

## 未来の血液製剤

佐竹 正博

物理化学的な処置を施すことが困難な輸血用血液製剤も、その製法や保存法を改良して、より臨床で使いやすいものにする試みが続けられている。解凍血漿 (thawed plasma) は、FFP を解凍後 1~6°C で 5 日間保存可能としたもので、第 VIII 因子等の活性低下は 30~40% で、そのほかの因子はほぼ正常域にある。融解に必要な時間が不要で早期に投与できるため、急性大量出血の際の輸血に有効である。冷蔵血小板製剤は血小板を [35% 血漿 + 65% 血小板添加液] に浮遊させたもので、保存中の血小板の凝集はほとんどなく、血小板凝集能も 15 日間良好に維持できるものである。ただし輸血後の生体内寿命は短く、更なる技術開発が必要である。ヘモグロビンを脂質膜で包んだ人工赤血球 (Hemoglobin vesicles) は室温で 2 年間保存が可能で、実用化できる段階にある。緊急の輸血や島嶼・へき地などでの輸血に威力を発揮することが期待される。iPS 細胞由来血小板は、不死化した巨核球株のマスターバンクを複製しておき、そこから適宜細胞を取り出して拡大培養・分化させ、成熟血小板の製剤とするものである。正常の血小板に近い止血機能を持つことが確認されており、血小板輸血不応状態の患者への輸血などが適応として考えられる。

キーワード：緊急輸血，血小板活性化，血液供給，Hemoglobin vesicles，血小板輸血不応

輸血用血液製剤は、細胞成分や、熱などによって容易に失活する活性成分を含むため、その調製や保存の物理化学的条件には自ずと制約が出てくる。このため、これらの製剤は基本的に、物理化学的な処置を施さず、採血後短時日のうちに使用せざるを得なかった。しかしながら、細胞や活性物質の性状が明らかになるにつれて、その製法や保存法を改良して、より臨床で使いやすいものとするのが可能になってきた。ここではそれら新しい血液製剤の研究の状況の一端を紹介する。

### 1. 解凍血漿 (Thawed Plasma)

日本では、新鮮凍結血漿 (FFP) は解凍後ただちに使用しない場合でも、2~6°C に保存されれば 24 時間まで使用することができる。しかしながら米国では、解凍後の血漿は "Thawed Plasma" として、融解後 1~6°C で 5 日間保存が可能で、単一凝固因子欠乏症 (血友病など) 以外の治療に使用できることとされている<sup>1)</sup>。これは次のような事実に基づいている。1~6°C に 5 日間保存された解凍血漿の凝固因子活性は、第 VIII 因子は 30~40% 減少し、第 VII 因子は 20% 減少するが、フィブリノーゲンはほとんど低下が見られない。いっぽう、外科手術や外傷のような強い生体ストレスが生じている場合は、血管内皮から第 VIII 因子や von Willebrand

因子の遊離が亢進しており、熱変性因子の活性低下も心配されるほどではないとされている。解凍血漿の利点は、血漿の有効利用もさることながら、解凍に必要な時間がなく早期に投与できるため、急性大量出血の際の緊急輸血において血液凝固能と血圧を維持するとともに、循環血液量維持のための晶質液の投与を最小限にして希釈性凝固障害を防止できることにある。

最新の日本の「大量出血症例に対する血液製剤の適正な使用のガイドライン」<sup>2)</sup>においては、次のような輸血方針が示されている。「大量輸血が予想される患者の初期治療においては、早期に各製剤の投与単位比として FFP : PC : RCC が 1 : 1 : 1 となることを目標とし、少なくとも  $\geq 1 : 1 : 2$  を維持できるように FFP, PC を投与することを強く推奨する。」

日本でも 24 時間以上の保存が可能とされた場合に、医療機関における輸血製剤の実際の使い回しは次のようなことになろう。基本戦略としては、AB 型解凍血漿を Trauma pack としてコンテナに有効期限 5 日間として準備しておく。臨床側から要請があればこれをすぐに払い出す。AB 型血漿を得にくい場合は、A 型 FFP (低抗 B 抗体価、男性由来) を充当することとする。この方針がほぼ安全であることは欧米の実臨床において示されつつある<sup>3)</sup>。融解後 3~4 日目に使用され

ていない場合には他の患者に転用する。それぞれの施設において、早期の「大量輸血プロトコール (MTP)」発動と各製剤投与の実行の可能性を検討しておくことが重要であり、血漿の早期投与が可能な施設の体制整備が必要である。

