

平成 26 年 3 月 19 日
薬事・食品衛生審議会
血液事業部会運営委員会
提出用資料

日本赤十字社

感染性因子低減化（不活化）技術ミラソルの導入準備に係る評価試験結果報告

1. ミラソル処理血小板製剤に発生する凝集塊発生抑制効果の検討

平成 24 年度第 3 回血液事業部会運営委員会において、振とう保存中のミラソル処理血小板（以下、「ミラソル PC」という。）に発生する凝集塊の原因が、処理バッグの内部構造によるものであり、改良型バッグを用いることで、凝集塊発生が抑制される可能性について報告した。

今回、改良型バッグを用いて、以下の検証を行ったので報告する。

ア) 改良型バッグ

現行バッグ（図 1-1）では、UVB 照射により活性化した血小板が、スパイクポートに反復して接触する刺激が加わることにより凝集塊の発生を誘発すると考え、改良型バッグを用いて検証した。

- ① 改良型バッグは、スパイクポートのピンをチューブ接続部に移設し、保存中に血小板と接触しないように変更されている（図 1-2）。
- ② スパイクポートの位置以外の変更点はない。



図 1-1 現行バッグ

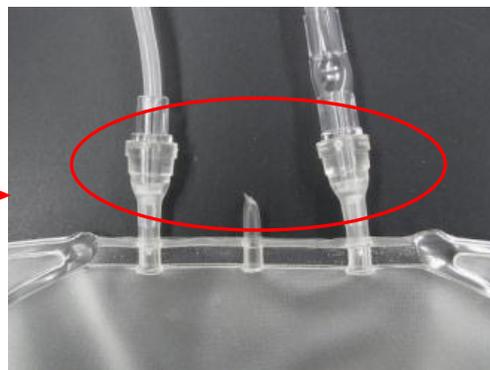


図 1-2 改良型バッグ

イ) 可視凝集塊の発生率

前回、現行バッグでは、振とう保存中にミラソル未処理 PC で可視凝集塊が 1 mm 程度であるのに対し、ミラソル PC では 3-5 mm の可視凝集塊を認めたことを報告した。

① 改良型バッグの使用により、ミラソル未処理・処理 PC とも可視凝集塊の発生率は顕著に減少した (図 2-1)。

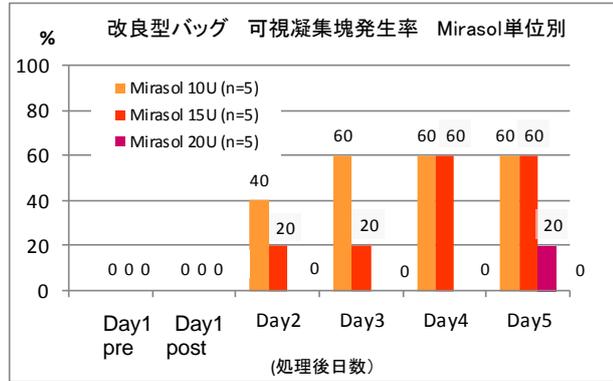
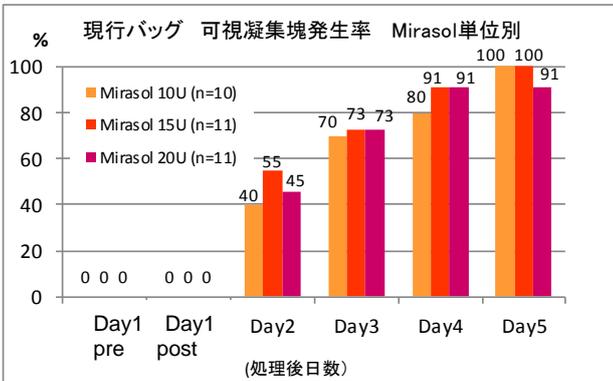
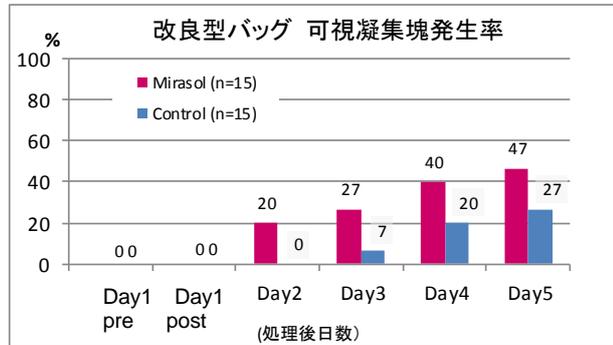
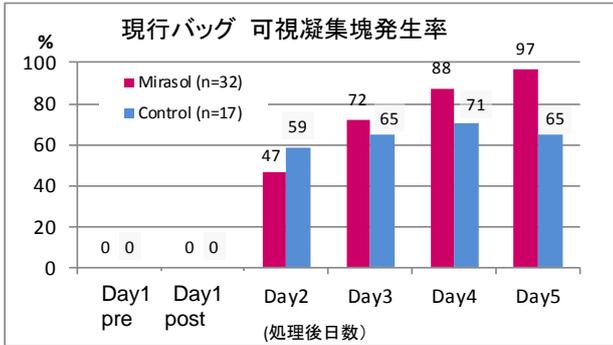
特に高単位血小板 (20 単位) における可視凝集塊発生率の減少を認めた。

