

409-418	1487.82	2	2973.63	K.SQYLNNGPQR.I
428-437	588.77	2	1175.52	R.FMAYTDETFK.T
428-437	626.76	2	1251.50	R.FM(O)AYTDETFK.T
428-439	634.76	2	1267.50	R.FMAYTDETFK.R.E
440-466	503.89	3	1508.65	R.EAIQHESGILGPLLYGEVGD <sup>1</sup> TLIIIFK.N
467 - 489	975.85	3	2924.53	K.NQASRPYNIYPHGITDVRPLYSR.R
472 - 484	544.30	5	2716.46	R.PYNIYPHGITDVR.P
472 - 489	515.59	3	1543.75	R.PYNIYPHGITDVRPLYSR.R
497 - 510	541.02	4	2160.05	K.HLKDFPILPGEIFK.Y
500 - 510	551.97	3	1652.89	K.DFPILPGEIFK.Y
511 - 523	638.33	2	1274.64	K.YKWTVTVEDGPTK.S
513 - 523	508.58	3	1522.72	K.WTVTVEDGPTK.S
532 - 541	616.79	2	1231.56	R.YYSSFVNMER.D
532 - 541	28.2	2	1294.52	R.YYSSFVN(M(O)ER.D
542 - 556	656.27	2	1310.52	R.DLASGLIGPLLI <sup>1</sup> CYK.E
542 - 562	817.42	2	1632.82	R.DLASGLIGPLLI <sup>1</sup> CYKESVDQR.G
563 - 570	783.40	3	2347.18	R.GNQIMSDK.R
563 - 571	446.70	2	891.38	R.GNQIMSDKR.N
572 - 583	524.75	2	1047.48	R.NVILFSVFDENR.S
572 - 593	726.86	2	1451.70	R.NVILFSVFDENRSWYL <sup>1</sup> TENIQR.F
584 - 593	915.11	3	2742.31	R.SWYL <sup>1</sup> TENIQR.F
662 - 698	655.31	2	1308.60	K.MVYEDTLTLPFSGETVFMSPENPGLWILG <sup>1</sup> CHNSDFR.N
734 - 740	1086.16	4	4340.62	K.NNAIEPR.S
741 - 747	407.20	2	812.38	R.SFSQNSR.H
769 - 776	413.18	2	824.34	K.TDPWFAHR.T
863 - 872	515.23	2	1028.44	K.LGTTAATELK.K
925 - 946	502.77	2	1003.52	K.KSSPLTESGGPLSLSEEN <sup>1</sup> NDK.L
926 - 946	27.1	3	2275.03	K.SSPLTESGGPLSLSEEN <sup>1</sup> NDK.L
947 - 962	716.65	3	2146.93	K.LLESGLMNSQESSWGK.N
947 - 962	883.40	2	1764.78	K.LLESGLM(O)NSQESSWGK.N
978 - 986	891.40	2	1780.78	R.AHG <sup>1</sup> PALLTK.D
1012 - 1041	454.26	2	906.50	R.KTHIDG <sup>1</sup> PSLJIENS <sup>1</sup> PSVWQNI <sup>1</sup> ESDTEFKK.V
1013 - 1040	685.94	5	3424.66	K.THIDG <sup>1</sup> PSLJIENS <sup>1</sup> PSVWQNI <sup>1</sup> ESDTEFK.K
1042 - 1049	1057.16	3	3168.46	K.VTPLIHDR.M
1073 - 1080	475.76	2	949.50	K.NMEMVQQK.K
	504.22	2	1006.42	

1073 - 1080	17.5	512.22	2	1022.42	K.NM(O)EMVQQK.K
1081 - 1098	34.5	673.31	3	2016.91	K.KEGIPPPDAQNPDMMSFFK.M
1082 - 1098	38.2	945.42	2	1888.82	K.EGIPPPDAQNPDMMSFFK.M
1099 - 1107	31.7	532.27	2	1062.52	K.MLFLPESAR.W
1099 - 1107	26.6	540.27	2	1078.52	K.M(O)LFLPESAR.W
1116 - 1127	4.2	593.28	2	1184.54	K.NSLNSGQGPSPK.Q
1128 - 1136	2.9	485.77	2	969.52	K.QLVSLGPEK.S
1137 - 1147		619.29	2	1236.56	K.SVEGQNFLSEK.N
1165 - 1172	15.2	484.71	2	967.40	K.EM(O)VFPSSR.N
1193 - 1200	7.5	508.77	2	1015.52	K.KIQEEIEK.K
1193 - 1201	41.0	572.81	2	1143.60	K.KIQEEIEKK.E
1194 - 1200	8.4	444.72	2	887.42	K.IQEEIEK.K
1194 - 1201	4.0	508.77	2	1015.52	K.IQEEIEKK.E
1202 - 1221	40.6	740.73	3	2219.17	K.ETLIQENVVLPQIHVTGT.K.N
1226 - 1233	33.9	482.27	2	962.52	K.NLFLSTR.Q
1234 - 1252	41.0	710.32	3	2127.94	R.QNVEGSYDGAYAPVLQDFR.S
1264 - 1270	2.7	414.20	2	826.38	K.HTAHFSK.K
1271 - 1285	19.6	549.25	3	1644.73	K.KGEEENLEGLNQTK.Q
1297 - 1310	21.1	810.39	2	1618.76	R.ISPNTSQQNFVTQR.S
1320 - 1329	25.6	600.80	2	1199.58	R.LPLEETELEK.R
1320 - 1330	23.7	452.91	3	1355.71	R.LPLEETELEKR.I
1331 - 1342	25.3	696.83	2	1391.64	R.IIVDDTSTQWSK.N
1346 - 1360	28.1	587.28	3	1758.82	K.HLTPSTLTQIDYNEK.E
1363 - 1376	30.5	760.34	2	1518.66	K.GAITQSPLSDCLTR.S
1377 - 1385	3.3	505.25	2	1008.48	R.SHSIPQANR.S
1393 - 1400	22.4	446.73	2	891.44	K.VSSFPSIR.P
1393 - 1406	37.8	545.97	3	1634.89	K.VSSFPSIRPIYLTR.V
1425 - 1439	22.6	530.57	3	1588.69	K.DSGVQESSHFLQGAK.K
1458 - 1473	22.9	807.38	2	1612.74	R.EVGLGTSATNSVTYK.K
1474 - 1487	24.7	526.63	3	1576.87	K.KVENTVLPKPDLPK.T
1475 - 1487	26.9	483.93	3	1448.77	K.KVENTVLPKPDLPK.T
1535 - 1543	5.6	536.25	2	1070.48	K.WNEANRPGK.V
1561 - 1577	42.2	660.99	3	1979.95	K.LLDPLAWDNHYGTQPK.E
1596 - 1628	46.5	910.17	4	3636.65	K.DTILSLNACESNHAIAINEGQNKPEIEVTWAK.Q
1535 - 1644	19.6	578.78	2	1155.54	R.LCSQNPVVK.R
1653 - 1673	35.9	1270.5	3	3808.54	R.TTLQSDQEEIIDY(SO <sub>3</sub> )DDTISVEMK.K

