

平成20年5月23日
血液事業部会運営委員会・安全技術
調査会合同委員会提出資料

参考資料4 (BCT Japan株式会社)

MIRASOL®

病原体不活化技術：

Mirasol PRT システム

A Novel Approach to Blood Safety

前書き

海外旅行の増加は、通常的生活環境を越えて病原体の広まりを生じさせている。例えば、FDA がシャーガス病に対する初めてのスクリーニング検査を認可してから 10 ヶ月で、米国で採血された 241 件の血液はクルーズ・トリパノソーマに対し陽性であり、献血者が病原体に晒されたことを示唆していた。これは、西ナイル・ウィルスなどの新しい病原体の出現と共に、血液供給の安全性に対するリスクの増大を示している。

人々は、当然、感染症リスクの高い輸血は受けたくないと要求する。それにより、病原体不活化技術などのより改善された血液安全対策の実施に、政府と行政当局側が積極的に資金を提供するよう促している。

Gambro BCT の完全所有子会社である Navigant Biotechnologies LLC 社は、献血血液製剤の質を改善する仕事が委託されている。Navigant Biotechnologies LLC 社によって開発された Mirasol®PRT 装置は、献血血液製剤中の病原体と残存白血球を不活化するためにリボフラビンと紫外線を利用している。この装置は広範囲において試験され、信頼できる機関によって科学的に実証されている。新しい病原体が血液供給中に導入されることは無く、処理過程は安全、簡単、効果的である。

本論文より、Mirasol PRT 装置の安全性と有効性を担保する重要なデータの概観を示す。

目次

- 第 1 章：病原体不活化に関する背景：技術とドライバー
- 第 2 章：Mirasol：プロセス
- 第 3 章：Mirasol による処理の安全面
- 第 4 章：病原体不活化の性能
- 第 5 章：病原体不活化技術（Mirasol PRT）による白血球の不活化
- 第 6 章：Mirasol 処理した血小板製剤の品質
- 第 7 章：Mirasol 処理した血漿の品質
- 第 8 章：臨床試験と将来における製品開発
- 第 9 章：血液の安全性にかかるコスト

第 1 章

病原体不活化に関する背景情報：技術とドライバー

MIRASOL®

病原体不活化技術

病原体不活化に関する背景：技術とドライバー

Mirasol病原体不活化技術(PRT)装置は、輸血用の献血血液成分中の病原体負荷を減らし、残存白血球の不活化を意図して設計されている。本Mirasol装置は紫外線(UV)とリボフラビン(ビタミンB2)に基づく技術を応用している。血小板用のMirasol PRT装置はCEマークを受け、市場導入された最初のMirasol製品である。同じ技術は、現在、血漿と白血球適用に向けて開発中である。

Mirasol PRT 装置

血小板用の Mirasol PRT 装置は、再使用可能な照射器、および滅菌リボフラビン溶液バッグと滅菌照射・保存バッグを含むディスプレイセットからなる。処理の間、血液成分は照射・保存バッグに送られ、リボフラビン溶液が添加された後、照射器に移される。照射器は、マイクロプロセッサ制御式の電気機械装置であり、照射及び、血小板成分とリボフラビンの混合を調整する。照射器はまた、血小板の質が確実に維持されるように温度をモニターし調整する。照射中、血液成分は、その量にもよるが、約 6 分間から 10 分間紫外線にさらされるが、照射中の光エネルギーは 6.2 J/mL である。照射完了後、処理した血液成分は保存され、血液バンクにより管理される。

血液の安全性の簡単な歴史

歴史的に、輸血関連の肝炎のリスクはずっと以前から分かっていたことだが、ヒト免疫不全ウイルス(HIV)の出現までは、厳しい血液の安全対策が導入されることはなかった。1981年のエイズの最初の症例の発症から数年以内に、この疾患は血液由来のウイルスが病因であることが明らかになったが、その時すでに数千人の人々が感染していた。血友病患者は、第Ⅷ因子製剤(当時は数 1,000 単位のヒト血漿を貯留して製造していた)の定期的な注射が必要であったことから、特に大きな被害を受け、米国の多数の血友病患者が HIV に感染した。

HIV の最初の血清(抗体)検査は 1985 年血液バンクによって実施されたが、献血血液や血液成分に未知の病原体が混入しているかもしれないという知識は輸血の安全性に対する態度を著しく変化させた。これらの懸念に対処するため、輸血業務では様々な方法が用いられている。

HIV 感染は、血液に由来する病原体からの血液成分の危険性を際立たせた。

血液供給の安全性の向上のための現在のアプローチ

献血者の選択

献血者の選択は、通常、血液バンクのスタッフによる面接や質問表に基づいており、伝染性病原体のキャリアーであるリスクが高い人(例えば高リスクの性的行為を行った人、静

脈麻薬を使用した人、マラリアなどの風土病が流行する地域へ旅行し、検査を受けていない人)からの献血を受け付けないことを目的としている。

過去 20 年間、この献血者の選択は汚染献血件数を減らすのに最も有効な手段であった。しかし、この方法は、献血者が除外基準を無視したり理解できないようであれば役に立たない。

血清検査と核酸増幅テスト

次の防御方法は、血清検査および／または核酸増幅テスト(NAT)による病原体についての献血血液の検査である。血清検査のルーチン使用は輸血による HIV 感染症の発症率を有意に減少させた。1990 年代後半での NAT の導入はさらに検査の精度を向上させ、潜伏期間(感染してから、検出可能な抗体またはウィルスマーカーの出現までの時間)を 22 日から 13-15 日に減少させた。しかし、検査により実質的にリスクは減少したものの、特に複数回輸血を受けた患者の、輸血を介した感染症など限定的リスクは、依然として存在する。

細菌検出

ウィルスの脅威にさらされる危険性があるにもかかわらず、(先進国における)輸血による最大の伝染性疾患リスクに細菌性敗血症がある。血小板および赤血球の細菌汚染の発生率は輸血血液 3,000 単位当たりで約 1 単位であり、また 25,000 回の血小板輸血当たり約 1 回、25,000 回の赤血球輸血当たり 1 回は、輸血に関連した敗血症を発症している。現在までに行われた、骨髄移植を受けた患者の血小板輸血に関する唯一のプロスペクティブ研究は、16 人中 1 人、輸血症例 350 症例中 1 症例、血小板 2000 単位中 1 単位に症候性菌血症のリスクがあったことを示した。これらの発症頻度は、毎年米国だけで 9 百万単位以上の血小板濃厚液が輸血されていることを考えると、無視できない値である。このリスクを減らすためには様々な手段、細菌感染のリスクを考慮するような献血者選択基準を修正することや、採取した血液の処理段階および白血球不活化処理の最中に、一般向けおよび特定対象向けに衛生対策を実施することが含まれる。しかし、細菌性敗血症のリスクを減じる目的で最も広く適用されている方法は細菌検出であり、この方法によって血小板製剤は、検査結果が陰性であるということに基づき、市場に供給される。

白血球不活化

多数の国で実施されている一般的な白血球不活化処理の適用は、輸血の安全性に大きな影響を与え、ヒト白血球抗原(HLA)免疫化の発症率と患者の有害反応の発症率を劇的に減少させた。さらに、これにより細胞由来感染性病原体の伝染を減らしている。

ガンマ線照射

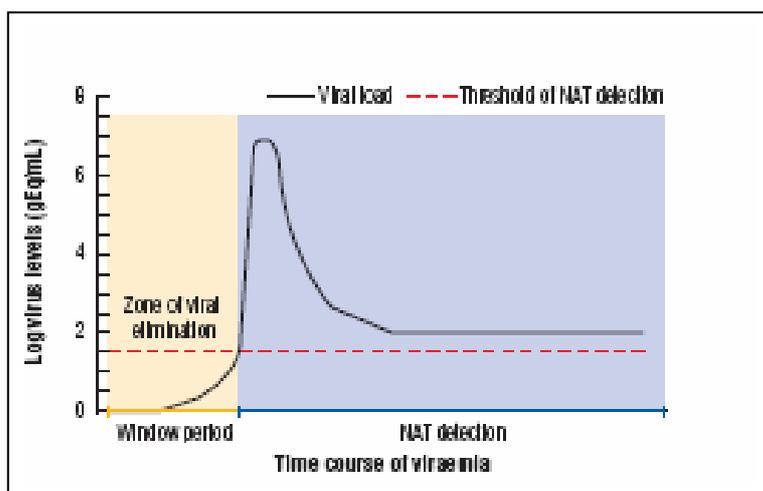
ガンマ線照射は、稀ではあるが、非常に重度の輸血合併症（例えば、同種造血幹細胞移植レシピエントなどの重度免疫障害患者で見られるが、HLA 単一同一血液成分を投与された非免疫障害患者の一部にも生じる免疫輸血関連移植片対宿主病(TA-GVHD)) を予防するのに適用されている。

血液の安全性の満たされていない要求

血液の安全性に対する現在の重層化介入アプローチは、血液成分のウィルス汚染のリスクを顕著に減少させた。しかし、細菌汚染のリスクと新しい病原体の予期せぬ出現は、未だに主要な懸念事項である。スクリーニングと検査では潜在的なヒト病原体を全て除外することはできない。血液供給の安全性を向上させるために積極的な対策を講じることが必要である。

