

[原著]

血漿製剤を凍結するための急速凍結装置に必要な性能

日本赤十字社近畿ブロック血液センター¹⁾, 日本赤十字社血液事業本部中央血液研究所²⁾
滝口 淳¹⁾, 森 純平¹⁾, 渕崎晶弘²⁾, 寺田あかね¹⁾, 大橋祥朗¹⁾, 小河英人¹⁾, 平山文也¹⁾

Cooling capacity required for rapid freezing apparatus for freezing the plasma products

*Japanese Red Cross Kinki Block Blood Center¹⁾,
Central Blood Institute, Blood Service Headquarters, Japanese Red Cross Society²⁾
Atsushi Takiguchi¹⁾, Jyunpei Mori¹⁾, Akihiro Fuchizaki²⁾, Akane Terada¹⁾,
Yoshiro Ohashi¹⁾, Hideto Ogawa¹⁾ and Fumiya Hirayama¹⁾*

抄 錄

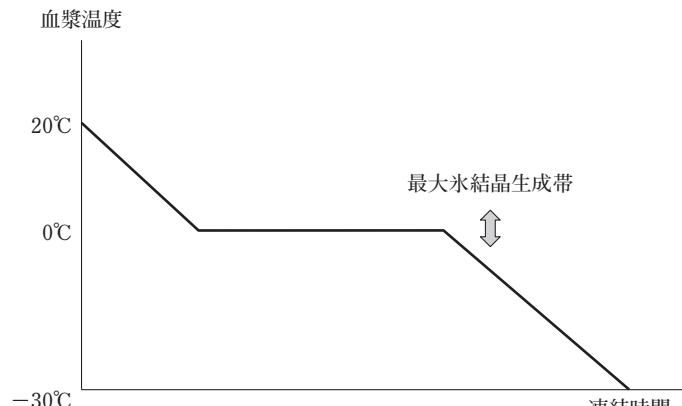
FFPの凍結速度は、血液凝固第VIII因子活性に影響を与えることがすでに報告されており¹⁾、この凝固因子活性は、最大氷結晶生成帯で低下することが知られている。そこで、最大氷結晶生成帯を通過する時間がFFPの品質に与える影響を検証し、製造部門で使用する急速凍結装置に必要な性能を検討した。血漿を、-1°Cに設定した氷水に留置して、バッグ内温度が最大氷結晶生成帯に達してから1時間ごとに7時間まで、検体を採取した。血液凝固第VIII因子活性は3時間以降に有意差を認めた。血液凝固第V因子活性は2時間および4時間以降で有意差を認めたが7時間まで実測値で90%以上の活性を維持していた。PT, APTT, 血液凝固第II因子活性およびトロンビン生成能は、有意差を認めなかった。製造部門で使用する急速凍結装置は、血液凝固第VIII因子活性で最初に有意差が確認される3時間までに最大氷結晶生成帯を通過させる能力を有していることが望ましいと考える。

Key words: freezing speed, fresh frozen plasma, plasma product,
thrombin generation capacity

【目 的】

日本赤十字社では、全血採血由来新鮮凍結血漿(以下FFPと略す)の製造について、原料血液の採血開始時刻から分離終了までの時間と凍結温度に関する規定はあるが、凍結開始から凍結完了までの凍結速度に関する規定はない。そのため、凍結時に用いる急速凍結装置は統一されておらず、凍結速度は各製造所で異なっているものと推測される。FFPの凍結速度は、血液凝固第VIII因子(以

下VIII因子と略す)活性に影響を与えることがすでに報告されており、この凝固因子活性の低下が最大氷結晶生成帯で進行することが知られている¹⁾。最大氷結晶生成帯とは氷結晶を生成する温度帯のこと、この温度帯を通過する間は温度変化が小さくなる(図1)。そこで、本試験では、最大氷結晶生成帯を通過する時間がFFPの品質に与える影響を検証し、製造部門で使用する急速凍結装置に必要な性能を検討した。



参考：文献1) Vox Sang, 90 : 35 fig4

図1 血漿凍結時の温度推移イメージ

【方 法】

試験血液は、採血当日の血漿を未凍結の状態で用いた。全血血液から血漿を分離した後、すぐに検体を採取し、pre検体（以下preと略す）とした。検体を採取した全血由来血漿は、-1°Cに設定した氷水に留置した。氷水に留置して約20分でバッグ内温度が最大氷結晶生成帯に達することから、この時間を0時間とし以降1時間ごとに7時間目までシリングで検体を採取した。PT、APTT、血液凝固第II因子（以下II因子と略す）活性、血液凝固第V因子（以下V因子と略す）活性、VIII因子活性は、全自动血液凝固測定装置（CS-2000i、シスメックス）を用いて測定し（n=10）、トロンビン生成能は、トロンビン生成能測定システム（CAT、フィンガルリンク）を用いて測定した（n=7）。統計処理は、preを対照に各時間の値を比較した（Dunnett検定、 $\alpha=0.05$ ）。PTおよびAPTTは実測値で評価した。一方、血液凝固因子活性は個体差が大きいことから、preとの相対値で評価した。トロンビン生成能は、測定ごとに値が変動する可能性があるため^{2), 3)}、preとの相対値で評価した。また、トロンビン生成能は、Lag time、ETP、Peak Height、Start Tail、Time to Peakの5つのパラメーターで検討を行った（図2）。

