

シンポジウム4

EBMに基づいたクリオ沈殿再考と血液事業

藤村吉博(日本赤十字社近畿ブロック血液センター)

はじめに

大量出血を伴う産婦人科、肝臓外科、そして心臓血管外科手術等において、クリオ沈殿の術早期投与が、術中そして術直後の総輸血量減少に繋がると報告されてきた。そして、この原因の多くは希釈性凝固障害による血中フィブリノゲン(Fg)低下(とくに100mg/dL以下)によるもので、クリオ沈殿輸注はこの低下したFgの補充と位置づけされてきた。しかしながら現行のクリオ沈殿は新鮮凍結血漿(FFP)から作成されるが、FFPは病原体低減化処理がなされていないことから、感染リスクを完全に否定できない。このため、病原体低減化処理がなされている精製Fg製剤がクリオ沈殿代替物として利用できるのではないかとの仮説のもと、近年、心臓血管外科領域での精製Fg製剤とプラセボの国際共同ランダム化試験が行われ、最近この結果が発表された。これによると、「Fg製剤の投与は(むしろ)血液製剤の使用量増加に繋がる」と、当初予想とは真逆の結果であった。これを機会にクリオ沈殿と血液事業のあり方を再考することにした。

クリオ沈殿とフィブリノゲン(Fg)製剤

今日、「クリオ沈殿とFg製剤は等価物、あるいはクリオ沈殿はFg製剤の代替物」と考えている医療関係者は少なくない。しかし、ここで明言すべきは「クリオ沈殿とFg製剤は異なる」ということである。

クリオ沈殿の製法は1964年、米国のJudith A. Poolらによって考案された。即ち凍結血漿を4℃で一昼夜ゆっくりと解凍すると不溶性絮状物が生じ、これを4℃で遠心分離するとクリオ沈殿とクリオ上清とに分離される。クリオ沈殿にはFg、凝固VIII因子、凝固XIII因子、von Willebrand因子(VWF)、フィブロンectin(FN)、そして血小板マイクロパーティクル(MP)が含まれている。一方、クリオ上清にはアルブミン、グロブリン、

VWF切断酵素(別名ADAMTS13)、さらにFg、VIII-VWF、そしてXIIIを除く数種の凝固因子が含まれている。

出血と止血におけるVWFの役割

流速が早く、ずり応力(剪断力またはひずみ力)が高い、毛細血管や細小動脈の血管壁傷害にて出血を来した場合、この部位でまず血小板血栓が形成され一次止血が計られる。この時、VWFは血小板をお互い凝集させる分子糊の働きをする。しかし、この血小板血栓は脆弱で、強い血流下で剥がれ易く、これを補強するために、血小板血栓の上に凝固機転によってフィブリン血栓ができ、強固な止血血栓となる(二次止血)。即ち、確実な止血を得るためには血小板、Fg、そしてVWFの3要素が必須なのである。

VWFには以下の3つの構造特性がある。(1) VWFは長い線状構造を持つが、これは単一蛋白(分子量250kD)が頭一頭、尻尾一尻尾のかたちで結合した多重体(M:マルチマー)構造で成り立っている。この形状イメージはアコーデオンカーテンにたとえられ、前述の「ずり応力」によって延び縮みする。進展時、VWFはADAMTS13で分解されるので、血中VWFは分子量500kDから15,000kDと多岐にわたる分子量を持つ。この血漿からクリオを作製すると、クリオ沈殿には高分子量VWFMが濃縮されて存在し、その中には僅かではあるが15,000~30,000kDの超高分子VWFMも認められる。これらの高分子量VWFMは高い止血能を持つ。一方、クリオ上清には低分子量VWFMのみが少量残る。(2) VWFはVIII因子と(非共有)結合して循環血中に存在する。(3) VWFとVIII因子は共に糖蛋白で、いずれも分子内にABO血液型糖鎖を持つという重要な特性を持つ。即ち、血液型A型のヒトはA-VWFを、B型はB-VWFを、そしてO型はO(H)-VWFを持つ。この意義は後述する。

最近、VWFの持つ血管新生作用が注目されている。詳細な説明は割愛するが、元来、胎生期の初期血管叢を形成するのにVEGF(血管内皮細胞増殖因子)が必要で、これから成熟血管網を構築するにはアンギオポエチンの作用によるが、高分子量VWFMはこの両方の反応を促進調節する。即ち、「VWFは止血因子の他に血管新生因子としての新機能も併せ持つ」のである。したがって、FgとVWFそして後述のフィブロネクチン(FN)の3種を持つクリオ沈殿はFg単剤よりも小動脈性出血に対する優れた止血効果を持つと考えられる。しかし現実には、クリオ沈殿を作製するFFP-LR480は1バックの製造原価が29,170円、そして薬価が23,617円であり、供給する度に日赤側としてはバック当たり5,562円の損失を負う形になり、血液事業運営という面では厳しい問題を抱えている。

