

## 膜型血漿分離器を用い短時間かつ簡便に新鮮凍結血漿中の フィブリノゲンおよび FXIII などを濃縮する方法

小野寺秀一<sup>1)</sup> 金子 佑次<sup>1)</sup> 小池 靖敏<sup>1)</sup> 福田 香苗<sup>1)</sup> 阿部 高秋<sup>1)</sup>  
 平山 順一<sup>1)</sup> 柴 雅之<sup>1)</sup> 五十嵐 滋<sup>1)</sup> 永井 正<sup>1)2)</sup> 佐竹 正博<sup>1)</sup>  
 田所 憲治<sup>3)</sup>

Cryoprecipitate (Cryo) は新鮮凍結血漿 (FFP) より高濃度に Fibrinogen (Fib) を含み、止血障害を改善する効果が高いことで知られる。Cryo は医療機関が自ら調製して使用できるが、大型の冷却遠心機を備えた施設に限定される。本検討では遠心機によらず膜型血漿分離器 (分離器) を用いて FFP の Fib を濃縮し、生成物 (FFP の使用量を変えて 2 系作製。産物を M1, M2 とした。各 n=10) を回収して、その凝固因子濃度等の性状を明らかとした。分離器の中空糸外側に FFP (M1 作製では 458ml, M2 作製では 878ml) を充填し、これを 1,200ml の生食で洗浄した後、中空糸外側に残った成分を生食で回収 (M1 : 51ml, M2 : 99ml) した。生成物の fib 濃度は M1 が 695mg/dl, M2 が 953mg/dl で、調製時間は M1 で 23 分, M2 で 71 分であった。M2 は同一の FFP から作製された Cryo (Fib 濃度 : 1,128mg/dl) と比べて、2.6 倍の FXIII 活性 (507IU/dl) と 4.4 倍の FV 活性 (502IU/dl) を示した。本方法は遠心機や送液ポンプが不要であり、多くの医療機関で Fib 濃縮物の調製が可能になることが期待できるが、これには更なる研究が必要である。

キーワード：大量出血，クリオプレシピテート，フィブリノゲン，膜型血漿分離器，濃縮

### はじめに

高度の低フィブリノゲン血症は、しばしば患者容態の危機的状況を招くことから、大量出血時などにはフィブリノゲン (Fib : Fibrinogen) を補充し、血中 Fib 濃度を止血が可能となるレベルまで上昇させることが重要である<sup>1)</sup>。一般的に凝固因子の補充に用いられる新鮮凍結血漿 (FFP : Fresh frozen plasma) には正常程度程度の凝固因子しか含まれておらず、急性凝固障害を改善させるためには、大量の FFP 投与<sup>2)</sup>を必要とする場合があり、肺水腫、輸血関連循環過負荷などの合併症や、輸血関連急性肺障害等の免疫学的副作用を引き起こす可能性が指摘されている<sup>3)4)</sup>。さらに、FFP の投与では高度の低 Fib 血症から離脱できず<sup>5)</sup>、止血予防効果や止血効果が得られないこと<sup>6)7)</sup>が指摘されている。これに対して、FFP よりも高濃度に Fib を含む Fib 濃縮製剤 (FC : Fibrinogen Concentrate) やクリオプレシピテート (Cryo : Cryoprecipitate) などは、大量出血に伴う急性凝固障害や止血障害を改善する効果が高いことが示されている<sup>8)~11)</sup>。FC は溶剤との混合で速

やかに溶解し、Cryo は容量が少なく比較的短時間で解凍できるため、ともに FFP よりも迅速に使用できる利点もある。我が国において、FC は適応症が先天性フィブリノゲン欠乏症に限定されており、かつ製造量も約 11,500g/年<sup>12)</sup>と少ない。他方で Cryo は医療機関が自ら調製して使用することが可能である。

Cryo は Fib に加え FVIII や vWF 等が原料とする FFP よりも濃縮された生成物である<sup>13)</sup>。その調製法が Judith Graham Pool によって初めて示されたのは 1964 年のこと<sup>14)</sup>であるが、現在に至っても調製の基本形は不変で、まず 4℃ 程度の温度下において FFP を 18~24 時間かけて緩速融解して寒冷沈降物を生成し、次に沈降物を冷却遠心機で遠心分離することが求められる<sup>13)~15)</sup>。したがって、Cryo の自家調製が可能であるのは、血漿製剤をバッグごと遠心分離可能な大型の冷却遠心機を備えた施設に限定される。このことも障壁となつてか、日本において、大量出血や大量輸血時の凝固障害に対して Cryo で対応している医療施設は、ほぼ 500 床以上の大規模施設に限られる<sup>16)</sup>。

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) 日本赤十字社血液事業本部

[受付日 : 2018 年 10 月 15 日, 受理日 : 2018 年 12 月 25 日]

