糖タンパク質; LIMP: ライソゾーム完全膜タンパク質; vWF: フォン・ヴィレブランド因子。

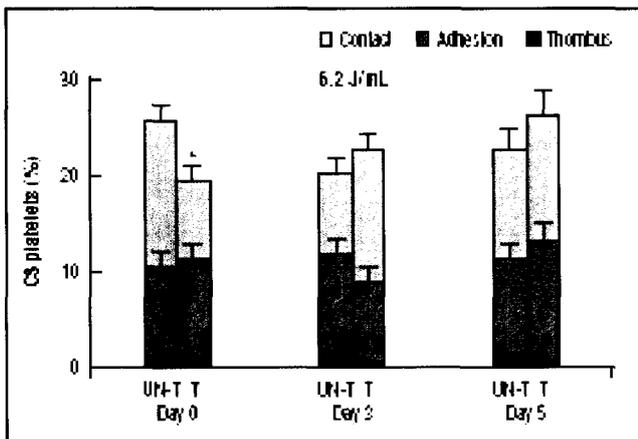


図 2. 5 日間の保存中の未処理血小板 (UN-T) および Mirasol 処理血小板 (T) の接触、接着および血栓形成のパーセンテージで分類した血小板による表面被覆 (CS) パーセンテージ (平均 ± 平均の標準誤差, n=8, * UN-T に対して p<0.05)。

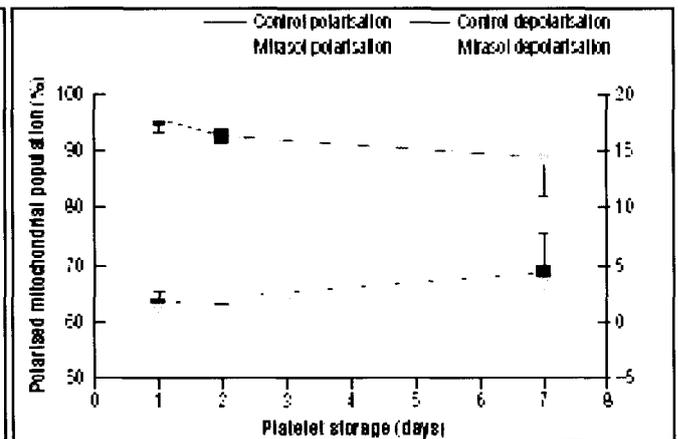


図 3. JC-1 染色アッセイを用いたミトコンドリア膜電位の測定

以上の結果は、Mirasol 処理がミトコンドリアの構造および機能の完全性を損なわないこと、ならびに処理血小板で観察された解糖流量と酸化的代謝の増加については ATP に対する要求の増大が推進力となっている可能性があることを示している。

続いての研究により、解糖流量の増加は保存損傷発生中の血小板の形態変化と自発的活性化の直接的な原因ではないことが示されている。その結果はまた、グルコース利用の低下は実際に保存中の血小板の損失を増大させ得ることも示唆している。

Mirasol 処理はミトコンドリアの機能的完全性と活性を変化させない。

In vivo の生存性およびリカバリー試験からの結果

あるランダム化一重盲検交差試験において、Mirasol 処理したアフエーシス血小板と未処理血小板の有効性を比較した。すなわち、健康な被験者 24 人から採取した白血球減少アフエーシス血小板を 5 日間保存し、処理の前後と保存期間中に微生物学的、in vitro および in vivo 分析を実施した。

放射標識して被験者に再注射した後、再注射から 3 時間以内、その後 1 週間は毎日、および再注射から 10 日目に新たな血液サンプルを採取した。In vitro 分析には、血小板濃度、グルコースおよび乳酸塩濃度、単位 pH、 pO_2 および pCO_2 、CD62/P-セレクチンの発現、ならびに血小板の形態（スワーリングスコア）が含まれた。元のドナーに再注射した血小板の生存性およびリカバリー率の計算も実施された（図 5 を参照）。

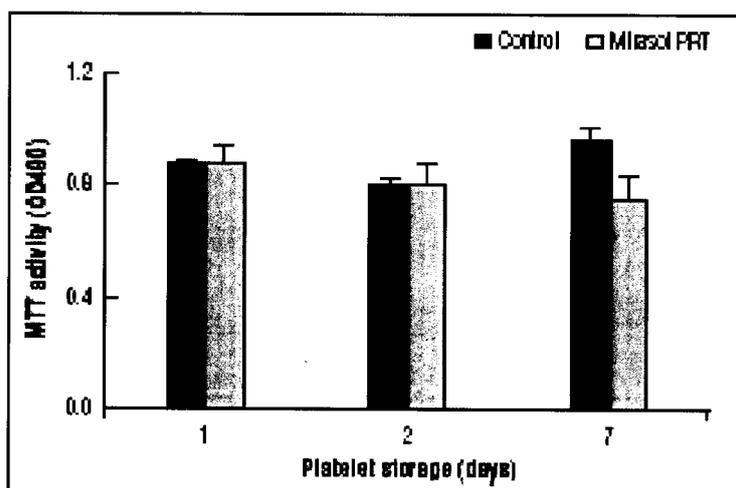


図 4. MTT 低下アッセイを用いたミトコンドリアの酵素活性の評価

数値は平均±SD で表している。7 日目の試験サンプルと対照サンプルの間に有意差が認められた。

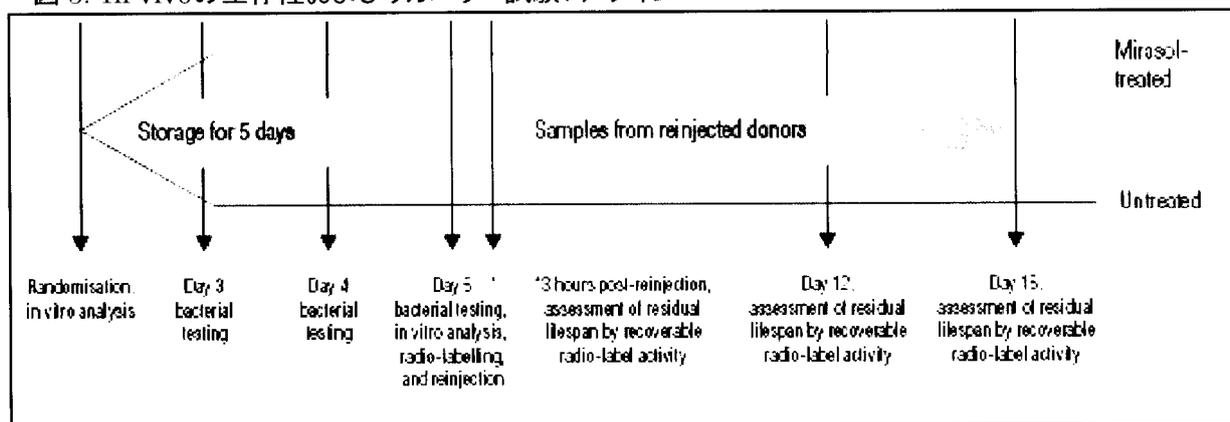
SD: 標準偏差。

表 4. 血小板のミトコンドリアに対する Mirasol 処理の即時的効果

変数	対照 (n=5)	Mirasol PRT (n=7)
pH, 22°C	7.45 ± 0.02	7.51 ± 0.06
ミトコンドリア 分極 (%)	94.7 ± 1.8	95.9 ± 1.7
脱分極 (%)	1.5 ± 1.0	1.0 ± 1.2
MTT (OD490)	0.875 ± 0.027	0.885 ± 0.055
ATP (μmol/10 ¹¹ PLT)	5.08 ± 0.72	4.64 ± 0.93

試験したいずれの変数についても、対照血小板と処理血小板の間に有意差は認められなかった。ATP：アデノシン三リン酸

図 5. In vivoの生存性およびリカバリー試験: デザイン¹



その結果から以下のことが明らかとなった。

- いずれの被験者も試験への参加に関連した有害事象を経験することはなく、血小板の再注射はいずれも十分に忍容された。
- すべてのユニット培養は陰性で、総血小板数は無変化のままであった。
- Mirasol 処理ユニットは、グルコース消費の増加、グルコース濃度の低下および乳酸塩濃度の上昇を示した (図 6A および 6B)。
- 保存期間終了時にはすべてのユニットでグルコースの残存が認められた¹。
- pH はすべてのユニットで 6.8 を上回っていた (図 6C)。
- Mirasol 処理および未処理血小板はともに保存期間中に pO₂ および pCO₂ の低下を示した (図 6D および 6E)。pO₂ レベルについては、未処理および Mirasol 処理ユニットの間に有意差は認められなかった。処理群における処理前の pCO₂ レベルは未処理群よりも有意に低かったが、保存終了時には有意に高くなった。