これは、血小板数が多い高単位製剤の方が、個々の細胞が受ける照射エネルギーが小さくなり、これに伴い血小板のダメージも小さくなったためと考えられる。

図 2-1 可視凝集塊発生率

・2 人の観察者により凝集塊を観察。

・1 人でも凝集塊を確認した場合、凝集 (+) として集計 (各々の n に対する発生率 (%) で表示)
 <現行バッグ> <改良型バッグ>



Day1 pre: 採血日翌日、UVB 照射前
 Day1 post: 採血日翌日、UVB 照射後

- ② 発生した可視凝集塊を、数と大きさによってスコア化し平均値をグラフ化した(図 2-2)。改良型バッグの使用により、ミラソル未処理 PC・処理 PC のいずれにおいても、可視凝集塊数が減少し、さらにサイズも小さくなったことが示された。

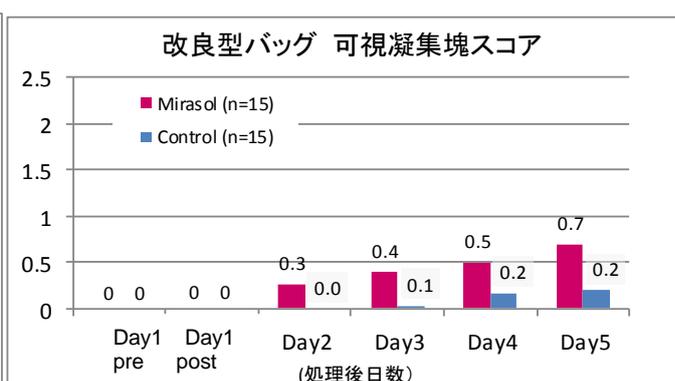
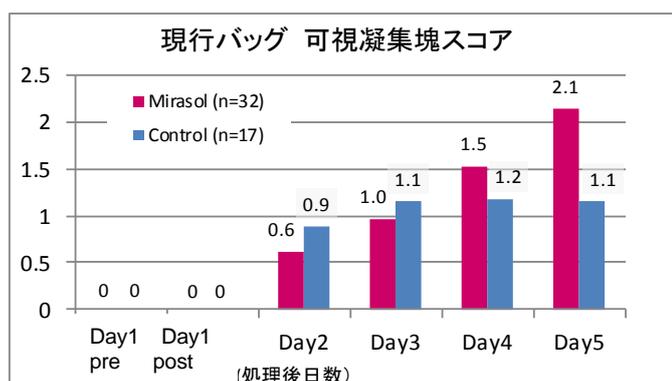
図 2-2 可視凝集塊スコア

発生した凝集塊を、数と大きさによってスコア化し集計。その平均のスコアをグラフに示した。

0 :凝集塊なし
1 :~1mm の凝集塊 1~3 個
2 :~1mm の凝集塊数個、2~3mm の凝集塊1個
3 :~2mm の凝集塊数個、3~5mm の凝集塊1個
4 :5mm 以上のものを含む凝集塊多数

