

## 委員からの質問に対する各社からの回答

## ○不活化技術に関するヒアリング概要

(参考)

社名	マコファルマ社 株式会社アムコ メチレンブルー	BCT Japan株式会社 (旧 ガンプロ株式会社) リポフラビン	バイオワン株式会社 シーラス社 アモトサレン (S-59)	シーラス社
①不活化法の種類				
②化合物添加	要	要	要	要
③光照射	要	要	要	不要
④薬剤除去工程	要	不要	要	不要
⑤適応製剤	FFP(実用化済み)	PC (2007年実用化済み) FFP (2008年7-9月予定)	PC(実用化済み) FFP(実用化済み)	RBC (2008年5月時点で第 I 相試験まで終了)
⑥不活化効果	<b>ウイルス:</b> 可 (HIV-1, WNV, BVDV, Influenza, Duck HBV, 等) <b>細菌:</b> 不可	<b>ウイルス:</b> HIV, active 5.9, latent 4.5, HCV model V. 3.2, HBV 2.0-3.0, WNV 5.2, Human B19 model v. > 5.0 <b>細菌:</b> S. aureus 3.6-4.8, S. epidermidis 4.2, E. coli > 4.4, B. cereus 1.9-2.7, P. aeruginosa 4.5 <b>Parasites:</b> 測定限界値まで (>3 to >6) 生体外検定法 (TCID 50) による。単位: HBV 除き ログ/ml, HBV は gEq/ml	<b>ウイルス:</b> HIV-1 > 6.2, HBV > 5.5, HCV > 4.5, WNV > 5.5, SARS HCoV > 5.8 Parvovirus B19 3.5->5.0, HTLV, CMV 等可 (単位 ログ/ml) <b>細菌:</b> S. epidermidis > 6.6, S. aureus > 6.6, E. coli > 6.4, S. pyogenes > 6.8, B. cereus > 5.5, P. aeruginosa 4.5 等, <b>白血球</b> > 5.3, <b>原虫</b> 等 T. cruzi > 5.3	<b>ウイルス:</b> HIV, ウシのウイルス性下痢ウイルス, アデノウイルス, 水泡性口内炎 <b>細菌:</b> 黄色ブドウ球菌, 表皮ブドウ球菌, エルシニア・エンテロコリチカ, セラチア・マルセセンス, 大腸菌
⑦製剤への影響				
1) 容量変化	処理する血漿製剤から約 15ml 減少 (キット内及びキットに含まれるフィルター2個に残留するポリウムとして)	血小板製剤 250ml に対し 35ml (500 μM) のリポフラビン溶液を加える。従って 35ml の容量増加となる。	<b>血小板:</b> 血漿 65% を保存液インターソールで置換した血小板溶液約 300ml に S-59 溶液 15ml を加えるが、処理ロス約 7% があるので約 5ml 減少する。 <b>血漿:</b> 血漿 (385-635ml) に S-59 溶液 15ml を加えるが、処理ロス約 7% があるので約 20ml 減少する。	
2) 凝固因子活性低下	Fibrinogen = -14.3% / FII = -3.4% / FV = -21.4% / FVII = -4.2% / FVIII = -15.4% / FIX = -7.4% / FX = -13.3% / FXI = -16.2% / FXII = -11.8% / FXIII = -2.8% / vWF = -0.7%	血小板の凝固機能: 5日保存で p-selectin は通常の輸血時同程度程度の若干の上昇 (17.9 ± 7.0 → 57.8 ± 14.8)。GP1b α、GP11b-11a, Gp IV, vWF 等処理前と比較して機能性異常なし。FFP: 52週保存で凝固因子 VIIIc 活性 0.8 ± 0.1 IU/ml, Fibrinogen 活性。69週保存 211 ± 33.5 mg/dl 等すべて欧州ガイドラインを満たす。(資料 Miraso PRT システム参照)	<b>血漿:</b> Fibrinogen = -21% / FII = -11% / FV = -5% / FVII = -18% / FVIII = -23% / FIX = -11% / FX = -11% / FXI = -10% / <b>血小板:</b> In vitro: 5日保存 pH 6.8 (6.94), HSR 58.8% (58.5), Pセレクトリン 51.7% (31.0), pO2 24.2 mmHg (29.9), 乳酸 11.3 mM (10.5) <b>In vivo:</b> 輸血後のウサギ 耳出血時間 259秒 (274) ( ) 内は未処理	<b>血</b>
3) 血小板回収率		98% 程度 (この処理により約 2% の血小板回収率低下が想定される。	92-93% (容量減少分を含む)	(赤血球) 24時間回収率 > 75%
⑧安全性について	すでに臨床で広く使用されており、メチレンブルー処理された血漿製剤輸血の臨床例は累計 400 万件以上に上るが副作用報告は無い。現在同社製品は年間 30 万例以上の臨床使用が続けられている。	リポフラビンは生体物質 (ビタミン B2) で、FDA により食品着色用に安全物質 (GRAS) として認知されている。輸血用血液に新たな化学合成物質が加えられることはなく、広範な生体内外の毒性試験で毒性および変異性がないことは実証されている。	ICH ガイドラインに沿って全ての毒性試験を実施し安全性は EU, FDA より認められている。一般毒性は臨床量の 100 倍、遺伝毒性は 1 万倍の量で安全である。臨床試験、10 万例以上の臨床使用で問題は報告されていない。	安全性の実証: 発がん性 遺伝毒性 安全性薬理試験 生殖毒性 操作安全性

## 委員からの質問に対する各社からの回答

- 平成20年4月8日開催 血液事業部会運営委員会・安全技術調査会 合同委員会  
質問事項等まとめ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・2
- ・ マコファルマ社回答・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・5
- ・ BCT Japan 株式会社回答・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・6  
((4)の質問について、4月8日合同委員会後の追加説明あり)
- ・ バイオワン株式会社回答・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・16
  
- 平成20年4月8日開催 血液事業部会運営委員会・安全技術調査会 合同委員会後  
追加質問事項1(バイオワン社のみ)・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・27
- ・ バイオワン株式会社回答・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・28
  
- 平成20年4月8日開催 血液事業部会運営委員会・安全技術調査会 合同委員会後  
追加質問事項2・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・31
- ・ マコファルマ社回答・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・32
  - ・ (参考)マコファルマ社回答(英語)・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・34
- ・ BCT Japan 株式会社回答・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・37
  - ・ (参考)BCT Japan 株式会社回答(英語)、参考資料(文献2報)・・・・40
- ・ バイオワン株式会社回答・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・57

# 平成20年4月8日開催 血液事業部会運営委員会・安全技術調

## 査会合同委員会 質問事項等まとめ

### 1. 質問事項及び議論に必要なデータ等(全ての技術に対する質問)

#### ○不活化剤の体内動態、安全性について

- (1) 不活化剤の代謝(薬剤の排泄経路)。反復投与した場合の排泄、分解、蓄積の詳細。腎臓あるいは肝障害患者の場合の配慮。代謝(排泄完了)に要する時間。
- (2) 不活化剤の体内分布、特にレンズ等への蓄積など。不活化処理血液製剤を大量に使った場合の安全性は。
- (3) 不活化剤を除去した後、一定濃度以下であれば安全という科学的根拠は。
- (4) 他の薬剤との反応と、その問題点。
- (5) (薬剤としての)不活化剤の用法、用量、使用上の注意など(取り扱い説明書)
- (6) reduction ratio が主で、安全性試験の情報がない。

#### ○不活化効果について

- (7) 不活化効果(log をどの様にして求めたのか:使用したモデルウイルス・培養細胞など)
- (8) (3剤)不活化強度の比較。
- (9) 不活化効果の評価法の妥当性(モデルウイルスのデータのみでよいか)。
- (10) 不活化の対象病原体。ウイルス(HBV、HCV、HIV、その他未知のウイルスも含む?細菌?原虫?)
- (11) 不活化法の導入で、現在の輸血用血液製剤の感染リスクのそれぞれがどれだけ減少できると考えられるか?(それぞれの病原体に対する推定値とその根拠)また、外国の導入例において、どのような輸血後感染リスクがどれだけ減少したかを比較検証(あるいは推測)できるデータがあればその提示もお願いしたい。

#### ○不活化剤除去について

- (12) (除去後の)不活化剤の製剤中の残存率は。不活化剤を添加した後の回収をどのように計算しているのか。
- (13) (除去に伴う)製剤自体の減損率
- (14) (除去に伴う)製剤の生物活性の低下率

#### ○その他(日本、海外の状況等)

- (15) 国内、国外における治験研究の現状は。

- (16) 海外で治験(トライアル)ではなく、正式に導入している実績はどれほどか。
- (17) 危機管理体制確保の一環としての基礎的研究(治験研究)チーム設定の可能性は。
- (18) 不活化技術により現在の感染症検査のうち、何を省略できるのか。できないとしたら現在のわが国のような感染症検査が行われている国では屋上屋を架すこととならないか。また、海外で省略できている項目はあるのか。
- (19) コストベネフィットの問題だけでなく、日本では放射線照射をしているが、不活化との相乗で製剤が使い物にならないのではないか？その治験を行えるのか。HLAの近い日本人で輸血後GVHD予防のために照射をやめられるか。
- (20) 薬物添加以外の方法による不活化法の検討は。γ線照射による細菌滅菌の現状は。

## 2. 質問事項及び議論に必要なデータ等(各技術に対する質問)

### 1. MB

- 1) 処理後 C5a が 3 倍に増加している。これは処理によって補体が活性化した結果であり、血管透過性の亢進などアレルギー反応が増加する可能性がある。また、大量に投与することがあるので、投与可能な血漿量の検討はされているのか？
- 2) MB と結合する血漿タンパクはないのか？もし、血漿タンパクのなかで結合する因子があった場合、体内での沈着部位は確認されているのでしょうか？例えば、皮膚などにMBと結合したタンパクが存在した場合、日光によって再度、1重項酸素が産生され、組織が破壊される可能性はないのか？
- 3) MBと結合した血漿タンパクが処理によって発生する1重項酸素のために構造等が変化してネオアンチゲンとなって、血漿タンパクに対する自己抗体が産生されないのか？特に、自己免疫疾患やアトピーの患者に投与する場合は自己抗体が作られやすくなる可能性はないのか？
- 4) 導入した地域・国で導入後感染症が減少したとのデータがあれば提示していただきたい。また、導入後に感染症が発生した症例があれば、その理由(例えば、処理能力以上にウイルス量が多かった等)も示していただきたい。
- 5) 今までの投与実績と報告された重篤な副作用例があれば示していただきたい。

### 2 アモトサレン

- 6) 各種毒性試験の具体的な記載がなく、例えば、単回投与での毒性なし、といっても何頭使用して、どういう毒性を検討したのか全く不明。他の毒性試験も同様である。具体的な記載と、毒性の専門家の意見を聞きたい。
- 7) 不活化処理後のアモトサレン除去によっても 2mg のアモトサレンが血漿と結合して残存する。血漿タンパクと結合したアモトサレンはどのように代謝されるのか？

また、体内に結合したまま沈着する可能性を検討したことがあるか？例えば、皮膚などにMBと結合したタンパクが存在した場合、日光によって組織が破壊される可能性はないのか？

- 8) アモトサレンと血漿タンパクが結合して構造等が変化してネオアンチゲンとならないか？そのため、血漿タンパクに対する自己抗体が産生されないのか？特に、自己免疫疾患やアトピーの患者に投与する場合は自己抗体が作られやすくなる可能性はないのか？反復投与後の副作用として自己抗体産生の症例はないのか？
- 9) 導入した地域・国で導入後感染症が減少したとのデータがあれば提示していただきたい。また、導入後に感染症が発生した症例があれば、その理由（例えば、処理能力以上にウイルス量が多かった等）も示していただきたい。
- 10) 今までの投与実績と報告された重篤な副作用例があれば示していただきたい。
- 11) 血小板において2mgのアモトサレンが血漿と結合して残存するが、新鮮凍結血漿ではさらに多くのアモトサレンが血漿に結合して残存する可能性がある。血漿のデータがないので用意していただきたい。

### 3. リボフラビン

- 12) 結合する血漿タンパクはないのか？もし、血漿タンパクのなかで結合する因子があった場合、体内での沈着部位は確認されているのか。例えば、皮膚・眼球などに結合したタンパクが存在した場合、日光によって再度、活性化され組織が破壊される可能性はないのか？
- 13) 導入した地域・国で導入後感染症が減少したとのデータがあれば提示していただきたい。また、導入後に感染症が発生した症例があれば、その理由（例えば、処理能力以上にウイルス量が多かった等）も示していただきたい。
- 14) 今までの投与実績と報告された重篤な副作用例があれば示していただきたい。

### 3. 主な意見

- (1) 議論の時間が『時間切れ』になることは好ましくなく、時間を十分確保して行うべき。
- (2) 毒性学の専門家の意見を聞きたい。テルモ等、機器の滅菌を行っている人達は、病原性因子の不活化について（ $\gamma$ 線照射など）むしろ医学関係者よりも詳しい。いずれ不活化の毒性の検討が必要。
- (3) 導入にあたっては、日赤などで不活化をきちんと評価する体制が必要。
- (4) 危機管理体制として不活化技術を利用するというのが現在の最も有効な利用対象ではないか。

## マコファルマ社回答

回答は非公開。

# BCT Japan 株式会社回答

平成20年4月8日開催 血液事業部会運営委員会・安全技術調査会合同委員会  
不活化技術を有する事業者に対する質問事項等まとめ(配布用)

## 1. 質問事項及び議論に必要なデータ等(全ての技術に対する質問)

### ○不活化剤の体内動態、安全性について

Mirasol PRT 製品の安全性および毒性プロファイルに関する詳細は、“MIRASOL Monograph”, 第三章「MIRASOL 処置の安全性プロファイル」にその大半が記載されている。

- (1) 不活化剤の代謝(薬剤の排泄経路)。反復投与した場合の排泄、分解、蓄積の詳細。腎臓あるいは肝障害患者の場合の配慮。代謝(排泄完了)に要する時間。

Mirasol PRT System は、軽質の合成リボフラビン(ビタミン B2)を使用して、ドナーから採取した血小板内の病原体数を低減させる。リボフラビンを濃縮血小板に補助的な方法で使用し、混入病原体数を減らすことで、リボフラビンそのものの効果が人体外で発揮される。なお、リボフラビンには人体への代謝的もしくは生物学的作用が皆無のため、本システムにおいてリボフラビンが医薬品として作用することはない。

リボフラビンの薬物動態調査では、血漿からのリボフラビンの除去は主として尿中排泄によって行われるが、これによるリボフラビンの半減時間はおよそ 9.9 時間であると報告されている。また、病因や治療方法がさまざまに異なる肝硬変患者間の追加調査では、リボフラビンの代謝回転数になんら変動は見られなかった。一方、光分解リボフラビンの消失半減観測時間は、対人体の約 3.8 倍の Mirasol 処置血漿を投与したラットの実験において、約 55 時間であると判定された。

亜慢性毒性試験は、対人体と同量の Mirasol 処置血漿を週 6 日、13 週間投与したビーグル犬を用いて行われ、その結果、被験犬のいずれにも被験物質毒性が認められなかった。実験群と対照群からそれぞれ採取した肝臓を顕微鏡で観察したところ、後者群の肝臓にやや強めの炎症が認められ、それ以外に特筆すべき点は何もなかった。

(2) 不活化剤の体内分布、特にレンズ等への蓄積など。不活化処理血液製剤を大量に使った場合の安全性は。

リボフラビンの LD<sub>50</sub> (50%致死量) を判定するための調査がいくつか実施済みで、これらは“Reddy ら”に要約されている。LD<sub>50</sub> は、一部の調査で判定できたが、その他においては、最大 10,000mg/kg と、相当量のリボフラビンを投与しても判定が不可能であった。Mirasol 処置血小板/血漿 (輸液単位) の曝露レベル値 0.077mg/kg をマウスの静脈リボフラビンの LD<sub>50</sub> 報告値 50 – 100 mg/kg と比較した場合、少なくとも 649 (50/0,077) という安全係数が得られる。現時点では、リボフラビンの最大無有害性影響量は明らかではないが、かといって、MIRASOL 処置血液成分の輸血におけるリボフラビンおよびその光分解生成物への曝露レベルが有毒に作用する、との予見にはつながらない。

対 MIRASOL 処置血液成分曝露を最大可能レベルで繰り返し行ったが、主な生理機能になんら悪影響はなく、また標的臓器の毒性も検出されなかった。

Navigant による亜慢性毒性生体試験では、ビーグル犬に Mirasol 処置血漿を週 6 日 13 週間連続して投与したわけだが、検眼テストにおいても何ら異常は認められなかった。

(3) 不活化剤を除去した後、一定濃度以下であれば安全という科学的根拠は。

リボフラビンおよびその光分解生成物は、いずれも人体内で自然発生するものであり、除去する必要はない。

(4) 他の薬剤との反応と、その問題点。

テトラサイクリンとトリメトプリム・スルファメトキサゾール配合剤 (抗生物質) : リボフラビンはこれらの吸収/効果を阻害するため、同時摂取してはならない。

クロロキンおよびメフロキン : リボフラビンは、これら抗マラリア医薬治療剤の効果を低減する可能性がある。

(4 月 8 日合同委員会における質問に対する追加説明)  
Updated response to Question (4) from initial Q&A document:



(4) 他の薬剤との相互作用とその問題について

Mirasol PRT 処理の使用に関連して、懸念を惹起するような薬物相互作用が一切ないと結論づける in-vivo の最終報告はありません。

当初、厚生労働省に提供させていただいた Tetracycline(テトラサイクリン)及びトリメトプリム・スルファメトキサゾール配合剤 (Trimethoprim - sulfamethoxazole) とリボフラビン (Riboflavin) の相互作用の可能性に関する情報は、主に in-vitro 研究文献報告にもとづくものでした。それらの研究ではリボフラビン溶液が若干の潜在的影響を示唆するものでした。

とりわけ Mirasol アプリケーションに特有なこの件に関する詳細報告は、弊社とは一切関係のない毒性研究の専門家により現在準備されており、ご請求によりいつでも入手可能となります。

(5) (薬剤としての)不活化剤の用法、用量、使用上の注意など(取り扱い説明書)

リボフラビン (ビタミン B2) は 13 種の必須ビタミンのひとつで、栄養補助食品として幅広く用いられ、この認可着色剤は薬物とはみなされない。リボフラビンは、「欧州委員会科学評議会」でも認められており、またアメリカの「食品医薬品局」では、“一般に安全と認められる食品” に分類されている。リボフラビンの推奨日常摂取量は、平均的成人男子で最大約 1,3 mg、同女性で最大 1.1mg、授乳中の女性で最大 1.6mg である。また、リボフラビン欠乏症のための推奨治療量は、成人で 1 日 ≤ 30 mg である。なお、リボフラビンの安全性は、経口・皮下・腹腔・静脈等の投与経路で実証済みである。

マルチビタミン投与の一環であるリボフラビン補給は、早産児の経静脈栄養摂取法とよく併用される。この患者集団のリボフラビンの投与レベルは次のとおりで、一般的に日常推奨摂取量 (0.15 ~ 0.2 mg/kg) を超過しているが、リボフラビンによる副作用は報告されていない：0.62 mg/kg、0.66 mg/kg、0.43~0.72 mg/kg

(6) Reduction ratio が主で、安全性試験の情報がない。

以下は、下記出版物からの抜粋である：

“Toxicity Testing of a Novel Riboflavin-Based Technology for Pathogen Reduction and White Blood Cell Inactivation; Reddy, H. et al. (2008) *Transfusion Medicine Reviews*, 22(2): 133-153

人体におけるリボフラビンおよびその光分解生成物への可能曝露レベルは0.077 mg/kg (ただし輸液単位) である。臨床条件下において受血者へのリボフラビンおよび光分解生成物への可能曝露値は、平均体重70kg、公称リボフラビン溶液濃度500  $\mu$  mol/L、平均リボフラビン光変換率18%であり、公称リボフラビン溶液量35mLを前提として計算した。この曝露レベルは、生物集団の50%が生存した致死量報告地と比較するに値し、具体的には次のとおりである：マウスにリボフラビン (50-100 mg/kg)<sup>30</sup>を点滴投与、最低安全係数 $50/0.077 = 649$

ただし、この安全係数計算は、人体内でのリボフラビンの中毒量について、臨床資料やしかるべき動物実験の確かなデータが存在しないため、最大無有害性影響量がいまだ不明であり、いくぶん疑似的である。

明らかに高いレベルの曝露が血小板または血漿輸血により起こらない限り、MirasolPRT 処置製剤中のリボフラビン及び光生成物の非経口曝露による人体への有毒性を予見すべき根拠は何もない。

同様の理由により、血小板にMirasol PRT処理を施した後の曝露値とリボフラビンの一日の摂取許容量(ADI)  $0 \sim 0.54 \text{ mg} \times \text{kg}^{-1} \times \text{d}^{-1}$ を比較した場合もまた誤解を招きかねない；ADIは生涯的かつ日常的な食物中物質への曝露値を示すものであり、仮にADI摂取を週に数回、数ヶ月間続けたとしても、短期的経口曝露の適正な比較子にはならない。

生理的必須物質にとっては正常といえない状況下、リボフラビンとその光分解生成物の生体内における毒性試験値は低い、という毒物学者の最適アドバイスがある。

Mirasol PRTシステムは、広範囲に及ぶ臨床前評価プログラムによって評価が行われており、人体における安全プロファイルを取り扱った本評価試験の結果に加え、リボフラビンとその光分解生成物の履歴資料も提供できる状況にある。本評価試験で取得・報告されたデータは、資料中のデータと整合性がとれており、かつ、輸血時の本システムの使用による毒性リスクは低いとされている。

## ○不活化効果について

(7) 不活化効果(log をどの様にして求めたのか:使用したモデルウイルス・培養細胞など)

“MIRASOL Monograph” 第四章を参照のこと。

(8) (3剤)不活化強度の比較。

“MIRASOL Monograph” 第四章を参照のこと。

(9) 不活化効果の評価法の妥当性(モデルウイルスのデータのみでよいか)。

“MIRASOL Monograph” 第四章を参照のこと。

(10) 不活化の対象病原体。ウイルス(HBV、HCV、HIV、その他未知のウイルスも含む?細菌?原虫?)

