

大型冷却遠心機を必要としないクリオプレシピテート作製術

—サイホン法—

西村 滋子¹⁾ 田中 麻衣²⁾ 藤田 浩¹⁾

従来の遠心法によるクリオ作製には大型冷却遠心機が必要であり、施設の制約がある。そこで、血漿から乏クリオ血漿を重力で除去するサイホン法の改良版として、「簡易サイホン法(簡易法)」と「2回凍結サイホン法(2回凍結法)」を検討した。簡易法は、購入した新鮮凍結血漿 (FFP) を血液専用保冷庫内でサイホン (オーバーナイト) する方法で、Fbg 回収率約 49.2%、Fbg 精製率約 56.4% と、遠心法とほぼ同等のクリオが作製できた。2回凍結法は、FFP を低温融解し再凍結後にサイホンする方法で、Fbg 回収率約 72.9%、Fbg 精製率約 74.9%、FFP480 から Fbg 1g 以上回収できた。大型遠心機がなくても、サイホン法で十分なクリオを作製可能であり、大量出血による後天性低フィブリノゲン血症に対しても有効な止血戦略が立てられ、血液製剤の有効活用、適正使用推進に役立つことが期待される。

キーワード：クリオプレシピテート作製方法、サイホン法、フィブリノゲン回収率、精製率

はじめに

現在日本のクリオプレシピテート (以下クリオ) 作製方法¹⁾は、約 4℃ で新鮮凍結血漿 (以下 FFP) を 18~24 時間かけて緩徐融解して寒冷沈降物を生成し、冷却遠心機で分離回収するというものである (以下遠心法)。課題として、大型の冷却遠心機のある施設に限定される点、フィブリノゲン回収率 (以下 Fbg 回収率) の向上などがある。

乏クリオ血漿を重力で除去するサイホン法は、1980 年頃に血液凝固第 8 因子 (FVIII) 濃縮方法として考案され、実際に血友病治療に使用されていた。我々はこの方法を改良し、遠心法とほぼ同等のクリオが作製できることを報告した²⁾。今回、実臨床に即し、購入した FFP をそのままサイホンする「簡易サイホン法 (以下簡易法)」と、低温融解再凍結してからサイホンする「2回凍結サイホン法 (以下 2回凍結法)」について報告する。

方 法

手順は図 1A に示した。FFP480 は日本赤十字社より提供を受けた (31J00016)。凝固検査、各凝固因子の測定は BML 社に委託した。

回収率、精製率の計算式は表 1 に示した。元製剤の Fbg はセグメントの濃度から算出し、クリオの Fbg

濃度は実測した。

本研究は、東京都立病院法人機構の一般研究として登録され、院内倫理委員会の承認を受けた。

結果 (表 1)

簡易法では、Fbg 回収率は平均 49.2%、Fbg 精製率は平均 56.4% であった。FVIII、血液凝固第 XIII 因子 (FXIII)、フォンビルブランド因子 (VWF) も濃縮され、既報の遠心法のクリオと比較してもほぼ同等と思われた^{2)~5)}。2回凍結法では、Fbg 回収率は平均 72.9%、Fbg 精製率は平均 74.9% となり、簡易法よりさらなる濃縮が確認された。

考 察

2回凍結の効果

低温融解してクリオが析出した製剤を再凍結させると、凍結濃縮により乏クリオ血漿からさらにクリオが析出すると考えられる⁶⁾。凍結濃縮は、冷却を緩徐に行う方が効果的であるため、再凍結はディープフリーザー (-80℃) より FFP 専用冷凍庫 (-30℃ 以下) の方が良い (図 1B)。

凍結融解の操作を繰り返し行うと、クラウス法による Fbg 濃度測定に影響を与える可溶性フィブリンモノマー複合体 (SFMC) 等が生じることが指摘されている⁷⁾。

