

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

ミトコンドリアの完全性と機能性

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

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

その結果は以下のとおりであった。

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

表 3. In vitro 試験: フローサイトメトリーの結果。

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

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

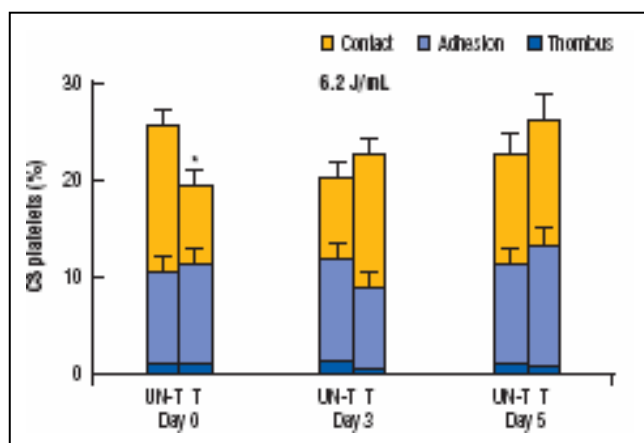


図 2. 5 日間の保存中の未処理血小板 (UN-T) および Mirasol 処理血小板 (T) の接触、接着および血栓形成のパーセンテージで分類した血小板による表面被覆 (CS) パーセンテージ (平均 ± 平均の標準誤差, n=8, * UN-T に対して p<0.05)。

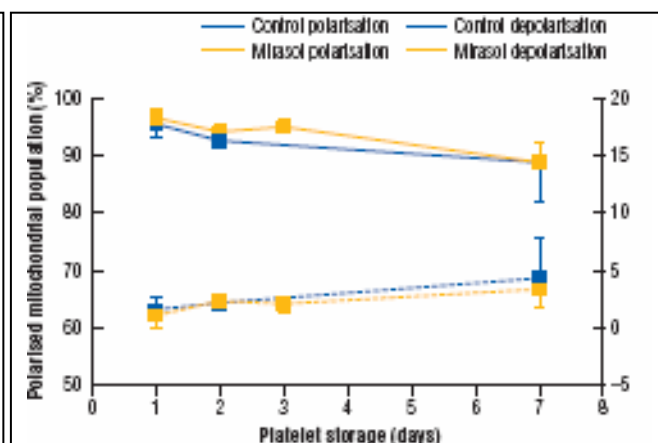


図 3. JC-1 染色アッセイを用いたミトコンドリア膜電位の測定

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

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

Mirasol 処理はミトコンドリアの機能的完全性と活性を変化させない。

In vivo の生存性およびリカバリー試験からの結果

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

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

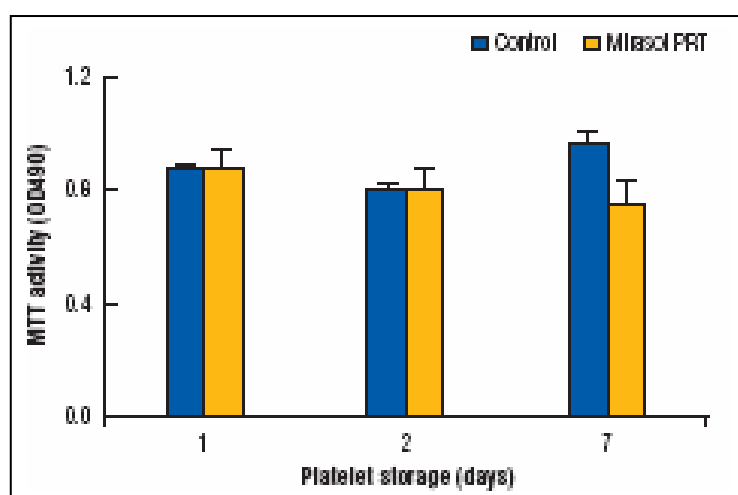


図 4. MTT 低下アッセイを用いたミトコンドリアの酵素活性の評価

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

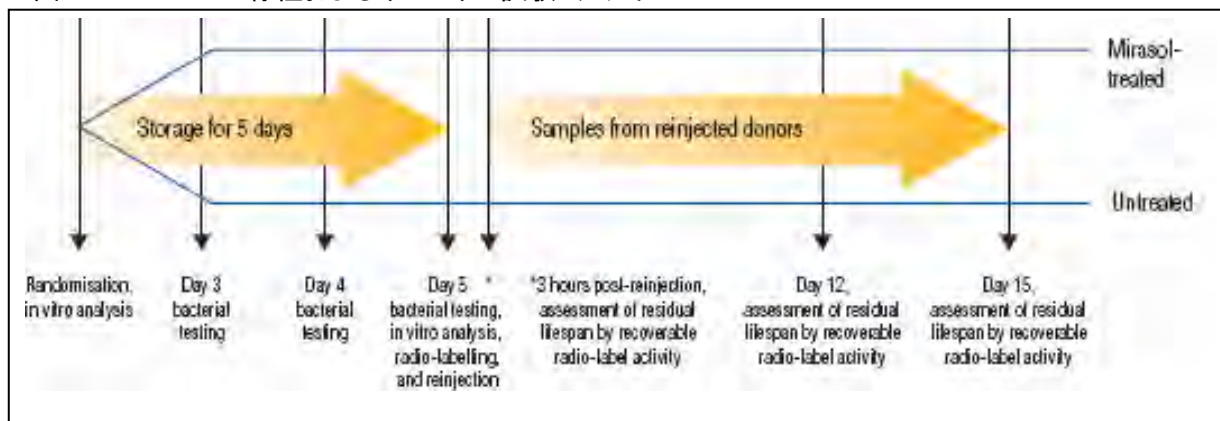
SD: 標準偏差。

表 4. 血小板のミトコンドリアに対する Mirasol 処理の即時的効果

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

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

図 5. In vivoの生存性およびリカバリー試験：デザイン¹



その結果から以下のことが明らかとなった。

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

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

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

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

表 5. 放射標識試験の結果

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

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

臨床試験の結果

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

図 6A~E. In vitro 分析の結果

要約

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

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

