

## 新鮮凍結血漿の融解後の使用期限

内藤 祐 林 宜亨 秋野 光明 若本志乃舞 藤原 満博  
本間 稚広 池田 久實 高本 滋

日本において、新鮮凍結血漿-LR (FFP-LR) は融解後3時間以内に使用することとされている。欧米のように、融解後の使用期限が延長できれば、新生児医療や緊急性の高い救命救急での使用可能範囲は広くなると考える。我々は各血液凝固因子の活性に加えて、凝固反応の全体像が評価可能なトロンビン生成能の経時変化を検討し、FFP-LR融解後の品質について、保存温度を含めた評価を改めて試みた。

その結果、血液凝固因子の中で第VIII因子活性 (FVIII) が最も急速かつ大きく低下したが、融解後6時間ではEUの品質管理基準 (0.7IU/ml以上) を満たしていた。第V因子活性は4℃保存、融解後120時間で $0.81 \pm 0.18$  IU/mlであり、第VII因子活性は同様に $0.73 \pm 0.12$  IU/mlであった。フィブリノーゲン濃度は4℃保存で融解後120時間まで著しい変化をみとめなかった。トロンビン生成能は融解後120時間まで変化をみとめなかった。

以上の結果から、FFP-LRは、融解後120時間でもFVIIIを除く血液凝固因子の補充に使用可能と示唆された。

キーワード：新鮮凍結血漿、使用期限延長、血液凝固因子、トロンビン生成能

第62回日本輸血・細胞治療学会座長推薦論文

### はじめに

新鮮凍結血漿-LR「日赤」(FFP-LR)は、血液凝固因子の補充を主目的として使用されるため、FFP-LRの凍結保存あるいは融解時は、種々の血液凝固因子活性の低下に注意しなければならない。全血液からFFP-LRを製造する時は、血液凝固因子の分解を抑制するため、分離後、血漿を速やかに凍結させ、-20℃以下で保存される。これにより血漿中の血液凝固因子は、1年間の保存後も採血時に近い活性が保持されている<sup>1)</sup>。また、本製剤は、日本赤十字社が昭和46年(1971年)に製造販売承認を取得して以来、用法を「融解後3時間以内に静脈内に輸注する」とし、融解後の使用期限は現在も変わっていない。融解した血漿は、血液凝固因子活性が低下することが知られているため<sup>2)</sup>、その使用期限は、主として血液凝固第VIII因子活性の消失に基づいて設定されたと考えられる。

他方、American Association of Blood Banks (AABB)は、1977年にFFP融解後の使用期限を2時間以内としていた<sup>3)</sup>。現在は、Food and Drug Administration (FDA)が、FFP融解後の使用期限を1~6℃下で24時間まで認め<sup>4)5)</sup>、AABBは、さらに4日(融解5日)の保存を可能としている<sup>6)7)</sup>。イギリスでは、融解したFFPの保

管温度によって使用期限が異なることがガイドライン<sup>8)</sup>に明記されており、4℃で24時間、22℃で4時間とされている (Table 1)。

いずれもFFP融解後の使用期限が本邦に比べて長い。本邦でもFFP-LRを融解した後の使用期限が現行の3時間から延長されれば、輸血に時間を要する症例が多い新生児医療や緊急性の高い救命医療での有用性は高いと思われる。しかし、本邦において、FFP-LRを融解した後の品質を評価した報告は見られない。そこで、本検討では、FFP-LRを融解した後の血液凝固因子活性のみならず、凝固系機能を包括的に評価することが可能なトロンビン生成測定システムを用いて、品質を改めて評価し、融解後の使用期限が延長可能か検討した。

### 材料および方法

#### 1. 試験血液

試験には、-30℃で約12カ月凍結保存されたFFP-LR-2 (n=15, A型:4, O型:5, B型:2, AB型:4)を供した。FFP-LR-2は、血漿融解装置 (FP-40, Kawasumi Laboratories, Inc.)を用いて37℃で融解後、等分割し、それぞれ4℃または22℃で120時間保存した。検体は融解直後(0時間)、3、6、24、48および120時間に採