- P-セレクチンの発現は Mirasol 処理および未処理血小板の両方で保存期間を通じて増大しており、5 日目には Mirasol 処理ユニットの方が未処理ユニットよりも高くなっていた。
- 血小板スワーリングは保存開始時には差がなかったが、5 日目には処理ユニットの方が低くなった。

この試験により、処理血小板のリカバリーと生存性の平均は未処理ユニットより低いものの（表 5 を参照）、*in vivo* の有効性は十分に保持されていることが示され、臨床的有用性が推認された。

In vivo 試験の有望な結果は、Mirasol 処理血小板が十分に臨床使用できるだけの生存能と有効性を保持しており、*in vivo* でのリカバリーおよび生存性基準を満たしていることを示しており、これが臨床研究の根拠となった。

表 5. 放射標識試験の結果

	対照	処理	p 値
放射能収集効率 (%)	64.2 ± 17.2	59.5 ± 21.2	>0.05
リカバリー (%)	66.5 ± 13.4	50.0 ± 18.9	<0.05
生存性 (複数ヒット、時)	142 ± 26	104 ± 26	<0.05

¹¹¹ Inによる放射標識と自家再注射の 5 日目の結果。結果は対照サイクルからの 22 所見および処理サイクルからの 24 所見を示している。

臨床試験の結果

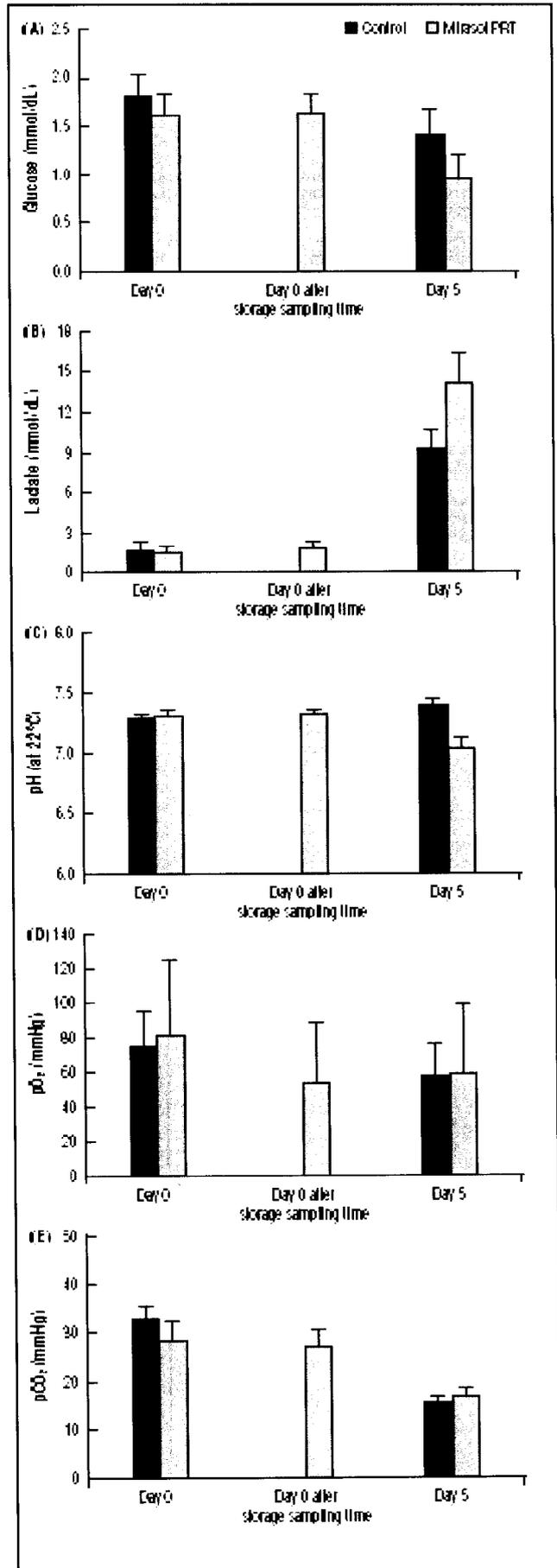
血小板減少症患者における Mirasol 処理血小板の臨床的有効性を調べるため、多施設、非盲検、対照臨床試験が現在フランスの 6 カ所で実施されている（MIRACLE 試験、第 8 章を参照）。患者には通常の臨床条件下で Mirasol 処理血小板濃厚液（試験コホート）または未処理の標準的血小板濃厚液（参照コホート）のいずれかを投与する。血小板成分は最大 5 日間保存することが許される。輸血から 1 時間後に測定した補正血小板増加数（CCI_{1時間}）と血小板濃厚液の注入に対する反応としての重大有害事象が、処理および未処理血小板濃厚液で比較される。輸血から 4 週間後までの、輸血関連感染症の発生など、血小板輸血に関連した有害事象による試験中止の発生率、ならびにその回数および輸血からの時間をモニターおよび比較することにより、Mirasol 処理血小板の性能、安全性および忍容性がさらに評価される。

図 6A~E. In vitro 分析の結果

要約

- In vitro 試験の結果は、Mirasol 処理血小板が品質と性能を維持し、輸血の時点で求められる in vitro の pH 基準を満たすことを実証している。
- フローサイトメトリーと灌流試験は、Mirasol 処理血小板が未処理血小板と同等の接着性および凝集性を保持していることを示している。
- 5 日目には Mirasol 処理血小板の接着機能が未処理血小板と比較してわずかに上昇していた。
- Mirasol 処理はミトコンドリアの機能的完全性と活性を変化させない。
- In vivo 試験の有望な結果は、Mirasol 処理血小板の臨床研究の根拠となった。
- Mirasol 処理血小板は十分に臨床使用できるだけの生存能と有効性を保持しており、in vivo でのリカバリーおよび生存性の基準を満たしていた。

0 日目 : Mirasol 処理の前に検査 ; 0 日目の後 : Mirasol 処理の直後に検査 ; 5 日目 : 保存 5 日目に検査。



References

1. AuBuchon JP, Herschel L, Roger J, et al. Efficacy of apheresis platelets treated with riboflavin and ultraviolet light for pathogen reduction. *Transfusion*. 2005;45:1335-1341.
2. Goodrich RP, Edrich RA, Li J, et al. The Mirasol™ PRT system for pathogen reduction of platelets and plasma: an overview of current status and future trends. *Transfus Apher Sci*. 2006;35:5-17.
3. Li J, Goodrich L, Hansen E, et al. Platelet glycolytic flux increases stimulated by ultraviolet-induced stress is not the direct cause of platelet morphology and activation changes: possible implications for the role of glucose in platelet storage. *Transfusion*. 2005;45:1750-1758.
4. Holme S, Moroff G, Murphy S. A multi-laboratory evaluation of in vitro platelet assays: the tests for extent of shape change and response to hypotonic shock. *Transfusion*. 1998;38:31-40.
5. Pieterz RNI, Engelfriet CP, Reesink HW. Evaluation of stored platelets. *Vox Sang*. 2004;86:203-223.
6. Goodrich RP, Li J, Pieters H, et al. Correlation of in vitro platelet quality measurements with in vivo platelet viability in human subjects. *Vox Sang*. 2006;90:279-285.
7. Li J, De Korte D, Woolum MD, et al. Pathogen reduction of buffy coat platelet concentrates using riboflavin and light: comparisons with pathogen-reduction technology-treated apheresis platelet products. *Vox Sang*. 2004;87:82-90.
8. Perez-Pujol S, Tonda R, Lozano M, et al. Effects of a new pathogen-reduction technology (Mirasol PRT) on functional aspects of platelet concentrates. *Transfusion*. 2006;45:911-919.
9. Verhoeven AJ, Verhaar R, Gouwerok EG, et al. The mitochondrial membrane potential in human platelets: a sensitive parameter for platelet quality. *Transfusion*. 2006;45:82-89.
10. Li J, Lookerbie O, de Korte D, et al. Evaluation of platelet mitochondria integrity after treatment with Mirasol pathogen reduction technology. *Transfusion*. 2006;45:920-925.
11. Data on file. Navigant Biotechnologies LLC.