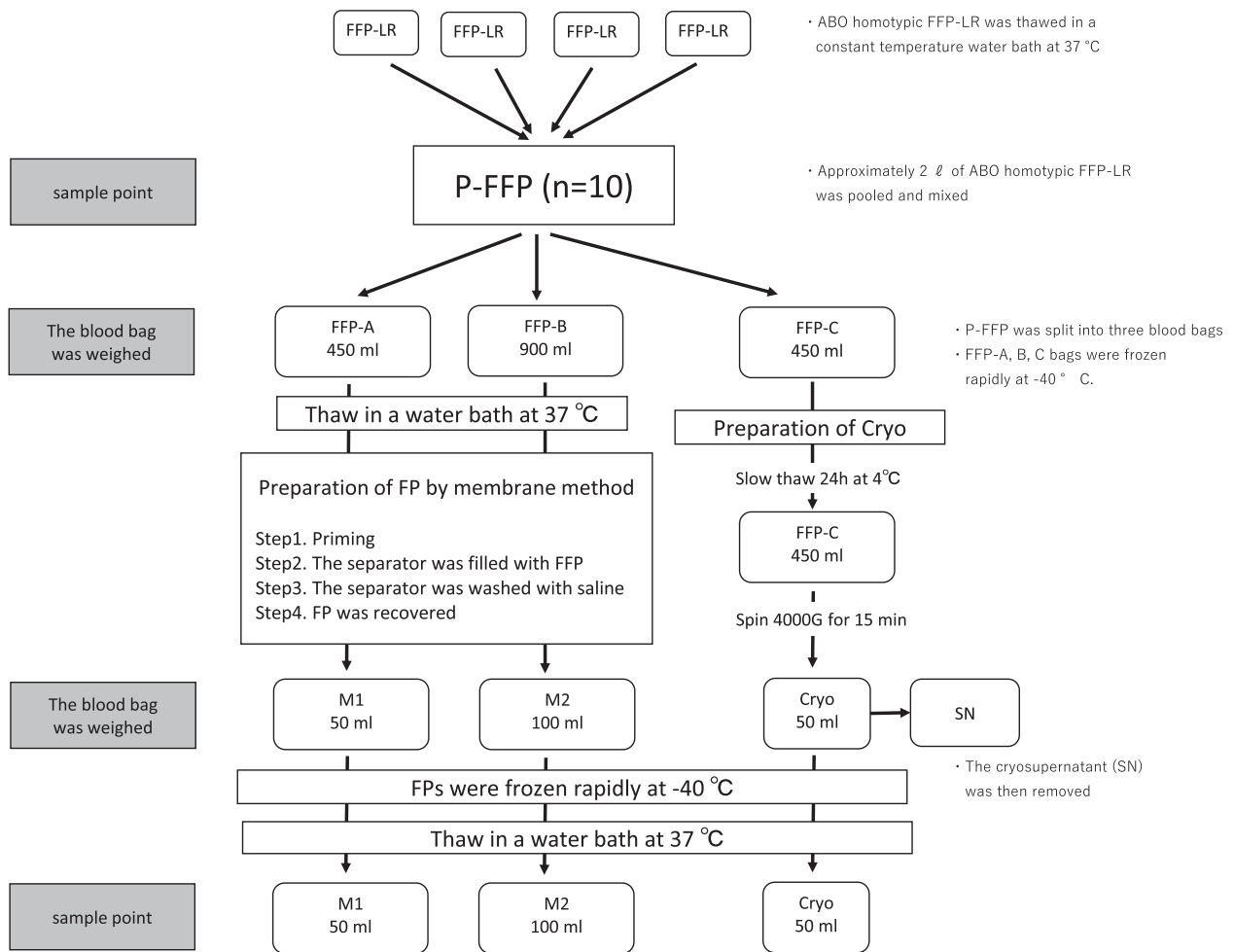


図1 試験のデザイン

既に我々が報告した膜型血漿分離器 EC-4A10 を用いた洗浄血小板の調製法<sup>17)</sup>(膜法)は、限外濾過(UF: Ultrafiltration)によって血小板を濃縮して回収することが可能であった。この EC-4A10 の Fib に対する篩係数<sup>18)</sup>は 0 であることから、EC-4A10 を用いることで Fib を濃縮回収できると考えられた。そこで本検討では、膜法を応用して Cryo の様な fib 濃縮物 (FP: Fibrinogen Preparations) を調製することが可能かを検証した。また、この生成物の性状を明らかとするため、凝固因子量などを Cryo と比較検討した。

**方 法**

本検討は日本赤十字社血液事業研究倫理審査委員会の承認を得て実施した。研究に使用した血液は、献血の同意説明書により研究利用に文書で同意した供血者から採取された。試験のデザインは図 1 のとおりである。

**原料 FFP の分割調製と保存**

FFP-LR 240 を 37°C の恒温水槽で融解したのち、ポ

リプロピレン製バッグ(セーフミック TPN バッグ, JMS) に約 2l 分プールして P-FFP とした (n=10)。P-FFP を次の要領で血液分離バッグに 3 分割し、FP の原料となる FFP-A, B, C (各 n=10) を調製した。FFP-A: 血液分離バッグ (KBP-1000FPN, 川澄化学工業) に血漿 450ml, FFP-B: 血液分離バッグ (KBP-1000FPN, 川澄化学工業) に血漿 900ml, FFP-C: 血液分離バッグ (KBP-600C, 川澄化学工業) に血漿 450ml。FFP-A, B, C の各々を冷凍庫 (MDF-U442, SANYO) に入れ -40°C で凍結保管した (以下、凍結保管と略記)。

**膜法による FP (膜法-FP) の調製**

以下の手順で、2 種の膜法-FP (FFP-A から M1, FFP-B から M2) を調製した。

・ FFP の融解と調製回路の作成 (図 2)

FFP-A または FFP-B を 37°C の恒温水槽で融解した。膜型血漿分離器 EC-4A10 (以下、分離器と略記。膜孔径 0.030µm, 膜面積 1.0m<sup>2</sup>, 膜素材エチレンービニルアルコール重合体, ハウジングサイズ 57φ×280mm, 川澄化学工業) と原料 FFP バッグ, 生理食塩水バッグ,

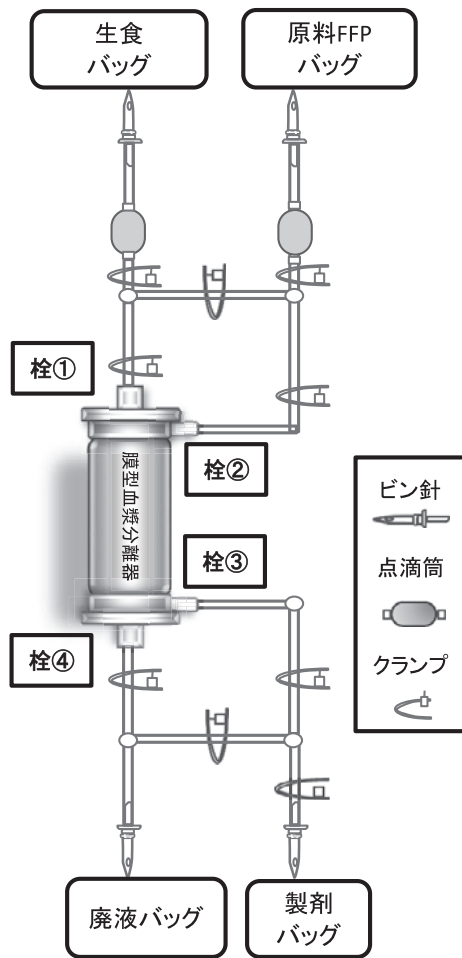


図2 調製回路の概形

送液は点滴筒と回収バッグ間の高低落差で行われた。  
回路の流路切替はクランプの開閉操作で行われた。

製剤バッグ (BB-T030DJ, テルモ), 廃液バッグ (セーフミック TPN バッグ, JMS) の各々を血液回路で連結した。原料 FFP バッグと生理食塩水バッグをガートル台に吊り下げ、分離器をガートル台の中央部に留め具で固定した。さらに、点滴筒と廃液バッグ間に約 140 cm の落差を設け、調製回路とした。なお、処理流量を観察する為に、廃液バッグを電子天秤 (LP-4200S, sartorius) の上に置いた。

