

新鮮凍結血漿の長期保存後の凝固因子活性

瀧崎 晶弘¹⁾ 森 純平¹⁾²⁾ 岩間 輝¹⁾ 柴 雅之¹⁾ 内藤 祐³⁾
 林 宜亨³⁾ 秋野 光明³⁾⁴⁾ 松本 真実⁵⁾ 益子 毅⁵⁾ 小野寺秀一⁵⁾
 金子 祐次⁵⁾ 榎本 圭介⁵⁾ 茶谷 真⁵⁾ 栗原 勝彦⁵⁾ 小池 敏靖²⁾
 寺田あかね²⁾ 大橋 祥朗²⁾ 佐竹 正博¹⁾ 田所 憲治¹⁾⁴⁾

新鮮凍結人血漿 (FFP) の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, 凝固第 II, V, VIII (FVIII) 因子活性は, 血液製剤の使用指針に記載されているが, その他の凝固因子について報告はない。

そこで, 成分由来 FFP (FFP480) と全血由来 FFP (FFP240) の品質評価を凍結前と凍結保存後 (1~13 カ月) に行った。

保存 12 カ月において, 凍結前活性値を 100 とした相対値で FFP480, FFP240 とともに 90 を下回った凝固因子は FVIII のみであり, その他の凝固関連項目は凍結保存により活性値が安定していた。生物学的製剤基準における凝固試験の判定基準 (PT 20sec 以下) は, すべての FFP で満たした。トロンビン生成試験は, すべての評価項目において凍結前と比較して保存 13 カ月で変化率 10% 以内であった。O 型 FFP の FVIII 及び VWF : RCo は, O 型以外より有意に低値を示したが, トロンビン生成試験結果に有意な差は認められなかった。

キーワード : FFP480, FFP240, 凝固因子活性, トロンビン生成, 凍結保存

はじめに

新鮮凍結人血漿 (FFP) は, 血漿因子の欠乏による病態の改善を目的に投与され, 特に凝固因子を補充することにより出血の予防や止血の促進効果 (予防的投与と治療的投与) をもたらすことにある¹⁾。

FFP の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), 凝固第 II (FII), FV, FVIII 因子活性は, 血液製剤の使用指針¹⁾や輸血用血液製剤試験成績集²⁾に記載されているが, その他の凝固因子活性や生理的凝固阻害因子, 凝固反応の全体像が評価可能なトロンビン生成能^{3)~5)}についての報告はない。播種性血管内凝固症候群の治療は基礎疾患の治療とヘパリンなどによる抗凝固療法であるが, これらを前提として生理的凝固阻害因子 (アンチトロンビン, プロテインシ C など) の同時補給を目的に FFP が投与される¹⁾。また, FXI 因子欠乏症では濃縮製剤がないため, FFP が適応となる¹⁾。このように輸血用血液製剤試験成績集²⁾に記載されていない血漿因子の補充を目的に FFP

を使用する場合がある。

そこで成分採血由来 FFP (FFP480) と 400ml 全血採血由来 FFP (FFP240) について, 凍結前と凍結保存後 (1~13 カ月) に凝固関連試験を実施し, 活性値を測定して有効期限における安定性を評価した。FFP240 については, トロンビン生成試験も実施した。

O 型 FFP は FVIII 活性及びフォンビレブランド因子 (VWF) 活性が低値であると海外で報告⁶⁾されているため, 本邦で製造されている O 型と O 型以外の FFP について, FVIII 活性, VWF 活性及びトロンビン生成能の比較を行った。また, FFP480 及び FFP240 の凍結前の各品質項目について, 比較を行ったので併せて報告する。

方 法

1. 対象

献血の同意説明書により, 同意の得られた健康人ドナーから採血・製造した FFP480 と FFP240 を試験血

1) 日本赤十字社血液事業本部中央血液研究所
 2) 日本赤十字社近畿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
 4) 日本赤十字社血液事業本部
 5) 日本赤十字社関東甲信越ブロック血液センター
 [受付日 : 2015 年 12 月 7 日, 受理日 : 2016 年 4 月 4 日]

液として用いた。FFP480は抗凝固剤ACD-A液で成分採血し、FFP240は抗凝固剤CPD液で400ml全血採血後、遠心分離により製造した。検体数はFFP480を99本(A型44本、O型24本、B型28本、AB型3本)、FFP240を96本(A型46本、O型24本、B型24本、AB型2本)とし、O型を約25%含むこととした。

2. 試験血液の調製方法

凍結前及び凍結保存後(1カ月、3カ月、6カ月、9カ月、12カ月、13カ月)に試験血液から約20ml検体を採取して凝固関連試験を実施した。FFPは繰り返し凍結融解することによりFV及びFVIII等の凝固因子活性が低下することが報告⁷⁾されているため、保存期間ごとに経時的に採取するのではなく、凍結前及び所定の保存期間経過後の計2回(40ml)とした。