第7章

Mirasol 処理した血漿の品質

MIRASOL®

病原体不活化技術

Mirasol 処理した血漿の品質

血漿は全血の遠心分離または単一ドナーの血漿アフエレーシスによって得られ、凍結成分として配送および保存される。全血またはアフエレーシス採取から調製され、8時間以内に凍結保存された血漿は新鮮凍結血漿（FFP）と呼ばれる。

血漿の使用法

血漿は治療的価値の高い多様な有機および無機成分を含有し、FFP は多くの後天性凝固障害、特に複数の抗凝固タンパク質を低下させる凝固障害に最適な第一選択治療となる。FFP はまた、適当な濃厚液が存在しない単一凝固因子（たとえば第 V または第 XI 因子）欠乏症、急性播種性血管内凝固、血栓性血小板減少性紫斑病（TTP）における血漿交換、ならびにワルファリン作用の打ち消し、肝疾患、心肺バイパス、および大量輸血の一部の症例にも適応となる。しかし、第 VIII 因子、アルブミンおよび免疫グロブリンといった特定血漿成分を注射または輸血するためには分離、精製および調製が必要であるため、臨床診療における FFP の使用は制限されている。

新鮮凍結血漿に関連して起こり得る有害反応

血漿タンパク質の複雑さ、免疫グロブリン含量の不均一性、および処理と保存に関する要因により、FFP は広範な病態生理学的反応を引き起こす可能性がある（表 1 を参照）。

FFP は多様な重大病理学的反応を引き起こす可能性がある。これを避けるためには、FFP は感染性病原体や白血球汚染物質を含んでいてはならない。

表 1. 新鮮凍結血漿に対する有害反応

免疫介在性
同種免疫：Rh 1 (D) およびその他の赤血球抗原に対する抗体
アレルギー反応：IgA 欠乏症を除いて通常は原因アレルゲンが特定されない
TRALI：白血球凝集素および BRM
免疫修飾/免疫抑制
血漿汚染物質関連
ドナー特異的：投薬、感染
処理/保存特異的：サイトカイン類（FNHTR）、アナフィラトキシン
感染性汚染物質関連
非白血球関連：HIV、HBV、HCV、HAV、EBV、HHV-8、プリオン
物理化学的特徴および臨床使用関連
容量過負荷

BRM: 生物反応修飾物質; EBV: エプスタイン-バーウイルス; FNHTR: 熱性非溶血性輸血反応; HAV: A

型肝炎ウイルス:HBV:B型肝炎ウイルス;HCV:C型肝炎ウイルス;HHV:ヒトヘルペスウイルス;HIV:ヒト免疫不全ウイルス;Ig:免疫グロブリン;Rh:アカゲザル;TRALI:輸血関連急性肺障害。

血漿成分の品質要件

治療用血漿は安全である（すなわちウイルス、細菌および寄生虫を含んでいない）だけでなく、臨床的に有効であるためには、できるだけ新鮮血漿に近いレベルの凝固因子およびプロテアーゼ阻害物質を含有していなければならない。

血漿および血漿成分の品質にはいくつかの要因が影響し得る。FFPの品質は血漿の採取と保存の迅速性によって決まる。全血献血から分離され、採取から24時間以内に -18°C 以下に凍結された血漿（FP24）は、関連凝固活性を良好に保持している。しかし、8時間以内に凍結されたFFPに関する過去の記録と比較すると、FP24に含まれるフィブリノーゲン、第V因子、第VIII因子および第XI因子のレベルはそれぞれ12%、15%、23%および7%低下していることが示されている。

血漿の品質要件は各種ガイドラインに記されているが、それはかなり限定的なもので、主として第VIII因子と総タンパク質に関するものである。FFPが処方される患者の大部分は第VIII因子のレベルが正常または高いという事実にもかかわらず、これが現実である。

現在のFFPの品質管理は第VIII因子の測定値に基づいて行われており、欧州評議会（CE）のガイドラインはこれが 0.70 IU/mL を超えていることを要求し、英国のガイドラインはユニットの75%がこの第VIII因子レベルを満たしていなければならないと規定している。

ただ、これらはガイドラインであって明確な規則ではない点に注意が必要である。欧州のガイドラインを図1にまとめている。ほとんどの国はこのガイドラインに従っているが、多くは各地に特有の輸血サービスのための独自の特定ガイドラインまたは勧告の参考として利用しているに過ぎない。たとえば英国の国立血液サービスは、血漿成分について完全に別個の要件リストを確立している。

さらに、市販の病原体不活化FFP成分にはそれぞれ特有のガイドラインが存在する（表2を参照）。たとえば溶剤-洗浄剤（SD）処理FFPとメチレンブルー（MB）処理FFPとでは性能規格が異なっている。FFPに関するCEガイドラインは、毎月のルーチンの品質管理において第VIII因子の濃度が新鮮血漿成分の70%（ 0.70 IU/mL と解される）であることを求めている。英国のガイドラインは、SD処理FFPについては第VIII因子のレベルが 0.5 IU/mL 超であることを要求するのに対し、MB処理FFPについてはユニットの75%の第VIII因子レベルが 0.5 IU/mL 超であることが必要とされている。

図 1. 新鮮凍結血漿に関する欧州のガイドライン

- ・ 血漿は解凍後ただちに使用する。
- ・ 血漿は-25°C 以下に保持するなら最大 36 カ月間保存できる。
- ・ 第 VIIIc 因子の平均活性は 0.70 IU/mL 超でなければならない。
- ・ 総タンパク質は 50 g/L 超でなければならない。
- ・ 適応となるのは、凝固障害における使用、血栓性血小板減少性紫斑病の治療、および血漿分画の原料としての使用である。

表 2. 新鮮凍結血漿の規格ガイドラインの比較

	EU評議会 第 13 版 FFP ⁴	Paul Ehrlich Institut FFP ⁸	EC指令 ⁶	UK FFP ⁵	UK SD-FFP ⁵	UK MB-FFP ⁵	欧州薬局方 SD-FFP ⁹	Mirasol -FFP ⁷
第 VIIIc 因子	0.7 IU/mL 以上または 新鮮血漿の 70%以上	新鮮血漿の 70%超	新鮮血漿の 70%以上	75% >0.7 IU/mL	>0.5 IU/mL	75% >0.5 IU/mL	≥0.5 IU/mL	75% >0.5 IU/mL
第 V 因子	NA	>70%	NA	NA	≥0.5 IU/mL	≥0.5 IU/mL	≥0.5 IU/mL	≥0.5 IU/mL
活性化凝固 因子	NA	NA	NA	NA	NA	NA	150 秒以上	NA
赤血球	<6.0×10 ⁹ /L	<6.0×10 ⁹ /L	<6.0×10 ⁹ /L	NA	NA	NA	NA	<15×10 ⁹ /L
白血球	<0.1×10 ⁹ /L	<0.5×10 ⁹ /L	<0.1×10 ⁹ /L	NA	NA	NA	NA	<1.0×10 ⁹ /L
血小板	<50×10 ⁹ /L	<20×10 ⁹ /L	<50×10 ⁹ /L	NA	NA	NA	NA	<1.2×10 ⁹ /L
タンパク質	≥50 g/L	NA	≥50 g/L	≥50g/L	NA	NA	≥45 g/L	≥50 g/L

FFP: 新鮮凍結血漿; IU: 国際単位; NA: 該当なし; 赤血球。

Mirasol 処理 FFP について私たちは、SD-FFP や MB-FFP について行われてきたのと同じように、最終的に（第 VIIIc 因子、フィブリノーゲンおよび総タンパク質について）血液バンク標準品に組み込まれる成分性能に規格制限を設けている。社内品質管理で Mirasol 処理 FFP に用いている規格は以下のとおりである。

- 血漿ユニットの 75% の第 VIIIc 因子の活性が 0.5 IU/mL 超であること。
- 他のすべての因子の活性が 0.5 IU/mL 超であること。
- 抗トロンビン III、プロテイン C およびプロテイン S に有意な低下がないこと。
- フィブリノーゲン活性が 140 mg/dL 超であること。

- 総タンパク質が 50 g/L 超であること。

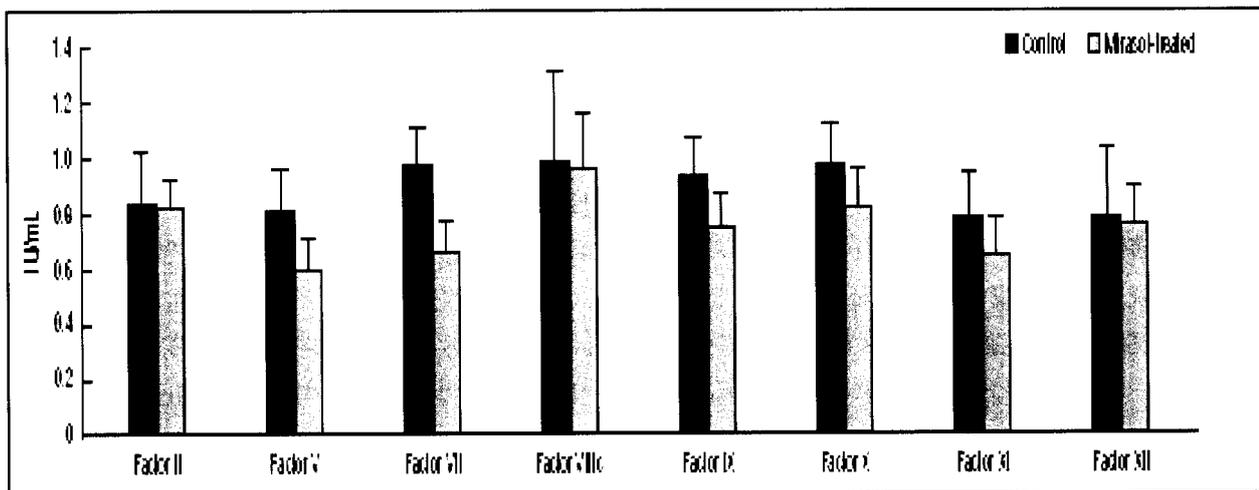
Mirasol 処理 FFP の規格は、他の病原体不活化血漿成分および未処理 FFP に用いられるものと同等である。