ABO血型と加齢

血漿蛋白には分子内に炭水化物側鎖を有する糖蛋白も多い。これら血漿糖蛋白の中で、ABO血液型糖鎖を持つものとして、VIII因子、VWF、そして α 2-マクログロブリンが知られている。VWFの場合、ABO血液型糖鎖はADAMTS13(や他酵素)による蛋白分解に対して抵抗性を与える。とくにA型糖鎖は最も高い抵抗性を示すが、O(H)型糖鎖は最も低い抵抗性(易切断)を示す。このため、O型健常人の血漿VWF量は平常でも約75%(正常100%)と低く、逆にAB型健常人は123%と高い。

1970年代にABO適合性(compatible)であっても、ABO非同型(non-identical)のクリオ沈殿(や血小板製剤)輸注によって、後に抗A/B免疫抗体価が上昇することが報告されている。今日の解釈では、これはクリオ沈殿中に含まれる結合型(糖蛋白)および非結合型のABO糖鎖による免疫刺激によると考えられている。また外科手術の臨床において、ABO非同型のクリオ沈殿や血小板製剤の輸注は、結果的には赤血球輸血量の増加、急性呼吸急迫症候群(ARDS)や敗血症の頻度増加に繋がるとされ、カナダのあるグループは2006年以降、「ABO同型輸血を遵守することにより、赤血球および血漿の単位当たりの死亡率が其々、28%と25%減少した」と報告している。この理由として、「抗A/B抗体や免疫複合体によって血小板や血管内皮細胞機能が低下し、止血傷害を来すため」と報告している。

一方、加齢と共にVWF量は増加する。20才時では平均略100%のVWF量が60~70才になると約140%に増加する。この増加曲線はAB型で急峻で、O型では緩やかである。VIII因子もこれに準じた増加を示す。他にFgも加齢と共に増加するが、IX因子など他の凝固因子の多くは全年齢層で不変である。

フィブロネクチン(FN)と

血小板マイクロパーティクル(MP)

FNは細胞接着因子で、創傷治癒促進効果を持つことが知られている。基礎面では細胞の分化、増殖、移動を調節している。またFNは黄色ブドウ球菌に結合し白血球による貪食促進を促すオプソニン効果を有する。さらにFN欠損(N/O)マウスでは細網内皮系機能が低下し、残渣排泄が機能せず、多臓器不全が悪化することが観察されている。臨床面では、大手術、外傷、火傷、敗血症で血漿FNが低下し、また逆にFN低下の外傷患者では感染の増加や予後の悪化が知られている。かかる作用を実際臨床では定量化することが難しいが、FN補充は外傷性出血に対し良方向に働くと考えられる。

血小板MPは血小板の破壊断片で、クリオ沈殿の効果を減じる悪玉と考えられる。即ち、クリオ沈殿輸注後、抗血小板抗体が上昇することがある。この原因として血小板MPの関与が指摘されている。クリオ沈殿中のMP濃度はクリオ上清の29倍、血漿の265倍である。血小板MPは血栓、炎症などの合併症を悪化させる。

クリオと病原体低減化処理

ABO同型で均質なクリオ沈殿製剤を作製するためには、プール血漿が出発材料となる。このためには原材料のFFPの病原体低減化処理は不可避である。

今日、血漿の病原体低減化処理は大きく2種類で、アモトサレンとミラソルを用いる方法がある。両薬剤は共に核酸への結合とUV照射によって、核酸増幅機能を阻害し、病原体の増殖を防ぐというものである。一般に、アモトサレンの方がミラソルよりもこの作用が強いとされているが、アモトサレンはUV照射後、試薬の再吸収操作が必要である。一方、ミラソルは基本成分がリボフラビンで再吸収操作が不要との利点がある。

いずれの薬剤処理にても、止血因子の活性低下

を伴うことが不可避であるが、その程度はアモトサレンよりミラソルの方が著しい。また両薬剤共に、処理血漿からクリオ沈殿が作製可能との報告があるが、コントロールの未処理血漿から作製したものと比較すると20～40%の活性低下が認められる。また、アモトサレン処理クリオ沈殿では高分子量VWFMが温存されていることが示されているが、ミラソルについてはかかる報告が見られない。ミラソル処理で止血因子活性がより大きく低下する原因として、血漿中の溶存酸素(O_2)にUVが照射されることによって活性酸素が生じ、これが止血因子蛋白を傷害するためとされている。これを防止するために血漿を予め窒素ガス(N_2)でフラッシュし、溶存酸素(O_2)を N_2 に置換しておくと、止血因子の活性低下は最小限に抑えられるとの報告もある。しかし活性酸素の発生を抑えると殺菌

効果も減じると考えられ、本邦での実施に当たっては詳細な検討の余地が残されている。

クリオ沈殿のまとめ

(1) 1964年にクリオ沈殿作製法が開発され、以後半世紀に渡って世界中で使用され、その止血効果は公知である。(2) 複合製剤であるため、投与量マーカーが時代によって変遷し、不確定である。(3) 感染と血栓の副作用が懸念される。このため製剤化に当たって病原体低減化処理は不可避である。(4) この低減化に当たってはとくに止血と血管新生の両効果を期待するために、高分子量VWFMが温存できる条件を探るべきである。(5) 現行のFFP480価格での作製は事業不成立である。(6) 当面は、各自施設でのクリオ沈殿作製を奨励する。ただしABO同型。