1) 地方独立行政法人東京都立病院機構東京都立墨東病院輸血科

2) 地方独立行政法人東京都立病院機構東京都立墨東病院検査科

連絡責任者：藤田 浩, E-mail : hiroshi_fujita@tmhp.jp

〔受付日：2025 年 9 月 16 日, 受理日：2025 年 10 月 28 日〕

①製剤の準備

<簡易法> 日赤から購入したFFP480をそのまま使用

<2回凍結法>

FFP480を箱のまま

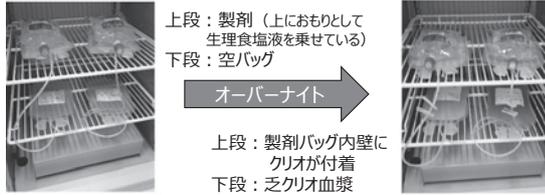
→4~6℃ 血液専用保冷庫 (RBC用) で低温融解 (18~24時間)

→-30℃以下 血液専用冷凍庫 (FFP用) で再凍結

②冷凍状態の血漿製剤に空バッグを無菌接合機で接続する



③血液専用保冷庫で低温融解 (2本同時にクリオ作製を試みている写真)



④ルートをクリックなどで遮断し血液専用保冷庫から取り出す。

⑤元バッグへ約40~50mLの乏クリオ血漿を移動しクリオを懸濁する

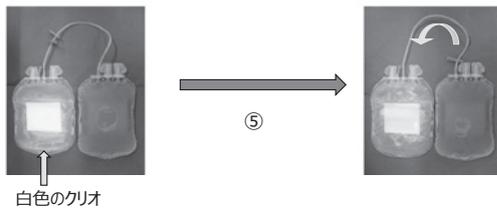


図1A サイホン法の手順

自験例の SFMC は基準値以下のものも含め製剤差があり、凍結回数による SFMC 増加は不明であった。この現象の臨床的意義を検討することは困難であるが、1回法と2回法のクリオの投与後 Fbg 血中濃度上昇の臨床データでは、2回法の方が有意に上昇していたとの報告もあり⁸⁾、実臨床には大きな影響はないと推察される。

本研究で、2回凍結法では1バッグ平均1g以上のFbgを回収できた。現在2g程度のFbg補充のため、当院では遠心法のクリオを1回3バッグ投与し、実臨床でも効果を確認している⁹⁾¹⁰⁾。2回凍結法のクリオ2バッグ投与で十分であれば、血液製剤の有効利用、患者のドナー暴露数減少、コスト削減につながると考える。

Fbg回収率, Fbg精製率の計算

同一製剤で回収率と精製率に差が生じた。2回凍結法の2製剤では、セグメントのFbg濃度が著しく低下しており、回収率が計算できなかった。セグメントは外部温度の影響を大きく受け、まれに不溶物が認められることもあり (図1C)、元製剤のFbg量を反映しない場合がある。セグメントのFbg値を使用しない精製率は正確であるが、臨床使用目的で作製したクリオのFbgを実測するのは推奨しにくい。計算方法の特性を考慮して自施設の作製精度を判断するのが望ましい。

