

ヤ	グニヤ				
狂犬病ウイルス	VSV	ssRNA 皮膜を有する	>6.3	その他のラブドウイルス 大型 RNA ウィルス	発表済みデータ
HCV WNV	シンドビスウイルス BDV	ssRNA 皮膜を有する	3.2 最大 4.0 まで	その他のトガウィルス	ファイル・データ
CMV ヒト CMV	IBRV HHV	dsDNA 皮膜を有する	3.0 ~ 3.4 進行中	その他のヘルペス・ウィルス	その他のヘルペス・ウィルス ファイル・データ ファイル・データ
HBV	ヒト HBV 仮性狂犬病ウイルス	ssDNA 皮膜を有する	進行中 2.5 ~ 3.0		ファイル・データ
インフルエンザ・ウィルス 鳥インフルエンザ・ウィルス	インフルエンザ A ウィルス	ssRNA 皮膜を有する	>5.3	その他のオルトミクソウィルス	ファイル・データ
ヒト B-19 ウィルス	PPV	ssDNA 皮膜を有さない	>5.0	その他のパルボ・ウィルス	発表済みデータ
HAV	HAV EMCV BEV	ssRNA 皮膜を有さない	2.0 3.2 3.0	その他のピコルナ・ウィルス ポリオウィルス	ファイル・データ

[§]ファイル・データはNavigant Biotechnologies LLCが保持しており発表期限は 2008 年。

BDV: 牛下痢性ウィルス; BEV: 牛エンテロウィルス; CMV: サイトメガロ・ウィルス; EMCV: 脳心筋炎ウィルス; HAV: A 型肝炎ウィルス; HBV: B 型肝炎ウィルス; HCV: C 型肝炎ウィルス; HHV: ヒト・ヘルペス・ウィルス; HIV: ヒト免疫不全ウィルス; IBRV: 牛伝染性鼻気管炎ウィルス; PPV: 豚パルボ・ウィルス; SS: 単一ストランド; VSV: 水泡性口内炎ウィルス; WNV: 西ナイル・ウィルス

サイトメガロ・ウイルス(CMV)

CMV は血液中に存在する時は、白血球に結び付けられている。白血球除去は白血球媒介感染を削減するが、複数の発表によると、白血球除去は最高でも感染率の低下における血清 CMV 試験と同程度の効果しかないということが示唆されている。現在、様々な CMV のモデルが存在し、これらのモデルには、感染したヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) またはモデル牛伝染性鼻気管炎ウイルス (IBRV) の使用が含まれる。HUVEC は輸血における CMV 感染を引き起こすわけではないが、効果的に高レベルのウイルスを算出するため使用される。

私たちは IBRV モデルシステムを利用して Mirasol 処理を評価し、ウイルス力価が 3.0~3.4 log/mL 削減されたことを実証した。しかし、このモデルで達成されたログ・リダクションとその結果生じた白血球媒介感染の間には、説得力のある相関性はなかった。従って、Mirasol 処理による CMV の不活化の効果を実証するために CMV に感染したヒト白血球を使用したモデルの開発を進めている。

Mirasol 処理は、CMV のモデルである IBRV を効果的に不活化する。CMV に感染した白血球を使用したモデルについては調査中である。

細菌の不活化

輸血による細菌感染症 (TTBI) は、輸血に関して何よりも第一に認識される致命的な危険要因である。実際に、細菌による血小板成分の汚染は、血液成分の輸血に関連する最も重大なリスクの一つとして確認されてきた。このリスクに対する懸念から、細菌に汚染された成分の輸血を削減または廃止する試みとして、細菌培養の実施およびスクリーニング方法が推奨される一方で、現在この環境で PRT の有効性を評価することに対する特定の推奨はない。

細菌の選択

現在、PRT の評価対象となる細菌種に関する標準的な指定パネルは存在しない。そのため、私たちは中心的な臨床専門家と共同で、発表されている文献または血液安全監視体制に関するレポートで特定されている主な病原体について代表的な細菌パネルを編成した。また、私たちは以下に記載されている細菌不活化性能を計測するための 2 つの補完的な試験方法も開発した。

遡及的な調査研究において、報告された事象の 70%以上を一般的な細菌である表皮ブドウ球菌および黄色ブドウ球菌の 2 種が占めていた。さらに別の 3 種、大腸菌、緑膿菌および

セレウス菌も、頻度は下がるが輸血に関する致命的な事象に関連していた。さらに、輸血に関連する敗血症の原因として、一般的な血小板汚染物質であるセラチア・マルセッセンスがヘモビジランスに関する多数のレポートに見られる。これらの 6 種の細菌は、これらの研究で報告されている文書化された血小板輸血に関する敗血症の事象（およびすべての死亡事象）の約 86%に相当する（表 3 参照）。そのため、Navigant Biotechnologies LLC は、これら 6 種が Mirasol PRT System の性能を実証する対象となる受容可能な最初の細菌パネルであると考えた。現在進行中の研究では 26 種を超える幅広いパネルに対するシステム性能を評価しており、それら 26 種を合わせると輸血に関する深刻な感染の 98%を占めている。これらの追加研究の結果は、完了後に報告する。

