

凍結融解を繰り返した 400ml 全血採血由来新鮮凍結血漿の品質について

淵崎 晶弘¹⁾ 松本 真実²⁾ 柴 雅之¹⁾ 佐竹 正博¹⁾ 田所 憲治¹⁾

融解した新鮮凍結人血漿 (FFP) は、温度に不安定な凝固因子活性が経時的に低下することが海外で報告されているが、凍結融解を繰り返した FFP の品質変化を評価した報告はない。そこで 400ml 全血採血由来 FFP について 3 回凍結融解時の品質評価を行った。

凍結融解を繰り返すことにより第 V 因子活性、第 VIII 因子活性は低下し、活性化部分トロンボプラスチン時間は延長する傾向を示したが、pH、ナトリウム濃度、カリウム濃度、プロトロンビン時間、フィブリノゲン濃度、第 II 因子活性、第 VII 因子活性、第 XI 因子活性、フォンヴィレブランド因子リストセチンコファクター活性に有意な変化はみられなかった。

3 回目凍結融解 FFP のプロトロンビン時間は $11.3 \pm 0.7 \text{sec}$ で、生物学的製剤基準の凝固試験の判定基準である 20 sec 以下を保持し、第 VIII 因子活性は $0.72 \pm 0.23 \text{IU/ml}$ と EU ガイドライン (0.70IU/ml 以上) の値を保持していた。トロンビン生成時間に関する項目は、凍結融解により延長する可能性が示唆されたが、トロンビン生成率最高値及び総トロンビン生成量に有意な低下は認められなかった。

FFP 再凍結使用は無菌性担保などが必要であるが、血液製剤の有効利用につながる可能性があると考えられた。

キーワード：FFP、再凍結、凝固因子活性、トロンビン生成能

はじめに

新鮮凍結血漿 (Fresh Frozen Plasma : FFP) は、生物学的製剤基準¹⁾ならびに血液製剤の使用指針²⁾に「融解後 3 時間以内に使用すること」と規定されており、FFP 再凍結は、添付文書に「一度融解したものを再凍結して使用しないこと」と記載されており禁止されている。しかしながら、融解後 3 時間以内に使用できない事例や出血が収まったなどの患者の容態の変化により FFP が廃棄される事例が報告³⁾されており、使用期限の延長や再凍結して使用することができれば、貴重な血液製剤の有効利用につながる。

融解した FFP は、温度に不安定な第 V 因子活性や第 VIII 因子活性が経時的に低下することが報告^{4)~7)}されているが、凍結融解を繰り返した FFP の品質評価を行った報告はない。凝血的評価である活性化部分トロンボプラスチン時間 (APTT)、プロトロンビン時間 (PT) さらに凝固因子定量は出血性疾患や血栓性疾患の診断や治療において極めて重要であるが、非生理的条件下における測定であり最終的な凝固状態と単純に相関せず、必ずしも *in vivo* の凝固機能を反映しない⁸⁾。近年、継続的に進行するトロンビン生成過程を反映させるト

ロンビン生成試験が血液凝固反応の全体像を正確に把握するために用いられている。

そこで 3 回凍結融解を繰り返した時の 400ml 全血採血由来 FFP の性状を確認し、凝固因子活性及びトロンビン生成能を測定して品質評価を行ったので報告する。

方 法

1. 対象

400ml 全血採血基準に合致したドナーから採血した FFP を 7 本用いて検討した。O 型血液では第 VIII 因子活性及び VWF 活性が低い⁹⁾ことが知られているため、O 型を含む A 型 2 本、B 型 3 本、O 型 2 本の FFP を用いた。

2. 試験血液の調製方法

日本赤十字社の標準作業手順書に従い製造された 400 ml 全血採血由来 FFP を試験血液として用いた。FFP を血漿解凍装置¹⁰⁾ (FP-40, 川澄化学工業) で融解 (設定温度 37°C, 融解時間 13 分) したものを 1 回目凍結融解 FFP (once freeze-thawed FFP : 1-FFP) とした。1-FFP に無菌接合装置 (TSCD, テルモ BCT 社) で 80 ml 容量血液分離バッグ (BB-T008FJ, 川澄化学工業)

