

成分採血由来新鮮凍結血漿の融解後の品質

森 純平¹⁾ 岩間 輝¹⁾ 松本 真実²⁾ 内藤 祐³⁾ 林 宜亨³⁾
 栗原 勝彦²⁾ 秋野 光明³⁾ 柴 雅之¹⁾ 岡崎 仁¹⁾ 佐竹 正博¹⁾
 田所 憲治¹⁾

キーワード：新鮮凍結血漿，成分採血，使用期限，凝固因子，トロンビン生成能

(第61回日本輸血・細胞治療学会座長推薦論文)

緒言

日本における新鮮凍結血漿 (FFP) の使用期限は、融解後3時間以内と定められているが¹⁾、海外では日本の基準よりも使用期限を長く設けている国が多く、冷蔵保存により24時間以内の使用を可能としている^{2)~5)}。さらにアメリカやオーストラリアでは融解後、ラベルの張替および製剤名を改称することにより、最長で5日間の使用を可能としている²⁾³⁾。

また、国内では融解後すぐに輸血しない場合は冷蔵保管とし、融解後3時間以内に使用しているが、イギリスでは22±2℃保管で4時間以内⁴⁾、オランダでは室温保管で6時間以内の使用が可能⁵⁾となっている。これらはFFP融解後の不安定な凝固因子の低下を考慮し、活性の低下が許容される範囲で決められている。

日本では、危機的出血への備えとしてFFPを使用する場合、安全な輸血が現在の使用期限に制約され、適正に実施できない可能性がある。こうした背景からFFPの融解後の使用期限について品質データを基に再度検討する必要があると考えられる。

しかし、国内のFFPについては、融解後の保管期間や保管温度に関する品質データの報告が少なく、全血採血由来FFPの融解後の品質に関する報告⁶⁾はあるが、成分採血由来FFPについての報告はない。成分採血と全血採血由来のFFPでは抗凝固剤が異なり、前者はACD-A液、後者はCPD液を使用しているため、両製剤の組成は異なる。Table 1に示したように、ACD-A液はCPD液よりpHが低く、生物学的製剤基準ではACD-A液を用いたFFPは、CPD液を用いたFFPより採血から凍

結するまでの液状で取り扱える時間が短く規定されている¹⁾。そして、ACD-A液は、第VIII因子活性の保存性能がCPD液より劣ることが報告されている⁷⁾。そのためFFP融解後の使用期限延長を検討するには、成分採血由来FFPの融解後の品質データも評価する必要がある。

そこで我々は、融解後の成分採血由来FFPの品質を調査し、使用期限延長の可能性について評価を行った。また室温(22℃)保管での評価も併せて行ったので報告する。

方法

健康人ドナーより採取した480mlの成分採血由来FFPを凍結保管したものをを用いた。

凍結保管後のFFPは血漿融解装置 (FP-40, 北陽電機株式会社)を用いて37℃で融解した。融解後のFFPを血液分離バッグ (KBP-200C, 川澄化学工業株式会社)に二分割し、4℃および22℃に保管した。融解直後を0時間として融解後3, 6, 24, 48, 120時間に各FFPから検体を採取し、Table 2に示した項目を測定した。統計処理はTable 3に示した検定方法で融解後0時間に対する各測定ポイントの比較および保管温度間での比較を行った。危険率5%未満を有意とした。

本検討は、中央血液研究所、北海道ブロック血液センター、関東甲信越ブロック血液センターの3施設で実施した。

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
 3) 日本赤十字社北海道ブロック血液センター
 [受付日：2014年12月1日，受理日：2015年8月13日]

Table 1 Comparison of anticoagulant

Anticoagulant	ACD-A	CPD
Composition (w/v%)		
Trisodium citrate	2.20	2.63
Citric acid	0.80	0.327
Dextrose	2.20	2.32
Sodium dihydrogen phosphate	—	0.251
pH	4.5-5.5	5.4-5.8
Collection method	apheresis	whole blood
Addition ratio (Whole blood : Anticoagulant)	11 : 1	7.1 : 1
Time from draw to starting freezing	≤6 hours	≤8 hours*

*Plasma is separated from red cells within 8 hours of collecting blood.
The plasma is frozen solid rapidly.