表 3. Mirasol 処理 FFP の保存 52 週目のタンパク質パラメータ

IU/mL	全血対照	全血処理	アフエレーシス対照	アフエレーシス処理	基準範囲
第 II 因子	0.8 ± 0.1	0.8 ± 0.1	0.9 ± 0.1	0.8 ± 0.1	0.65–1.54
第 V 因子	0.8 ± 0.1	0.6 ± 0.1	0.8 ± 0.1	0.6 ± 0.1	0.54–1.45
第 VII 因子	1.0 ± 0.2	0.7 ± 0.1	0.9 ± 0.1	0.6 ± 0.2	0.62–1.65
第 VIIIc 因子	1.1 ± 0.4	1.1 ± 0.2	0.8 ± 0.2	0.8 ± 0.1	0.45–1.68 (1 段)
第 IX 因子	0.9 ± 0.2	0.7 ± 0.1	0.9 ± 0.1	0.8 ± 0.1	0.45–1.48
第 X 因子	0.9 ± 0.1	0.8 ± 0.1	1.0 ± 0.2	0.9 ± 0.2	0.68–1.48
第 XI 因子	0.7 ± 0.2	0.6 ± 0.1	0.8 ± 0.2	0.7 ± 0.1	0.42–1.44
第 XII 因子	0.7 ± 0.3	0.7 ± 0.2	0.9 ± 0.2	0.8 ± 0.1	0.40–1.52

IU : 国際単位。

図 2. Mirasol 処理新鮮凍結血漿の保存 52 週目のタンパク質パラメータ



IU : 国際単位。

Mirasol 処理した血漿の品質

In vitro 試験

In vitro 試験では、Mirasol 処理 FFP が欧州の FFP 基準に適合したレベルで in vitro タンパク質品質を維持していることが示されている。追加的に、Mirasol 処理したアフエーシスおよび全血由来血漿成分の保存1年後の in vitro 血漿タンパク質活性を評価する試験も実施された（表 3、図 2 を参照）。

認定血液銀行施設でアフエーシスおよび全血から新鮮血漿を採取し、採取後 8 時間にわたり室温で保持した。使用したのは合計 14 ユニットの処理成分であった（容量範囲は 231 ~ 327 mL）。処理成分については、リボフラビンの最終濃度が約 50 μM となるよう、500 μM のリボフラビン溶液 35 mL と合わせて血漿を照射バックに入れた。このバッグを Mirasol 照射器に入れ、UV 光に曝露した (6.2 J/mL)。その後、血漿成分を -30°C にまで急速冷凍し、 -30°C のフリーザーに 52 週間保存した。この血漿を解凍し、標準的な凝固アッセイを用いて分析した。

In vitro の血漿タンパク質品質は、次の合格基準を満たしていた。すなわち、フィブリノーゲンは平均が 140 mg/dL 以上、第 II、第 V、第 VII、第 IX、第 X、第 XI 因子は平均が 0.6 IU/mL 以上、第 VIIIc 因子は平均が 0.8 IU/mL 以上、および総タンパク質は平均が 50 g/L 以上であった。69 週目には、プロテイン S の回収率（初期値の 100%超）、プロテイン C（初期値の 90%）、抗プラスミン（初期値の 94%）、抗トロンビン（初期値の 100%）の追加アッセイを指示した。処理サンプルは補体および免疫学的活性化の徴候を示さなかった。この試験で観察された結果は、Mirasol 処理 FFP が欧州のガイドラインに記されている未処理 FFP 成分の要件を満たすか、むしろ上回っていることを示唆している（表 4 および 5 を参照）。プロテイン C、プロテイン S、抗プラスミンおよび抗トロンビンの保持レベルは、他の不活化方法で認められるものを上回っていた。Mirasol 処理 FFP を -30°C で 1 年間保存した後のフォン・ヴィレブランド因子（vWF）抗原：活性比は 1.0 ± 0.3 であった。vWF 抗原：活性比が 1.4 未満であれば vWF の多量体分布は正常であるが、この比が 3.7 を超えると高分子量の多量体が損失していることになる（図 3 を参照）。現在進行中の試験では、vWF を切断する亜鉛含有メタロプロテアーゼである ADAMTS13（トロンボスポンジン 1 型モチーフ第 13 番を備えたメタロプロテイナーゼ・ディスインテグリン）の活性が Mirasol 処理によって有意に変化しないことが確認されている。この結果は、 -30°C での 1 年間の保存後にもフィブリノーゲンと第 VIIIc 因子が良好に維持されていることを示している。総合すると、以上のデータは Mirasol 処理 FFP が 1 年間の保存後にも欧州の FFP 基準を満たすレベルで in vitro タンパク質品質を維持していることを実証している。

Mirasol 処理 FFP は未処理 FFP 成分に関する欧州の現行タンパク質品質基準を満たしてい

る。

表 4. Mirasol 処理 FFP の保存 69 週目のタンパク質パラメータ

活性	全血対照 [†]	全血処理	アフエレーシ ス対照	アフエレーシ ス処理	基準範囲
プロテイン C	93.4 ± 10.6	83.0 ± 7.7	105.7 ± 27.6	96.0 ± 23.4	58-164
プロテイン S	65.0 ± 9.8	85.7 ± 18.6	92.3 ± 6.0	106.0 ± 15.1	56-168
抗トロンビン	83.0 ± 5.5	82.8 ± 6.9	87.0 ± 9.8	87.2 ± 8.4	72-145
プラスミノ ーゲン	80.8 ± 10.5	75.4 ± 10.3	79.7 ± 7.2	74.8 ± 6.9	68-144
抗プラスミン	99.6 ± 6.2	98.3 ± 6.2	101.3 ± 4.0	94.8 ± 6.3	72-132
プレカリクレ イン	111.1 ± 16.9	62.7 ± 9.6	124 ± 17.2	52.2 ± 22.7	65-135
高分子量キニ ノーゲン	89.5 ± 24.6	69.0 ± 12.8	99.2 ± 7.2	69.9 ± 21.0	65-135
フォン・ヴィレ ブランド因子 活性	125.6 ± 36.3	110.4 ± 52.4	99.2 ± 59.7	81.3 ± 39.6	50-150
フォン・ヴィレ ブランド因子 抗原	123.8 ± 31.4	91.2 ± 47.0	141.6 ± 41.7	108.3 ± 47.3	50-150

