

原 著

[原著]

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—

日本赤十字社北海道ブロック血液センター

石原徹也, 秋野光明, 内藤 祐, 林 宜亨, 本間稚広, 池田久實, 高本 滋

Evaluation of a new rapid freezer —Comparison to the old type in terms of freezing time and activity of blood coagulation factors in plasma

Japanese Red Cross Hokkaido Block Blood Center

Tetsuya Ishihara, Mitsuki Akino, Yu Naito, Yoshiaki Hayashi, Chihiro Homma,
Hisami Ikeda and Shigeru Takamoto

抄 録

当施設で導入した急速凍結装置(新装置)の凍結性能や凍結前後の血漿中に含まれる血液凝固因子活性を測定し, 従来の装置(旧装置)と比較した。

FFPのバッグ内温度が -30°C になるまでの時間を調べたところ, 旧装置は185~228分であったが, 新装置では110~140分と短縮され, かつ庫内温度のばらつきが改善された。また, 新装置の最大氷結晶生成帯通過時間は35分であり, 旧装置よりも短時間であった。プロトロンビン時間および血液凝固第Ⅷ因子活性は新旧の装置間で有意な差をみとめなかった。

新装置は旧装置に比べて, より短時間に血漿を凍結させることが可能であり, FFPの品質も従来と同様に良好に維持されていることが確認された。

Key words: rapid freezing, fresh frozen plasma, freezing rate,
factor Ⅷ activity

【はじめに】

献血由来血漿は, 新鮮凍結血漿(以下, FFP)の製造や, 第Ⅷ因子などの血漿分画製剤の原料に用いるため, 血液凝固因子の活性を高く保つ必要がある。血液凝固第Ⅷ因子などの凝固因子活性は, 遠心分離や包装, 凍結などの製造工程を経ることで, 採血直後よりも低下する¹⁾。血漿を凍結させる工程については, 凍結速度を上げ, 液相から固相へと移る温度帯(最大氷結晶生成帯)を速やかに

通過させることで, 凝固因子活性の低下を抑制できるとされている^{2), 3)}。

凍結製剤の保管に広く使われているフリーザーは庫内が自然対流式であり急速な凍結には不向きとされる^{4), 5)}。そのため全国の血液センターの製造所では, 血漿の凍結作業を専用の急速凍結装置を用いて行っている。しかし, 装置の選定基準がなく, 機種や仕様が統一されていない。急速凍結装置の凍結性能についても全国的に比較検討され

た報告はない。

当センターでは2013年に、血漿凍結に係る時間短縮や凍結血漿の品質の安定化を目的とし、新たな急速凍結装置(以下、新装置)を設計して導入した。そこで今回、従来使用していた装置(以下、旧装置)と新装置について、凍結中の温度推移や凍結に要する時間を測定して凍結性能を比較した。また、各装置で凍結したFFPの品質評価として、血液凝固因子活性を測定した。

【材料と方法】

1. 急速凍結装置

新旧の各装置の仕様を表1にまとめた。新装置の冷凍機の出力は、旧装置の約2倍に設計した。凍結装置1台で凍結可能なバッグ数を減らした分、装置の台数を従来の3台から5台へと増やし、凍結可能な総バッグ数を増加させた。冷却方式は新旧装置ともに庫内の空気を循環させる空冷式であるが、新装置では、庫内の隅々まで均等に冷風があたると、風向が自動で切り替わる仕組みと

した。新旧の各装置ともに、血漿バッグを専用のトレイに並べた後、そのトレイを台車に積載して凍結させる(図1)。

2. 凍結性能の比較

温度測定用の模擬バッグとして、分離バッグ(KBW-650AC, 川澄化学工業)にACD-A液(カーミパックACD-A液, 川澄化学工業)を480mL注入したものを12バッグ作製した。模擬バッグには温度計のセンサー(温度計:TR-81, 温度センサー:TR-8120, とともにT&D)を挿入し、FFP-LR-480の包装箱に入れた。