Table 2 Method for measurement and Materials used

Analyte	Method	Material
PT, APTT, Fbg, II, V, VII, VIII, XI, VWF: RCo (Activity)	CS-2000i (Sysmex Corp.)	
ADAMTS13 (Activity)	ADAMTS13 ELISA Kit (Kainos Laboratories Inc.)	Frozen storage period of material 6-12 months Ratio of blood group O to other blood groups O group : other groups = 3 : 7
TPS, FPS (Concentration)	Asserachrom Total Protein S TMB Asserachrom Free Protein S TMB (Roche Diagnostics K.K.)	
C3a (Concentration)	Human C3a ELISA kit (BD Biosciences)	
pH, pCO ₂	Cobas b221 (Roche Diagnostics K.K.)	
ETP, Lag Time, Peak Height, Time to Peak, Start Tail	The calibrated automated thrombogram (CAT) assay (Thermo Fisher Scientific K.K.)	Frozen storage period of material 12-15 months Ratio of blood group O to other blood groups O group : other groups = 3 : 7

結果および考察

1. 凝固因子, 血漿因子

結果を Table 3-A に示した。

第 VIII 因子活性は, 融解後 0 時間で 1.256 ± 0.455 IU/ml, 4°C 保管にて 24 時間で 0.881 ± 0.332 IU/ml, 48 時間で 0.732 ± 0.281 IU/ml であった。欧州ガイドラインでは不安定な第 VIII 因子が 0.70 IU/ml 以上であることが FFP の基準の一つとなっている⁸⁾。Heymann や Lamboo によると 2 日間の保存でも融解後 0 時間の値が十分に高いため 0.70 IU/ml 以下に下がらないことを報告しており⁹⁾¹⁰⁾, 本検討も同様の傾向を示していた。

第 VIII 因子活性が低い O 型由来の FFP でも, 融解後 0 時間で 0.893 ± 0.191 IU/ml, 4°C 保管では融解後 6 時間まで, 22°C 保管では 24 時間まで 0.70 IU/ml 以上を保っていた (Fig. 1)。

第 V 因子, 第 XI 因子や ADAMTS13 の欠乏症等では, これらの成分を FFP から補充する必要があるため融解後の活性が十分維持されている必要がある。第 V 因子および第 XI 因子は, 保管期間に伴い, 活性の低下

を示したが, 120 時間においても 0.90 IU/ml 近い値を示していた。保管期間中に変動の少なかった ADAMTS13 と併せて, これらの成分は融解後 120 時間まで十分に活性を維持していると考えられた。

2. 凝固阻害因子

結果を Table 3-B に示した。

Yazer らや Nifong らは Thawed Plasma および FFP 24 における PS が融解後 1 日目と比べ 5 日目に 1~6°C 保管で 26%, 20°C 保管で 64% 低下すると報告しており¹¹⁾¹²⁾, これに基づき FDA では Thawed Plasma の PS を維持するため 1~6°C での保管を推奨している¹³⁾。本検討においても, 4°C 保管に比べ 22°C 保管で Total Protein S (TPS) 濃度は, 低下傾向を示した。TPS は, 補体制御因子 C4bp 結合型 PS と抗凝固作用を有する遊離型の Free Protein S (FPS) から成り立っているが, 保管中に FPS の低下は認めず, 120 時間まで維持されていた。

また 22°C 保管では, TPS と FPS の変動の差より C4bp 結合型 PS が低下したと考えられ, 補体 C3a が 22°C 保

Table 3 Quality of FFP after thawing and during storage for 120 hours at 4 and 22°C