現在の血液の安全性手順により血液と血液製剤はより安全なものとなってきたが、リスクはまだ存在している。

図 1. 核酸増幅検査 (NAT) の有用性と限界



核酸増幅テストの限界

輸血による感染症の全体的リスクは低いですが、有意なリスクはまだ存在している。血清学的検査は3週間以上の潜伏期間のために限界がある。NATはこのリスク期間を減らしたが、それを取り除いたわけではない(図1参照)。さらに、NATは少量の病原体でさえ検出することができるが、それは特異的な病原体に対してのみである。HIV、B型肝炎ウィルス(HBV)、C型肝炎ウィルス(HCV)などの良く知られたウィルスはルーチンに検査されているが、一連の検査に挙げられていないウィルスのリスクについて検査することは不可能である。新し

い検査法を開発することは、費用がかかり時間が要る。例えば、新しい病原体の確認から適切な検査のルーチン化までには3年かかる。さらに、検査がもっと迅速に開発できても、早期の低ウイルス負荷のウイルスはまだ検出できないかもしれない。NATは費用がかかり、比較的裕福な西洋諸国でもその費用効果性に関してまだ議論の余地がある。

新しく出現した病原体と未知の病原体のリスク

血液バンクは、血液供給の安全性に対するリスクの出現・再出現について益々慎重になってきているが、検査は、事前の策を講じるのではなく、事後の処理であり、未知の病原体を検査することは不可能である。新しい病原体が確認される時までには、血液供給がすでに汚染されてしまっているかもしれない。残念ながら、そのような病原体は多くある。西ナイル・ウイルス(WNV)、クルーズ・トリパノソーマ、プラスモジウム spp、バベシア spp、パルボ・ウイルス B19、デングウイルス、変異型クロイツフェルト・ヤコブ病(vCJD)の病因となるプリオンが含まれる。ヒト・ヘルペス・ウイルス 8 (カポシ肉腫)、ボレリア(ライム病)、鳥インフルエンザ・ウイルスなどの他の病原体も輸血で伝染するかもしれない。

新たな病原体の危険性は、蚊由来のウイルスの顕著な地理的な広がりによって説明されている。米国で WNV によって生じた重度の神経学的疾患の発生はよく知られているが、それに加えて、以前アフリカやアジアでのみ生じたチキングニアウイルスがイタリアで 2007 年 9 月、突発的に発生した。血液供給経路に侵入する新生病原体や再出現病原のリスクを最小限にするために、新しい積極的な対策が必要である。

細菌検査の限界

細菌検査も完全であると言えるにはほど遠い。最初に陰性を検査する血小板の培養は、長期保存で陽性を検査できるが、それは細菌のスクリーニングが輸血由来の全ての細菌感染症を防げるわけではないことを示している。細菌検出法は血小板単位の検査合格リリースの遅れと保存期限の短縮を生じさせ、結果的に期限切れの率を増加させている。さらに、血液成分の細菌検査が陽性である場合、それはしばしばすでにリリースされて輸血されてしまっている。偽陰性の血小板もまだ生じており、致命的な敗血症の発症の原因になっている。

白血球に対する挑戦

白血球不活化法は、残存白血球と関連合併症のリスクを完全には取り除くことはできず、サイトメガロウイルス(CMV)とヒトT細胞好リンパ球ウイルス(HTLV)などの細胞関連ウイルスや潜在的に致命的な免疫輸血関連移植片対宿主病(TA-GVHD)からのリスクに抵抗力の無い患者をさらしてしまう。

血液の安全性を向上させるため、より良い技術が早急に必要である。

病原体不活化技術の見込み

病原体不活化は、血液成分輸血の安全性の向上に対する別の方法である。病原体不活化の優位性は溶剤洗浄処理の血漿分画の処理で示されてきた。しかし、この特別の処理はエンベロープを持たないウイルス（A型肝炎ウイルスなど）には効果が無い。既知及び未知の病原体に対する広範囲に有効な病原体不活化処理は、血液の安全性の現在と将来の要求を満たすだろう。しかし、血液の安全性の向上には相当の代償を払う必要がある。PRT 技術の適用に要する費用には、ハードウェアと必要物品、他のバッグへの移し変えと混合物吸収装置の除去処理による血液成分抽出減少の可能性、より少ない修正カウント増加(CCI)や血漿タンパクで観察される成分の質、臨床的効果（より高い耐熱性や赤血球利用）への出費が含まれる。PRT 技術を適用する前に、この装置の性能と対費用効果は、特定の PRT 技術を適用することの全体的有益性が全般的経費を確実に超えないようにするために評価されなければならない（第 9 章参照）。

病原体不活化技術は、現在と将来の病原体への危険に対する保護となることによって血液供給の安全性をさらに増強し得る。

要約

- HIV 感染症は、血液由来病原体からの血液成分への危険性を際立たせた。
- 現在の血液安全性手順により血液と血液成分はより安全なものになってきたが、リスクはまだ存在している。
- 血液の安全性を向上させるため、より良い技術が早急に必要である。
 - － NAT は全潜伏期間をなくす事ができない（異なる検査法には同じウイルスについて異なる潜伏期間がある）。
 - － 新生病原体はいつも危険となる。
 - － 細菌検査は細菌感染症の伝染を防ぐのに 100%効果があるわけではない。
 - － 残存白血球はまだ重度の有害反応を生じ得る。
- 病原体不活化技術は、現在及び将来の危険に対する保護となることによって血液供給の安全性をさらに増強し得る。

References

1. Brookmeyer R, Goedert JJ. Censoring in an epidemic with an application to hemophilia-associated AIDS. *Biometrics*. 1989;45:325–335.
2. Janatpour KA, Holland PV: A brief history of blood transfusion. In: Hillyer CD, Silberstein LE, Ness PM, et al., eds. *Blood Banking and Transfusion Medicine Basic Principles and Practice*. 2nd ed. Philadelphia, PA: Churchill Livingstone Elsevier, 2007:3–11.
3. Hervig T. Where will pathogen inactivation have the greatest impact? *ISBT Science Series*. 2007;2:25–29.
4. Chamberland ME. Emerging infectious agents: do they pose a risk to the safety of transfused blood and blood products? *Clin Infect Dis*. 2002;34:797–805.
5. Soldan K, Barbara J. The risks of infection transmission by blood transfusions in England. *J Clin Pathol*. 1999;52:405–408.
6. Blajchman MA, Beckers EA, Dickmeiss E, et al. Bacterial detection of platelets: current problems and possible resolutions. *Transfus Med Rev*. 2005;19:259–272.
7. Chiu EKW, Yuen KY, Lie AKW, et al. A prospective study of symptomatic bacteremia following platelet transfusion and of its management. *Transfusion*. 1994;34:960–964.
8. Sullivan MT, McCullough J, Schreiber GB, Wallace EL. Blood collection and transfusion in the United States in 1997. *Transfusion*. 2002;42:1253–1260.
9. Andreu G, Morel P, Forestier F, et al. Haemovigilance network in France: organization and analysis of immediate transfusion incident reports from 1994 to 1998. *Transfusion*. 2002;42:1356–1364.
10. The Trial to Reduce Alloimmunization to Platelets Study Group. Leukocyte reduction and ultraviolet B irradiation of platelets to prevent alloimmunization and refractoriness to platelet transfusions. *N Engl J Med*. 1997;337:1861–1869.
11. Andreu G, Dewailly J. Prevention of HLA alloimmunization by using leukocyte-depleted components. *Curr Stud Hematol Blood Transfus*. 1994;60:29–40.
12. Anderson NA, Gray S, Copplestone JA, et al. A prospective randomized study of three types of platelet concentrates in patients with haematological malignancy: corrected platelet increments and frequency of non haemolytic febrile transfusion reactions. *Transfus Med*. 1997;7:33–39.
13. Enright H, Davis K, Gernsheimer T, et al. Factors influencing moderate to severe reactions to PLT transfusions: experience of the TRAP multicenter clinical trial. *Transfusion*. 2003;43:1545–1552.
14. Thaler M, Shamiss A, Orgad S, et al. The role of the blood from HLA-homozygous donors in fatal transfusion associated graft-versus-host disease after open heart surgery. *N Engl J Med*. 1989;321:25–28.
15. Wagner FF, Flegel WA. Transfusion-associated graft-versus host disease: risk due to homozygous HLA haplotypes. *Transfusion*. 1995;35:284–291.
16. Seghatchian J, de Sousa G. Pathogen-reduction systems for blood components: the current position and future trends. *Transfus Apher Sci*. 2006;35:189–196.
17. Pelletier JPR, Transue S, Snyder EL. Pathogen inactivation techniques. *Best Pract Res Clin Haematol*. 2006;19:205–242.
18. Moeremans K, Warie H, Annemans L. Assessment of the economic value of the INTERCEPT blood system in Belgium. *Transfus Med*. 2006;16:17–30.
19. Weusten JJ, Van Drimmelen HA, Lelie PN. Mathematic modeling of the risk of HBV, HCV, and HIV transmission by window-phase donations not detected by NAT. *Transfusion*. 2002;42:537–548.
20. Alter HJ, Stramer SL, Dodd RY. Emerging infectious diseases that threaten the blood supply. *Semin Hematol*. 2007;44:32–41.
21. Watson R. Europe witnesses first local transmission of chikungunya fever in Italy. *BMJ*. 2007;335:532–533.
22. Eder AF, Kennedy JM, Dy BA, et al. American Red Cross Regional Blood Centers. Bacterial screening of apheresis platelets and the residual risk of septic transfusion reactions: the American Red Cross experience (2004–2006). *Transfusion*. 2007;47:1134–1142.
23. Akahoshi M, Takanashi 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.
24. Visconti MR, Pennington J, Garner SF, et al. Assessment of removal of human cytomegalovirus from blood components by leucocyte depletion filters using real-time quantitative PCR. *Blood*. 2004;103:1137–1139.
25. Pennington J, Taylor GP, Sutherland J, et al. Persistence of HTLV-I in blood components after leukocyte depletion. *Blood*. 2002;100:677–681.
26. Roberts P. Resistance of vaccinia virus to inactivation by solvent detergent treatment of blood products. *Biologicals*. 2000;28:29–32.

