

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、混じりけのないレミクロム（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存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性効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 184.1635. 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. Urna K, Grestin 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 und hypervitaminosen. In: Buchner F, Letterer E, Roulet F, eds. *Handbuch der Allgemeinen Pathologie*. Berlin: Springer Verlag; 1962 (Band III):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;79:667-691.
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;46:1883-1885.
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, Rosenkrantz 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, Hanikumar 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 2008.
20. BBRPA. Riboflavin and its Derivatives: Toxicity Profile. 1990:1-7. Available at: <http://www.bibra-information.co.uk> Accessed 28 November 2007.
21. Fouty B, Freman F, Reeves 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. Luzati 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/vitamin2003.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。

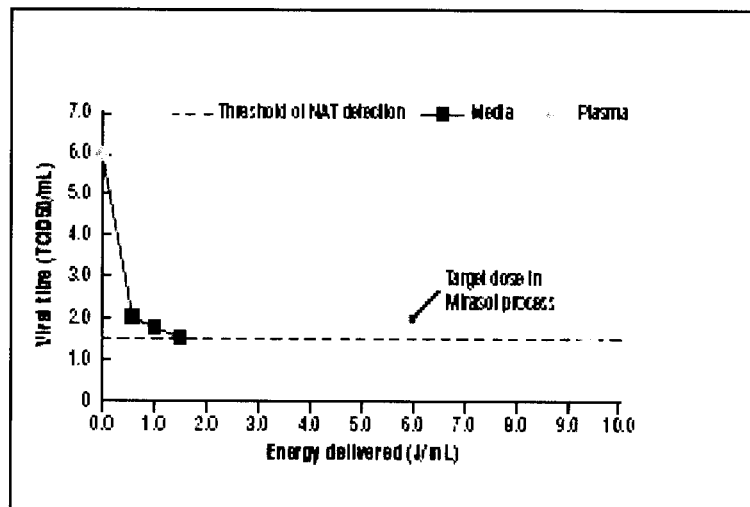


図1. 血漿および媒体における脳心筋炎 (EMC)ウイルスの不活化動力学: Mirasol 処理利用時のウイルス不活化率。

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とも、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

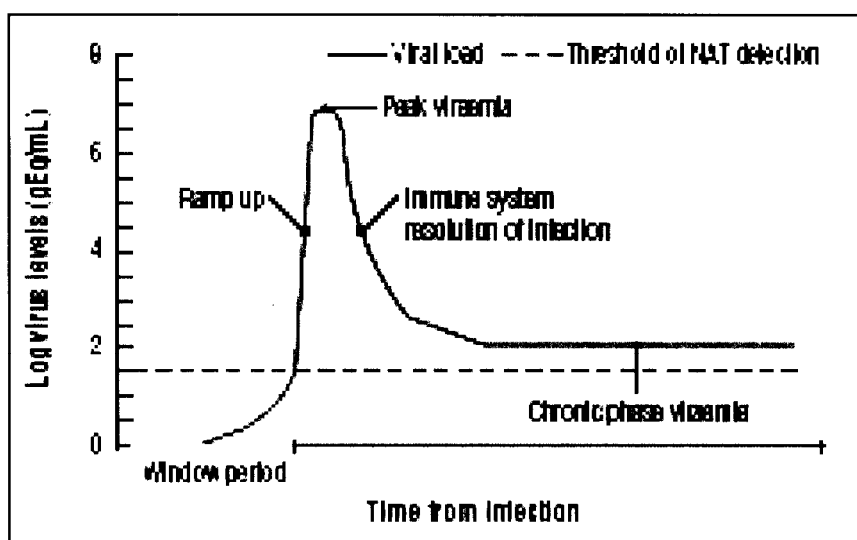


表1. 輸血製剤のウイルス汚染レベル

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ことを意味し、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

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種
- ・ 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かしかな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細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髓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 ウイ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 $7.06 \pm 0.26 \log$ TCID₅₀ 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. ウイルス・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

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

⁹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: 牛下痢性ウイルス; BEV: 牛エンテロウイルス; CMV: サイトメガロ・ウィルス; EMCV: 脳心筋炎ウイルス; HAV: A 型肝炎ウイルス; HBV: B 型肝炎ウイルス; HCV: C 型肝炎ウイルス; HHV: ヒト・ヘルペス・ウィルス; HIV: ヒト免疫不全ウイルス; IBRV: 牛伝染性鼻気管炎ウイルス; PPV: 豚パルボ・ウィルス; SS: 単一ストランド; VSV: 水泡性口内炎ウイルス; 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こと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・ファルシバルム）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・ファルシバルム	>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・ミクロテイ	>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: Q5A 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 (CPMP)ICH/295/35 – Guidance for Industry: Q5A Viral safety evaluation of biotechnology products derived from cell lines of human or animal origin. March 4, 1997.
5. Simer 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, Edlich 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, Edlich 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;41:130–136.
11. Syndou G, Skevaki C, Kafetzis DA. Intrauterine infection with parvovirus B19 and CMV: implications in early and late gestation fetal demise. *Expert Rev Ant 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, Martin 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*. 2005;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;44:1685–1699.
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;41:657–661.
21. Engelbret CP, Feesink 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 irradiated platelets: implications for bacterial detection and the extension of platelet storage. *Transfusion*. 2000;40:1308–1312.
23. Goodrich RP, Gilmour D, Hovenga 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 36A):S66–04E1.
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, Dickreiss E, et al. Bacterial detection of platelets: current problems and possible resolutions. *Transfus Med News*. 2005;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, Loskoff 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 DJ, Rentas FJ, Ketchum 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, Osane 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。