3-A: Coagulant parameters

Analyte (number of samples)	Thawed, 0 h	°C	3 h	6 h	24 h	48 h	120 h
PT (sec) (33)	11.0 ± 0.5	4	11.0 ± 0.5	11.0 ± 0.5	11.3 ± 0.5*	11.5 ± 0.7*	11.9 ± 0.6*
		22	10.9 ± 0.5*	10.9 ± 0.5*	11.0 ± 0.5	11.2 ± 0.6*	12.0 ± 0.6*
APTT (sec) (34)	29.4 ± 2.6	4	29.3 ± 2.5	29.6 ± 2.6	30.8 ± 2.7	31.7 ± 2.8*	32.1 ± 2.8*
		22	28.9 ± 2.4*	29.0 ± 2.5*	29.4 ± 2.4	29.9 ± 2.5*	30.6 ± 2.7*
Fbg (mg/dl) (37)	244.7 ± 47.8	4	245.3 ± 49.2	244.4 ± 47.7	244.0 ± 48.2	244.6 ± 49.2	244.3 ± 48.7
		22	244.0 ± 48.0	243.7 ± 48.3	242.8 ± 49.3*	240.8 ± 48.3*	235.1 ± 47.7*
II (IU/ml) (37)	1.022 ± 0.128	4	NT	NT	1.006 ± 0.125*	0.995 ± 0.125*	0.998 ± 0.124*
		22			1.014 ± 0.131	0.997 ± 0.117*	0.976 ± 0.117*
V (IU/ml) (30)	1.088 ± 0.290	4	1.086 ± 0.292	1.066 ± 0.256	1.026 ± 0.229*	0.975 ± 0.241*	0.893 ± 0.184*
		22	1.114 ± 0.286	1.106 ± 0.280	1.084 ± 0.254	1.012 ± 0.246*	0.869 ± 0.202*
VII (IU/ml) (33)	1.176 ± 0.253	4	1.166 ± 0.261	1.159 ± 0.242	1.041 ± 0.210*	0.939 ± 0.196*	0.821 ± 0.160*
		22	1.197 ± 0.260	1.201 ± 0.253	1.136 ± 0.245*	1.015 ± 0.223*	0.818 ± 0.158*
VIII (IU/ml) (32)	1.256 ± 0.455	4	1.207 ± 0.440	1.144 ± 0.412*	0.881 ± 0.332*	0.732 ± 0.281*	0.639 ± 0.245*
		22	1.217 ± 0.436	1.174 ± 0.420*	0.962 ± 0.349*	0.800 ± 0.309*	0.652 ± 0.244*
XI (IU/ml) (39)	1.043 ± 0.306	4	1.018 ± 0.291	0.995 ± 0.287*	0.937 ± 0.247*	0.908 ± 0.246*	0.880 ± 0.232*
		22	1.022 ± 0.290	1.002 ± 0.291*	0.982 ± 0.278*	0.939 ± 0.257*	0.890 ± 0.244*
VWF: RCo (IU/ml) (39)	1.097 ± 0.394	4	NT	NT	1.089 ± 0.397	1.082 ± 0.406	1.029 ± 0.395*
		22			1.098 ± 0.406	1.063 ± 0.375	1.041 ± 0.389*
ADAMTS13 (%) (39)	91.8 ± 20.5	4	91.2 ± 19.4	89.6 ± 18.5	91.0 ± 21.8	91.1 ± 20.7	90.2 ± 20.0
		22	90.2 ± 21.9	90.5 ± 23.2	89.4 ± 21.1	88.1 ± 20.4*	87.5 ± 20.0*

3-B: Coagulation inhibitor parameters

Analyte (number of samples)	Thawed, 0 h	°C	3 h	6 h	24 h	48 h	120 h
TPS (%) (39)	80.1 ± 17.9	4	82.7 ± 17.7	84.7 ± 18.5	85.9 ± 19.5*	78.7 ± 16.3*	78.2 ± 15.9
		22	81.1 ± 18.4	84.7 ± 19.6*	74.9 ± 18.3*	73.9 ± 17.4*	68.0 ± 14.4*
FPS (%) (39)	70.1 ± 14.7	4	74.8 ± 16.0*	77.5 ± 16.1*	77.3 ± 17.5*	71.4 ± 17.0	72.4 ± 14.9
		22	78.0 ± 14.8*	73.5 ± 13.4*	67.8 ± 13.0	70.3 ± 13.7	70.3 ± 12.8