Table 1 Comparison of plasma products in various countries

	Japan	USA <sup>a, b)</sup>	Europe <sup>c)</sup>	Australia <sup>d)</sup>
<u>Preparation</u>				
Collection method	whole blood, apheresis	whole blood, apheresis	whole blood, apheresis	whole blood, apheresis
Time from draw to start freezing	whole blood: $\leq 8$ hours (CPD) apheresis: $\leq 6$ hours (ACD-A)	$\leq 8$ hours	whole blood: $\leq 6$ hours (if the unit is refrigerated, $\leq 18$ hours) apheresis: $\leq 6$ hours	whole blood: $\leq 18$ hours apheresis: $\leq 6$ hours
Freezing condition, temperature	$\leq -20^{\circ}\text{C}$	$\leq -18^{\circ}\text{C}$	$\leq -25^{\circ}\text{C}$ , $-18$ to $25^{\circ}\text{C}$	$\leq -25^{\circ}\text{C}$
Expiration	1 year	$\leq -18^{\circ}\text{C}$ , 12 months $\leq -65^{\circ}\text{C}$ , 7 years	$\leq -25^{\circ}\text{C}$ , 36 months $-18$ to $25^{\circ}\text{C}$ , 3 months	12 months
<u>After thawing</u>				
Storage, expiration	2 to $6^{\circ}\text{C}$ , 3 hours	1 to $6^{\circ}\text{C}$ , 24 hours	The appropriate date or time of expiry UK <sup>d)</sup> : $4 \pm 2^{\circ}\text{C}$ , 24 hours $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ , 4 hours Germany <sup>e)</sup> : 6 hours	2 to $6^{\circ}\text{C}$ , 24 hours

CPD = citrate-phosphate-dextrose; ACD-A = acid-citrate-dextrose formula A

<sup>a)</sup> American Association of Blood Banks. Technical Manual 17th edition

<sup>b)</sup> American Association of Blood Banks. Standards for blood banks and transfusion services 28th edition

<sup>c)</sup> Guide to the preparation, use and quality assurance of blood components. 16th edition

<sup>d)</sup> Guidelines for the Blood Transfusion Services in the United Kingdom 7th edition

<sup>e)</sup> Cross-sectional guidelines for therapy with blood components and plasma derivatives

<sup>f)</sup> Blood Component Information 2012

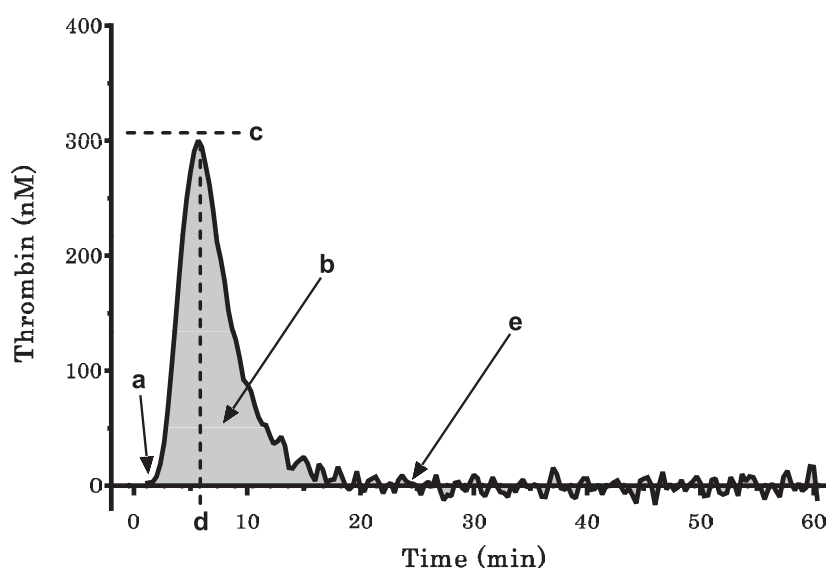


Fig. 1 Thrombograms in thawed FFP-LR

a: Lag Time (min), b: Endogenous Thrombin Potential (nM · min), c: Peak Height (nM),  
d: Time to Peak (min), e: Start Tail (min)

取した。

## 2. 各種パラメーターの測定

血液凝固に関連するパラメーターとして、プロトロンビン時間(PT), 活性化部分トロンボプラスチン時間(APTT), フィブリノーゲン, 血液凝固第II(FII), V(FV), VII(FVII), VIII(FVIII), XI(FXI) 因子活

性, フォンビルブランド因子(VWF) およびアンチトロンビンIII(ATIII)は, 全自動血液凝固測定装置(CS-2000i, Sysmex Corporation)を用いて測定した。フリープロテインS(PS), トータルPS, ADAMTS13, C3a および血小板由来マイクロパーティクル(PDMP)は, それぞれ, Asserachrom Free Protein S(Diagnos-

Table 2 Coagulation factor levels in thawed FFP-LR during storage at 4 or 22°C for 120 h