〈現行バッグ〉

〈改良型バッグ〉



ウ) 改良型バッグの血小板品質への影響

- ① pH と Glucose 濃度の低下及び Lactate 濃度と CD 62P 発現の経時変化は、現行バッグと同様の動きを示した(図 3-6)。
- ② 前回の試験で見られた振とう保存中のスワーリングの低下又は消失は、改良型バッグでは認められなかった(図 7)。
- ③ 改良型バッグの使用により、血小板製剤の有効期間内の使用は可能であると考えられる。

図3 保存中の pH の変化

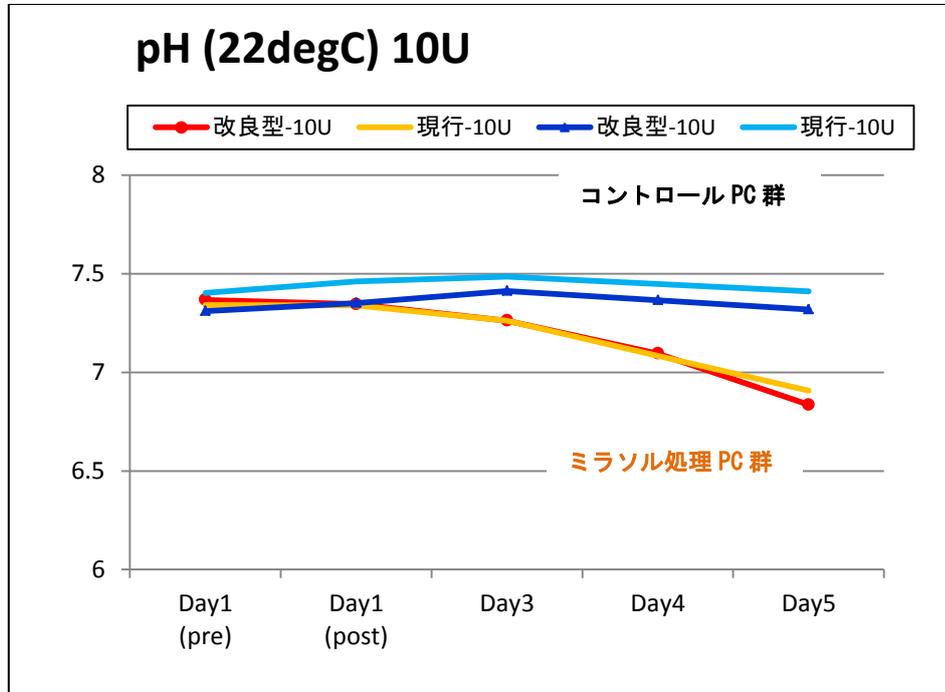


図4 保存中のグルコース濃度の変化

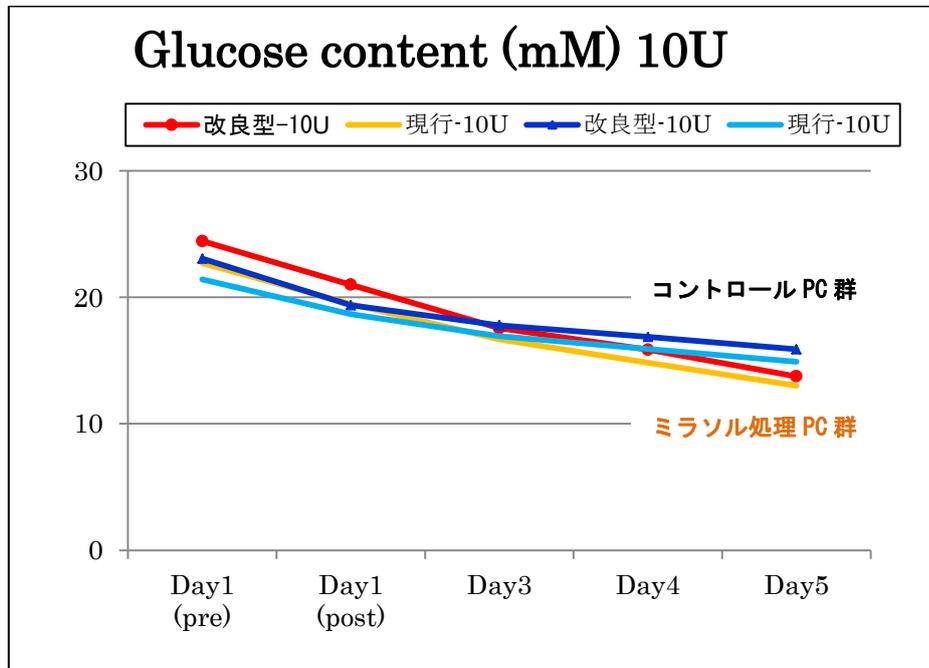


図 5 保存中の乳酸濃度の変化

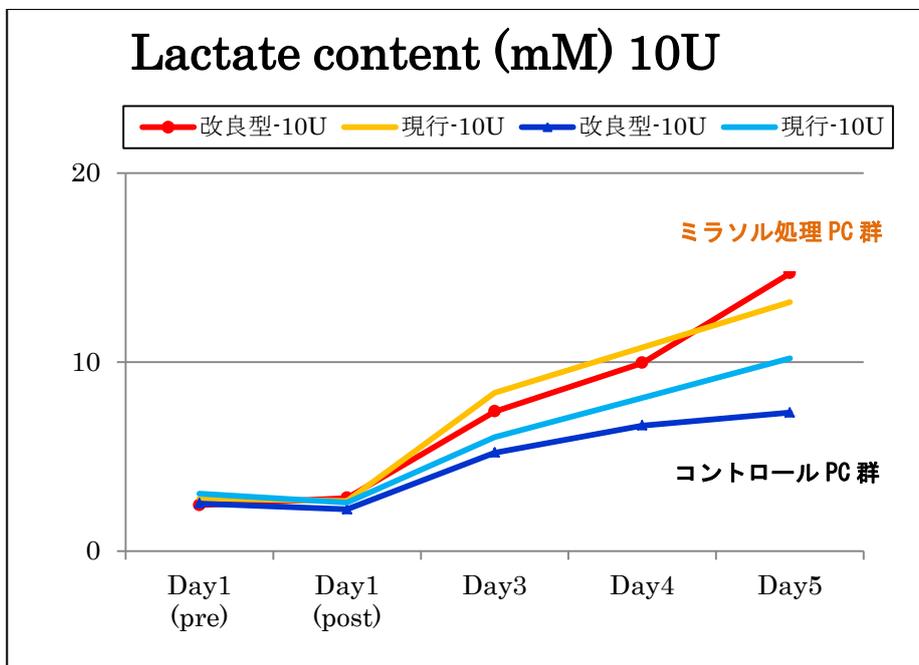


図 6 保存中の CD62P (P セレクチン) 発現率の変化

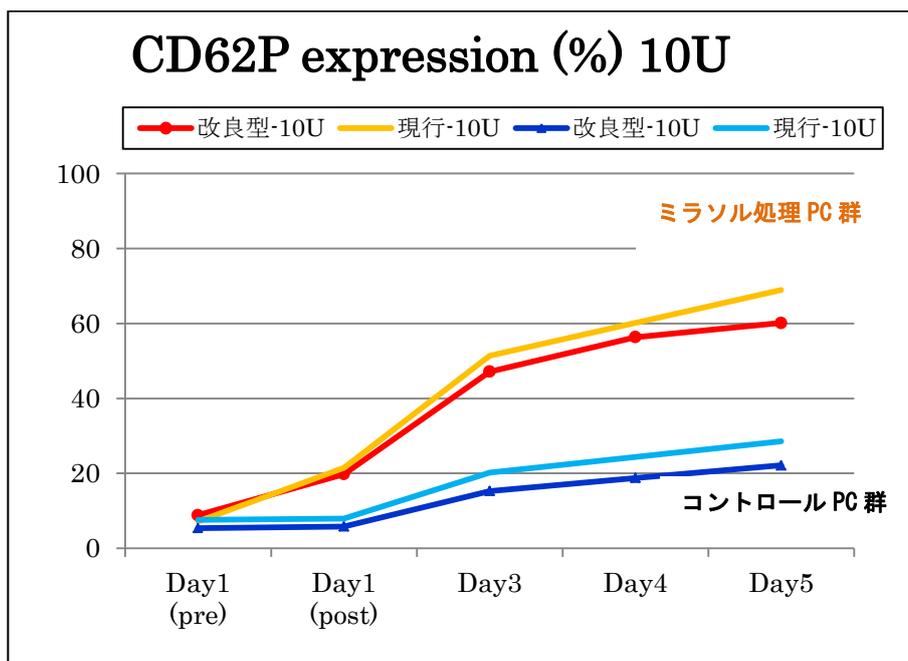
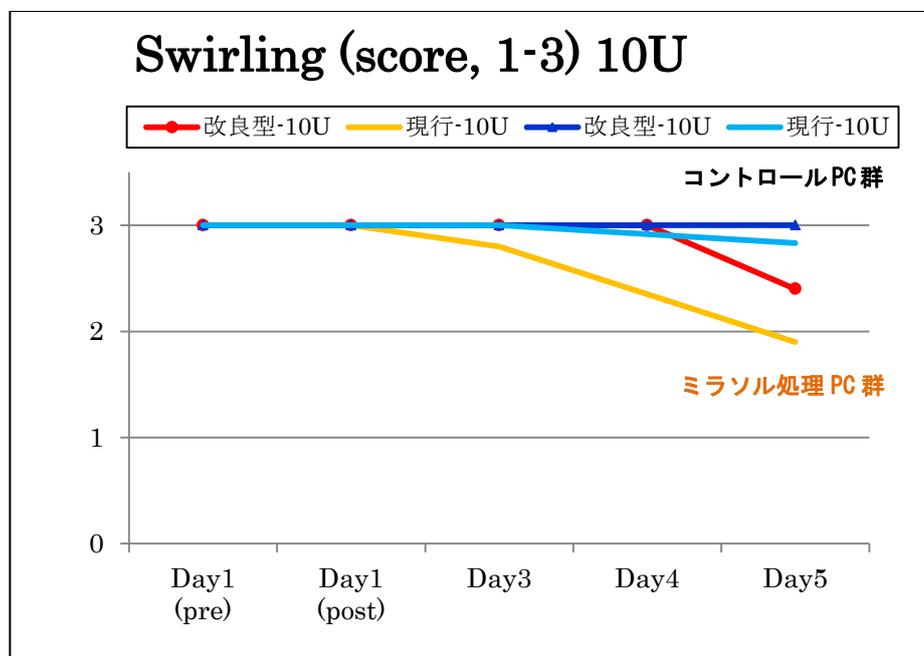