3-C: Thrombin generation parameters

Analyte (number of samples)	Thawed, 0 h	°C	3 h	6 h	24 h	48 h	120 h
ETP (nM·min) (6)	1.073 ± 133	4	1.127 ± 135	1.176 ± 142*	1.106 ± 140	1.131 ± 151	1.047 ± 147
		22	1.114 ± 171	1.178 ± 129*	1.099 ± 136	1.116 ± 157	1.035 ± 138
Lag Time (mim) (6)	2.07 ± 0.19	4	2.28 ± 0.39	2.13 ± 0.22	2.43 ± 0.38*	2.55 ± 0.29*	2.89 ± 0.34*
		22	2.19 ± 0.31	2.07 ± 0.14	2.13 ± 0.21	2.22 ± 0.25	2.61 ± 0.25*
Peak Height (nM) (6)	143.4 ± 48.0	4	152.8 ± 40.5	153.1 ± 39.8	129.9 ± 33.2	124.2 ± 27.6	105.2 ± 27.1*
		22	154.0 ± 46.7	157.8 ± 41.9	147.4 ± 38.3	145.5 ± 38.2	125.2 ± 31.0
Time to Peak (mim) (6)	6.74 ± 1.04	4	6.92 ± 1.23	6.85 ± 0.69	7.91 ± 0.92*	8.33 ± 0.83*	9.39 ± 0.82*
		22	6.72 ± 1.20	6.66 ± 0.79	6.88 ± 0.66	7.06 ± 0.79	7.92 ± 0.72*
Start Tail (mim) (6)	25.2 ± 2.6	4	24.8 ± 2.6	24.9 ± 1.9	26.9 ± 2.7	27.8 ± 2.7*	29.1 ± 3.4*
		22	24.4 ± 2.3	24.4 ± 1.7	24.6 ± 2.0	25.3 ± 2.7	26.4 ± 3.2

3-D: Complement parameters

Analyte (number of samples)	Thawed, 0 h	°C	3 h	6 h	24 h	48 h	120 h
C3a (mg/dl) (39)	0.40 ± 0.13	4	0.39 ± 0.12	0.40 ± 0.13	0.42 ± 0.14	0.44 ± 0.14*	0.46 ± 0.14*
		22	0.40 ± 0.13	0.41 ± 0.14	0.42 ± 0.13	0.48 ± 0.14*	0.65 ± 0.22*

3-E: Blood gas parameters

Analyte (number of samples)	Thawed, 0 h	°C	3 h	6 h	24 h	48 h	120 h
pH (39)	7.27 ± 0.08	4	7.32 ± 0.04*	7.32 ± 0.04*	7.35 ± 0.05*	7.37 ± 0.05*	7.45 ± 0.06*
		22	7.34 ± 0.05*	7.35 ± 0.05*	7.43 ± 0.05*	7.52 ± 0.04*	7.69 ± 0.04*
pCO ₂ (mmHg) (38)	37.8 ± 10.4	4	36.1 ± 10.9*	36.4 ± 10.8	34.3 ± 10.8*	31.4 ± 11.3*	26.7 ± 8.5*
		22	34.0 ± 9.1*	33.1 ± 9.8*	27.1 ± 8.1*	21.3 ± 6.1*	12.7 ± 3.6*

The data represent mean ± SD. NT: not tested.

Statistical analysis was performed using GraphPad Prism version 5.02 (GraphPad Software Inc.).

† Significant difference ($P < 0.05$) when compared 4°C with 22°C results using two-way ANOVA with Bonferroni post hoc test.

* Significant difference ($P < 0.01$) when compared to 0-hour results using Dunnett's test.