parameter	0 h	3 h	6 h	24 h	48 h	120 h
APTT-based assays						
<u>APTT (sec)</u>						
4°C		29.2 ± 1.5*	29.4 ± 1.5*	30.9 ± 1.7*	31.6 ± 1.8*	32.0 ± 1.9*
22°C	29.0 ± 1.5	29.0 ± 1.5	29.1 ± 1.5	30.0 ± 1.7*	30.7 ± 1.8*	31.7 ± 2.0*
<u>FVIII (IU/ml)</u>						
4°C		0.89 ± 0.18*	0.83 ± 0.17*	0.62 ± 0.13*	0.54 ± 0.12*	0.50 ± 0.11*
22°C	0.95 ± 0.21	0.89 ± 0.19*	0.84 ± 0.18*	0.64 ± 0.14*	0.55 ± 0.12*	0.50 ± 0.11*
<u>FXI (IU/ml)</u>						
4°C		0.86 ± 0.20*	0.84 ± 0.19*	0.82 ± 0.19*	0.79 ± 0.18*	0.78 ± 0.16*
22°C	0.89 ± 0.20	0.87 ± 0.20*	0.85 ± 0.19*	0.83 ± 0.19*	0.79 ± 0.19*	0.77 ± 0.17*
PT-based assays						
<u>PT (sec)</u>						
4°C		11.3 ± 0.6	11.4 ± 0.6	11.6 ± 0.7*	11.9 ± 0.7*	12.1 ± 0.7*
22°C	11.4 ± 0.6	11.2 ± 0.6*	11.3 ± 0.6*	11.3 ± 0.6	11.6 ± 0.6*	12.6 ± 0.7*
<u>FII (IU/ml)</u>						
4°C		0.95 ± 0.12	0.94 ± 0.12	0.94 ± 0.12	0.92 ± 0.12*	0.91 ± 0.10
22°C	0.95 ± 0.11	0.94 ± 0.11	0.94 ± 0.11	0.94 ± 0.11	0.91 ± 0.11*	0.88 ± 0.09*
<u>FV (IU/ml)</u>						
4°C		0.91 ± 0.20	0.91 ± 0.20	0.88 ± 0.19*	0.84 ± 0.19*	0.81 ± 0.18*
22°C	0.91 ± 0.21	0.92 ± 0.19	0.92 ± 0.21	0.92 ± 0.21	0.85 ± 0.21*	0.78 ± 0.18*
<u>FVII (IU/ml)</u>						
4°C		1.08 ± 0.20	1.06 ± 0.18	0.95 ± 0.17*	0.85 ± 0.14*	0.73 ± 0.12*
22°C	1.09 ± 0.20	1.12 ± 0.20*	1.11 ± 0.21	1.03 ± 0.18*	0.92 ± 0.17*	0.70 ± 0.12*
<u>Fibrinogen (mg/dl)</u>						
4°C		213.6 ± 30.3	214.4 ± 29.1	213.8 ± 31.0	211.1 ± 30.2*	208.0 ± 29.4*
22°C	213.3 ± 29.9	213.3 ± 30.8	214.2 ± 30.3	211.3 ± 30.6	206.7 ± 29.8*	196.0 ± 27.0*
<u>VWF:RCo (IU/ml)</u>						
4°C		0.99 ± 0.20*	1.03 ± 0.21	1.00 ± 0.21	0.99 ± 0.20	0.95 ± 0.19*
22°C	1.03 ± 0.21	1.00 ± 0.19	1.04 ± 0.21	1.02 ± 0.21	0.98 ± 0.20	0.94 ± 0.18*

Data are represented as mean ± standard deviation, n=15.

\*Comparison of factor activity levels at 0 h versus 3, 6, 24, 48, and 120 h with Dunnett's test. Significance was set at p<0.05.

†Comparison of factor activity levels between 4 and 22°C with paired t-test. Significance was set at p<0.05.

tica Stago), Asserachrom Total Protein S (Diagnostica Stago), ADAMTS13 ELISA Kit (Kainos Laboratories, Inc.), Human C3a ELISA (BD Biosciences) および PDMP ELISA kit (ProteinPurify, Ltd) を用いて測定した。pH は、全自動血液ガス・電解質分析装置 (cobas b 221, Roche Diagnostics K. K.) により測定した。

### 3. トロンビン生成能の測定

トロンビン生成能は、Thrombinoscope BV 社の Calibrated Automated Thrombogram (CAT) 法を用いて測定し、トロンボグラムより自動算出されたパラメーターとして、Lag Time (min), ETP: Endogenous Thrombin Potential (nM・min), Peak Height (nM), Time to Peak (min) および Start Tail (min) を解析した (Fig. 1)。

### 4. 統計

FFP-LR 融解 0 時間と 3, 6, 24, 48 および 120 時間の比較は、Repeated Measures ANOVA で検定後、Dunnett's test を用い、危険率 (P) 5% 未満を有意とした。

保存温度の比較には、paired t-test を用い、危険率 (P) 5% 未満を有意とした。統計処理には GraphPad Prism (Version 6.0, GraphPad Software, Inc., USA) を用いた。

## 結 果

### 1. 血液凝固関連因子

FFP-LR を融解後、4°C または 22°C で 120 時間まで保存し、血液凝固関連因子の変化を調べた (Table 2, Table 3)。4°C 保存下における FVII は、融解後 24, 48, 120 時間で、それぞれ 0.95 ± 0.17 IU/ml, 0.85 ± 0.14 IU/ml, 0.73 ± 0.12 IU/ml であり、融解直後と比較して有意に低値であった。FVIII は経時的に低下し、融解後 3, 6, 24 時間では、それぞれ 0.89 ± 0.18 IU/ml, 0.83 ± 0.17 IU/ml, 0.62 ± 0.13 IU/ml であった。APTT は融解後 3 時間以降、PT は 24 時間以降で融解直後と比較して、それぞれ有意に延長した。FV, FXI および VWF は、融解後 120 時間で、融解直後に対して約 10% の低下であった。FII, フィブリノーゲン濃度, ATIII, フリー