1) 日本赤十字社血液事業本部中央血液研究所

2) 日本赤十字社関東甲信越ブロック血液センター

〔受付日：2014 年 10 月 8 日，受理日：2015 年 2 月 2 日〕

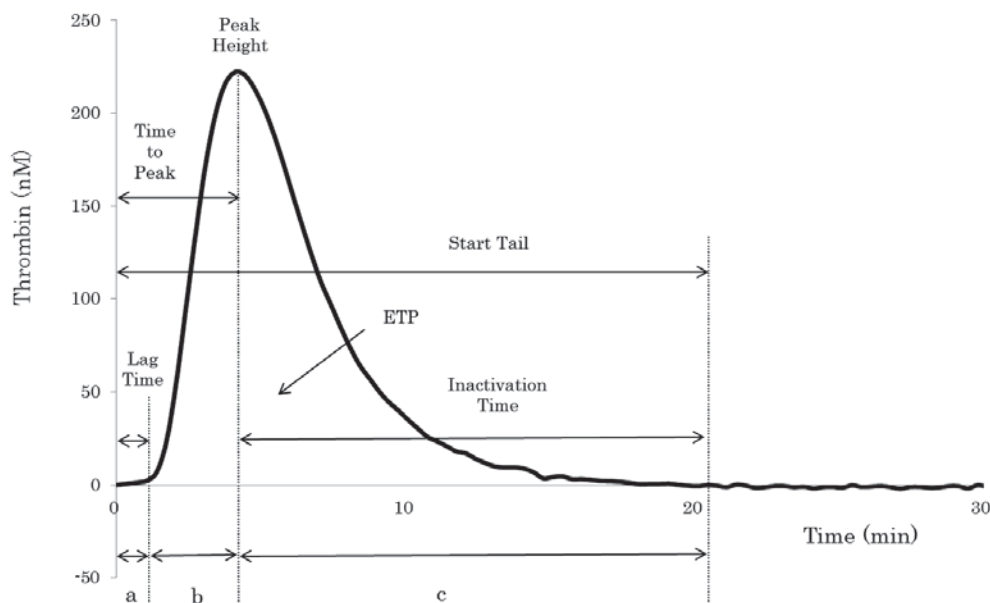


Fig. 1 Thrombogram parameters

- a. initial (lag) phase
- b. burst thrombin formation
- c. inactivation phase

を接続して、品質試験用検体を約 25ml 採取して測定に用いた。検体採取後、1-FFP を設定温度 -40°C の冷凍庫 (MDF-U442, SANYO 社) で再凍結 (融解から再凍結までの所要時間は約 10 分) した。1-FFP 凍結保管 1 週間後に、血漿解凍装置で融解したものを 2 回目凍結融解 FFP (twice freeze-thawed FFP : 2-FFP) とし、無菌接合装置で 80ml 容量血液分離バッグに接続して品質試験用検体を約 15ml 採取して測定に用いた。検体採取後、2-FFP を設定温度 -40°C の冷凍庫で再々凍結した。2-FFP 凍結保管 1 週間後に、血漿解凍装置で融解したものを 3 回目凍結融解 FFP (three times freeze-thawed FFP : 3-FFP) とし、無菌接合装置で 80ml 容量血液分離バッグに接続して品質試験用検体を約 15ml 採取して測定に用いた。

3. 試験血液の性状試験、凝固関連試験及びトロンビン生成試験

1-FFP, 2-FFP, 3-FFP の性状試験として容量, pH, ナトリウム濃度, カリウム濃度を測定した。容量は上皿天びん (PG6002-SDR, メトラートレド社) で測定し, pH, ナトリウム濃度, カリウム濃度を血液ガス分析装置 (ラピッドポイント 405, SIEMENS 社) で測定した。