採血から急速凍結を開始するまでの時間により、凝固因子活性は影響⁸⁾を受けるため、FFP480は採血後4~6時間⁹⁾、FFP240は採血後6~8時間⁹⁾に-20℃以下で急速凍結した。

3. 評価項目

1) 性状試験

容量及びpHを測定対象とした。容量は電子天びん(GX-2000R; A&DあるいはLP4200S; ザルトリウスジャパン)で測定し、pHを血液ガス分析装置(cobas b221; Roche Diagnosticsあるいはラピッドポイント405; SIEMENS)で測定した。

2) 凝固関連試験

PT, APTT, フィブリノーゲン濃度(Fbg), FII, FV, FVII, FVIII, FIX, FX, FXI, FXII, FXIII, フォンビレブランド因子活性リソセチンコファクター(VWF:RCo), アンチトロンビン活性(AT), プロテインC活性(PC)を全自動血液凝固測定装置(CS-2000i; Sysmex)で測定した。

測定試薬は、PT試薬(デイドイノピン; Sysmex), APTT試薬(アクチンFSL; Sysmex), トロンビン試薬(トロンボチェックFib(L); Sysmex), 測定項目の欠乏血漿試薬(FII, FV, FVII, FVIII, FIX, FX, FXI, FXII; Sysmex), ベリクロームFXIII(Sysmex), VWF試薬(BCフォンビレブランド試薬; Sysmex), ベリクロームアンチトロンビンIII(オートB; Sysmex), ベリクロームプロテインC(Sysmex)を使用した。

3) トロンビン生成試験

トロンビン生成能はHemkerらの方法¹⁰⁾に基づき、トロンビン生成測定システム: Calibrated Automated Thrombogram (Thrombinoscope)で測定した。

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(トロンビン生成最大値), 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), PPP試薬(Thrombinoscope), Flu-Ca蛍光基質試薬キット(Thrombinoscope)を用いた。FFP240はFFP480と比較して、採血から凍結を開始するまでの時間が2時間長く規定⁹⁾されており、抗凝固剤の比率が高く希釈されているため、トロンビン生成能が低値になると考えられたのでFFP240を優先して測定した。

4. 統計処理

凍結保存期間中の各品質項目の安定性を比較するため、保存期間が最も短い保存1カ月と有効期限である保存12カ月の間でStudent's t-testを行い、危険率1%未満を有意とした。O型におけるFVIII, VWF:RCo, トロンビン生成能の比較はStudent's t-testを用い、凍結前検体を対象として危険率1%未満を有意とした。また、FFP480とFFP240の各品質項目の比較は、凍結前検体を対象としてStudent's t-testを行い、危険率1%未満を有意とした。統計解析ソフトはGraph Pad Prism 5(エムデーエフ)を用いた。

結 果

1. FFP480

性状試験結果及び凝固関連試験結果をTable 1に示した。また、O型とO型以外の血液型におけるFVIII, VWF:RCoをTable 2に示した。保存検体(1~13カ月)の凝固関連試験結果は、凍結前検体(pre-freeze)を100とした時の相対値で示した。検量線範囲の上限である2.0IU/mlを超えて、試験血液を希釈せずに測定した項目は除外した(Table 1, 2)。

1) 性状試験

容量は $480 \pm 3\text{ml}$ となり、すべて製品規格(460~500ml)を満たした(Table 1)。保存期間中のpHは7.29~7.37であり、保存12カ月において有意な変化を認めなかった。

2) 凝固関連試験

有意な変化を認めた項目は、PT, FII, FVII, FIX, FX, PCであったが、すべての保存期間で凍結前に対して、PTは105以内であり、FII, FVII, FIX, FX, PCは90以上を維持していた(Table 1)。APTT, Fbg, FV, FVIII, FXI, FXII, FXIII, VWF:RCo, ATは保存12カ月で有意な変化を認めなかったが、FVIIIは凍結前に対してすべての保存期間で90を下回った。