Table 3 Coagulation inhibitors levels in thawed FFP-LR during storage at 4 or 22°C for 120 h

parameter	0 h	3 h	6 h	24 h	48 h	120 h
<u>ATIII (IU/ml)</u>						
4°C		1.01 ± 0.08	1.01 ± 0.08*	1.00 ± 0.08	0.98 ± 0.08*	0.97 ± 0.09
22°C	1.00 ± 0.08	1.01 ± 0.08*	1.01 ± 0.08	1.00 ± 0.08	0.98 ± 0.08*	0.96 ± 0.09*
<u>Free Protein S (%)</u>						
4°C		73.5 ± 9.8	73.6 ± 9.5	72.7 ± 10.8	69.9 ± 7.5	70.5 ± 8.3
22°C	73.5 ± 9.8	71.6 ± 8.0	72.1 ± 9.6	70.0 ± 10.9	68.5 ± 9.9*	66.4 ± 8.4*
<u>Total Protein S (%)</u>						
4°C		73.2 ± 14.2	72.1 ± 12.9	68.6 ± 10.3	72.2 ± 16.1	68.1 ± 11.2
22°C	72.4 ± 13.1	70.9 ± 11.8	68.6 ± 13.6	65.4 ± 10.7*	61.4 ± 12.1*	52.8 ± 8.7*
<u>ADAMTS13 (%)</u>						
4°C		97.2 ± 9.1	101.0 ± 11.3	96.0 ± 17.7	98.4 ± 11.6	98.0 ± 9.7
22°C	98.7 ± 21.0	96.7 ± 10.4	98.8 ± 11.2	97.7 ± 18.1	97.7 ± 7.5	93.6 ± 11.4

Data are represented as mean ± standard deviation, n=15 (ATIII, free protein S, total protein S) or n=6 (ADAMTS13).

\*Comparison of factor activity levels at 0 h versus 3, 6, 24, 48, and 120 h with Dunnett's test. Significance was set at p<0.05.

† Comparison of factor activity levels between 4 and 22°C with paired t-test. Significance was set at p<0.05.

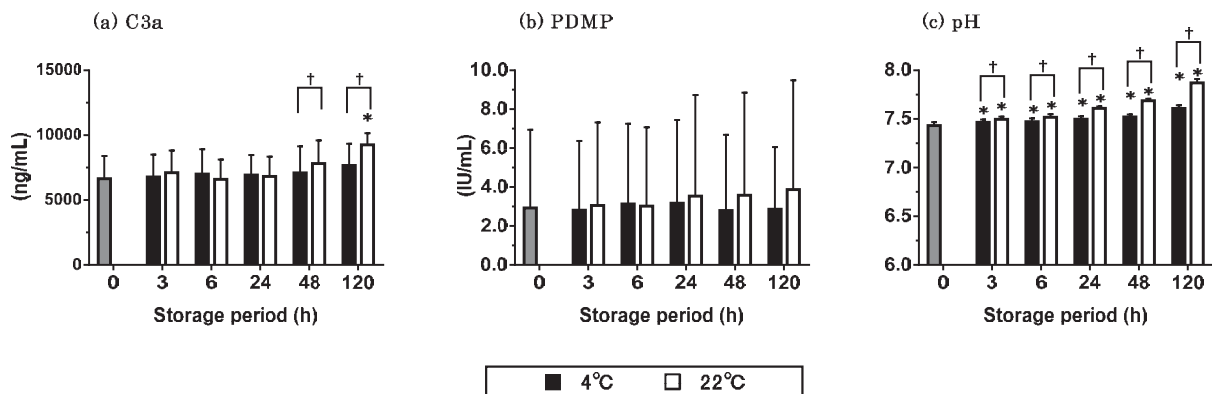


Fig. 2 C3a, platelet-derived microparticle, and pH in thawed FFP-LR during for storage 4 or 22°C for 120 h. Variables of C3a (a), platelet-derived microparticle (PDMP) (b) and pH (c) in thawed plasma are shown.

Data are represented as mean ± standard deviation, n=15 (C3a, pH) or n=6 (PDMP)

\*Comparison of levels at 0 h versus 3, 6, 24, 48, and 120 h with Dunnett's test. Significance was set at p<0.05.

† Comparison of levels between 4 and 22°C with paired t-test. Significance was set at p<0.05.