第 2 章

Mirasol : プロセス

MIRASOL®

病原体不活化技術

Mirasol : プロセス

Mirasol 病原体不活化技術 (PRT) は、光と自然界に存在するリボフラビン (ビタミン B2) を用いて血液製剤中の病原体を除去し、白血球を不活化する技術である。リボフラビンは紫外線下で核酸と反応し、不可逆的な変化を引き起こす光増感剤として用いられる。なお、リボフラビンは薬剤ではなく、薬用効果を意図して導入される訳ではない。本技術は 40 年以上もの研究を経て開発されたものであり、化学、毒物学、体外および体内でのリボフラビンの核酸への光増感反応に関する膨大なデータ蓄積に基づいている。

リボフラビン

人体における役割

リボフラビンは人体に不可欠な栄養素で、牛乳、卵、パン、葉野菜など、多くの食材に含まれている (図 1)。平均的な成人の 1 日当たり推奨摂取量は 1.3 mg [男性] / 1.1 mg [女性] (授乳中の女性は最大で 1.6 mg)。そうした栄養価と毒性に関する網羅的データの蓄積も、血液製剤への利用にとって好都合である。

リボフラビンは、数多くの生化学反応に係る重要なコエンザイムの前駆体となっている。遺伝毒性が無いことは体外で実証済みで、米国食品医薬品局 (FDA) により「一般に安全と認められる物質 (GRAS 物質)」に分類されている。

リボフラビンは人体の生化学プロセスにおいて重要な役割を果たす、必須ビタミンである。

リボフラビンの光化学反応

リボフラビンの光増感性が最初に発見されたのは 1932 年、Warburg 博士と Christian 博士による。リボフラビンによる核酸の光増感反応は 1976 年、Speck 博士らにより提唱された。可視光・紫外線下でのリボフラビン使用によるウィルスとバクテリアの不活化は、1960 年代と 1970 年代の研究により有効性が示唆されたが、さらに 1980 年代の研究によって、病原体除去、光増感剤反応、光活性化時の核酸融合・分解におけるリボフラビンの可能性が実証された。

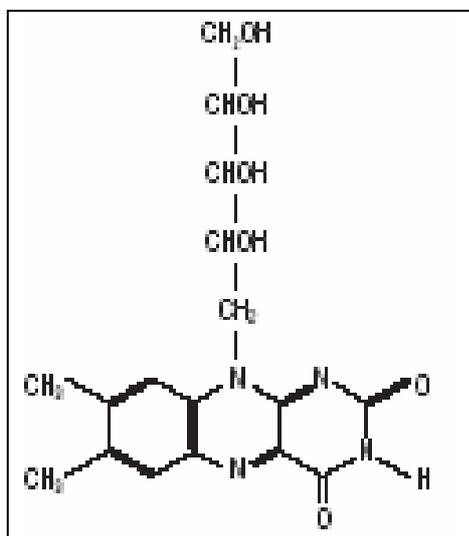


図 1. リボフラビン(ビタミン B2) 必須栄養素

リボフラビンの中性水溶液に自然光を当てると、リボフラビンはルミクロム (LC) に変化する。LC は人体におけるリボフラビン代謝分解物としても知られている。フラビン体の光分解生成物はすべて特定済みで、自然界におけるリボフラビン酵素分解の代謝産物の特色も特定されている。さらに、リボフラビンの光分解生成物 (主に 2'-キトフラビン、4'-キトフラビン、フォルミルメチルフラビン、LC の 4 つ) はすべて通常の代謝産物であり、未処理のアフェレーシス血小板にも含まれている。リボフラビンの代謝産物となり得るルミフラビン等は人体における通常の pH 環境では発生しない。

Mirasol PRT は 40 年以上もの研究成果に基づいて開発された技術である。

リボフラビンは 30 年以上も前から新生児黄疸の光線療法に用いられてきた。新生児に光を当てることで、黄疸の原因となるビリルビンを分解するだけでなく、新生児の血中に元から存在するリボフラビンを分解する療法であるが、臨床時における副作用の報告はこれまでもなく、治療後 9 年の経過を見たレトロスペクティブ分析でも問題は報告されていない。

現時点で商品化されている不活化システムの幾つかは、有害の可能性のある光増感物質を除去するための吸収装置 (CAD) を必要とする。それに対し、安全性が確立されたリボフラビンの場合、その光分解生成物も未処理の血液サンプル中に通常に存在するようなものであるため、処理後の血液製剤からこれらを除去・吸収することなく、そのまま投与することができる。

Mirasol 処理後の血液製剤は、リボフラビンとその光分解生成物を除去せずに投与できる。
†

反応メカニズム

Mirasol PRT システムは照射器 (および付属部品) とディスポーザブルの照射/保存キットから成る。ディスポーザブルキットは 35 ミリリットルのリボフラビン溶液と照射/保存用袋が付いている (図 2)。いずれも滅菌処理済である。

Mirasol プロセスでは、まず血液製剤にリボフラビンを混合した後に、265~370 nm 波長域の紫外線に短時間 (通常 10 分未満) さらす。紫外線照射により、DNA と RNA の複製を妨げる化学反応が起き、そうしてウィルス、バクテリア、その他真核細胞 (例えば、白血球) が不活化される。ゲノム核酸を持たない赤血球、血小板、血漿は影響を受けない。

リボフラビンと紫外線による核酸分解は、2 つの異なるメカニズムを通じて起きる (図 3)。

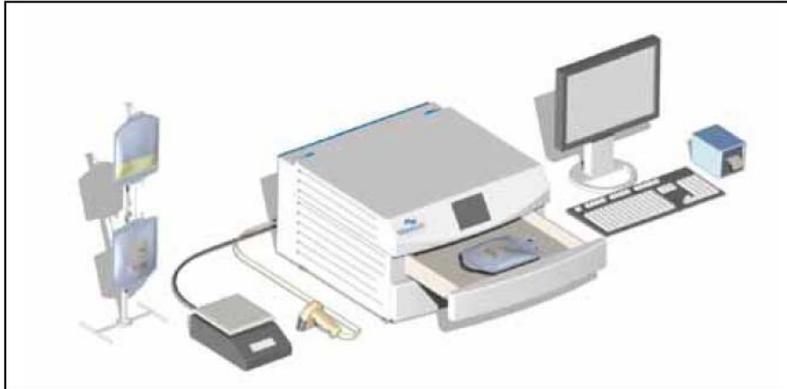


図 2. Mirasol PRT システム

主要部品:(A) 照射器、(B) 照射／保存用袋、リボフラビン溶液

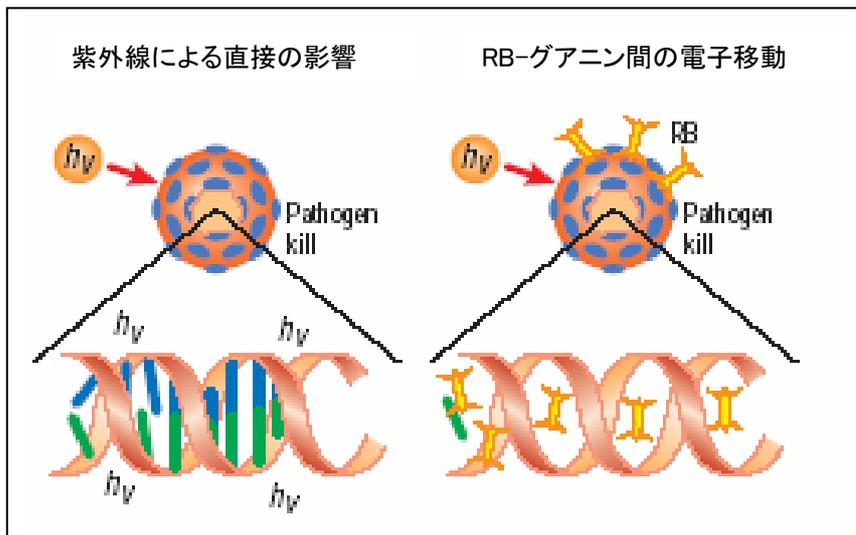
付属部品:(C) バーコード・リーダー、(D) 計り、(E) Mirasol システム管理用 PC、
(F) ラベル・プリンター