・調製の手順 (図 3)

工程 1) プライミング: 生理食塩水を 500ml 使用して分離器内の注射用水を生理食塩水に置換した。工程 2) 原料 FFP の充填: 原料 FFP (FFP-A または FFP-B) の全量を分離器の中空系外側に充填した。工程 3) 洗浄: 生理食塩水 (約 1,200ml) で分離器内を洗浄した。工程 4) FP の回収: M1 は 50ml, M2 は 100ml の生理食塩水を使用して、製剤バッグに FP を回収した。これらの工程ごとに、クランプを手動で開閉操作して流路の切替を行った。工程 1) では、分離器の栓 (図 2) に繋がるライン (以下、単に栓という) をすべて開放し

て中空系内外の注射用水とエアを排出した。続く工程 2) から工程 3) では、分離器の栓①および栓③を閉じ、中空系の外側から内側に向かって原料 FFP または生理食塩水を分離器内に流入させて廃液を排出した。これとは逆に、工程 4) では分離器の栓②および栓④を閉じ、中空系の内側から外側に向かって生理食塩水を分離器内に流入させて FP を回収した。膜法-FP をハンドシーラーで調製回路から切り離し、凍結保管した。すべての調製実験において各工程の所要時間を記録し、処理流量を廃液バッグの重量増加から観測した。FFP 充填および洗浄の工程における流速変化を観察するために、M2 調製実験のうちの 3 例において、100ml 処理毎に所要時間を記録した。

**Cryo の調製**

Cryo を日本輸血細胞治療学会のクリオプレシテート作製プロトコル<sup>15)</sup> に準じて調製した (n=10)。FFP-C を冷蔵庫 (MPR-1410R, SANYO) に入れ静置し、緩速融解 (4℃, 24 hour) した。つづいて、4℃ に予冷した冷却遠心機 (CR7, HITACHI) で FFP-C-bag を遠心 (3,000G, 15min, 4℃) した。遠心後の上清血漿を無菌接続した血液分離バッグ (KBP-600C, 川澄化学工業) に排出し、FFP-C-bag 内の液量を 50ml 程度に減じて Cryo を調製した。Cryo-bag を水平浸透してペレットを微細化したのち、凍結保管した。

**容量および浸透圧**

原料 FFP および FP (M1, M2, Cryo) について、各々重量を電子天秤 (LP-4200S, sartorius) で計測した総重量から風袋重量を引き、比重 (FFP=1.03, M1=1.04, M2=1.04, Cryo=1.04) で除して容量を算出した。比重は密度比重計 (DA-650, 京都電子工業) で求めた。浸透圧は自動浸透圧測定装置 (OM-6040, アークレイ) で測定した。

**検体の採取と保管**

P-FFP および 37℃ の恒温水槽で融解した FP (M1, M2, Cryo) の血液バッグを良く転倒混和した。つづいて、血液バッグのチューブラインを鋏で切断して、血液検体をポリプロピレン製チューブ (BD Falcon 50ml, BD) に採取し、これを 2ml ずつセラムチューブ (MS-4603, 住友ベークライト) に分注し凍結保管した。

**各種蛋白および凝固因子の測定**

凍結検体を 37℃ の水浴で溶解し、各種蛋白および凝固因子の濃度又は活性を測定した。総蛋白およびアルブミン濃度を試薬 A/GB-テストワコー (和光純薬工業) と U2900 形分光光度計 (日立ハイテクノロジー) を用いて測定した。免疫グロブリン (IgG, IgA, IgM) 濃度を Immunochemistry system (Image 800, バックマン・コールター) を用いた peak-rate 比濁法で測定した。凝固因子を全自動血液凝固測定装置 (CS2000i, Sys-