PS, トータル PS および ADAMTS13 は、4°C 保存において、著しい変化をみとめなかった。

一方、22°C 保存において、FVII は、融解後 120 時間まで経時的に低下し、また、4°C 保存と比べて融解後 3, 6, 24, 48 時間は有意に高値を示した。FVIII は、融解後 3, 6, 24 時間で、それぞれ  $0.89 \pm 0.19 \text{ IU/ml}$ 、 $0.84 \pm 0.18 \text{ IU/ml}$ 、 $0.64 \pm 0.14 \text{ IU/ml}$  であった。また、4°C 保存と比べて融解後 6, 24 時間は有意に高値を示したが、その差は僅かであった。APTT および PT は、融解後 120 時間まで経時的に延長した。フリー PS は融解後 48 時間以降、トータル PS は 24 時間以降で、融解直後と比べて有意に低値であり、また、4°C 保存と比較し有意に低値を示した。FII, FV, FXI, VWF, フィブリノーゲン濃度、ATIII および ADAMTS13 は、22°C 保存において著しい変化をみとめず、また、4°C 保存と同程度であった。

## 2. C3a, PDMP, pH

融解した FFP-LR 中の補体、PDMP および pH の変化を検討した (Fig. 2)。アナフィラトキシンである C3a は、22°C 保存において、融解後 120 時間が  $9,261.6 \pm 894.8 \text{ ng/ml}$  であり、融解直後 ( $6,641.3 \pm 1,757.3 \text{ ng/ml}$ ) と比較し有意に高値を示した。また、融解後 48, 120 時間は 4°C 保存に比べて有意に高値であった。PDMP は、保存に伴う変化をみとめず、また、温度による差もみとめなかった。pH は、4°C 保存および 22°C 保存共に経時的な上昇を示し、融解直後の  $7.43 \pm 0.04$  と比べて、融解後 3 時間以降有意に高値であった。また、22°C 保存は、4°C 保存に比べて、いずれの時間も有意に高値であった。

## 3. トロンビン生成能

FFP-LR を融解した後の凝固能を調べるため、トロンビン生成能を測定した (Table 4)。4°C 保存において、トロンビン生成までの Lag Time は、融解後 120 時間ま

Table 4 Variables of thrombin generation in thawed FFP-LR during storage at 4 or 22°C for 120 h

parameter	0 h	3 h	6 h	24 h	48 h	120 h
<u>Lag Time (min)</u>						
4°C		1.7 ± 0.2	1.9 ± 0.4	1.9 ± 0.3	2.0 ± 0.4	2.0 ± 0.3
22°C	1.8 ± 0.3	1.8 ± 0.3	2.0 ± 0.4	1.9 ± 0.2	2.1 ± 0.2	2.2 ± 0.3*
<u>ETP (nM · min)</u>						
4°C		1,260.2 ± 128.9	1,217.7 ± 122.3	1,235.3 ± 133.3	1,185.3 ± 145.9	1,160.8 ± 101.3
22°C	1,209.3 ± 164.0	1,252.5 ± 149.3	1,165.0 ± 136.8 ]†	1,190.1 ± 149.4 ]†	1,140.3 ± 141.8 ]†	1,090.0 ± 92.5 ]†
<u>Peak Height (nM)</u>						
4°C		324.5 ± 25.6*	313.1 ± 26.3	310.5 ± 29.5	302.5 ± 23.1	302.8 ± 25.3
22°C	304.4 ± 30.7	315.5 ± 29.0	301.7 ± 31.5 ]†	301.3 ± 30.2	300.4 ± 30.6	299.2 ± 28.2
<u>Time to Peak (min)</u>						
4°C		3.6 ± 0.4	3.8 ± 0.5	3.8 ± 0.4	3.9 ± 0.3	3.9 ± 0.3
22°C	3.7 ± 0.4	3.7 ± 0.4 ]†	3.8 ± 0.4	3.9 ± 0.2	3.9 ± 0.3	3.9 ± 0.3
<u>Start Tail (min)</u>						
4°C		17.7 ± 1.0	18.1 ± 1.1	18.0 ± 1.0	18.2 ± 1.1	18.1 ± 0.8
22°C	17.9 ± 0.9	17.8 ± 1.0	17.9 ± 1.1 ]†	18.0 ± 0.7	18.0 ± 1.1 ]†	17.7 ± 0.8 ]†

Data are represented as mean ± standard deviation.

12 observations are used.

\* Comparison of levels at 0 h versus 3, 6, 24, 48, and 120 h with Dunnett's test. Significance was set at  $p < 0.05$ .

† Comparison of levels between 4 and 22°C with paired t-test. Significance was set at  $p < 0.05$ .