“MIRASOL Monograph” 第四章および第五章を参照のこと。

(11) 不活化法の導入で、現在の輸血用血液製剤の感染リスクのそれぞれがどれだけ減少できると考えられるか?(それぞれの病原体に対する推定値とその根拠)また、外国の導入例において、どのような輸血後感染リスクがどれだけ減少したかを比較検証(あるいは推測)できるデータがあればその提示もお願いしたい。

本件について、Mirasol 製品関連データはいまだ取得されていない。現時点で取得している限定情報をもとにモデル化を行うことはできない。

### ○不活化剤除去について

(12) (除去後の)不活化剤の製剤中の残存率は、不活化剤を添加した後の回収をどのように計算しているのか。

MIRASOL システムでは、リボフラビンおよびその光分解生成物の残渣を除去する必要はない。本システムで使用する光感作化学物質は、全光分解生成物と共に人血中で認識されており、除去手段を必要としない。実際にリスクを解析した結果、本システムで化合物除去作業を行うと对患者リスク率が増加するであろうということがわかった。(当然のことだが、本除去作業は、未知もしくは被疑毒性プロファイルをもつ合成化合物支援システムにおいては適切なリスクの軽減手段である。)

(13) (除去に伴う)製剤自体の減損率

リボフラビンの吸収半減時間は 1.1 時間で、これは血液から組織またはその他の流体への吸収による半減時間をさす。この他、処置済み濃縮血小板輸血一時間後に採取した患者の血液サンプルを使った HPLC テストでは、血中のリボフラビンレベルは基準値に迅速に戻ることが示された。前述のとおり、リボフラビンの血漿からの除去は主に尿中排泄によって行われるが、これによるリボフラビンの半減時間は 9.9 時間であると実証されている。

血小板の減損率は約 2% (PLT Loss)。

血小板の品質に関する詳細については“MIRASOL Monograph”第六章を参照のこと。

#### (14) (除去に伴う)製剤の生物活性の低下率

Mirasol 処置血小板は、フランスにおける血小板減少疾患患者の臨床試験でその有効性が証明されている。血漿中の血小板の生存期間は5日間、血小板添加溶液中の血小板のそれは7日であると実証された。

詳細については“MIRASOL Monograph”第六章を参照のこと。

### ○その他(日本、海外の状況等)

#### (15) 国内、国外における治験研究の現状は。

Navigant Biotechnologies, LLC では、日本においては臨床試験を実施していないが、フランスでは大規模な治験を最近執り行い、そのデータを解析中である。スペイン、イタリア、リトアニアでは、MIRASOL 処置血小板が輸血用として継続的に使用されている。また FDA からは、MIRASOL 処置済全血について、この全血からの赤血球分離および長期保存処置の実施許可を受領した。

#### (16) 海外で治験(トライアル)ではなく、正式に導入している実績はどれほどか。

血小板向けとして、CE マーキング認識 MIRASOL システムの販売が各国で開始されている。当社では、本システムの販売許可を2007年10月後半に取得した。スペイン、イタリア、リビア、リトアニア各国の多数の血液センターでは、本システムを継続的に使用し始めている。なお、要請があり次第マニュアルを支給する予定である。

#### (17) 危機管理体制確保の一環としての基礎的研究(治験研究)チーム設定の可能性は。

Gambro BCT および Navigant 間では、潜在的装置関連事故に関する情報を受領・調査する制度が確立している。この管理制度には、医師、医療従事者、科学者、技師の専門知識が必要である。Gambro BCT は、将来的に科学調査グループを設立し、PRT を専門とする品質部門を強化する予定であり、日本国内の大学や日本赤十字社と提携し、あらゆる基本臨床研究が可能になるはずである。

#### (18) 不活化技術により現在の感染症検査のうち、何を省略できるのか。できないとしたら現在のわが国のような感染症検査が行われている国では屋上屋を架すこととならないか。また、海外で省略できている項目はあるのか。

当社の目的は、病原体および残余白血球を不活化する手段を提供し、最も安全な血液製剤の供給をサポートすることにある。この最終目的を達成するため、当社は、特異的試験の排除を特定の政府機関や見込み客だけに提言しない方針をとっている。Mirasol システム導入時に排除すべき試験があれば、どれを排除すべきかを決断するための支援データを顧客に提供する。また、地理情報変数（感染率、新興病原体の危険率等）をとり入れることにより、余分な試験を排除するための適正かつ各顧客に即した決定がなされることになる。

- (19) コストベネフィットの問題だけでなく、日本では放射線照射をしているが、不活化との相乗で製剤が使い物にならないのではないのか？その治験を行えるのか。HLAの近い日本人で輸血後GVHD予防のために照射をやめられるか。

Navigant は、これまで広範囲に及ぶ生体内実験や動物実験を実施し、白血球細胞を不活化して $\gamma$ 線照射レベルと同程度、もしくはそれ以上にするための技術を実証してきた。フランスでとり行われた臨床試験では、白血球細胞レベルを落とすか、もしくは $\gamma$ 線照射レベルでキープするか否かの決断が治験医師にゆだねられた。一方 90%以上の症例において、Mirasol システム処理製剤の場合 $\gamma$ 線照射を行わないという決断がなされている。ただし、臨床試験で規制対象とされている場合、大多数の患者に $\gamma$ 照射製剤が使用されている。

- (20) 薬物添加以外の方法による不活化法の検討は。 $\gamma$ 線照射による細菌滅菌の現状は。

Navigant で開発中の MIRASOL システムは、現段階では薬剤を必要とせず、光線感作化学物質として自然発生ビタミンであるリボフラビンを使用している。現に、Mirasol 処置でリボフラビンが使用されていることからわかるように、リボフラビンを薬剤とみなす規制制度が存在しないことは周知のとおりである。

リボフラビンを光感作化学物質として使用すると、病原体の核酸に回復不能なダメージが生じる。一方、リボフラビンを使用せず紫外線のみ単独で照射した場合、これらの核酸ダメージが回復可能となる、という問題が生じるため、紫外線のみ依存する前計算放射輝度伝達方法は、その効果が弱いと確信する。

$\gamma$ 線照射により不安定な血液製剤内の細菌を不活化する最近の技術について、弊社は詳細な知識を持ち得ない。

## 2. 質問事項及び議論に必要なデータ等(各技術に対する質問)

### 1. MB

- 1) 処理後 C5a が 3 倍に増加している。これは処理によって補体が活性化した結果であり、血管透過性の亢進などアレルギー反応が増加する可能性がある。また、大量に投与することがあるので、投与可能な血漿量の検討はされているのか？
- 2) MB と結合する血漿タンパクはないのか？もし、血漿タンパクのなかで結合する因子があった場合、体内での沈着部位は確認されているのでしょうか？例えば、皮膚などにMBと結合したタンパクが存在した場合、日光によって再度、1重項酸素が産生され、組織が破壊される可能性はないのか？
- 3) MBと結合した血漿タンパクが処理によって発生する1重項酸素のために構造等が変化してネオアンチゲンとなって、血漿タンパクに対する自己抗体が産生されないのか？特に、自己免疫疾患やアトピーの患者に投与する場合は自己抗体が作られやすくなる可能性はないのか？
- 4) 導入した地域・国で導入後感染症が減少したとのデータがあれば提示していただきたい。また、導入後に感染症が発生した症例があれば、その理由(例えば、処理能力以上にウイルス量が多かった等)も示していただきたい。
- 5) 今までの投与実績と報告された重篤な副作用例があれば示していただきたい。

### 2 アモトサレン

- 6) 各種毒性試験の具体的な記載がなく、例えば、単回投与での毒性なし、といっても何頭使用して、どういう毒性を検討したのか全く不明。他の毒性試験も同様である。具体的な記載と、毒性の専門家の意見を聞きたい。
- 7) 不活化処理後のアモトサレン除去によっても 2mg のアモトサレンが血漿と結合して残存する。血漿タンパクと結合したアモトサレンはどのように代謝されるのか？また、体内に結合したまま沈着する可能性を検討したことがあるか？例えば、皮膚などにMBと結合したタンパクが存在した場合、日光によって組織が破壊される可能性はないのか？
- 8) アモトサレンと血漿タンパクが結合して構造等が変化してネオアンチゲンとならないか？そのため、血漿タンパクに対する自己抗体が産生されないのか？特に、自己免疫疾患やアトピーの患者に投与する場合は自己抗体が作られやすくなる可能性はないのか？反復投与後の副作用として自己抗体産生の症例はないのか？
- 9) 導入した地域・国で導入後感染症が減少したとのデータがあれば提示していただきたい。また、導入後に感染症が発生した症例があれば、その理由(例えば、処理能力以上にウイルス量が多かった等)も示していただきたい。

- 10) 今までの投与実績と報告された重篤な副作用例があれば示していただきたい。
- 11) 血小板において2mgのアモトサレンが血漿と結合して残存するが、新鮮凍結血漿ではさらに多くのアモトサレンが血漿に結合して残存する可能性がある。血漿のデータがないので用意していただきたい。

### 3.リボフラビン

- 12) 結合する血漿タンパクはないのか？もし、血漿タンパクのなかで結合する因子があった場合、体内での沈着部位は確認されているのか。例えば、皮膚・眼球などに結合したタンパクが存在した場合、日光によって再度、活性化され組織が破壊される可能性はないのか？

当社が執り行った調査では、リボフラビンが血漿タンパク質、赤血球表面タンパク質、もしくはその他の表面タンパク質のいずれにも結合しないことが示された。リボフラビンは、電子転送中に電子を取得して作用するが、たとえばソラレンを使用するような競合技術では、実際のところタンパク質の二重結合や核酸に結合する。

リボフラビンは Mirasol 処置後のタンパク質とは共有結合しないため、リボフラビンの高濃度領域もしくは自然タンパク質／細胞との結合が患者への安全性に悪影響を及ぼすものとは考えられない。前述のとおり、リボフラビンには水溶性があり、人体から迅速に排出される。

赤血球は、当然ある種のタンパク質と結合しているが、皮膚や眼球への局部集中はありえない。次の出版物を参照されたい： Rao P, et al. Elevation of serum riboflavin carrier protein in breast cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 1999 Nov;8(11):985-90, Watson CD, Ford HC) . High-affinity binding of riboflavin and FAD by immunoglobulins from normal human serum. *Biochem Int.* 1988 Jun;16(6):1067-74. High-affinity binding of riboflavin and FAD by immunoglobulins from normal human serum.

- 13) 導入した地域・国で導入後感染症が減少したとのデータがあれば提示していただきたい。また、導入後に感染症が発生した症例があれば、その理由（例えば、処理能力以上にウイルス量が多かった等）も示していただきたい。

本件についてはデータはない。

- 14) 今までの投与実績と報告された重篤な副作用例があれば示していただきたい。

現時点までの臨床データには、装置関連の有害事象は一切含まれていない。とりわけ、血小板の不応性や赤血球の同種免疫性を著しく高めるような事象は確認されていない。

### 3. 主な意見

- (1) 議論の時間が『時間切れ』になることは好ましくなく、時間を十分確保して行うべき。
- (2) 毒性学の専門家の意見を聞きたい。テルモ等、機器の滅菌を行っている人達は、病原性因子の不活化について(γ線照射など)むしろ医学関係者よりも詳しい。いずれ不活化の毒性の検討が必要。
- (3) 導入にあたっては、日赤などで不活化をきちんと評価する体制が必要。
- (4) 危機管理体制として不活化技術を利用するというのが現在の最も有効な利用対象ではないか。



# バイオワン株式会社回答

平成20年4月8日開催 血液事業部会運営委員会・安全技術調査会合同委員会  
不活化技術を有する事業者に対する質問事項等まとめ(配布用)

## 1. 質問事項及び議論に必要なデータ等(全ての技術に対する質問)

IBS : InterCept Blood System の略。S-59 による不活化技術をさす。

IBS 処理 : S-59 による不活化処理をさす。

### ○不活化剤の体内動態、安全性について

(1) 不活化剤の代謝(薬剤の排泄経路)。反復投与した場合の排泄、分解、蓄積の詳細。腎臓あるいは肝障害患者の場合の配慮。代謝(排泄完了)に要する時間。

#### \*S-59 の体内動態・代謝・蓄積性。

S-59 のヒトにおける体内動態は Phase IB において、自己血小板濃厚液を IBS 処理し被験者に戻す検討が行なわれた。残留 S-59 の平均濃度は  $0.31 \mu\text{M}$  ( $25.1 \mu\text{g/body}$ )、最高血中濃度の平均値は  $1113\text{pg/mL}$ 、半減期の平均値は  $428.1\text{min}$ 、AUC の平均値は  $15.1\text{ng/L}\cdot\text{min}$  であった。

非臨床試験において尿中および糞中排泄物を HPLC で検討した結果、糞中では多くのマイナーピークが検出され非常に高度代謝されていることがうかがえた。また尿サンプルにおいて S-59 の代謝を検討しているが、グルクロン酸抱合および硫酸抱合は関与していない。(8-MOP はグルクロン酸抱合および硫酸抱合の関連あり)。非臨床試験(ラット及びイヌ)における検討では、投与後 28 日目までに約 65% が糞中、約 10% が尿中に排泄された。

非臨床試験における検討ではラット及びイヌにおいて、投与後 48 時間目までに投与された残留 S-59 (CAD 処理済)の 57%、35% が排泄された。また、投与後 28 日目までに、それぞれ 86-87%、70-84% が排出された。一方、ラットにおいて、体内に残留した S-59 は投与後 28 日目で 6% であった。

#### \*肝機能障害又は腎機能障害に対する場合の代謝。

血漿用 IBS の臨床試験において、肝障害患者を対象にしたランダム化比較試験が実施されているが、有害事象の発現に有意差は認められなかった。血漿用 IBS の臨床試験において、肝障害患者を対象にしたランダム化比較試験が実施されているが、有害事象の発現に有意差は認められなかった。

腎不全の患者では血小板と血漿で臨床試験をしたが蓄積性など問題はなかった。血小板の1ユニットの輸血では血中のピークレベルは  $1\text{ng/ml}$  程度ですぐに消失した。血漿1Litter 輸血後でもピークレベルは  $10\text{ng/ml}$  ですぐに消失した。

(2) 不活化剤の体内分布、特にレンズ等への蓄積など。不活化処理血液製剤を大

量に使った場合の安全性は。

S-59 単体での代謝をラット、マウスを用いて試験したところ、半減期は 0.8 時間であり、一方血小板と一緒に投与した場合 ヒトで 6.5 時間、イヌで 7.2 時間と代謝は早い。また 28 日間の連続投与でも蓄積性は見られず、臓器蓄積性(特別な臓器のみ蓄積する)は認められていない。

C14-S-59 によりラットにおける体内分布を確認したところ、表のように脳、眼の濃度は非常に低い。in vivo 試験では臨床使用量の x40000 をマウスに投与しても毒性は認められず、安全域は非常に広い。

臨床的には血漿交換などの治療においてほぼ同時に 100 処理分相当量以上の血漿を輸血しているが、副作用は報告されていない(17 例で 3185 血漿を輸血:平均 187 血漿/ヒト)

(3) 不活化剤を除去した後、一定濃度以下であれば安全という科学的根拠は。

欧州において 2 本の Phase III B スタディが実施されている。これらの試験において、残留 S-59 量が測定されている。設定された目標値は  $0.5 \mu\text{M}$  ( $50 \mu\text{g}/300\text{ml}$ ) であり、結果として平均値はそれぞれ  $0.4 \mu\text{M}$  及び  $0.46 \mu\text{M}$  であった。

一方、イヌにおいて  $25\text{mg}/\text{kg}$ 、28 日間連続投与しても毒性所見は報告されていない。この量は、臨床で血小板がヒトに輸血された場合の S-59 体内混入量 ( $0.4 \mu\text{g}/\text{kg}$ ) と比較した場合、60000 倍と非常に高く、安全域が大きいことを示している。

また、本設定における安全性は、同じく欧州及び米国において実施された Phase III Study において、IBS 処理済み血小板濃厚液と通常の血小板濃厚液の間に有意差を示した有害事象は観察されなかった。また、Phase III B、10000 輸血以上を集積した Hemovigilance Study、小児を対象とした Study、約 120000 輸血以上の実績において特異的な有害事象は観察されていないことから、上記の残留 S-59 量の設定が適切あるいは許容できると考えられる。

(4) 他の薬剤との反応と、その問題点。

薬剤相互作用についての試験、解析は実施されていない。しかし、臨床試験で一般的に使用されている薬剤と併用されているが、特別な問題は生じていない。

(5) (薬剤としての)不活化剤の用法、用量、使用上の注意など(取り扱い説明書)

S-59 は人体に対する直接的な治療効果を目的とした化学物質ではないので医薬品として取り扱われることはない。

本医療機器には S-59 溶液 ( $1.01 \text{g}/\text{L}$ ) が 15mL 又は 17.5mL 含まれており、これを血小板と混合し紫外線 A ( $320-400\text{nm}$  でエネルギーが低く最も可視光に近い紫外線) を照射することにより病原体を不活化することが可能となる。

万一 S-59 溶液を皮膚等に付着させてしまった場合は、MSDS (Material Safety Data Sheet) の指針に従い速やかに大量の水で洗浄する。

(6) reduction ratio が主で、安全性試験の情報がない。

前臨床試験において多くの毒性試験が ICH の医薬品のガイドラインに従って実施されている。その結果、臨床使用量の 40000 倍で遺伝毒性は認められておらず、安全性は高い。また、安全性のデータは

米国FDAでは審査が終了し、EUのCEマーク、フランス AFFSAP、ドイツPEIで承認されている。

一方、本設定における安全性は、同じく欧州及び米国において実施された Phase III Study において、IBS 処理済み血小板濃厚液と通常の血小板濃厚液の間に有意差を示した有害事象は観察されなかった。また、Phase III B、10000 輸血以上を集積した Hemovigilance Study、小児を対象とした Study、約 120000 輸血以上の実績において特異的な有害事象は観察されていないことから、上記の残留 S-59 量の設定が適切あるいは許容できると考えられる。

毒性試験の結果については 080401 概要の 7. 毒性試験 参照。

### ○不活化効果について

(7) 不活化効果(log をどの様にして求めたのか:使用したモデルウイルス・培養細胞など)

(8) (3剤)不活化強度の比較。

(9) 不活化効果の評価法の妥当性(モデルウイルスのデータのみでよいか)。

(10) 不活化の対象病原体。ウイルス(HBV、HCV、HIV、その他未知のウイルスも含む?細菌?原虫?)