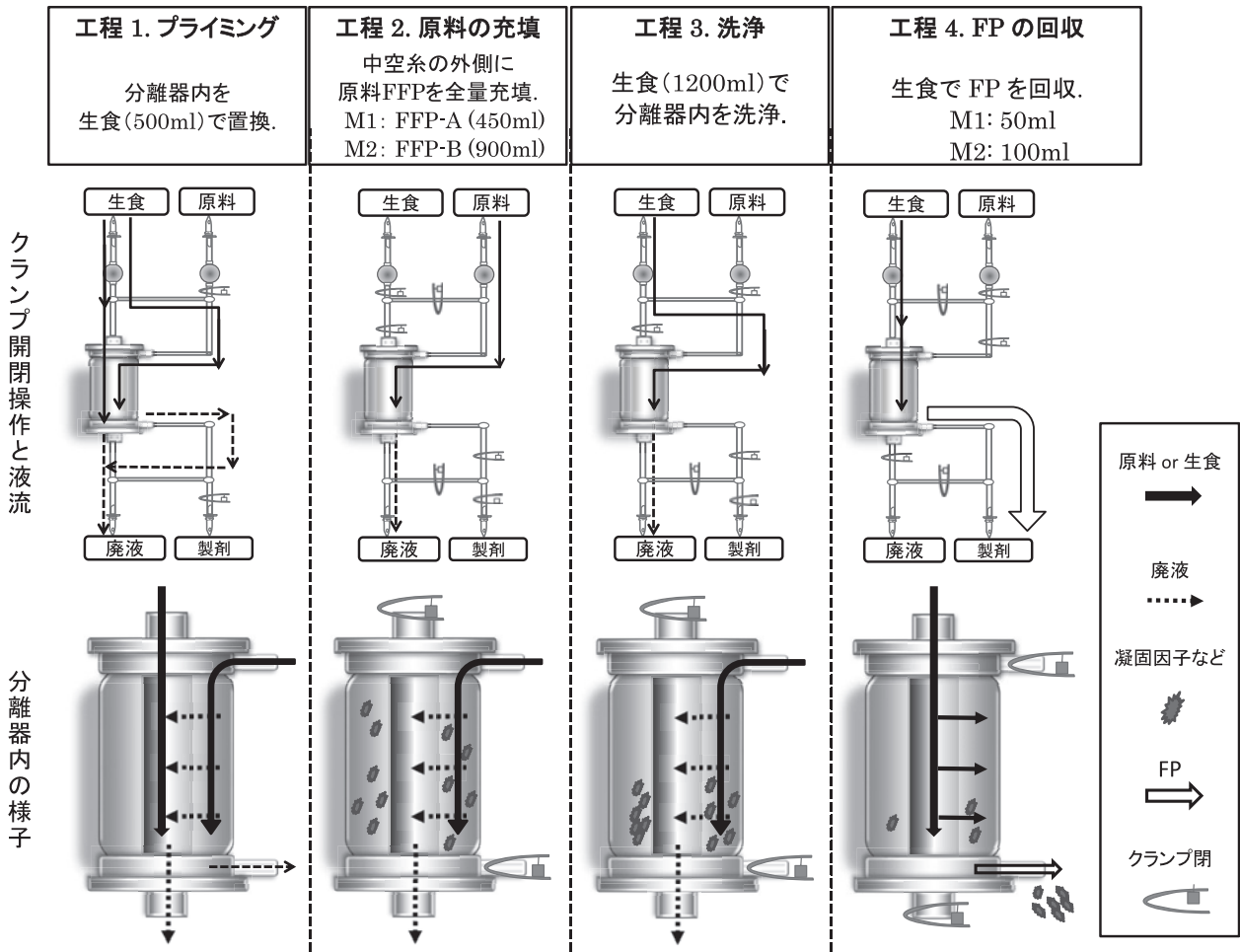


図3 膜法によるFPの調製手順  
FFPを膜型血漿分離器の中空系外側に充填し、生食で洗浄後にFPを回収した。

mex) と以下の試薬 (すべて Sysmex) を用いた分析システムで測定した. 測定装置に PT 試薬 (デイドイノビン), APTT 試薬 (アクチン FLS),  $\text{CaCl}_2$  試薬をセットし, Fib 濃度を トロンビン試薬 (トロンボチェック Fib (L)), FV 活性を FV 欠乏血漿, FVIII 活性を FVIII 欠乏血漿, FIX 活性を FIX 欠乏血漿, FXIII 活性をベリクローム FXIII 試薬, vWF-Rco 活性を BC フォンビレブランド試薬で測定した. Fibronectin 濃度を xMark マイクロプレートリーダー (BIO-RAD168-1150J1, BIO-RAD) と Fibronectin EIA Kit (Takara) を用いた ELISA で測定した. 測定項目に関して, 原料に対する FP の成分回収率を次式により算出した.

$$\text{各成分の回収率 (\%)} = \frac{\text{FP の成分濃度} \times \text{FP の容量}}{\text{P-FFP の物質濃度} \times \text{原料の容量}} \times 100$$

**比較, 統計**

各種蛋白および凝固因子の分析結果について, FP 群の成分濃度を各々の原料 FFP に対する濃縮比に一旦変換した. この値に関し, 解析ソフト GraphPad Prism 7.02 (エムデーエフ) を使用して, P-FFP と各 FP の間

を Dunnet-test, 各 FP の相互間を Tukey-test で解析した.

**結 果**

**容量, 調製時間**

原料 FFP, M1, M2, Cryo の容量を表 1 に示す. 原料 FFP に対する各 FP の容量比率 (FP/原料 FFP) はすべて 0.11 であった. FP の調製に要した平均時間は, FFP 解凍後のカラム充填から回収までが, M1 で 23 分, M2 で 71 分 (表 2) であった.

**FFP 充填および洗浄工程における液量区間毎の処理流速**

M2 の調製時における処理流速 (n=3) は, FFP 充填量の増加とともに減速し, 洗浄液処理量の増加とともに加速した (図 4).

**免疫グロブリン, 総蛋白, アルブミン, 浸透圧**

結果を表 3 に示す. IgG, IgA, IgM 濃度は, P-FFP および Cryo よりも膜法-FP で有意に高く, これら成分濃度の上昇の度合いは, M2 で M1 以上であった (IgG :



P-FFP<Cryo<M1≐M2, IgA および IgM : P-FFP≐Cryo<M1<M2). 総蛋白濃度は, P-FFP よりも FP で有意に高値であった (TP : P-FFP<M1<M2≐Cryo). Alb 濃度は, Cryo で FFP より有意に高く, 逆に膜法-FP で FFP より有意に低かった (Alb : M1≐M2<P-FFP<Cryo). 浸透圧は, P-FFP と膜法-FP の間に有意差を認めず, Cryo でこれらより有意に高値であった (P-FFP≐M1, M2<Cryo).

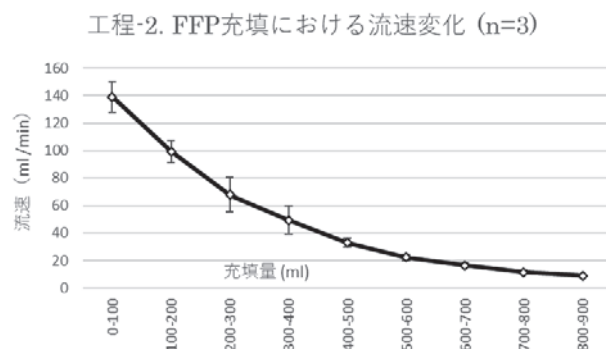
#### 凝固因子濃度および活性

結果を表4に示す. Fib 濃度および vWF-Rco 活性は, ともに膜法-FP より Cryo が有意に高値であった (Fib, vWF-Rho : P-FFP<M1<M2<Cryo). 一方で, FV 活性と FXIII 活性は, ともに Cryo より膜法-FP が有意に高値であった (FV : P-FFP≐Cryo<M1<M2, FXIII :

表1 原料 FFP とフィブリノゲン濃縮物の容量 (ml)

| FP 名 | 原料 FFP |            | FP   |          | 容量比 : FP/FFP |
|------|--------|------------|------|----------|--------------|
|      | 原料名    | 容量         | 製剤名  | 容量       |              |
| M1   | FFP-A  | 457.7±12.1 | M1   | 51.1±2.6 | 0.11±0.01    |
| M2   | FFP-B  | 877.8±13.6 | M2   | 99.0±3.0 | 0.11±0.00    |
| Cryo | FFP-C  | 455.5±8.7  | Cryo | 50.7±3.0 | 0.11±0.01    |

数値は平均値±SD.



P-FFP<Cryo<M1<M2). また, Fibronectin 濃度は, Cryo より M2 が有意に高値であった (Fibronectin : P-FFP<M1≐Cryo<M2). FVIII 活性について, Cryo と M2 の間に有意差を認めなかった (FVIII : FFP<M1<M2≐Cryo). 膜法-FP の FIX 活性は, P-FFP より有意に低値であった (FIX : M1≐M2<P-FFP<Cryo).

