

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

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

### 同種異型白血球の輸血に関連するリスク

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

#### 輸血に起因する移植片対宿主病

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

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

#### マイクロキメリズム

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

## 同種免疫

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

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

表1. 不安定血液製剤による潜在的副作用

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

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

## 輸血関連急性肺障害

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

6-10%にとっては致命的なものとなる。

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

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

### 発熱性非溶血輸血反応

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

FNHTRの発生率は、赤血球輸血の場合で6.8%、非白血球不活化血小板輸血の場合で30.8%と推定されている。白血球は、FNHTRの原因として重視すべきものである——保存された濃厚血小板においては、白血球細胞によってサイトカインの活性合成が起こり、白血球由来の炎症性サイトカインの含有量が増加する。濃厚血小板製剤は保存中に溶解性CD40リガンドを蓄積することがわかっており、これによって、発熱を誘引するものとして知られるプロスタグランジンE<sub>2</sub>（PGE<sub>2</sub>）が生成されるのである。FNHTRは生死にかかわるものではないが、コスト面ならびに患者のコントロールの側面において重大な影響を持っている（血液培養に関する要件、溶血反応の可能性が否定されるまで輸血を停止する必要性、入院期間の長期化の可能性など）。

## 輸血関連免疫修飾

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

## 病原体の直接感染

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

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

## 白血球由来の危険性削減に向けた現在の戦略における限界

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

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

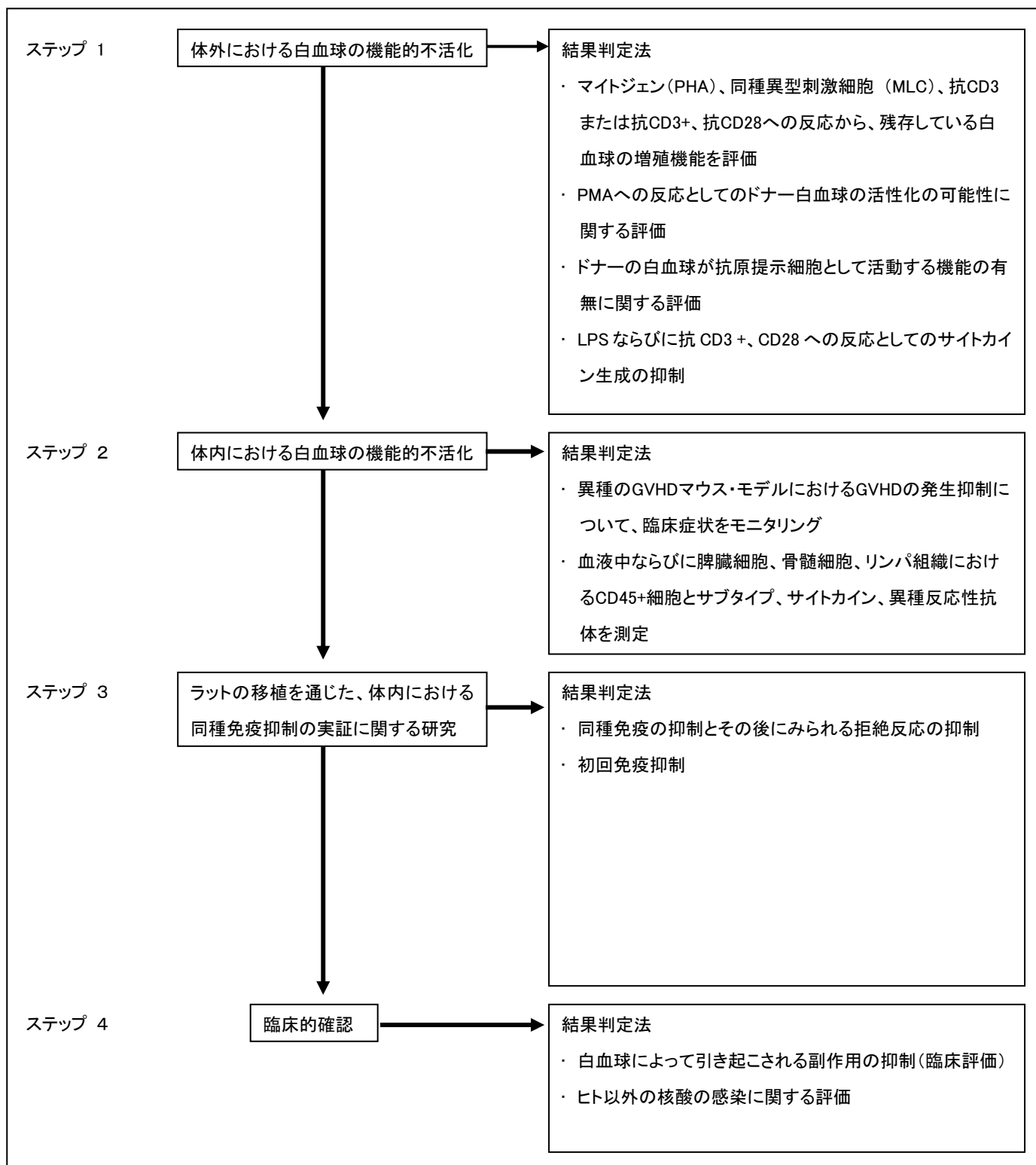
リスクを軽減する目的で使用されているもうひとつの一般的な方法が、ろ過（赤血球除去または赤血球不活化）である。しかしながら、以下を抑制するためのものとしては100%有効なものではない。a) FNHTR、b) ウイルス感染、c) マイクロキメリズム。