[†]対照データは保存 52 および 69 週目の未処理成分のものである。

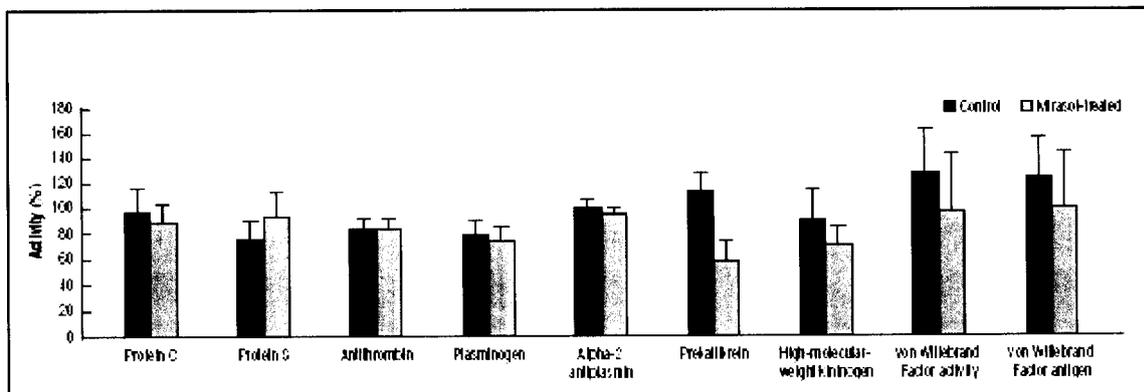


図 3. Mirasol 処理 FFP の保存 69 週目のタンパク質パラメータ

表 5. Mirasol 処理 FFP の保存 69 週目のタンパク質パラメータ

パラメータ	全血対照 [†]	全血処理	アフエレー シス対照	アフエレー ス処理	基準範囲
フィブリノーゲン (mg/dL) [§]	288.8 ± 59.6	219.9 ± 33.3	290.7 ± 4.7	211.0 ± 33.5	145–385
総タンパク質 (g/L) [§]	47.6 ± 2.9	51.3 ± 3.1	51.9 ± 4.8	53.6 ± 3.6	48–364
PAI-1 (IU/mL)	18.8 ± 12.5	7.8 ± 3.5	12.6 ± 11.4	18.8 ± 10.5	<31.1
D-二量体 (ng/mL)	158.4 ± 115.3	89.0 ± 0.0	103.3 ± 24.8	132.8 ± 87.5	<256
プロトロンビン断片 1 + 2 (pmol/L)	178.4 ± 61.0	161.1 ± 35.9	241.6 ± 79.9	265.8 ± 218.0	87–3325
トロンビン-抗トロンビン 複合体 (ng/mL)	2.0 ± 0.1	2.0 ± 0.0	2.0 ± 0.0	2.0 ± 0.0	<5.1
アルファ ₁ 抗トリプシン (mg/dL)	100.7 ± 14.7	97.5 ± 15.2	147.5 ± 9.1	110.4 ± 22.8	90–3200

[†]対照データは保存 52 および 69 週目の未処理成分のものである。

[§]処理データは保存 52 週目の処理成分のものである。

PAI: プラスミノゲン活性化因子阻害物質。

Mirasol 処理 FFP の機能面

さらなる研究により、Mirasol 処理 FFP が天然の抗凝固タンパク質として最も多い 3 種、すなわちプロテイン C、プロテイン S および抗トロンビンの活性を維持していることが示されている (表 6 を参照)。Mirasol 処理 FFP は抗凝固機能だけでなく免疫グロブリン (IgG と IgM) の量的および機能的活性も満足できるほどに保持しており、凝固亢進性障害のある患者の治療にも使用可能である。

Mirasol 処理 FFP は免疫グロブリンの機能的活性を保持していることも示されている (表 7 を参照)。この試験では、新鮮血漿を照射バッグに移して最終濃度が 50 μM となるようリボフラビンを添加し、この溶液に 10 J/cm² の UV 光を照射した。ここから照射の前後にサンプルを採取し、これをバッチ検査の前に冷凍した。このサンプルのジフテリア、破傷風および肺炎球菌の力価は基準範囲内に保持されていた (表 7 を参照)。破傷風、肺炎球菌およびジフテリアの力価の照射前: 照射後の比の平均はそれぞれ 0.66、0.72 および 1 以上であり、これは Mirasol 処理 FFP がジフテリア、破傷風および肺炎球菌の多糖体抗体の機能的活性を保持していることを示している。

Mirasol 処理には、献血時に残存していた白血球と関連病原体を不活化させる作用もある。これにより Mirasol 処理は、機能のある白血球の伝達、蓄積している炎症メディエーターへの曝露、および細胞内ウイルスによる感染を防ぐことができる (これに関する詳細は第 5 章を参照)。

Mirasol 処理 FFP は正常な抗凝固能と免疫能を保持している。

表 6. Mirasol 処理 FFP に含まれる抗凝固タンパク質の機能的活性(平均±標準偏差)

パラメータ	対照	処理	回収率 (%)
抗トロンビン III (IU/mL)	1.01 ± 0.07	0.99 ± 0.06	98
プロテイン C (IU/mL)	1.07 ± 0.10	1.04 ± 0.15	98
プロテイン S (IU/mL)	1.04 ± 0.13	1.01 ± 0.12	97

表 7. Mirasol 処理 FFP に含まれる免疫グロブリンの機能的活性(平均±標準偏差)

抗体	処理前	処理後	正常基準範囲
ジフテリア (IU/mL)	0.46 ± 0.35	0.53 ± 0.34	>0.01
破傷風 (IU/mL)	6.4 ± 6.0	4.2 ± 2.6	0.1–13.1
肺炎球菌 (IU/mL)	819 ± 707	587 ± 460	>200

要約

- FFP は多様な重大病理学的反応を引き起こす可能性がある。これを避けるためには、FFP は感染性病原体や白血球汚染物質を含んでいてはならない。
- Mirasol 処理 FFP の規格は、他の病原体不活化血漿成分および未処理 FFP に用いられるものと同等である。
- Mirasol 処理 FFP は欧州の現行のタンパク質品質基準を満たしている。
- Mirasol 処理 FFP は欧州の現行の抗凝固能および免疫能基準を満たしている。

References

1. Crookes RL, Hillyer CD. Fresh frozen plasma and related products. In: Hillyer CD, Silliterstein LE, Ness PM, et al., eds. *Blood Banking and Transfusion Medicine: Basic Principles and Practice*, 2nd ed. Philadelphia, PA: Churchill Livingstone/Elsevier; 2007:259–269.
2. Cardigan R, Lawrie AS, Mackie IJ, Williamson LM. The quality of fresh-frozen plasma produced from whole blood stored at 4°C overnight. *Transfusion*. 2005;45:1342–1349.
3. Solheim BG, Seghatchian J. Update on pathogen reduction technology for therapeutic plasma: an overview. *Transfus Apher Sci*. 2006;35:83–90.
4. Council of Europe. Guide to the preparation, use and quality assurance of blood components - 13th edition (2007). ISBN 978-92-871-6157-6. Available at: http://book.coe.int/EN/ticheoustage.php?PAGEID=36&lang=EN&product_id=2151 Accessed November 2007.
5. UK Blood Transfusion and Tissue Transplantation Services. Guidelines for the Blood Transfusion Service, 7th ed. Norwich, England: TSO (The Stationery Office); 2005.
6. EU Directive. Commission Directive 2004/33/EC of 22 March 2004 implementing Directive 2002/98/EC of the European Parliament and of the Council as regards certain technical requirements for blood and blood components.
7. Data on File. Navigant Biotechnologies LLC.
8. Heiden M, Seitz R. Quality of therapeutic plasma – requirements for marketing authorization. *Thromb Res*. 2000;107:547–551.
9. European Pharmacopoeia 5th Edition. 01:2007:1646 Human Plasma.
10. Buytaert-Hoelen KA, Hendrix BK, Gamp G, et al. Protein quality in Mirasol-treated fresh frozen plasma after one year in storage. Presented at the AABB Annual Meeting, Anaheim, USA, 20–23 October 2007.
11. Ramasamy I, Farrugia A, Tran E, et al. Biological activity of von Willebrand Factor during the manufacture of therapeutic factor VIII concentrates as determined by the collagen binding assay. *Biologicals*. 1998;26:155–166.
12. Larrea L, Calabuig M, Rivera J, et al. Influence of riboflavin photoinactivation treatment on coagulation factors from fresh frozen plasma. Presented at the ISBT XVIIIth Regional Congress Asia, Hanoi, Vietnam, 10–13 November 2007.
13. Kumar V, Motheral T, Luzniak G, et al. Mirasol™ Pathogen Reduction Technology: Riboflavin-based process retains functional activities of immunoglobulins. *Transfusion*. 2003;43(Suppl):90A.
14. Fast LD, DiLeone G, Li J, et al. Functional inactivation of white blood cells by Mirasol treatment. *Transfusion*. 2006;46:642–648.

第 8 章

臨床経験と将来における製品開発

MIRASOL®

病原体不活化技術

初期の臨床業務

初期の臨床研究は、処理済み血液製剤に関する体外のパラメータと体内におけるリカバリーならびに生存の相互関係を確立することを目的として設計されたものである。P-セレクチン発現量など、体内における血小板性能の測定値、循環における回復や生存など、体外の特徴を変更させるため、光エネルギーの放射ならびに添加剤の効果について測定を行った処理プロセスは、この研究結果に基づいて決定されたものである。

第2回の臨床試験は、初回の研究によって確定したMirasol処理の最善のパラメータを採用することにより、血小板の回復と生存を調査することを目的として設計された。体外における測定値にはいくらかの変更が加えられたものの、この臨床試験の結果、Mirasol処理済みの血小板は临床上において、標準濃厚血小板製剤と同様の特徴を持つことが結論づけられた。治験責任医師はこれらの2回にわたる研究に基づき、Mirasol処理済みの血小板は、患者を対象としてさらに研究を行うのが正当であると考えするのに十分なだけの実行可能性と機能性を維持していると結論づけた。Mirasol PRTシステムに関する臨床研究のうち、すでに完了したもの、ならびに現行の研究の結果を表1にまとめた。