表 3. 血小板輸血に関連する敗血症事象

有機組織体	グラム染色	特徴	観測総数	致死率	頻度 (%)
表皮ブドウ球菌	グラム+	頻繁に皮膚が感染；輸血に関連する致死量に関与	35	1	61.4
黄色ブドウ球菌	グラム+	体温で急速に成長 起源は多数ある；輸血に関連する致死量に関与	6	3	10.53
大腸菌	グラム-	標準的なヒトフローラ；輸血に関する致死量に関与	1	1	1.75
緑膿菌	グラム-	輸血に関する致死量に関与	2	2	3.51
セレウス菌	グラム+	時々皮膚が感染；輸血に関連する致死量に関与	3	0	5.26
セラチア・マルセッセンス	グラム-	日和見性の環境汚染；輸血に関連する敗血症に関与	2	0	3.51
その他の全種	-		8	0	14.04
合計	-		57	7	100

細菌のログ・リダクション研究

細菌の不活化に関する研究には、適切なスパイク・レベルの選択が不可欠だ。ほとんどの研究が高度な細菌力価（例: 1000~10,000 organisms/mL）を使用するが、汚染された成分の力価が 0.03~0.3 organisms/mL（単位当たり 10~100organisms）を超えることはほとんどない。そのため、病原体不活化技術に関する最も適切な結果の基準は、高力価を不活化させる能力ではなく、低力価を不活化させて成分の有効期限を通じてこれらの微生物の成長を抑制する能力である。私たちは、細菌の負荷の削減における Mirasol システムの有効性を評価するための2つの補完的な試験、高スパイクおよび低スパイク試験を使用した。どちらの方法も、Mirasol 処理およびそれに続く細菌の存在の測定を受けて周知の力価の細菌を血小板成分に注入することを伴う。8 高スパイク実験の目的は、ひどく汚染された血小板成分に対するシステムの包括的な細菌不活化能力を判断することである。これらの研究は（上述されているように）臨床状況を代表するものではないが、一般的に PRT の評価に使用される。低スパイク実験の目的は、5 日間の保存期間の経過を通じて処理済血小板成分を評価し、それが培養陰性を維持して輸血の解除基準を満たすかどうかを判断することである。このアプローチでは、実際の臨床的環境において予想されるよりも実質的に高度な課題をもたらす状況下で、Mirasol 処理の細菌不活化能力を評価する。

Mirasol PRT System は、2つの補完的な試験方法を使用して広範囲に渡る細菌病原菌を包括的に評価してきた。

高スパイク細菌力価実験

これらの実験では、Trima アフェレーシス装置を使用して収集され、5~6 log コロニー形成単位 (CFU) /mL のバクテリアでスパイクしたシングルドナー血小板成分が使用される。収集されたばかりの汚染された血小板は、通常<100 CFU/成分を含んでいるため、高スパイク調査で使用されるレベルは、代表的な臨床的環境において予期されるよりも 10,000~100,000 倍高くなる。スパイク後すぐに、血小板成分は Mirasol システムで処理され、初期および最後の力価間で達成された不活化を算出することによって総合的な病原体不活化性能が判断される。これらの実験では、力価は照射の直前および直後に判断され、保管期間はない。表 4 は高スパイク細菌力価実験の公表結果を表示しており、それには多くの高耐性菌が含まれる。これらの調査は、高細菌力価における Mirasol 処理の有効性を実証された。

Mirasol PRT System は、高耐性菌を含む広範囲にわたる細菌に対して、高細菌力価を見事に削減する。

低スパイク細菌力価実験

低スパイク細菌力価調査は、保管期間中の血小板成分の無菌性を監視しながら、より低く臨床的に適切な細菌力価（0.5～2.0 log/mL）で能力を評価します。スパイク後、血小板サンプルはMirasolシステムで処理され、通常の血液を構築する状況下で保管される。最低でも 5 日間保管した後で、成分の見本が採取され培養される。サンプルは、血液成分用自動培養システム（BioMerieuxにより開発されたBacT/ALERT[®]）を使用して監視され、このシステムは、試験サンプルにおける細菌の存在を監視するためにヨーロッパ全域で広く使用されている。結果は、Mirasol処理は保管期間全体を通じて培養陰性成分を産出するということを実証している。

Mirasol PRT System は、通常の血液を構築する状況下で 5 日間の保管期間全体を通じて培養陰性成分を産出する。

表 4. 細菌ログ・リダクション結果

病原体	耐性菌	ログ・リダクション	種類	コメント
黄色ブドウ球菌	ATCC 25923	3.6	グラム+	
黄色ブドウ球菌	ATCC 700787	4.8	グラム+	MRSA 耐性菌
表皮ブドウ球菌	ATCC 12228	4.2	グラム+	
セレウス菌*	ATCC 7064	1.9	グラム+	耐性菌
セレウス菌*	NI-0001	2.7	グラム+	献血された血液から分離
連鎖球菌	ATCC 6249	3.7	グラム+	
緑膿菌	ATCC 43088	>4.5	グラム-	
緑膿菌	ATCC 27853	>4.7	グラム-	耐性菌
大腸菌	ATCC 25922	>4.4	グラム-	
セラチア・マルセッセンス	ATCC 43862	4.0	グラム-	