(7)(9)(10)に関して

不活化効果については 080401 概要の 3. S-59 による病原因子の不活化能力 及び 不活化効果試験の Assay Method 参照。

インターセプト(S-59)はウイルス、細菌、原虫のみならず白血球(T細胞)をも不活化可能である。

不活化効果を確認したウイルスの多くはモデルウイルスであるが、HIVについてはモデルウイルス以外にエイズ患者から分離したウイルスを用いて試験を行っており、不活化効果を認めている。B型肝炎、C型肝炎ウイルスは in vivo で評価試験を行っている。

実験において表の数字までしか病原体を増殖することができなく、その病原体をすべて不活化できたので、もし病原体をもっと増殖させることが可能であれば、もっと数字が大きくなるかもしれないという可能性を含めて“>”で表している。

(8)に関して

3剤を直接比較した試験結果は2005年に実施した日本赤十字社の試験以外にはまだない。

(11) 不活化法の導入で、現在の輸血用血液製剤の感染リスクのそれぞれがどれだけ減少できると考えられるか?(それぞれの病原体に対する推定値とその根拠)  
また、外国の導入例において、どのような輸血後感染リスクがどれだけ減少したかを比較検証(あるいは推測)できるデータがあればその提示もお願いしたい。

臨床試験の結果、既に導入している国での使用実績ではこれまでに細菌による敗血症、GVHD、或いは他の病原による感染症の発生は報告されていない。

すでに12万回を越える輸血実績があるが、細菌検査を実施しても11,000回(ドイツ赤十字)から59,000回(米国赤十字)の輸血に1回の頻度で発生があると報告されている敗血症がIBSの使用例では細菌検査を実施していないにもかかわらず報告されていない。

フランスのLa Union島ではChikungunyaの流行により島内での採血を中止せざるを得なくなって赤血球、血漿はフランス本土からの空輸により供給しているが、血小板は保存期間が短いためフランス本土からの供給では間に合わなくなっている。すでに導入していたストラスブールからSOPとともにIBSを

導入し2006年年初より血小板のみ成分採血により採取を開始しIBSで処理して供給している。IBS処理により新たな病原の流行があっても血液製剤の供給が確保できることが証明されている。その後北イタリアでもChikungunyaが侵入したがIBSが導入されていたため血小板の供給には支障がなかった。輸血の副作用について米国のPhase IIIにおいてIBS処理群で副作用が少なくなる傾向が示唆された。

さらにベルギー、フランスアルサス地方、La Union島でもHemovigilanceの調査結果からIBSで処理した血小板輸血では通常の血小板輸血に比較して副作用の発生率が1000回輸血当たり1/3に減少することが報告されている。

副作用は血小板に含まれる血漿成分の減少(100%→35%)だけでも改善され IBS により不活化することでさらに改善することが示唆されている。

12万回を超える血小板輸血で1例 TRALI の発生が報告されているこの例は3回出産を経験した女性から成分採血した血小板の輸血により発生した。

海外のヘモビジランス情報はスライド 参考資料2参照。

### ○不活化剤除去について

(12) (除去後の)不活化剤の製剤中の残存率は、不活化剤を添加した後の回収をどのように計算しているのか。

欧州において2本のPhase III B スタディが実施されている。これらの試験において、残留 S-59 量が HPLC で測定されている。設定された目標値は  $0.5 \mu\text{M}$  ( $50 \mu\text{g}/300\text{ml}$ ) であり、結果として平均値はそれぞれ  $0.4 \mu\text{M}$  及び  $0.46 \mu\text{M}$  であった。

一方、イヌにおいて  $25\text{mg}/\text{kg}$ 、28日間連続投与しても毒性所見は報告されていない。この量は、臨床で血小板がヒトに輸血された場合の S-59 体内混入量 ( $0.4 \mu\text{g}/\text{kg}$ ) と比較した場合、60000倍と非常に高く、安全域が大きいことを示している。

また、一方、本設定における安全性は、同じく欧州及び米国において実施された Phase III Study において、IBS 処理済み血小板濃厚液と通常の血小板濃厚液の間に有意差を示した有害事象は観察されなかった。また、Phase III B、10000 輸血以上を集積した Hemovigilance Study、小児を対象とした Study、約 120000 輸血以上の実績において特異的な有害事象は観察されていないことから、上記の残留 S-59 量の設定が適切あるいは許容できると考えられる。

(13) (除去に伴う)製剤自体の減損率

ベルギー、フランスの実績において、不活化処理による減損率は約7-8%である。

(14) (除去に伴う)製剤の生物活性の低下率

In vitro の試験ではIBS処理群と対象群で差がみられているがどちらもAABBの基準の範囲内であり、かつ in vivo のウサギの耳出血時間モデルでは両処理群で差が認められず、血小板止血機能に有害な影響を与えないことが判明している。

また米国のPhase IIIによる出血の防止をEnd Pointとした臨床試験でIBS処理群と対象群で差がないことを実証している。

市販後の追跡調査でもIBS処理によって血小板の登用量が増えている情報はない。

不活化処理により血小板の回収率は7-8%低下するが活性面での低下は市販後の調査結果では問題になっていない。

その原因の一部は血小板輸血にあたって医療の現場では厳密には血小板数を管理していないこともあると思われる。

詳細は 080401 概要の6. 血小板の機能 参照

### ○その他(日本、海外の状況等)

(15) 国内、国外における治験研究の現状は。

(16) 海外で治験(トライアル)ではなく、正式に導入している実績はどれほどか。

導入実績は添付の資料参照:080401 導入実績

輸血に使われた血小板は 12 万バッグ 以上。

#### \* 世界中のインターセプト導入国(ルーチンユース-12 カ国)

ベルギー、フランス、ドイツ、イタリア、ノルウェー、スペイン、スウェーデン、ロシア、チェコ、スロベニア、クエート、マレーシア

#### \* 主な既承認国での承認年月日

フランス Afssaps:2005 年 7 月 19 日

ドイツ:2007 年 1 月 29 日

イタリア:2002 年 3 月 31 日

スペイン:2002 年 3 月 31 日

#### \* アメリカの現状:FDA 申請中

米国では出血防止を End Point にした約600人規模の Double Blind Phase III まで終了。申請書のうち前臨床の部分は既に審査が終わり問題がないとされています。Phase I, Phase II においても問題はなく Phase III の試験結果で IBS 処理した血小板を輸血した群に対象群比較して有意に肺障害の発生頻度が高いことがわかりました。この原因について追加調査が行われ追跡調査の結果 S-59 処理による障害の発生ではないと判断された。原因として考えられるのは血小板輸血が繰り返し必要になる例は白血病の治療を受けた患者、或いは骨髄移植を受けた患者が多く治療には放射線治療が入っていることが多くなります。放射線治療は肺障害が副作用として発生することが知られています。放射線の照射量を調べたところ S-59 処理群の方が前治療でより多くの放射線照射を受けていました。しかし FDA は実施した Phase III は肺障害の頻度を検出することを目的とした試験ではないので大規模な試験を実施して発生の頻度を比較すべきということで1万人規模以上の試験の提案をしました。それは S-59 開発当時は骨髄移植の前治療に放射線治療が多く使われていて副作用としての肺障害の発生も10%以上ありましたが現在は治療方法が改善されて肺障害の発生頻度は5%以下になっています。また前治療も放射線を含まない治療に変わっているため改めて同じような試験をしても結果は確認できないので FDA の担当官と協議を続けてきました。一方同じ臨床試験の報告を審査した EU, AFSAP(フランス)、PEI(ドイツ)の担当官はすべて審査の上問題はないということで承認している。この問題についてはトロントの会議、および Ministry of Health and Human Service の公開の席上でも取り上げられ FDA の担当官の誤解であることが PEI の Dr. Heiden から指摘されトロント会議でも、HSS の会議でも勧告となりました。なって病原不活化は安全であることを示す十分な情報がある、一方では温暖化などにより予期していない病原の侵入がありことが起きてからではなく先取りして対応すべきということで勧告になっています。米国では欧州の Hemovigilance の情報も合わせて審査して承認する方向で動き出しています。

(17) 危機管理体制確保の一環としての基礎的研究(治験研究)チーム設定の可能性は。

血小板を製造する施設に協力して研究チームを編成することに協力できます。しかしこの試験の実施者は血小板を製造する側にあるので臨床試験のための治験申請も製造者(日本赤十字社)になりま

す。治験申請に必要な資料については既に整っていると考えています。

- (18) 不活化技術により現在の感染症検査のうち、何を省略できるのか。できないとしたら現在のわが国のような感染症検査が行われている国では屋上屋を架すこととならないか。また、海外で省略できている項目はあるのか。

現時点では直接のコスト比較は行われていない。ただし、IBS の導入によって、新たな病原体検査の追加が不要になる可能性がある。白血球除去に関しては、IBS 処理を行えば、理論的にはなくてもかまわないが、各血液センターの判断に従う。又、不活化処理をするため処理費用はプラスとなるが、次のような費用削減効果がフランス、ベルギーで報告されている。しかし詳細は各国の状況によって異なるであろう。フランスは導入の結果 Single NAT の導入は不要と判断している。

費用削減効果(フランス・ベルギー)

細菌試験、ガンマ線照射が不要となる。追加の病原の試験が不要になる(CMV)など。  
保存期間を7日まで延長可能により廃棄率が減少する  
血漿量を減少できるので節約した血漿を血漿製剤などに有効に利用できる。

- (19) コストベネフィットの問題だけでなく、日本では放射線照射をしているが、不活化との相乗で製剤が使い物にならないのではないか？その治験を行えるのか。HLAの近い日本人で輸血後GVHD予防のために照射をやめられるか。

\* GVHD の予防に関して。

γ線照射と同等あるいはそれより有効というデータに関して、臨床試験でのγ線照射との比較データがあり、サイトカイン産生能(IL-8、IL-1β)をγ線照射処理と IBS 処理で比較した試験ではγ線照射血小板より有意に抑制する結果が得られた。

また S-59 は 83 塩基対毎に結合するのに対しγ線照射は 3 万 7 千塩基対毎であることより IBS 処理はγ線照射と同等あるいはそれ以上に GVHD の発症を抑制すると考えられる。したがって IBS 処理とガンマー線処理を併用することは考えていない。(IBS 処理:S-59 による不活化処理)

一方 臨床試験で S-59 による不活化処理した血小板をガンマー線照射した例があるが、特別な問題は生じていない。

- (20) 薬物添加以外の方法による不活化法の検討は。γ線照射による細菌滅菌の現状は。

参考: スライド(080401UVC)あり。白血球不活化程度のガンマー線照射量では Virus の不活化ができない。

UVC についてはマコファルマ社の公表試験成績があり HIV の不活化が 1.36 ログであるとされています。また UVC については血小板の活性低下が報告されています。

## 2. 質問事項及び議論に必要なデータ等(各技術に対する質問)

### 1. MB

- 1) 処理後 C5a が 3 倍に増加している。これは処理によって補体が活性化した結果で

あり、血管透過性の亢進などアレルギー反応が増加する可能性がある。また、大量に投与することがあるので、投与可能な血漿量の検討はされているのか？

- 2) MB と結合する血漿タンパクはないのか？もし、血漿タンパクのなかで結合する因子があった場合、体内での沈着部位は確認されているのでしょうか？例えば、皮膚などにMBと結合したタンパクが存在した場合、日光によって再度、1重項酸素が産生され、組織が破壊される可能性はないのか？
- 3) MBと結合した血漿タンパクが処理によって発生する1重項酸素のために構造等が変化してネオアンチゲンとなって、血漿タンパクに対する自己抗体が産生されないのか？特に、自己免疫疾患やアトピーの患者に投与する場合は自己抗体が作られやすくなる可能性はないのか？
- 4) 導入した地域・国で導入後感染症が減少したとのデータがあれば提示していただきたい。また、導入後に感染症が発生した症例があれば、その理由(例えば、処理能力以上にウイルス量が多かった等)も示していただきたい。
- 5) 今までの投与実績と報告された重篤な副作用例があれば示していただきたい。

## 2 アモトサレン

- 6) 各種毒性試験の具体的な記載がなく、例えば、単回投与での毒性なし、といても何頭使用して、どういう毒性を検討したのか全く不明。他の毒性試験も同様である。具体的な記載と、毒性の専門家の意見を聞きたい。

080401 概要の7. 毒性試験結果を参照。

- 7) 不活化処理後のアモトサレン除去によっても 2mg のアモトサレンが血漿と結合して残存する。血漿タンパクと結合したアモトサレンはどのように代謝されるのか？また、体内に結合したまま沈着する可能性を検討したことがあるか？例えば、皮膚などにMBと結合したタンパクが存在した場合、日光によって組織が破壊される可能性はないのか？

排泄物に中間代謝物は確認されず、すべて低分子になっている。半減期、S-59 の代謝及び排泄物から推察して中間代謝物にとどまる時間は非常に短いと思われる。S-59 で処理した血小板の 28 日間連続投与の毒性試験で毒性が認められておらず蓄積性はないと考える。

- 8) アモトサレンと血漿タンパクが結合して構造等が変化してネオアンチゲンとならないか？そのため、血漿タンパクに対する自己抗体が産生されないのか？特に、自己免疫疾患やアトピーの患者に投与する場合は自己抗体が作られやすくなる可能性はないのか？反復投与後の副作用として自己抗体産生の症例はないのか？

免疫処理したニュージーランド白ウサギの抗体を用いて in vitro でネオアンチゲンが産生されるか

どうかの試験を実施したが、ネオアンチゲンは確認されていない。さらに、臨床試験、市販後の調査を通じて抗体産生の報告はない。

- 9) 導入した地域・国で導入後感染症が減少したとのデータがあれば提示していただきたい。また、導入後に感染症が発生した症例があれば、その理由(例えば、処理能力以上にウイルス量が多かった等)も示していただきたい。

既に導入している国での使用実績ではこれまでに細菌による敗血症、GVHD、或いは他の病原による感染症の発生は報告されていない。

すでに12万回を越える輸血実績があるが、細菌検査を実施しても11,000回(ドイツ赤十字)から59,000回(米国赤十字)の輸血に1回の頻度で発生があると報告されている敗血症がIBSの使用例では細菌検査を実施していないにもかかわらず報告されていない。

ベルギー、フランスアルサス地方、La Union島でもHemovigilanceの調査結果からIBSで処理した血小板輸血では通常の血小板輸血に比較して副作用の発生率が1000回輸血当たり1/3に減少することが報告されている。

副作用は血小板に含まれる血漿成分の減少(100%→35%)だけでも改善されIBSにより不活化することでさらに改善することが示唆されている。

12万回を超える血小板輸血で1例 TRALI の発生が報告されているこの例は3回出産を経験した女性から成分採血した血小板の輸血により発生した。

海外のヘモビジランス情報はスライド 参考資料2参照。

- 10) 今までの投与実績と報告された重篤な副作用例があれば示していただきたい。

120000例以上の実績があるが、重篤な副作用報告はない。

- 11) 血小板において2mgのアモトサレンが血漿と結合して残存するが、新鮮凍結血漿ではさらに多くのアモトサレンが血漿に結合して残存する可能性がある。血漿のデータがないので用意していただきたい。

後日追加。

### 3.リボフラビン

- 12) 結合する血漿タンパクはないのか？もし、血漿タンパクのなかで結合する因子があった場合、体内での沈着部位は確認されているのか。例えば、皮膚・眼球などに結合したタンパクが存在した場合、日光によって再度、活性化され組織が破壊される可能性はないのか？

- 13) 導入した地域・国で導入後感染症が減少したとのデータがあれば提示していただきたい。また、導入後に感染症が発生した症例があれば、その理由(例えば、処理能力以上にウイルス量が多かった等)も示していただきたい。



14) 今までの投与実績と報告された重篤な副作用例があれば示していただきたい。

### 3. 主な意見

- (1) 議論の時間が『時間切れ』になることは好ましくなく、時間を十分確保して行うべき。
- (2) 毒性学の専門家の意見を聞きたい。テルモ等、機器の滅菌を行っている人達は、病原性因子の不活化について(γ線照射など)むしろ医学関係者よりも詳しい。いずれ不活化の毒性の検討が必要。
- (3) 導入にあたっては、日赤などで不活化をきちんと評価する体制が必要。
- (4) 危機管理体制として不活化技術を利用するというのが現在の最も有効な利用対象ではないか。

#### バイオワン追加資料

##### 1) 質問(2)---参考の表 (弊社回答中、表の指定明記が無かった)

表 ラットにおける  $^{14}\text{C}$ -S-59 又は  $^{14}\text{C}$ -S-59 混合物投与後の組織分布

	放射能活性の最高あるいは最低であった組織		
	S-59 混合液		
	S-59	CAD 非処理	CAD 処理
最高	副腎	副腎, 卵巣	副腎, 卵巣
高度	肝臓, 腎臓, 肺, 消化管, 皮膚	肝臓, 腎臓, 肺, 脾臓, 小消化管	肝臓, 腎臓, 脾臓
最低	脳, 眼, 脂肪組織	脳, 脂肪組織	脳, 眼, 脂肪組織 (雄) 筋肉, 胸腺

##### 2) 質問(1 3) 回答の訂正 (減損率の言葉の意味の取り違えのための訂正)

製剤の回収率は約 7-8%低下するが、減損率 (血小板製造工程での血小板パックの廃棄率) は発表されていないためわからない。

##### 3) (各技術に対する質問) -----アモトサレンに関する質問番号 11) 未回答だったため回答追加

血漿を IBS で不活化して健常人、および患者で血中の S-59 のレベルを検討している。

## 1. 健常人での試験

IBSで不活化処理した血漿1リットルを投与したとき投与直後にピークレベルに達しその濃度は10 ng/mlであった。S-59は速やかに血中から消失し16-24時間後にはほぼ投与前のレベルに戻っている。

## 2. 患者での検討

患者では血漿交換の必要な血栓性血小板減少性紫斑病（TTP）の患者でも検討している。

S-59単独でのT1/2は41分であり血漿或いは血小板に含まれた状態では6.5時間であった。

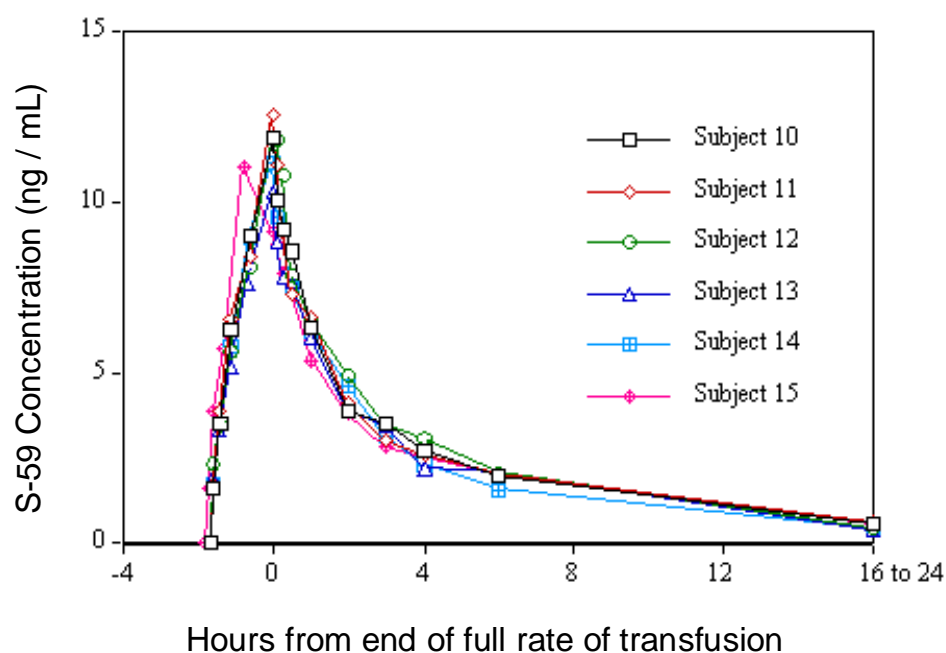
血漿蛋白がS-59の体内での分解作用から保護的に働いていると思われる。

しかし添付したようにいずれの試験においても繰り返し輸血しても蓄積作用はみられていない。

4時間後のS-59は1.7-8.5 ng/mlで24時間後には0.1-2.0 ng/mlであった。

## 参考資料

### Plasma Amotosalen Levels In Healthy Subjects After 1 L FFP



**Amotosalen Levels (ng/mL) In Patients**

<b>Patient Group</b>	<b>N</b>	<b>1- 4 Hr Post Transfusion</b>	<b>24 Hr Post Transfusion</b>
<b>Congenital</b>	<b>28</b>	<b>8.4 ± 2.7</b>	<b>0.9 ± 0.6</b>
<b>Acquired</b>	<b>57</b>	<b>5.4 ± 3.4</b>	<b>2.0 ± 2.0</b>
<b>Plasma Exchange</b>	<b>16</b>	<b>1.7 ± 0.6</b>	<b>0.1 ± 0.1</b>

平成20年4月8日開催 血液事業部会運営委員会・安全技術調  
査会合同委員会後 追加質問事項1(バイオワン社のみ)

1: 追加資料として送られてきた transfusionの論文では、血小板に添加したS-59の15%が血小板に、血漿に添加したS-59の15~22%は血漿成分に結合すると記載されています。その多くは脂肪に associateしているとあります。血小板の膜は脂質を含むことから、膜にS-59が結合し、S-59がハプテンになってS-59が結合した血小板にのみ反応する抗体が産生される危険性はないのか？同様に、S-59が結合した血漿成分に対しても抗体ができる可能性があるのでは？

S-59処理したヒト血小板, 又はヒト血漿をウサギに免疫した試験では明らかな 抗体の産生は認められていない、と報告されているが、試験法をよく見ると、ヒトに対する抗体を吸収するなどの前処理をおこなっており、本当に、否定して良いのか疑問が残る。適切な実験系なのか自信はないが、例えば、ウサギの血小板や血漿をS-59で処理し、ウサギに反復投与した場合にS-59処理した血小板等への抗体の有無が明らかになるのではないか？

2: S-59による新鮮凍結血漿の処理の場合、S-59を添加するだけで凝固因子のいくつかは活性が低下するが、UV 照射後にS-59を吸着させるために5時間以上(?)処理時間が必要となるが、凝固因子の活性は新鮮凍結血漿として使用できる程度に保つことは可能なのか？

## バイオワン株式会社回答

平成20年4月8日開催 血液事業部会運営委員会・安全技術調査会合同委員会後  
追加質問事項1(バイオワン社のみ)