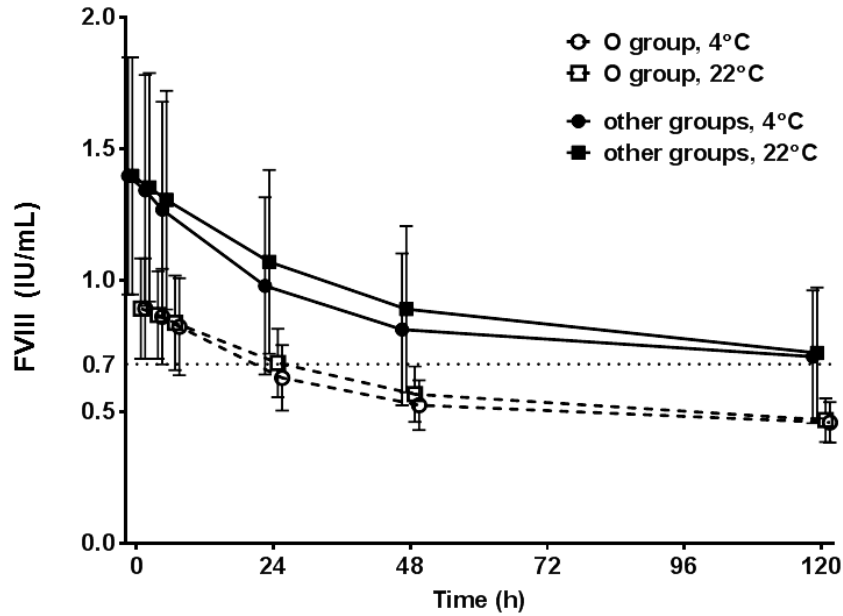


Fig. 1 FVIII in blood group O and other blood groups (O group: n=9, other groups: n=23).

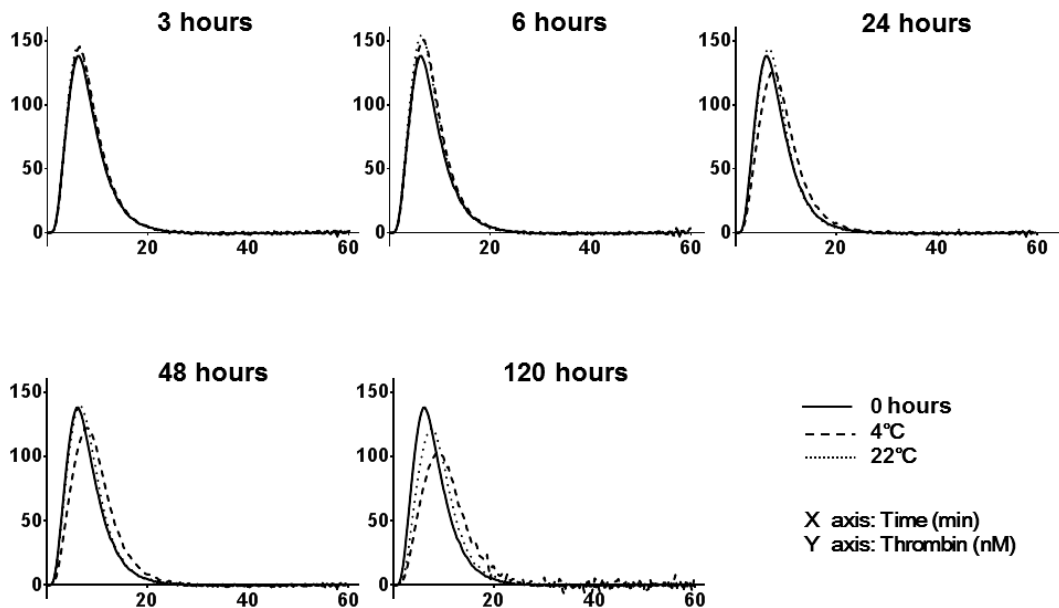


Fig. 2 Thrombogram of FFP during storage at each temperature after thawing (mean, n=6).

管で上昇傾向が強かったことを併せて考えると、補体の活性化に伴うPSへの影響が示唆されたが、これらの直接的な関与については更なる検討が必要である。

3. トロンビン生成能

結果を Table 3-C に示した。

複合型凝固障害に対する FFP の投与は凝固因子だけでなく、線溶系因子の補正を目的とする場合もあり、FFP のトロンビン生成能を測定することにより総合的な凝固能についても評価を行った。4°C 保管にて、24

時間でLag timeとTime to Peakに延長を認めた。トロンビンの生成パターンを示すトロンボグラムから得られるLag timeとTime to Peakはトロンビン生成の開始時間、トロンビン生成量が最大値に到達するまでの時間をそれぞれ意味し、これらの延長は線溶抵抗性が低下し、止血機能が不十分である可能性があるとして報告されている¹⁴⁾。しかし、融解後120時間まで4°C、22°Cともにトロンボグラムに著しい変動が見られないことから (Fig. 2)、FFP 融解後120時間までは総合的な凝固