凝固関連試験として PT, APTT, 第 II 因子活性, 第 V 因子活性, 第 VII 因子活性, 第 VIII 因子活性, 第 XI 因子活性, フォンヴィレブランド因子リストセチンコファクター (VWF : RCo) 活性, フィブリノゲン (Fbg) 濃度を測定した。測定装置は、マルチウェーブ検出方式を採用した全自動血液凝固測定装置 (CS-2000i, Sys-

mex 社) を用いた¹¹⁾。測定試薬は、PT 試薬 (デイドイノピン, Sysmex 社), APTT 試薬 (アクチン FSL, Sysmex 社), 測定項目の欠乏血漿試薬 (第 II 因子, 第 V 因子, 第 VII 因子, 第 VIII 因子, 第 XI 因子, Sysmex 社), VWF 試薬 (BC フォンヴィレブランド試薬, Sysmex 社), トロンビン試薬 (トロンボチェック Fib(L), Sysmex 社) を使用した。

トロンビン生成試験は、Hemker らの方法¹²⁾に基づき、トロンビン生成測定システム : Calibrated Automated Thrombogram (Thrombinoscope 社) を用いて測定した。評価項目は、Lag Time (トロンビン生成が開始するまでの時間), Time to Peak (トロンビン生成最大値までの時間), Inactivation Time (トロンビン不活性化過程の時間), Start Tail (トロンビン生成終了時間), Peak Height (トロンビン生成率最高値), Endogenous Thrombin Potential (ETP : 総トロンビン生成量) とした (Fig. 1)。測定試薬はトロンビンキャリブレーター試薬 (Thrombinoscope 社), PPP 試薬 (Thrombinoscope 社), Flu Ca 蛍光基質試薬キット (Thrombinoscope 社) を用いた。

4. 統計処理

統計処理は Graph Pad Prism 5 (有限会社エムデーエフ) を用い、1way repeated Measures ANOVA で検定後、多重比較 Dunnett test により行った。Control は臨床で使用される FFP である 1-FFP として、危険率 1% 未満を有意差ありと判定した。

Table 1 Comparison of *in vitro* quality of repeatedly freeze-thawed FFP

	1-FFP (Control)	2-FFP	3-FFP
Volume	222.9±8.4	195.3±8.7*	182.7±8.6*
pH	7.43±0.04	7.45±0.04	7.44±0.06
Na ⁺ (mmol/l)	155.1±1.7	155.1±1.5	154.3±1.8
K ⁺ (mmol/l)	2.9±0.3	2.9±0.3	2.9±0.3
PT (sec)	11.1±0.6	11.3±0.6	11.3±0.7
APTT (sec)	29.0±1.9	29.3±2.0*	29.5±2.0*
F II (IU/ml)	1.00±0.08	0.98±0.09	0.98±0.08
F V (%)	94.3±15.2	86.5±14.9*	86.8±12.3*
F VII (IU/ml)	1.05±0.14	1.03±0.14	1.03±0.13
F VIII (IU/ml)	0.86±0.26	0.80±0.24	0.72±0.23*
F XI (%)	86.8±20.0	83.9±17.4	83.1±17.9
VWF: RCo (IU/ml)	0.86±0.20	0.83±0.21	0.83±0.17
Fbg (mg/dl)	251.7±54.2	252.8±53.9	250.8±54.2

n=7, mean ± standard deviation

1-FFP: once freeze-thawed FFP

2-FFP: twice freeze-thawed FFP

3-FFP: three times freeze-thawed FFP

*p<0.01 (1 way repeated Measures ANOVA, for post-hoc test: Dunnett test)

結 果

凍結融解を繰り返した FFP の性状試験及び凝固関連試験の結果を Table 1 に示した。容量は各試験血液で品質試験用検体を採取したため減少した。pH 及び電解質濃度であるナトリウム濃度、カリウム濃度は凍結融解を繰り返すことによる有意な変化はみられなかった。