1674 - 1689	25.3	667.27	3	1998.79	1	K.KEDFDIYDEDENQSPR.S
1674 - 1689	25.2	1040.38	2	2078.74	1	K.KEDFDIY(SO <sub>3</sub> )DEDENQSPR.S
1697 - 1705	22.7	553.28	2	1104.54		R.HYFIAAVER.L
1706 - 1719	32.5	549.92	3	1646.74		R.LWDYGMSSSPHVL.R.N
1706 - 1719	28.6	555.26	3	1662.76		R.LWDYGM(O)SSSPHVL.R.N
1722 - 1731	16.4	524.76	2	1047.50		R.AQSGSVPPQFK.K
1733 - 1749	45.1	678.65	3	2032.93		K.VVFQFTDGSFTQPLYR.G
1750 - 1764	40.8	560.96	3	1679.86		R.GELNEHLGLLGPYIR.A
1765 - 1776	34.3	712.33	2	1422.64		R.AEVEDNIMVTFR.N
1765 - 1776	30.2	720.33	2	1438.64		R.AEVEDNIM(O)VTFR.N
1777 - 1797	44.1	847.37	3	2539.09		R.NQASRPYSFYSSLISYEEDQR.Q
1782 - 1797	45.6	661.96	3	1982.86		R.PYSFYSSLISYEEDQR.Q
1804 - 1813	3.2	402.23	3	1203.67	1	R.KNFVKPNETK.T
1805 - 1813	6.2	538.77	2	1075.52		K.NFVKPNETK.T
1819 - 1833	16.0	461.69	4	1842.73	1	K.VQHHM <del>A</del> PTKDEFDCK.A
1828 - 1833	7.3	407.64	2	813.26		K.DEFDCK.A
1834 - 1845	40.2	722.32	2	1442.62		K.AWAYFSDVDLEK.D
1834 - 1869	52.8	801.6	5	4002.95	1	K.AWAYFSDVDLEKDVHSGLIGPLLVCHTNTLPAHGR.Q
1846 - 1869	37.6	645.57	4	2578.25		K.DVHSGLIGPLLVCHTNTLPAHGR.Q
1870 - 1897	61.9	721.68	3	2162.02		R.QVTVQEFALFFTFIDETK.S
1888 - 1897	33.3	681.78	2	1361.54		K.SWYFTENMER.N
1888 - 1897	28.3	689.77	2	1377.52		K.SWYFTENM(O)ER.N
1901 - 1913	29.1	776.32	2	1550.62		R.APCNIQMEDPTFK.E
1901 - 1913	23.9	784.32	2	1566.62		R.APCNIQM(O)EDPTFK.E
1901 - 1917	29.9	705.30	3	2112.88	1	R.APCNIQMEDPTFKENYR.F
1901 - 1917	25.9	710.63	3	2128.87	1	R.APCNIQM(O)EDPTFKENYR.F
1918 - 1939	50.8	830.73	3	2489.17		R.FHAINGYIMDTLPGLVMAQDQR.I
1942 - 1966	48.4	587.07	5	2930.31		R.WYLLSMGSNENIHSFHSGHVFTVR.K
1973 - 1992	55.7	768.04	3	2301.10		K.MALYNLYPGVFETVEMLPSK.A
1973 - 1992	53.7	773.37	3	2317.09		K.M(O)ALYNLYPGVFETVEMLPSK.A
1998 - 2020	51.0	655.56	4	2618.21		R.VECLIGEHLHAGMSTLFLVYSNK.C
2021 - 2033	26.1	476.88	3	1427.62		K.CQTPLGMASGHIR.D
2034 - 2049	36.5	898.90	2	1795.78		R.DFQITASGQYQWAPK.L
2053 - 2065	26.1	488.57	3	1462.69		R.LHYSGSINAWSTK.E
2066 - 2072	32.0	453.73	2	905.44		K.EPFSWIK.V
2073 - 2085	43.8	473.94	3	1418.80		K.VDLLAPMIHGIK.T

2091 - 2111	53.8	624.81	4	2495.21	R.QKFSSLYISQFIIMYSLDGKK.W
2093 - 2110	58.8	1056.52	2	2111.02	K.FSSLYISQFIIMYSLDGK.K
2093 - 2111	56.2	747.38	3	2239.12	K.FSSLYISQFIIMYSLDGKK.W
2111 - 2116	8.8	441.22	2	880.42	K.KWQTYR.G
2137 - 2147	31.2	646.34	2	1290.66	K.HNIFNPPIIAR.Y
2151 - 2159	11.2	562.29	2	1122.56	R.LHPHYSIR.S
2164 - 2183	44.6	1146.42	2	2290.82	R.MELMGCDLNSCSMPLGMESK.A
2184 - 2207	55.1	875.39	3	2623.15	K.AISDAQITASSYFTNMFATWSPSK.A
2184 - 2207	49.2	880.72	3	2639.14	K.AISDAQITASSYFTNM(O)FATWSPSK.A
2216 - 2227	17.5	470.9	3	1409.68	R.SNAWRPQVNNPK.E
2228 - 2236	34.3	596.78	2	1191.54	K.EWLQVDFQK.T
2240 - 2249	8.9	495.27	2	988.52	K.VTGVTQTQVK.S
2250 - 2258	31.6	521.27	2	1040.52	K.SLLTSMYVK.E
2250 - 2258	25.2	529.27	2	1056.52	K.SLLTSM(O)YVK.E
2259 - 2279	49.1	823.71	3	2468.11	K.EFLISSODGHQWTLFFQNGK.V
2282 - 2304	47.7	848.75	3	2543.23	K.VFQGNQDSFTPVVNSLDPPLLTR.Y
2308 - 2320	31.0	528.95	3	1583.83	R.IHPQSWVHQIALR.M
2321 - 2332	38.0	714.78	2	1427.54	R.MEVLGCEAQDLY.-

表 2. ヒト血液凝固第 VIII 因子の LC/MS/MS で検出した N 結合型糖鎖結合糖ペプチド

Domain	Site	Position	Peptide sequence	Mass	Previously reported N-linked glycans	Composition of detected N-linked glycans						
A1 domain	42	37-47	SFPFNTSVVYK	1287.65	Complex	N4H5F1	N4H5S1F1	N4H5S2F1	N5H6S3F1			
	239	231-240	MHTVNGYVNR	1189.57	High mannose, Hybrid, and Complex	N2H5	N2H6	N2H7	N3H5	N3H6		
A2 domain B domain	582	572-583	NVILFSVFDENR	1451.74	Not glycosylated	Not glycosylated						
	757	755-768	QFNATTIPENDIEK	1618.78	Complex	N4H5S1F1	N4H5S2F1					
	784	782-795	IQNVSSDLLMLLR	1587.87	Complex	N4H5F1	N4H5S1F1	N4H5S2F1	N5H6S1F1	N5H6S2F1	N5H6S3F1	
	828	813-858	YETFDSPGAIDSNNSLSEMTFRPQLHHSQDMVFTPEGLQLR	5146.35	Complex	N6H7S3F1	N6H7S4F1					
	900	878-924	VSSTSNLISITPSDNLAAAGTDNTSSLGPPSPMPVHYDSQLDITLFGK	4849.32	Complex	Not detected						
	943	926-946	SSPLTESGGPLSLEENDDSK	2146.99	Not glycosylated	Not glycosylated						
	963	963-971	NVSSITESGR	935.43	Complex	N4H5S1F1	N4H5S2F1	N5H6S2F1	N5H6S3F1			
	1001	1000-1002	TNK	361.2	Complex	Not detected						
	1005	1003-1011	TSNNSATNR	963.44	Complex	N4H5S1F1	N4H5S2F1	N5H6S1F1	N5H6S2F1			
	1055	1050-1060	MLMDKNATALR*	1262.65	Complex	N4H5F1	N4H5S1F1	N4H5S2F1	N5H6S1F1	N5H6S2F1	N5H6S3F1	
	1066	1061-1067	LNHMSNK	842.41	Complex	N6H7S2F1	N6H7S3F1					
	1185	1173-1192	NLFLTNLDNLHENHINHQEK	2407.15	Complex	N4H5F1	N4H5S1F1	N4H5S2F1	N5H6S2F1	N5H6S3F1		
	1255, 1259	1253-1260	SLNDSTNR	905.42	Complex	N4H5S1F1	N4H5S2F1	N8H10S2F2	N8H10S3F2	N9H11S3F2		
	1282	1271-1285	KGEEENLEGLGNQTK	1644.8	Complex	N4H5F1	N4H5S1F1	N4H5S2F1	N5H6S1F1	N5H6S2F1	N5H6S3F1	
	1300	1297-1310	ISPNTSQNFVTQR	1618.81	Complex	N4H5S1F1	N4H5S2F1					
	1384	1377-1385	SHSIQANR	1008.51	Not glycosylated	Not glycosylated						
	1412	1407-1422	VLFDQNSSHLPAASYR	1803.89	Complex	N4H5S1F1	N4H5S2F1	N5H6S2F1	N5H6S3F1			