緊急大量輸血のために解凍血漿を常備することになると、必然的に期限切れ血漿が増えてくる。医療機関においてこれをどのように解決するか方針を定めておく必要がある。犯罪や事故の少ない日本においては、外傷による緊急大量輸血や心血管系の手術における大量輸血などで、解凍血漿がその本来の適応に沿って適切に使用される医療機関は比較的限られてくる。多くの医療機関では、解凍した新鮮凍結血漿が24時間以内に使用されなかった場合の有効利用として使用されるのではないかと予想される。

## 2. 冷蔵血小板製剤

現行の血小板製剤の最大の問題は、常温で保存しなければならぬために、まれではあるが保存中に細菌の増殖が起こり、輸血された患者に敗血症を惹起する可能性があることと、保存中に血小板に保存障害や活性化が起こるために保存期間が最大7日程度に限られることが挙げられる。現在、日本の血小板製剤は有効期限を最大85時間程度に制限することによってこれらの問題に対処しているが、それは、血液センターの各部門での煩雑過重な業務と医療機関での短い有効期限内での輸血という代償を払って達成されているものである。細菌の増殖を抑制し血小板の生理的機能をより長期間維持できる製造・保存法が開発されれば、血液センター・医療機関双方に大きな恩恵もたらされるはずである。その一つが血小板製剤の冷蔵保存である。

血小板製剤を6℃以下に保存することができれば、たとえ細菌が混入していてもその増殖は最低限に抑えられ、輸血敗血症のリスクは激減する。また血小板の代謝も抑制されて保存期間も延長できる可能性が出てくる。実は血小板製剤の冷蔵保存には長い研究の歴史がある。そこで問題となったのは、冷蔵保存すると血小板の止血能は良好に保たれるが、容易に血小板凝集塊が形成されることと、輸血後の生体内寿命が非常に短いことであった。これらの理由から現在の血小板製剤の保存温度が20~24℃に設定された経緯がある。この状況にbreakthroughをもたらしたのが、2016年Transfusion誌に発表されたGetz, Capらの論文であった<sup>4)</sup>。彼らは、血小板を35%血漿+65%血小板添加液(PAS, platelet additive solution)に浮遊させる(PAS-PCと呼ぶ)ことによって、保存中の血小板の凝集をほぼ完全に阻止し、血小板凝集能も15日間良好に維持できることを示した。凝集が起らないのはPAS添加によりフィ

ブリノーゲン濃度が下がったことが大きな理由であると考えられる。この保存法は全世界で追試が行われたと見られるが、日本赤十字社でも多くの検証を行った<sup>5)</sup>。その結果、PAS-PCは21日間冷蔵保存しても全く凝集塊は見られず、ADP等による凝集能も保存3日目の値を維持していた。活性化マーカーの一つであるAnnexin V値は、保存10日目まではやや高値を示したがその後は室温保存よりも有意に低い値を維持した。

冷蔵保存PAS-PCの最大の問題は、生体内寿命が依然短いと思われることである。これについては、厳密に半減期や回収率などを計測したデータは2019年夏の段階ではまだ発表されていないが、寿命は依然短いと推定される部分的なデータが出ている<sup>6)</sup>。臨床的には、開心術に際しての血小板輸血において、新鮮な冷蔵保存PAS-PCを使用して特に有害な事象を認めなかったことが示されている。日赤では、独自に開発したウサギ血小板輸血モデルにおいて輸血後回収率を見ているが、現在のままでは臨床現場への応用は困難ではないかと考えられる。

ここで、血小板輸血を必要とする2つの病態について考える必要がある。血液疾患患者で血小板輸血をする場合は、慢性的な血小板減少状態に対して、出血を予防するために輸血する場合はほとんどである(prophylactic transfusion)。日本の輸血ではこれが血小板輸血の70%程度を占めていると考えられる。この場合はできるだけ寿命の長い、活性化していない血小板を輸血することが望ましいのは明らかである。これに対し、心血管系手術やその他の状況での急性の血小板減少により、出血中或いは出血直前の状態に対して輸血する場合には、輸血後ただちに止血機能を発揮してほしいわけであるから、ある程度活性化している血小板の方がむしろ都合がいい。その意味では、一度冷却された血小板は部分的に活性化されているために、輸血直後から血管の破たん部位に集積して止血機能を発揮することができる。この理由から、米国ではすでに、活動的出血をしている外傷患者に適応を限定して冷却血小板を輸血することが認められている。ただし現在米国で認可されているのは100%血漿浮遊血小板で、保存期間は3日間である。

## 3. 人工赤血球

人工赤血球の研究には長い歴史があり、日本でも精力的に研究開発が行われてきた。人工の酸素運搬体には大きく分けて二つのタイプがあり、遊離ヘモグロビンのものと、ヘモグロビンを生体適合性の良い膜についで球体にしたものである。遊離ヘモグロビンタイプは正確には「血球」ではないが、製法が比較的簡単なため米国を中心に多くの研究がなされてきた。しか