3) O型とO型以外の血液型におけるFVIII, VWF:RCo

凍結前FFPにおけるFVIIIは、O型で $0.99 \pm 0.27\text{IU/}$

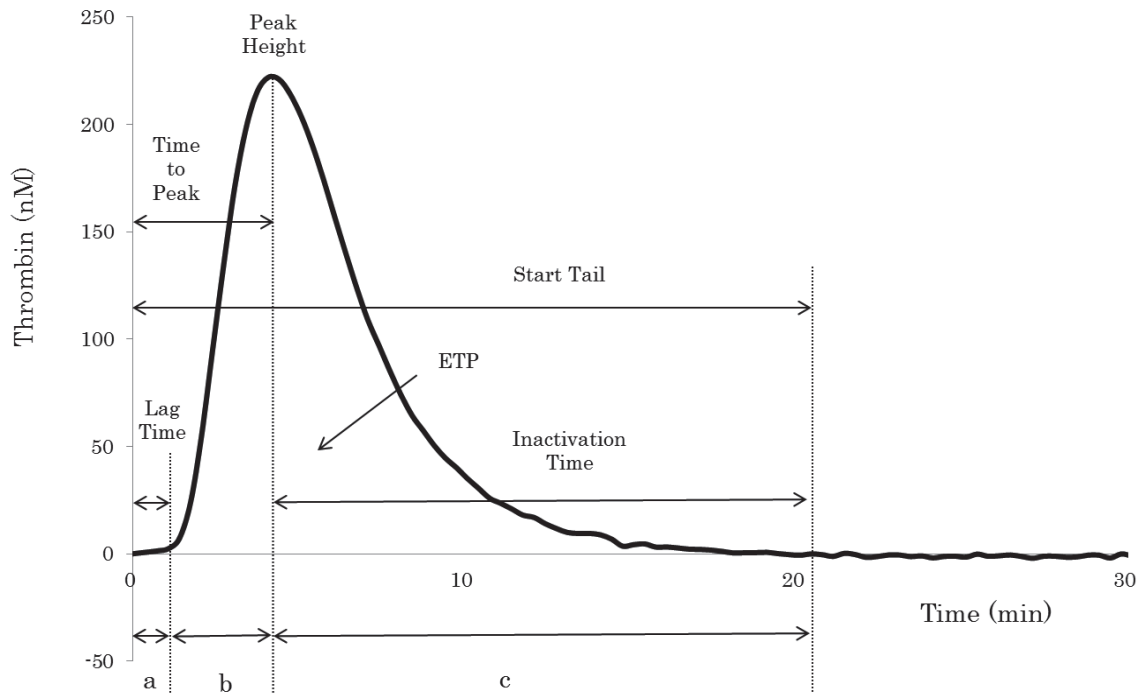


Fig. 1 Thrombogram parameters
 a. Initial (lag) phase
 b. Burst thrombin formation
 c. Inactivation phase

Table 1 FFP480 long-term storage test in pre-freeze and freeze preservation for 1, 3, 6, 9, 12, 13 months

parameter	pre-freeze	1 month	3 months	6 months	9 months	12 months	13 months
Volume	480 ± 3 (ml)	—	—	—	—	—	—
pH (at 22°C)	7.32 ± 0.05	7.30 ± 0.04	7.37 ± 0.05 ¹⁾	7.29 ± 0.05	7.30 ± 0.04	7.29 ± 0.07	7.30 ± 0.04
PT	10.8 ± 0.5 (sec)	101 ± 1	104 ± 3	103 ± 2	103 ± 1	104 ± 2*	102 ± 2
APTT	28.8 ± 3.0 (sec)	103 ± 3	102 ± 1	102 ± 2	105 ± 4	105 ± 4	106 ± 4
Fibrinogen	244 ± 49 (mg/dl)	101 ± 2	—	104 ± 5	101 ± 4	101 ± 5	—
FII	1.08 ± 0.15 (IU/ml) †	102 ± 3	97 ± 5	95 ± 14	93 ± 3	92 ± 5*	97 ± 6
FV	1.17 ± 0.25 (IU/ml)	96 ± 5	91 ± 5	90 ± 5	93 ± 11	93 ± 13	99 ± 6
FVII	1.18 ± 0.24 (IU/ml) †	100 ± 6	—	95 ± 13	94 ± 8	91 ± 7*	—
FVIII	1.28 ± 0.37 (IU/ml) ²⁾ †	83 ± 6 ³⁾	85 ± 5 ³⁾	84 ± 6 ⁴⁾	84 ± 6 ³⁾	86 ± 6 ⁵⁾	87 ± 4 ⁵⁾
FIX	1.01 ± 0.33 (IU/ml) ⁶⁾ †	100 ± 6	—	99 ± 4 ³⁾	—	91 ± 11*	—
FX	1.03 ± 0.18 (IU/ml)	102 ± 4	—	97 ± 8	—	96 ± 8*	—
FXI	1.06 ± 0.31 (IU/ml) ⁷⁾ †	96 ± 5	—	95 ± 7	92 ± 9	99 ± 9 ³⁾	—
FXII	0.91 ± 0.41 (IU/ml) ⁷⁾ †	104 ± 5	—	103 ± 7	—	96 ± 13 ³⁾	—
FXIII	0.93 ± 0.23 (IU/ml)	103 ± 2	—	102 ± 10	—	103 ± 4	—
VWF: Rco	1.05 ± 0.38 (IU/ml) †	105 ± 9	—	99 ± 10	98 ± 10	105 ± 9	—
Antithrombin	1.05 ± 0.11 (IU/ml) †	102 ± 2	—	103 ± 7	104 ± 2	99 ± 6	—
Protein C	1.10 ± 0.19 (IU/ml)	101 ± 2	—	103 ± 2	—	103 ± 2*	—

pre-freeze: n = 99 1, 9, 12 months (freeze preservation): n = 16 3, 6, 13 months (freeze preservation): n = 17 mean ± standard deviation

1) n = 8 2) n = 85 3) n = 15 4) n = 14 5) n = 13 6) n = 97 7) n = 98

*Comparison of parameter at 1 month vs 12 months with Student's t-test. Significance was set at p < 0.01.