能が維持されていると考えられた。

4. 補体

結果を Table 3-D に示した。

C3a はどちらの保管温度でも 48 時間以降に有意な上昇を認めた。また保管温度間でも 48 時間以降に差が認められた。血液製剤では、補体が活性化される¹⁵⁾ことが知られており、成分採血由来の血漿についても C3a が全血採血由来に比べ高値となり、保管期間中にも補体活性が上昇する¹⁶⁾。本検討では C3a の分解産物である C3a-desArg を測定し、C3a の活性化レベルの指標とした。

嶋田らは、非溶血性輸血副作用患者の補体活性を C3a の前駆体である C3 の減少量で報告しており、Anaphylatic shock を起こした患者の C3 が $13.6 \pm 18.4 \text{ mg/dl}$ 減少したと報告している¹⁷⁾。本検討結果では、22°C にて 120 時間後に C3a が大きく上昇したが、この増加量は、嶋田らの報告の数十分の一であった。しかし C3a-desArg 自体が生理活性を有していることから、融解後 FFP の使用期限を考慮する上では補体の活性化に注意が必要である。

5. pH, pCO₂

結果を Table 3-E に示した。

どちらの保管温度でも FFP 融解後の pH は 3 時間以降に有意な上昇を認めた。pH, pCO₂ では 24 時間以降で保管温度間の差を認めた。CO₂ 溶存率は温度と逆相関にあるため 4°C に比べ 22°C 保管で pH が上昇したと考えられた。pH の上昇は凝固時間の短縮¹⁸⁾や、凝固因子活性に影響を及ぼすこと¹⁹⁾が報告されており、本検討においても 22°C で凝固因子活性が高い傾向を示したのは、この pH の影響だと考えられた。

6. 全血採血由来 FFP との比較

内藤らは、全血採血由来 FFP の融解後の品質は、第 V 因子および第 VIII 因子が保管に伴い低下するが、トロンビン生成能が融解後 0 時間から 120 時間まで有意な変動を示さなかったことから、使用期限を延長できる可能性がある⁶⁾と報告している。成分採血と全血採血では pH の異なる抗凝固剤を用いるが、内藤らによれば、全血採血由来 FFP の融解後 0 時間の pH は、 7.43 ± 0.04 であり、今回我々が評価した成分採血由来 FFP の pH 7.27 ± 0.08 と比較し、近い値を示していた。これは、血液に対する抗凝固剤の添加割合が採血方法により異なるため、FFP における pH の差が減少したものと考えられた。本検討結果と内藤らの報告を併せて考えると両採血方法由来の FFP において融解後の凝固時間や凝固因子活性の維持に差はないと考えられ、いずれの採血由来 FFP も融解後の使用期限を現行より延長できる可能性がある点で、同様の傾向を示していた。

結 語

成分採血由来 FFP の融解後の品質について検討した。融解後の成分採血由来 FFP においては、120 時間後においても第 VIII 因子を除く凝固因子活性の低下はほとんどなく、トロンビン生成能も維持されており、融解後の成分採血由来 FFP 使用期限を現在のものより、延長できる可能性が示された。