#### 成分の回収率

各 FP の成分回収率を表5に示す.

#### 考 察

血液浄化療法で使用される膜型血漿分離器 EC-4A10 を用いて FFP の凝固因子成分を濃縮し, M1 を約 23 分で, M2 を約 71 分で調製することが可能であること

表2 膜法-FP の調製に要した時間

| FP 名 (n=10) | 調製時間 (min.) |            |         | 合計         |
|-------------|-------------|------------|---------|------------|
|             | 工程-2 原料の充填  | 工程-3 洗浄    | 工程-4 回収 |            |
| M1          | 7 (6~9)     | 14 (10~17) | 1 (1)   | 23 (18~26) |
| M2          | 36 (33~43)  | 33 (29~37) | 2 (1~2) | 71 (65~79) |

・数値は平均値 (範囲)

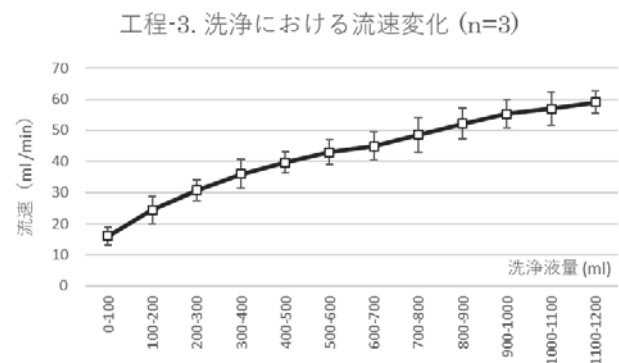


図4 FFP 充填および洗浄工程における流量区間毎の処理流速  
M2 の調製実験において FFP 充填および洗浄を行った際, 流量区間ごとに処理流速を算出した.

表3 免疫グロブリン濃度と蛋白濃度, 浸透圧

| 検体群   | IgG (mg/dl)                              | IgA (mg/dl)                               | IgM (mg/dl)                               | TP (g/dl)                              | Alb (g/dl)                                 | 浸透圧 (mOsm)                                    |
|-------|--|---|---|--|--|---|
| P-FFP | 900±116                                  | 187±23                                    | 88±14                                     | 6.2±0.2                                | 3.9±0.1                                    | 299.9±5.5                                     |
| M1    | 1,242±159 <sup>†</sup> [cr]<br>[1.4±0.2] | 442±57 <sup>†</sup> [cr]<br>[2.4±0.4]     | 350±40 <sup>†</sup> [cr]<br>[4.1±0.5]     | 7.1±0.8 <sup>†</sup><br>[1.2±0.1]      | 2.7±0.2 <sup>†</sup><br>[0.7±0.1]          | 286.6±2.6<br>[1.0±0.0]                        |
| M2    | 1,328±208 <sup>†</sup> [cr]<br>[1.5±0.1] | 543±82 <sup>†</sup> [m1][cr]<br>[2.9±0.3] | 474±92 <sup>†</sup> [m1][cr]<br>[5.4±0.5] | 8.5±1.1 <sup>†</sup> [m1]<br>[1.4±0.1] | 2.8±0.2 <sup>†</sup><br>[0.7±0.1]          | 286.6±0.8<br>[1.0±0.0]                        |
| Cryo  | 1,059±217 <sup>†</sup><br>[1.2±0.1]      | 239±48<br>[1.3±0.1]                       | 126±27 <sup>†</sup><br>[1.4±0.2]          | 8.6±1.2 <sup>†</sup> [m1]<br>[1.4±0.2] | 4.9±0.5 <sup>†</sup> [m1][m2]<br>[1.3±0.1] | 326.7±32.5 <sup>†</sup> [m1][m2]<br>[1.1±0.1] |

Data (n=10) are reported as mean±SD. [Ratio : FP-value/ each P-FFP-value]

<sup>†</sup> : Significant difference to FFP (Dunnet-test, p<0.05)

[m1] : Significantly higher than the M1 group. (Tukey-test, p<0.05)

[m2] : Significantly higher than the M2 group. (Tukey-test, p<0.05)

[cr] : Significantly higher than the Cryo group. (Tukey-test, p<0.05)

表4 凝固因子濃度と凝固因子活性

| 検体群   | Fibrinogen<br>(mg/dl)                                 | FVIII<br>(IU/dl)                              | vWF:Rco<br>(IU/dl)                                  | FXIII<br>(IU/dl)                                   | FV<br>(IU/dl)                                      | FIX<br>(IU/dl)                                     | Fibronectin<br>(mg/dl)                           |
|-------|---|---|---|--|--|--|--|
| P-FFP | 221.5 ± 15.3  | 119.7 ± 20.5                                  | 98.2 ± 8.5  | 96.8 ± 7.1   | 102.3 ± 8.8  | 99.0 ± 8.7   | 11.6 ± 0.8                                       |
| M1    | 695.5 ± 119.0 <sup>†</sup><br>(3.1 ± 0.3)             | 478.9 ± 100.6 <sup>†</sup><br>(4.0 ± 0.6)     | 417.0 ± 80.6 <sup>†</sup><br>(4.3 ± 0.8)            | 371.2 ± 71.7 <sup>†</sup> [cr]<br>(3.8 ± 0.6)      | 378.9 ± 73.8 <sup>†</sup> [cv]<br>(3.7 ± 0.7)      | 83.2 ± 12.8 <sup>†</sup><br>(0.8 ± 0.1)            | 43.1 ± 3.8 <sup>†</sup><br>(3.7 ± 0.4)           |
| M2    | 953.4 ± 121.8 <sup>†</sup> [ml]<br>(4.3 ± 0.3)        | 604.0 ± 99.5 <sup>†</sup> [ml]<br>(5.1 ± 0.6) | 537.6 ± 74.2 <sup>†</sup> [ml]<br>(5.5 ± 0.8)       | 506.5 ± 62.4 <sup>†</sup> [ml] [cr]<br>(5.2 ± 0.5) | 502.1 ± 59.0 <sup>†</sup> [ml] [cv]<br>(4.9 ± 0.5) | 74.0 ± 9.0 <sup>†</sup><br>(0.8 ± 0.1)             | 52.3 ± 2.7 <sup>†</sup> [ml] [cv]<br>(4.5 ± 0.3) |
| Cryo  | 1,128.1 ± 149.0 <sup>†</sup> [ml] [m2]<br>(5.1 ± 0.5) | 577.4 ± 76.4 <sup>†</sup> [ml]<br>(4.9 ± 0.5) | 848.8 ± 154.9 <sup>†</sup> [ml] [m2]<br>(8.7 ± 1.5) | 194.8 ± 15.3 <sup>†</sup><br>(2.0 ± 0.2)           | 113 ± 14.6<br>(1.1 ± 0.1)                          | 137.6 ± 16.5 <sup>†</sup> [ml] [m2]<br>(1.4 ± 0.2) | 40.4 ± 2.1 <sup>†</sup><br>(3.5 ± 0.2)           |