Comparison of parameter in pre-freeze between FFP480 and FFP240 with Student's t-test. Significance was set at p < 0.01.

† Significantly high value in FFP480

ml, O型以外で $1.39 \pm 0.34 \text{ IU/ml}$ となり O型で有意に低値を示した (Table 2). VWF : RCo は O型で $0.69 \pm 0.18 \text{ IU/ml}$, O型以外で $1.16 \pm 0.35 \text{ IU/ml}$ となり, O

型で有意に低値を示した.

2. FFP240

FFP240 における性状試験結果, 凝固関連試験結果及

Table 2 Changes of FVIII and VWF: RCo between blood group O donor and non-group O donor

brood product	parameter	group	pre-freeze	1 month	3 months	6 months	9 months	12 months	13 months
FFP480	FVIII	group O	0.99 ± 0.27 (IU/ml) ¹⁾	85 ± 7 ²⁾	89 ± 7 ²⁾	88 ± 2 ²⁾	85 ± 6 ²⁾	86 ± 7 ²⁾	88 ± 5 ²⁾
		non-group O	1.39 ± 0.34 (IU/ml) ³⁾	82 ± 6 ⁴⁾	83 ± 4 ⁴⁾	82 ± 7 ⁵⁾	84 ± 6 ⁴⁾	86 ± 6 ⁶⁾	87 ± 4 ⁶⁾
FFP480	VWF: RCo	group O	0.69 ± 0.18 (IU/ml) ¹⁾	97 ± 5 ²⁾	—	100 ± 14 ²⁾	103 ± 11 ²⁾	108 ± 14 ²⁾	—
		non-group O	1.16 ± 0.35 (IU/ml) ⁷⁾	107 ± 9 ⁸⁾	—	99 ± 9 ⁹⁾	96 ± 10 ⁸⁾	103 ± 7 ⁸⁾	—
FFP240	FVIII	group O	0.87 ± 0.21 (IU/ml) ¹⁾	82 ± 4 ²⁾	82 ± 5 ²⁾	77 ± 10 ²⁾	76 ± 5 ²⁾	69 ± 8 ²⁾	69 ± 6 ²⁾
		non-group O	1.24 ± 0.35 (IU/ml) ¹⁰⁾	82 ± 5 ⁸⁾	84 ± 5 ⁸⁾	86 ± 6 ⁸⁾	83 ± 10 ⁸⁾	77 ± 2 ⁸⁾	79 ± 8 ⁸⁾
FFP240	VWF: RCo	group O	0.74 ± 0.21 (IU/ml) ¹⁾	96 ± 4 ²⁾	—	103 ± 4 ²⁾	102 ± 3 ²⁾	94 ± 6 ²⁾	—
		non-group O	1.02 ± 0.21 (IU/ml) ¹⁰⁾	97 ± 6 ⁸⁾	—	108 ± 10 ⁸⁾	105 ± 9 ⁸⁾	98 ± 12 ⁸⁾	—
FFP240	Lag Time	group O	1.8 ± 0.3 (min) ⁸⁾	113 ± 2 ¹¹⁾	—	96 ± 15 ¹¹⁾	135 ± 22 ¹¹⁾	115 ± 18 ¹¹⁾	110 ± 4 ¹¹⁾
		non-group O	2.0 ± 0.4 (min) ¹²⁾	112 ± 4 ¹³⁾	—	92 ± 9 ¹³⁾	113 ± 8 ¹³⁾	114 ± 10 ¹³⁾	102 ± 3 ¹³⁾
FFP240	Time to Peak	group O	5.3 ± 1.6 (min) ⁸⁾	88 ± 2 ¹¹⁾	—	95 ± 7 ¹¹⁾	104 ± 6 ¹¹⁾	100 ± 2 ¹¹⁾	94 ± 5 ¹¹⁾
		non-group O	5.3 ± 1.5 (min) ¹²⁾	90 ± 4 ¹³⁾	—	94 ± 6 ¹³⁾	104 ± 11 ¹³⁾	102 ± 12 ¹³⁾	92 ± 6 ¹³⁾
FFP240	Inactivation Time	group O	15.5 ± 1.1 (min) ⁸⁾	98 ± 6 ¹¹⁾	—	99 ± 7 ¹¹⁾	93 ± 4 ¹¹⁾	103 ± 0 ¹¹⁾	100 ± 1 ¹¹⁾
		non-group O	15.3 ± 0.9 (min) ¹²⁾	98 ± 1 ¹³⁾	—	101 ± 5 ¹³⁾	93 ± 6 ¹³⁾	102 ± 2 ¹³⁾	100 ± 3 ¹³⁾
FFP240	Start Tail	group O	20.8 ± 2.4 (min) ⁸⁾	95 ± 5 ¹¹⁾	—	98 ± 7 ¹¹⁾	95 ± 2 ¹¹⁾	102 ± 1 ¹¹⁾	98 ± 0 ¹¹⁾
		non-group O	20.6 ± 2.2 (min) ¹²⁾	96 ± 1 ¹³⁾	—	99 ± 4 ¹³⁾	95 ± 3 ¹³⁾	102 ± 4 ¹³⁾	97 ± 4 ¹³⁾
FFP240	Peak Height	group O	208 ± 54 (nM) ⁸⁾	112 ± 11 ¹¹⁾	—	95 ± 0 ¹¹⁾	106 ± 1 ¹¹⁾	101 ± 11 ¹¹⁾	108 ± 14 ¹¹⁾
		non-group O	219 ± 51 (nM) ¹²⁾	110 ± 4 ¹³⁾	—	101 ± 9 ¹³⁾	97 ± 9 ¹³⁾	100 ± 19 ¹³⁾	108 ± 8 ¹³⁾
FFP240	ETP	group O	1,148 ± 144 (nM · min) ⁸⁾	92 ± 3 ¹¹⁾	—	93 ± 6 ¹¹⁾	94 ± 1 ¹¹⁾	101 ± 11 ¹¹⁾	97 ± 7 ¹¹⁾
		non-group O	1,174 ± 167 (nM · min) ¹²⁾	94 ± 2 ¹³⁾	—	98 ± 4 ¹³⁾	87 ± 8 ¹³⁾	97 ± 8 ¹³⁾	98 ± 4 ¹³⁾