しながら遊離ヘモグロビン自身の毒性や、そのNOスカベンジによる血管収縮や血管損傷などの副反応を克服できていない。血球タイプはヘモグロビンのこれらの有害な直接作用を遮断したもので、特に脂質二重膜で包んだ人工赤血球は1980年代に日本の土田らによって開発された優れたものである。これはその後酒井らによる膨大な研究によってほぼ実用段階にまで性能が高められた。

酒井らの人工赤血球の製法と考え方については、その総論や論文を参照されたい<sup>7,8)</sup>。ここでは酒井氏の許可を得てその研究の一端を紹介させていただく。まず不要となった献血血液から高純度・高濃度のヘモグロビンを抽出し、それを脂質膜で包み、さらにポリエチレングリコール処理で生体適合性を向上させてHemoglobin vesicles と呼ばれるものを作成した。大きさは直径250nmと赤血球の30分の1ほどで、化学的に極めて安定で室温で2年間保存が可能である。ヒトに由来する病原因子は極小に抑えられ事実上感染症のリスクはないといっている。脂質膜に内包されているのでヘモグロビンがNOと直接反応することが無く、血圧上昇の副作用がない。ビーグル犬を使った大動物での脱血・輸血実験でも血圧が良好に維持される結果が得られている<sup>9)</sup>。また同種血液型が膜上にまったく存在しない。

以上の生物化学的な性状から、多くの利点が生まれる。まず室温で長期保存できるため、緊急の輸血が起こりうる施設で適量の常備が可能となる。緊急輸血が必要で血液型が不明の間はまずこれを輸血して救命し、その間に血液型を確定して適合血を選択し、また院内の血液が足りなければ血液センターに緊急の発注を行うことができる。この人工赤血球の常備は、事故による大出血や心血管系の手術、または産科での危機的出血等への対応策として非常に有用と考えられる。特に産科においては小規模の医療機関でも時に緊急輸血が必要な場合があるが、そこで輸血用血液製剤を備蓄して緊急輸血に備えることは非常に困難である。このような場合にいつでも輸血できる人工赤血球製剤を常備しておくことの利点は大きい。

いっぽう現在日赤の血液センターは、各都道府県に一つの血液センターがあるほかに、15の事業所、9の出張所、26の供給出張所を設け、血液センターから離れた地域や島嶼、僻地への血液の供給を確保しているが、これらの施設の維持と人員の確保、また血液の緊急搬送には大きな労力と費用を費やしている。また島嶼などで実際に輸血が行われることは非常に少ないため、血液製剤の有効利用の面からは問題がある。これらの地域の医療機関で人工赤血球が常備されていれば、医療機関と血液センター両者にとって大きな福音となる。とりあえず人工赤血球で血圧を維持し、その間に

患者を中枢医療機関に移送するか、適切な同種血液製剤を当該医療機関に供給すればよいことになる。これらの点において、人工赤血球の血液事業への導入は、血液センターにとっても大きなメリットとなるものであり、決して現行事業と相対立するものではない。

人工赤血球は血液型物質を表現していないために、適合する赤血球製剤を見つけることが困難な不規則抗体を持った患者への輸血に使用することができる。ただしこの場合も、比較的緊急の輸血に限られるであろう。現在の人工赤血球の生体内半減期は数日程度であるので、慢性貧血の状態に対してこれを継続的に輸血することは考えにくい。生体内寿命を長くする研究開発と、長期使用での問題点について十分な知見を得ることが必要となる。

いっぽう、人工赤血球はサイズがかなり小さいので、狭い血管腔を通して赤血球によるよりも末梢まで酸素を供給できる可能性がある。これを利用して、急性の脳梗塞や虚血性心疾患などで積極的な治療としてこれを輸血することも考えられる。また、ヘモグロビン濃度が10g/lと十分に高いので、輸血をして貧血が進むという希釈効果を引き起こすことは少ないと思われる。

#### 4. iPS細胞由来血小板の臨床研究

これは京都大学の江藤らが中心になって精力的に研究が進められているもので、ここでは江藤氏の許可を得てその研究を簡単に紹介させていただく<sup>10,11)</sup>。

iPS細胞を大量に増殖・分化させて血小板を作成するのが最も素直な方法であるが、これには多大の労力と時間・費用がかかり全く現実的ではない。江藤らはiPS細胞を造血多能性前駆細胞に分化させ、トロンボポエチン刺激依存的に巨核球の増殖および細胞死を抑制する3遺伝子を導入して増殖能旺盛な自己複製能を持つ不死化巨核球株の作製に成功した<sup>12)</sup>。これをマスターセルバンクとして凍結保存しておき、必要に応じて取り出して拡大培養し、血小板分化を促進する特殊な振盪培養器で培養することにより、これまでよりも短時間で大量の成熟血小板を得ることに成功した。得られた血小板は、濃縮・洗浄・有核細胞のろ過除去・放射線照射を経て5~10単位の血小板製剤に調製される。その凝集・止血機能などはin vitro評価系、ウサギ輸血モデルなどを用いて詳細に検討され、十分な止血機能を有していることが確認されている。