第 V 因子活性は 94.3±15.2%, 86.5±14.9%, 86.8±12.3%, 第 VIII 因子活性は 0.86±0.26IU/ml, 0.80±0.24 IU/ml, 0.72±0.23IU/ml と有意な低下がみられ、内因系凝固の指標である APTT は 29.0±1.9sec, 29.3±2.0 sec, 29.5±2.0sec と凍結融解を繰り返すことにより延長する傾向が認められた。

その他の凝固関連項目である PT, 第 II 因子活性, 第 VII 因子活性, 第 XI 因子活性, VWF: RCo 活性, Fbg 濃度は凍結融解を繰り返すことによる有意な低下を認めなかった。

試験血液のトロンビン生成試験結果を Table 2 に示し、トロンビン生成過程の経時変化を波形 (トロンボグラム) として Fig. 2 に示した。Lag Time, Time to Peak は 2-FFP で有意な延長がみられたが、3-FFP では有意な差は認められなかった。Inactivation Time は 3-FFP で有意な延長がみられ、Start Tail は 2-FFP と 3-FFP で有意な延長がみられた。Peak Height は凍結融解回数による有意な差はみられず、ETP は 3-FFP で有意に増加した。

考 察

恒温水槽等で融解した FFP は、融解後不安定な凝固

Table 2 Comparison of findings on thrombin generation test of repeatedly freeze-thawed FFP

	1-FFP (Control)	2-FFP	3-FFP
Lag Time (min)	1.9±0.2	2.2±0.3*	2.0±0.2
Time to Peak (min)	4.5±0.7	4.9±0.8*	4.7±0.6
Inactivation Time (min)	15.1±0.4	15.3±0.2	15.5±0.4*
Start Tail (min)	19.5±1.0	20.2±1.0*	20.2±0.9*
Peak Height (nM)	244±41	245±46	249±42
ETP (nM·min)	1,151±113	1,200±130	1,209±136*

n=7, mean ± standard deviation

1-FFP: once freeze-thawed FFP

2-FFP: twice freeze-thawed FFP

3-FFP: three times freeze-thawed FFP

*p<0.01 (1 way repeated Measures ANOVA, for post-hoc test: Dunnett test)

因子である第 V 因子, 第 VIII 因子の活性値が経時的に低下するが, その他の凝固因子活性は融解後 120 時間まで比較的安定していることが報告⁴⁾⁷⁾されている。凍結融解を繰り返した FFP である 2-FFP 及び 3-FFP でも同様に, 融解後安定な第 II 因子活性, 第 VII 因子活性, 第 XI 因子活性, VWF: RCo 活性及び Fbg 濃度⁴⁾⁷⁾に有意な低下はみられず, 融解後不安定な第 V 因子活性, 第 VIII 因子活性は低下した (Table 1)。融解した FFP は再凍結が開始されるまで液状であるため, 融解後不安定な凝固因子活性が低下したと推測された。また, 第 VIII 因子は凍結時の氷晶生成により活性値が低下することが報告³⁾されており, 再凍結, 再々凍結時の氷晶生成も活性値低下の要因と考えられた。しかし, 3 回凍結融解を繰り返した FFP においても, 第 VIII 因子活性は EU ガイドラインに示されている 0.70IU/ml 以上 (3-FFP: 0.72±0.23IU/ml) を保持していた (Table 1)。PT は全ての試験血液で生物学的製剤基準¹⁾の凝固試験の判定基準である 20sec 以下であった (Table 1)。

トロンビン生成試験における Lag Time は, FVII/TF 複合体が第 X 因子を活性化して微量のトロンビンを生成する凝固開始相 (initiation phase) を反映しており, トロンボグラムでは検出感度以下¹⁴⁾の時間である (Fig. 1)。生成された微量のトロンビンは血小板を活性化するとともに, 第 VIII 因子, 第 V 因子を活性化して, 活性化血小板膜表面上で内因性 FX 複合体およびトロンビン生成反応を司る prothrombinase 複合体 (FXa, プロトロンビン, FVa) の酵素活性を増幅 (凝固増幅相: propagation phase) させてトロンビンバースト¹⁴⁾を起こす。トロンボグラムでは Time to Peak がこの時間を反映し, Peak Height は生成率最高値を示している (Fig. 1)。産生されたトロンビンは, アンチトロンビン (AT) および α2-マクログロブリン (α2-MG) などにより不活性化⁸⁾される (不活性化過程: inactivation phase)。トロンボ