1) n=24 2) n=4 3) n=61 4) n=11 5) n=10 6) n=9 7) n=75 8) n=12 9) n=13 10) n=72 11) n=2 12) n=36 13) n=6 mean ± standard deviation

*Comparison of parameter in pre-freeze between group O donor and non-group O donor with Student's t-test. Significance was set at p<0.01

びトロンビン生成試験結果を Table 3 に示した。また、O 型と O 型以外の血液型における FVIII, VWF: RCo, トロンビン生成試験結果を Table 2 に示した。保存検体 (1~13 カ月) の凝固関連試験結果とトロンビン生成試験結果は、凍結前検体 (pre-freeze) を 100 とした時の相対値で示した。

1) 性状試験

容量は 220 ± 6ml となり、すべて製品規格 (207~263 ml) を満たした (Table 3)。保存期間中の pH は 7.31~7.36 であり、保存 12 カ月において有意な変化を認めなかった。

2) 凝固関連試験

有意な変化を認めた項目は、Fbg, FV, FVIII, FXIII, PC であったが、FVIII を除く項目は保存 12 カ月においても 90 以上を維持していた (Table 3)。FVIII は保存 1 カ月で 82 ± 5 に低下し、保存 12 カ月で 75 ± 5 となり、凍結前と比較して最も低値を示した項目であった。PT, APTT, FII, FVII, FIX, FX, FXI, FXII, VWF: RCo, AT は保存 12 カ月で有意な変化を認めなかった。

3) トロンビン生成試験

Time to Peak, Inactivation Time, Start Tail は有意な延長が認められたが、凍結前に対して保存 12 カ月でそれぞれ 102 ± 10, 102 ± 2, 102 ± 3 となり、105 以内で

あった (Table 3)。Lag Time, Peak Height, ETP は保存 12 カ月で有意な変化を認めなかった。

4) O 型と O 型以外の血液型における FVIII, VWF: RCo, トロンビン生成試験

凍結前 FFP における FVIII は、O 型で 0.87 ± 0.21 IU/ml, O 型以外で 1.24 ± 0.35 IU/ml となり、O 型で有意に低値を示した (Table 2)。VWF: RCo は O 型で 0.74 ± 0.21 IU/ml, O 型以外で 1.02 ± 0.21 IU/ml となり、O 型で有意に低値を示した。トロンビン生成試験の評価項目は、O 型と O 型以外の血液型で有意な差を認めなかった。

3. FFP480 と FFP240 の比較

FFP480 及び FFP240 の凍結前における各品質項目の有意差検定結果をそれぞれ Table 1 及び Table 3 に示した。FFP480 において、FII, FVII, FVIII, FIX, FXI, FXII, VWF: RCo, AT で有意に高値を示した。pH, PT, APTT, Fbg, FV, FX, FXIII, PC は、有意な差を認めなかった。

考 察

本邦における FFP の凝固試験は、生物学的製剤基準に PT が 20sec 以下でなければならないと定められている⁹⁾が、すべての試験血液でこの基準を満たした (Table

Table 3 FFP240 long-term storage test in pre-freeze and freeze preservation 1, 3, 6, 9, 12, 13 months