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

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

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

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



GVHD: 移植片対宿主病、LPS: リポ多糖、MLC: 白血球混合培養、PHA: ファイトヘマグルチニン、  
PMA: ホルボールミスチン酸アセテート、白血球: 白血球

## 白血球に由来するリスクの軽減におけるMirasol PRTシステムの有効性

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

### 結果:体外における白血球の機能的不活化(ステップ 1)

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

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

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

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

### 結果:体内における白血球の機能的不活化(ステップ 2)

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

この研究により、以下が明らかになった。：

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

ンのみが検出された

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

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

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

**結果：同種免疫およびその他の白血球関連の副作用が抑制された(ステップ3)。**

同種免疫

In vivo研究では、同種免疫の発生に対するMirasol処理の効果について調査を行った。レシピエントであるラットには複数回にわたって、ドナー・ラットから血小板50 mLおよび高濃度の白血球 [10<sup>6</sup>/mL]を含有する輸血を行った。

以下の3つのグループについて、評価を実施した。：

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

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

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

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

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

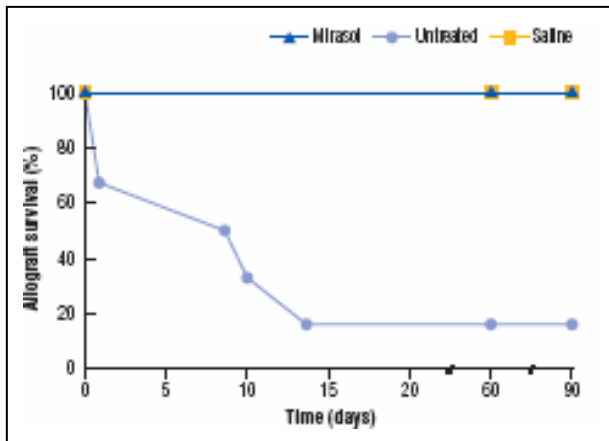
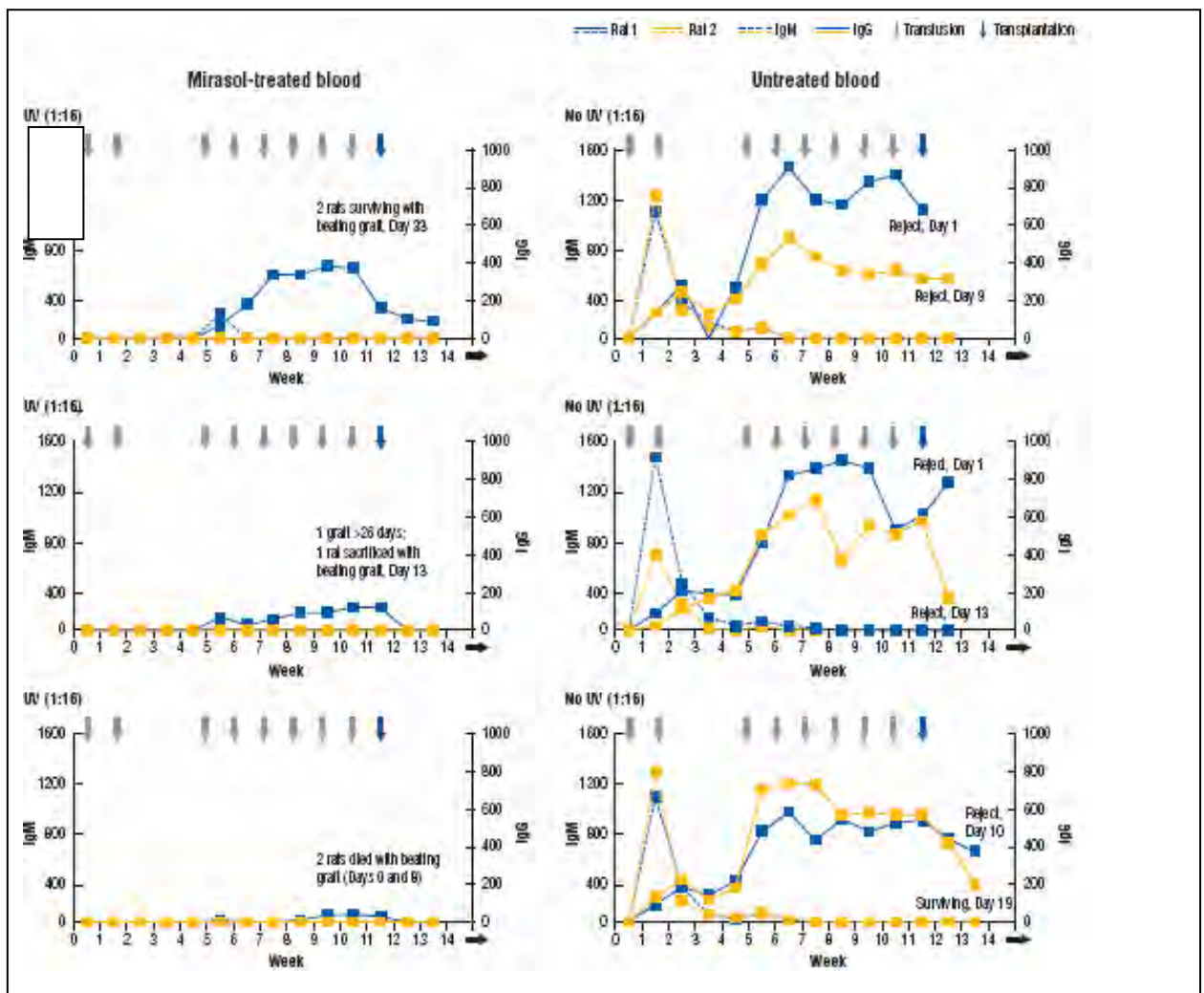


図3. ラットにおける同種免疫移植の生存率に関する研究

図2. ラットにおける同種免疫移植のIgM値およびIgG値に関する研究





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

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

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

CMV：サイトメガロ・ウィルス、GVHD：移植片対宿主病、白血球：白血球

### 免疫に起因するその他の副作用

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

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

る能力を測定するため、これらの分析を行った。

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

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

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

#### **結果：臨床試験による確認(ステップ4)**

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

#### **結論**

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

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