図7 保存中のスワーリングの変化



2. ウイルス低減化能（追加試験）

ア) 試験ウイルス株

今回の評価試験には下記のウイルスを用いた。

- ・ *Human parvovirus* B19 Genotype-1, human plasma No1190 株
- ・ *Trypanosoma cruzi* JRC-TC1 (Bolivia) 株

イ) この結果、*Human parvovirus* B19 に対しては 3Log、*Trypanosoma cruzi* に対しては、 $\geq 3\text{Log}$ (n=1)、 $\geq 4\text{Log}$ (n=1) の低減化能を示した（参考）。

3. 細菌低減化能（追加試験）

ア) 試験菌株

今回の評価試験には下記の細菌を用いた。

いずれの菌種も過去、日本の輸血用血液製剤から検出されたものである。

- ・ *Staphylococcus aureus* (黄色ブドウ球菌) NBRC 13276 —グラム陽性菌
- ・ *Staphylococcus epidermidis* (表皮ブドウ球菌) NBRC 100911 —グラム陽性菌
- ・ *Streptococcus dysgalactiae* (B 群レンサ球菌) ATCC 12394 —グラム陽性菌
- ・ *Bacillus cereus* (セレウス菌) NBRC 13494 —グラム陰性菌
- ・ *Escherichia coli* (大腸菌) NBRC 15034 —グラム陰性菌

イ) 試験方法

PC 採血日 (Day0) の翌日 (Day1) に菌を接種し、更にその翌日 (Day2) に UVB 照射を行った (表 1-5)。一部の検体については菌の接種と同じ日に UVB 照射を行った (表 6)。

ウ) 結果

- ① 採血時に混入しうる菌量において、ミラソル PC は血小板の有効期間 (採血後 4 日間) は十分な低減化効果を示し、一部の菌種に対しては、有効期間後も菌の増殖を抑え

ることがわかった。

- ② 開発メーカーでは照射時期を「採血後 22 時間以内」と規定している。今回の試験から、菌の接種翌日 (Day2) に UVB 照射した検体では、有効期間後に菌の増殖を認めたことから、採血後、可能な限り早期に UVB 処理を行うことが良いと考えられた。