2つのメカニズムとは、

- ・ 紫外線独自の DNA 損傷効果
- ・ 光励起リボフラビンと核酸塩基対との接触による電子移動反応

Mirasol RPT は 2 つの異なるメカニズムによって病原体を不活化する。

図 3. Mirasol PRT システムの 2 つの主な反応



低波長光線の吸収によって、血液製剤中のウイルス、バクテリア、寄生物、白血球の核核酸が損傷する。

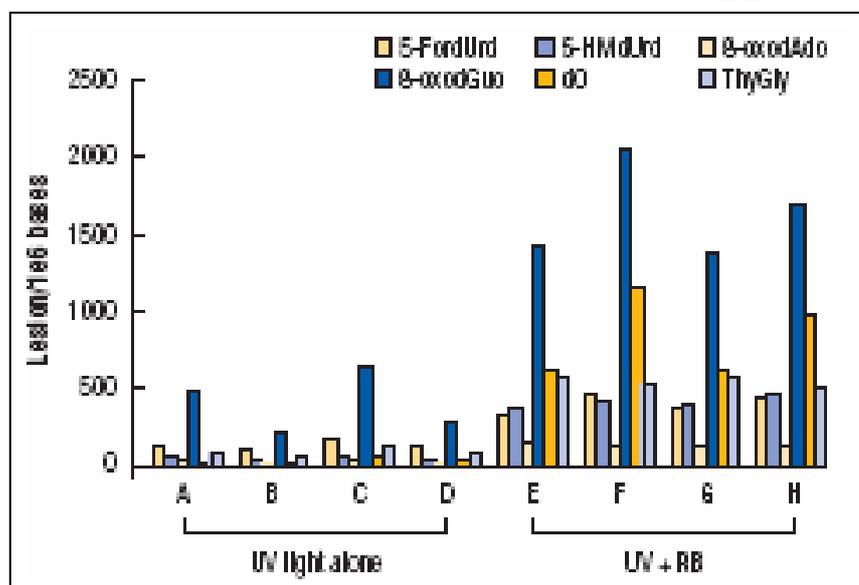
さらにリボフラビンと核酸との化学反応では、リボフラビン-グアニン間の電子移動反応によって、不可逆的な損傷が引き起こされる。

RB: リボフラビン UV: 紫外線

リボフラビン（ビタミンB2）は光照射によって活性酸素種が発生する可能性もあるが、それは非特異的反応であるため望ましくない。Mirasol システムでは、処理前に袋を真空状態にし、未結合ではなく結合した状態でリボフラビンを活性化させる波長の光を選択することでこれを防ぐことができる。

リボフラビンは、塩基対（主にグアニン塩基対）の不可逆的な変形を引き起こすことで病原体の複製を阻止する。また、インターカレーション（挿入）等によって核酸と結合することも知られている。さらに、I型、II型の光化学反応のいずれでもDNA連鎖を切断することが実証されている。

図 4. 紫外線のみを使った場合とリボフラビンを併用した場合の塩基損傷



各棒グラフは個別実験の数値。損傷のパターンは似ているが、リボフラビンを併用することで損傷数が大幅に増えていることがわかる。
RB:リボフラビン UV:紫外線

つまり、本システムにおけるリボフラビン使用は、紫外線独自の滅菌効果を増強するだけでなく、病原体が紫外線の影響をより受けるような素地を作る効果（光増感効果）をもたらす。それによって、紫外線のみを使用した場合より多くの塩基損傷を引き起こし、またその損傷を不可逆的なものにする。紫外線のみの場合、損傷の一部はDNAの修復メカニズムにより無効化される。それに対し、2つのメカニズムを組み合わせたMirasol PRTシステムは、広範的かつ徹底的な病原体除去を可能にする（図4）。

さらに、リボフラビンの光増感反応による微生物核酸の変性度合いについて検証を重ね、23リボフラビンと光線への暴露がウイルス、バクテリア、寄生生物、白血球に及ぼす影響を評価した（第4章と第5章を参照）。

光増感剤としてリボフラビンを使用することで、紫外線のみを使った場合と比べて、より多くの不可逆的な塩基損傷を引き起こすことが出来る。不可逆的な塩基損傷は病原体を確実に死滅させる上で重要である。

要約

- ・ Mirasol PRT システムはリボフラビンと紫外線を用いる
- ・ リボフラビンは人体の生化学反応において重要な役割を果たす、必須ビタミンである
- ・ Mirasol PRT は 40 年以上もの研究成果を基に開発された
- ・ Mirasol 処理後の血液製剤は、リボフラビンとその光分解生成物を除去せずに投与できる
- ・ Mirasol RPT は 2 つの異なるメカニズムによって病原体を不活化する
- ・ 光増感剤としてリボフラビンを使用することで、紫外線のみを使った場合と比べて、より多くの不可逆的な塩基損傷を引き起こすことが出来る
- ・ 不可逆的な塩基損傷は病原体を確実に死滅させる上で重要である

† Mirasol PRT System for Platelets に対する現行の CE マーク規格認定による。

References

1. Kumar V, Lockerbie O, Keil SD, et al. Riboflavin and UV-light based pathogen reduction: extent and consequence of DNA damage at the molecular level. *Photochem Photobiol.* 2004;80:15–21.
2. World Health Organization. Thiamine, riboflavin, niacin, vitamin B6, pantothenic acid, and biotin. In: *Vitamin and Mineral Requirements in Human Nutrition*. 2nd ed. 2004:Section 9.3.5;172.
3. Scientific Committee for Food (SCF) (2000). Tolerable upper intake level of vitamin B2. (Opinion expressed on 22 November 2000.)
4. Rivlin SR. Riboflavin metabolism. *N Engl J Med.* 1970;283:463–472.
5. Kale H, Hanikumar P, Nair PM, Netrawali MS. Assessment of the genotoxic potential of riboflavin and lumiflavin. *Mutat Res.* 1992;298:9–16.
6. United States Food and Drug Administration (FDA) Center for Food Safety and Applied Nutrition (CFSAN) Priority-based Assessment of Food Additives (PAFA). EAFUS: A Food Additive Database. Available at: <http://vm.cfsan.fda.gov/~7Edms/efalus.html> Accessed November 2007.
7. Warburg VO, Christian W. Über das neue Oxydationsfenment. *Naturwissenschaften.* 1932;20:980–981.
8. Speck WT, Rosenkranz S, Rosenkranz HS. Further observations on the photo-oxidation of DNA in the presence of riboflavin. *Biochim Biophys Acta.* 1976;435:39–44.
9. Oster G, Bellin JS, Holmstrom B, et al. Photochemistry of riboflavin. *Experientia.* 1962;18:249–253.
10. Tsugita A, Okada Y, Uehara K. Photosensitized inactivation of ribonucleic acids in the presence of riboflavin. *Biochim Biophys Acta.* 1965;103:360–363.
11. Speck WT, Chen CC, Rosenkranz HS. In vitro studies of effects of light and riboflavin on DNA and HeLa cells. *Pediatr Res.* 1975;9:150–153.
12. Kuratomi K, Kobayashi Y. Studies on the interactions between DNA and flavins. *Biochim Biophys Acta.* 1977;476:207–217.
13. Korycka-Dahl M, Richardson T. Photodegradation of DNA with fluorescent light in the presence of riboflavin and photoprotection by flavin triplet-state quenchers. *Biochim Biophys Acta.* 1980;610:229–230.
14. Cairns WL, Metzler DE. Photochemical degradation of flavins. VI. A new photoproduct and its use in studying the photolytic mechanism. *J Am Chem Soc.* 1971;93:2772–2777.
15. Hardwick CC, Herivel TR, Hernandez SC, et al. Separation, identification and quantification of riboflavin and its photoproducts in blood products using high-performance liquid chromatography with fluorescence detection: a method to support pathogen reduction technology. *Photochem Photobiol.* 2004;80:609–615.
16. Sisson TR. Photodegradation of riboflavin in neonates. *Federation Proc.* 1987;46:1883–1885.
17. Olsen JH, Hertz H, Kjaer SK, et al. Childhood leukemia following phototherapy for neonatal hyperbilirubinemia (Denmark). *Cancer Causes Control.* 1996;7:411–414.
18. Goodrich RP, Edrich RA, Goodrich LL, et al. The antiviral and antibacterial properties of riboflavin and light: applications to blood safety and transfusion medicine. In: *Comprehensive Series in Photochemical & Photobiological Sciences.* 2006;6:83–113.
19. Martin CB, Willong E, Ruane P, et al. An action spectrum of the riboflavin-photosensitized inactivation of lambda phage. *Photochem Photobiol.* 2005;81:474–480.
20. Dardare N, Platz MS. Binding affinities of commonly employed sensitizers of viral inactivation. *Photochem Photobiol.* 2002;75:561–564.
21. Joshi PC. Ultraviolet radiation-induced photodegradation and 1O_2 , O_2^- production by riboflavin, lumichrome and lumiflavin. *Indian J Biochem Biophys.* 1989;26:186–189.
22. Data on file. Navigant Biotechnologies LLC.
23. Goodrich RP, Edrich RA, Li J, et al. The Mirasol™ PRT system for pathogen reduction of platelets and plasma: an overview of current status and future trends. *Transfus Apher Sci.* 2006;35:5–17.