Parameter	pre-freeze	1 month	3 months	6 months	9 months	12 months	13 months
Volume	220±6 (ml)	—	—	—	—	—	—
pH (at 22°C)	7.31±0.08	7.33±0.11	7.33±0.11	7.36±0.09	7.36±0.10	7.34±0.11	7.35±0.12
PT	10.9±0.5 (sec)	103±2	105±2	103±1	104±1	102±2	102±2
APTT	28.6±1.9 (sec)	103±1	104±2	103±2	105±3	105±4	105±1
Fibrinogen	235±46 (mg/dl)	98±3	—	103±2	97±3	95±3*	—
FII	0.99±0.12 (IU/ml) †	100±3	97±4	99±7	98±7	102±4	99±4
FV	1.13±0.23 (IU/ml)	95±4	87±5	93±9	85±8	90±3*	84±6
FVII	1.05±0.19 (IU/ml) †	98±4	—	100±4	93±6	99±3	—
FVIII	1.15±0.36 (IU/ml) †	82±5	84±5	84±8	81±10	75±5*	77±8
FIX	0.92±0.19 (IU/ml) †	94±5	—	90±6	—	89±7	—
FX	1.03±0.17 (IU/ml)	96±4	—	107±10	—	97±4	—
FXI	0.92±0.19 (IU/ml) †	97±6	—	97±4	99±4	93±6	—
FXII	0.76±0.28 (IU/ml) †	94±6	—	94±7	—	90±6	—
FXIII	0.98±0.24 (IU/ml)	100±2	—	103±3	—	106±5*	—
VWF: Rco	0.95±0.24 (IU/ml) †	97±6	—	107±11	104±8	97±11	—
Antithrombin	0.95±0.08 (IU/ml) †	100±2	—	101±2	101±4	99±2	—
Protein C	1.08±0.13 (IU/ml)	100±1	—	100±3	—	96±1*	—
Lag Time	1.9±0.4 (min) ¹⁾	113±3 ²⁾	—	93±10 ²⁾	119±15 ²⁾	114±11 ²⁾	104±5 ²⁾
Time to Peak	5.3±1.5 (min) ¹⁾	89±4 ²⁾	—	94±6 ²⁾	104±9 ²⁾	102±10 ²⁾ *	93±6 ²⁾
Inactivation Time	15.3±1.0 (min) ¹⁾	98±2 ²⁾	—	101±5 ²⁾	93±5 ²⁾	102±2 ²⁾ *	100±3 ²⁾
Start Tail	20.6±2.2 (min) ¹⁾	96±2 ²⁾	—	99±5 ²⁾	95±3 ²⁾	102±3 ²⁾ *	98±4 ²⁾
Peak Height	216±52 (nM) ¹⁾	110±6 ²⁾	—	100±8 ²⁾	99±9 ²⁾	100±16 ²⁾	108±8 ²⁾
ETP	1,167±160 (nM·min) ¹⁾	93±2 ²⁾	—	97±4 ²⁾	89±8 ²⁾	98±8 ²⁾	98±5 ²⁾

pre-freeze: n=96. 1, 3, 6, 9, 12, 13 months (freeze preservation): n=16 mean±standard deviation

1) n=48 2) n=8

*Comparison of parameter at 1 month vs 12 months with Student's t-test. Significance was set at p<0.01.

Comparison of parameter in pre-freeze between FFP480 and FFP240 with Student's t-test. Significance was set at p<0.01.

† Significant low value in FFP240

1, 3).

FFPの有効期限である保存12カ月で、FFP480、FFP240ともに凍結前100に対して90を下回ったのはFVIIIのみであり、FVIIIを除く凝固関連項目は凍結保存により活性値が安定していた (Table 1, 3)。FVIIIは保存期間が最も短い1カ月においても、凍結前100に対してFFP480で83±6、FFP240で82±5と低下が認められ、すべての保存期間でFFP480、FFP240ともに90を下回った (Table 1, 3)。FFP480の凍結工程は、MCU-1012K (サンヨー) を用いた条件で201±19 min必要であり¹¹⁾、FFP240の凍結工程は、TBF-400S (テイオン) を用いた条件で155±11 min必要である¹²⁾。すべての保存期間でFVIIIが低下した要因は、凍結が完了するまでFFPが液状であること¹³⁾¹⁴⁾や凍結時の氷晶生成¹⁵⁾¹⁶⁾に起因すると考えられ、保存工程より凍結工程で活性値が低下することを示唆する結果となった。

FFP480及びFFP240の有効期限は-20°C以下の凍結保存で採血後1年間であるが、英国では-25°C以下で有効期限3年間¹⁷⁾¹⁸⁾であり、American Association of Blood Banksは-65°C以下で有効期限7年間¹⁷⁾¹⁹⁾と規定している。今回の長期保存試験結果より、保存13カ月のFFPにおいても、生物学的製剤基準⁹⁾を満たしており、最も活性値が低下したFVIIIの場合、その低