表1. Mirasol PRTシステムに関する初期ならびに現行の臨床研究

プロトコル	被験者	被験者	場所	報告
CTS-0001/BCT02-09PET 血小板の自己回復と活着に関する評価 リボフラビン・ベースの光不活性化処理を実施	予備調査 体外における血小板パラメータと体内における血小板の回復ならびに生存率の相互関係を比較するため、血小板をTrima®アフェレーシス装置で収集し、リボフラビンを補充した光不活性化システムで加工した。その後、これに活性化抑制物質を加えたものと加えないものに分け、加工を行わない血小板とともにそれぞれ5日間保存した。	被験者 11名 サンプル 18	南アフリカ (2002年) ヨハネスブルグ	CTF-0002ならびに発行物1
CTS-0011 放射性標識血小板の回復と生存に対するMirasol処理の効果	設計検証研究 気温22°Cで5日間保存した後、放射性標識管理し、Mirasol処理を行った血小板の回復と生存を評価するため、無作為化クロスオーバー単盲検を実施した。	参加者 29名 評価実施 24名	アメリカ合衆国 (2003-2004年) 1) ニューハンプシャー州、レバノン	CFR-0003ならびに発行物2

			2) バージニア州、ノーフォーク	
CTS-0028 Mirasol処理を行った血小板輸血製剤の安全性と性能に関する評価 血小板減少性疾患の患者に関する研究	MIRACLEに関する臨床研究 多施設共同無作為オープン結果遮蔽試験の臨床設定において、Mirasol PRTシステムが安全に作動し、適切な血小板の動作を維持するか否かに関して判断するための対照研究を実施した。	CEマーケ ティング 向け：† 被験者 54名 参加者総 数： 被験者 118名 (Mirasol 部門に60 名、コント ロール部 門に58名)	フランス (2005-2007 年) 1) ストラス ブール 2) ブザンソ ン 3) ボルドー 4) グルノー ブル 5) リヨン 6) ナント	2007年9月10日 登録終了 データは2008 中に発表の予 定

MIRACLE (MIRAsol臨床評価)：

血小板減少症患者を対象とした臨床研究

MIRACLE (Mirasol®病原体不活性化技術による処理済み血小板輸血製剤の安全性、ならびに性能についての評価：血小板減少性疾患患者を対象とする) は現在、その最終段階にある。この多施設共同無作為オープン結果遮蔽試験の臨床設定の対照研究では、血小板輸血を必要とする二つの血小板減少症患者のグループの比較を行っている。

この研究の目的は、臨床設定においてMirasol処理済み血小板が安全に作用し、十分な動作を維持するか否かを判断することである。血小板輸血を必要とする血小板減少症患者を調査対象とし、輸血から1時間後に測定した補正血小板増加数(CCI_{時間})と、反応として発現した重篤有害事象 (SAEs) を比較することによって、これに関する評価を実施した。なお、輸血については処理済み (検査コンポーネント) ならびに未処理 (参考コンポーネント) の濃厚血小板製剤を比較の対象とした。輸血から4週間後までの期間、輸血関連の感染、輸血の回数や輸血の間隔などのほか、血小板輸血に関連した有害事象 (AEs) によって輸血が中止されたケースを監視し、比較することによって、Mirasol処理の動作、安全性、耐性に関するさらなる評価を行った。Gambro BCT, Inc.は、CEマークの取得申請に際して本研究の中間結果を報告している。†完全なデータセットは、2008年中に発表する予定である。

将来における臨床研究

Mirasol処理済みの不活性化病原体と白血球。

Mirasol処理は、病原体と白血球細胞（白血球）を不活性化する。Mirasol処理済みの血液製剤においては、血小板の機能性ならびに代謝活性、白血球活性の実質的な不活性化（単核細胞の増殖の抑制、サイトカイン生成の抑制、および抗原提示細胞としての活動の抑制）が維持される。体外検査、臨床前研究、ならびに患者を対象とした検査データによって、これらの効果が確認されている。これらのデータが示唆するのは、Mirasol処理を行った血液製剤は臨床上において、患者に対して適切、かつ有益な結果をもたらすと解釈し得る性能特性を示していることである。こうした結果は、臨床設定においては定量化することが難しい病原体の不活性化（病気感染ならびに感染性合併症の削減に対する潜在性など）がもたらす全般的な効果に加えて、さらに有益なものになるといえるだろう。また、これらの潜在的利点の正当性を確認するためには、具体的な結果判定法と対象患者数を定めたいうえで、臨床設定においてMirasol処理済み血液製剤の性能を評価する必要があるだろう。このため、複数の研究設計を行い、患者グループを設定し、詳細な調査を実施することとする。

Mirasol処理を行った血液製剤は臨床上において、病原体除去における利益のみならず、患者に適切、かつ有益な結果をもたらすと解釈し得る性能特性を示している。

臨床設定 におけるさらなる研究には、以下を含める可能性がある

1. 白血球の不活性化による潜在的利点についての評価
 - a) 標準濃厚血小板製剤と比べた場合の抗HLA 抗体の生成ならびに血小板不応の抑制
 - b) 発熱性非溶血輸血反応（FNHTR）など、その他の輸血に関連のある疾病率、ならびに死亡率の低減、輸血後のTRIM感染性合併症の抑制
2. アレルギー反応ならびに輸血関連急性肺障害（TRALI）に関する評価
3. 血小板代謝作用、ミトコンドリア活性の維持、血小板の機能性に関するさらなる研究には、以下を含むものとする：
 - a) 活動性の出血を起こす血小板減少症の患者、もしくは血小板病症の患者における出血リスクの軽減、ならびに赤血球またはその他の血液製剤輸血の必要性の削減。

b) 大量の失血があり、血小板の使用によって血液の凝固が増進し、血小板の活性化により失血が減少するとみられ、血液製剤の輸血が必要とみられる外科的処理中の患者に関する研究。また、当該の患者の手術後の合併症に関する研究。

Mirasol PRTシステム：現在ならびに将来のアプリケーション

アフエレーシス処理と血漿の中にある血小板に関するバフィーコート処理を目的とした初期のMirasol PRT システムは、現在はヨーロッパの大半の国、ならびに中東、アフリカで利用可能となっている[‡]。システムの拡充が進行中であり、利用が可能になれば、この技術を用いることによって処理可能な血液製剤の種類が大幅に増加することになる。

新たなアプリケーションによって、以下の処理が可能となる：

- 血小板添加剤溶液（PAS）における保存が可能な血漿の濃縮された（高濃度）濃厚血小板製剤：血小板の第二世代アプリケーション
- アフエレーシスによって採取した血漿、または全血に由来する血漿

血小板添加剤に含まれる血小板

Mirasol PRTシステムへのアップグレードによって、血漿に含まれる血小板製剤と、処理後にPASに保存される高濃度血小板ユニットの双方を処理できる設備が提供されることになる。ヨーロッパとアメリカにおいて現在、市販されているPASのうち複数のタイプに関する体外研究を通じた評価が実施されている。製品が発売されれば、PASに保存される製剤のうち認証を受けたもののいずれについても、このシステムを利用することが可能になる。

血漿

既存のMirasolシステムをさらに拡充することによって、血漿ユニットを凍結保存向けに処理することも可能になる。予備データによれば、Mirasol処理を施した血漿製剤は、タンパク質の品質ならびに抗凝固剤、免疫グロブリン機能活性に関するヨーロッパの現行基準を満たすものである（第6章参照）。

全血

現在、実施している研究は、全血の処理におけるMirasolシステムの効果を調査するためのものである。この研究には、Mirasol処理を行った全血から分離されるすべての製剤の品質、ならびに有効性の評価が含まれている。

新たなアプリケーションによって、血小板製剤をPAS、血漿、ならびに全血製剤において保

存するための処理が可能になるだろう。

要旨

- Mirasol処理を行った血液製剤は、臨床において、病原体除去における利益のみならず、患者に適切かつ有益な結果をもたらすと解釈し得る性能特性を示している。
- 新たなアプリケーションによって、PAS、血漿、ならびに全血製剤における保存に向けた血小板製剤の処理を可能にするだろう

‡初期の血小板 Mirasol PRT システムは CE マークを取得済みであり、利用可能なものである。CE マークを承認している国々では、最終血液製剤についてその他の国家認証を取得する必要がない

‡アメリカでの販売は行われていない。

References

1. Goodrich RP, Li J, Pieters H, et al. Correlation of in vitro platelet quality measurements with in vivo platelet viability in human subjects. *Vir Sang*. 2006;90:279-285.
2. AuBuchon JP, Herschel L, Roger J, et al. Efficacy of apheresis platelets treated with riboflavin and ultraviolet light for pathogen reduction. *Transfusion*. 2005;45:1335-1341.
3. Li J, Lockertie O, de Korte D, et al. Evaluation of platelet mitochondria integrity after treatment with Mirasol pathogen reduction technology. *Transfusion*. 2005;45:920-926.
4. Fast LD, DiLeone G, Li J, Goodrich RP. Functional inactivation of white blood cells by Mirasol treatment. *Transfusion*. 2006;46:642-648.