1: 追加資料として送られてきた transfusionの論文では、血小板に添加したS-59の15%が血小板に、血漿に添加したS-59の15~22%は血漿成分に結合すると記載されています。その多くは脂肪に associateしているとあります。血小板の膜は脂質を含むことから、膜にS-59が結合し、S-59がハプテンになってS-59が結合した血小板にのみ反応する抗体が産生される危険性はないのか？同様に、S-59が結合した血漿成分に対しても抗体ができる可能性があるのでは？

S-59処理したヒト血小板、又はヒト血漿をウサギに免疫した試験では明らかな 抗体の産生は認められていない、と報告されているが、試験法をよく見ると、ヒトに対する抗体を吸収するなどの前処理をおこなっており、本当に、否定して良いのか疑問が残る。適切な実験系なのか自信はないが、例えば、ウサギの血小板や血漿をS-59で処理し、ウサギに反復投与した場合にS-59処理した血小板等への抗体の有無が明らかになるのではないか？

1) 動物による Neo antigenicity の検討について

S-59 の前臨床開発に当たり Baxter, Cerus は FDA と協議の上動物実験を実施しました。

ご指摘のようにウサギを用いた試験には人血小板、および血漿を用いています。S-59 で処理した血小板、或いは血漿を用いて免疫したウサギは抗体を作りました。この抗体はいずれも Polyclonal でした。ここで得られたウサギの抗ヒト血小板抗体を S-59 で処理していない血小板と反応させた後 S-59 処理した血小板と反応させましたが反応しませんでした。推察するとウサギに生じた抗体は血小板に対する抗体で S-59 或いはその分解産物に対する抗体ではありませんでした。

同様にウサギの抗ヒト血漿抗体は血漿を認識するもので S-59 或いはその分解産物を認識するものではありませんでした。

一方内部標準として加えていたトリのアルブミンについてはウサギの抗体を血小板、或いは血漿で処理したあとでも認識しました。

この実験では人の血小板、或いは血漿を S-59 で処理した後ウサギに免疫しましたがそこで生じた Poly Clonal 抗体はいずれも S-59 処理をしていない人の血小板、或いは血漿を認識しており特別に S-59 で処理した血小板、或いは血漿を認識するものではありませんでした。

この結果から S-59 で処理した血小板、或いは血漿には新たに抗原となる変化は起きていないと推察されました。また S-59 或いは S-59 の分解産物に対する抗体の生成も認められませんでした。

ウサギの血小板、血漿を用いなかった理由は免疫を繰り返すのに十分な量の血漿、或いは血小板を

同じ固体からは採取できないことです。

S-59 に対する抗体の生成の可能性を完全に否定することはできませんがこれまでの前臨床試験、臨床試験、市販後調査の結果からは S-59 に対する抗体生成の報告はありません。

参考までに EPO, G-CSF のような遺伝子工学で製造したヒト血液ホルモンの前臨床試験、臨床試験でも抗体生成の可能性について注意深く検討していますが臨床試験の終了までに600例程度の症例を検討し抗体の生成が認められなかったため市販後には抗体の検査は行っていません。

S-59 についても臨床試験で約700例の症例について抗体生成の有無を検討していますが抗体の生成はありませんでした。

これまでのところ12万回を越える輸血に使われていますが抗体の生成は報告されていません。

## 2) S-59 に対する抗体の生成の可能性について

ご指摘のようにS-59は血漿の脂質に多く結合します。この結合した状態でのS-59の半減期は約6.5時間です。(血小板中も血漿中も同じ)S-59 単独に比べると長いですが蓄積性がないことは確かめられています。血漿、或いは血小板に結合した状態でも分解は早いです。

抗体生成の可能性を完全に否定することは困難ですがこれまでのところ抗体生成を示す情報は前臨床試験、臨床試験、市販後調査を通じてありません。

8-MOP など治療に広く使われているソラレン化合物についても抗体産生の報告は現時点ではありません。

2: S-59による新鮮凍結血漿の処理の場合、S-59を添加するだけで凝固因子のいくつかは活性が低下するが、UV 照射後にS-59を吸着させるために5時間以上(?)処理時間が必要となるが、凝固因子の活性は新鮮凍結血漿として使用できる程度に保つことは可能なのか?

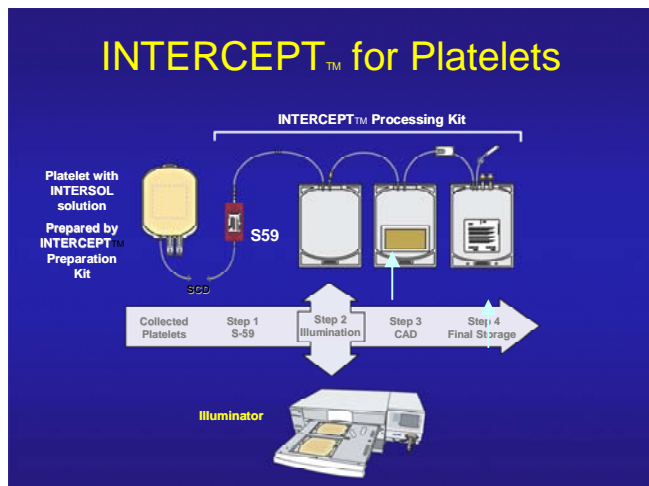
血小板用不活化処理キットと血漿用不活化処理キットではS59吸着装置(CAD)の形状が異なり、CAD処理時間が異なります。血漿を処理する場合、長時間振盪する必要はなく、血漿全量が円形のCAD内を自然落下する時間(15~30分)のみ必要となります。(下図1参照)

前臨床試験で不活化処理前後の血漿の凝固因子活性を比較しています。目標とする凝固因子保持率はフィブリノーゲン及びファクターⅧは65%以上、ファクターⅤ、Ⅶ、Ⅸ及びⅪは70%以上、他の因子については基準を設定していません。この実験では不活化処理によりいくつかの凝固因子にわずかに活性低下が認められますが、すべて目標とした基準に合致しており、不活化処理血漿は新鮮凍結血漿と同様に使用可能であります(下表2参照)。

また、すでにルーチンで使用している欧州のセンターで使用量に変化していないとの報告があります。

図1 血小板用及び血漿用不活化処理キット

血小板用不活化処理キット



血漿用不活化処理キット

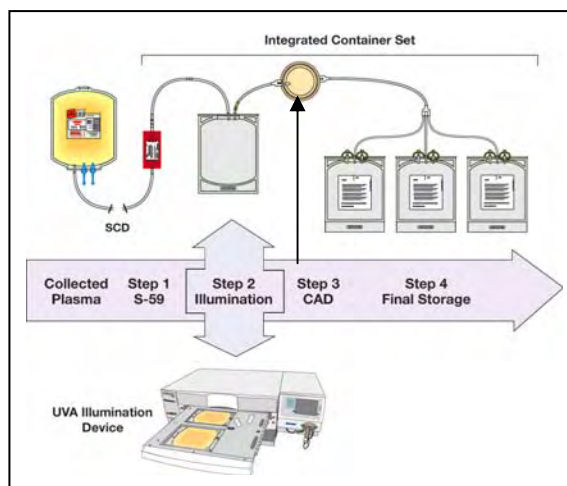


表2 in vitro インターセプトの処理前後の凝固因子の保持率

凝固因子	数	不活化処理前の活性 (IU/mL) <sup>a</sup>	不活化処理後の活性 <sup>b</sup> (IU/mL)	保持率
ファクター I (フィブリノーゲン)	91	290±48	209±36	72±5
ファクター II	59	96±11	85±11	88±4
ファクター V	91	130±21	119±19	92±7
ファクター VII	91	123±26	95±20	78±6
ファクター VIII	91	157±36	115±28	73±7
ファクター IX	91	108±19	88±16	82±4
ファクター X	59	100±13	86±11	86±3
ファクター XI	91	103±22	87±18	85±4

スクリーニング試験	数	不活化処理前 (秒)	不活化処理後 (秒)	延長時間 (秒)
PT <sup>c</sup>	14	11.2±0.3	11.6±0.3	0.5±0.1
aPTT <sup>d</sup>	13	26.9±1.4	31.6±2.1	4.7±0.8

a:フィブリノーゲンはmg/mL

b: 600mL血漿に150 μM S-59を添加し3.0J/cm<sup>2</sup> UVA照射後CAD処理

c: Prothrombin time

d: Activated partial thromboplastin time

## 平成20年4月8日開催 血液事業部会運営委員会・安全技術調

### 査会合同委員会後 追加質問事項2(各社共通)

1. EU主要国等、各社の不活化技術を導入しているそれぞれの国における供給の実態。輸血用血液製剤の全供給数(不活化技術を適用している製剤と適用していない製剤の合計)、そのうち不活化技術を適用している製剤の割合は何%か。また、供給はどのように行われているか(供給先、医師の希望により供給できるのか等)。
2. 各社の不活化技術を適用する前の製剤に白血球除去を行った場合と、不活化技術を適用した製剤に白血球除去を行わなかった場合を比較して、GVHD等の副作用の推移はどのようになっているか。
3. EU主要国における不活化技術導入後不要になった技術(白除、NAT等)
4. EU主要国における不活化技術を適用している製剤の市販後調査の実態(調査数)



## マコファルマ社回答

平成20年4月8日開催 血液事業部会運営委員会・安全技術調査会合同委員会後  
追加質問事項2(各社共通)

1. EU主要国等、各社の不活化技術を導入しているそれぞれの国における供給の実態。輸血用血液製剤の全供給数(不活化技術を適用している製剤と適用していない製剤の合計)、そのうち不活化技術を適用している製剤の割合は何%か。また、供給はどのように行われているか(供給先、医師の希望により供給できるのか等)。

### 回答

国	血漿製剤不活化の義務化	マコファルマ製品により処理された血漿製剤(本数)	マコファルマ製品により処理された血漿製剤(%)	不活化処理された血漿製剤(%)
アルゼンチン	×	2,000	—	—
ベルギー	○	70,000	100	100
ブラジル	×	2,000	—	—
フランス	○(将来的に)	150,000(2008年予測)	60(2008年予測)	100(2008年予測)
ギリシャ	×	8,000	5	—
イタリア	×	34,000	5	25
マレーシア	×	300	—	—
ロシア	×	17,000	1	1
シンガポール	×	1,000	—	—
スペイン	×	105,000	44	69
イギリス	×	9,000	2	2

ベルギー及びフランスにおいては国立輸血サービス(National Transfusion Service)が血漿のみの不活化製剤を提供している(ベルギーでは2004年から、フランスでは2009年までの移行が予定されている)。その他の全ての国においては、医師並びに病院が使用する血漿製剤(不活化製剤及び検疫製剤)を自由に選択することが可能である。しかしながら欧州においては、血漿製剤並びに血小板製剤の不活化傾向が顕著である。

2. 各社の不活化技術を適用する前の製剤に白血球除去を行った場合と、不活化技術を適用した製剤に白血球除去を行わなかった場合を比較して、GVHD等の副作用の推

移はどのようになっているか。

### 回答

欧州全ての国において赤血球製剤並びに血小板製剤の白血球除去は、長年に亘り義務化されている。白血球除去の導入後、輸血由来による熱発例数は著しく減少した(M. M. Mueller et al., “Clinical impact of leucocyte depletion – what is the evidence?”参照)。GVHD の予防に関して、輸血製剤は依然としてガンマ線照射されている。しかしながらマコファルマ社製 THERAFLEX UVC を含む血小板製剤不活化技術は、ガンマ線照射の代替になり得ると期待されている。

### 3. EU主要国における不活化技術導入後不要になった技術(白除、NAT等)

#### 回答

不活化技術が採用されたいくつかの国においては、検疫保管期間が省略された。その結果、より良好な流通、保管スペースの節約及び迅速な血漿製剤供給につながった。メチレンブルー処理の導入に伴い白血球除去並びに既存の検査を省略した国は無い。一方でメチレンブルー処理の導入により新たな検査の追加及び既存の検査感度を向上させる措置(シングル NAT 等)は行われていない。

#### 血漿製剤 :

欧州において、キットに採用されている 0.65 $\mu$ m のフィルターは血漿製剤用白血球除去フィルターより効率が良いため、THERAFLEX MB-Plasma 処理は血漿製剤の白血球除去の代替となる。

#### 血小板製剤 :

THERAFLEX UVC-Platelet 処理により、将来的にガンマ線照射並びに細菌スクリーニング検査の省略が期待される。現在の段階では、ウイルス NAT 検査の省略は推奨しない。

### 4. EU主要国における不活化技術を適用している製剤の市販後調査の実態(調査数)

#### 回答

市販後調査は、欧州各国に導入されているヘモビジランス及び輸血サービス機関(Blood Transfusion Services)により実施されており、イギリス並びにフランスが多くの経験を有している。全ての欧州諸国がメチレンブルー処理された血漿製剤を含む全ての血液製剤に対するヘモビジランスプログラムを実施している。更に、既報の通り追跡評価の実施(フランスにおけるメチレンブルー処理血漿製剤の四相臨床治験、等)あるいは Politis 等による臨床使用経験(Vox Sanguinis, [2007];Volume 92, Issue 4, Pages: 319-326)が発表されている。

Maco Pharma International GmbH · Robert-Bosch-Straße 11 · D-63225 Langen

Robert-Bosch-Straße 11  
D-63225 Langen  
Bestellannahme Infusion  
Telefon: +49-(0) 6103-9008-88  
Telefax: +49-(0) 6103-9008-20  
Zentrale Verwaltung  
Telefon: +49-(0) 6103-9008-0  
Telefax: +49-(0) 6103-9008-90  
www.macopharma.de

Mr. Takahiro GOTOU  
c/o Blood & Blood Products Division  
Pharmaceutical & Food Safety Bureau (PFS)  
Ministry of Health, Labour and Welfare (MHLW)

1-2-2, Kasumigaseki, Chiyoda-ku

Tokyo, JAPAN, 100-8916

Your Reference:

Your Message of:

Our Reference: Dr.W./AH

Date: April 30<sup>th</sup>, 2008

### Committee questions from April 24<sup>th</sup>, 2008

Dear Sirs,

following you will find answers to the questions raised by you on the Theraflex MB Plasma on April 24<sup>th</sup>, 2008.

**1. Actual conditions of blood products supply in each country, where the inactivation has been implemented**

*(Please specify the total number of blood products supply with breakdown of inactivation processed and non-processed blood products in %. Also, describe, whether all supplied blood products must be processed mandatory or user (physician or hospital) can chose one).*

**ANSWER:**

**Supply of pathogen reduced blood products by countries:**

In our letter of 31.3.2008 to you, we indicated in Table 1) the list of countries, where the Theraflex MB Plasma has been registered and used in clinical routine. Below you will find a table of the countries with the actual quantities of plasmas treated in 2007 and the percentage of the total therapeutical plasma units treated by Theraflex and/or by other methods.

Country	Inactivation for plasma mandatory	Quantity of plasmas treated with Theraflex MB plasma	% of Theraflex to therapeutical plasma	% of inactivated plasma to therapeutical plasma
Argentina	No	2000	-	-
Belgium	Yes	70000	100	100
Brazil	No	2000	-	-
France	Yes (in future)	150000 (in 2008)	60 (in 2008)	100 (in 2008)
Greece	No	8000	5	-
Italy	No	34000	5	25
Malaysia	No	300	-	-
Russia	No	17000	1	1
Singapore	No	1000	-	-
Spain	No	105000	44	69
UK	No	9000	2	2

In Belgium and France the National Transfusion Services offer only pathogen reduced plasma products (in Belgium since 2004, in France conversion is planned by 2009).

In all other countries the physicians and hospitals are still free to use their plasma (pathogen treated or quarantine plasma) by themselves. However, the trend in Europe goes clearly to pathogen reduced plasma products and pathogen reduced platelet products.

## 2. **Leukocyte reduction:**

*The trend of blood transfusion related side effect occurrence rate, such as GVHD, with inactivation processed with leukocyte reduction and without leukocyte reduction.*

### **ANSWER:**

Please note, that leucodepletion of all red cells and platelets is mandatory in Europe for all countries since many years.

The number of febrile transfusion reactions has decreased since significantly after Introduction of universal leucodepletion (see f.ex. *M. M. Mueller et al.*, "Clinical impact of leukocyte depletion – what is the evidence?"; Science series (2008), 3: 85-90).

To avoid GvHD, blood products are still gamma-irradiated. However, it is expected, that platelet pathogen reduction technologies, including the THERAFLEX UVC-treatment by MacoPharma, will substitute gamma-irradiation of platelet concentrates.

## 3. **Test:**

*The existing tests and/or processes, such as leukocyte filtration and NAT, which can be omitted after inactivation implementation.*

### **ANSWER:**

In the different countries where the process is implemented the quarantine storage is omitted. This leads to better logistics, reduced storage space, and immediate provision of the plasma.

Neither leukocyte filtration nor any at the time of implementation of the MB procedure used test for infection markers was stopped in any country. Nevertheless, the implementation of new tests or tests with enhanced sensitivity, like single NAT was also not done after introduction of the MB procedure.

**Plasma:**

In Europe the THERAFLEX MB-Plasma Procedure substitutes leucodepletion of plasma, since the membrane 0.65 µm filter is more efficient than a plasma leucodepletion filter.

**Platelets:**

We expect, that the THERAFLEX UVC-Platelet Procedure will substitute in the future both gamma-irradiation as well as bacterial screening.

We do not recommend any substitution of viral NAT-Testing for the moment

**4. Post marketing surveillance:**

*(Specify the actual condition of the PMS including total number in each country):*

**ANSWER:**

Post market surveillance is done by Blood Transfusion Services and by Hemovigilance procedures installed in all European Countries with most experience available in the U.K. and in France.

All European countries have ongoing Hemovigilance programmes for all components, which includes MB-treated plasma.

Additional, we have follow-up studies (like Phase IV Clinical Study on MB-Plasma In France) or Publications on clinical use of *Politis et al.* [Vox Sanguinis, (2007); Volume 92, Issue 4, Pages: 319-326], as already mentioned in our last letter to you dated 31.3.08, under point 4.b).

We do hope to have answered clearly to all your questions arising on April 24<sup>th</sup>, 2008.

If something is still unclear, please do not hesitate to approach us.