Data (n = 10) are reported as mean ± SD. [Ratio : FP-value/each P-FFP-value]

<sup>†</sup> : Significant difference to FFP (Dunnet-test, p < 0.05)

[m1] : Significantly higher than the M1 group. (Tukey-test, p < 0.05)

[m2] : Significantly higher than the M2 group. (Tukey-test, p < 0.05)

[cr] : Significantly higher than the Cryo group. (Tukey-test, p < 0.05)

を示した。また、膜法-FPのFV活性とFXIII活性は、Cryoより高値であることを示した(表4)。原料FFPに対する各FPの容量比率(FP/原料FFP)がすべて

0.11であったため、各FPの成分濃度を比較することで、成分回収率の優劣評価が可能であった。

膜法によるFPの調製では、分画分子量(MWCO)が200~250kDa程度と推測される中空糸膜によるUFで成分濃縮が行われることから、FibやFVIII、FXIII、FibronectinやFV等の分子サイズが300kDa程度以上の成分を濃縮回収できる(表4、5)。その一方で、アルブミンやIgGなどが濾過され濃厚とならないため、濃縮液の膠質浸透圧は低減される(表3)。これが一因となって、全工程で高低落差の位置エネルギーを利用した送液が可能であったため、Bunuan<sup>19)</sup>らが透析膜を用いてFFPを半量程度の容量に濃縮した方法と異なり、膜法-FPの調製には送液ポンプ等の機器が必要でない。調製回路の組み立ては、血液回路のダイアライザ接続部を分離器と繋ぎ、ピン針部を各種血液バッグに刺して行うが、これらは手組で行える。膜型血漿分離器をFFP濃縮の用途に使用することは、保険適用外の使用にあたるため、分離器の費用コスト(約2万円)は保険償還されない。

膜法-FP調製の実験結果について、分離器内へのFFP充填量とFPの凝固因子量の関係をみると、M2中の凝固因子(>300kDa)の濃度がM1より高値(表4)であった。したがって、FP中の凝固因子を高濃度かつ高収率とする為には、FFP充填量が多い方が有利と考えられた。一方で、分離器内へのFFP充填量と充填速度の関係(図4)をみると、FFP充填量の増加に伴う充填速度の低下がみられ、はじめ140ml/min程であった充填速度は、充填量800ml以降において10ml/min程となった。この結果は、FFP充填量の増加に伴って中空糸膜表面の濃度分極が進行し、分離器の有効膜面積が低下したことを示唆した。したがって、より多くのFFPを充填する為には、送液の為にポンプ等の外部動力が必要となることが予想された。

つぎに、洗浄工程に注目すると、洗浄液の処理液量の増加に伴って流速が増すことが観察された(図4)。このことは、洗浄によってFFPの充填で生じた濃度分極が解消され、分離器の有効膜面積が増大したことを示唆した。これは、洗浄液の流入口と排出口の位置関係からいって、分離器の上部側から徐々に濃度分極が解消した結果と考えられる。つまり、洗浄工程の終了後における蛋白濃度は、分離器内で一様ではなく、洗浄液の流入口付近で希薄となり、その分、分離器下部でより濃厚であったことが推察される。FPの回収口は分離器の下部に位置するため、このことは効率的な成分回収に寄与する要素と考えられた。

ところで、膜法-FPはFFPよりもやや低い濃度でアルブミン(66kDa)やFIX(57kDa)を含有した(表5)。MWCOよりも小さいこれらの物質が回収された理由は、

表5 膜法-FPとCryoの成分回収率(%)

| FP<br>(各n=10) | 成分名            | FIX<br>(IU) | Alb  | IgG  | IgA  | FXIII<br>(IU) | FV<br>(IU) | FVIII<br>(IU) | fibrinogen | fibronectin | IgM  | vWF-Rco<br>(IU)      | TP   |
|---------------|----------------|-------------|------|------|------|---------------|------------|---------------|------------|-------------|------|----------------------|------|
|               | 分子サイズ<br>(kDa) | 57          | 66   | 150  | 170  | 320           | 330        | 330           | 340        | 420~500     | 900  | 250<br>(single unit) | -    |
| M1            |                | 9.4         | 7.6  | 15.4 | 26.4 | 42.8          | 41.4       | 44.7          | 35.1       | 41.4        | 44.7 | 47.4                 | 12.9 |
| M2            |                | 8.4         | 8.1  | 16.6 | 32.8 | 59.0          | 55.4       | 56.9          | 48.6       | 50.9        | 61.1 | 61.7                 | 15.6 |
| Cryo          |                | 15.5        | 13.9 | 13.1 | 14.3 | 22.4          | 12.3       | 53.7          | 56.7       | 38.8        | 16.1 | 96.2                 | 15.6 |

UFで濃度分極が生じて膜の分離性能が低下すると、MWCOの1/10程度より大きい分子サイズの物質が濾過されにくくなる<sup>20)</sup>ことによる。よって、その他の凝固や線溶に関わる物質についても、膜法-FPには含まれていることが推察された。

Cryoは、含有するFib濃度はFCに劣るものの、一次止血に重要な働きをするvWFのほかFVIII, FXIII, Fibronectinを効率的に補充できることから止血効果は高いと考えられている<sup>11)13)</sup>。我々が調製した膜法-FPも、これらの成分をFFPより高濃度に含んでいた点でCryoに類似していたが、いくつかの成分の含有濃度がCryoと大きく異なった点で特徴的であった(表3, 表4)。