* バチルス種 頻繁に孢子形状で発生する。

MRSA: メチシリン耐性黄色ブドウ球菌

BacT/ALERT を使用した細菌培養試験における Mirasol 処理の有効性を比較する組織内データは、BacT/ALERT が理想的な状況下で実施される際にはどちらの方法も同様に効果的（約 90%）であることを示唆している。しかし、臨床環境においては、Mirasol 処理の有効性は 90%を超える状態を維持すると予測される一方で、BacT/ALERT の有効性は約 50%にまで落ち込む（表 5 および 6 参照）。

表 5. Mirasol PRT System および BacT/ALERT 方法の総合的な有効性の比較

有機組織体	ATCC 番号	発生	頻度 (%)
表皮ブドウ球菌	12228 14990 700578 35984	20	33
大腸菌	25922	8	13
セレウス菌	NI-0001	7	11
黄色ブドウ球菌	29213 10832 25923 27217	6	10
B 群連鎖球菌 連鎖球菌 化膿連鎖球菌	70046 6249 BAA-1064	5	8
エンテロバクター菌	29005	4	7
グラム陽性菌	51277	3	5
セラチア・マルセッセンス	43862	3	5
肺炎桿菌	8045	2	3
非発酵陰性桿菌	17961	1	2
陰性桿菌	試験対象外	1	2
エルシニア感染症	23715	1	2

表 6. BacT/ALERT 比較調査において評価された有機組織体の総括表

有機組織体のタイプ	グラム +/-	ATCC 番号	検出までの 培養時間 (平均時間)	接種力価 (CFU/ 製 剤)	7日間の積極 抑制力価の 成長 (CFU/ 製剤)
非発酵陰性桿菌	-	17961	7.6±1.1	61	3.6×10 ⁸
セレウス菌	+	該当なし	4.4±1.1	103	6.5×10 ⁶
エンテロバクター 菌	-	29005	5.9±0.5	41.3	1.5×10 ⁹
大腸菌	-	25922	6.6±2.3	65	2.7×10 ⁸
肺炎桿菌	-	8045	12.6±0.7	55	6.2×10 ⁸
グラム陽性菌	+	51277	106.7±45.8	596	<1.0
セラチア・マルセ ッセンス	-	43862	4.3±0.2	79	>3.0×10 ⁹
黄色ブドウ球菌	+	29213	9.7±1.1	75	2.2×10 ⁸
黄色ブドウ球菌	+	10832	14.4±0.9	63	3.8×10 ⁸
黄色ブドウ球菌	+	25923	9.3±0.3	68	4.3×10 ⁸
黄色ブドウ球菌	+	27217	9.0±0.6	70	5.3×10 ⁸
黄色ブドウ球菌	+	29213	12.1±2.1	14	4.0×10 ⁸
表皮ブドウ球菌	+	12228	17.3±1.7	54	3.6×10 ⁸
表皮ブドウ球菌	+	14990	19.0±1.9	57	1.2×10 ⁸
表皮ブドウ球菌	+	700578	23.2±1.7	23	2.9×10 ⁸
表皮ブドウ球菌	+	35984	19.4±1.5	39	2.7×10 ⁷
表皮ブドウ球菌	+	12228	19.1±0.8	11	1.8×10 ⁸
表皮ブドウ球菌	+	12228	該当なし	<3	1.7×10 ⁸
B群連鎖球菌	+	700046	9.1±0.8	54	6.1×10 ⁶
連鎖球菌	+	6249	16.2±2.9	28	2.9×10 ⁷
化膿連鎖球菌	+	BAA-1064	10.2±0.6	42	4.4×10 ⁵
エルシニア感染症	-	23715	10.1±2.3	76	8.5×10 ⁸

CFU: コロニー形成単位; NA: 該当なし

細菌で汚染されている代表的な血小板成分には、全体で約 10~100 の有機組織体が含まれている可能性がある。高スパイク調査および低スパイク調査を合わせたデータは、実際の臨床的環境において予想されるよりも実質的に高度な課題をもたらす状況下における、

Mirasol 処理の細菌不活化能力を実証する。これらの細菌不活化レベルは、細菌感染リスクの対応不活化における非常に高い限界点を示唆している。

これらの結果にもとづき、Mirasol 処理は処理済血液成分を介した細菌感染を削減する結果をもたらすと期待されている。1:3000 という血小板成分の細菌汚染の頻度を考えると、この環境における患者の罹患率および死亡率に対する潜在的な利点は重要である。

臨床的環境において予想されるよりも大幅に高度な課題をもたらす状況下における Mirasol PRT System による細菌不活化の印象的な結果は、Mirasol 処理により輸血による細菌感染が減少するという点を強く示唆している。

寄生虫の不活化

旅行や移住の増加により、熱帯地方特有の寄生虫症がそれ以外の国々の献血者にも見られる。現在では、血液成分を通じて感染する可能性のある多数の寄生虫に対する十分な献血者のスクリーニングが存在せず、シャーガス病（クルーズ・トリパノソーマ）、内臓リーシュマニア症（ドノヴァン・リーシュマニア）およびマラリア（プラスモディウム・ファルシパルム）を含む、輸血に関連する寄生虫感染が近年数多く報告されている。

そのため、寄生虫の不活化は PRT のもう一つの魅力的な特性であるが、細菌に関しては、PRT の試験対象となる標準的な病原体パネルが存在しない。Mirasol PRT System はどのような病原体に対しても利用される可能性があるため、寄生虫の感染を予防する効果的なオプションを提供する。私たちは現在様々な寄生虫に対してシステムの試験を行っている。現在までに得られた結果は、表 7 に要約する。