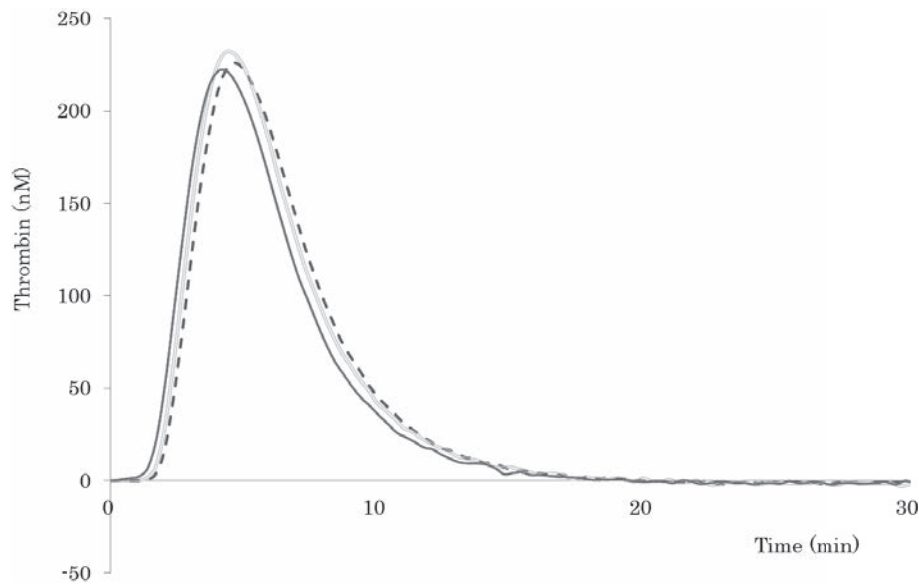


Fig. 2 Thrombin generation of repeatedly freeze-thawed FFP

1-FFP (Control) (—)
2-FFP (---)
3-FFP (—)

グラムでは Inactivation Time が不活性化過程の時間を反映し, Start Tail は生成終了までの時間を示しており, ETP は総トロンビン生成量である (Fig. 1).

今回, Lag Time と Time to Peak は 2-FFP で有意な延長がみられたが, 3-FFP で有意な延長は認められなかった (Table 2). Peak Height は凍結融解を繰り返すことによる有意な低下は認められなかった (Table 2). これらの結果より凝固開始相から凝固増幅相に寄与する第 VIII 因子や第 V 因子の活性値は凍結融解により低下したが, トロンビン生成を開始してトロンビンバーストを起こすのに十分な活性値を保持している可能性が示唆された. 凝固因子活性と Lag Time, Time to Peak, Peak Height の関係については, 別途検討が必要であると考えられた.

総トロンビン生成量を示す ETP は 3-FFP で有意に増加した (Table 2). これは Inactivation Time が延長したことにより, トロンビン不活性化過程におけるトロンビン生成量が増加したことによると推測された. トロンビン不活性化過程は, AT, α 2-MG による抗トロンビン作用や組織因子経路インヒビター (Tissue Factor Pathway Inhibitor: TFPI), 活性化プロテイン C (APC)/プロテイン S (PS) などの抗凝固因子も合わせて測定することで, 詳細な評価が可能であると考えられた.