〈まとめ〉

- ① 改良型バッグで保存したミラソル PC では可視凝集塊発生は顕著に抑制され、その大きさも小型化した。
- ② 改良型バッグで保存することにより、スワーリングの保持等、ミラソル PC の品質についても改善傾向がみられた。
- ③ ミラソルは、一部のウイルスに対する効果は極めて限定的であるが、他の安全対策と併用することで、十分機能すると考えられる。
- ④ 献血時に原料血液に混在しうるレベルの菌量であれば、細菌に対して、血小板製剤の有効期間内は概ね低減化効果を示すことがわかった。
- ⑤ また、今回使用した検体の容量は 10 単位製剤の規格 (160-240mL) であるが、15・20 単位製剤の容量 (200-300mL) の上限においても、細菌に対し同様の低減化効果が得られるかは検討が必要である。
- ⑥ 以上の結果より、ミラソル PC は日本で製造される血小板製剤の規格に照らしても、実製造が可能な品質の血小板であることが確認された。

<ミラソル細菌評価試験結果>

表 1 *S. aureus* に対する効果

評価菌種	検体 No	菌接種時情報		検体の培養結果				
		接種菌量*	PC 容量 (mL)	保存期間 項目	UVB 照射後	Day3	Day4	Day5
<i>S. aureus</i>	1-C	60	187	菌検出濃度*		2.6E+05	5.4E+06	2.0E+07
				スワーリング	++	++	++	++
				凝集	-	-	+	+
	1-T		191	菌検出濃度*	未検出	未検出	未検出	4
				スワーリング	++	++	+	+/-
				凝集	-	-	-	-
	2-C		184	菌検出濃度*		1.1E+05	3.5E+07	1.5E+08
				スワーリング	++	++	++	+
				凝集	-	-	+	+
	2-T		185	菌検出濃度*	未検出	未検出	未検出	6.4E+03
				スワーリング	++	++	+	+/-
				凝集	-	-	-	-

*:cfu/mL

C:コントロール PC

T:ミラソル PC

血小板製剤の有効期間 ←

表2 *S. epidermidis*に対する効果

評価菌種	検体 No	菌接種時情報		検体の培養結果				
		接種菌量*	PC 容量 (mL)	項目 / 保存期間	UVB 照射後	Day3	Day4	Day5
<i>S. epidermidis</i>	1-C	40	187	菌検出濃度*		未検出	1. 6E+02	1. 2E+05
				スワーリング	++	++	++	++
				凝集	-	-	-	-
	1-T		185	菌検出濃度*	未検出	未検出	未検出	未検出
				スワーリング	++	++	++	+/-
				凝集	-	-	-	-
	2-C		194	菌検出濃度*		未検出	1. 0E+02	1. 6E+04
				スワーリング	++	++	++	++
				凝集	-	-	-	-
	2-T		190	菌検出濃度*	未検出	未検出	未検出	未検出
				スワーリング	++	++	+/-	-
				凝集	-	-	-	-

*:cfu/mL

C:コントロール PC

T: ミラソル PC

表3 *S. dysgalactiae*に対する効果

評価菌種	検体 No	菌接種時情報		検体の培養結果				
		接種菌量*	PC 容量 (mL)	項目 / 保存期間	UVB 照射後	Day3	Day4	Day5
<i>S. dysgalactiae</i>	1-C	40	190	菌検出濃度*		2.7E+08	1.1E+09	2.9E+08
				スワーリング	++	++	+	-
				凝集	-	-	-	-
	1-T		189	菌検出濃度*	未検出	未検出	未検出	未検出
				スワーリング	++	++	+	-
				凝集	-	-	-	-
	2-C		196	菌検出濃度*		6.5E+08	7.5E+08	8.0E+08
				スワーリング	++	++	+	+/-
				凝集	-	-	-	-
	2-T	192	菌検出濃度*	未検出	未検出	未検出	未検出	
			スワーリング	++	++	+	-	
			凝集	-	-	-	-	