Sincerely yours,

MacoPharma International GmbH

  
Dr. Wolfram H. Walker

- Scientific Director -

  
Dr. Stefan Reichenberg

- Project Manager Pathogen Inactivation -

Copy:

- Mr. Gus Ribeiro, General Manager, MacoPharma Asian / Pacific Region;
- Mr. Hirotaka Nagase, AMCO Inc., Tokyo / Japan;
- Mr. Kenzo Watanabe, AMCO Inc., Tokyo / Japan

4月8日運営委員会・安全技術調査会合同委員会後

追加質問事項2(各社共通)

1. EU主要国等、各社の不活化技術を導入しているそれぞれの国における供給の実態。輸血用血液製剤の全供給数(不活化技術を適用している製剤と適用していない製剤の合計)、そのうち不活化技術を適用している製剤の割合は何%か。また、供給はどのように行われているか(供給先、医師の希望により供給できるのか等)。

さまざまな病原体不活化技術 Pathogen Reduction Technologies(PRT)が開発されており、ヨーロッパでは現時点で通常使用されたり、さまざまな評価段階であったりしています。

ー3種類の血漿処理のできる PRT 処理方法が現在市場で販売されています。

Solvent Detergent 処理(1990年代初期からいろいろな国で既に使用中)

Methylene Blue(2001年以降市場に出て、フランス、スペイン、イタリア、英国で通常使用)

Intercept Blood System(2006年以降 CE マーク取得:通常使用については未確認)

Milasol PRT System は、2008年に血漿処理で CE マークを取得予定です。

ー2種類の血小板処理のできる PRT 法が現在販売されています。

Intercept Blood System(2002年の CE マーク取得以降、主にフランス、スペイン、ベルギー、ノルウェーとスウェーデンの血液センターで限定的に使用中)

Mirasol PRT System(2007年後半に CE マーク取得済み。現在アイルランド、スペイン、イタリアと中東諸国のいくつかの血液センターで通常使用に向けた評価試験を実施中)

全体として、ヨーロッパでは輸血に使用されるすべての血小板製剤の5%に PRT 処理が施されており、これらの製剤への PRT の使用は明らかに増加傾向があると我々は考えます。とりわけ血小板製剤について高い関心および使用を予定している国々には、フランス、ベルギー、アイルランド、スペイン及び中東諸国があります。

PRT 処理済みの製剤の供給および配送に関しては、PRT 処理方法の違いにより物流方法も異なります。Mirasol PRT での血小板と血漿の処理は短時間(処理時間は15分以内)で、しかも簡単に処理ができることから、血液センターの通常の血液成分製剤の製造

工程の一部として組み込むことができます。血小板の出荷直前でも PRT 処理が可能であり、血液センターは PRT 処理済みの製剤を医療機関からの需要に合わせて供給することが可能になります。

病原体不活化技術(PRT)の幅広い利益を考えますと、すべての患者様は PRT 処理済みの血液製剤から利益を享受するものと考えます。したがって、最終的にはすべての血液製剤が不活化処理されることでしょう。しかし、専門家の先生方によれば、各病院には患者様のために PRT 処理された製剤を求める緊急度、もしくは求める能力に違いがある場合があるようです。そのため各血液センターは、当面各病院のニーズに合わせて血小板の在庫の一定の部分にのみ PRT 処理を行う必要があるでしょう。

## 2. 各社の不活化技術を適用する前の製剤に白血球除去を行った場合と、不活化技術を適用した製剤に白血球除去を行わなかった場合を比較して、GVHD等の副作用の推移はどのようになっているか。

私達の知る限りでは、輸血後GVHD予防に関連して白血球除去対非白血球除去製剤の不活化技術の有効性について、直接比較したヒューマンデータはありません。Mirasolで不活化処理したヒトの白血球(単核球)を、遺伝的に処理した免疫不全マウス(輸血後GVHDのモデルとして)に注入した動物実験の結果は、白血球除去が施されていない血液製剤に適用された場合、輸血後GVHDの予防においてMirasol不活化処理が有効であることを間接的に示しています。

さらに、PRTの功績に関する最近の出版物の中で、Dr. H. Alter(米国 国立衛生研究所)は、PRTを実施する場合、白血球除去を行わないという選択はコスト削減の戦略の一つとなり得る、と示唆しています。白血球除去が施されていない製剤に適用されるMirasol不活化技術のさらなる確立に向けて、様々な研究が現在計画されています。

既に白血球除去が施された製剤にPRT病原体不活化技術が適用される場合の輸血後GVHDの予防という観点では、実際の臨床経験は既にInterceptの研究で示されており、Mirasol PRTにおいても同様に入手可能となりつつあります。MIRACLE(Mirasol臨床評価)、これはランダム比較臨床試験ですが、その一環で、Mirasol処理された製剤の大多数(160/168<sup>4</sup>)は輸血前にガンマ線照射は施されておらず、輸血後GVHDの危険性があると見なされた患者グループでは、リファレンスの輸血製剤(Mirasol処理されていない製剤)の大多数(122/166)にガンマ線照射が施されています。どちらの患者グループからも輸血後GVHDは報告されておりません。MIRACLEトライアルの最終結果は、今年の後半に提示される予定です。

### 3. EU主要国における不活化技術導入後不要になった技術(白除、NAT等)

この20年間もしくはそれ以上の年月の間に、血液安全性を主導する技術は数多く導入されてきました。その技術とは、ガンマ線照射、白血球除去、新しいマーカーに対する血清学検査、現存のマーカーに対する改良された血清学検査、NAT、バクテリア・スクリーニングです。一度検査が導入されると、通常はその検査を撤廃することはできません。一つの例外はP24抗原分析の撤廃で、HIV検査用のNAT導入に伴いFDAにより許可されました。これは、大規模な多施設臨床試験での入念な分析により達成されました。

この20年余りの間に導入されたこれら技術の多く、あるいは幾つかの技術は、長い年月をかければ、PRTにより置き換えることは可能と考えられます。血液の安全性および安定供給に関するアドバイザリーコミッティー(米国 保健社会福祉省)は、ガンマ線照射とバクテリア検査はその候補になり得ることを示唆しています。さらに、過去10年以上の間に、NAT検査のプールサイズは著しく減少し、10以下となりました。全ての血液製剤においてPRTが一般的に導入されると、各国政府はコスト削減に関連して、NAT検査のプールサイズを以前のような大きさに戻すことを考慮し始めるかもしれません。

技術の撤廃や修正を行っていくにあたり、市販後調査や臨床試験の実施は必要となります。

### 4. EU主要国における不活化技術を適用している製剤の市販後調査の実態(調査数)

Navigant Biotechnologies LLC社とGambro BCT社は、Mirasol PRT処理を行った製品の輸血の安全性を継続的にモニターするという市販後調査の実施を約束しています(CEマークの承認の一部として)。2007年11月にヨーロッパ、中東各国とアフリカでMirasol PRT Systemが公式に導入されて以降、各施設でMirasol PRT処理を行った100以上の血小板製剤の輸血に関しての安全性データが収集されており、今後もこの活動は継続されます。さらに、輸血業務におけるMirasol PRT処理製剤の臨床使用に関する重要なデータを記録することを目的に、電子データ収集システムが開発されました。最後になりましたが、我々はMirasolの不活化処理に関心の深い国々の政府機関と協力し、各国の必要に応じた適切な安全性のモニタリングが確実に実施されるよう作業をすすめとおります。



Additional questions after the Joint Session of April 8  
(same questions to each companies)

1. Update the current use status of each major EU nations where pathogen reduction technology is known to be available: Total quantity of blood products for transfusion (ratio of the total number of PRT-Pathogen Reduction Products- supplied vs. non PRT). How PRT products are supplied and distributed? (i.e. can they supply PRT based on the demands from physicians or end users?)

Various Pathogen Reduction Technologies (PRT) have been developed and are in various stages of evaluation and/or routine use in Europe.

- Three PRT methods are currently marketed for treatment of plasma: Solvent Detergent (in use in various countries since early 1990's<sup>1</sup>), Methylene Blue (marketed since 2001 and routinely used in France, Spain, Italy, UK), and the Intercept Blood System (CE marked since 2006; status of routine use unknown). The Mirasol PRT System is expected to receive CE mark for treatment of plasma in 2008.

- Two PRT methods are being marketed for treatment of platelet concentrates: the Intercept Blood System (CE Marked since 2002 and in routine use in a limited number of blood centers primarily in France, Spain, Belgium, Norway, and Sweden), and the Mirasol PRT System (CE Marked since late 2007 and currently under evaluation for routine implementation in several blood centers in Ireland, Spain, Italy, and the Middle East).

Overall, we believe that approximately 5% of all platelet products transfused in Europe are PRT-treated, with a clear trend towards an increasing use of PRT for these products. Countries with a high interest in and/or commitment to PRT for platelets include France, Belgium, Ireland, Spain, and various countries in the Middle-East.

In terms of supply and distribution of PRT-treated products, the logistics vary by PRT method. Because the Mirasol PRT procedure for platelets and plasma is quick (<15 min. total processing time) and easy to perform, the treatment may be conducted as part of the routine component manufacturing process in the blood center, or may be performed immediately prior to issue of platelets and so allow a blood center to supply PRT-treated components on demand. Given the broad benefits of PRT, all patient groups would benefit from receiving PRT-treated components, therefore, ultimately universal conversion to PRT is likely. However, expert opinion suggests that different hospitals may have a different sense of urgency and/or ability to request PRT treated products for their patients, hence blood centers may initially be required to perform PRT on a portion of their platelet inventory to meet various

---

<sup>1</sup> Pelletier et al., Best Practice and Research Clinical Haematology (Elsevier), Vol 19: 205-242, 2006

hospitals' specific needs.

2. Is there any difference in the frequency of the occurrence of the transfusion related side effects such as GVHD by the use of the pathogen reduced product manufacturing methods when leukocyte reduced products and non leukocyte reduced products are compared.

To our knowledge, no human data are available providing a direct comparison of the effectiveness of PRT treatment of leukoreduced vs. non-leukoreduced components in preventing transfusion-associated (TA-) GVHD. Results from an animal model in which human white blood cells (mononuclear cells) treated with the Mirasol PRT System were injected into genetically immune-deficient mice (as a model for TA-GVHD), indirectly support the effectiveness of the Mirasol PRT system in preventing GVHD when applied to non-leukoreduced blood components<sup>2</sup>. Additionally, in a recent publication<sup>3</sup> on the merits of PRT, Dr. H. Alter (National Institute of Health, US) indicated that discontinuation of leukoreduction was one of several potential cost-saving strategies when implementing PRT. Various studies are planned to further establish the Mirasol system performance when applied to non-leukoreduced components.

In terms of prevention of TA-GVHD when applying PRT to already leukoreduced components, actual clinical experience has been presented for the Intercept system, and is now becoming available for the Mirasol PRT system as well. As part of the MIRACLE (Mirasol Clinical Evaluation) trial, a randomized controlled clinical trial, the majority (160/168<sup>4</sup>) of Mirasol-treated products were not gamma-irradiated prior to transfusion, whereas the majority of reference (untreated) products (122/166) were treated with gamma-irradiation, confirming that the patient group studied was considered at risk for TA-GVHD. There were no reports of TA-GVHD in either patient group. Complete results from the MIRACLE trial will be presented later this year.

3. Is there any technology becomes obsolete after introduction of Pathogen Reduction Technology?

There are a number of blood safety initiatives that have been introduced over the last 20 or more years: Gamma irradiation, leukocyte reduction, serology testing for new markers, enhanced serology testing for existing markers, NAT testing, Bacterial testing. Typically, once a test is introduced it has not been allowed by regulators to be removed; one exception is the dropping of P24 antigen assay that was allowed by the FDA upon the introduction of NAT testing for HIV. This was achieved through careful analysis of a large multi-center clinical trial.

---

<sup>2</sup> Fast, et al., *Transfusion* 2006; 46: 1553-1560.

<sup>3</sup> Alter, *Transfusion Medicine Reviews*, Vol 22(2): 97-102 (relevant statement on bottom of page 100)

<sup>4</sup> Data submitted to Notified Body (KEMA). Based on this data the Mirasol System was granted CE Mark for application to platelets on October 5, 2007.

Potentially many or some of these technologies introduced over the last 20 years could over time be replaced by PRT. The indications of the Advisory Committee on Blood Safety and Availability (Department of Health and Human Services, US)<sup>5</sup> suggested that Gamma irradiation and Bacterial testing were likely candidates. Additionally, over the last 10 years the pool size for NAT testing has decreased significantly down to < 10. With the general introduction of PRT for all components, countries may consider a return to larger pool sizes for NAT testing with the associated reduction in costs.

For any of the technologies to be dropped or their use to be modified it is likely that Post Market surveillance and clinical trials will need to be conducted.

4. The investigation status on the post market approval status on the Pathogen Reduced Blood Products in the major EU nations. Reality of the post market approval investigation (number of investigated cases).

Navigant Biotechnologies, LLC and Gambro BCT Inc. have a commitment (as part of the CE Mark certification) to conduct Post-Market Surveillance studies to continue to monitor the safety of Mirasol-treated products transfused on a routine basis. Since the Mirasol PRT system was officially launched in Europe, the Middle East and Africa in November 2007, safety data have been collected on over 100 routine transfusions of Mirasol-treated platelet products at multiple sites, and this activity continues. Additionally, an electronic data capture system has been developed to allow transfusion services to record important data regarding the clinical use of Mirasol-treated products. Finally, we will be working with the authorities of countries interested in adopting the Mirasol process to ensure adequate safety monitoring is in place according to local country needs.

---

#### Updated response to Question (4) from initial Q&A document:

- (4) Reaction of the medical agent with other medical agent and its issues.

There have been no conclusive reports from in-vivo studies on drug interactions that would raise any concerns related to the use of Mirasol. The information initially provided to MHLW regarding a possible interaction of Riboflavin with Tetracycline and Trimethoprim-sulfamethoxazole was based only on a review of the literature in which primarily in-vitro studies suggested some potential effect with Riboflavin solutions. A detailed report on this matter, specific to the Mirasol application, is being prepared by independent toxicology experts and will be made available upon request.

---

<sup>5</sup> Thirty-third meeting of the ACSBA meeting, Washington, DC, January 9-10.

## Mirasol PRT treatment of donor white blood cells prevents the development of xenogeneic graft-versus-host disease in Rag2<sup>-/-</sup>γc<sup>-/-</sup> double knockout mice

Loren D. Fast, Gilbert DiLeone, Gene Cardarelli, Junzhi Li, and Raymond Goodrich

**BACKGROUND:** Mirasol PRT (Navigant Biotechnologies) treatment utilizes exposure to light in the presence of riboflavin to introduce irreparable lesions to nucleic acids thereby inhibiting pathogen and WBC replication. The ability of Mirasol PRT-treated mononuclear cells (MNCs) to generate xenogeneic graft-versus-host disease (GVHD) responses was used to model transfusion-associated GVHD (TAGVHD).

**STUDY DESIGN AND METHODS:** Pairs of human MNCs from five different individual donors that had or had not received Mirasol PRT treatment and contained  $30 \times 10^6$  CD3+ cells were injected intraperitoneally into sublethally irradiated (350 cGy) Rag2<sup>-/-</sup>γc<sup>-/-</sup> double-knockout mice. Recipient mice were weighed and observed regularly and euthanized when they exhibited symptoms of GVHD or at termination of the experiment. Recipient lymphoid compartments were collected and phenotyped for the presence of human lymphoid cells. The presence of human cytokines and/or immunoglobulins in the recipient plasma was also used to detect the presence of human cells.

**RESULTS:** Twelve of 14 mice injected with untreated cells developed xenogeneic GVHD, whereas 0 of 14 mice injected with Mirasol PRT-treated cells developed xenogeneic GVHD. End-stage xenogeneic GVHD in the recipients of untreated cells was characterized by the presence of splenic human cytolytic CD4+ and CD8+ cells, with high levels of interferon-γ, interleukin-10, and xenoreactive antibodies in the plasma.

**CONCLUSION:** Mirasol PRT treatment of the donor MNCs abolished xenogeneic GVHD responses, indicating that the use of Mirasol PRT treatment of blood products should prevent the development of TAGVHD.

The presence of white blood cells (WBCs) in transfused blood products is a significant contributor to the immunologic consequences of transfusion.<sup>1,2</sup> The immune responses resulting from transfusion include donor antirecipient responses such as transfusion-associated graft-versus-host disease (TAGVHD), graft-versus-tumor responses, and production of cytokines. Recipient antidonor responses can be induced by direct presentation of antigen by donor WBCs or indirectly after processing of the donor cells by recipient antigen-presenting cells.<sup>3</sup> These responses include elimination of donor cells, production of alloantibodies, and the induction of immunoregulatory immune responses that result in increased infection, increased risk of tumor relapse, and increased survival of transplanted organs. Because TAGVHD is almost always fatal, the emphasis has been placed in the development of protocols that prevent TAGVHD. The severity of TAGVHD has made it impossible to design clinical trials to test the ability of different protocols to inhibit the development of TAGVHD. As a result, models of human in vivo immune responses are being developed to test the effectiveness of various protocols in preventing TAGVHD.

**ABBREVIATIONS:** PBST = phosphate-buffered saline containing 0.5 percent Tween 20; TAGVHD = transfusion-associated graft-versus-host disease.

From the Department of Medicine, Rhode Island Hospital/Brown University, Providence, Rhode Island; the Department of Radiation Oncology, Rhode Island Hospital, Providence, Rhode Island; and Navigant Biotechnologies, Lakewood, Colorado.

*Address reprint requests to:* Loren D. Fast, Division of Hematology/Oncology, Rhode Island Hospital, 593 Eddy Street, Providence, RI 02903; e-mail: Loren\_Fast@brown.edu.

This work was supported by a grant from Navigant Biotechnologies to LDF.

Received for publication November 15, 2005; revision received January 19, 2006, and accepted January 26, 2006.

doi: 10.1111/j.1537-2995.2006.00939.x

TRANSFUSION 2006;46:1553-1560.

Although a number of *in vitro* assays have been developed to measure the functionality of human WBCs, it would be useful to develop a model that more closely mimics the *in vivo* responses resulting in TAGVHD. Recent studies have utilized the xenogeneic GVHD responses of human cells when injected into immunodeficient murine recipients as a model of TAGVHD.<sup>4,5</sup> Initial studies found that human WBCs injected into SCID mice lacking both T and B lymphocytes were rejected by the murine NK cells and macrophages still present in these SCID mice especially following intravenous injection of the human mononuclear cells (MNCs).<sup>6-9</sup> Depletion of murine NK cells or macrophages from the SCID mice before injection of the human cells resulted in improved engraftment of intraperitoneally injected cells. If a sufficient number of cells were injected, the human lymphocytes were able to overcome the recipient mediated rejection and attack the recipient resulting in xenogeneic GVHD.<sup>5</sup> Recent studies have shown that the use of Rag2<sup>-/-</sup>γc<sup>-/-</sup> double-knockout mice that lack B, T, and NK cells as recipients accelerated the xenogeneic GVHD response as a result of increased human T-cell engraftment.<sup>4</sup>

Several different approaches are being developed for inactivation of pathogens that could be present in blood products. Mirasol PRT technology (Navigant Biotechnologies, Lakewood, CO) accomplishes pathogen inactivation by introducing irreparable nucleic acid lesions by exposure to light in the presence of riboflavin.<sup>10</sup> An initial study found that riboflavin plus light exposure functionally inactivated WBCs when the WBCs were tested with a panel of *in vitro* assays.<sup>11</sup> The ability to generate xenogeneic GVHD responses was utilized to test the functional ability of Mirasol PRT-treated WBCs *in vivo* and as a surrogate indicator for the efficacy of this treatment on TAGVHD prevention. Pairs of Mirasol PRT-treated or control untreated WBCs were injected into sublethally irradiated Rag2<sup>-/-</sup>γc<sup>-/-</sup> double-knockout mice, and the development of xenogeneic GVHD was monitored by regular observation of the mice and further immunologic analysis was conducted when the mice exhibited symptoms of GVHD or at the termination of the experiment.

## MATERIALS AND METHODS

### Preparation and characterization of human WBCs

WBCs were obtained from the leukoreduction chamber of an automated blood collection machine (Trima, Gambro BCT, Lakewood, CO) after standard apheresis collection of platelets (PLTs) from five different volunteer donors. The cells were separated into the MNC fraction with Ficoll-Hypaque (Pharmacia, Piscataway, NJ) discontinuous centrifugation and then placed equally into two PLT bags containing autologous plasma. The test cells received the Mirasol PRT treatment in 10 to 15 minutes after cell prep-

aration as described.<sup>11</sup> Control cells received no treatment. The treated and untreated cells were then washed three times with phosphate-buffered saline (PBS) containing 0.1 percent fetal calf serum (FCS) and resuspended in RPMI 1640 containing 10 percent FCS. The cell populations were sent via overnight courier to Rhode Island Hospital. Upon receipt, the cell populations were assessed for number and viability with trypan blue staining (all cells were viable). The cells were also stained with a panel of antibodies to CD45, CD3, CD14, CD19, and CD56 (BD Biosciences, San Jose, CA) as previously described<sup>11</sup> to characterize the distribution of WBC subpopulations present in each of the treated and untreated donor populations.

In addition, the ability of the donor cells to proliferate in response to mitomycin C-treated allogeneic peripheral blood mononuclear cells (PBMNCs) as previously described<sup>12</sup> or to mitomycin C-treated xenogeneic C57BL/6 spleen cells was tested in triplicate. The xenogeneic MLC was set up by mixing 100 μL of donor MNCs at 4 × 10<sup>6</sup> MNCs per mL with 100 μL of mitomycin C-treated C57BL/6 spleen cells at 4 × 10<sup>6</sup> cells per mL in MLC medium.<sup>13</sup> The cells were cultured for 5 days, and then the cells were pulsed with 1 μCi of [<sup>3</sup>H]thymidine for 4 hours before harvesting the wells to measure incorporation of the [<sup>3</sup>H]thymidine as a measure of proliferation.

### Mice

Six- to eight-week-old Rag2<sup>-/-</sup>γc<sup>-/-</sup> double-knockout mice were obtained from Taconic (Germantown, NY). These mice were housed in the special suite for immunodeficient mice in the Central Research Facility at Rhode Island Hospital. C57BL/6J mice were obtained from the Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME).

### Analysis of GVHD response

The recipient mice received 350 cGy gamma irradiation the night before the injection of cells. Each recipient mouse was injected intraperitoneally with a treated or untreated cell population containing 30 × 10<sup>6</sup> CD3+ cells from a single donor (three mice per group). Recipient mice were weighed twice per week and observed regularly. One recipient mouse in the untreated group developed an inner ear problem and was euthanized because it was unable to get its head off the bedding. One recipient mouse in the treated group died unexpectedly without any symptoms of GVHD as evidence by weight loss or splenomegaly when autopsied. There was no evidence suggesting the death was related to injection of treated cells. Recipient mice that demonstrated a dramatic weight loss (usually >20%) and exhibited lethargy, hunched posture, and ruffled fur were euthanized. Blood was collected by cardiac puncture with a heparinized syringe. The blood

was centrifuged, the hematocrit (Hct) level was recorded, and the plasma collected and stored at  $-20^{\circ}\text{C}$ . The buffy-coat cells were collected, and the remaining RBCs were lysed with RBC lysis solution (Gentra, Minneapolis, MN). In addition, spleen cells were obtained by dissociating the spleen in PBS after weighing the spleen, marrow cells were obtained by flushing marrow from the femurs with PBS containing 1 percent BSA, and cells were obtained from intestinal lymphoid tissue by dissociation in PBS. The liver MNC population was obtained from the dissociated liver cells by centrifuging the cells over a Ficoll-Hypaque discontinuous gradient and collecting the MNCs at the interface and washing them twice with PBS. All mice that did not exhibit GVHD symptoms were euthanized by Day 63 and a similar analysis to that described above was conducted on these recipient mice.