Mirasol PRT System は、輸血用血液に重大な脅威を与える様々な寄生虫を効果的に不活化させることが明らかになった。

表 7. 寄生虫のログ・リダクション結果

病気	病原体	ログ・リダクション	試験対象
リーシュマニア	小児ドノヴァン・リーシュマニア	>5.0 ³²	血小板、血漿
マラリア	プラスモディウム・ファルシパルム	>2.0 ^{2,33}	赤血球
シャーガス病	クルーズ・トリパノソーマ	>6.0 ²	血小板、血漿
ツツガ虫病	オリエンティア・ツツガ	>6.0 ³⁴	血小板、血漿、赤血球

	ムシ		
バベシア症	バベシア・ミクロティ	>5.0 ²	血小板、血漿

^{††}ファイル・データはNavigant Biotechnologies LLCが保持しており発表期限は 2008 年

要約

- ・ウイルス、細菌および寄生虫に対する Mirasol PRT System の有効性を評価するために、厳しい基準を採用した
- ・ガイドラインが利用可能な場合は、推奨される病原体の全機能について Mirasol PRT System の試験を実施した
- ・ガイドラインが利用可能でない場合は、Navigant Biotechnologies LLC は適当な血液製剤汚染に関する公開データを利用した
- ・Mirasol PRT System を使用した処理は、処理済血液製剤からの病気感染の可能性を減少させ、Mirasol PRT System の有効性に関する代表的な試験を保証することを目的としている
- ・Mirasol PRT System の有効性は細菌（グラム陽性およびグラム陰性の両方）、ウイルス（RNA および DNA、皮膜を有する場合と有さない場合）および寄生虫に対して実証されている
- ・Mirasol PRT System は病気感染の可能性が極めて低くなるレベルまでウイルス力価を削減する
- ・PPV に関する不活化調査の結果に基づき、観測されたウイルス不活化のレベルは、HIV-1 の潜伏期間および人体における全体的なウイルス血症期間を終わらせるために必要とされるレベル、およびヒト B-19 パルボ・ウイルスの慢性的段階感染の潜伏を終わらせる可能性のあるレベルを超えている
- ・Mirasol 処理は IBRV（CMV のモデル）ウイルス力価を大幅に削減する
- ・Mirasol PRT System は、HAV のレベルを削減することが証明されている唯一の技術である
- ・Mirasol PRT System は、高耐性菌を含む広範囲にわたる細菌の高細菌力価を削減する
- ・Mirasol PRT System は、通常の血液を構築する状況下における 5 日間の保管期間を通じて溶液陰性製剤を産出する
- ・臨床的環境において予想されるよりも大幅に高度な課題をもたらす状況下における Mirasol 処理の細菌不活化の結果は、Mirasol 処理が輸血による細菌感染を削減するということを強く示唆している
- ・Mirasol PRT System は、輸血用血液に重大な脅威を与える様々な寄生虫を効果的に不活化させることが明らかになった