下は凍結工程で起こり、保存によって大きくは低下しないと考えられたことから、FFP有効期限延長の可能性が示唆された。

トロンビン生成試験におけるLag TimeとTime to Peakの延長はトロンビン生成の開始やトロンビンバーストを遅らせ²⁰⁾、Peak Heightの低下はThrombin-activatable Fibrinolysis Inhibitor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ることが報告²¹⁾されている。FFP240の保存13カ月において、凍結前100に対してLag Timeは104±5、Time to Peakは93±6、Peak Heightは108±8といずれの項目も変化が10以内であったことから、保存13カ月まで凍結前と比較して凝固能に大きな変化はなく、安定なフィブリンが形成されると考えられた (Table 3)。

Lag Timeの決定要素はFbg、FV、FVII、FIXであり、Peak Height及びETPの決定要素はFbg、FII、FV、FX、FXII、AT、PCと報告²²⁾²³⁾がある。FFP480とFFP240を比較すると (Table 1, 3)、Lag Timeの正の決定要素であるFbg、FVに有意な差はなかったが、FVII、FIXはFFP480で有意に高値を示した。Peak Height及びETPの正の決定要素であるFbg、FV、FXに有意な差はなかったが、FII、FXIIはFFP480で有意に高値を示した。Peak Height及びETPの負の決定要素であ

る PC に有意な差はなかったが、AT は FFP480 で有意に高値を示した。これらの結果より、FFP480 のトロンビン生成能は、FFP240 と比較して Lag Time が短くなり、Peak Height 及び ETP が高くなる可能性があると考えられた。

凍結前 FFP における VWF : RCo 及び FVIII は、FFP480、FFP240 の O 型でいずれも有意に低値となった (Table 2)。これについては、O 型と O 型以外で血管内皮細胞からの VWF 産生量に差はないが、クリアランスが速いことが報告²⁴⁾されており、今回の結果はそれに矛盾しなかった。FVIII は担体タンパクである VWF と結合することで分解から保護され安定化²⁵⁾するため、O 型 FFP では VWF と相関して FVIII が低値を示した。しかしながら、トロンビン生成能は O 型 FFP で有意に低値を示さなかったことから、トロンビン生成を開始してトロンビンバースト²⁰⁾を起こすのに十分な凝固因子活性は保持しており、FFP 凝固能は O 型と O 型以外で同程度であると考えられた。

凝固関連試験において、FFP480 は FFP240 より有意に高値を示す項目があった (Table 1, 3)。FFP480 は ACD-A 液を使用して全血との比率 11 : 1 で成分採血装置により採血されており、FFP240 は CPD 液を使用して全血との比率 7 : 1 で採血後、遠心分離操作により製造されているため、FFP480 では血漿に含まれる抗凝固剤の割合が低くなり、凝固関連試験で高値を示す項目があったと考えられた。

結 語

1) 生物学的製剤基準における FFP 凝固試験判定基準 (PT 20sec 以下) は、すべての FFP で満たした。

2) 保存 12 カ月で FFP480、FFP240 とともに凍結前 100 に対して 90 を下回ったのは FVIII のみであり、その他の凝固関連項目である PT, APTT, Fbg, FII, FV, FVII, FIX, FX, FXI, FXII, FXIII, VWF : RCo, AT, PC は凍結保存により活性値が安定していた。

3) FFP240 におけるトロンビン生成試験は、すべての評価項目で凍結前と比較して保存 13 カ月で変化率 10% 以内であった。

4) O 型 FFP の FVIII 及び VWF : RCo は、O 型以外より有意に低値を示したが、トロンビン生成試験結果に有意な差は認められなかった。

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) 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.
- 2) 輸血用血液製剤 試験成績集, 日本赤十字社, 2013.

- 3) 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.
- 4) 松本智子, 嶋 緑倫 : トロンビン生成試験. 検査と技術, 39 : 1138—1144, 2011.
- 5) Luddington R, Baglin T: Clinical measurement of thrombin generation by calibrated automated thrombography requires contact factor inhibition. J Thromb Haemost, 2: 1954—1959, 2004.
- 6) Moeller A, Weippert-Kretschmer M, Prinz H, et al: Influence of ABO blood groups on primary hemostasis. Transfusion, 41: 56—60, 2001.
- 7) 瀧崎晶弘, 松本真実, 柴 雅之, 他 : 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. 日本輸血細胞治療学会誌, 61 : 403—408, 2015.
- 8) de Wit HJ, Sheer G, Muradin J, et al: Influence of the Primary Anticoagulation on the Recovery of the Factor VIII in Cryoprecipitate. Vox Sang, 51: 172—175, 1986.
- 9) 厚生労働省 : 生物学的製剤基準 (2014 年 厚生労働省告示第 439 号), 2014, 229.
- 10) Hemker HC, Gisen P, Al Dieri R, et al: Calibrated automated thrombin generation measurement in clotting plasma. Pathophysiol Haemost Thromb, 33: 4—15, 2003.
- 11) 石原徹也, 秋野光明, 内藤 祐, 他 : 新たな急速凍結装置の性能評価—凍結時間と凝固因子活性の比較—. 血液事業, 37 : 557—563, 2014.
- 12) 榎本圭介, 小野寺秀一, 金子祐次, 他 : 液体凍結装置を用いた高速凍結技術の血漿製剤への応用. 血液事業, 37 : 137—139, 2014.
- 13) Lamboo M, Poland D.C.W, Eikenboom J.C.J, et al: Coagulation parameters of thawed fresh-frozen plasma during storage at different temperatures. Transfusion Medicine, 17: 182—186, 2007.
- 14) Tholpady A, Monson J, Radovancevic R, et al: Analysis of prolonged storage on coagulation Factor (F) V, F VII, and F VIII in thawed plasma is it time to extend the expiration date beyond 5days? Transfusion, 53: 645—650, 2013.
- 15) Sward-Nilsson AM, Persson P.O, Johnson U, et al: Factors influencing factor VIII activity in frozen plasma. Vox Sanguinis, 90: 33—39, 2006.
- 16) Akerblom O, et al: Freezing technique and Quality of Fresh Frozen Plasma. Transfusion Medicine and Hemotherapy, 19: 283—287, 1992.
- 17) Cardigan R, Green L: Thawed and liquid plasma—what do we know? Vox Sanguinis, 10: 1111/vox.12251, 2015.
- 18) Guidelines for the blood transfusion services in the United Kingdom, 8th ed, The Stationary Office, London, 2013.