* The Mirasol PRT System for Platelets is not available for sale in the United States.

第9章

血液の安全性維持にかかるコスト

MIRASOL®

病原体不活化技術

血液の安全性維持にかかるコスト

輸血によって、多数の患者の命が救われ、寿命が延長される。輸血という行為そのものが患者の健康に悪影響を与えないことを確実にものにするためには、血液供給の安全性を保証することが不可欠である。供給される血液の中からは間違いなく、病原体やドナーの白血球が発見されており、病気感染や副作用のケースに関する数多くの報告がなされている。これまでも、血液供給の安全性を向上させるための多数の措置が導入されてきた。これらは確実に血液の安全性を高めてきたものの、一方でコストを大幅に増大させ、プロセスを煩雑化させたのである。

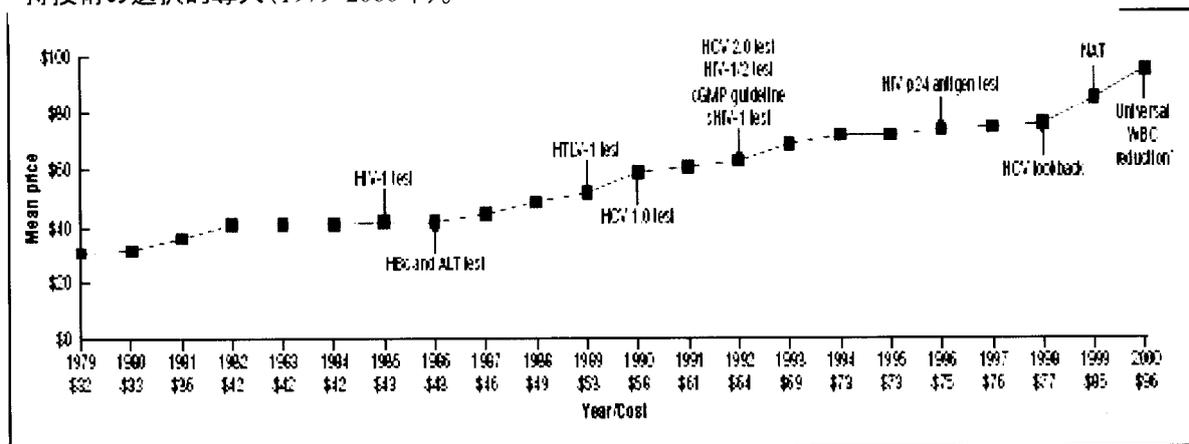
血液安全性の維持にかかる最終コスト

血液安全性の維持にかかるコスト—ならびに輸血を行う病院において血液1ユニットあたりにかかるコスト—は、ここ数十年で大幅に増加している。これは、主として新たな血液安全性メカニズムの導入によって増幅されたものである（図1を参照）。

新技術の導入によって発生したコストの評価は、クオリティオブライフを調整した生存年数（QALY：完全に健康な年を1.0 QALYとし、—輸血関連感染などで—健康を損なった年の数値を低く評価する）の評価で判断される場合が多い。共通のユニットに関して達成された平均的な健康への利点を明確にすることによって、新技術を直接に、また客観的に評価し、比較することができる。

なお、行われた比較が有効なものであり、また典型例を示すものであることを確認することが不可欠である。たとえば：

図1. ABC加盟センターの病院向け輸血用血液1ユニットあたりの販売価格と、血液安全性維持技術の選択的導入(1979-2000年)。



†2000年12月以降、75あるABCの加盟センターのうち12施設では、白血球不活性化製剤のみが配布されている。平均価格は、これらのセンターが白血球不活性化赤血球の料金として徴収している金額から算出した。

ALT: アラニン・アミノトランスフェラーゼ、GMP: 医薬品製造管理および品質管理基準、Hbc: ヘモグロビンC、HCV: C型肝炎ウイルス、HIV: ヒト免疫不全ウイルス、HTLV: ヒトT細胞性白血病ウイルス、NAT: 核酸増幅テスト(NAT)、白血球: 白血球

- コストの比較は、関連性のあるコストを比較対象としたものでなくてはならない。血液の安全性に関する対策についていえば、コンパレータに医薬品—コスト効率において計測基準が異なる—を含んではならないが、核酸増幅テスト (NAT) やガンマ線照射、白血球除去など、その他の血液の安全性維持技術はこれに含むものとする。
- 潜在的なコスト、ならびにコスト削減に関連するすべてのものを考慮する必要がある。残存している白血球の不活性化も同時に行う病原体除去技術のコストの算出は、輸血関連の感染の削減という面のみに基づいたものであってはならない。安全性維持のための措置がもたらす利点を過小評価してしまうためである。また、同種免疫とそれに関連する反応の防止の可能性、および血小板不応も考慮すべき要因である。
- また、コスト対利益について考慮する際においては、安全対策によって将来に生じ得る好影響（または悪影響）を考慮しなければならない。たとえば、特定の病原体を検出するために設計された血液安全性維持のための技術は、新たに出現する新興病原体に対して血液の供給を保証するものではない；すべての病原体を不活性化する潜在力を持った技術であれば、こうした新興病原体に対する新規の検査を開発し、導入しなくてはならないという要件をあらかじめ回避するものとなるだろう。

輸血の安全性維持のための措置については、QALYあたりの最終コストが高くなるものと認識されているが、コスト効率性に関する議論においては、上記の点などすべてを考慮する必要がある。

病原体不活性化システムの実質的な価値を正確に評価するためには、そのシステムがクオリティオブライフ、ならびに社会におけるコスト削減の面においてどれだけの救済となるかという点に対してのコストを算出することが不可欠である。

直接経費と間接費、病原体不活性化技術の導入によるコスト削減

新たな血液安全性維持システムの導入を検討する際には、すべての関連コスト—直接コストおよび間接コスト—、ならびにコスト削減の可能性—直接コストと間接コスト—に関する完全な理解が不可欠である（表1参照）。

表1. 潜在的な直接費用ならびに間接費、新たな病原体不活性化技術の導入によるコスト削減の可能性

直接費用	間接費
<ul style="list-style-type: none"> 新規設備にかかる設備投資 各ユニットにかかる増分費用 加工にかかる時間の延長 その他（職員研修など） 	<ul style="list-style-type: none"> 処理によって血小板収量や機能性に悪影響が生じ、追加ユニットが必要となる可能性
直接費用の削減	間接費の削減
<ul style="list-style-type: none"> 血液の安全性維持のための対策としての要件（ガンマ線照射、新規の血清学的検査など）を事前に満たし得る 輸血感染や輸血関連敗血症に関連したコストの排除 廃棄血液の削減（細菌汚染により使用不可能となるユニットの減少など） 	<p>間接費の削減</p> <ul style="list-style-type: none"> 輸血による感染の減少を通じた入院長期化の防止 輸血感染の結果として起きる賠償請求件数の削減 FNHTRや輸血関連急性肺障害（TRALI）など、白血球関連の合併症の防止 現在、据え置きとなっているドナーの療養> ドナー・プールの拡大> ドナー募集費用の削減 輸血が中断されるケースの減少 同種免疫の減少を原因とする不応が抑制できる可能性

FNHTR: 発熱性非溶血輸血反応、TRALI: 輸血関連急性肺障害、白血球: 白血球

たとえば、新技術は初期投資を必要とする一方で、既存のコスト（現行の措置などにかかるもの）を免除対象とすることができるほか、コスト効率の低いプロセスに取って代わることができる。アメリカにおいては、白血球除去（白血球除去）の場合、加工された1ユニットあたり\$35-45（€24-31）の追加コストがかかり、国全体としての血液関連のコストが\$5億（€3億4,000万）が上乘せされると推定されている。一方、病原体検出には加工された1ユニットあたり€20-30のコストが必要であり、ガンマ線放射には同€5-12、ウェスト・ナイル・ウイルス（WNV）血清検査には同€1-6、抗ヘモグロビンCには同€2.50、梅毒には同€4、サイトメガロ・ウイルス血清検査には同€4.4がかかると見積もられている。

これらの—そしてその他の—一部に必要とされるコストを回避できる潜在性を持った血液安全性維持のための技術は、単に追加コストを生じるものと考えられるべきものではないのである。