References

1. FDA Guidance for Industry: OSA Viral safety evaluation of biotechnology products derived from cell lines of human or animal origin, September 1998.
2. Data on file at Navigant Biotechnologies LLC.
3. Goodrich RP, Keil S, Busch MP. Pathogen inactivation in blood components and the definition of adequacy in performance. Manuscript in preparation.
4. Committee for Proprietary Medicinal Products Guidelines CPMP/CH/295/95 – Guidance for Industry: OSA Viral safety evaluation of biotechnology products derived from cell lines of human or animal origin, March 4, 1997.
5. Stamer S. Project lead: Emerging Infectious Disease Project. American Association of Blood Banks. Personal communication, September 2006.
6. World Health Organization guidelines, WHO technical report, Series No. 924, 2004:61–162.
7. Ruane P, Edrich R, Gampp D, et al. Photochemical inactivation of selected viruses and bacteria in platelet concentrates using riboflavin and light. *Transfusion*. 2004;44:877–885.
8. Goodrich RP, Edrich RA, Li J, Seghatchian J. 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.
9. Piatak M Jr, Saag MS, Yang LC, et al. High levels of HIV-1 in plasma during all stages of infection determined by competitive PCR. *Science*. 1993;259:1749–1754.
10. Brown KE, Young NS, Alving BM, Barbosa LH. Parvovirus B19: implications for transfusion medicine. Summary of a workshop. *Transfusion*. 2001;41:130–135.
11. Syridou G, Skevaki C, Kafetzis DA. Intrauterine infection with parvovirus B19 and CMV: implications in early and late gestation fetal demise. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2005;3:651–661.
12. West Nile virus activity – United States, October 10–16, 2002, and update on West Nile virus infections in recipients of blood transfusions. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. 2002;51:929–931.
13. Pealer LN, Marfin AA, Petersen LR, et al. Transmission of West Nile virus through blood transfusion in the United States in 2002. *N Engl J Med*. 2003;349:1236–1245.
14. 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*. 2006;353:451–459.
15. Busch MP, Caglioti S, Robertson EF, et al. Screening the blood supply for West Nile virus RNA by nucleic acid amplification testing. *N Engl J Med*. 2005;353:460–467.
16. Macedo De Oliveira A, Beecham BD, Montgomery SP, et al. West Nile virus blood transfusion-related infection despite nucleic acid testing. *Transfusion*. 2004;44:1695–1699.
17. Kusov Y, Kanda T, Palmenberg A, et al. Silencing of hepatitis A virus infection by small interfering RNAs. *J Virol*. 2006;80:5599–5610.
18. Strauss RG. Leukocyte-reduction to prevent transfusion-transmitted cytomegalovirus infections. *Pediatr Transplant*. 1999;3(Suppl 1):19–22.
19. 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.
20. Ness P, Braine H, King K, et al. Single-donor platelets reduce the risk of septic platelet transfusion reactions. *Transfusion*. 2001;41:857–861.
21. Engelfriet CP, Reesink HW, Blajchman MA, et al. Bacterial contamination of blood components. *Vox Sang*. 2000;78:59–67.
22. Brecher M, Holland PV, Pineda AA, et al. Growth of bacteria in inoculated platelets: implications for bacterial detection and the extension of platelet storage. *Transfusion*. 2000;40:1308–1312.
23. Goodrich RP, Gilmour D, Howenga N, Keil SD. A laboratory comparison of Mirasol PRT treatment and culture of platelet products for addressing bacterial contamination concerns. Unpublished manuscript.
24. Foley MJ, Doherty C, Salami A, et al. Re-testing platelet concentrations for bacterial contamination at day 4 prior to extended storage for 7 days. *Transfusion*. 2007;47(Suppl):38A(S96–04CE).
25. Eder AF, Kennedy JM, Dy B, et al. 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.
26. Blajchman MA, Beckers EAM, Dickmeiss E, et al. Bacterial detection of platelets: current problems and possible resolutions. *Transfus Med News*. 2006;19:259–272.
27. Leiby DA, Rentas FJ, Nelson KE, et al. Evidence of *Trypanosoma cruzi* infection (Chagas' disease) among patients undergoing cardiac surgery. *Circulation*. 2000;102:2978–2982.
28. Kelly DJ, Richards AL, Temenak J, et al. The past and present threat of rickettsial diseases to military medicine and international public health. *Clin Infect Dis*. 2002;34:S145–S169.
29. Young C, Losikoff P, Chawla A, et al. Transfusion-acquired *Trypanosoma cruzi* infection. *Transfusion*. 2007;47:540–544.
30. Dey A, Singh S. Transfusion transmitted leishmaniasis: a case report and review of literature. *Indian J Med Microbiol*. 2006;24:165–170.
31. Kitchen AD, Chiodini PL. Malaria and blood transfusion. *Vox Sang*. 2006;90:77–84.
32. Cardo LJ, Rentas FJ, Kelchum L, et al. Pathogen inactivation of *Leishmania donovani infantum* in plasma and platelet concentrates using riboflavin and ultraviolet light. *Vox Sang*. 2006;90:85–91.
33. Lippert L, Watson R, Doane S, et al. Inactivation of *P. falciparum* by riboflavin and light. *Vox Sang*. 2002;83:163.
34. Rentas F, Harman R, Gomez C, et al. Inactivation of *Orientia tsutsugamushi* in red blood cells, plasma, and platelets with riboflavin and light, as demonstrated in an animal model. *Transfusion*. 2007;47:240–247.

第 5 章

病原体不活化技術（Mirasol PRT）による白血球の不活化

MIRASOL®

病原体不活化技術

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¹。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⁵。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E₂（PGE₂）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。