Peak Height が低いとトロンビン依存性抗線溶因子 (Thrombin-activable Fibrinolysis Inhibitor: TAFI) が活性化されず線溶を受けやすい不安定なフィブリンになり, ETP で示される総トロンビン量に変化がなくても止血能として不十分である可能性⁸⁾があるが, 凍結融

解を 3 回繰り返した FFP では, Peak Height 及び ETP の低下がみられなかったため, 止血能に大きな影響はないと考えられた. 室温で 24 時間保管した全血から調製された FFP は, 8 時間以内に調製されたものと比較して, 第 VIII 因子活性が 23% 低下したが総トロンビン生成量に影響がなかったため, FFP として临床上同等に使用できる可能性が Cardigan らにより示されており¹⁵⁾, 本検討の条件であれば 3-FFP の止血能は, 通常の FFP と临床上同等である可能性が考えられた. また, Fbg 濃度, VWF 活性に変化がなく, 第 VIII 因子活性が EU ガイドライン以上保持されていればクリオプレシピテートの製造に適している¹⁶⁾ことから, 3-FFP においてもその可能性が示唆された. また, 第 V 因子や第 XI 因子の欠乏・異常症では凝固因子製剤がないため FFP が第一選択薬となるが, 3-FFP においても第 XI 因子活性に有意な低下が認められず, 第 V 因子活性は 80% 以上 (3-FFP: $86.8 \pm 12.3\%$) を保持する結果となった (Table 1). 今回, ADAMTS13 活性の測定は実施していないが, 少なくとも 2 回凍結融解までは活性値が安定していることが報告¹⁶⁾されている. 先天性の血栓性血小板減少性紫斑病である Upshaw-Schulman 症候群への治療は FFP 投与による ADAMTS13 の補充が目的¹⁷⁾であり, 再凍結融解した FFP でも同等の治療効果が得られる可能性がある.

本邦における融解後の FFP 使用期限は 3 時間と欧米諸国の使用期限である 24 時間以内¹⁸⁾¹⁹⁾と比較して短く, 一度融解した FFP は再凍結して使用することができないため, 廃棄せざるを得ない場合がある. 今回, in vi-

tro のみの品質試験結果であり, FFP を再凍結して使用する場合は, 無菌性を担保することや融解後の静置時間, 凍結装置の性能により品質が変化することを考慮する必要があるが, 再凍結方法や用法などを規定することで血液製剤の有効利用につながる可能性があると考えられた。

結 論

FFP は凍結融解を繰り返すことにより, 融解後不安定な第 V 因子活性, 第 VIII 因子活性が低下し, 内因系凝固の指標である APTT は延長する傾向を示したが, pH, 電解質, その他の融解後安定な凝固因子活性に大きな変化はみられなかった。凝固機能の総合的な指標であるトロンビン生成能は, 凍結融解を繰り返すことにより生成時間に関する項目で延長する可能性が示唆されたが, 生成率最高値及び生成量に有意な低下は認められなかった。

FFP 再凍結使用は無菌性を担保すること, 品質が融解後静置時間や凍結装置性能により変化するため, 再凍結方法や用法等を規定して行うことが必要であるが, 血液製剤の有効利用につながる可能性があると考えられた。