実際のクリオの効果は、止血の状態や投与後の血中Fbg値を測定することで判断できる。

表1 簡易サイホン法, 2回凍結サイホン法による凝固因子

	基準値 (血漿) (BML)	簡易サイホン法 (N=4)	2回凍結サイホン法 (N=4)	遠心法 (N=6)
vol (ml)	NA	50.3±5.6	50.5±1.3	36.7±9.8
Fibrinogen (mg/ml)	170 ~ 410	1,661.8±378.7	2,104.8±584.4	1,992.0±1,261.7
Fibrinogen (mg in bag)	NA	845.3±263.4	1059.1±271.6	652.4±321.6
Fibrinogen 回収率 (%)	NA	49.2±5.8	72.9 (N=2)	48.0±6.1 (N=12)
Fibrinogen 精製率 (%)	NA	56.4±5.3	74.9±2.4 (N=4)	47.0±7.0 (N=12)
PT (%)	80 ~ 120	70.4±18.4	84.9±15.1	72.1±8.4
APTT (sec)	26 ~ 36	41.7±12.2	39.0±7.2	32.3±5.5
Factor II (%)	66 ~ 118	82.3±20.8	101.4±25.0	115.0±14.4
Factor V (%)	73 ~ 122	62.6±16.0	49.3±20.4	73.7±11.0
Factor VII (%)	54 ~ 162	97.8±28.3	253.2±136.6	114.1±24.7
Factor VIII (%)	78 ~ 165	509.3±79.2	556.2±125.6	545.0±160.2
Factor IX (%)	67 ~ 152	80.1±19.8	121.9±39.4	91.9±17.6
Factor X (%)	58 ~ 200	81.6±25.6	134.0±35.3	94.4±9.0
Factor XI (%)	75 ~ 137	72.0±24.5	133.2±51.7	111.3±17.3
Factor XIII (%)	70 ~ 140	241.8±19.7	424.3±142.3	237.7±102.6
VWF antigen (%)	42 ~ 176.3	1,089.6±124.5	1,052.8±149.0	1,117.0±386.6
FM complex (µg/ml)	≤6	27.8±42.3	19.3±5.6	NA

数値: 平均値±標準偏差, NA: 未測定

$$\text{回収率} = \frac{[\text{元製剤のフィブリノゲン (mg)} - \text{乏クリオ血漿中フィブリノゲン (mg)}]}{\text{元製剤のフィブリノゲン (mg)}} \times 100 (\%)$$

$$\text{精製率} = \frac{\text{クリオのフィブリノゲン (mg)}}{\text{クリオのフィブリノゲン (mg)} + \text{乏クリオ血漿中フィブリノゲン (mg)}} \times 100 (\%)$$

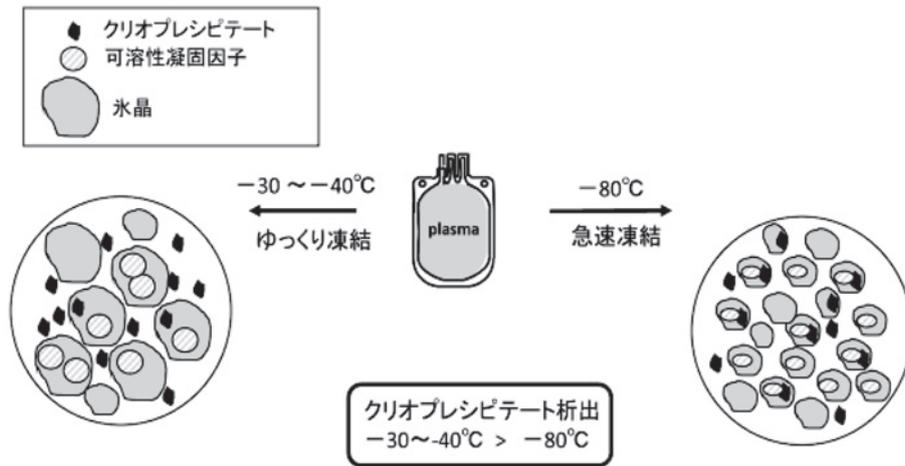


図1B 血漿凍結温度とクリオプレシピテート析出の関係
文献6より参考に、著者が図を作製した。



図1C セグメント内の凝集物

セグメントを融解後に凝集物が確認でき、血漿をスピッツへ移動したところを撮影した。この血漿のFbg濃度は135mg/dlであった。その結果、Fbg回収率44.2%、Fbg精製率73.2%となる。

まとめ

乏クリオ血漿を重力で除去する簡易法で遠心法と同等のクリオを作製でき、もう2日かければ20%程度のFbg回収率が高いクリオが作製できることも紹介した。大型冷却遠心機のない施設でもサイホン法でクリオが作製でき、大量出血による後天性低フィブリノゲン血症に対し有効な止血戦略が立てられること、血液製剤の適正使用が推進することを願う。

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) 大石晃嗣, 松本剛史, 田中由美, 他：クリオプレシピテート院内作製プロトコル. 日本輸血細胞治療学会誌, 62 (6) : 664—672, 2016.