第3章

Mirasol による処理の安全面

MIRASOL®

病原体不活化技術

Mirasol による処理の安全面

血液に関する新しい安全技術に対する包括的な毒物学的評価は、その安全技術が輸血プロセスに悪影響を与えないことを実証するために不可欠である。そのため、Mirasol による処理は広範囲にわたって検査されている。紫外線に関連したリボフラビンの利用に関する大量の史料に加え、広範囲にわたる毒物学的検査によって血液成分の光化学処理の安全性が裏付けられている。

治療分野におけるリボフラビンのアプリケーション

必要不可欠なビタミンとしてのリボフラビン

リボフラビン（ビタミン B2）は 13 種類の必須ビタミンのうちの 1 つで、栄養補助食品および認可を受けた食品着色料として幅広く使用されている。リボフラビンは、欧州食品科学委員会（European Scientific Committee on Food¹）により認可されており、米国食品医薬品局（United States Food and Drug Administration）により GRAS（Generally Recognized as Safe: 一般に安全であると認められる）に分類されている。リボフラビンの RDI（Recommended Daily Intake: 1 日当たりの推奨摂取量）は、平均的な成人の場合約 1.3 mg/日（男性）および約 1.1 mg/日（女性）で、授乳中の女性の場合は最大 1.6 mg/日である。リボフラビン欠乏症に対する推奨薬用量は、平均的な成人の場合 ≤ 30 mg/日。リボフラビンの安全性は、経口投与、皮下投与、腹腔内投与および静脈内投与において実証されている。

新生児黄疸の治療におけるリボフラビン

リボフラビンおよびビリルビンの光吸収スペクトルがオーバーラップするため、光線療法が促進するビリルビンの除去により新生児黄疸の新生児が一時的にリボフラビン欠乏症になる可能性がある。そのため、1970 年代までは、このように体の弱い病人には光線療法を受けている間はリボフラビンを投与することが推奨されていた。

リボフラビンおよび新生児に対する直接光線療法の毒性に関する可能性について解説されてきたが（光の存在する場で発生する可能性のある DNA への作用に関する理論的な考察および簡略化された試験管内検査システムにおける実験結果に基づく）、臨床的環境における副作用（AE）のレポートはまだない。しかし実際に、光線療法を受けた 55,000 人を超える幼児に関する大規模な遡及的分析により、平均 9 年間の追跡調査期間における小児白血病の発生率が過剰ではないということが証明され、リボフラビンの投与は、広範囲にわたる臨床治療で利用されている。

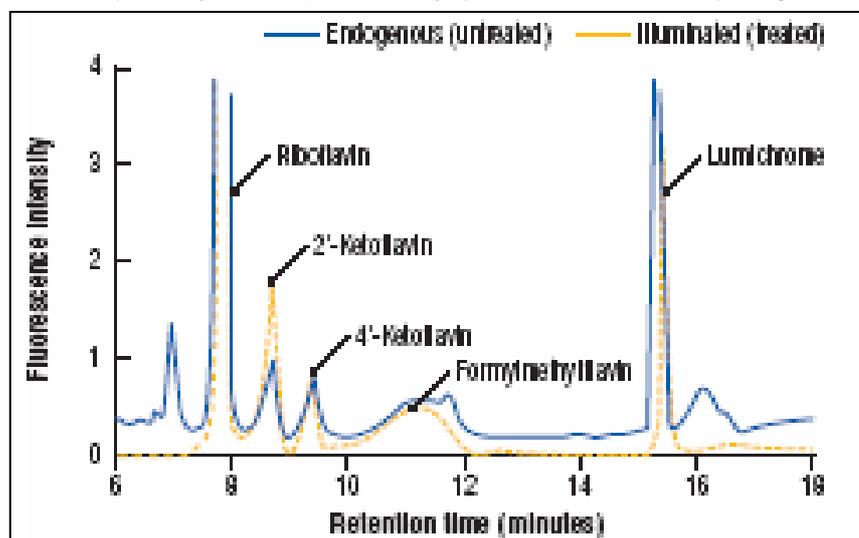
リボフラビンの安全性は、体の弱い人々に対する使用など、長年にわたる経験を通じて最終的に証明された。

リボフラビンの光化学

添加剤を利用した血液に関する新技術の導入における重大な懸念事項は、その添加物を輸血用血液に入れることによる副作用の可能性である。理論上は、添加剤がもたらすリスクが状況によっては血液成分により病気感染が発生するリスクを上回る可能性もある。Mirasol 処理で利用される添加剤は、自然に発生する物質であるリボフラビンであり、リボフラビンは、安全であると知られているにもかかわらず、光の照射を受けて多くの光化学反応の生成物へと薄められ、これらの生成物も輸血用血液に入れられる可能性がある。リボフラビンの 4 つの主要な光化学反応生成物（2'-ケトフラビン、4'-ケトフラビン、フォルミルメチルフラビンおよびルミクロム）は、分離され、その特性を示す。これらは主に親モジュールにおけるリビチル側鎖の分解を通じて形成される。光化学反応の生成物はそれぞれ標準的な代謝産物であり、各生成物は未処理のアフェレーシス血小板から検出される。

献血されたばかりで照射されていない血液成分にこれらの光化学反応の生成物が存在するという事実は、リボフラビンを基盤とする病原体不活化処理の利用によって輸血用血液に新たな化学物質が取り入れることはないということを示している（図 1 参照）。さらに、これらの生成物はすべて人間の血液からなる天然成分であるため、Mirasol 処理後にそれらを血液成分から取り除く必要はないということに注意することが重要である。

図 1. 処理済の血液および未処理の血液中のリボフラビンおよび光化学反応の生成物



未処理の血小板におけるこれらの生成物の濃度は Mirasol 処理済血小板の濃度よりも低いですが、処理済血液成分の濃度は患者の血流に注入される際に 16~20 倍薄められ、循環血液中ですべて自然発生したものに対して処理済の血小板の濃度を著しく減少させる。さらに別の光化学反応生成物であるルミフラビンが形成される可能性についても、懸念されてきた。これ

は非常に高い（非生理学的な）pH（9-3）、言い換えれば標準的な血液および血液成分の pH をはるかに超える pH 値においてのみ形成される。

ルミフラビンによりもたらされたリボフラビンの遺伝的な作用の可能性に関するレポートがあるが、これはその後の調査において再現されていない（広範囲にわたる毒物学的なデータベースの研究に基づく）。さらに、ルミフラビンは一般に普及している食品にも見られる。Mirasol 処理の毒性評価中に、ルミフラビンの活性調査は陰性だった。高性能液体クロマトグラフィー（HPLC）または質量分析法のいずれにおいても、血液成分からルミフラビンは検出されなかった。

リボフラビンが光を浴びた後に形成される光化学反応生成物は安全であり、血液や血液成分中にも見ることができる。

リボフラビンは極めて安全なプロファイルを示す

Mirasol PRT System におけるリボフラビンの暴露

ドナーの成分に対して Mirasol 処理を使用することにより、潜在的にレシピエントをリボフラビンおよびその光化学反応生成物の両方にさらす可能性がある。臨床的環境において起こりうるレシピエントに対するリボフラビンの暴露は、平均的なレシピエントの体重が 70kg、標準的なリボフラビンの溶解濃度が 500 μ M、平均的なリボフラビンのフォトコンバージョンが 18%、および平均的なリボフラビンの溶解体積が 35 mL であるという前提のもとで、輸血される成分単位当たり 0.077 mg/kg と算出されている。

リボフラビンのLD₅₀を定義する

人体への使用を目的とするその他の製品と同様に、LD₅₀を特定することは重要である。LD₅₀とは、試験の対象となる集団の 50%に死をもたらす服用量である。LD₅₀は重要だが、LD₅₀および患者に投与される薬用量の比率はさらに重要である。この比率が大きければ大きいほど、その製品は安全になるのである。

リボフラビンのLD₅₀を測定するため、複数の調査が行われてきた（Reddy et al.19 に概要記載）。一部の調査においてはLD₅₀の測定が可能だったが、その他の多くの調査では極めて高用量（10,000 mg/kgまたはそれ以上）の場合であっても不可能であった（表 1 参照）。輸血ごとの暴露レベルである 0.077 mg/kgを、報告されているマウスの静脈内のリボフラビンに対するLD₅₀、50-100 mg/kgと比較すると、その安全性は少なくとも 649 倍（50/0.077）になる。

表 1. リボフラビンのLD₅₀を確立するための調査概要

調査の種類	種	経路	結果
急性	ラット	腹腔内	LD ₅₀ = 560 mg/kg ⁷
急性	ラット	皮下	LD ₅₀ >5000 mg/kg ⁷
急性	ラット	経口	LD ₅₀ >10,000 mg/kg ⁷
急性	マウス	腹腔内	LD ₅₀ >340 mg/kg ¹¹
亜慢性 (4 日間)	マウス	腹腔内	1000 mg/kg/日 ¹¹ で死亡率 2/6

LD₅₀: 試験の対象となる集団の 50%に死をもたらすと推量される服用量。

表 2. Mirasol 処理済血液成分に対して行われた毒性評価の概要。

対象	方法	露出	結果
急性毒性	ラットおよび犬の雄および雌に対する 2 件の急性毒性調査: 死亡率、毒性の兆候、血液学、臨床化学、食料消費、一般行動および体重増加の観察。	IV 注入	毒物学的に重要な結果はなし
亜慢性毒性	犬の雄および雌に対する調査: 死亡率、毒性の兆候、臨床化学、血液学、体重、食料消費、組織の病理学および組織病理学の観察。	1 週間に 6 日間、13 週間以上投与、カテーテルと併せて IV 注入	毒物学的に重要な結果はなし
生殖毒性	ラットの胎児の発育: 臨床的観察、体重および食料消費。20 日目に検死。着床、黄体、再吸収および胎児の調査。	懐胎中に IV 注入 6~17 日	発達毒性は観測されなかった
遺伝毒性	1. 細菌を使用した復帰突然変異試験法 (Ames 試験): 細菌における生体外遺伝子突然変異 2. CHO 細胞における染色体異常: 哺乳類の細胞における生体外染色体異常誘発 (染色体の崩壊) 3. 哺乳類赤血球小核試験: 大腿部から吸引された生体内骨髓に対する染色体異常誘発試験	Mirasol 処理済血小板およびルミクロムに対する Ames 試験 IP 投与	処理済血小板または制御ヒト血小板あるいはルミクロムに対する Ames 試験では変異原性は観測されなかった。 Mirasol 処理済ヒト血小板は、すべての遺伝毒性実験において陰性の結果を出した。
新抗原性試験	1. 生体外実験: 血小板および血漿タンパク質に対する ¹⁴ C-リボフラビン結合の評価および血小	貯蔵してから 1 日後および 5 日後のキャプチャ-P 試験	血小板または血漿成分に対するリボフラビンの結合およびその光化