膜法-FPで特徴的であったのは、M2のFXIII活性が $506.5 \pm 59.0$  IU/dlと、クリオ( $194.8 \pm 15.3$  IU/dl)と比べて約2.6倍の高値を示した点である。外傷急性期のFibは、消費と線溶亢進により急速に低下するが<sup>21)~23)</sup>、これに対して、FXIIIはフィブリン血栓を安定化させるとともにHyperfibrinolysisを抑制する効果がある<sup>24)25)</sup>ことが報告されている。この効果によれば、M2のFib補充効率(効果)はFib濃度の見掛け上よりも高くなる可能性が考えられた。vWFマルチマーは、血管損傷部位でコラーゲンと結合し、さらに血小板とも結合することで一次止血に寄与する。M2はvWF-Rco活性がFFPの5.5倍を示しており、この効果も期待されるが、活性値はCryoより低い。大量出血症例に対してM2を投与する場合には、これらが止血機構に与える影響を明らかにするには、介入型の臨床研究が必要と考える。

また、M2のFV活性は $502.1 \pm 59.0$  IU/dlとFFPよりも約5倍の高値を示した。これはCryoがFFPと同レベルのFVしか含まず、さらにFVには濃縮製剤が存在しないことと対照的であった。外傷や産科疾患の合併症としてDICが発症する場合があるが、このDIC症例ではfibやFVIII, FXIIIの枯渇に加えてFVの枯渇が顕著<sup>26)</sup>である。各国(JSTH<sup>27)</sup>, BCSH<sup>28)</sup>, Siset<sup>29)</sup>, ISTH/SSC<sup>30)</sup>)のDIC治療のガイドラインでは、患者が出血を伴う場合にFFPやCryoを投与し凝固因子の補充を行うことを推奨している。また、産科出血症例において、Cryo投与群でDIC治療薬の使用率が低下した<sup>31)</sup>

ことが報告されている。これらの用途で用いる場合、大量出血に伴うDICで枯渇する凝固因子を総合的に補充する能力は、M2でCryoを超える可能性が考えられる。しかしながら、DICは未だ最適な治療法に関するコンセンサスがないこと、今回検討したFPについては凝固・抗凝固因子の測定が網羅されている訳ではないことから、FVおよびFXIIIの補充効率が高いことが治療効果にどう影響するか明らかではない。

一方で、膜法-FPはIgM濃度が濃厚であるから、抗A抗B抗体濃度もCryoの数倍程度であろうことに注意しなければならないと考えられた。

## 結 論

膜型血漿分離機EC-4A10を用いたUFにより、FFPの凝固因子を濃縮し、FPを調製することができた。このFP(M2)は、同一のFFPから調製したCryoと比べ、0.85倍濃度のFibを含有し、4.4倍のFV活性と2.6倍のFXIII活性を示した。本方法は遠心機や送液ポンプが不要な簡便法であるため、多くの医療機関でFib濃縮物の調製が可能になることが期待できる。しかし、構成成分について網羅的な解析がされていないため、さらに研究を続ける必要があると考える。

著者のCOI開示：著者は日本赤十字社の職員である。

謝辞：本論文の英文抄録作成にあたって、英文校閲の依頼をご快諾いただいた関東甲信越ブロック血液センターの津野寛和検査部長に深く御礼申し上げます。

## 文 献

- 1) Bolliger D, Tanaka KA: Fibrinogen-is it a universal haemostatic agent? *Br J Anaesth*, 117 (5): 548—550, 2016.
- 2) Chowdary P, Saayman AG, Paulus U, et al: Efficacy of standard dose and 30ml/kg fresh frozen plasma in correcting laboratory parameters of haemostasis in critically ill patients. *Br J Haematol*, 125 (1): 69—73, 2004.
- 3) Rana R, Fernández-Pérez ER, Khan SA, et al: Transfusion-related acute lung injury and pulmonary edema in critically ill patients: a retrospective study. *Transfusion*, 46 (9): 1478—1483, 2006.