- 2) Nishimura S., Teratani M., Igarashi T., et al: A novel modified thaw-siphon method for extracting cryoprecipitate: The Bokutoh-siphon method. *Transfusion*, 61 (4) 1035—1040, 2021.
- 3) 小野寺秀一, 金子佑次, 小池靖敏, 他：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. 日本輸血細胞治療学会誌, 65 (3) : 568—576, 2019.
- 4) 宮崎研一, 村山和子, 富田 守, 他：品質向上を目的とした、クリオプレシピテート製剤の調製条件の検討. 日本輸血細胞治療学会誌, 64 (3) : 516—524, 2018.
- 5) 細川真梨, 岩木啓太, 伊藤智啓, 他：「クリオプレシピテート院内作製プロトコル」に準じて調製した同種クリオプレシピテートの品質検討結果. 日本輸血細胞治療学会誌, 65 (1) : 93—97, 2019.
- 6) 秋野光明, 滝川紀美子, 千葉清司, 他：ダブル・クリオプレシピテート法を用いたヒト・フィブリンクローの調製. *低温医学*, 19 (1) : 13—17, 1993.
- 7) Tanaka Y., Matsumoto T., Kadoya K., et al: Overestimation of fibrinogen concentration in cryoprecipitate by repeated freeze-thawing with long thawing period as used in the Claus method. *Transfusion*, 63 (8) 1435—1440, 2023.
- 8) 宮脇岳志, 松浦秀哲, 石原裕也, 他：クリオプレシピテートが投与された心臓血管外科手術施行患者のクリオプレシピテート作製法の違いにおけるフィブリノゲン値の変化. 日本輸血細胞治療学会誌, 70 (2) : 327, 2024.
- 9) 公益法人 日本麻酔科学会, 一般社団法人 日本輸血・細胞治療学会：危機的出血への対応ガイドライン 2025年改訂.
kikitekiGL2.pdf (2025年9月16日現在).

- 10) Sugiyama K, Fujita H, Nishimura S: Effects of in-house cryoprecipitate on transfusion usage and mortality in patients with multiple trauma with severe traumatic brain injury: a retrospective cohort study. *Blood Transfusion*, 18 (1): 6–12, 2020.

CRYOPRECIPITATE PREPARATION WITHOUT USING A LARGE CAPACITY REFRIGERATED CENTRIFUGE FOR BLOOD BAGS: THE THAW-SIPHON METHOD

*Shigeko Nishimura*¹⁾, *Mai Tanaka*²⁾ and *Hiroshi Fujita*¹⁾

¹⁾Department of Transfusion Medicine, Tokyo Metropolitan Bokutoh Hospital

²⁾Clinial Laboratory, Tokyo Metropolitan Bokutoh Hospital

Abstract:

Traditional cryoprecipitate preparation requires large centrifuges, limiting the number of available facilities. We improved the siphon method, a gravity-based alternative, with two approaches: a simplified siphon method (overnight siphoning of FFP in a blood refrigerator) and a double-freezing siphon method (thawing, and refreezing FFP before siphoning). The simplified method achieved about 49.2% Fbg recovery and 56.4% purification, comparable to the traditional method using centrifugation. The double-freezing method yielded approximately 72.9% recovery and 74.9% purification, providing over 1g Fbg from 480ml FFP. These methods enable effective cryoprecipitate production without using large centrifuges, aiding bleeding management and promoting proper blood product use.

Keywords:

Cryoprecipitate preparation, thaw-siphon method, recovery rate of fibrinogen, purification rate of fibrinogen