1442	1440-1457	KNNLSLAILTLEMTGDQR	2016.07	Complex	N4H5F1	N4H5S1F1	N4H5S2F1		
1512	1504-1534	DLFPTETSNQSPGHLDLVEGSLQQTGGAIK	3181.58	Potential	Not detected				
	1675-1689	EDFDIYDEDEENQSPR	1870.75	Not glycosylated	Not glycosylated				
A3C1C2	1804-1813	KNFVKPNETK	1203.66	Complex	N4H5F1	N4H5S1F1	N4H5S2F1		
2118	2117-2136	GNSTGTLMVFFGNVDSSGIK	2029.98	High mannose	N2H8	N2H9			

\*、N 結合型糖鎖と O 結合型糖鎖の両方が結合している可能性がある。

表 3. ヒト血液凝固第 VIII 因子の O 結合型糖鎖結合部位を含むと推定されたペプチド及び実際に検出した糖ペプチド

Position	Potential O-linked glycopeptide Peptide sequence	Mass	Deduced from*		Detected O-linked glycans Compositions
360-372	FDDNSPSFIQIR	1552.72	β		Not detected
428-437	FMAYTDETFK	1251.55	β		Not detected
513-523	WTVTVEDGPTK	1231.61	β		Not detected
769-781	TDPWFAHRTPMPK	1582.77	HN	2HN	NIH1S1 NIH1S2
796-812	QSPTPHGLSLSDLQEAK	1806.91	HN	2HN	NIH1S1 NIH1S2
863-872	LGTTAATELK	1003.55	HN	2HN	2(NIH1)S3 2(NIH1)S4
926-946	SSPLTESGGPLSLSEENNSK	2146.99	4-6β	ME	Not detected
1013-1040	THIDGSPLLIENSPVWQNILESDTEFK	3168.56	4β		Not detected
1042-1049	VTPLIHDR	949.53	HN		Not detected
1128-1136	QLVSLGPEK	969.55	HN	β	Not detected
1297-1310	ISPNTSQQNFVTQR	1618.81	HN		Not detected
1331-1342	IIVDDTSTQWSK	1391.69	HN	2HN	NIH1S2
			β	ME	
1346-1360	HLPSTLTQIDYNEK	1758.88	HN	2HN	NIH1S1 NIH1S2
1363-1376	GAITQSP LSDCLTR	1518.73	HN	2HN	NIH1S1 NIH1S2
1458-1473	EVGSLGTSATNSVTYK	1612.79	HN	2HN β	NIH1S2
1475-1487	KVENTVLPKPDLPK	1576.92	HN		NIH1S2
1561-1577	LLDPLAWDNHYGTQIPK	1980.01	HN		NIH1S2

\*, HN, ・及び ME: それぞれ, ヘキソサミン付加ペプチド, ・脱離したペプチド, 2メルカプトエタノール付加したペプチドとして検出した.

ウイルス不活化技術の血小板製剤への影響評価に関する研究

研究分担者 石井明子 国立医薬品食品衛生研究所 生物薬品部 第二室長

輸血用血液製剤の更なる安全性の向上に向けて導入の検討が進められているリボフラビンを用いた病原体不活化技術について、病原体不活化能、及び血小板への影響の観点から、有用性と解決すべき課題について検討した。

- (1) 病原体不活化能に関しては、一般には不活化が困難であるとされる小型ノンエンベロープウイルスを含めウイルス不活化が可能であること、細菌や寄生虫の不活化も可能であることが示されており、検査が実施されていない病原体による有害事象発生のリスク低減に資するものと考えられた。
- (2) 血小板への影響に関しては、不活化処理後、活性化型 GPIIb/IIIa 陽性率が一時的に上昇し、その後、経時的に p-セレクトリン陽性率が上昇することが報告されている。p-セレクトリン陽性率の上昇は、血小板活性化につながる変化が製剤中で生じていることを反映していると考えられることから、p-セレクトリン陽性の血小板を投与することの安全性を評価すると共に、血小板活性化につながる製剤成分の変化を明らかにする必要があると考えられた。

病原体不活化技術は、検査が実施されていない病原体や、ウインドウ期の病原体の不活化に有用であると考えられるものの、全ての病原体混入のリスクをゼロにできるものではない。一方で、不活化処理に伴う製剤の品質の変化や新たな有害事象の発生というリスクが生じる。また、不活化技術の導入に当たっては、製法の変更や技術導入に伴う規格試験法の変更など多くの費用が必要とされることから、導入の効果と付随するリスク等を十分考慮する必要がある。リボフラビンを用いた不活化技術導入の可否判断には、臨床試験による安全性評価の実施が必須であり、承認後においてもどのようなケースで不活化処理をした製剤を使用するのかの判断も求められる。また、市販後も安全性に関する十分な調査が必要であると考えられる。

A. 研究目的

輸血用血液製剤の安全性確保のためには、ウイルスや細菌等の感染性因子の混入防止と、免疫応

答により生じる有害作用に関する対策が必要となる。これまで感染性因子の混入防止の観点では、十分な皮膚消毒と初流血除去法の採用による皮



膚常在菌混入の防止や NAT 試験による混入ウイルスの検出等により、安全性向上が図られてきた。また、免疫反応に関わる有害作用の防止に関しては、保存前白血球除去や $\gamma$ 線照射の実施等による安全性向上が図られてきている。これらの努力に続き、現在、厚生労働省では、輸血用血液製剤のさらなる安全性の向上を求めて、病原体不活化技術の導入に関する検討が進められている。

輸血用血液製剤の病原体不活化技術のうち、実用化に近い段階まで開発されているものは、血漿製剤あるいは血小板製剤を対象とした技術である。これまで、メチレンブルー、アモトサレン、リボフラビンをを用いた方法の有用性について、厚生労働省薬事・食品衛生審議会血液事業部会を中心に検討が重ねられ、平成 20 年度には血液事業部会運営委員会・安全技術調査会合同委員会において、日赤が血小板製剤への不活化技術の導入に向けて準備を開始することが了承された。さらに同年、血液事業部会において、不活化剤の安全性及び我が国の血小板製剤への適合性等の観点から、リボフラビンをを用いた技術を重点的に評価することが表明された（平成 21 年 12 月 10 日血液事業部会運営委員会資料）。血小板製剤は、常温で浸透保存されるために細菌の混入及び増殖が問題となりやすく細菌感染症が発症した場合に重篤化しやすいため、細菌の不活化技術の導入による安全性向上や保存期間の延長の可能性が考えられている。

現在開発されている病原体不活化技術は、核酸を標的とする方法であり、輸血用血液製剤に含まれる有核細胞である白血球も不活化することができる。したがって、不活化技術導入の効果として期待されることは、献血検査が実施されていない病原体やスクリーニング検査で検出されなかった病原体の不活化、及び免疫応答により生じる

とされている TRALI（輸血関連急性肺障害）等の有害作用発生頻度の低減である。

本研究ではこれらの背景を踏まえ、リボフラビンをを用いた血小板製剤の病原体不活化技術に関して、(1)病原体不活化能、(2)血小板への影響、(3)白血球への影響を考察する。本年度は(1)病原体不活化能および(2)血小板への影響について検討し、導入の可否判断に必要な要件を考察した。