- 4) Murad MH, Stubbs JR, Gandhi MJ, et al: The effect of plasma transfusion on morbidity and mortality: a systematic review and meta-analysis. *Transfusion*, 50 (6): 1370—1383, 2010.
- 5) Collins PW, Solomon C, Sutor K, et al: Theoretical modeling of fibrinogen supplementation with therapeutic plasma, cryoprecipitate, or fibrinogen concentrate. *Br J Anaesth*, 113 (4): 585—595, 2014.
- 6) Yang L, Stanworth S, Hopewell S, et al: Is fresh-frozen plasma clinically effective? An update of a systematic review of randomized controlled trials. *Transfusion*, 52 (8): 1673—1686, 2012.
- 7) Müller MC, Straat M, Meijers JC, et al: Fresh frozen plasma transfusion fails to influence the hemostatic balance in critically ill patients with a coagulopathy. *J Thromb Haemost*, 13 (6): 989—997, 2015.
- 8) Rourke C, Curry N, Khan S, et al: Fibrinogen levels during trauma hemorrhage, response to replacement therapy, and association with patient outcomes. *J Thromb Haemost*, 10 (7): 1342—1351, 2012.
- 9) Matsunaga S, Takai Y, Nakamura E, et al: The clinical efficacy of fibrinogen concentrate in massive obstetric haemorrhage with hypofibrinogenaemia. *Sci Rep*, 7: 46749, 2017.
- 10) Levy JH, Welsby I, Goodnough LT: Fibrinogen as a therapeutic target for bleeding: a review of critical levels and replacement therapy. *Transfusion*, 54 (5): 1389—1405, 2014.
- 11) Levy JH, Szlam F, Tanaka KA, et al: Fibrinogen and hemostasis: a primary hemostatic target for the management of acquired bleeding. *Anesth Analg*, 114: 261—274, 2012.
- 12) 厚生労働省告示第百九十号 (平成三十年三月三十日). 平成三十年度の血液製剤の安定供給に関する計画 [http://www.japal.org/wp-content/uploads/2017/06/2017\\_0331\\_kokuji119.pdf](http://www.japal.org/wp-content/uploads/2017/06/2017_0331_kokuji119.pdf) (2018年9月現在).
- 13) Jeannie L, Callum, Keyvan Karkouti, Yulia Lin: Cryoprecipitate: The Current State of Knowledge. *Transfus Med Rev*, 23 (3): 177—188, 2009.
- 14) Pool JG, Hershgold EJ, Pappenhagen AR: High-potency antihaemophilic factor concentrate prepared from cryoglobulin precipitate. *Nature*, 203: 312, 1964.
- 15) 日本輸血細胞治療学会ホームページ. クリオプレシピテート作製プロトコール Ver1.4. <http://yuketsu.jstmct.or.jp/wp-content/uploads/2016/11/be64675762b20d703527c3d9a19ccac6.pdf> (2018年9月現在).
- 16) 日本輸血細胞治療学会ホームページ. 平成28年度血液製剤使用実態基本調査. <http://yuketsu.jstmct.or.jp/wp-content/uploads/2017/10/dd2cea55ee5e4a1fd021b7f914bda072.pdf> (2018年9月現在).
- 17) 小野寺秀一, 金子佑次, 瀧崎晶弘, 他: 市販の膜型血漿分離器 EC-4A10®により調製した洗浄血小板の品質. *日本輸血細胞治療学会誌*, 62 (5): 592—600, 2016.
- 18) Atushi O, Kurashima N, Nakamura A, et al: Solute removal capacity of high cut-off membrane plasma separators. *Ther Apher Dial*, 17 (5): 484—489, 2013.
- 19) Bunuan H, Roberts GT, Russett J: Concentration of blood coagulation factors by ultrafiltration in hollow fiber artificial kidney. *Uremia Invest*, 8 (2): 127—133, 1984—1985.
- 20) Robert van Reis, Shishir Gadani, Leah N. Frautschy, et al: High Performance Tangential Flow Filtration. *Biotechnol Bioeng*, 56 (1): 71—82, 1997.
- 21) Oshiro A, Yanagida Y, Gando S, et al: Hemostasis during the early stages of trauma: comparison with disseminated intravascular coagulation. *Crit Care*, 18 (2): R61, 2014.
- 22) Hayakawa M, Sawamura A, Gando S, et al: Disseminated intravascular coagulation at an early phase of trauma is associated with consumption coagulopathy and excessive fibrinolysis both by plasmin and neutrophil elastase. *Surgery*, 149 (2): 221—230, 2011.
- 23) Theusinger OM, Wanner GA, Emmert MY, et al: Hyperfibrinolysis diagnosed by rotational thromboelastometry (ROTEM) is associated with higher mortality in patients with severe trauma. *Anesth Analg*, 113 (5): 1003—1012, 2011.
- 24) Dirkmann D, Görlinger K, Gisbertz C, et al: Factor XIII and tranexamic acid but not recombinant factor VIIa attenuate tissue plasminogen activator-induced hyperfibrinolysis in human whole blood. *Anesth Analg*, 114 (6): 1182—1188, 2012.
- 25) Cushing MM, Fitzgerald MM, Harris RM, et al: Influence of cryoprecipitate, Factor XIII, and fibrinogen concentrate on hyperfibrinolysis. *Transfusion*, 57 (10): 2502—2510, 2017.
- 26) O'Shaughnessy DF, Atterbury C, Bolton Maggs P, et al: Guidelines for the use of fresh-frozen plasma, cryoprecipitate and cryosupernatant. *Br J Haematol*, 126 (1): 11—28, 2004.
- 27) Wada H, Asakura H, Okamoto K, et al: Expert consensus for the treatment of disseminated intravascular coagulation in Japan. *Thromb Res*, 125 (1): 6—11, 2010.



- 28) Levi M, Toh CH, Thachil J, et al: Guidelines for the diagnosis and management of disseminated intravascular coagulation. British Committee for Standards in Haematology. *Br J Haematol*, 145 (1): 24–33, 2009.
- 29) Di Nisio M, Baudo F, Cosmi B, et al: Diagnosis and treatment of disseminated intravascular coagulation: guidelines of the Italian Society for Haemostasis and Thrombosis (SISET). *Thromb Res*, 129 (5): 177–184, 2012.
- 30) Wada H, Thachil J, Di Nisio M, et al: The Scientific Standardization Committee on DIC of the International Society on Thrombosis Haemostasis: Guidance for diagnosis and treatment of DIC from harmonization of the recommendations from three guidelines. *J Thromb Haemost*, 11: 761–767, 2013.
- 31) 西村滋子, 高田裕子, 大竹千晶, 他: 産科出血に対するクリオプレシピテートの臨床効果. *日本輸血細胞治療学会誌*, 63 (1): 23–29, 2017.

## A SIMPLE AND RAPID METHOD FOR CONCENTRATING FIBRINOGEN AND OTHER COAGULATION FACTORS IN FRESH FROZEN PLASMA USING A MEMBRANE-TYPE PLASMA SEPARATOR

Hidekazu Onodera<sup>1)</sup>, Yuji Kaneko<sup>1)</sup>, Toshiyasu Koike<sup>1)</sup>, Kanae Fukuda<sup>1)</sup>, Takaaki Abe<sup>1)</sup>, Junichi Hirayama<sup>1)</sup>, Masayuki Shiba<sup>1)</sup>, Shigeru Igarashi<sup>1)</sup>, Tadashi Nagai<sup>1)2)</sup>, Masahiro Satake<sup>1)</sup> and Kenji Tadokoro<sup>3)</sup>

<sup>1)</sup>Japanese Red Cross Blood Service Headquarters Central Blood Institute

<sup>2)</sup>Japanese Red Cross Kanto-Koshinetsu Block Blood Center

<sup>3)</sup>Japanese Red Cross Blood Service Headquarters

### Abstract:

Cryoprecipitate contains a higher concentration of fibrinogen than fresh frozen plasma (FFP) and is known to markedly improve hemostatic disorders. While cryoprecipitate can be prepared in the hospital for internal use, this is limited to sites equipped with a large cooling centrifuge. In this study, we investigated on the feasibility of obtaining concentrated fibrinogen from FFP using a membrane-type plasma separator (separator) instead of a centrifuge. Two experiments were conducted using different volumes of FFP, and the products were named M1 and M2. The outer compartment of the hollow fiber of the separator was filled with FFP (458 ml for M1, 878 ml for M2), and subsequently washed with 1,200 ml of saline. The remaining liquid in the outer compartment was recovered (M1: 51 ml, M2: 99 ml). The fibrinogen concentration of M1 was 695 mg/dl and that of M2 was 953 mg/dl. The average preparation time was 23 minutes for M1 and 71 minutes for M2. M2 had about 2.6-times higher FXIII activity and about 4.4-times higher FV activity than cryoprecipitate prepared from the same plasma using the conventional method. The new method described here does not require a centrifuge or a liquid transfer pump, and can therefore be performed at a large number of medical institutions.

### Keywords:

Massive bleeding, Cryoprecipitate, Fibrinogen, Membrane-type plasma separator, Concentrating