

要約

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

References

1. Schroeder ML. Transfusion-associated graft-versus-host disease. *Br J Haematol*. 2002;117:275-287.
2. Lee TH, Paglieroni T, Utter GH, et al. High-level long-term white blood cell microchimerism after transfusion of leukoreduced blood components to patients resuscitated after severe traumatic injury. *Transfusion*. 2006;45:1280-1290.
3. Utter GH, Reed WF, Lee TH, Busch MP. Transfusion-associated microchimerism. *Vox sang*. 2007;93:188-195.
4. Toy P, Popovsky MA, Abraham E, et al. Transfusion-related acute lung injury: definition and review. *Crit Care Med*. 2005;33:721-726.
5. Siliman CC. The two-event model of transfusion-related acute lung injury. *Crit Care Med*. 2006;34(5 Suppl):S124-S131.
6. Heddle NM, Klama LN, Griffith L, et al. A prospective study to identify the risk factors associated with acute reactions to platelet and red cell transfusions. *Transfusion*. 1993;33:794-797.
7. Yazer MH, Podlosky L, Clarke G, et al. The effect of prestorage WBC reduction on the rates of febrile nonhemolytic transfusion reactions to platelet concentrates and RBC. *Transfusion*. 2004;44:10-15.
8. Rogers MA, Blumberg N, Saint SK, et al. Allogeneic blood transfusions explain increased mortality in women after coronary artery bypass graft surgery. *Am Heart J*. 2006;152:1028-1034.
9. Council of Europe Expert Committee in Blood Transfusion Study Group on Pathogen Inactivation of Labile Blood Components. Pathogen inactivation of labile blood components. *Transfusion Med*. 2001;11:149-175.
10. Ibojje J, Greiss MA, Urbaniak SJ. Limited efficacy of universal leukodepletion in reducing the incidence of febrile nonhemolytic reactions in red cell transfusions. *Transfusion Med*. 2002;12:181-185.
11. Vamvakas EC. Is white blood cell reduction equivalent to antibody screening in preventing transmission of cytomegalovirus by transfusion? A review of the literature and meta-analysis. *Transfus Med Rev*. 2005;19:181-199.
12. Akahoshi M, Takahashi M, Masuda M, et al. A case of transfusion-associated graft-versus-host disease not prevented by white cell-reduction filters. *Transfusion*. 1992;32:169-172.
13. Fast LD, DiLeone G, Li J, et al. Functional inactivation of white blood cells by Mirasol treatment. *Transfusion*. 2006;46:642-648.
14. Fast LD, Marschner S, DiLeone G, et al. Inactivation of human WBCs in RBC products using the Mirasol® system for whole blood. In: Abstracts of the American Society of Hematology 49th Annual Meeting and Exposition; December 8-11, 2007; Atlanta, GA, USA.
15. Fast LD, DiLeone G, Cardarelli G, et al. Mirasol PRT treatment of donor white blood cells prevents the development of xenogeneic graft-versus-host disease in Rag2-/-gcl-/- double knockout mice. *Transfusion*. 2006;46:1553-1560.
16. Data on file. Navigant Biotechnologies LLC.
17. Sachs UJ, Hattar K, Weissmann N, et al. Antibody-induced neutrophil activation as a trigger for transfusion-related acute lung injury in an ex vivo rat lung model. *Blood*. 2006;107:1217-1219.
18. Ambruso DR, Thurman G, Marschner S, et al. Mirasol™ pathogen reduction of packed red blood cells (PRBCs) and apheresis platelet (Apl) concentrates decreases neutrophil priming activity generated during storage. In: Abstracts of the American Society of Hematology 49th Annual Meeting and Exposition; December 8-11, 2007; Atlanta, GA, USA.
19. Pelszynski MM, Moroff G, Luban NL, et al. Effect of gamma irradiation of red blood cell units on T-cell inactivation as assessed by limiting dilution analysis: implications for preventing transfusion-associated graft-versus-host disease. *Blood*. 1994;83:1683-1689.
20. Luban NL, Drothler D, Moroff G, Quinones R. Irradiation of platelet components: inhibition of lymphocyte proliferation assessed by limiting-dilution analysis. *Transfusion*. 2000;40:346-352.