iPS細胞由来血小板を輸血に用いる場合としては次のような場面が考えられる。1)自己血小板しか適合しないような広範囲の抗体を持つ血小板輸血不応患者に対して、自己iPS細胞に由来する血小板製剤を作製・輸血する、2)すでに事業化されている再生医療用iPS細胞ストック(すべてHLAホモ個人由来)より、患者HLA

に適合した血小板製剤の製造, 3)HLA-null 血小板を作製し, ユニバーサル血小板製剤として製造する. また, この製剤が安価大量に製造できるようになった場合には, 次のような供給体制が考えられる. 1)広範囲のHLA (とHPA)抗体を持つ患者への普遍的な適応製剤として, 全国的に販路を設ける. この場合現存の日赤血液センターの供給体制と対立するのではなく, 協働するのが合理的と思われる. 2)限られた契約医療機関, 或いは地域に限定した供給を行う, 3)現行の日赤の同種血小板製剤の代替製剤として, 独自に販路を拡大することも考えられるが, 医療全体として無益な競争と医療費増加をもたらすだけであろう. 4)Platelet Lysate のような再生医療用の医薬品の原料としての利用も考えられる. いずれにしてもこれからの研究の発展が期待される領域である.

著者のCOI開示: 著者は日本赤十字社職員である. 本論文発表内容に関連して特に申告なし

## 文 献

- 1) American association of blood banks (aabb): Circular of information; for the use of human blood and blood components, 2017.  
<http://www.aabb.org/tm/coi/Documents/coil017.pdf>  
(2019年8月15日現在)
- 2) 宮田茂樹: 大量出血症例に対する血液製剤の適正な使用のガイドライン. 日本輸血細胞治療学会誌, 65: 21—92, 2019.
- 3) Stevens WT, Morse BC, Bernard A, et al: Incompatible type A plasma transfusion in patients requiring massive transfusion protocol: Outcomes of an Eastern Association for the Surgery of Trauma multicenter study. J Trauma Acute Care Surg, 83: 25—29, 2017.
- 4) Getz TM, Montgomery RK, Bynum JA, et al: Storage of platelets at 4°C in platelet additive solutions prevents aggregate formation and preserves platelet functional responses. Transfusion, 56: 1320—1328, 2016.
- 5) 小池敏靖, 福田香苗, 平山順一, 他: 血漿を血小板保存液に置換した血小板製剤の冷蔵保存時の品質. 日本輸血細胞治療学会誌, 64: 726—732, 2018.
- 6) Vostal JG, Gelderman MP, Skripchenko A, et al: Temperature cycling during platelet cold storage improves in vivo recovery and survival in healthy volunteers. Transfusion, 58: 25—33, 2018.
- 7) 酒井宏水: 人工赤血球(ヘモグロビンベシクル)製剤の新しい利用法. 日本輸血細胞治療学会誌, 64: 589—596, 2018.
- 8) Sakai H: Overview of Potential Clinical Applications of Hemoglobin Vesicles (HbV) as Artificial Red Cells, Evidenced by Preclinical Studies of the Academic Research Consortium. J Funct Biomater, 8 (1): 2017.
- 9) Yamamoto M, Horinouchi H, Kobayashi K, et al: Fluid resuscitation of hemorrhagic shock with hemoglobin vesicles in Beagle dogs: pilot study. Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol, 40: 179—195, 2012.
- 10) Ito Y, Nakamura S, Sugimoto N, et al: Turbulence Activates Platelet Biogenesis to Enable Clinical Scale Ex Vivo Production. Cell, 174: 636—648, 2018.
- 11) 杉本直志, 江藤浩之: iPS細胞を用いた新たな輸血医療. 日本内科学会雑誌, 106: 843—849, 2017.
- 12) Nakamura S, Takayama N, Hirata S, et al: Expandable megakaryocyte cell lines enable clinically applicable generation of platelets from human induced pluripotent stem cells. Cell Stem Cell, 14: 535—548, 2014.

## FUTURE BLOOD COMPONENT FOR TRANSFUSION

*Masahiro Satake*

Japanese Red Cross Central Blood Institute

### Keywords:

emergency transfusion, platelet activation, blood delivery, Hemoglobin vesicles, platelet transfusion refractoriness