*: cfu/mL

C: コントロール PC

T: ミラソル PC

表 4 *B. cereus* に対する効果

評価菌種	検体 No	菌接種時情報		検体の培養結果				
		接種菌量*	PC 容量 (mL)	項目 / 保存期間	UVB 照射後	Day3	Day4	Day5
<i>B. cereus</i>	1-C	140	188	菌検出濃度*		7.9E+06	4.7E+06	1.9E+06
				スワーリング	++	++	-	-
				凝集	-	-	-	-
	1-T		189	菌検出濃度*	0.2	未検出	4.0	6.5E+02
				スワーリング	++	++	+	-
				凝集	-	-	-	-
	2-C		186	菌検出濃度*		6.4E+06	7.7E+06	5.8E+06
				スワーリング	++	++	-	-
				凝集	-	-	-	-
	2-T		187	菌検出濃度*	0.4	未検出	1.0E+02	1.7E+05
				スワーリング	++	++	+	-
				凝集	-	-	-	-

*:cfu/mL

C:コントロール PC

T:ミラソル PC

表5 *E. coli*に対する効果

評価菌種	検体 No	菌接種時情報		検体の培養結果				
		接種菌量*	PC 容量 (mL)	項目 / 保存期間	UVB 照射後	Day3	Day4	Day5
<i>E. coli</i>	1-C	100	184	菌検出濃度*		3.1E+07	4.5E+08	6.9E+08
				スワーリング	++	++	+	-
				凝集	-	-	-	-
	1-T		188	菌検出濃度*	未検出	未検出	未検出	未検出
				スワーリング	++	++	+	+/-
				凝集	-	-	-	-
	2-C		192	菌検出濃度*		1.4E+06	6.0E+08	6.2E+08
				スワーリング	++	++	+	-
				凝集	-	-	-	-
	2-T		189	菌検出濃度*	未検出	未検出	未検出	未検出
				スワーリング	++	++	+	-
				凝集	-	-	-	-

*:cfu/mL

C:コントロール PC

T: ミラソル PC

表6 *S. aureus*に対する照射時期の違いによる効果

評価菌種	検体 No	菌接種時情報		保存 期間 項目	検体の培養結果				
		接種菌量*	PC 容量 (mL)		UVB 照射後	Day2	Day3	Day4	Day5
<i>S. aureus</i>	1-C	90	120	菌検出濃度*			1.5E+05	1.3E+07	7.6E+07
				スワーリング			++	++	+/-
				凝集			-	+	+
	1-T 接種当日 UVB 処理		224	菌検出濃度*	未検出	未検出	未検出	未検出	未検出
				スワーリング	++	++	++	++	+/-
				凝集	-	-	-	-	-
	1-T 接種翌日 UVB 処理		222	菌検出濃度*	未検出		未検出	1.6E+02	1.6E+06
				スワーリング	++		++	+	-
				凝集	-		-	-	+
	2-C	120	217	菌検出濃度*		0.1	1.7E+05	3.1E+08	2.1E+08
				スワーリング		++	++	++	+/-
				凝集		-	-	+	+
	2-T 接種当日 UVB 処理		220	菌検出濃度*	未検出	未検出	未検出	未検出	未検出
				スワーリング	++	++	++	-	-
				凝集	-	-	-	-	-
2-T 接種翌日 UVB 処理	218		菌検出濃度*	0.6		未検出	未検出	1.6E+06	
			スワーリング	++		++	+	+/-	
			凝集	-		-	-	-	

*:cfu/mL

C:コントロール PC

T:ミラソル PC

Pathogen and Leucocyte Inactivation for IBS/Theraflex®/Mirasol® Platelets

(平成25年7月10日開催 安全技術調査会日赤評価データ 一部追加：カラー部分)