## B. 方法

厚生労働省より公表されている薬事・食品衛生審議会の議事録及び配布資料、科学雑誌に掲載された論文、開発企業からの公開情報から情報を収集した。

## C. 結果

### C.1. リボフラビンをを用いた病原体不活化技術の概略

Stramer らの総説<sup>1)</sup>を参考に、リボフラビンをを用いた病原体不活化技術の概略を述べる (Fig. 1)。リボフラビンをを用いた不活化システムは、紫外線照射用バッグ、リボフラビン溶液、紫外線照射装置から構成される。不活化のための操作としては、まず、血液製剤を紫外線照射用のバッグに移し、500  $\mu$ M のリボフラビン溶液 35mL を添加する。次に、バッグを紫外線照射装置に入れ、265～370nm の紫外線 (6.2 J/cm<sup>2</sup>) を 6～10 分間照射する。リボフラビンはビタミン B であり、その代謝物も血中に存在するものであること<sup>2)</sup>、リボフラビンやその代謝物に毒性はないと考えられていることから<sup>3)</sup>、照射後にリボフラビンを除去する工程は設けられておらず、不活化処理後にそのまま製剤として用いられる。

リボフラビン法による病原体不活化には、紫外線による核酸損傷効果と、光励起リボフラビンと核酸塩基対の接触による電子移動反応に基づく核酸（主としてグアニン）損傷の2つの機構が関与しているとされている<sup>4)</sup>。リボフラビンの照射により活性酸素種が発生する可能性もあるが<sup>5)</sup>、Mirasol システムでは処理前に袋を真空状態にし、核酸に結合した状態の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、活性酸素種の発生を防ぐ仕組みになっているとされている。また、血小板製剤に含まれ、免疫応答の原因となる白血球は有核細胞であることから、リボフラビンおよび紫外線照射により不活化されるとされている。

リボフラビンを用いる不活化法に関しては、上記の第一世代に続き、血漿除去により高濃縮した血小板にリボフラビンを添加して不活化処理を行い、処理後に血小板用添加液（PAS）を加える第二世代、さらに、採血時に PAS 置換してリボフラビンを添加し不活化処理を行う第三世代の方法も開発されている。これら第二世代、第三世代の方法では血漿を別に多く確保できる利点があるが、現在我が国の献血事業で用いられている採血機器とは異なる機器が必要である。そのため、我が国に血液事業に採用する場合は、新たな採血機器を導入せずに実施が可能な第一世代が現実的であると考えられている<sup>6)</sup>。

## C.2. リボフラビンの病原体不活化能

輸血用血液製剤に混入する可能性がある病原体には、ウイルス、細菌、寄生虫が考えられる<sup>7-10)</sup>。これらのうち、献血時に全ての検体について検査が実施されているのはウイルスの一部であり、無菌試験は血清生化学検査で規格外となった製品を利用して実施されている。

### C.2.1. ウイルス不活化

リボフラビン法のウイルス不活化能に関しては、製剤に混入する可能性のあるウイルスを念頭に、試験するウイルスが選択され不活化が可能か調べられている。部会参考資料<sup>11)</sup>として報告されている不活化能の試験結果を、バイオ医薬品のウイルス安全性確保の考え方と同様に、関連ウイルス、特異的モデルウイルス、及び非特異的モデルウイルスに分類して記す。

（\*はノンエンベロープウイルス。数字はクリアランス指数（log）を示す。）

#### ・関連ウイルス

ヒト免疫不全ウイルス（HIV）：5.9

西ナイルウイルス（WNV）：5.2

\*A 型肝炎ウイルス（HAV）：2.0

B 型肝炎ウイルス（HBV）：2.5

インフルエンザウイルス：>5.3

#### ・特異的モデルウイルス

\*豚パルボウイルス：>5.0

シンドビスウイルス：3.2

#### ・非特異的モデルウイルス

脳心筋炎ウイルス（EMCV）：3.2

牛エンテロウイルス（BEV）：3.0

これらの結果から、リボフラビン法により、輸血用血液製剤に混入する可能性のあるウイルスを不活化できることが分かる。また、HAV やパルボウイルス等、不活化が難しい小型ノンエンベロープウイルスを不活化できる点がリボフラビン法の特徴の一つであるとされている。パルボウイルスのクリアランス指数はエンベロープウイルスに匹敵するレベルであり、同様の結果が文献でも報告されている<sup>8)</sup>。わが国で実施されている献血サンプルのウイルス検査は、HBV、HCV、HIV、HTLV-1、ヒトパルボウイルス B19 で計5分類であるが、ウイルス検査での検出が困難なウインド

ウ期があることや、これらのウイルス以外の混入の可能性を考えると、リボフラビンによる不活化は、ウイルス混入リスクの低減に有効であると考えられる。

### C.2.2. 細菌不活化

細菌感染症は輸血用血液製剤の使用に伴って生じる有害事象の中でも最も重大なものであり、海外での汚染の発生頻度は0.08~0.22% (1:1230~1:454) との報告もある<sup>12)</sup>。特に、血小板は20~24℃で浸とうしながら貯蔵するため、細菌が増殖しやすいという問題がある。我が国では、輸血用血液製剤の無菌試験は、生化学検査で規格外となった製品を利用して実施されているが、GMP適合条件下で出発原料から製造される一般の医薬品と比較すると、輸血用血液製剤の原料である血液の採取状況は個々の採血の状況により異なるため、一部の製品の検査で全製品の無菌性を保証することは困難である。また、白血球除去フィルター導入前は、製剤中に含まれる白血球の殺菌作用により細菌の増殖が抑えられていたが、現在では免疫反応による有害事象発生を低減するため白血球除去フィルターを用いた白血球除去が行われており、白血球による細菌の増殖抑制が望めなくなっている。これらのことを考えると、不活化技術の導入は、輸血用血液製剤からの細菌感染リスクの低減のために一定の有効性があると期待されている。

リボフラビン法に関して文献では、製剤に混入するリスクのある黄色ブドウ球菌、表皮ブドウ球菌、セレウス菌等のグラム陽性菌、及び大腸菌等のグラム陰性菌、計13種類20系統について、実際に起こりえる汚染レベルを考慮し、製剤あたり20CFU以下をスパイクして不活化効果を調べた結果が報告されている<sup>9)</sup>。リボフラビン法による各細菌の不活化試験結果(%)に、これまでの血液安全監視により報告されている各細菌の汚染

発生頻度を乗じた値を合計して算出した overall effectiveness は98%とされている。

全ての検体での無菌試験の実施が困難であることを考えると、リボフラビン法による細菌不活化は輸血用血液製剤の安全性向上に貢献可能であり、無菌性の向上の観点からは血小板製剤では有効期間の延長が可能になることも考えられる。

### C.2.3. 寄生虫

寄生虫感染したヒトからの献血により、輸血用血液製剤を介して患者が寄生虫に感染するリスクがあるとされているが、寄生虫のスクリーニングは行われておらず、これまでに、トリパノゾーマ、リーシュマニア、ファルシパルム(マラリア)などの感染例があるとされている<sup>11)</sup>。リボフラビンによる寄生虫不活化のログリダクション係数として、リーシュマニアの原因となるドノヴァン・リーシュマニアでは5.0以上、マラリアの原因となるプラスモディウム・ファルシパルムでは2.0以上、シャーガス病の原因となるクルーズ・トリパノゾーマでは6.0以上、ツツガ虫病の原因となるオリエンティア・ツツガでは6.0以上、バベシア病の原因となるバベシア・マイクロディでは5.0以上という試験結果が報告されている<sup>7, 10, 13-15)</sup>。現在、献血時に寄生虫に関する検査は実施されていないため、不活化工程の導入は安全性の向上に有効であると考えられる。