で変化をみとめなかった。総トロンビン量を表す ETP は、融解後 120 時間で  $1,160.8 \pm 101.3 \text{ nM} \cdot \text{min}$  であり、融解直後 ( $1,209.3 \pm 164.0 \text{ nM} \cdot \text{min}$ ) と有意差をみとめなかった。トロンビン生成率の最高値を示す Peak Height は、融解直後が  $304.4 \pm 30.7 \text{ nM}$  であり、融解後 120 時間まで変化をみとめなかった。Time to Peak (トロンビン生成最大値までの時間) および Start Tail (トロンビン生成終了時間) は、120 時間まで保存による変化をみとめなかった。一方、22°C 保存において、融解後の変化は、4°C 保存と同様であった。

## 考 察

FFP-LR を輸血に使用する際は、恒温槽や融解装置を用いて 30~37°C で融解し、3 時間以内に使用しなければならないとされている<sup>29)</sup>。新生児科領域では、FFP-LR を長時間に渡り投与される症例があることから、日本赤十字社には FFP-LR 融解後の使用期限延長についての要望が寄せられている<sup>10)</sup>。また、外傷や大量出血時には FFP を早期に投与しなければならないとされる<sup>11)12)</sup> が、FFP の融解には 2 単位製剤で 20 分程度を要するため<sup>13)</sup>、緊急性の高い救命医療の分野でも融解後の使用期限延長は有用であると考えられる。

各国において、FFP を融解した後の使用期限は異なる。ドイツ<sup>14)</sup> は 6 時間、イギリス<sup>8)</sup> は 4°C 保存では 24 時間、22°C 保存では 4 時間としている。アメリカは、2012 年に FDA が融解 6 時間から 24 時間の使用期限延長を承認し<sup>4)5)</sup>、また、AABB はラベルを thawed plasma と変えることで、さらに 4 日 (融解 5 日) まで認めている<sup>6)7)</sup>。いずれも本邦に比べて、FFP 融解後の使用期限は長く、血液凝固因子の安定性を評価した報告も多

い<sup>11)12)15)~18)</sup>。

本検討では、FFP-LR を融解した後の血液凝固関連因子の活性やトロンビン生成能を測定し、融解後の使用期限が延長可能か検討した。

FFP-LR を融解した後の血液凝固因子活性は、FVIII が最も不安定であった。ヨーロッパでは FFP の品質管理基準として、「FVIII が平均  $0.70 \text{ IU/ml}$  以上含まなければならない」と要求される<sup>19)</sup>。この基準を代用した場合、FFP-LR を融解した後の FVIII は 4°C および 22°C 保存いずれも融解後 6 時間まで適合した。

Downes ら<sup>16)</sup> は、FVIII が融解後 1 日で 28% 低下し、融解後 5 日には O 型血漿の FVIII 活性が約 40% となったが、5 日間保存した融解血漿は FVIII の欠乏症を除き、肝障害による凝固異常、血栓性血小板減少性紫斑病の治療に安全に使用できるとしている。AABB<sup>5)</sup> は、融解血漿は 5 日保存で FV 活性が 60% 以上、FVIII 活性が 40% 以上含むとし、FVIII 以外の凝固因子欠乏症の治療を適応としている。本検討では 4°C、22°C 保存ともに、融解後 120 時間においても、FV が約  $0.8 \text{ IU/ml}$ 、FVIII が約  $0.5 \text{ IU/ml}$  であり、海外と同等の結果であった (Table 2)。また、止血に必要な活性値は、FV が 10~30%、FVIII が 30% で充分とされる<sup>12)15)</sup>。したがって FFP-LR は、海外同様、適応によって融解後 120 時間まで治療に必要な凝固因子活性を維持していると考えられた。

Thiele ら<sup>18)</sup> は、血液凝固因子に影響を及ぼす血漿の保存温度について検討し、室温保存では FVIII、FVII、PS の低下が大きいと報告している。PS は、遊離型が活性を示すとされる<sup>20)</sup>。本検討は、フリー PS の濃度を測定し、22°C 保存では融解後 48 時間以降、参考基準 (70~

140%)<sup>17)</sup>の下限値以下であったが、4℃保存では融解後120時間で70%以上を維持した (Table 3)。また、アナフィラトキシンであるC3aの上昇は22℃保存の方が大きかった (Fig. 2a)。血漿中のC3aは、速やかにアナフィラトキシン活性の無いC3a-desArgに分解される<sup>21)</sup>が、補体の臨床への影響は今後さらに検討を要する。使用期限の延長に伴い、細菌汚染が懸念されるが、Sidhuら<sup>22)</sup>は、融解したアフエレーシス由来FFPについて、1~6℃で5日間保存後、採取した全ての細菌培養サンプルが陰性であったと報告している。また、AABBは、FFPを融解後に未使用となった場合、その期限を最大5日としているが、我々が調べた限り、臨床的に問題が生じたという報告は見当たらなかった。