	<p>板に対する IgG の結合を評価するためのキャプチャ-P 試験</p> <p>2. オークタロニー法を利用した生体内試験：制御および Mirasol 処理済ヒト血小板を投与したうさぎの免疫反応の比較抗体産生の評価</p>		<p>学反応生成物は検出されなかった</p> <p>新抗原形成の兆候はなかった</p>
血液適合性試験	<p>1. 溶血試験：人間の血液に直接接触</p> <p>2. 血小板の機能に関する調査：第 6 章に記載されている一連の実験において評価されている</p>	該当なし	<p>溶血は観測されなかった</p> <p>第 6 章の結果を参照</p>
薬物動態試験	<p>雄の CD ラットの生体内評価：尿および糞便、全血および血漿の事前投与の検査、および実験の最後に、検死後に収集された皮膚、尾の皮膚、小腸、大腸、脾臓、腎臓、肝臓、リンパ系組織および骨髄の検査</p>	単回投与 IV 注入	<p>投与された放射能の約 95%が投与後 260～275 時間以内に除去された</p> <p>曲線下の観測範囲に基づき、全体的な暴露は高いほうから順番に以下のとおり：肝臓>腎臓>大腸>小腸>脾臓>大腿部の骨髄>リンパ管</p>
浸出物および抽出物	<p>血小板成分に直接入り込む可能性のある混合物を特定および定量化するために行われる分析：ガスクロマトグラフィーおよび質量分析法を利用</p>	該当なし	<p>治療状態にさらされる前後で著しい違いはなかった。</p> <p>FTIR により Mirasol 処理済または未処理の血小板抽出物から高分子材料は検出されなかった。Mirasol 処理済の血小板抽出物から検出されたすべての金属は、未処理の血小板抽出物にも同様な量だけ含まれていた</p>

CD: Cri:CD® (SD)ラット; CHO: チャイニーズハムスター卵巣; FTIR: フーリエ変換赤外分光; IgG: 免疫グロブリン G; IP: 腹腔内; IV: 静脈内; NA: 該当なし。

現時点では、リボフラビンの「中毒作用が発生しないレベル」は依然として不明である。従って、Mirasol 処理済血液成分の輸血によりもたらされるリボフラビンおよびその光化学反応生成物への暴露レベルが何らかの中毒作用を引き起こすということを予測する根拠はない。てんかん発作の感作および発作を増大させる可能性について、数ヶ月（たとえば>5 mg/kg/日を 6 ヶ月以上）に渡って毎日リボフラビンを高用量投与した後に個別の題材で報告されてきたが、これらのレポートはピアレビューを受けた資料により実証されていない。20 体の人体における高用量の経口投与および親の服用に関するその他のレポートにおいて、毒性作用は記載されていない。実際に、6 ヶ月以上>200 mg/日を安全に経口服用している人々に関するレポートがあり、標準的な服用量を超えると速やかに排出されるようである。

Mirasol PRT System の安全プログラム

リボフラビンの安全性については広範囲に渡って研究され、文書によっても証明されているが、Mirasol 処理におけるリボフラビンの使用はさらなる評価を保証した。そのため、国際標準化機構（ISO: International Organization for Standardization）のガイドラインに従って Mirasol 処理に対して広範囲にわたる臨床前毒性評価が実施された。大部分の調査レポートにおける被験物質および制御物質は、Mirasol 処理済血液成分または未処理の血液成分だった。一部の調査では、混じりけのないミクロム（リボフラビンの主な光化学反応生成物）または光分解されたリボフラビン溶液が使用された。Mirasol 処理済血液成分の検査では、リボフラビンおよび制御された光照明の追加から処理後の血液成分に対する持続可能性の評価まで、全工程を検査した。評価には、細胞および血漿蛋白質への作用、リボフラビン本体およびその光化学反応生成物の毒性、処理に使用される医療用プラスチック製コネクタおよびバッグなどのその他のシステムコンポーネントに対する影響が含まれていた。毒性の評価に使用される方法およびこれらの試験の結果の要約は、表 2 に記載されている。

すべての調査において、ガンマ線照射の Mirasol 処理済血液成分を使用した結果は、ガンマ線非照射の Mirasol 処理済血液成分から得られる結果と同一だった。Mirasol 処理済血液成分に対して実現可能な最大限の暴露を伴う投与を繰り返した後でさえも、主な生理的システムの機能に対する有害な影響の兆候または標的臓器における毒物の生成はなかった。試験により、Mirasol 処理済血液成分または蛋白質には検出可能な抗原は存在せず、調剤によって抗体または自己抗体の形成を促すことはないということが明らかとなり、また、毒性試験により、あらゆる遺伝毒性のリスクや妊娠中の動物および胎児の発達に関する中毒作用が排除された。IV を注入した場所の部分的な耐性も良好であることが分かった。処理済血小板の調剤により、細胞毒性が示されたり、システムで使用される容器およびコネクタから不要な物質の浸出が発生したりすることはなかった。亜慢性試験やその他の試験における腫瘍発生效果を与える可能性の欠如や、リボフラビンおよびその光化学反応生成物

の遺伝毒性および化学的性質の欠乏により、さらなる発癌性試験の必要性が除去された。歴史的な研究におけるリボフラビンの発癌性試験はこれらの調査結果と一致しており、また、この複合物は発癌性物質の可能性がないことを示している。

リボフラビンおよびその光化学反応生成物は、Mirasol 処理後に血液成分から除去する必要がないため、単純で簡単に使用することができる。

上記の調査結果は、Mirasol 処理を行った場合でも輸血する前に処理済血液成分からリボフラビンおよびその光化学反応生成物を除去する必要がないという事実を示す。これは、バッグの運搬および／または複合物の除去処理による成分の損失を最小限に抑え、病原体不活化処理が大いに必要とする簡易性を提供する。

要約

- ・リボフラビンは必要不可欠なビタミンである。
- ・リボフラビンの安全性は、体の弱い人々に対する使用を含む長年にわたる経験を通じて最終的に証明された。
- ・包括的な臨床前の毒性に関するプログラムが実施され、リボフラビンおよびその光化学反応生成物の優れた安全プロファイル、およびそれらの Mirasol 処理への使用の適合性が証明された。
- ・Mirasol 処理済成分を受容する患者に対するリボフラビンの予想される暴露は、輸血される血液成分の単位当たり 0.077 mg/kg である。この服用量は、報告されている LD₅₀ の最低値よりも少なくとも 649 倍低くなっている。
- ・リボフラビンが照射された後に形成される光化学反応生成物は安全であり、血液および血液成分中に自然に存在する。
- ・安全性に関する調査により、Mirasol 処理後に血液成分からリボフラビンおよびその光化学反応生成物を除去する必要がなく、病原体不活化処理が簡易化されているということが裏付けられた。
- ・毒性に関するプログラムが好ましい結果をもたらしたことにより、広範囲に渡る臨床試験プログラムの実施が可能になった。