### C.3. リボフラビンによる不活化工程の血小板への影響

血小板は機械的な刺激や温度変化により活性化され、粘着や凝集を起こしやすくなるため、血小板製剤調製時には活性化を最小限にとどめる配慮が必要である。しかし、リボフラビンを用いた不活化処理を施された血小板製剤では、保存期

間中に血小板が活性化されることが報告されている。

Perez-Pujol らの論文<sup>16)</sup>では、リボフラビンによる不活化処理をした血小板を用いて、保存3日目および5日目に血小板表面分子発現と血小板機能(血管への接着・粘着・凝集)が検討されている。不活化処理を施した血小板では、血小板活性化マーカーである p-selectin、lysosomal integral membrane protein(LIMP)の血小板表面発現が経時的に上昇し、annexin V の結合も上昇している。紫外線照射量が高い方がその上昇は顕著である。しかし摘出ウサギ大動脈を用いた灌流実験により、血小板製剤中の血小板機能を調べた結果では、不活化処理による内皮下層への血小板の接着、粘着、凝集の上昇は観察されていない。高エネルギー紫外線照射群で5日目に接着、粘着、凝集の低下が認められたが、その他では血小板機能がほぼ保たれていることを示す結果となっている。文献上は、保存期間中に低下することが知られている血小板機能が、不活化操作により維持されている可能性が考察されており、血小板活性化が良い影響を与えていると考えられているようである。

上記文献では、対照群が“unilluminated”と記載されており、未処理検体であるのか紫外線照射をしない対照であるのかが明確でない。一方、本不活化技術を評価するための日本赤十字社の検討では、未処理検体を対照とした実験が行われている。Fig.2は、平成21年12月24日血液事業部会資料4-6として、日本赤十字社より報告されたデータをグラフ化したものである。Fig.2(A)のデータでは、p-セレクトリン陽性率の経時的な上昇が確認されているが、これは、初期活性化型 GPIIb/IIIa 陽性率の上昇が一過的であるのと好対照である(Fig.2(B))。Fig.2(A)と(B)は、別ロットの検体について実施された試験結果である

と考えられ、比較対象として適していない可能性もあるが、GPIIb/IIIa の活性化が不活化処理の際の物理的刺激による可能性が考えられる一方で、不活化処理後一定時間を経て上昇する p-セレクトリン陽性率は、不活化処理後に生じる製剤中の環境変化を反映している可能性がある。

p-セレクトリン陽性率上昇の他に、不活化処理した血小板の保存中には、グルコース消費量の増加、乳酸産生量の増加がおこることも報告されている<sup>17)</sup>。不活化処理後の保存期間中に ATP 含量の低下も認められたことから、 $\alpha$  顆粒の放出等が原因となり ATP 消費が増加することが、グルコース消費や乳酸産生の増加の一因と考えられている<sup>18) 19)</sup>。一方で、2-deoxyglucose の添加により解糖系の亢進を抑制しても、p-セレクトリン陽性率の上昇は抑制されなかったことから、解糖系の亢進は p-セレクトリン陽性率上昇の原因にはなっていないとされており<sup>20)</sup>、p-セレクトリン陽性率上昇の原因究明が不活化処理後の製剤中で起こっている変化を究明する上での重要事項と考えられる。これらの変化は不活化直後ではなく、保存期間中に生じているものである。保存期間中の pH 変動に関しては、文献により結果が異なっており、一定の見解が得られていない。

また、日本赤十字社からの報告<sup>6)</sup>によると、リボフラビン処理した血小板製剤中に凝集塊が検出されている。凝集塊はフィルターにより除去可能とされているが、凝集に至らずとも p-セレクトリン陽性となった血小板は、患者の白血球活性化に関与する可能性も考えられるため、安全性に関しては十分な検討が必要であると考えられる。

これらの知見から、リボフラビンによる不活化処理導入の可否判断のためには、p-セレクトリン陽性血小板を投与することの安全性を検討する必要があると共に、p-セレクトリン陽性率上昇につな

がる要因を解明し、品質の一定性確保の対策を講じる必要があると考えられる。また、血小板活性化の問題が解決されなければ、有効期間の延長は難しいと考えられる。

#### D. 考察

リボフラビンによる病原体不活化技術を導入することの利点は、病原体混入に関する安全性向上であり、欠点は、不活化処理により製剤成分に変化が生じる可能性があること、及び、これまでの製剤には含まれていないリボフラビンやその代謝物が不活化処理製剤に含まれることである。

##### D.1. 病原体不活化能

輸血用血液製剤の安全性確保の対策に関しては、感染性因子混入の検出感度や精度の向上を目的とした試験法の改良を含め、継続的に改善が図られてきている。現在我が国では、献血された血液について下記の検査が実施されている。

- ・血液型検査
- ・生化学検査
- ・血球計数検査
- ・抗原・抗体検査：化学発光酵素免疫測定法 (CLEIA 法)

梅毒血清学的検査

HBV (HBs 抗原、HBs 抗体、HBc 抗体)

HCV (HCV 抗体)

HIV (HIV-1、2 抗体)

HTLV-1 (HTLV-1 抗体)

ヒトパルボウイルス B19 (ヒトパルボウイルス B19 抗体)

- ・ウイルス検査：核酸増幅法 (NAT 法)

HBV

HCV

#### HIV

核酸増幅検査の導入とその後の改良（プールサイズの変更、試薬や機器の変更等）により、感染したウイルスが検出されないウインドウ期が短縮されるなど、安全性確保の対策は向上してきているが、依然としてウインドウ期は存在し、検査による安全性確保は完全なものではない。また、検査により検出できる病原体は特定のものに限られている。さらに、無菌性試験が実施されるのは一部の検体に限られており、寄生虫の検査は実施されていない。特に、血小板は製剤では保存条件が室温であるため細菌が増殖しやすいとされている。このような状況を考えると、病原体不活化技術の導入は輸血用血液製剤の安全性向上に有用性をもっていると考えられる。

しかし、病原体の不活化が安全性向上に貢献することは確かと考えられる一方で、輸血用血液製剤の安全性確保に関するこれまでの努力により、我が国の輸血用血液製剤の安全性は、実際には極めて高くなっているという事実もある。平成 20 年 2 月 27 日血液事業部会運営委員会・安全技術調査会合同委員会資料 2-1 によると、現在、ウイルス残存リスクは、HBV に関して 100 万件に対して 7 件 (0.0007%)、HCV 及び HIV ではないずれも 100 万件に対して 0.09 件 (0.000009%) である。また、細菌の残存リスクは症例がわずかであるためリスクの推定が困難とされるレベルとなっている。ちなみに FDA は現在検討されている不活化技術に対して、現在高感度に検査が実施されているウイルス等についてウインドウ期等の理由により残存しているリスクを低減化するために導入することはリスクベネフィットの観点からは否定的であると報告している。

感染性因子混入のリスクを完全に回避できる

不活可能の程度を定めることは困難であり、リボフラビンの不活化能が十分であるかを判断することは難しいが、製造工程中にウイルス不活化処理が導入されている血漿分画製剤の場合は、ウイルスに関して 9 log のクリアランスがあればよいとされていること<sup>21)</sup>、ウイルス血症の最大値がパルボウイルスでは  $10^8 \sim 10^{12}$  gEq/mL に達する可能性がある<sup>11)</sup>ことを考えると、リボフラビンによる不活可能として報告されているクリアランス（例えば、ブタパルボウイルスに対して 5 log 以上）で十分であるとは言い難い。すなわち、リボフラビン法による不活化により病原体混入リスクは低下し、安全性向上が期待できるものの、不活化能は完全ではなく、依然として感染性因子混入のリスクはなくなる。したがって、現状では極めて低い病原体混入リスクをさらに低下させるために、製剤中に新たな成分を添加する不活化技術を導入することに関しては慎重な対応が必要である。