これまで、FFPの品質評価では、血液凝固因子活性の測定が一般的に行われてきた。しかし、各血液凝固因子単独の濃度のみでは、最終的な凝固状態と関連しないとされる<sup>20)</sup>。近年、生理的条件に近い状態で、血液凝固反応の全体像を評価可能にしたトロンビン生成測定システムが注目されている<sup>23)~27)</sup>。我々は、CAT法を用いてFFP-LRを融解した後のトロンビン生成能を測定した (Table 4)。Lag Time (トロンビン生成の開始時間) は、22℃保存、融解後120時間でわずかに延長した。ETP (総トロンビン量) は融解後120時間まで変化を認めず、Peak Height (トロンビン生成率の最高値) は、融解後120時間においてもThrombinoscope BV社が提示する正常血漿の平均値 (301 ± 2nM) と近似していた<sup>24)</sup>。よって、FFP-LRは、4℃、22℃とも融解後120時間まで融解直後と同等の凝固能を維持していると考えられた。

我々は、FFP-LR融解後のPDMP濃度についても検討したが、保存時間や温度に因らず変化がみられなかった (Fig. 2b)。これは、全血液中の血小板が保存前白血球除去によってほぼ完全に除去され、血漿中に混入する血小板が極めて少ないことが要因と思われた。

以上のことから、FFP-LRは、融解後、FVIII以外の血液凝固因子補充等、治療目的によっては現行の期限である3時間を越えた120時間でも使用可能と示唆された。今後、融解したFFP-LRについて、トロンビン生成能の他、Rotational Thromboelastometry (ROTEM<sup>®</sup>) またはThrombelastograph (TEG<sup>®</sup>) を用いたクロット (血餅) 強度の測定<sup>28)</sup>等、より治療効果を反映しやすい試験を実施し、凝固能や止血能を包括的に評価することが重要と考える。

## 結 語

FFPは、製造承認販売を取得して以来、用法を「融解後3時間以内に静脈内に輸注する」としている。今回、FFP-LR融解後の血液凝固因子活性のみならず、血

液凝固反応の全体像が評価可能なトロンビン生成能も検討し、FFP-LR融解後の品質再評価を試みた。さらに融解後の使用期限延長についても検討した。

FFP-LRは、融解後、FVIIIが最も急速に低下したものの、6時間までEU基準 (0.7IU/ml) を満たしていた。FV、FVIIおよびフィブリノーゲン濃度は4℃、22℃保存とも融解後120時間まで止血に必要な濃度を維持していた。また、融解後の凝固能は、融解後120時間まで融解直後と同等であった。従って、FFP-LRは、融解後120時間でもFVIII欠乏症以外に使用可能と示唆された。FFP-LRを融解した後の使用期限が延長されれば、臨床現場で余裕を持った使用が期待でき、輸血医療において大いに有用と考える。

著者のCOI開示：本論文発表内容に関連して特に申告なし

本論文の内容の一部は、第62回日本輸血・細胞治療学会総会 (2014, 奈良) において発表した。

謝辞：本論文の作成にあたり、ご助力くださった旭川医科大学病院 (現：北海道ブロック血液センター) の紀野修一先生に深謝いたします。

## 文 献

- 1) 輸血用血液製剤 試験成績集, 日本赤十字社, 2013.
- 2) 血液製剤の使用指針 (改定版), 厚生労働省医薬食品局血液対策課, 2012.
- 3) American Association of Blood Banks: Technical Manual 7th edition, Chapter 3: Preparation of Blood Components, 1977, 37-46.
- 4) Federal Register/Vol. 77, No. 1/Tuesday, January 3, 2012/Rules and Regulations.
- 5) ABC Newsletter, August 31, 2012.
- 6) American Association of Blood Banks: Technical Manual 17th edition, Chapter 6: Whole Blood Collection and Component Processing at Blood Collection Centers, 2011, 167-226.
- 7) American Association of Blood Banks: Standards for blood banks and transfusion services 28th edition, American Association of Blood Banks, Bethesda (MD), 2012.
- 8) Guidelines for the Blood Transfusion Services in the United Kingdom 7th edition, Chapter 8 Specifications for blood components, 2005, 63-115.
- 9) 輸血情報 0902-117: 新鮮凍結血漿 (FFP) の融解方法について: 日本赤十字社, 2009.
- 10) 全国大学病院輸血部会議ホームページ: 平成25年度会議. <http://plaza.umin.ac.jp/yuketsuk/styled-5/index.html> (2014年1月現在).