著者の COI 開示: 本論文発表内容に関連して特に申告なし

文 献

- 1) 生物学的製剤基準, 厚生労働省, 2014.
- 2) 血液製剤の使用指針 (改訂版), 厚生労働省医薬食品局血液対策課, 2012.
- 3) 池田珠世, 押田真知子, 帰山ともみ, 他: 廃棄血削減への取り組み—過去 6 年廃棄理由の解析—. 日本輸血細胞治療学会誌, 57 (6): 484—489, 2011.
- 4) Scott E, Puca K, Heraly J, et al: Evaluation and comparison of coagulation factor activity in fresh-frozen plasma and 24-hour plasma at thaw and after 120 hours of 1 to 6°C storage. *Transfusion*, 49: 1584—1591, 2009.
- 5) Lamboo M., Poland D.C., Eikenboom J.C., et al: Coagulation parameters of thawed fresh-frozen plasma during storage at different temperatures. *Transfusion Medicine*, 17: 182—186, 2007.
- 6) 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.
- 7) Sidhu R.S., Le T., Brimhall B., et al: Study of Coagulation Factor Activities in Apheresed Thawed Fresh Frozen Plasma at 1-6°C for Five Days. *Journal of Clinical Apheresis*, 21: 224—226, 2006.
- 8) 嶋 緑倫, 松本智子: トロンビン生成試験の実際と応用. *血栓止血誌*, 18 (3): 217—225, 2007.
- 9) Moeller A, Weippert-Kretschmer M, Prinz H, et al: Influence of ABO blood groups on primary hemostasis. *Transfusion*, 41: 56—60, 2001.
- 10) 江月将史, 川畑絹代, 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. 日本輸血細胞治療学会誌, 52 (6): 698—703, 2006.
- 11) 向出佳恵: マルチウェーブ検出方式を用いた全自動血液凝固測定装置 CS-2000i/2100i の特長. *生物試料分析*, 32 (5): 393—400, 2009.
- 12) Hemker HC, Gissen P, Al Dieri R, et al: Calibrated automated thrombin generation measurement in clotting plasma. *Pathophysiol Haemost Thromb*, 33: 4—15, 2003.
- 13) Sward-Nilsson A-M, Persson P-O, Johnson U, et al: Factors influencing factor VIII activity in frozen plasma. *Vox Sanguinis*, 90: 33—39, 2006.
- 14) 松本智子, 嶋 緑倫: トロンビン生成試験. *検査と技術*, 39 (13): 1138—1144, 2011.
- 15) Cardigan R, Van der Meer P.F, Pergand 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.
- 16) Scott E.A., Puca K.E., Pietz B.C., et al: Comparison and stability of ADAMTS13 activity in therapeutic plasma products. *Transfusion*, 47: 120—125, 2007.
- 17) 竹山佳織, 辻 博之, 永峰知子, 他: Upshaw-Schulman 症候群患者への小分け調製 FFP 投与の試み. 日本輸血細胞治療学会誌, 56 (1): 48—51, 2010.
- 18) Guidelines for the Blood Transfusion Service in the UK. UK Blood Transfusion & Tissue Transplantation Services (Red Book): October, 2005 (Update/Feb, 2012).
- 19) Circular of Information for the use of human blood and blood components. AABB: Dec, 2009.

QUALITY OF REPEATEDLY FREEZE-THAWED FRESH FROZEN PLASMA DERIVED FROM 400 ml OF WHOLE BLOOD

*Akihiro Fuchizaki*¹⁾, *Mami Matsumoto*²⁾, *Masayuki Shiba*¹⁾, *Masahiro Satake*¹⁾ and *Kenji Tadokoro*¹⁾

¹⁾Japanese Red Cross Society, Blood Service Headquarters, Central Blood Institute

²⁾Japanese Red Cross Kanto-Koshinetsu Block Blood Center

Abstract:

It has been reported by some studies that unstable coagulation factor activities in thawed fresh frozen plasma (FFP) decreased with time. However no report has evaluated quality change in repeatedly freeze-thawed FFP. We assessed the quality of FFP derived from 400 ml of whole blood over three freeze-thaw cycles.

Regarding activities of Factor (F) V, F VIII activities were decreased, and APTT was prolonged by repeated freeze-thawing, but no significant changes in pH, sodium concentration, potassium concentration, PT, fibrinogen concentration, activities of F II, F VII, F XI, VWF: RCo were noted.

PT after three freeze-thaw cycles was 11.3 ± 0.7 sec, which meets the coagulation examination standard in "Minimum Requirements for Biological Products" (less than 20 sec). Activity of F VIII after three freeze-thaw cycles remained at 0.72 ± 0.23 IU/ml, which satisfied the European guideline (more than 0.70 IU/ml).

Thrombin generation time might be prolonged by repeated freeze-thawing, but peak height and endogenous thrombin potential were not significantly reduced by freeze-thawing repeatedly.

Keywords:

fresh frozen plasma, refreeze, activity of coagulation factor, thrombin generation