温度測定用の模擬バッグ(B-01~B-12)を4バッグずつ並べた凍結トレイを、各装置の台車の上段、中段、下段に設置した(図2)。凍結時の熱負荷量を最大にするため、温度測定以外の棚にも水入りバッグ(480mL, 箱包装)を設置し、台車に積載可能な最大数(新旧装置ともに56バッグ)を収納した状態で各装置に入庫した。模擬バッグが室温(約25℃)から-30℃になるまでの時間を凍

表1 急速凍結装置の仕様

			旧装置	新装置
メーカー			サンヨー	天満冷凍機
型式			MCU-1012K	BBF-200TA-HF
冷凍機出力	kW		5.5	10.6
最低到達温度	℃		-40	-45
内寸(W-D-H)	mm		600-1100-1800	700-1000-1300
内容積	m ³		1.2	0.9
台数	台		3	5
凍結可能数	FFPLR-120	1台/総数	180 / 540	140 / 700
	FFPLR-240	1台/総数	180 / 540	140 / 700
	FFPLR-480	1台/総数	72 / 216	56 / 280





図1 新装置を用いた血漿の凍結風景

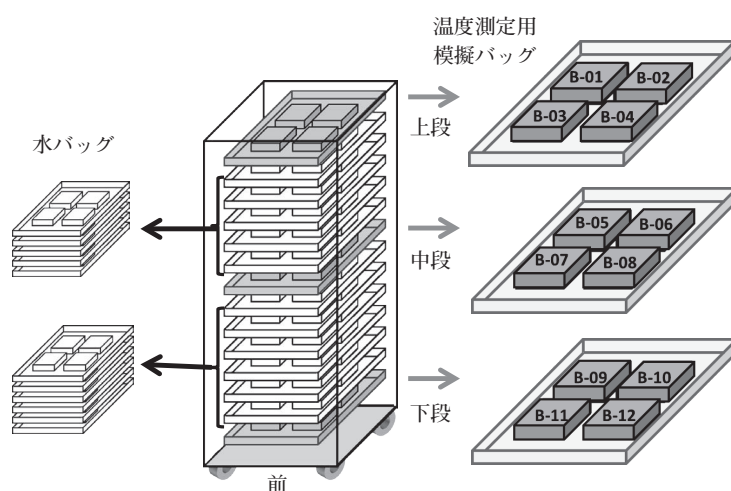


図2 血漿の凍結台車と温度測定ポイント

結時間として計測した。また、 $-0.5 \sim -5.0^{\circ}\text{C}$ (最大氷結晶生成帯) の通過時間を求めた。なお、温度測定は新装置で5回、旧装置で3回行った。

3. 血液凝固因子の比較

同型のFFP-LR-480を2バッグ、融解後にプールし、等分割したものを試験血液とした ($n=6$)。試験血液の凍結時間は、両装置ともに3時間とし、凍結前(プール後)および凍結後に凝固因子等の測定用検体を採取した。なお、凍結時には、前述した凍結時間の測定と同様に凍結装置に最大限の負荷をかけた状態で試験を実施した。

凝固因子等の品質試験項目は、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)、フィブリノーゲン (Fbg)、血液凝固第V (F V)、第VII (F VII)、第VIII (F VIII) 因子活性およびフォンビレブランド因子 (vWF) とし、測定には全自動血液凝固測定装置 (CS-2000i, シスメックス) を用いた。

4. 統計処理

装置内の各段の凍結時間の比較はone-way ANOVA、装置間の比較にはunpaired t-testを用いた。血液凝固因子については、各装置での凍結

前後の比較および新旧装置間での凍結後の比較を paired t-test を用いた。いずれも危険率 (p) は 1 % 未満を有意とした。

【結 果】

1. 凍結性能

図3に新旧各装置における血漿凍結時の温度推移を示す。バッグの中心温度が -30°C 以下になるまでの凍結時間の平均は、新装置では125分、旧装置では205分であり、80分短縮された。また、凍結時間のばらつき(最速と最遅の差)は、旧装置では47分であるのに対し新装置では30分に短縮された。

表2に測定ポイント別の凍結時間を示す。庫内のすべての測定ポイントについて、旧装置に比べて新装置の凍結時間が有意に早い結果が得られた。凍結時間が最も早かったポイントは、新装置では上段左奥 (B-01) で 110 ± 9 分、旧装置では上段右手前 (B-04) で 181 ± 11 分であった。一方、最も凍結に時間を要したポイントは、新装置では中段左前 (B-07) で 140 ± 2 分、旧装置では下段右奥 (B-10) で 228 ± 0 分であった。