Mirasol PRT System for Platelets の現在の CE マーク規格認定に準じる。

References

1. Scientific Committee for Food (SCF) (2000). Tolerable upper intake level of vitamin B2. (Opinion expressed on 22 November 2000.)
2. US Food and Drug Administration. Department of Health and Human Substances. Direct Food Substances Affirmed as Generally Recognized as Safe; Riboflavin. 21 CFR 184.1695. 2001.
3. World Health Organization. Thiamine, riboflavin, niacin, vitamin B6, pantothenic acid, and biotin. In: *Vitamin and Mineral Requirements in Human Nutrition*. 2nd ed. 2004:Section 9.3.5:172.
4. Martindale W, Sweetman SC, eds. *The Complete Drug Reference*. 33rd ed. London: Pharmaceutical Press; 2002:1386.
5. Unna K, Greslin JG. Studies on the toxicity and pharmacology of riboflavin. *J Pharmacol*. 1942;76:75–80.
6. Studer A, Zbinden G, Uehlinger E. Die pathologie der avitaminosen and hypervitaminosen. In: Buchner F, Letterer E, Roulet F, eds. *Handbuch der Allgemeinen Pathologie*. Berlin: Springer Verlag; 1962 (Band II):734–987.
7. Muñoz N, Hayashi M, Bang LJ, et al. Effect of riboflavin, retinol, and zinc on micronuclei of buccal mucosa and of esophagus: a randomized double-blind intervention study in China. *J Natl Cancer Inst*. 1987;79:687–691.
8. Hayashi M, Kishi M, Sofuni S, et al. Micronucleus tests in mice on 39 food additives and eight miscellaneous chemicals. *Food Chem Toxicol*. 1988;26:487–500.
9. Sisson TR. Photodegradation of riboflavin in neonates. *Fed Proc*. 1987;46:1863–1865.
10. Gromisch DS, Lopez R, Cole HS, et al. Light (phototherapy)-induced riboflavin deficiency in the neonate. *J Pediatr*. 1977;90:118–122.
11. Speck WT, Rosenkranz HS. Phototherapy for neonatal hyperbilirubinemia – a potential environmental health hazard to newborn infants: a review. *Environmental Mutagenesis*. 1979;1:321–336.
12. Olsen JH, Hertz H, Kjaer SK, et al. Childhood leukemia following phototherapy for neonatal hyperbilirubinemia (Denmark). *Cancer Causes Control*. 1996;7:411–414.
13. Treadwell GE, Cairns WL, Metzler DE. Photochemical degradation of flavins. V. Chromatographic studies of the products of photolysis of riboflavin. *J Chromatogr*. 1968;35:376–388.
14. Cairns WL, Metzler DE. Photochemical degradation of flavins. VI. A new photoproduct and its use in studying the photolytic mechanism. *J Am Chem Soc*. 1971;93:2772–2777.
15. Oka M, McCormick DB. Urinary lumichrome-level catabolites of riboflavin are due to microbial and photochemical events and not rat tissue enzymatic cleavage of the ribityl chain. *J Nutr*. 1985;115:496–499.
16. Hardwick CC, Herivel TR, Hernandez SC, et al. Separation, identification and quantification of riboflavin and its photoproducts in blood products using high-performance liquid chromatography with fluorescence detection: a method to support pathogen reduction technology. *Photochem Photobiol*. 2004;80:609–615.
17. Kale H, Harikumar P, Nair PM, et al. Assessment of the genotoxic potential of riboflavin and lumiflavin. A. Effect of metabolic enzymes. *Mutat Res*. 1992;298:9–16.
18. Huang R, Choe E, Min DB. Kinetics for singlet oxygen formation by riboflavin photosensitization and the reaction between riboflavin and singlet oxygen. *J Food Sci*. 2004;69:C726–C732.
19. Reddy et al. *Transfusion*. Manuscript in press, April 2006.
20. BIBRA. Riboflavin and its Derivatives: Toxicity Profile. 1990:1–7. Available at: <http://www.bibra-information.co.uk> Accessed 28 November 2007.
21. Fouty B, Frerman F, Reves R. Riboflavin to treat nucleoside analogue-induced lactic acidosis. *Lancet*. 1998;352:291–292.
22. Schoenen J, Jacquy J, Lenaerts M. Effectiveness of high-dose riboflavin in migraine prophylaxis: a randomized controlled trial. *Neurology*. 1998;50:466–470.
23. Luzzati R, Del Bravo P, Di Perri G, et al. Riboflavin and severe lactic acidosis. *Lancet*. 1999;353:901–902.
24. Expert Group on Vitamins and Minerals. Safe Upper Levels for Vitamins and Minerals. May 2003. Available at: <http://www.food.gov.uk/multimedia/pdfs/vitmin2003.pdf> Accessed 23 November 2007.
25. Zempleni J, Galloway JR, McCormick DB. Pharmacokinetics of orally and intravenously administered riboflavin in healthy humans. *Am J Clin Nutr*. 1996;63:54–66.
26. International Organization for Standardization. ISO 10993-1:2003.

第 4 章

病原体不活化の性能

MIRASOL®

病原体不活化技術

病原体不活化の性能

ウイルス、細菌および寄生虫の一般のおよび代表的な集団に対する、Mirasol PRT Systemの有効性が広範囲にわたって評価されてきた。

病原体不活化の評価

血漿から派生する生物薬剤学における病原体不活化の基準は定着しており、それに相応して血液成分における病原体不活化の評価に採用されてきた。病原体不活化の範囲は、通常「ログ・リダクション」に置き換えて表される。これは、 10^x mL^{-1} の単位で表される始点力価から、同様に 10^x mL^{-1} の単位で表される処理後の力価を引いたものとして報告されている。サンプルの容量は処理の前後で一定であるため、容量の単位は相殺され、レポートにあるログ・リダクション値が導き出される。たとえば、サンプルの始点力価が mL につき 10^6 個のウイルス粒子で、処理後の力価が mL につき 10^2 個のウイルス粒子である場合は、報告されるログ・リダクションは 10^4 または4ログになると推量される。これは、ウイルスのレベルが99.99%減少することに相当する。値はログ単位で報告されるため、100%減少することはない。

ログ・リダクション調査の結果を解釈する際には、実験的方法論を理解することが非常に重要である。

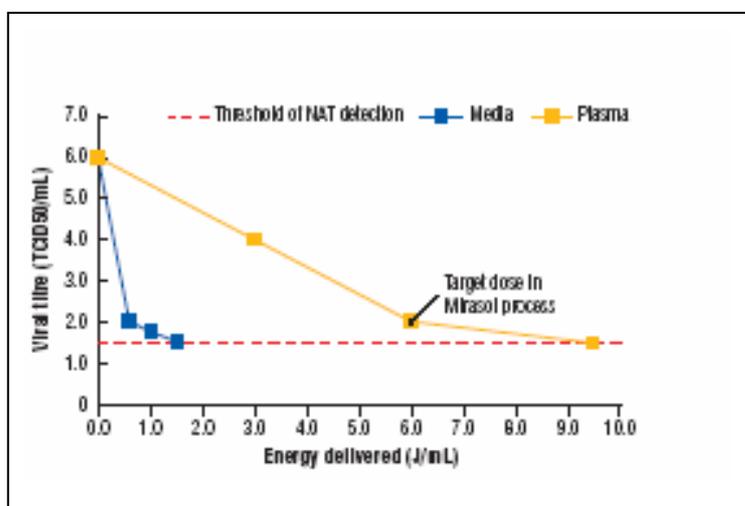


図 1.血漿および媒体における脳心筋炎 (EMC)ウイルスの不活化動力学: Mirasol 処理利用時のウイルス不活化率。

たとえば、実験に使用される媒体は、実験結果に多大な影響を与える可能性がある。病原体不活化の比率および範囲のどちらも、媒体および血漿の間で大きく変化する（図 1 参照）。Navigant Biotechnologies LLC により実施された特異ウイルス性因子、細菌性因子、寄生性因子および白血球因子に対する効能に関するあらゆる調査は、利用規格に適合する条件の下で血液成分に対して実施されていることに注意することが重要である。

さらに、ログ・リダクションの値は関連する臨床状況に分類される必要がある。図2は代表的なウイルス感染の経時変化を表している。感染の初期段階、特に潜伏期間における病原体不活化が重要であることは明白である。感染の段階におけるウイルス力価は低い、それでもなお十分に感染を引き起こす可能性があり、既存の分析では検出できない場合がある。反対に、ウイルス血症が最大限の間は明白な症状が表わされる可能性が高く、ドナーに提供させないようにするほどだ。表1はウイルス性病原体に関するウイルス血症の様々な段階におけるウイルス力価の要約を示している。

図2. 代表的なウイルス血症期間の概要図

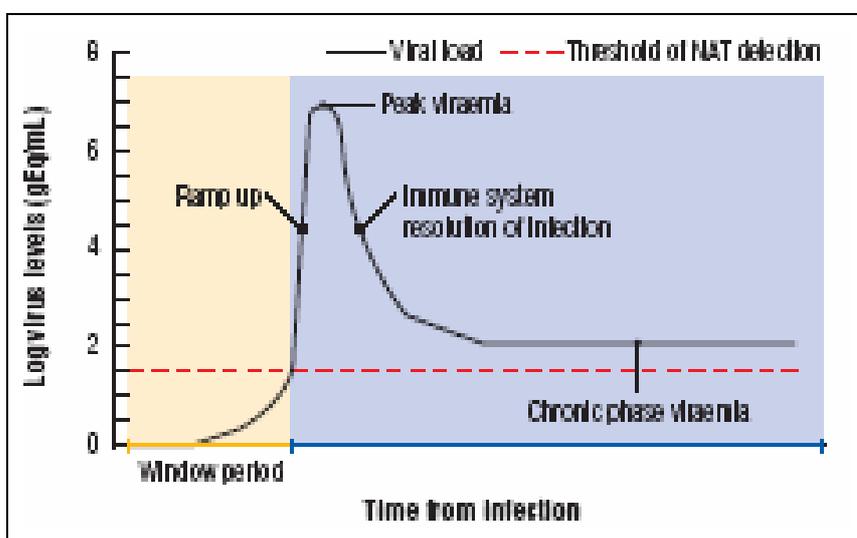


表1. 輸血製剤のウイルス汚染レベル

作用因子	感染段階	ウイルス血症の最大値
HIV、HCV、HBV	WP w/MP-NAT WP w/SD-NAT WP wo/NAT 慢性感染症	<10 ³ <10 ¹ 10 ⁶ ~10 ⁸ 10 ⁴ ~10 ⁶
CMV、EBV HTLV	WP 慢性感染症	10 ⁴ ~10 ⁶ <10 ² ~10 ⁴
パルボ・ウイルス	WP 慢性感染症	10 ⁸ ~10 ¹² <10 ² ~10 ⁴

†mLまたは 10⁶ PBMCごとのgEq。

CMV: サイトメガロ・ウイルス; EBV: エプスタインバーウイルス; gEq: 核酸相当数; HBV: B型肝炎ウイルス; HCV: C型肝炎ウイルス; HIV: ヒト免疫不全ウイルス; HTLV: ヒトT細胞性白血病ウイルス; MP: ミニプール; NAT: 核酸試験; PBMC: 末梢血単核細胞; SD: シングルドナー; w:あり; wo: なし; WP: 潜伏期間.