- 19) AABB Standards Program Committee: Standards for Blood Banks and Transfusion Services, AABB, Bethesda, MD, 2013.
- 20) 松本智子, 嶋 緑倫: トロンビン生成試験. 検査と技術, 39: 1138—1144, 2011.
- 21) Boffa MB, Wang W, Bajzar L, et al: Plasma and recombinant thrombin-activable fibrinolysis inhibitor (TAFI) and activated TAFI compared with respect to glycosylation, thrombin/thrombomodulin-dependent activation, thermal stability, and enzymatic properties. *J Biol Chem*, 273: 2127—2135, 1998.
- 22) Castoldi E, Rosing J: Thrombin generation tests. *Thrombosis Research*, 127: S21—S25, 2011.
- 23) Dielis A.W.J.H, Castoldi E, Spronk H.M.H, et al: Coagulation factors and the protein C system as determinants of thrombin generation in normal population. *J Thromb Haemost*, 6: 125—131, 2008.
- 24) Gallinaro L, Cattini MG, Sztukowska M, et al: A shorter von Willebrand factor survival in O blood group subjects explains how ABO determinants influence plasma von Willebrand factor. *Blood*, 111: 3540—3545, 2008.
- 25) 志田泰明, 野上恵嗣: FVIIIの生合成およびフォンビレブランド因子との相互作用に関する最新の知見. 血栓止血誌, 26: 49—56, 2015.

ACTIVITIES OF COAGULATION FACTORS IN FRESH FROZEN PLASMA AFTER LONG-TERM STORAGE

Akihiro Fuchizaki¹⁾, Jumpei Mori¹⁾²⁾, Akira Iwama¹⁾, Masayuki Shiba¹⁾, Yu Naito³⁾, Yoshiaki Hayashi³⁾, Mitsuaki Akino³⁾⁴⁾, Mami Matsumoto⁵⁾, Tsuyoshi Mashiko⁵⁾, Hidekazu Onodera⁵⁾, Yuji Kaneko⁵⁾, Keisuke Enomoto⁵⁾, Makoto Chatani⁵⁾, Katsuhiko Kurihara⁵⁾, Toshiyasu Koike²⁾, Akane Terada²⁾, Yoshio Oohashi²⁾, Masahiro Satake¹⁾ and Kenji Tadokoro¹⁾⁴⁾

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

²⁾Japanese Red Cross Kinki Block Blood Center

³⁾Japanese Red Cross Hokkaido Block Blood Center

⁴⁾Japanese Red Cross Society, Blood Service Headquarters

⁵⁾Japanese Red Cross Kanto-Koshinetsu Block Blood Center

Abstract:

Japanese guidelines for usage of blood products for transfusion describes prothrombin time (PT), activated partial thromboplastin time (APTT), and activities of Factors (F) II, V, and VIII in FFP. However, no studies in Japan have reported the activities of other coagulation factors. We investigated the activities of 15 coagulation-related factors in apheresis-derived and whole blood-derived FFP (FFP480 and FFP240, respectively) after 1, 3, 6, 9, 12, and 13 months of storage.

Only FVIII showed >10% decrease in activity after storage in both FFP480 and FFP240. Activities of all other coagulation-related factors showed high stability during storage. All samples met the Japanese standard in “Minimum Requirements for Biological Products” (PT ≤20 sec). All parameters in thrombin generation tests showed ≤10% change after storage. Although O-group samples showed lower FVIII and VWF:RCO levels than non-O-groups, they had thrombin generation activity comparable to non-O-groups.

Keywords:

FFP480, FFP240, Activity of coagulation factor, Thrombin generation, Freeze preservation