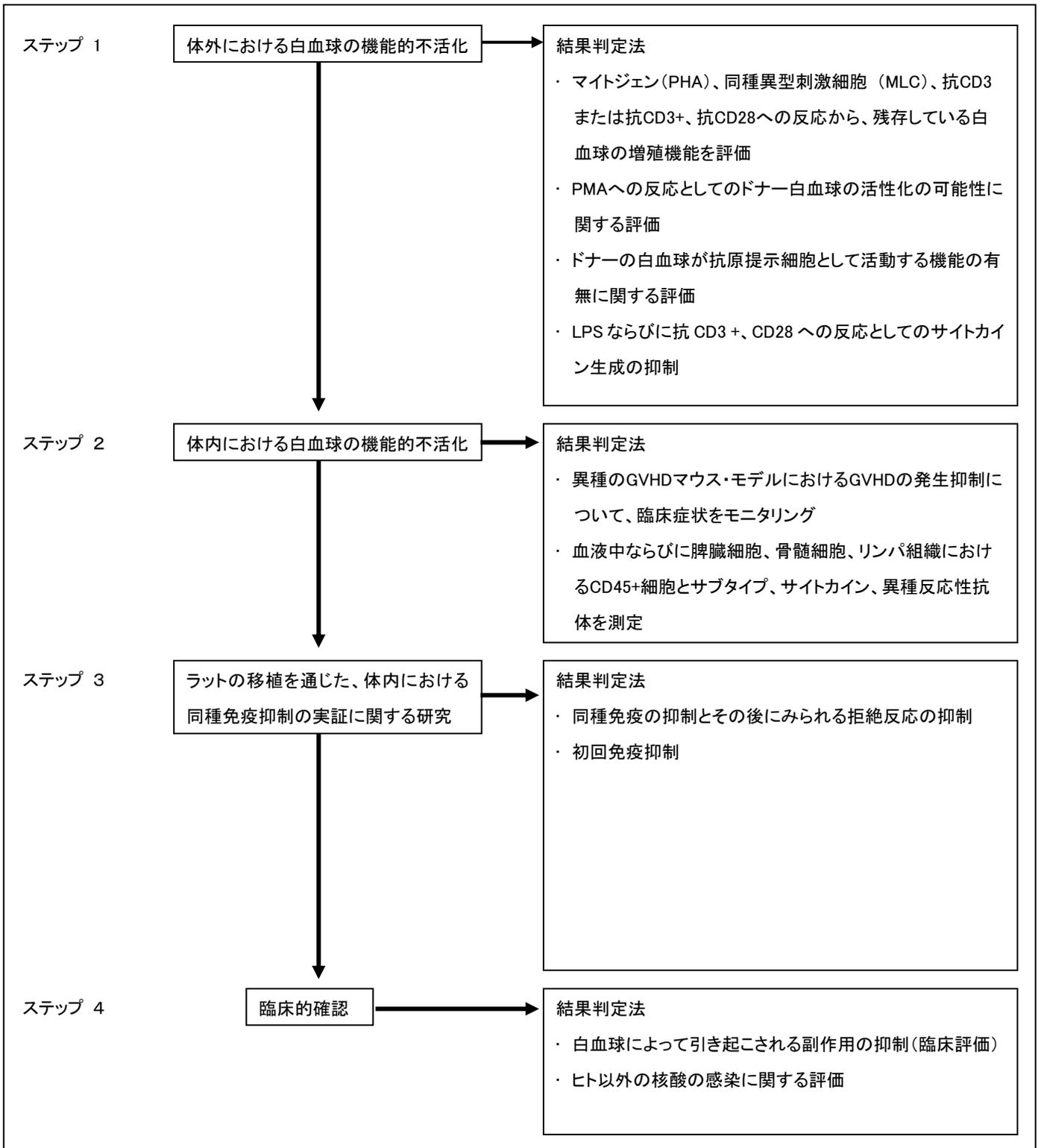
リスクを軽減する目的で使用されているもうひとつの一般的な方法が、ろ過（赤血球除去または赤血球不活化）である。しかしながら、以下を抑制するためのものとしては100%有効なものではない。a) FNHTR、b) ウイルス感染、c) マイクロキメリズム。

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¹³。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+、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+ 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+ならびにCD8+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- γ 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¹⁵。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 [10⁶/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。

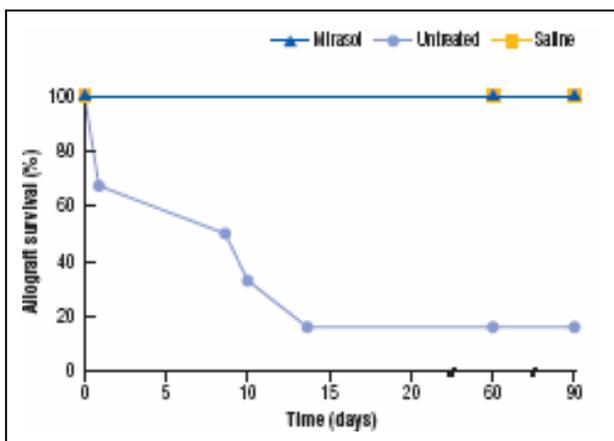
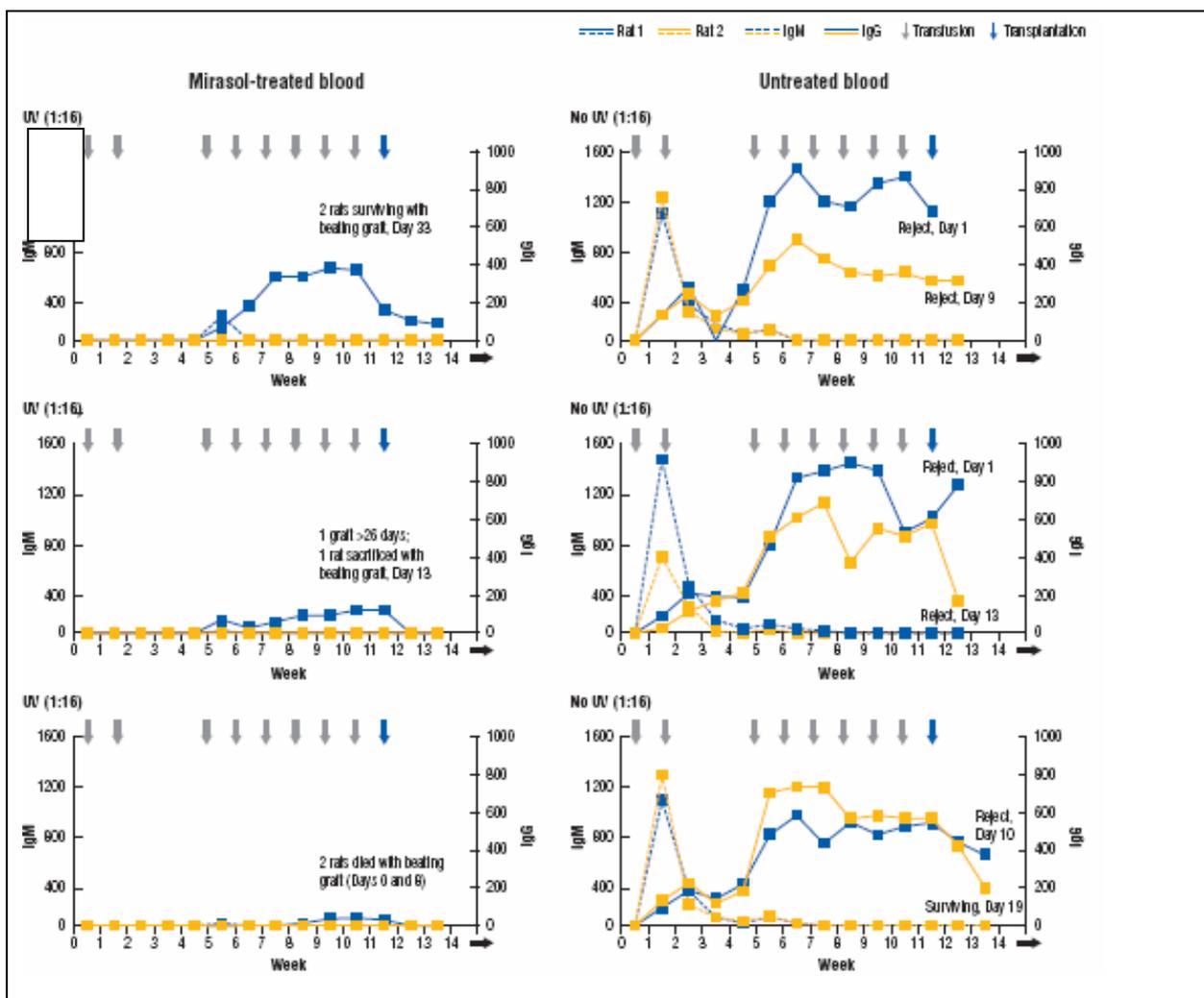