最大氷結晶生成帯の通過時間を表3に示す。旧

装置では平均77分であった最大氷結晶生成帯の通過時間が新装置では平均35分に短縮され、両者には有意差がみとめられた。

2. 血液凝固因子

血液凝固因子の測定結果を図4に示す。不安定な因子とされるFⅧについて、凍結前を100%とした回収率は、新装置では $95.3 \pm 2.3\%$ 、旧装置では $93.7 \pm 3.7\%$ であり、新旧の装置間で差をみとめなかった。

FⅤは凍結後に有意な低下がみられたが、新旧の装置間での差はみられなかった。外因系凝固に関与するFⅦやPT、内因系に関与するvWFやAPTT、Fbgは凍結前後および新旧装置間において有意差をみとめなかった。

【考 察】

FFPや血液凝固因子用原料血漿の製造工程では、血液凝固因子の活性低下を抑えることが重要となる。凝固因子活性の低下を抑えるために、ヨーロッパのガイドラインでは「血漿の中心温度が1時間以内に -30°C になるよう凍結する」ことが推奨されている⁶⁾。一方日本では、生物学的製剤

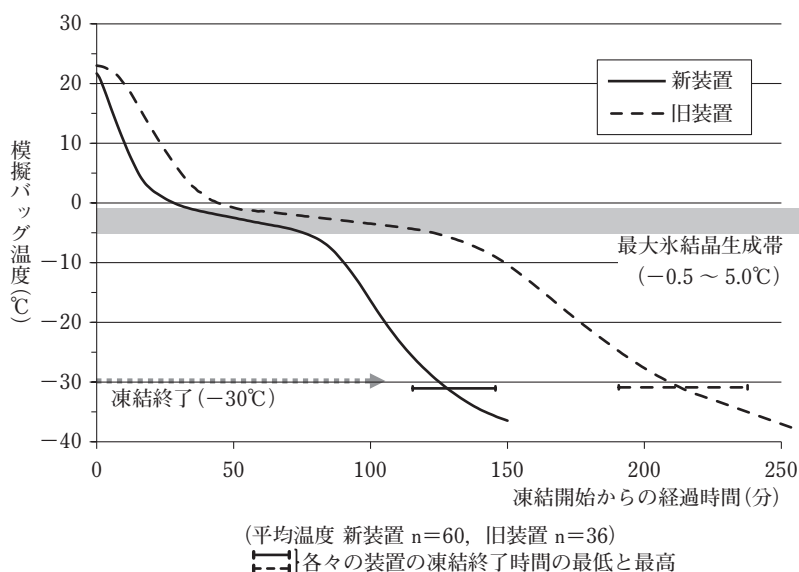


図3 模擬バッグ(480mL)の凍結時の温度推移

基準⁷⁾において、採血から分離までの時間や凍結開始時の温度についての規定はあるものの、凍結時間や使用する機器の規定はない。

2013年に当センターで導入した新装置は、冷凍機の出力を増加させ、また風向を工夫したことなどにより、旧装置に比べて凍結性能の向上が期待された。われわれは新装置で成分採血由来の血漿を凍結した時の凍結時間を計測し、さらに血液凝固因子を測定してFFPの品質を評価した。

新装置での凍結時間は、すべての測定ポイントで旧装置よりも早く、またポイント別に比較すると最大で約100分短縮された(表2)。冷凍機出力の向上、また台車への積載可能数を製造数に見合うように設計したことで、凍結時間を短縮させることが可能となったと考える。また、旧装置で

は凍結する場所によって凍結時間のばらつきが大きかったが、その点についても新装置では改善された(表2)。これは、装置内の空気の対流方法の違いによると考えられる。表1に示したように、旧装置は冷風が上方から下方へと一方向にしか流れないため装置内で温度ムラが発生し、凍結時間にばらつきが生じる原因となった。この問題を解決するため、新装置では台車設置部の両側に吹出・吸込口を設け、さらに吹出と吸込の風向きが自動で切り替わる仕様とした。このような設計により、庫内の冷風の流れを均一にすることが可能となった。