## D.2. 安全性への影響

血小板製剤の有効成分である血小板機能への影響に関しては、C.3 で述べた通りである。不活化技術の安全性に関しては、その他に、リボフラビンやその代謝物の影響も考慮する必要がある。リボフラビンはビタミン B2 であり、生体内に存在する物質であること、光照射により生じる主要な代謝物（2'-ketoflavin、4'-ketoflavin、formylmethylflavin、lumichrome）についてもリボフラビン処理していない血液中に検出される成分であるとされ<sup>2)</sup>、不活化後の除去操作が不要とされている。ただし、リボフラビンとその代謝物は生体内に元来存在する物質であるとは言え、その含量はリボフラビン処理後には未処理検体の約 1000 倍になるため<sup>3)</sup>、多量に含まれる場

合にその代謝産物を含めた安全性への影響は十分に検討が必要と思われる。

一方、リボフラビンによる不活化を実施した製剤の投与により、ヒトに取り入れられるリボフラビンの量は、リボフラビンの濃度が 500uM、リボフラビン溶液の体積が 35mL リボフラビンのフォトコンバージョンが 18%であるという前提のもとで、ヒトの体重を 70kg とすると、輸血ごとの暴露量が 0.077 mg/kg になると算出されている<sup>11)</sup>。FAO/WHO により定められた食品中リボフラビンの一日摂取許容量は 0.5mg/ kg / day である<sup>3)</sup>。血液中への投与と、食物としての摂取という違いはあるが、少なくとも、不活化した製剤中に含まれるリボフラビンの量は一日摂取許容量を超えていないとは言える。

これまで、リボフラビン及びその代謝物に問題となる毒性は検出されていない<sup>3)</sup>。しかし、リボフラビン及びルミフラビンの変異原性を調べた Kale らの 2 つの論文 "Assessment of the genotoxic potential of riboflavin and lumiflavin A. Effect of metabolic enzymes. B. Effect of light"<sup>5, 22)</sup>の一つでは、リボフラビンへの可視光照射により生成される活性酸素種には変異原性があると報告されている<sup>5)</sup>。リボフラビンを用いた不活化処理に際して発生する可能性のある活性酸素種に関しては、平成 20 年 5 月 23 日の血液事業部会参考資料 4 の p.11 に記載があるが、その他には議論されていないようである。紫外線照射により発生する可能性のある活性酸素種と、Kale らの実験で生じていた活性酸素種の異同については明らかでないが、不活化処理の際にリボフラビン由来の活性酸素種が生じる可能性とその安全性への影響については、検討が必要かもしれない。

リボフラビンによる不活化技術では、核酸が標的であることから、病原体の不活化のみならず、輸血後の免疫反応の原因となる白血球も不活化される。本不活化技術導入の可否判断に必要な要件を明らかにするため、来年度は、リボフラビンによる白血球不活化について検討する予定である。

#### E. 結論

不活化技術の導入により病原体混入のリスクが減ることは確かであると考えられるが、リスクが完全になくなるものではない。有効成分である血小板が活性化されることの安全性への影響や、リボフラビンとその代謝物に関する安全性上の問題がないことを、臨床試験を通じて明らかにしていくことが導入の可否判断には必須である。病原体混入が大きな問題となっていない現状も踏まえ、導入の有用性を総合的に考える必要がある。

#### F. 参考文献

- 1) Stramer SL, Hollinger FB, Katz LM, Kleinman S, Metzger PS, Gregory KR, Dodd RY. Emerging infectious disease agents and their potential threat to transfusion safety. *Transfusion*. 49 Suppl 2, 1S-29S, 2009
- 2) Hardwick CC, Herivel TR, Hernandez SC, Ruane PH, Goodrich RP. 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. *Photochemistry and photobiology*. 80(3), 609-15, 2004
- 3) Reddy HL, Dayan AD, Cavagnaro J, Gad S, Li J, Goodrich RP. Toxicity testing of a novel riboflavin-based technology for pathogen reduction and white blood cell inactivation. *Transfusion medicine reviews*. 22(2), 133-53, 2008
- 4) Korycka-Dahl M, Richardson T. Photodegradation of DNA with fluorescent light in the presence of riboflavin, and photoprotection by flavin triplet-state quenchers. *Biochimica et biophysica acta*. 610(2), 229-34, 1980
- 5) Kale H, Harikumar P, Kulkarni SB, Nair PM, Netrawali MS. Assessment of the genotoxic potential of riboflavin and lumiflavin. B. Effect of light. *Mutation research*. 298(1), 17-23, 1992
- 6) 平成 21 年 12 月 24 日 血液事業部会 資料 4-6.
- 7) Cardo LJ, Rentas FJ, Ketchum L, Salata J, Harman R, Melvin W, Weina PJ, Mendez J, Reddy H, Goodrich R. Pathogen inactivation of *Leishmania donovani* infantum in plasma and platelet concentrates using riboflavin and ultraviolet light. *Vox sanguinis*. 90(2), 85-91, 2006
- 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*. 35(1), 5-17, 2006
- 9) Goodrich RP, Gilmour D, Hovenga N, Keil

- SD. A laboratory comparison of pathogen reduction technology treatment and culture of platelet products for addressing bacterial contamination concerns. *Transfusion*. 49(6), 1205-16, 2009
- 10) Tonnetti L, Proctor MC, Reddy HL, Goodrich RP, Leiby DA. Evaluation of the Mirasol platelet reduction technology system against *Babesia microti* in apheresis platelets and plasma. *Transfusion*. 2009
- 11) 平成 20 年 5 月 23 日 血液事業部会 参考資料 4.
- 12) Murphy WG, Foley M, Doherty C, Tierney G, Kinsella A, Salami A, Cadden E, Coakley P. Screening platelet concentrates for bacterial contamination: low numbers of bacteria and slow growth in contaminated units mandate an alternative approach to product safety. *Vox sanguinis*. 95(1), 13-9, 2008
- 13) Cardo LJ, Salata J, Mendez J, Reddy H, Goodrich R. Pathogen inactivation of *Trypanosoma cruzi* in plasma and platelet concentrates using riboflavin and ultraviolet light. *Transfus Apher Sci*. 37(2), 131-7, 2007
- 14) Rentas F, Harman R, Gomez C, Salata J, Childs J, Silva T, Lippert L, Montgomery J, Richards A, Chan C, Jiang J, Reddy H, Li J, Goodrich R. Inactivation of *Orientia tsutsugamushi* in red blood cells, plasma, and platelets with riboflavin and light, as demonstrated in an animal model. *Transfusion*. 47(2), 240-7, 2007
- 15) Ruane PH, Edrich R, Gampp D, Keil SD, Leonard RL, Goodrich RP. Photochemical inactivation of selected viruses and bacteria in platelet concentrates using riboflavin and light. *Transfusion*. 44(6), 877-85, 2004
- 16) Perez-Pujol S, Tonda R, Lozano M, Fuste B, Lopez-Vilchez I, Galan AM, Li J, Goodrich R, Escolar G. Effects of a new pathogen-reduction technology (Mirasol PRT) on functional aspects of platelet concentrates. *Transfusion*. 45(6), 911-9, 2005
- 17) AuBuchon JP, Herschel L, Roger J, Taylor H, Whitley P, Li J, Edrich R, Goodrich RP. Efficacy of apheresis platelets treated with riboflavin and ultraviolet light for pathogen reduction. *Transfusion*. 45(8), 1335-41, 2005
- 18) Li J, Lockerbie O, de Korte D, Rice J, McLean R, Goodrich RP. Evaluation of platelet mitochondria integrity after treatment with Mirasol pathogen reduction technology. *Transfusion*. 45(6), 920-6, 2005
- 19) Picker SM, Steisel A, Gathof BS. Cell integrity and mitochondrial function after Mirasol-PRT treatment for pathogen reduction of apheresis-derived platelets: Results of a three-arm in vitro study. *Transfus Apher Sci*. 40(2), 79-85, 2009
- 20) Li J, Goodrich L, Hansen E, Edrich R, Gampp D, Goodrich RP. Platelet glycolytic flux increases stimulated by ultraviolet-induced stress is not the direct cause of platelet morphology and activation changes: possible implications for the role



of glucose in platelet storage. Transfusion.  
45(11), 1750-8, 2005

21) 平成 15 年 11 月 7 日 薬食審査発第 1107001  
号.