C. V. Prowse:Component pathogen inactivation:a critical review.Vox Sanguinis 2013; 104: 183-199

Viruses

Enveloped Viruses	IBS	THF	MIR	日本赤十字社
HIV-1(cell associated)	>6.1	–	4.5	–
HIV-1 (cell free)	>6.2	1.4	5.9	≥4.6
Clinical isolate HIV-1	>3.4	–	–	–
Clinical isolate HIV-2	>2.5	–	–	–
Latent proviral HIV-1	All detectable* ¹	–	4.5	–
Hepatitis B	>5.5	–	(2.3)	–
Hepatitis C	>4.5	–	(3.2)	–
HTLV-I	4.7	–	–	–
HTLV-II	5.1	–	–	–
Cytomegalovirus (cell-associated)	>5.9	–	–	–
Cytomegalovirus (cell-free)	All detectable* ¹	(3.5)	(2.1)	–
BVDV (HCV model)	>6.0	–	5.8	1.9
Duck HBV(HBV model)	>6.2	–	–	–
West Nile Virus	>6.0	5.4	>5.1 Uganda株	1.3 NY株
SARS-CoV	>5.8	–	–	–
Chikungunya	>6.4	–	2.1	1.7
Influenza A virus H5N1	>5.9	–	(>5)	–
Dengue	>5.0* ²			0.4* ²
PRV			2.5* ²	2.8* ²
Non-enveloped Viruses	IBS	THF	MIR	日本赤十字社
Blue tongue virus type II	6.1-6.4	–	–	–
Calicivirus	1.7-2.4	–	–	–
Human adenovirus 5	>5.7	–	–	–
Parvovirus B19	3.5 to >5	(5.46)	(>5)	3
hepatitis A	0	–	(1.8)	1.8
HEV				≥3.0* ²

– : no data available

* 1:inactivated to limit of detection.

* 2:学会発表等のデータ

Bacteria

Gram-negative	IBS	THF	MIR	日本赤十字社
<i>Escherichia coli</i>	>6.4	>4.0	4.4	—
<i>Serratia marcescens</i>	>6.7	>4.0	4.0	4.0(平均値)
<i>Klebsiella pneumonia</i>	>5.6	4.8	2.8	—
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	4.5	>4.9	>4.6	—
<i>Salmonella choleraesuis</i>	>6.2	—	—	—
<i>Yersinia enterocolitica</i>	>5.9	—	3.3	—
<i>Enterobacter cloacae</i>	5.9	>4.3	>2.0	—
<i>Orientia tsutsugamushi</i> (scrub typhus)	>5.0	~	>5.0	—
Gram-positive	IBS	THF	MIR	日本赤十字社
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	>6.6	4.8	4.2	3~5
<i>Staphylococcus aureus</i>	6.6	>4.8	4.0	☆
<i>Streptococcus pyogenes</i>	>6.8	—	2.2	—
<i>Listeria monocytogenes</i>	>6.3	—	—	—
<i>Corynebacterium minutissimum</i>	>6.3	—	—	—
<i>Bacillus cereus (incl spores)</i>	3.6	—	—	—
<i>Bacillus cereus (vegetative)</i>	>6.0	4.3	1.9	—
<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	>6.2	—	—	—
<i>Propionibacterium acnes</i>	>6.2	4.5	>2.0	—
<i>Lactobacillus species</i>	>6.4	—	—	—
<i>Clostridium perfringens</i> (vegetative)	>6.5	>4.7	—	—
Spirochaete bacteria	IBS	THF	MIR	日本赤十字社
<i>Treponema pallidum</i> (syphilis)	>6.8	—	—	—
<i>Borrelia burgdorferi</i> (Lyme disease)	>6.8	—	—	—

— : no data available

☆:day3(有効期間最終日)の状

対照群(非低減化群)・・・8本中7本が 10^6 CFU/mL以上

低減化群 ……………8本中4本が培養陰性 他の4本は 10^5 CFU/mL未満

Parasites

	IBS	THF	MIR	日本赤十字社
<i>Plasmodium falciparum</i> (malaria)	>6	–	>3.2	–
<i>Trypanosoma cruzi</i> (Chagas' disease)	>5.3	–	6.0	≥3(n=1), ≥4(n=1)
<i>Leishmania mexicana</i> (promastigote)	>5.0	–	~	–
<i>Leishmania major</i> Jish (amastigote)	>4.3	–	>5.0	–
<i>Babesia microti</i> (babesiosis)	>5.3	–	>4.0	–

Leucocyte	IBS	THF	MIR	日本赤十字社
T-cell viability (limiting dilution)	>5.4	–	>6.0	–
DNA modification (one adduct per x base pairs)	1 per 83	–	–	–
Polymerase chain reaction	Inhibited	–	–	–
Cytokine synthesis: No Il-8 or IL-1b synthesis	↳	–	↳	–
Murine model TA-GVHD: Prevents disease	↳	–	↳	–

– : no data available

↳ : Tick marks show where the different study types have been undertaken for each type of component