凍結速度を向上させる方法として、アルコール等の冷媒に浸漬して凍結する液体凍結法が古くから用いられている。最近では、液体凍結法を用い

表2 新旧装置における凍結時間(−30℃に到達する時間)

単位：分

旧装置		新装置	
B-01	202 ± 6	110 ± 9 †	117 ± 14 †
B-02	187 ± 28	111 ± 4 †	
B-03	185 ± 6	132 ± 20 †	
B-04	181 ± 11	116 ± 5 †	
B-05	209 ± 20	121 ± 14 †	128 ± 11 †
B-06	199 ± 25	123 ± 9 †	
B-07	201 ± 24	140 ± 2 †	
B-08	196 ± 16	128 ± 8 †	
B-09	222 ± 10	120 ± 12 †	122 ± 12 †
B-10	228 ± 0	124 ± 9 †	
B-11	215 ± 7	121 ± 12 †	
B-12	216 ± 9	124 ± 16 †	

mean ± SD (n = 旧装置 : 3, 新装置 : 5)

§ : p < 0.01 (同一装置内での比較 one-way ANOVA)

† : p < 0.01 (新装置 vs 旧装置 unpaired t-test)

N.S. : Not Significant

表3 新旧装置における最大氷結晶生成帯通過時間

単位：分

	旧装置	新装置
上段	73 ± 19	33 ± 11 †
中段	78 ± 27	40 ± 15 †
下段	79 ± 25	33 ± 15 †

mean ± SD (n = 旧装置 : 3, 新装置 : 5)

† : p < 0.01 (新装置 vs 旧装置 unpaired t-test)