基準値

医薬品においては、コスト効率はQALYあたり\$50,000 (€34,000)が一般的な許容範囲とされている。しかしながら、血液の安全性においてはこの基準は不適切であり、不当である。実際に、QALYあたりで推定されるヒト免疫不全ウイルス (HIV) のp24 抗原検査、Hbc抗体検査、有機溶媒／界面活性処理 (SD) 法、新鮮凍結血漿 (FFP) のコストは\$500,000–\$1,000万 (€339,000–€6,700,000) であり、また、これらの措置のすべてが標準的な血液プールの一部として恒常的に実施されているわけではないのである。明らかに、コスト効率に関する決定を下す際においては、血液の安全性について各項目に異なる基準を適用することが不適切であるとはいえないのである。

輸血関連の感染性合併症

コスト効率に関する推計の大半においては、病原体除去プロセスによって削減できる可能性のあるアレルギー反応やTRALIなど、非感染性輸血関連合併症が考慮されていない。実際、病原体除去技術 (PRT) で処理した血漿のQALYあたりのコストは、これらの合併症を考慮した場合には大幅に減少する。例を挙げれば、SD処理済み血漿に関連したコストの分析によれば、QALYあたりのコストはUS\$215万6,000 (146万1,000ユーロ) - US\$974万3,000 (660万1,000ユーロ) である。こうした結果は、輸血伝搬性ウイルスの感染リスクが低いこと、ならびに血漿のレシピエントの大半が高齢であり、その予後診断が短期間で終わっているため不十分なものになっていることに起因したものである。しかしながら、分析において非感染性の輸血関連合併症を考慮すると、推定されるQALY値は大幅に低下することになる——TRALIの発現の減少におけるSD処理済み血漿のコストを考慮したモデルの場合、21歳以下の患者の生存年数のうち一年あたりのコストは£30,000 (€42,000) 未満であり、48歳以下の患者の場合は同£50,000 (€70,000) である。

将来の血液提供における危機に向けた保護措置

血液供給に新たな脅威が発生する頻度についての歴史的データをみると、新たな血液の安全性維持に関する技術のコスト効率を検証するモデルはいずれも、チクングンヤなどの新興病原体やその他の未確認の有機体など、新たに発現した新興病原体を特定し、血液供給から排除するための検査方法の開発コストとして予測されるコストを考慮する必要があることがわかる。

血小板輸血における病原体不活性化のコスト

病原体除去技術 (PRT) システムを通じた病原体不活性化が血小板輸血コストに与える経済的影響を評価するための研究によると、そのコスト効率はNATなどその他の安全性維持のための措置と同程度であるか、あるいはそれ以上となり得ることがわかった。PRT技術のコスト効率に関するその他の調査において本論の著者は、輸血による感染が起こり得る“[PRT]

のない世界”と感染が防がれている“[PRT]のある世界”の比較を実施した。輸血伝搬性ウイルスへの感染によって生じる年間コストは、無症候性HIVの場合で€2,231、AIDSの場合で€25,736と見積もられている——さらに、急性と慢性の肝炎の場合は、それぞれ€2,300と€125とされる。また、敗血症の症状発現ごとのコストの総額は、€17,988と算出されている。一方、これらのすでに認識されているものに加えて、新興病原体（既知、または未知の）感染患者の看護にかかると見込まれる費用も考慮に入れられている。本論の著者は、輸血1回あたりの新興病原体への感染リスクが1/1000から1/2300以上であるとすれば、増分のコスト効率はQALYあたり€195,364であり、PRTは全体として、措置としてはコスト効率が高いものと考えられると結論づけた。

上記を考慮すると、Mirasol PRT システムの付加価値はその潜在的利点に大きく依存するものとなる：

- その他のシステムが残存している光線感作物質の副生成物や代謝産物の除去を必要とする場合についても、Mirasol PRT システムはこのステップを必要としない。‡広範な毒物学的評価と長期にわたる臨床経験によって、リボフラビンとその光分解生成物は安全であることが証明されている（第2章参照）。

このステップを排除することで技術者の作業負荷が軽減され、プロセスの処理能力が向上することから、コストと時間が削減できるのである。

- Mirasol PRTシステムは、白血球に由来する輸血副作用の発生を抑制し、追加の処理コストの回避を通じてコスト効率を上昇させる。

- Mirasol PRTシステムにより、同種免疫と血小板不応を低減できる可能性がある。

血小板輸血コストにおける病原体不活性化の経済的影響を評価するための調査によると、そのコスト効率はNATなどその他の血液安全性の維持のための措置と同程度であるか、あるいは潜在的にはより高いことが分かった。

Mirasol PRTシステムのコスト効率を確保するための新たなモデル

既存の処理方法に加え、さらなる利点を提供する新たな安全性維持のための技術が開発されていることから、コスト対利点のプロフィールを正確に評価するための新規モデルが必要となるだろう。

病原体不活性化技術に関する既存のモデルは、Mirasol PRTシステムのコストとこのシステムによって実現し得るコスト削減の側面の全般を考慮したものではないことから、Mirasol

データのみに基づく新たな、そしてより適切なモデルを開発する必要性が生じたのである。

現在、より効率の高い評価モデルを開発中である。このモデルによって、Mirasol処理とその他の病原体不活性化技術、ならびに細菌類のスクリーニングや新たな核酸増幅テストなど、その他の血液安全性の維持のための措置との包括的な比較が可能になる。

Mirasol PRTシステムのさらなる強み

血液の安全性維持のための新たな技術を導入するか否かについては、導入にかかるとされているコストのみに基づいて決定を下すべきではない。その他の多くの要因についても検討する必要がある。

たとえば、細菌検査の結果が得られる前にすでに血液製剤が販売されている場合が多く、さらにその多くがすでに輸血されてしまっている場合が多い。実際、陽性であるとわかったユニットの約40%が回収されておらず、回収された血小板ユニットもその90%以上がすでに輸血に使用されたものとなっている。

血液の安全性維持のための技術の大半は本来、対処するためのものであり、そのため新しい検査を実施するには時間がかかる。一例を挙げれば、1999年にWNVが初めて検知されてから、2002年11月にその血液スクリーニングのためにNATが定期的実施されるようになるまでには、3年の期間があった。

血液製剤の全保存期間中を通じて細菌の増殖を抑制するための技術、ならびに将来において発現し得る未知の新興病原体に対する保護機能を持つのに十分なだけの確固とした技術は、現在の血液供給の安全性向上に大きく貢献するだろう。

要旨

- 病原体不活性化システムの実質的な価値を正確に評価するためには、そのシステムがクオリティオブライフ、ならびに社会におけるコスト削減の面においてどれだけの救済となるかという点に対してのコストを算出することが不可欠である。
- 血小板輸血コストにおける病原体不活性化の経済的影響を評価するための調査によると、そのコスト効率はNATなどその他の血液安全性の維持のための措置と同程度であるか、あるいは潜在的にはより高いことが分かった。
- 現在、より効率の高い評価モデルが開発中である。このモデルにより、Mirasolとその他の病原体不活性化技術、ならびに細菌類のスクリーニングや新しい核酸増幅テストの実施などといった、その他の血液の安全性維持のための対策の包括的な比較が可能になる。

References

1. Goodman C, Chan S, Collins P, et al. Ensuring blood safety and availability in the US: technological advances, costs, and challenges to payment—final report. *Transfusion*. 2003;43:35–465.
2. AuBuchon JP, Birkmeyer JD, Busch MP. Safety of the blood supply in the United States: opportunities and controversies. *Ann Intern Med*. 1997;127:904–909.
3. Postma MJ, van Hulst M, De Wolf JT, et al. Cost-effectiveness of pathogen inactivation for platelet transfusions in the Netherlands. *Transfus Med*. 2005;15:379–387.
4. Pathogen inactivation: making decisions about new technologies: consensus conference. Toronto, Canada, 29–30 March 2007.
5. Owens DK. Interpretation of cost-effectiveness analyses. *J Gen Intern Med*. 1996;13:716–717.
6. Jackson BR, Busch MP, Stramer SL, AuBuchon JP. The cost-effectiveness of NAT for HIV, HCV, and HBV in whole-blood donations. *Transfusion*. 2003;43:721–729.
7. Pereira A. Cost-effectiveness of transfusing virus-inactivated plasma instead of standard plasma. *Transfusion*. 1999;39:479–487.
8. Jackson BR, AuBuchon JP, Birkmeyer JD. Update of cost-effectiveness analysis for solvent-detergent-treated plasma. *JAMA*. 1999;282:329.
9. Friedler GF, Haycox AR, Duggan AK, Dakin HA. Cost-effectiveness of solvent/detergent-treated fresh-frozen plasma. *Vox Sang*. 2003;85:88–95.
10. Bell CE, Botteman MF, Gao X, et al. Cost-effectiveness of transfusion of platelet components prepared with pathogen inactivation treatment in the United States. *Clin Ther*. 2003;25:2464–2486.
11. Moeremans K, Warie H, Annemans L. Assessment of the economic value of the INTERCEPT blood system in Belgium. *Transfus Med*. 2006;16:17–30.