### Analysis of human cell chimerism

Cells from the various tissues were initially stained with PE-Cy5 or PE anti-human CD45 or isotype controls (BD Biosciences) and then analyzed immediately for the presence of human CD45+ cells on a flow cytometer (FACScan, BD Biosciences). If the number of CD45+ cells present were equal to or less than the number of positive cells in the isotype control, the result was recorded as 0.0. If human CD45+ cells were detected and sufficient cells were present in a cell population, a second battery of staining was done in which the expression of WBC subpopulation markers including CD3, CD4, CD8, CD14, CD19, and CD56 (BD Biosciences) was measured. The populations containing T cells were also stained for the presence on CD107a on the cell surface, an indicator that the cells were experienced cytolytic cells because this marker is expressed on the cell surface after granule exocytosis.<sup>14,15</sup>

### Measurement of cytokines

The level of cytokines in the plasma samples were measured with the CBA human TH1/TH2 kit I and the CBA human inflammation kit according to manufacturer's instructions (BD Biosciences).

### Measurement of immunoglobulin levels

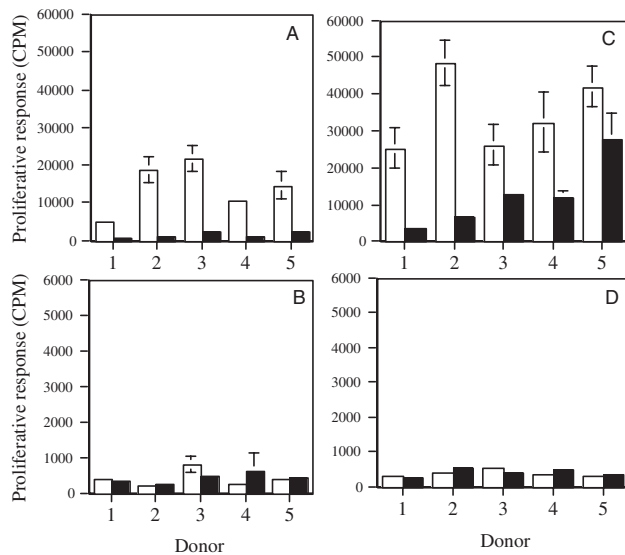
Ninety-six well flat-bottom microtest plates (BD Labware, Franklin Lakes, NJ) were coated with goat anti-human IgG-IgM-IgA-light chains (Biosource, Camarillo, CA) at  $5\ \mu\text{g}$  per mL in 0.1 mol per L bicarbonate buffer, pH 9.6. The plates were incubated for 4 hours at room temperature and then stored at  $4^{\circ}\text{C}$  until used in the assay. On the day of assay, the plate was washed three times with Dulbecco's PBS containing 0.5 percent Tween 20 (PBST). Human IgG and IgM standards were prepared from puri-

fied IgG and IgM (Calbiochem, La Jolla, CA). Serial twofold dilutions of the standards were prepared in PBST starting at 500 ng per mL and ending with 4 ng per mL. The standards or plasma diluted 1:4 or 1:8 were added to designated wells (100  $\mu\text{L}$ ) and incubated at room temperature for 2 hours. After the plate was washed three times with PBST, 100  $\mu\text{L}$  of horseradish peroxidase-goat anti-human IgG or IgM (Biosource) diluted 1:16000 in PBST were added. The plates were incubated for 2 hours at room temperature. After washing  $3\times$  in PBST, 100  $\mu\text{L}$  of  $1\times$  2,2'-azino-bis-(3-ethylbenzothiazoline sulfonate) (Zymed, San Francisco, CA) diluted in 0.1 mol per L citrate buffer containing 0.3 percent hydrogen peroxide was added to all wells. The plates were read at 405 nm on an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) plate reader after a 20-minute incubation at room temperature. The levels of IgG and IgM in the plasma samples were determined by comparison to the values obtained for the standard curves for IgG and IgM.

## RESULTS

The paired Mirasol PRT-treated and control untreated donor MNCs were stained with trypan blue upon receipt to measure viability. All cell preparations were found to be 100 percent viable. The cells were then stained with a panel of antibodies to define the distribution of different subpopulations in these donor WBC populations. Although there was variation in the donor cell subset distribution from donor to donor, no differences in the number of CD3+ cells were observed when untreated ( $62.9 \pm 8.3\%$ ) were compared to treated groups ( $64.3 \pm 10.6\%$ ). The donor MNCs were also characterized by testing their ability to proliferate in response to allogeneic and xenogeneic murine stimulator cells. The results (Fig. 1) show that control donor cells that had not received Mirasol PRT treatment were able to proliferate in response to both allogeneic and xenogeneic stimulator cells and these proliferative responses as well as nonstimulated responses were completely abrogated by Mirasol PRT treatment.

Recipient Rag2<sup>-/-</sup> $\gamma\text{C}^{-/-}$  double-knockout mice that had received sublethal irradiation (350 cGy) the evening before were injected intraperitoneally with a treated or untreated donor cell populations from individual donors ( $n = 5$ ) that contained  $30 \times 10^6$  CD3+ cells. Recipient mice were euthanized when they demonstrated symptoms of xenogeneic GVHD such as more than 20 percent weight loss (Fig. 2), hunched posture, and ruffled fur or when the experiment was terminated. Assessment of clinical parameters in recipient mice including spleen weight, Hct, and the presence of human CD45+ cells in various lymphoid compartments indicated that 12 of 14 recipient mice injected with untreated cells displayed symptoms of xenogeneic GVHD and 12 of 13 expressed varying degrees

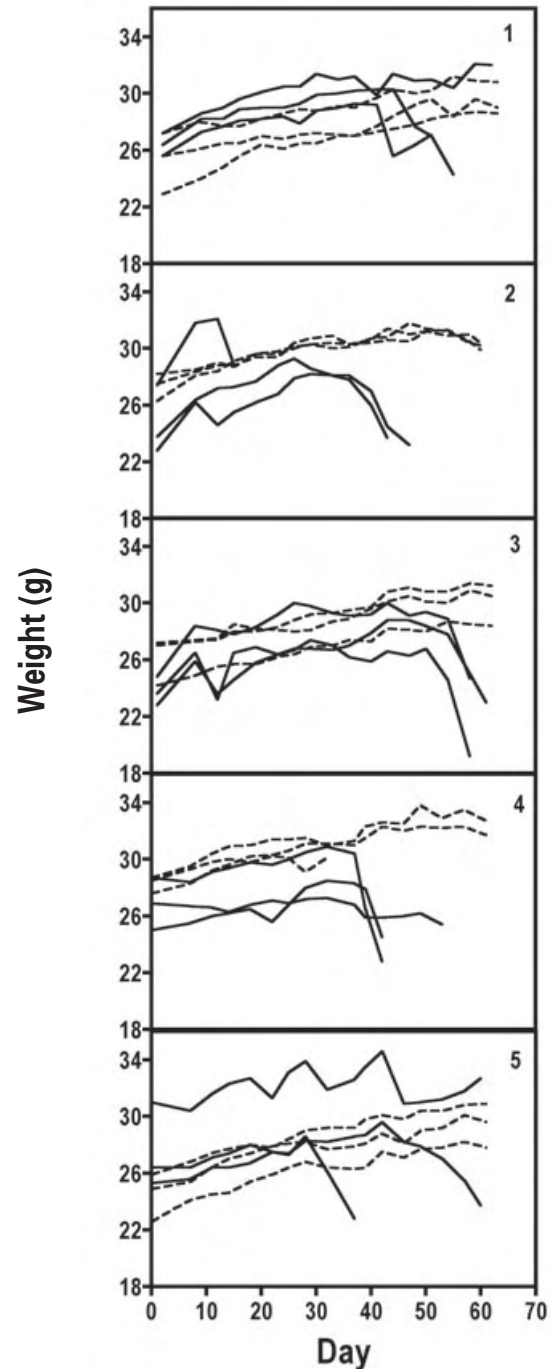


**Fig. 1. Proliferative responses of Mirasol PRT-treated and untreated donor cells to allogeneic or xenogeneic stimulator cells.** Five different paired sets of MNCs that had received Mirasol treatment (B and D) or no treatment (A and C) as responders were incubated with mitomycin C-treated allogeneic PBMNCs (A and B, □) or xenogeneic C57BL/6 spleen cells (C and D, □) or medium alone (■) for 5 days, and [<sup>3</sup>H]thymidine incorporation was measured on Day 5.

of human cell chimerism (Table 1). In addition to exhibiting human cell chimerism, the recipients injected with untreated donor cells also exhibited increased spleen weight (splenomegaly) and significantly decreased Hct levels (Table 1).

In the cell populations from the recipient mice that contained sufficient numbers of human CD45+ cells to analyze, samples of cells were stained with a panel of antibodies to define the distribution of various WBC subpopulations in the lymphoid compartments. The results (Table 2) demonstrated that human T cells were the cells that were primarily present in the spleen, blood, and marrow. B cells were primarily found in the liver and intestinal lymphoid tissue. With the exception of one recipient mouse in which CD56+ cells were observed, no reconstitution with CD14+ cells (macrophages) or CD56+ cells (NK cells) was observed in any lymphoid compartment.<sup>4</sup> The cells were also stained with antibodies to CD4 and CD8 and the ratio of the percentage of T cells that were CD4+ to the percentage of T cells that were CD8+ T cells was determined. The CD4:CD8 ratios in the recipients of untreated cells from the different donors varied from  $0.38 \pm 0.08$  to  $1.82 \pm 0.8$  in a donor-dependent fashion.

Acute GVHD and especially TAGVHD are characterized by cytolytic responses. To determine whether the human T cells found in these mice exhibited properties of cytolytic cells, the T-cell subsets from a subset of recipients were dual-stained with anti-CD107a, a marker of cells



**Fig. 2. The weight of recipient mice injected with untreated or Mirasol-treated donor cells.** The weights (g) of recipient mice (3 mice per group) injected on Day 0 with Mirasol-treated (- - -) and untreated (—) cells from each of five donors (Panels 1-5).

that have previously mediated exocytosis of cytotoxic granules.<sup>14,15</sup> This staining procedure identified  $41.1 \pm 16.7$  percent of human CD4+ cells (n = 8) and  $45.5 \pm 20.2$  percent of human CD8+ cells (n = 8) as expressing CD107a. This would suggest that both CD4+ and CD8+

**TABLE 1. Characterization of immune responses and reconstitution in mice injected with untreated or Mirasol PRT-treated MNCs**

Parameter	Untreated donor cells	Treated donor cells
Number of mice with GVHD symptoms	12/14*	0/14*
Day euthanized	51.8 ± 8.2 days	Not applicable†
Number of mice with human cells	12/13‡	0/14
Spleen weight (gram)	0.27 ± 0.27	0.07 ± 0.07
Hct (%)	27.9 ± 16.9	53.9 ± 2.9
Percentage of CD45+ cells in		
Spleen	26.8 ± 19.8	0.0
Blood	4.6 ± 4.7	0.0
Marrow	4.9 ± 5.6	0.0
Intestinal lymphoid tissue	58.4 ± 28.4	0.0
Liver	20.3 ± 20.7	0.0

\* One mouse was lost from a total of 15 recipient mice for unrelated reasons as detailed under Materials and Methods.

† None of the recipient mice in this group exhibited GVHD symptoms so mice were euthanized at the end of the experiment.

‡ One mouse that exhibited GVHD symptoms died before analysis could be conducted.

**TABLE 2. The human lymphocyte subpopulations present in recipient lymphoid compartments**

Donor	Mouse	Total number of human CD3+/CD19+ cells (×10 <sup>6</sup> )*				
		Spleen	Blood	Marrow	Liver	Intestinal
1	4	65.0/0.0	0.3/0.0	5.4/0.0	3.2/8.8	0.0/0.0
1	5	0.0/0.0	0.0/0.0	0.0/0.0	0.0/0.0	0.0/0.0
1	6	0.4/0.2	0.01/0.06	0.03/0.4	1.5/6.1	0.7/0.2
2	10	2.8/0.02	0.04/0.1	0.1/0.2	0.2/1.1	0.1/0.5
2	12	1.5/0.4	0.2/0.6	0.7/0.7	0.3/1.2	0.7/5.3
3	16	0.08/0.4	0.06/0.07	0.1/0.2	0.2/2.1	0.0/0.0
3	17	0.09/0.4	0.04/0.06	0.1/0.1	0.5/2.7	0.04/0.4
3	18	0.04/0.01	0.02/0.1	0.08/0.1	0.1/0.5	0.0/0.0
4	22	1.3/0.4	0.1/0.02	0.2/0.1	2.0/6.6	0.4/0.01
4	23	4.2/0.3	0.2/0.01	0.2/0.01	0.0/0.0	0.3/0.01
5	28	5.7/0.7	0.5/0.5	0.9/0.09	5.5/5.3	0.5/0.6
5	29	3.5/0.2	0.2/0.05	1.8/1.0	0.0/0.0	0.1/1.0
5	30	4.3/0.09	0.3/0.0	0.4/0.0	0.4/1.1	0.0/0.0

\* Each number is the product of the cell recovery in millions for each lymphoid compartment and the percentage of human CD3+ or CD19+ detected by flow cytometric analysis in each population.

cells have mediated cytolytic activity via granule exocytosis. CD4+CD25+ have been recently shown to contain granzymes and mediate cytolytic activity against autologous cells.<sup>16,17</sup> Staining of a limited number of samples with anti-CD25 found that less than 5 percent of the CD4+ cells expressed CD25, suggesting that the human CD4+ cells present in the spleen were not T regulatory cells.

Measurement of the levels of human cytokines in the plasma of the recipient mice was used as another approach to assess the possibility that human cells were present but not located in the lymphoid compartments. The plasma samples from recipient mice that had been injected with Mirasol PRT-treated cells did not contain any human cytokines. In contrast, the plasma samples of mice injected with untreated donor cells (n = 13) contained very high levels of interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ); high levels of interleukin (IL)-10; low levels of IL-5, IL-1 $\beta$ , tumor

necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), IL-8, and IL-12p70; and no IL-2 or IL-4 (Fig. 3).

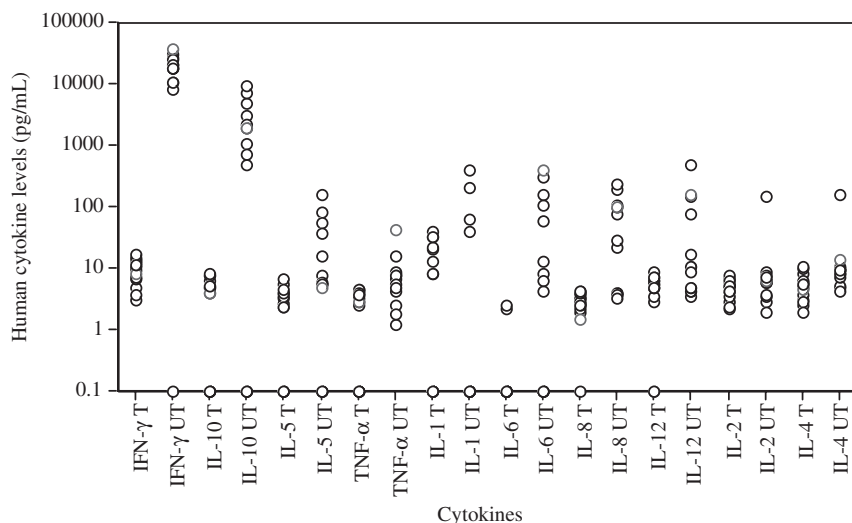
The measurement of human immunoglobulin levels in the plasma was a third approach to measure the presence of human lymphoid cell chimerism. An ELISA to measure the levels of human IgG and IgM in the plasma of the recipient found that human immunoglobulins were only detected in the plasma of recipients injected with untreated cells (Table 3). To test for the specificities exhibited by the human immunoglobulin, C57BL/6 spleen cells were stained with a 1:10 dilution of the recipients' plasma followed by fluorescein isothiocyanate-labeled anti-human IgM or IgG. Flow cytometric analysis of WBCs, RBCs, and PLTs was conducted by gating on the different sized populations. The results of this experiment (Table 3) indicated that there were high levels of IgM antibodies and lower levels of IgG antibodies binding to murine RBCs and PLTs with very low levels of antibodies binding to WBC.

## DISCUSSION

Mirasol PRT is a novel technology for pathogen reduction that has been shown to effectively preserve PLT viability in a PLT recovery and survival clinical trial.<sup>18</sup> The validation clinical trial for its efficacy and safety in thrombocytopenic patients has just been initiated in Europe. During Mirasol PRT treatment, blood products such as PLT concentrates are exposed to light in the presence of riboflavin resulting in inactivation of a wide range of pathogens.<sup>19-23</sup>

Because this process introduces irreparable lesions on nucleic acids,<sup>20</sup> the treatment was also expected to affect the function of WBCs. In a previous study, it was shown that Mirasol PRT treatment of WBCs prevented their ability to be activated, to proliferate in response to various stimuli, and to induce proliferation of normal PBMNCs.<sup>11</sup> The conclusion of these studies was that Mirasol PRT treatment caused a complete functional inactivation of WBCs. Several studies had previously shown that inhibition of in vitro proliferative responses correlated with an inability to generate GVHD.<sup>13,24</sup> To confirm the inactivation of WBC by Mirasol PRT treatment observed with in vitro assays also prevented in vivo GVHD responses, the ability of Mirasol PRT-treated cells to induce xenogeneic GVHD responses when injected into Rag2<sup>-/-</sup> $\gamma$ c<sup>-/-</sup> double-knockout recipient





**Fig. 3. Human cytokine levels in recipient mice plasma. Plasma samples obtained from recipient mice injected with Mirasol-treated cells (T) or untreated cells (UT) were tested for the concentrations of the indicated cytokines. The data show the results when undiluted plasma was tested except for the levels of IFN- $\gamma$  and IL-10, which were obtained with plasma diluted 1:10. Samples in which no cytokine was detected were recorded as 0.1 pg per mL.**

**TABLE 3. Amount and specificity of human immunoglobulin present in the plasma of recipient mice injected with untreated MNCs**

Antibody isotype	Antibody specificity	Untreated cells	Treated cells
IgG	Not tested	5981 $\pm$ 2781*	0.1 $\pm$ 0.2*
IgM	Not tested	1390 $\pm$ 845*	0.3 $\pm$ 0.8*
IgG	Mouse RBCs	16.1 $\pm$ 17.9†	0.3 $\pm$ 0.4†
IgM	Mouse RBCs	30.8 $\pm$ 21.7†	0.2 $\pm$ 0.5†
IgG	Mouse WBCs	5.1 $\pm$ 6.1†	0.5 $\pm$ 0.3†
IgM	Mouse WBCs	8.9 $\pm$ 7.3†	0.2 $\pm$ 0.4†
IgG	Mouse PLTs	28.2 $\pm$ 17.8†	0.3 $\pm$ 0.6†
IgM	Mouse PLTs	25.6 $\pm$ 23.5†	0.0 $\pm$ 0.1†

\* ng/mL.  
† Percent positive cells.

mice was tested.<sup>4</sup> These results indicated that Mirasol PRT-treated cells were unable to generate xenogeneic GVHD responses. Thus, it would be predicted that Mirasol PRT treatment would prevent the development of TAGVHD after the transfusion of treated blood products.