22) Kale H, Harikumar P, Nair PM, Netrawali  
MS. Assessment of the genotoxic potential  
of riboflavin and lumiflavin. A. Effect of  
metabolic enzymes. Mutation research.  
298(1), 9-16, 1992

## G. 研究発表

### 1. 論文発表、総説

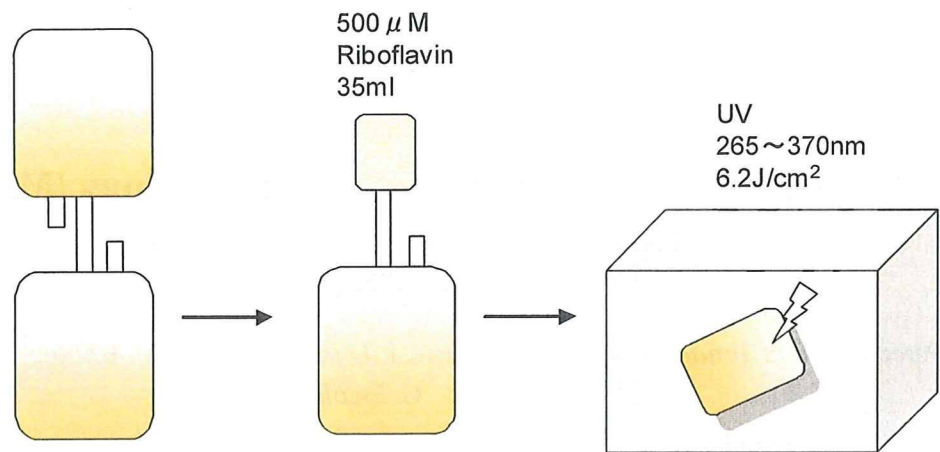
1) 山口照英、石井明子 早期臨床開発段階での  
バイオ医薬品の品質・安全性確保 臨床評  
価 36, 611-627 (2009)

### 2. 学会発表

1) 小林哲、鈴木琢雄、石井明子、川崎ナナ、山口  
照英 : MALDI-TOF MS におけるマトリック  
スの塩基性アミノ酸残基に対する影響 質  
量分析討論会 2009 年 5 月 大阪

## H. 知的財産権の出願・登録状況

なし



①製剤を照射用バッグに移す ②リボフラビン溶液を添加する ③UV照射する(6~10分)

図 3. リボフラビンを用いた不活化法の概略

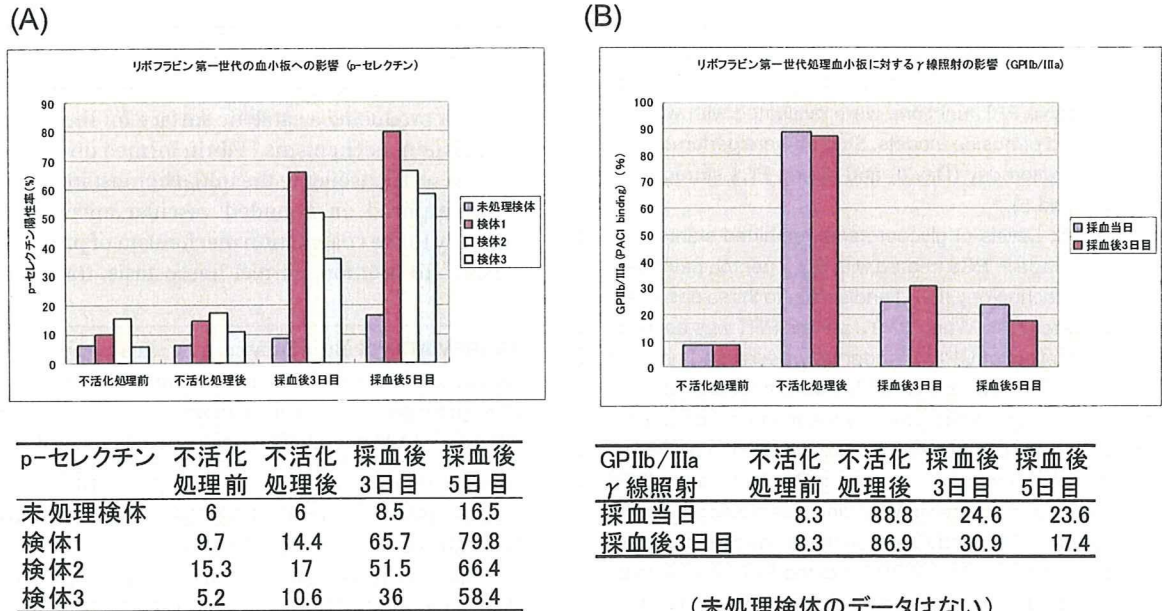


図 4. リボフラビンによる不活化処理の血小板への影響

(平成 21 年 12 月 24 日血液事業部会 参考資料 4-6 日本赤十字社からの報告データを  
グラフ化)

## Effects of a new pathogen-reduction technology (Mirasol PRT) on functional aspects of platelet concentrates

S. Perez-Pujol, R. Tonda, M. Lozano, B. Fuste, I. Lopez-Vilchez, A.M. Galan, J. Li, R. Goodrich, and G. Escolar

**BACKGROUND:** Several strategies are being developed to reduce the risk of pathogen transmission associated with platelet (PLT) transfusion.

**STUDY DESIGN AND METHODS:** The impact of a new technology for pathogen reduction based on riboflavin plus illumination (Mirasol PRT, Navigant Biotechnologies, Inc.) at 6.2 and 12.3 J per mL on functional and biochemical characteristics of PLTs was evaluated. PLT concentrates (PCs) obtained by apheresis were treated with Mirasol PRT and stored at 22°C. Modifications in major PLT glycoproteins (GPIb $\alpha$ , GPIV, and GPIIb-IIIa), adhesive ligands (von Willebrand factor [VWF], fibrinogen [Fg], and fibronectin), activation antigens (P-selectin and LIMP), and apoptotic markers (annexin V binding and factor [F]Va) were analyzed by flow cytometry. Adhesive and cohesive PLT functions were evaluated with well-established perfusion models. Studies were performed on the preparation day (Day 0) and during PCs storage (Days 3 and 5).

**RESULTS:** Levels of glycoproteins remained stable during storage in PCs treated with 6.2 J per mL pathogen reduction technology (PRT) and similar to those observed in nontreated PCs. When 12.3 J per mL PRT was applied, however, levels of GPIb $\alpha$  moderately decreased on Days 3 and 5. VWF, Fg, and FVa were not modified in their expression levels, either by treatment or by storage period. Fibronectin appeared more elevated in all PRT samples. A progressive increase in P-selectin and LIMP expression and in annexin V binding was observed during storage of PRT-treated PCs. Functional studies indicated that 6.2 J per mL Mirasol PRT-treated PLTs preserved adhesive and cohesive functions to levels compatible with those observed in the respective control PCs.