第 6 章

Mirasol 処理した血小板製剤の品質

MIRASOL®

病原体不活化技術

Mirasol 処理した血小板製剤の品質

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

In vitro 試験の結果

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

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

血小板の品質と性能

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

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

代謝に関する結果

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

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

表 1. 5日間保存後のin vitro結果のまとめ

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

†表中の数値は平均±標準偏差である; *N=17; ‡N=36。

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

活性化に関する結果

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

他のパラメータに関する結果

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

血小板の機能性

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

フローサイトメトリーによる一次評価

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

灌流による二次評価

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

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

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

で表されている)。

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

表 2. 血小板の機能性に関連する要因

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

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

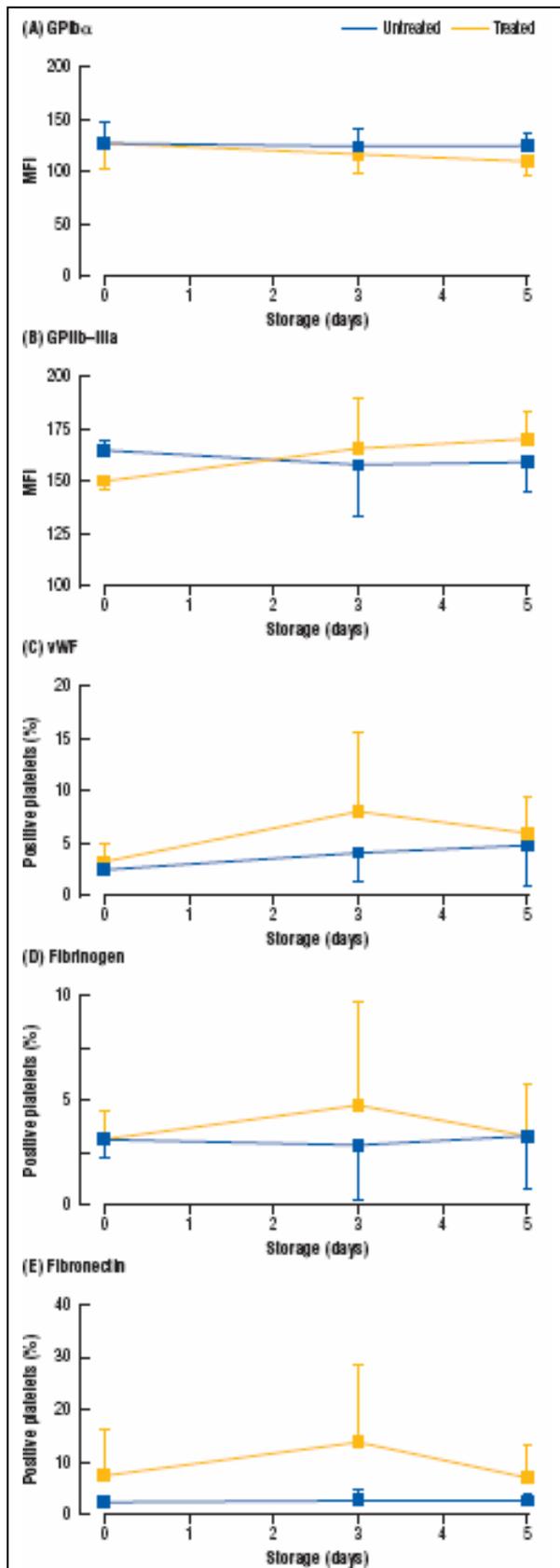


図 1A~E. 5 日間保存中の未処理および Mirasol 処理血小板に対する (A) GPIb α ; (B) GPIIb-IIIa; (C) vWF; (D) フィブリノーゲン; (E) フィブロネクチン存在下でのフローサイトメトリー試験 (平均 \pm SD、n=8)。