図3. ラットにおける同種免疫移植の生存率に関する研究

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。

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.* 2005;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. Silliman 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 leucodepletion in reducing the incidence of febrile nonhaemolytic 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, 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.
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. Ambuso 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;40:348-352.

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。

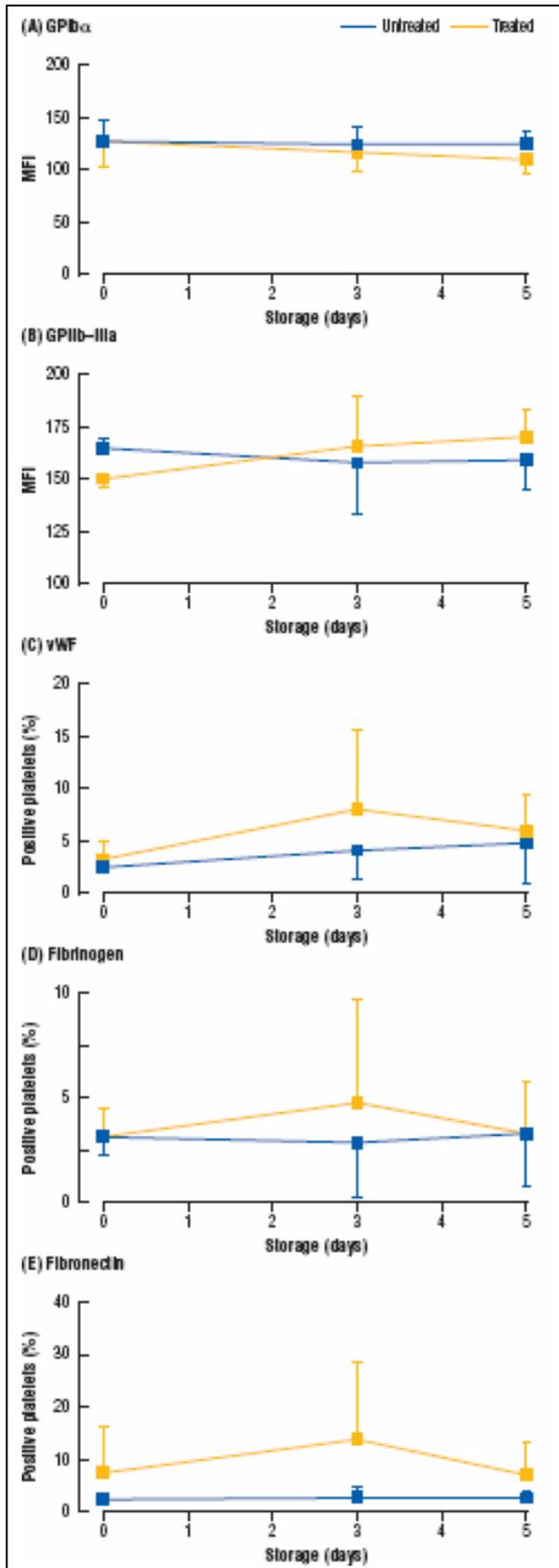


図 1A~E. 5 日間保存中の未処理および Mirasol 処理血小板に対する (A) GPIb α ; (B) GPIIb-IIIa; (C) vWF; (D) フィブリノーゲン; (E) フィブロネクチン存在下でのフローサイトメトリー試験 (平均 \pm SD、n=8)。