The standard current protocol for prevention of TAGVHD is to expose blood products to 25 Gy of gamma irradiation. Although this dose of gamma irradiation has been shown to be effective in preventing the proliferation of irradiated WBC, subsequent studies have indicated that 25 Gy of gamma irradiation is not sufficient to prevent the presentation of antigens by these cells.<sup>13,25</sup> In contrast, Mirasol PRT treatment is able to completely inhibit all functions of WBCs including the ability to directly present antigen and induce proliferation of normal PBMNCs in an MLC assay.<sup>11</sup> This would suggest that Mirasol PRT treat-

ment is able to prevent at least direct antigen presentation by the treated cells, indicating that Mirasol PRT treatment could potentially prevent the induction of alloantibodies after the transfusion of treated blood products. This would distinguish this treatment from gamma irradiation, which does not interfere with allo-immunization and the induction of alloantibodies.<sup>13,25</sup>

These studies also provide additional information about the xenogeneic GVHD response in Rag2<sup>-/-</sup> $\gamma$ c<sup>-/-</sup> double-knockout recipient mice. A previous study had shown that injection of human PBMNCs into Rag2<sup>-/-</sup> $\gamma$ c<sup>-/-</sup> double-knockout recipient mice resulted in enhanced peripheral reconstitution with human T cells.<sup>4</sup> Separation of donor PBMNCs into different subpopulations showed that both CD4+ and CD8+ cells were required to induce lethal GVHD in this model.<sup>4</sup> Although it took longer to develop xenogeneic GVHD than had

been published, it was confirmed that it was primarily human T cells including both CD4+ and CD8+ cells that reconstituted the peripheral lymphoid compartments. One explanation for the delayed kinetics may be due to intraperitoneal injection instead of intravenous injection of the donor cells. Another possibility is that we did not bleed our recipient mice weekly, which could induce leukopenia and facilitate reconstitution with the human donor cells. Human CD19+ cells were the primary cells found in the liver and in any intestinal lymphoid tissue that was observed. The preferential location of B cells in the peritoneal cavity could represent an inability of the B cells to home to other sites in the murine recipient after intraperitoneal injection. Another possibility is that this tissue could represent the beginnings of an expansion of Epstein-Barr virus-seropositive B cells that has been previously observed in studies of immunodeficient SCID mice.<sup>6,26</sup> These cells represent an uncontrolled expansion of these cells as occurs in posttransplant lymphoproliferative disorder.<sup>27</sup>

Characterization of human cytokines present in the serum at early time points after injection of the human cells into Rag2<sup>-/-</sup> $\gamma$ c<sup>-/-</sup> double-knockout recipients found high levels of IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-15, and IL-18; intermediate levels of IL-6 and IL-10; and very low levels of IL-4, IL-8, IFN- $\gamma$ , and TNF- $\alpha$ .<sup>4</sup> The lack of human cytokines in the plasma of recipients of cells treated with Mirasol PRT was consistent with the lack of human cell chimerism observed with other approaches. Measurement of the

level of cytokines in the plasma of recipients with end-stage GVHD contained a very different mixture of cytokines because very high levels of IFN- $\gamma$ , high levels of IL-10, and low levels of IL-5, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-12p70 were detected. Concordant expression of high levels of both IL-10 and IFN- $\gamma$  have been observed in autologous GVHD in humans.<sup>28</sup> Autologous GVHD is induced by a short course of cyclosporine in recipients of autologous transplants. Autologous GVHD is the result of cytolytic CD8+ cell responses whose T-cell receptors recognize MHC class II molecules containing the CLIP peptide. Polymorphisms in the IL-10 promoter were also found to correlate with the ability to generate autologous GVHD responses in patients.<sup>28</sup> Thus the xenogeneic GVHD responses in these recipients may be useful for modeling autologous GVHD responses.

The results indicate that both human CD4+ and CD8+ T cells are found in the recipient mice injected with untreated cells and that a large percentage of these cells express CD107a, indicative of CD4+ and CD8+ cells that had previously carried out granule exocytosis. There is evidence indicating that CD4+ cells can act as cytolytic cells in murine GVHD responses.<sup>29</sup> In these studies, the cytolytic CD4+ cells appeared to lyse peripheral blood progenitor cells in the marrow. This would provide one explanation for the decrease in Hct levels observed in the recipients of untreated MNCs. Although the antigens recognized by human T cells present in the Rag2<sup>-/-</sup> $\gamma$ c<sup>-/-</sup> double-knockout recipient mice undergoing GVHD have not been determined, previous studies have suggested that human T cells recognize xenogeneic H-2 antigens expressed by murine antigen-presenting cells.<sup>30,31</sup>


Another possible explanation for the decreased Hct levels in the recipients of untreated MNCs could be the production of xenoreactive antibodies by the human cells. Published studies had indicated that the injection of human cells results in production of xenoreactive antibodies that bind to multiple antigens expressed by murine RBC.<sup>32</sup> We also observed that there were high levels of human immunoglobulins in the serum of the recipients, and that these immunoglobulins contained primarily IgM antibodies with specificity toward murine RBCs and PLTs but not WBCs. The activation of complement by the IgM bound to the RBCs could facilitate the elimination of the murine RBCs.

In summary, these experiments demonstrate that the injection of untreated MNCs into Rag2<sup>-/-</sup> $\gamma$ c<sup>-/-</sup> double-knockout recipient mice induces a xenogeneic GVHD response that resembles the responses seen in TAGVHD. Mirasol PRT-treated donor cells are unable to generate xenogeneic GVHD when injected into Rag2<sup>-/-</sup> $\gamma$ c<sup>-/-</sup> double-knockout recipient mice. This finding is consistent with the previous finding that the Mirasol PRT-treated cells are functionally inactive in *in vitro* assays.<sup>11</sup> These findings suggest that a single treatment would be able not only to

inactivate pathogens present in blood products but also prevent the immunologic consequences such as TAGVHD that can occur after blood transfusion.

## REFERENCES

1. Vamvakas EC, Blajchman MA. Deleterious clinical effects of transfusion-associated immunomodulation: fact or fiction? *Blood* 2001;97:1180-95.
2. Lee JH, Klein H. From leukocyte reduction to leukocyte transfusion: the immunological effects of transfused leukocytes. *Bailliere's Clin Hematol* 2000;13:585-600.
3. Gould DS, Auchincloss HJ. Direct and indirect recognition: the role of MHC antigens in graft rejection. *Immunol Today* 1999;20:77-82.
4. van Rijn R, Simonetti E, Hagenbeek A, et al. A new xenograft model for graft-versus-host disease by intravenous transfer of human peripheral blood mononuclear cells in Rag2<sup>-/-</sup> $\gamma$ c<sup>-/-</sup> double mutant mice. *Blood* 2003;102:2522-31.
5. Fast L, Semple J, DiLeone G, et al. Inhibition of xenogeneic graft-versus-host disease by PEN110 treatment of donor human peripheral blood mononuclear cells. *Transfusion* 2004;44:282-5.
6. Mosier D, Guilizia R, Baird S, Wilson D. Transfer of a functional human immune system to mice with severe combined immunodeficiency. *Nature* 1988;335:256-9.
7. Barry T, Jones D, Richter C, Haynes B. Successful engraftment of human postnatal thymus in severe combined immune deficient (SCID) mice: differential engraftment of thymic components with irradiation versus anti-asialo GM1 immunosuppressive regimens. *J Exp Med* 1991;173:167-80.
8. Sandhu J, Gorczynski R, Shpitz B, et al. A human model of xenogeneic graft-versus-host disease in SCID mice engrafted with human peripheral blood lymphocytes. *Transplantation* 1995;60:179-84.
9. Fraser C, Chen B, Webb S, et al. Circulation of human hematopoietic cells in severe combined immunodeficient mice after Cl2MDP-liposome-mediated macrophage depletion. *Blood* 1995;86:183-92.
10. Kumar V, Lockerbie O, Ruane P, et al. Riboflavin and UV-light based pathogen reduction: extent and consequences of DNA damage at the molecular. *Photochem Photobiol* 2004;80:15-21.
11. Fast L, DiLeone GJ, Li J, Goodrich R. Functional inactivation of white blood cells by Mirasol treatment. *Transfusion* 2006;46:642-8.
12. Fast L, DiLeone G, Edson C, Purmal A. PEN110 treatment functionally inactivates the PBMNCs present in RBC units: comparison to the effects of exposure to gamma irradiation. *Transfusion* 2002;42:1318-25.
13. Fast L. The effect of exposing murine splenocytes to UVB light, psoralen plus UVA light or gamma-irradiation on *in vitro* and *in vivo* immune responses. *Transfusion* 2003;43:576-83.

14. Alter G, Malenfant J, Altfeld M. CD107a as a functional marker for the identification of natural killer cell activity. *J Immunol Methods* 2004;294:15-22.
15. Betts M, Brenchley J, Price D, et al. Sensitive and viable identification of antigen-specific CD8+ T cells by a flow cytometric assay for degranulation. *J Immunol Methods* 2003;281:65-78.
16. Grossman W, Verbsky J, Tollefsen B, et al. Differential expression of granzymes A and B in human cytotoxic lymphocyte subsets and T regulatory cells. *Blood* 2004;104:2840-8.
17. Grossman W, Verbsky J, Barchet W, et al. Human T regulatory cells can use the perforin pathway to cause autologous target cell death. *Immunity* 2004;21:589-601.
18. AuBuchon JI, Herschel L, Roger J, et al. Efficacy of apheresis platelets treated with riboflavin and ultraviolet light for pathogen reduction. *Transfusion* 2005;45:1335-41.
19. Ruane P, Edrich R, Gampp D, et al. Photochemical inactivation of selected viruses and bacteria in platelet concentrates using riboflavin and light. *Transfusion* 2004;44:877-85.
20. Kumar V, Motheral T, Luzniak G, Goodrich R. Mirasol pathogen reduction technology: riboflavin-based plasma process inactivates intracellular and extracellular human immunodeficiency. *J Clin Apher* 2003;18:84.
21. Goodrich L, Douglas I, Urisote M. Riboflavin photoinactivation procedure inactivates significant levels of bacteria and produces a culture negative product. *Transfusion* 2002;42:16S.
22. Goodrich LM, Ghielli M, Hansen E, et al. Riboflavin and UV light inactivate enveloped and non-enveloped viruses in platelet concentrates which maintain cell quality. *Vox Sang* 2002;83:111.
23. Goodrich R. Inactivation of viruses in blood products (platelets, plasma, and red cells). *Transfus Clin Biol* 2001;8:103S.
24. Andre-Schmutz I, Deist FL, Hacein-Bey-Abina S, et al. Immune reconstitution without graft-versus-host disease after haemopoietic stem-cell transplantation: a phase 1/2 study. *Lancet* 2002;360:130-7.
25. Ohto H. Gamma radiation does not prevent transfusion-induced HLA alloimmunization. *Transfusion* 1997;37:878-9.
26. Kamel-Reid S, Dick J. Engraftment of immune-deficient mice with human hematopoietic stem cells. *Science* 1988;242:1706-9.
27. Mamzer-Bruneel MF, Bourquelot P, Hermine O, Legendre C, Kreis H. Treatment and prognosis of post-transplant lymphoproliferative disease. *Ann Transplant* 1997;2:42-8.
28. Miura Y, Thoburn CJ, Bright EC, et al. Cytokine and chemokine profiles in autologous graft-versus-host disease (GVHD): interleukin 10 and interferon  $\gamma$  may be critical mediators for the development of autologous GVHD. *Blood* 2002;100:2650-8.
29. Sprent J, Suth CD, Agus D, et al. Profound atrophy of the bone marrow reflecting major histocompatibility complex class II-restricted destruction of stem cells by CD4+ cells. *J Exp Med* 1994;180:307-17.
30. Lindahl K, Bach F. Human lymphocytes recognise mouse alloantigens. *Nature* 1975;254:607-9.
31. Lindahl K, Bach F. Genetic and cellular aspects of xenogeneic mixed leukocyte culture reaction. *J Exp Med* 1976;144:305-18.
32. Williams SS, Umemoto T, Kida H, Repasky EA, Bankert RB. Engraftment of human peripheral blood leukocytes into severe combined immunodeficient mice results in the long term and dynamic production of human xenoreactive antibodies. *J Immunol* 1992;149:2830-6. 

# TRANSFUSION MEDICINE REVIEWS

Vol 22, No 2

April 2008

## Pathogen Reduction: A Precautionary Principle Paradigm

Harvey J. Alter

Although remarkable advances have been made in the prevention of the major transfusion-transmitted diseases, long intervals have transpired between the first recognition of transfusion risk and the implementation of a preventive strategy. For hepatitis B virus, that interval was 30 years; for non-A, non-B/hepatitis C virus, 15 years; and for human immunodeficiency virus, West Nile virus, *Trypanosoma cruzi*, and bacteria, 3, 4, 5, and 18 years, respectively. In our existing reactive approach, there is a fundamental and inevitable delay before we can react; and thus, infections are destined to occur. The continued emergence or reemergence of transfusion-transmitted infections calls for a new paradigm of preemptive pathogen reduction (PR). Two PR systems, psoralen/UV-A and riboflavin/

UV-A, have shown efficacy and safety for platelets and plasma; and psoralen/UV-A technology has been successfully implemented for platelets in Europe. Pathogen reduction can eliminate or reduce the risk for any nucleic acid containing agent, including bacteria, and thus will be effective for all but prion diseases. It is possible to introduce PR for platelets and plasma now and to concentrate resources on developing PR for red cells. This will require an intellectual and financial commitment from the National Institutes of Health, the Food and Drug Administration, industry, and the blood bank establishment, just as occurred for nucleic acid testing (NAT) technology. This can be done if there is sufficient will to do it.

© 2008 Published by Elsevier Inc.

**I**N THE WAKE of the human immunodeficiency virus (HIV) tragedy, the Food and Drug Administration (FDA) and US blood establishments have endorsed the *precautionary principle* that states that “for situations of scientific uncertainty, the possibility of risk should be taken into account in the absence of proof to the contrary.” As a corollary, the precautionary principle asserts that “measures need to be taken to face potential serious risks.” Yet pathogen reduction (PR), perhaps the quintessential example of the precautionary principle, has not been embraced. Pathogen reduction calls for a new paradigm in transfusion safety, namely, the transition from a reactive to a proactive and preemptive strategy for the prevention of transfusion-transmitted diseases. Pathogen reduction may initially add cost and complexity to blood processing, but ultimately will not only offer maximum safety, but also will prove to be cost-neutral and possibly cost-saving.

The decline in transfusion-associated hepatitis incidence from 30% to near zero over the course of 3 decades has been considered one of the major

triumphs in transfusion medicine.<sup>1</sup> However, viewed in the present context, it can also be seen as one of the major failures of transfusion medicine because no preemptive viral reduction strategy was in place and because decades passed before the extent of the hepatitis risk was defined, the causative agents discovered, and proper testing strategies implemented. A vast number of cases occurred before we could, or chose to, do anything about it. Based on prospectively determined

---

From the Department of Transfusion Medicine, Warren Grant Magnuson Clinical Center, National Institutes of Health, Bethesda, MD.

Address reprint requests to Harvey J. Alter, MD, FACP, Chief, Infectious Disease Section, Department of Transfusion Medicine, Bldg 10, Room 1C-711, NIH, 10 Center Drive, Bethesda, MD 20892.

E-mail: halter@dtm.cc.nih.gov  
0887-7963/08/\$ - see front matter  
© 2008 Published by Elsevier Inc.  
doi: 10.1016/j.tmr.2008.01.001

**Table 1. Time Interval Between Recognition of Risk and Implementation of a Donor Screening Assay**

Agent	Recognized as a transfusion risk	First screening assay	Interval (y)
HBV	1940	1970	30
NANB/HCV	1975	1990	15
HIV	1982	1985	3
WNV	2002 (1999)*	2003	1 (4)*
Chagas	2002	2007	5
Bacteria	1986	2004	18

Abbreviations: HBV, hepatitis B virus; NANB, non-A, non-B agent; HIV, human immunodeficiency virus; WNV, West Nile virus; Chagas, *T. cruzi* infection.

\* Suspected, but not proven, in 1999.

hepatitis incidence rates<sup>1</sup> and the number of blood transfusions nationwide in the United States, it can be estimated that there were 4.8 million transfusion-transmitted hepatitis C virus (HCV) infections between 1970 and 1990; and based on a 20% incidence of severe outcomes, these might have resulted in 768 000 cases of cirrhosis. Clearly, not all these cases of cirrhosis occurred because many transfusion recipients died of underlying diseases before the severe chronic manifestations of hepatitis could ensue. This does not diminish the fact that allogeneic transfusions placed these recipients at potential risk for a fatal disease. These projections are sobering, even if they are off by a factor of 10.

Historically, there has been a very long interval between the first recognition that a disease is transfusion-transmitted and the eventual implementation of a donor-screening test to prevent that transmission (Table 1). For the hepatitis B virus (HBV), the interval between recognition of transfusion-transmission and implementation of the first assays for HBV, the Australia antigen, was approximately 30 years; and for non-A, non-B/HCV hepatitis, it was 15 years. For HIV, the interval was reduced to 3 years; however, in that comparatively brief interval, more than 14 000 transfusion-transmitted, predominantly fatal HIV infections occurred in the United States alone.<sup>2</sup> We generally consider that the interval from recognition to implementation for West Nile virus (WNV) was from 2002 to 2003; however, retrospective analysis of the 1999 WNV epidemic in New York City made it highly probable that WNV could be transmitted by transfusion,<sup>3</sup> so that the true implementation interval was approximately 4 years. In addition, testing donations for *Trypanosoma cruzi* (Chagas disease) was recommended by the FDA's Blood

Products Advisory Committee in 2002; and yet the first reliable test was not introduced until 2007. Furthermore, the relatively frequent transmission of bacteria by room temperature-stored platelets was evident by 1986; but it was not until 18 years later (2004) that routine bacteriologic testing of platelets was introduced in the United States. The inherent problem is that in a reactive strategy to pathogen risks, there is a fundamental and inevitable delay between the recognition of risk and the prevention of that risk. Thus, transfusion-transmitted infections are destined to occur before we can adequately react. Perhaps William Murphy phrased it best when he stated, "this effect, that a new or poorly understood disease with a long preclinical phase can be spread among humans by transfusion for many years, and perhaps extensively, before the consequences become apparent is a fixed and inevitable property of transfusion medicine."<sup>4</sup>

Nonetheless, on a more positive note, based on prospectively determined hepatitis incidence figures,<sup>1</sup> the introduction of anti-HCV screening in 1990 is projected to have prevented 1.2 million cases of transfusion-associated hepatitis and 192 000 potential cases of cirrhosis in the decade of the 1990s. Furthermore, increasingly sensitive serologic and nucleic acid tests for HCV and HIV have reduced these risks dramatically. In the United States, the risks for the 3 major transfusion-transmitted viruses in 2006 were 1 in 1.6 million for HCV, 1 in 1.8 million for HIV, and 1 in 269 000 for HBV, as calculated by the incidence rate-window period model and approximately the same using the minipool nucleic acid testing (NAT) yield model.<sup>5</sup> In Canada, O'Brien et al,<sup>6</sup> using the incidence rate-window period model, reported a residual risk of 1 in 7.8 million for HCV, 1 in 2.3 million for HIV, and 1 in 153 000 for HBV. Although HBV transmissions occur much more frequently than HCV or HIV, this estimate is based on antibody to hepatitis B core antigen (anti-HBc) seroconversion and not on the development of the hepatitis B surface antigen (HBsAg) carrier state or clinical disease. Actual cases of transfusion-associated hepatitis B are quite rare.

Currently, the major infectious risks are zoonotic in origin, wherein animal viruses have been introduced to humans as an incidental host, either through the food chain, as in variant Creutzfeldt-Jakob disease, or through vector transmission. Mosquitoes, ticks, and other insect vectors are

injecting diseases into us at alarming frequency; and most, if not all, of these are then secondarily transmitted by transfusion. These vector-borne and transfusion-borne diseases include malaria, dengue fever, WNV-associated fever and meningoencephalitis, babesiosis, ehrlichiosis, Colorado tick fever, and Chagas disease. Conclusive evidence is missing; but Lyme disease, visceral leishmaniasis, and flavivirus-induced encephalitis might also prove to be transfusion-transmitted.

The history of transfusion-transmitted WNV infection is a case in point. Before the implementation of WNV testing in 2003, there were 23 documented transfusion-transmitted clinical cases reported in the United States; and based on the Centers for Disease Control and Prevention conversion factor of 140 asymptomatic cases to each clinical case,<sup>7</sup> it can be estimated that there were an additional 3200 subclinical transfusion-transmitted cases in 2002. It is commendable that WNV NAT testing began under IND only 8 months after the first documented transfusion-transmission. However, in retrospect, it was projected from the New York City epidemic in 1999 that transfusion-transmitted WNV cases were likely.<sup>3</sup> However, because the evidence was indirect and WNV epidemics were known to be intermittent in nature, no definitive action was taken at that time. Overall, since 2002, there have been 32 documented transfusion-associated cases of clinical WNV infection and 4480 projected transmissions in the United States. Remarkably, none of these cases would have occurred had a PR system been in place at the time, as evidenced by the absence of cases associated with the transfusion of solvent-detergent-treated plasma. Once implemented in 2003, WNV testing of donor blood has been highly effective. In the American Red Cross experience, WNV NAT prevented the release and transfusion of at least 1000 potentially infectious components from 519 confirmed positive blood donors in 2003 and 2004.<sup>8</sup> There have been only 9 WNV transmissions since testing was implemented, each representing a window period donation that failed to be detected in the minipool testing format being used.

There is current concern that the WNV story may be replayed by the dengue fever virus (DFV) because the agents and predisposing elements are similar. Globally, DFV causes 100 million cases of dengue fever, 250 000 cases of dengue hemorrhagic

fever, and 25 000 deaths annually. It is transmitted by the *Aedes* mosquito and is found in more than 100 countries with a rapidly expanding distribution that could easily follow the path of WNV to North America. The DFV has a median viremia of 5 days, and most cases are asymptomatic; RNA levels range from  $10^5$  to  $10^9$  copies per milliliter. Thus, dengue has all the characteristics of a transfusion-transmitted agent; and its vector is already present in North America. Thus far, there have been 2 transfusion-transmitted cases, 2 transplant-related cases, and 7 nosocomial dengue transmissions that have been documented.<sup>9</sup> Undoubtedly, many more transfusion-associated dengue cases occur in endemic areas; but these are masked by the high background infection rate. Fortunately, the epidemiologic pattern of this agent differs from WNV in that it does not have an intermediary bird host that would facilitate its spread.