- 11) Keller MK, Pruss A, Sander M, et al: Thawed solvent/detergent-treated plasma: too precious to be wasted after 6 hours? *Blood Transfus*, 10: 360—367, 2012.
- 12) Tholpady A, Monson J, Radovancevic R, et al: Analysis of prolonged storage on coagulation Factor (F) V, FVII, and FVIII in thawed plasma: is it time to extend the expiration date beyond 5 days? *Transfusion*, 53: 645—650, 2013.
- 13) 江月将史, 川端絹代, 猪狩次雄, 他: 新しく開発された新鮮凍結血漿解凍装置の性能評価. *日本輸血学会誌*, 52: 698—703, 2006.
- 14) Plasma for therapeutic use. In: Cross-sectional guidelines for therapy with blood components and plasma derivatives: plasma in therapeutic use. Published by the Board of the German Medical Association (Bundesärztekammer) on the recommendation of the Scientific Advisory Board. *Transfus Med Hemother*, 36: 388—397, 2009.
- 15) Smak Gregoor PJ, Harvey MS, Briet E, et al: Coagulation parameters of CPD fresh-frozen plasma and CPD cryoprecipitate-poor plasma after storage at 4 degrees C for 28 days. *Transfusion*, 33: 735—738, 1993.
- 16) Downes KA, Wilson E, Yomtovian R, et al: Serial measurement of clotting factors in thawed plasma stored for 5 days. *Transfusion*, 41: 570, 2001.
- 17) Nifong TP, Light J, Wenk RE: Coagulant stability and sterility of thawed S/D-treated plasma. *Transfusion*, 42: 1581—1584, 2002.
- 18) Thiele T, Kellner S, Hron G, et al: Storage of thawed plasma for a liquid plasma bank: impact of temperature and methylene blue pathogen inactivation. *Transfusion*, 52: 529—536, 2012.
- 19) Guide to the preparation, use and quality assurance of blood components, 16th edition, Chapter 5: Component monographs, Council of Europe Publishing, Strasbourg, 2010, 225—334.
- 20) Cardigan R, Van der Meer PF, Pergande C, et al: Coagulation factor content of plasma produced from whole blood stored for 24 hours at ambient temperature: results from an international multicenter BEST Collaborative study. *Transfusion*, 51: 50S—57S, 2011.
- 21) 秋野光明, 山本定光, 才川 聡, 他: 全血処理型白血球除去フィルタークローズドバッグシステム(セバセルインテグラ MAP)を用いた血液製剤の調製と長期保存試験. *日本輸血学会誌*, 46: 521—531, 2000.
- 22) Sidhu RS, Le T, Brimhall B, et al: Study of coagulation factor activities in apheresed thawed fresh frozen plasma at 1-6 degrees C for five days. *J Clin Apher*, 21: 224—226, 2006.
- 23) 和田英夫, 奥田昌宏: トロンビン産生能の原理とその発展性: ISTH2005で話題となった血栓止血グローバルアッセイについて. *日血栓止血会誌*, 17: 61—67, 2006.
- 24) 嶋 緑倫, 松本智子: トロンビン生成試験の実際と応用. *日血栓止血会誌*, 18: 217—225, 2007.
- 25) Hemker H.C, Giesen P, Al Dieri R, et al: Calibrated automated thrombin generation measurement in clotting plasma. *Pathophysiol Haemost Thromb*, 33: 4—15, 2003.
- 26) Regnault V, Béguin S, Lecompte T: Calibrated automated thrombin generation in frozen-thawed platelet-rich plasma to detect hypercoagulability. *Pathophysiol Haemost Thromb*, 33: 23—29, 2003.
- 27) Spronk HM, Dielis AW, De Smedt E, et al: Assessment of thrombin generation II: Validation of the Calibrated Automated Thrombogram in platelet-poor plasma in a clinical laboratory. *Thromb Haemost*, 100: 362—364, 2008.
- 28) 小川 覚, 川崎 潤, 田中健一: トロンボエラストメトリーを用いた周術期止血管理. *日血栓止血会誌*, 21: 553—561, 2006.

## SHELF LIFE OF THAWED FRESH FROZEN PLASMA

*Yu Naito, Yoshiaki Hayashi, Mitsuaki Akino, Shinobu Wakamoto, Mitsuhiro Fujihara, Chihiro Homma, Hisami Ikeda and Shigeru Takamoto*

Japanese Red Cross Hokkaido Block Blood Center

### **Abstract:**

In Japan, fresh frozen plasma-leukocytes reduced (FFP-LR) must be used within 3 hours after thawing. However, the longer shelf life of thawed FFP-LR makes it applicable for neonatal or critical care settings. Since the level of each coagulation factor does not necessarily reflect physiological coagulation potential, we have conducted a thrombin generation assay in addition to evaluation of coagulant factors for the thawed FFP-LR up to 120 hours.

The FVIII level decreased by the largest degree among coagulation factors, however, the level was higher than 0.7 IU/ml (i.e. European standard). FV and FVII levels after 120 hours of storage at 4°C were  $0.81 \pm 0.18$  IU/ml and  $0.73 \pm 0.12$  IU/ml, respectively. The level of fibrinogen was almost unchanged after 120 hours of storage. Thrombin generation was maintained even 120 hours after thawing.

These results suggest that thawed FFP-LR can be safely used to treat coagulopathies other than FVIII deficiency for up to 120 hours after thawing.

### **Keywords:**

Fresh frozen plasma, Extended storage, Blood coagulation factor, Thrombin generation