**CONCLUSION:** PLT function was well preserved in PCs treated with 6.2 J per mL Mirasol PRT and stored for 5 days.

The primary objective of platelet (PLT) transfusion is to provide the required amount of PLTs with preserved functions so that they can restore hemostasis in the recipient. PLTs play a triple role in hemostasis. First, based on their adhesive properties, PLTs attach onto the damaged areas of the blood vessels. PLT glycoprotein Ib (GPIb) interacting with subendothelial von Willebrand factor (VWF) acting in combination with other specific receptors for collagen play a critical role at this initial stage.<sup>1-3</sup> Second, PLTs through their cohesive properties interact with each other to produce a tight PLT aggregate. Receptors expressed on PLT glycoprotein IIb-IIIa (GPIIb-IIIa) interacting with plasma adhesive proteins such as fibrinogen (Fg) and VWF are responsible for these events.<sup>4,5</sup> In addition, phospholipids present on the membranes of activated PLTs undergo conformational changes producing a catalytic surface for the activation of coagulation mechanisms.<sup>6</sup> Fibrin formed during the latter process will consolidate the initial hemostatic plug. Tissue factor exposed on denuded vascular areas contributes critically to the coagulation mechanism of primary hemostasis.<sup>7,8</sup> To promote correct hemostasis, transfused PLTs

**ABBREVIATIONS:** BC = buffy coat; Fg = fibrinogen; GP(s) = glycoprotein(s); PC(s) = platelet concentrate(s); PLT = platelet; PRT = pathogen reduction technology; PRT 6.2 = 6.2 J per mL PRT; PRT 12.3 = 12.3 J per mL PRT; UN-1 = nonilluminated (platelets).

From the Hemotherapy-Hemostasis Service, CDB, Hospital Clinic, IDIBAPS, University of Barcelona, Spain; and Navigant Biotechnologies, Inc., Lakewood, Colorado.

Address reprint requests to: Ana M. Galán, PhD, Servicio de Hemoterapia y Hemostasia, Hospital Clínic, C/Villarroel 170, Barcelona 08036, Spain; e-mail: agalan@clinic.ub.es.

This study was supported by Grants SAF2003-05780 and SGR2001-0383 and was sponsored by grants SAF 2003-05780, CPO 4/0012, FISP 1040887, and SGR 2001-0383 and in part by an unrestricted grant from Navigant Biotechnologies, Inc.

Received for publication August 26, 2004; revision received November 12, 2004, and accepted November 15, 2004.

doi: 10.1111/j.1537-2995.2005.04350.x

TRANSFUSION 2005;45:911-919.

should fully retain adhesive, aggregating, and procoagulant activities.

During the past several years, a number of groups have studied the morphologic and biochemical changes that occur during preparation and storage of PLTs and how these modifications may result in an impairment of PLT function<sup>9-11</sup> and even a delayed response to further stimuli.<sup>12</sup> Pathogen inactivation of plasma derivatives is being enforced by several health authorities. This policy is being extended to PLT concentrates (PCs) used for transfusion. There is a reasonable concern that procedures with pathogen reduction technology (PRT) for PCs could have a deleterious effect on PLT integrity and functions.

For this reason, in this study we have explored functional and biochemical characteristics of PLTs exposed to PRT with riboflavin and ultraviolet (UV) light. This PRT process was conducted with a procedure described previously that has been demonstrated to provide both virus and bacteria inactivation while retaining cell functionality measured *in vitro* and *in vivo*.<sup>13-15</sup> Briefly, the process requires the use of a 50  $\mu\text{mol per L}$  working concentration of riboflavin in combination with UV light (265- to 370-nm output). In this study, two different intensities of illumination equivalent to 6.2 J per mL (PRT 6.2) and 12.3 J per mL (PRT 12.3) were utilized, and PLT quality was measured during different times of storage (0, 3, and 5 days). Studies were performed to evaluate modifications in major PLT GPs, activation-dependent antigens, and apoptotic markers by flow cytometry and the adhesive and cohesive functions of PLTs in PCs with well-established models with circulating human blood.

There were two primary reasons for selecting the light doses utilized in this study. In work reported previously, the effectiveness of the light dose of 6.2 J per mL was established in terms of the ability to inactivate 4 to 6 logs of representative viruses (human immunodeficiency virus, West Nile virus, porcine parvovirus) and bacteria (*Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli*) while maintaining adequate *in vitro* assay results.<sup>13</sup> The use of the light dose of 6.2 J per mL in this study was based on these prior observations. The higher light dose employed here was utilized to demonstrate the ability of the methods employed in this work to differentiate significant differences from both control, untreated samples and samples treated at the conditions utilized for both preclinical and clinical studies with this pathogen reduction technology *vivo*.<sup>13-15</sup>

## MATERIALS AND METHODS

### Experimental design

This study was designed to evaluate the possible effects of a new pathogen-reduction procedure (riboflavin plus UV light) known as Mirasol PRT (Navigant Biotechnologies, Inc., Lakewood, CO) on biochemical and functional char-

acteristics of PCs obtained through apheresis. Samples were treated with Mirasol PRT at 6.2 and 12.3 J per mL in the presence of 50  $\mu\text{mol per L}$  riboflavin. Modifications in major PLT glycoproteins, activation-dependent antigens, and apoptotic markers were analyzed by flow cytometry. Adhesive and cohesive functions of PLTs in the concentrates were evaluated with a perfusion assay, a well-established model with circulating human blood. Studies were performed during the preparation (Day 0) and during storage (Days 3 and 5) of PCs.

### Collection of blood samples

Apheresis collection of PCs was performed with an apheresis collection device (Trima, Gambro BCT, Lakewood, CO). The collection yield target was at least  $5.5 \times 10^{11}$  per procedure to facilitate the separation of the product into two aliquots (bags). For treated samples, after sterile connection,  $250 \pm 5$  mL of PLTs was transferred into an illumination and storage bag (extended-life PLT [ELP], Gambro BCT) containing 28 mL of riboflavin solution (500  $\mu\text{mol/L}$  in 0.9% saline) yielding a final working concentration of riboflavin of 50  $\mu\text{mol per L}$ . The transfer tubing was sealed with a hand-held radio frequency tubing sealer (Sebra, Tucson, AZ). After connection, the two bags were separated and the original collection bag was discarded. Each final PLT product to be treated contained PLTs suspended in approximately 278 mL of 90 percent autologous plasma in a 1-L citrate-plasticized polyvinylchloride ELP bag with an illumination surface area of 347  $\text{cm}^2$  per side. The same subjects were used to study the two different intensities of illumination applied (Mirasol PRT technology and protocols with 6.2 and 12.3 J/mL;  $n = 8$ ). In each experiment, one of the aliquots was subjected to illumination and the other remained untreated, used as a control. Riboflavin was not added to the untreated controls. Both aliquots were kept at  $22 \pm 2^\circ\text{C}$  on a flatbed agitator (Helmer Laboratories, Noblesville, IN) running at 60 agitations per minute for 5 days. All samples were taken, under sterile conditions, at 0, 3, and 5 days of storage.

### Flow cytometry studies

**Antibodies.** Monoclonal antibodies (MoAbs) used were commercially available (Immunotech, Marseille, France; except where expressly indicated) and were purchased conveniently tagged with fluorescein isothiocyanate (FITC) or phycoerythrin (PE), except where expressly indicated. GPIIb-IIIa was detected with anti-CD41a-PE (clone P2), GPIIb with anti-CD42b-FITC (clone SZ2), GPIV with anti-CD36-FITC (clone FA6.152), P-selectin with anti-CD62P-FITC (clone CLBThromb/6), the 53 kDa lysosomal membrane protein with anti-CD63-FITC (clone CLBGran/12), and coagulation factor V with a MoAb that recognizes the light chain of both factor (F)V and FVa (American