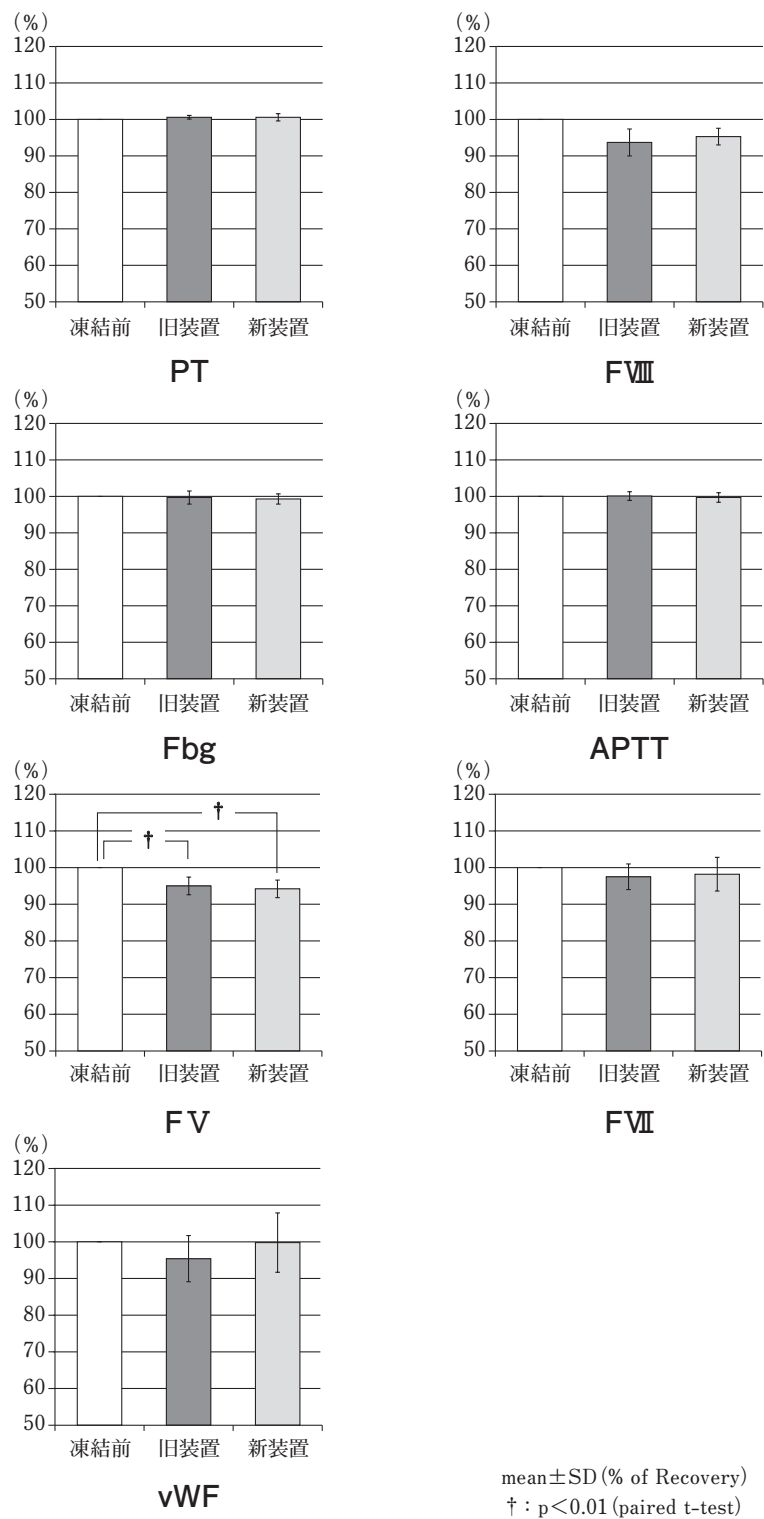


図4 新旧装置で凍結した血漿の凝固因子等の比較

て、血漿の凍結速度が向上した報告もある⁸⁾。しかし、液体凍結法は、凍結対象物を冷媒に浸漬するため、現行のFFPの包装形態(箱の劣化)や血液バッグへの冷媒接触による汚染など解決すべき課題がある。一方、新装置は、全国の血液センターで広く用いられている空冷方式による凍結法を採用しているため、液状冷媒を用いる方法のような問題は生じない。

新旧の各装置で凍結されたFFPについて、血液凝固因子活性を比較したところ、装置間で有意な差はみられなかった(図4)。新装置で凍結したFFPのPTは日本の基準(20秒以下)⁷⁾を満たしていた。またFⅧはヨーロッパの基準(0.7IU/mL以上)⁶⁾に適合した。このことから、今回の凍結装置の変更はFFPの品質には影響を与えず、従

来品と遜色なく良好であることが確認された。

凍結時間や庫内の温度分布については、旧装置に対して新装置が有意に優れていることを確認したが、それによって最終製品の品質が高められたわけではない。しかし、凍結時間の短縮による作業の効率化や将来的な無人搬送への対応などを考慮すると、導入コストが旧装置とほぼ同等な新装置の導入意義は大きかったと考える。当施設と凍結数が異なる他の製造所では、新装置をそのまま使用できるとはかぎらない。各製造所の製造規模や運用を考慮して凍結装置を設計することが大切である。また、均一で高品質なFFPや原料血漿を製造するにあたり、今後は凍結時間や凍結速度などに関する全国的に統一された規定を設けることが重要と考える。

文 献

- 1) Hughes C, *et al*: Effect of delayed blood processing on the yield of factor VIII in cryoprecipitate and factor VIII concentrate, *Transfusion*, 28: 566-570, 1988
- 2) Akerblom O, *et al*: Freezing technique and Quality of Fresh Frozen Plasma, *Transfusion Medicine and Hemotherapy*, 19(6): 283-287, 1992
- 3) Swärd-Nilsson AM, *et al*: Factors influencing factor VIII activity in frozen plasma, *Vox Sanguinis*, 90: 33-39, 2006
- 4) 三浦正光, 急速凍結装置とフリーザーの凍結性能の比較検討, 血液事業, 33(2): 242, 2010
- 5) 増川海平, 最近開発された急速凍結装置で凍結したFFPの第Ⅷ因子活性について, 血液事業, 11(1): 225-230, 1988
- 6) Guide to the Preparation, Use and Quality Assurance of Blood Components, 16th edition, Strasbourg, Council of Europe Publishing, 2010
- 7) 厚生労働省: 「生物学的製剤基準」平成25年6月18日 厚生労働省告示 第205号 改訂
- 8) 榎本圭介, 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(1): 137-139, 2014