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。

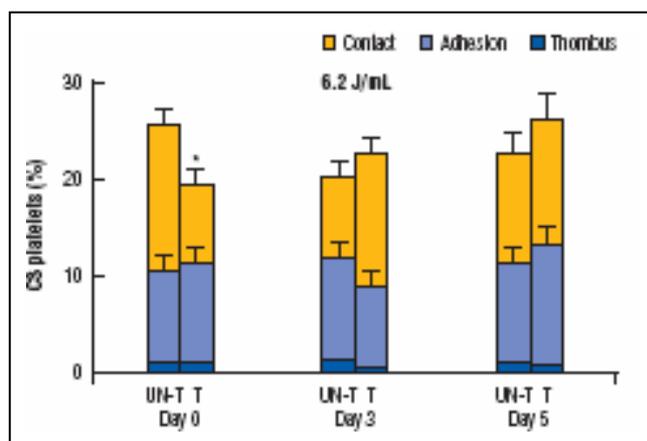


図 2. 5 日間の保存中の未処理血小板 (UN-T) および Mirasol 処理血小板 (T) の接触、接着および血栓形成のパーセンテージで分類した血小板による表面被覆 (CS) パーセンテージ (平均 ± 平均の標準誤差, n=8, * UN-T に対して p < 0.05)。

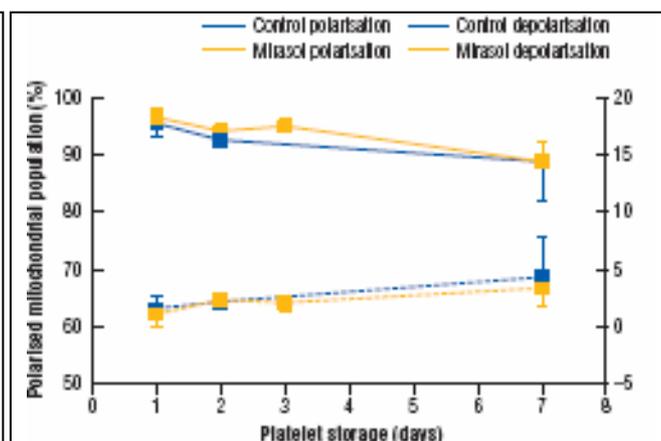


図 3. JC-1 染色アッセイを用いたミトコンドリア膜電位の測定

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、pO₂ および pCO₂、CD62/P-セレクトインの発現、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）。

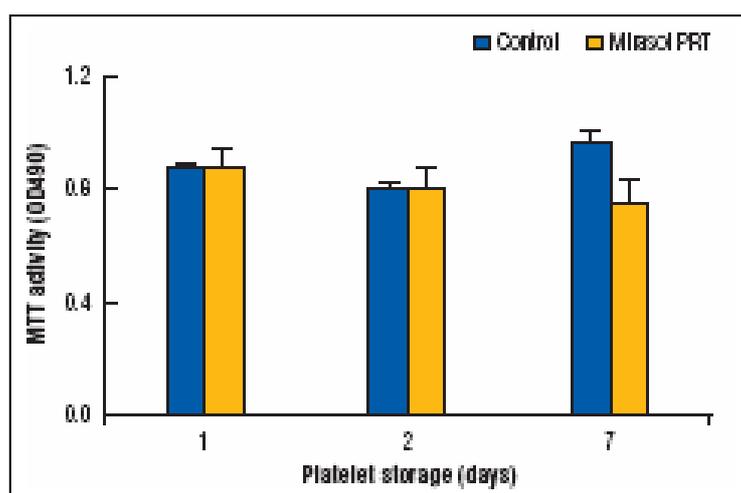


図 4. MTT 低下アッセイを用いたミトコンドリアの酵素活性の評価

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。

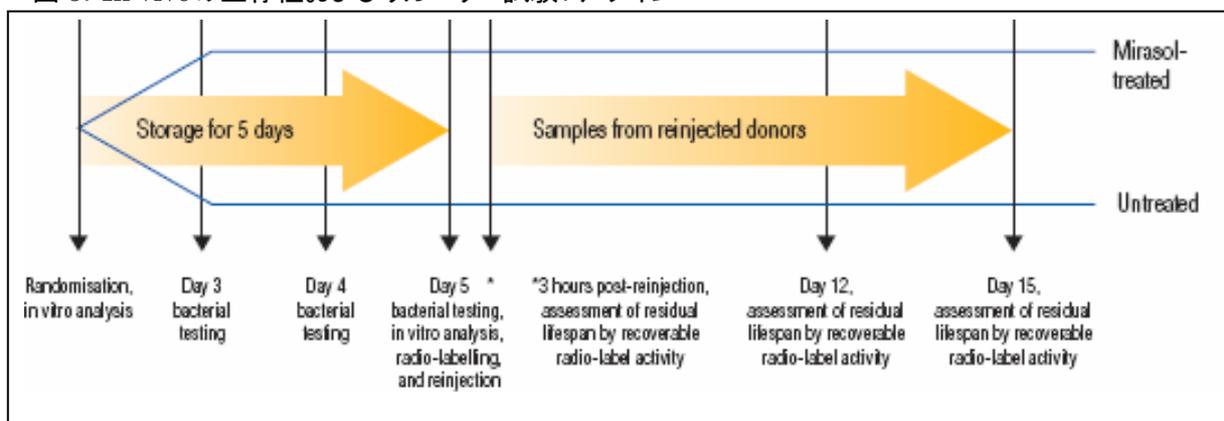
SD: 標準偏差。

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。