An agent of particular current interest is human herpesvirus (HHV)-8, important not only for its potential to transmit Kaposi sarcoma (KS) but also because it is critical to decisions regarding the donor reentry of men who have sex with men (MSM). The prevalence of HHV-8 antibody is 2% to 4% in blood donors,<sup>10</sup> 2% to 10% in the general population, 12% to 16% in HIV-negative MSMs, 40% to 50% in HIV-positive MSMs, and >95% in patients with KS (Dollard SC, personal communication). There have been several case reports and epidemiologic insights to suggest that HHV-8 can be transfusion-transmitted, but the best data indicating the transfusion-transmission of HHV-8 are in the study by Hladik and associates at the Centers for Disease Control and Prevention<sup>11</sup> who followed 1811 transfusion recipients in an HHV-8 endemic area of Uganda. The risk of seroconversion was significantly higher among recipients of seropositive blood (excess risk, 2.7%;  $P < .005$ ); and the increase was seen primarily in those who seroconverted for anti-HHV-8 between 3 and 10 weeks posttransfusion, an interval highly suggestive of transfusion-transmission.

In the final analysis, any agent that even transiently traverses the human circulation during an asymptomatic phase of infection is a threat to be transfusion-transmitted. The likelihood of that transmission is highly dependent on the duration of viremia ("agentemia"), and the level of concern is dependent upon the severity of the ensuing disease. Agents for which there are no routine screening

measures in place and that pose a documented or potential transfusion risk in this model include malaria sp, dengue and other arboviruses, HHV-8 (KS virus), cytomegalovirus (CMV) and other herpes viruses, parvovirus B-19 (erythrovirus), human papilloma virus, Colorado tick fever virus, *Babesia microti* (*Babesia*), *Ehrlichia* and other *Rickettsia*, *Borrelia burgdorferi* (Lyme disease), chikungunya virus, hepatitis A virus, and variant Creutzfeldt-Jakob disease. A comprehensive analysis of 68 potential/known transfusion-transmitted agents is being prepared for publication by a task force of the American Association of Blood Banks (AABB) and should be accessible sometime during 2008 (Stramer S, personal communication).

This vast array of potential microbiological threats requires continuous surveillance, clinical assessment of the magnitude of each identified risk, and then, where possible, testing or other strategies to limit risk of the most clinically significant agents. This is thus an agent by agent process that is inefficient, insensitive, often controversial in its decisions, and inevitably applied only after clinical disease has occurred. It is a reactive strategy that requires demonstrable risk before preventive measures can be implemented. A more encompassing, efficient, and intuitively appealing option is a preemptive approach that includes PR. Almost all of the aforementioned agents and many others can be reduced to nonpathogenic levels by nucleic acid intercalating agents such as the psoralens<sup>12</sup> and riboflavin<sup>13</sup> in the presence of UV-A light. Shown in Table 2 are known log reductions for psoralen/UV-A, and much the same could be shown for riboflavin/UV-A.

Pathogen reduction has multiple proven advantages in that it: (1) effectively inactivates most clinically relevant viruses whether RNA or DNA, single-stranded or double-stranded, enveloped or nonenveloped, and intracellular or extracellular; (2) inactivates clinically relevant gram-positive and

gram-negative bacteria; (3) inactivates all the spirochetes, *Rickettsia*, and protozoa of known transfusion relevance; (4) inactivates lymphocytes and thus prevents transfusion-associated graft-versus-host disease (GVHD); and (5) offers probable preemptive protection against pathogenic, potentially lethal agents that will inevitably emerge in the future.

There are also impediments to the implementation of PR that to this point have limited its widespread application, as follows: (1) decreased product yield for platelets in the range of 10% to 15%; (2) insufficient kill of some high-titer, nonenveloped agents such as hepatitis A virus (HAV) and parvovirus B-19. However, antibodies to these agents are common in the recipient population, and documented transmissions are exceedingly rare; (3) concern over potential toxicity, although none are known for riboflavin and toxicity of the psoralens is theoretical at the low residual doses transfused. For both agents, there appears to be a wide safety margin; (4) most significantly, there is at present no single PR system that can be applied to all blood products and, particularly, no proven system for PR of whole blood and packed red cells; and (5) anticipated high cost.

Although there are no methods for the PR of red blood cells (RBCs) that have been proven effective and safe in appropriate clinical trials, if the evolving technologies establish their efficacy and multicomponent PR can be implemented, then there are many potential savings that would offset the cost of the process itself, including (1) reducing or eliminating the future need for additional donor screening assays such as testing for HHV-8, *Babesia*, *Ehrlichia*, dengue, and malaria; (2) eliminating some current assays including anti-HBc, WNV, *T cruzi* (Chagas), and syphilis; (3) eliminating the bacterial testing of platelets; (4) discontinuing irradiation of blood products; (5) discontinuing leukoreduction; (6) allowing for the continuation of

Table 2. Inactivation of Infectious Agents in Plasma and Platelets Using Psoralen/UV-A

Classification	Agents	Log reduction
Virus (enveloped)	HIV-1/2, HTLV-I/II, HBV, DHBV, HCV, BVDV, WNV, CMV, SARS-CoV, vaccinia	>4.5 to >6.8
Virus (nonenveloped)	Human adenovirus-5, bluetongue, parvovirus B-19, HAV	>5.1 to >6.8 3.5 to >5.0
Bacteria	Gram + and gram-	>7.3
Spirochetes	<i>Treponema pallidum</i> , <i>B burgdorferi</i>	>5.9 to >10.6
Protozoa	<i>Plasmodium falciparum</i> , <i>T cruzi</i> , <i>B microti</i>	>5.0 to >6.9

Abbreviations: HTLV, human T lymphotropic virus; BVDV, bovine diarrheal virus.

minipool testing rather than the probable evolution to individual donor testing; and (7) reducing donor exclusions based on geography (malaria). Cumulatively, these measures could result in vast savings that should offset the implementation costs of PR. However, these savings can only be realized after procedures for the PR of RBC products are fully operational.

Perhaps the key immediate issue is not the efficacy of PR, where the evidence is substantial, and not even its safety, where toxicity remains theoretical, but rather whether we should introduce PR reduction for platelets and single-donor plasma before a system is in place to inactivate pathogens in RBC products. This is a difficult conundrum, and opinion on this issue is sharply divided. However, it is known that many patients receive repeated, often-daily platelet transfusions that are only intermittently accompanied by RBC transfusions and also that many centers pool platelet products, vastly increasing the recipient exposure risk.

It is also probable that if we wait for the complete PR package, another 5 to 10 years will elapse before licensure and implementation; and in that time, innumerable platelet and plasma infusions will continue to transmit infections to recipients that could have easily been prevented. If such transfusion-transmission infections are accompanied by significant disease, then further transfusion-transmitted tragedies could ensue. I believe that the precautionary principle and the moral imperative dictate that we implement what we have, even if they are less than perfect. Admittedly, there is the other side of the coin in that platelet and single-donor plasma inactivation, in the absence of RBC inactivation, will not reap the financial offsets of a complete PR system and in that RBC products will continue to transmit disease. Furthermore, it is known that transfusion-transmitted pathogens are only one part of the risk equation and, now, not even the largest part. However, I would counter that preventing human error, controlling transfusion-related acute lung injury, and PR are not mutually exclusive and all ways of reducing transfusion risk should be pursued with equal vigor.

The solvent-detergent treatment of plasma and its derivatives has established the principle that PR of even a single blood component is highly beneficial and has established the enormous value of a preemptive PR strategy. Universal inactivation of plasma derivatives has rendered the formerly

highest-risk blood products now to be the safest. As blood transfusion services scrambled to meet the threat of WNV, how reassured plasma manufacturers were to know that they had this agent preemptively covered, as they would for DFV or any other lipid-encapsulated agent that threatens the blood supply. Had solvent detergent treatment of plasma derivatives been implemented in the early 1980s, most HIV and HCV cases that devastated the hemophiliac population could have been avoided. This statement is being made not to cast retrospective blame, but to take a lesson from history and to illustrate the value of having a protective preemptive mechanism in place before the next agent strikes.

There is great potential risk in delaying implementation of PR while waiting for absolute evidence and a perfect system to be put into place. Waiting is a calculated risk that defies the precautionary principle. Can we chance the possibility that a new lethal agent will enter the blood supply and replay the HIV tragedy? Can we face future generations and say we did all that we could do at the time? I believe the time has come to act. At present, there are 2 technologies, psoralen/UV-A and riboflavin/UV-A, that would bring the same level of safety to platelets as currently exists for commercial plasma and its derivatives. Evidence for the efficacy and safety of PR for platelets and single-donor plasma products is sufficient,<sup>14,15</sup> if not overwhelming; and the European experience with psoralen/UV-A-treated platelets has proven the practicality and safety of this approach to transfusion-transmitted disease prevention.<sup>16</sup> Whether or not one concurs with the need to rapidly introduce PR for platelets and nonfractionated plasma in the United States and Canada, the more important and, I believe, crucial message is that we have to establish a mind-set that says PR of *all* blood products is a laudatory and achievable goal and that we need to invest ourselves emotionally, intellectually, and financially to make this happen. The blood bank establishment, the National Institutes of Health, the FDA, and industry have to make this concept a priority and then work in concert to devote substantial resources and energy to achieve this goal, just as they did for viral nucleic acid testing. Only then will it happen!

I was in that packed hotel ballroom in 1994 when Dr David Kessler urged blood banks to develop NAT for routine donor screening. His talk raised



eyebrows and great skepticism; but because of his position of authority, it drove the system, generated government-industry collaboration, and resulted in the remarkably rapid development of practical NAT assays that have been an enormous addition to

blood safety. I am no David Kessler; but I admonish and encourage you to say this is the right thing to do and that we have to find a way to do it. We have to bite the bullet. Fortunately, in this case, it is a magic bullet.

#### REFERENCES

1. Alter HJ, Houghton M: Hepatitis C virus and eliminating post-transfusion hepatitis. *Nat Med* 6:12-16, 2000
2. Selik RM, Ward JW, Buehler JW: Trends in transfusion-associated acquired immune deficiency syndrome in the United States, 1982 through 1991. *Transfusion* 33:890-893, 1993
3. Biggerstaff BJ, Peterson LR: Estimated risk of West Nile virus transmission through blood transfusion during an epidemic in Queens, New York City. *Transfusion* 42:1019-1026, 2002
4. Murphy W: Managing threats rather than risks in blood transfusion: Robust design for a complex system. *Transfusion* 46:2011-2013, 2006
5. Busch MP: Transfusion transmitted viral infections: Building bridges to transfusion medicine to reduce risks and understand epidemiology and pathogenesis. *Transfusion* 46:1624-1640, 2006
6. O'Brien SF, Yi Q-L, Fan W, et al: Current incidence and estimated residual risk of transfusion-transmitted infections in donations made to Canadian Blood Services. *Transfusion* 47:316-325, 2007
7. Centers for Disease Control and Prevention (CDC) serosurveys for West Nile virus infection—New York and Connecticut counties 2000. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 50:37-39, 2001
8. 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* 353:451-459, 2005
9. Centers for Disease Control and Prevention. Dengue Fever. [www.cdc.gov/ncidod/dvbid/dengue](http://www.cdc.gov/ncidod/dvbid/dengue). 12-19-2006.
10. Pellett PE, Wright DJ, Engels EA, et al: Multicenter comparison of serologic assays and estimation of human herpesvirus 8 seroprevalence among US blood donors. *Transfusion* 43:1260-1268, 2003
11. Hladik W, Dollard SC, Mermin J: Transmission of human herpesvirus 8 by blood transfusion. *N Engl J Med* 355:1331-1338, 2006
12. Allain JP, Bianco C, Blajchman MA, et al: Protecting the blood supply from emerging pathogens: The role of pathogen inactivation. *Transfus Med Rev* 19:110-126, 2005
13. Goodrich RP: The use of riboflavin for the inactivation of pathogens in blood products. *Vox Sang* 78(Suppl 2):211-215, 2000
14. Slichter SJ, Raife TJ, Davis K, et al: Platelets photochemically treated with amatosalen HCl and ultraviolet A light correct prolonged bleeding times in patients with thrombocytopenia. *Transfusion* 46:731-740, 2006
15. Mintz PD, Bass NM, Petz LD, et al: Photochemically treated fresh frozen plasma for transfusion of patients with acquired coagulopathy of liver disease. *Blood* 107:3753-3760, 2006
16. van Rhenen D, Gulliksson H, Cazenave JP, et al: Transfusion of pooled buffy coat platelet components prepared with photochemical pathogen inactivation treatment: The euroSPRITE trial. *Blood* 101:2426-2433, 2003

## バイオワン株式会社回答

4月8日運営委員会・安全技術調査会合同委員会後

### 追加質問事項2(各社共通)

インターセプトブラッドシステム(S-59) バイオワン株式会社

1. EU主要国等、各社の不活化技術を導入しているそれぞれの国における供給の実態。輸血用血液製剤の全供給数(不活化技術を適用している製剤と適用していない製剤の合計)、そのうち不活化技術を適用している製剤の割合は何%か。また、供給はどのように行われているか(供給先、医師の希望により供給できるのか等)。

国	血小板供給数		血漿供給数	
	全数	不活化率	全数	不活化率
ベルギー	70,000	100%* <sup>1</sup>	110,000	
フランス	230,000	約10%[2007年]	245,000	100%* <sup>2</sup>
ドイツ	400,000		1,200,000	
イタリア	120,000		605,000	
スペイン	215,000		275,000	
スウェーデン	35,000		120,000	
ノルウェイ	20,000		30,000	
ロシア	75,000		260,000	

- \* 1: ベルギーは血小板の 100%不活化導入が決定されているが、未政府状態が続いており、大臣就任後 100%実施になる。保険適用についても実施が遅れている。血漿についてはすでに2センターで IBS の日常的使用を開始。
- \* 2: フランスは規制により血漿の 100%不活化を要求されている。IBSによる不活化率は未確認(アルサスなど3か所で MB から IBS に変更)
- \* 3. ドイツではリューベック、フランクフルトで血小板用 IBS の日常的使用開始。
- \* 4. イタリア、スペインでは地域により採用が始まっている。採用の判断は血液センターによる。昨年北イタリアで Chikungunya が発生した際には既に IBS を採用していたため血小板の供給に支障は生じなかった。
- \* 5. ノルウェー、スウェーデンでは血液センターにより採用の判断をしている。不活化の費用は全体治療に必要な保険の範囲内で負担可能。
- \* 6. ロシアは医師、患者の判断により不活化した製剤を血液供給者に要求。

## 供給方法

### 1)ベルギー

その地域の血液センターが提供する血液製剤をそのまま使用。血液センターによって供給する製剤が不活化されているかいないか異なっているが2008年中に100%不活化した血小板が供給される予定。不活化は100%IBSによる。

### 2)フランス

採用する血液センターは100%採用になっているため地域によって不活化されているかされていないか決まる。

### 3)ドイツ

血液製剤はドイツ赤十字(75-80%)、病院/大学(10-15%)、供給民間会社(10%以下)から供給されている。血小板は原則 Buffy Coat 血小板で成分採血血小板は理由をつけて医師の要求がある場合に限られる。ガンマー線照射も骨髄移植患者など特に必要な患者に限って実施している。現在は成分採血の際に IBS を採用しているが(リ्यूベック)今後は Buffy Coat にも IBS の採用を広げている予定です。フランクフルト血液センターで Hemovigilance の体制を整えて実施予定。

2. 各社の不活化技術を適用する前の製剤に白血球除去を行った場合と、不活化技術を適用した製剤に白血球除去を行わなかった場合を比較して、GVHD等の副作用の推移はどのようになっているか。

現在 白血球除去を行わずに不活化処理を実施している国はない。

白血球除去導入実態

ベルギー、フランス、ドイツ、スウェーデン、スペイン、ノルウェイ 100%

イタリア 約70%

ロシア 約 20%

白除と、白除＋不活化の副作用の比較は下記情報がある。

**InterCept による不活化導入前後の副作用の比較(Dr. Osselaer ベルギー)**

血液製剤	対照期間(不活化処理前)		INTERCEPT 不活化処理期間	
	血小板(未処理)	赤血球(未処理)	血小板(不活化)	赤血球(未処理)
調査期間	18ヶ月	18ヶ月	18ヶ月	18ヶ月
輸血数	3529	9551	4051	11493
副作用	<b>1.3%</b>	0.4%	<b>0.9%</b>	0.4%

血小板では、不活化処理前の期間は細菌検査、γ線照射、CMV検査を実施していたが、不活化処理導入後これらの検査、処理は実施していない。

赤血球は不活化処理を行っていないので、両期間とも副作用の発生率に変化はない。

一方、血小板は不活化処理導入後、上記検査、照射を廃止したにもかかわらず、副作用の発生率が減少し統計的に有意差が認められている(p 0.002)

## Alsace (フランス)

### Adverse transfusion reactions during platelet concentrates (PC) transfused at EFS-Alsace

	(1) PC (100% plasma) 1/1/2003 – 1/2/2004 99.6 %	(2) PC (35% plasma+65% T-Sol) 1/9/2005 – 1/6/2006 95 %	(3) PC <b>INTERCEPT</b> (35% plasma+65% Intersol) 1/9/2006 – 1/8/2007 99 %
<b>Patients (n)</b>	59	33	36
<b>Adverse reactions (n)</b>	67 (11 RBC Imm)	41 (16 RBC Imm)	37* (19 RBC Imm)
<b>Adverse reactions/1000 PC (n)</b>	5.3	2.7	1.4
<b>Patients with reactions</b>	2.9 %	2 %	1.7 %

Period 3 : \*Fever/chills : 8 ; allergy : 3 ; TRALI : 1 ; RBC immunisations : 19

Period 1 : 1 death volume overload (2 RBCC + 2 BCPC)

All 3 periods : No bacterial sepsis

All 3 periods : 145 adverse reactions : **SEVERITY** grade 1 = 61 %; grade 2 = 33 % (46 RBC immunisations)

BioOne Corporation  
**IMPUTABILITY** grade 2, 3, 4 = 87 %; grade 3 and 4 = 70 %



## La Reunion (フランス)

### EFS-La Réunion : Adverse reactions with INTERCEPT treated Apheresis PC -1

(M F Angelini-Tibert and P. Rasongles)

year	2005	2006/3 - 2007/3
nb of patients	NA	427
nb of apheresis PC	1194	1948
nb of adverse reactions	109	19
Adverse reactions / 1000 APC	91,3	9,8



3. EU主要国における不活化技術導入後不要になった技術(白除、NAT等)

国	不要になった技術
ベルギー	細菌検査、 $\gamma$ 線照射、CMV検査、導入予定の個別NATの導入中止
フランス	$\gamma$ 線照射、導入予定の個別NATの導入中止
ドイツ	$\gamma$ 線照射
イタリア	
スペイン	
スウェーデン	
ノルウェイ	
ロシア	

東欧のIBS導入センターでは導入予定の白除の導入中止を検討しているが、まだ決定していない。

#### 4. EU主要国における不活化技術を適用している製剤の市販後調査の実態(調査数)

##### 1) 血小板

##### ヘモビジランス① (2003年10月～2005年12月)

ベルギー、イタリア、スペイン、ノルウェイ

輸血数 5106PC、患者数 651人、1人当たりの輸血数:1～156回 平均 7.8±16.2回

97.3%の血小板製剤はγ線照射なし

輸血関連の有害事象(可能性がある、おそらく関連、関連ある)

グレード1:41輸血、グレード2以上:1輸血 (全有害事象 42例、0.8%)

感染、TRALI及び死亡はない。

##### ヘモビジランス② (2005年5月～2007年1月)

ベルギー、フランス、スペイン

輸血数 7437PC、患者数 1400人、1人当たりの輸血数:1～129回 平均 5.3±10.8回

98.9%の血小板製剤はγ線照射なし

輸血関連の有害事象(可能性がある、おそらく関連、関連ある)

グレード1:55輸血、グレード2以上:0 (全有害事象 55例、0.7%)

感染、TRALI及び死亡はない。

##### ヘモビジランス③ フランス(Ile de La Reunion)

Ile de La Reunionでは2005年から2006年にかけてチキングニャが大流行し島内採血を禁止した。急遽、本国で導入されているIBS不活化技術を導入後、島内採血を再開し血小板を確保した。

輸血数 1948PC、有害事象 0.98%

チキングニャ感染例はない

##### ヘモビジランス④ フランス(Alsace) (2006年9月～2007年8月)

輸血数 13241PC、患者数 2069人、1人当たりの輸血数:1～289回 平均 6.4回

有害事象 37輸血(0.14%)

TRALI 1例、感染、死亡は報告されていない。TRALIは出産経験が3回ある女性の成分献血による。

##### ヘモビジランス⑤

輸血数 4000PC 2008年6月 International society of blood transfusion で発表予定

##### ヘモビジランス⑥ ドイツ

輸血数 5000PC 2008年より開始

## 2) 血漿

### ヘモビジランス①

輸血数 3000PC 2008年6月 International society of blood transfusion で発表予定

なおバイオワンとシーラスでは Hemovigilance に当たる市販後調査を継続して実施する予定です。アジアにおいても欧州と同じ基準により実施しますが日本は日本赤十字社のご判断によると思います。