病原体不活化処理の有効性を明確にするために必要とされる要件や性能限界を、完全に説明することのできる血液成分のウイルス不活化はない。また、ウイルス不活化の有効性が、ウイルス血症が最大限の時に、すべてのウイルスに見られるレベルに達していない場合でも、それが病気感染の可能性を減少させることのできない方法であるということにはならない。

ウイルス因子に関して重要な点は、その測定方法である。

すべての結果において、私たちは mL ごとの核酸相当数 (gEq) について報告されているウイルスのレベルを示す。これは、一般に採用されている NAT 方法論でスクリーニングされる特異遺伝子配列に基づくサンプルにおいて検出される粒子の数と一致する。この特異遺伝子配列が存在するという事は、ウイルス粒子またはウイルス粒子の一部が存在するという事を意味し、すなわちそれは病気の指標になる。しかし、このレベルが必ずしも感染性ウイルス粒子の存在にそのまま結びつくわけではない。たとえば、このウイルス特有の特異遺伝子配列に基づいて粒子とみなされるウイルスは、完璧なゲノムを持っているかもしれないが、宿主細胞および病気の伝染に結合するために必要なウイルス・エンベロープ蛋白質が欠如している。そのため、私たちが行ったようなウイルス因子の測定は、サンプルに残されたウイルスの伝染力を大幅に過大評価する可能性がある。

以下のテキストに挙げられている実験では、ログ・リダクション因子は医薬品委員会 (CHMP: Committee for Medicinal Products for Human Use、以前は Committee for Proprietary Medicinal Products [CPMP]) および US FDA のガイドラインに従って算出された。

ウイルスの不活化研究

ウイルスの選択

調査用の病原体は、米国血液銀行協会 (AABB: American Association of Blood Banks) の病原体優先順位リスト、WHO、国際輸血学会 (ISBT: International Society of Blood Transfusion)、および CHMP のガイドラインに基づいて選択された。CHMP は、欧州医薬品審査庁 (EMA: European Medicines Agency) 向けに人体に利用するための医薬品に関するあらゆる質問に対する見解を準備する責任がある。CHMP のガイドライン 4 は、ク

クリアランス評価および処理特性調査のためにはウイルスの 3 つのカテゴリについて詳しく調査することを勧めている：

- ・ 関連ウイルス言い換えれば、細胞基質または生産処理に使用されるその他のあらゆる試薬または物質を汚染することで知られている、またはその可能性のある実際のウイルスあるいは同じ種の一つ
- ・ 特異モデルウイルス言い換えれば、ウイルスとして知られているまたはその疑いがあるものと密接に関連するウイルスおよび物理化学特性を備えたウイルス
- ・ 非特異モデルウイルス

特異モデルウイルスは、関連ウイルスが入手不可能な場合、または研究室の状況下で適切に維持することができない場合に使用される。非特異モデルウイルスは、一般的にウイルスを除去および／または不活化するためのシステムの能力の特性を示すため、すなわちクリアランス処理の強固さの特性を示すために使用される。ウイルスクリアランス特性に関する調査は、異なる物理化学特性を備えた非特異モデルウイルスを使用して実施されなければならない。

Mirasol 処理は CHMP ガイドラインに含まれる様々なウイルスについて評価されてきた。

ウイルス不活化の調査

Mirasol PRT System は最初に優先純度の高いウイルスに対する不活化について評価される。最初に調査対象となったウイルスは、ヒト免疫不全ウイルス (HIV)、豚パルボ・ウイルス (PPV; ヒト B19 パルボ・ウイルスのモデルとして[B19]) および西ナイル・ウイルス (WNV) である。さらなる詳しい調査により、CHMP が推奨するその他のクラスのウイルスについても不活化能力が評価されている。完了済みのウイルス・ログ・リダクション調査の結果の要約は、表 2 に記載されている。

すべてのウイルス不活化調査は、Trima®アフェレーシス装置を使用したアフェレーシスにより収集されたシングルドナー血小板成分を使用して実施された。サンプルはMirasol処理の前にスパイクされる。多くの場合、血小板成分は直接ウイルスにスパイクされ、例外はすべて下記に記載されているが、サンプルは、ログ・リダクション値を計算するために使用される最初および最後のウイルス力価を得るために、照射直前および直後に試験される。感染培養液は加湿されたCO₂ 5% の培養器の中で 7 日間 37°Cで培養され、細胞病理学的効果について毎日検査される。ログ・リダクション結果は、感染性に関する標準的な生体外検定法により取得される (TCID₅₀)。‡ 上記に記載されているように、核酸相当数により定量化された高度なウイルス力価を含む溶液には、病気を伝染させることのできるウイルス粒子はわずしか存在しない可能性がある。そのため、組織培養感染検査はウイルス因

子が病気を伝染および発生させる能力の間接的測定方法として使用される。

次の試験は、これらの優先度の高いウイルス、HIV、B19—モデルとして PPV を使用—および WNV、および現在の血液の安全性に関する技術に特別な課題を提示する他の 2 つの重要な病原体（A 型肝炎ウイルス [HAV] および サイトメガロ・ウイルス）に関する、現在完了済みのウイルス不活化調査の主な結果を要約している。

‡ TCID₅₀: 組織培養検査（ウイルス因子が病気を伝染および発生させる能力の間接的測定方法）で測定される感染性のウイルス因子の数

ヒト免疫不全ウイルス (HIV)

Mirasol 処理は様々なウイルスの型に対して評価された。無細胞の HIV および細胞を有する HIV に対してシステムを評価するために、HIV に感染しているリンパ球 (H9 細胞) を使用して準備されたサンプルが使用された。これらの細胞には、活発に複製を行ったり、成長媒体中で制限なく出芽しているなどの様々な型のウイルスが含まれている。プロウイルス型である細胞内 HIV (HIV_i) に対する試験には、ACH-2 感染細胞が利用される。HIV_i は、感染細胞のゲノムに統合されるウイルスの型である。AXH-2 感染細胞は、非複製で感染性のあるウイルス・ゲノムを含むリンパ嚢胞に血液製剤が感染している可能性のある場合の代表的なものである。Mirasol 処理は、すべての型のウイルスのウイルス力価を効果的に削減し、4.5~5.9 log/mL のログ・リダクション値を実現する (表 2 参照)。

Mirasol 処理は HIV の細胞内および細胞外の両方の型のウイルス力価を効果的に削減する。

ヒト B19 パルボ・ウイルス (B19)

B19 はプールされた血漿または血漿派生物の一般的な汚染物質で、20,000 人に 1 人のドナーの血液に存在すると予測されており、この値は流行期間には 260 人に 1 人にのぼる。この事実にもかかわらず、B19 は標準的な血液スクリーニング法の一部として定期的に試験されていない。人体におけるその存在は、免疫不全の被験者における骨髄機能不全および妊娠第二期の女性の自然流産と関連してきた。CHMP のガイドライン⁴に従い、Mirasol 処理は特異モデルウイルス、豚パルボウイルス (PPV) を使用して評価された。>5 log/mL の削減値が達成された (表 2 参照)。

Mirasol 処理の結果として、ヒト B19 の特異モデルウイルスである PPV の力価の大幅な (>5 log) 削減に繋がる。

西ナイル・ウイルス(WNV)

WNV は、人間に病気や死をもたらす可能性のある蚊媒介性のウイルスである。2002 年のアメリカにおける流行期間中の輸血に関連した WNV 感染の伝染は、WNV ウィルス血症用に献血された血液のスクリーニングのための核酸試験 (NAT) 検定法の急速な発展を促した。試験が可能な一方で、「偽」陰性の結果に関するレポートがあり、感染をもたらしてきた。WNV(ATCC #VR-1510)に血小板濃厚液が追加され、mL 当たり $7.06 \pm 0.26 \log \text{TCID}_{50}$ の初期力価を達成した。

照射前および照射後のサンプルは、連続的にハンクス緩衝食塩液で希釈され、ペロ細胞に塗布された (ATCC #CCL-81)。Mirasol を利用した処理は、5.2.のログ・リダクションを実現した。

Mirasol 処理は WNV の力価を大幅に削減する。

A 型肝炎ウイルス(HAV)

従来の病原体不活化技術 (PRT) は、HAV を不活化することができない。複合物が核酸に近づくために蛋白質皮膜に浸透することが困難で、小型の HAV ゲノムは不活化の目標がほとんどないため、それは不活化するのが困難なウイルスである。この困難なウイルスの Mirasol 処理により、約 2.3 のログ・リダクション値がもたらされた。現在まで、Mirasol 処理は HAV のウイルス力価を削減すると報告されている唯一の技術である。

現在まで、*Mirasol* 処理はヒト HAV のウイルス力価を削減すると報告されている唯一の技術である。

表 2. ウィルス・ログの調査結果

対象ウイルス	使用モデル	種類	ログ・リダクション	モデル対象	参考
HIV 活性 HIV 潜在	細胞内のヒト HIV 細胞を有するヒト HIV	ssRNA 皮膜を有する	5.9 4.5	その他のレトロウイルス	発表済みデータ
HIV、WNV チクングニ	WNV チクン	ssRNA 皮膜を有する	5.2 計 画中	その他のフラビウイルス	発表済みデータ 保留中