室温 22°C での保管については、4°C 保管と比べ、補体 C3a の経時的な上昇、凝固阻害因子 TPS の低下、pH の有意な上昇を認めた。

著者の COI 開示：本論文発表内容に関連して特に申告なし

本論文の内容の一部は、第 61 回日本輸血・細胞治療学会総会において発表した。

文 献

- 1) 厚生労働省：生物学的製剤基準，平成 27 年厚生労働省告示 第 192 号，2015，235—236。
- 2) AABB, the American Red Cross, America's Blood Centers, and the Armed Services Blood Program: CIRCULAR OF INFORMATION FOR THE USE OF HUMAN BLOOD AND BLOOD COMPONENTS, USA, 2013, 16—20. <http://www.aabb.org/tm/coi/Documents/coil113.pdf> (2015 年 4 月現在)。
- 3) ANZSBT: Extended Life Plasma: A Framework for Preparation, Storage and Use, 2nd Edition, Australia & New Zealand, 2013, 14—15。
- 4) JPAC: Guidelines for the Blood Transfusion Services in the United Kingdom, 8th Edition, UK, 2013. <http://www.transfusionguidelines.org.uk/red-book/chapter-7-specifications-for-blood-components/7-15-fresh-frozen-plasma-leucocyte-depleted> (2015 年 4 月現在)。
- 5) National Users' Board Sanquin Blood Supply: Blood Transfusion Guideline, Netherland, 2011, 18—20。
- 6) 内藤 祐, 林 宜亨, 秋野光明, 他：新鮮凍結血漿の融解後の使用期限。日本輸血細胞治療学会誌, 60: 577—584, 2014。
- 7) de Wit HJ, Scheer G, Muradin J, et al: Influence of the primary anticoagulant on the recovery of factor VIII in cryoprecipitate. Vox Sanguinis, 51: 172—175, 1986。
- 8) EDQM: Guide to the preparation, use and quality assurance of blood components, 17th Edition, EU, 2013, 351—368。
- 9) von Heymann C, Keller MK, Spies C, et al: Activity of clotting factors in fresh-frozen plasma during storage at 4 degrees C over 6 days. Transfusion, 49: 913—920, 2009。

- 10) Lamboo M, Poland DC, Eikenboom JC, et al: Coagulation parameters of thawed fresh-frozen plasma during storage at different temperatures. *Transfusion Medicine*, 17: 182—186, 2007.
- 11) Yazer MH, Cortese-Hassett A, Triulzi DJ: Coagulation factor levels in plasma frozen within 24 hours of phlebotomy over 5 days of storage at 1 to 6 degrees C. *Transfusion*, 48: 2525—2530, 2008.
- 12) Nifong TP, Light J, Wenk RE: Coagulant stability and sterility of thawed S/D-treated plasma. *Transfusion*, 42: 1581—1584, 2002.
- 13) FDA: Guidance for Industry An Acceptable Circular of Information for the Use of Human Blood and Blood Components, USA, 2014, 24—27.
- 14) 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 : 217—225, 2007.
- 15) 柴 雅之, 田所憲治, 徳永勝士, 他: 血小板濃厚液保存中のサイトカイン産生, ヒスタミン遊離および補体の活性化. *日本輸血学会雑誌*, 40 : 716—720, 1994.
- 16) Sonntag J, Stiller B, Walka MM, et al: Anaphylatoxins in fresh-frozen plasma. *Transfusion*, 37: 798—803, 1997.
- 17) 嶋田英子, 下山田高茂, 穴沢雅子, 他: 非溶血性輸血副作用発生時の患者の血中補体濃度の検討. *日本輸血細胞治療学会誌*, 55 : 633—638, 2009.
- 18) Green FW Jr, Kaplan MM, Curtis LE, et al: Effect of acid and pepsin on blood coagulation and platelet aggregation. A possible contributor prolonged gastroduodenal mucosal hemorrhage. *Gastroenterology*, 74: 38—43, 1978.
- 19) Bladbjerg EM, Jespersen J: Activity of recombinant factor VIIa under different conditions in vitro: effect of temperature, pH, and haemodilution. *Blood Coagulation & Fibrinolysis*, 19: 369—374, 2008.

QUALITY OF APHERESIS-DERIVED FRESH-FROZEN PLASMA AFTER THAWING

*Jumpei Mori*¹⁾, *Akira Iwama*¹⁾, *Mami Matsumoto*²⁾, *Yu Naito*³⁾, *Yoshiaki Hayashi*³⁾, *Katsuhiko Kurihara*²⁾, *Mitsuaki Akino*³⁾, *Masayuki Shiba*¹⁾, *Hitoshi Okazaki*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

³⁾Japanese Red Cross Hokkaido Block Blood Center

Keywords:

Fresh-frozen plasma, Apheresis, Shelf life, Coagulant factors, Thrombin generation

©2015 The Japan Society of Transfusion Medicine and Cell Therapy

Journal Web Site: <http://yuketsu.jstmct.or.jp/>