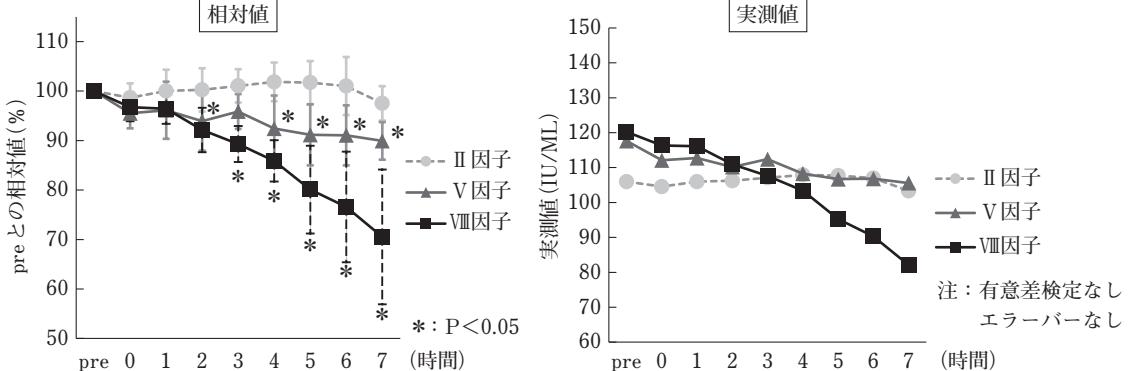
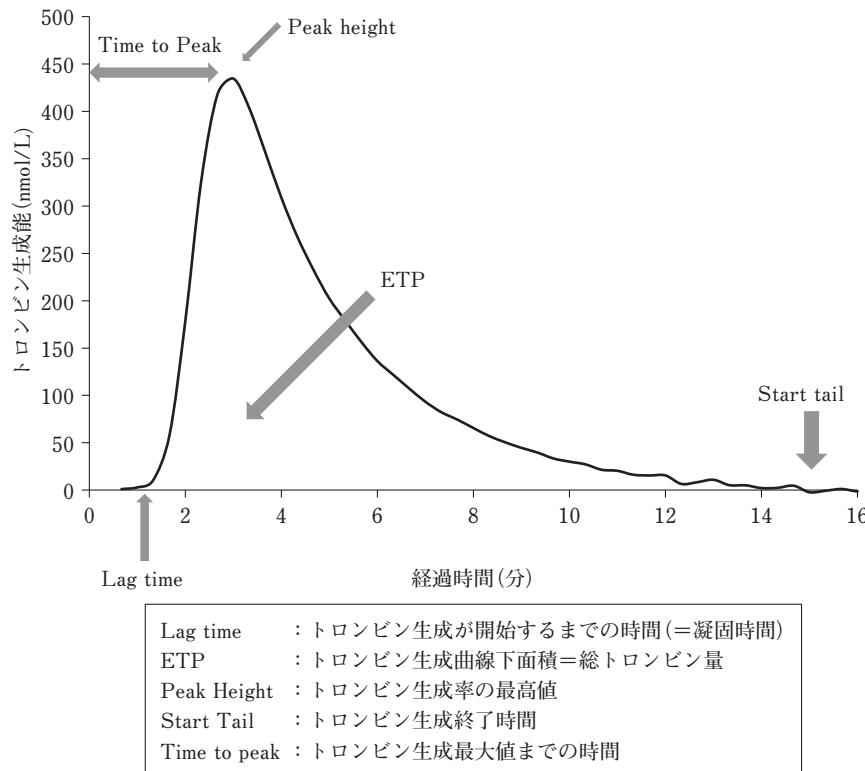
【結 果】

II因子活性は、preと比較して0時間から7時間までに活性の低下はほぼなかった。V因子活性とVIII因子活性は保管に伴い低下し、V因子活性は2時間および4時間以降、VIII因子活性は3時間以降で有意差が確認された。V因子活性は、preからバッグ内温度が最大氷結晶生成帯に達する0時間までに約5%，その後時間の経過とともに緩やかに低下し7時間で約10%低下した。VIII因子活性は、preから7時間まで1時間につき約4%ずつ低下し、7時間で約30%低下した（図3）。PT、APTTには有意な変化は認めなかった（表1）。

トロンビン生成能は、preと0時間に比べて、1時間から7時間までのpeak heightとETPに若干の低下がみられたが、すべてのパラメーターで有意な差は認めなかった（図4）。

【考 察】

FFPは、常温に放置すると凝固因子の活性が徐々に低下することが知られている。とくに、VIII因子は保管温度による影響を受けやすく、最大氷結晶生成帯に長時間保管すると活性が低下することが報告されている¹⁾。今回の試験でも、VIII因子は、時間の経過とともに活性が低下し、最大氷結晶生成帯通過時間が3時間を超えると有意差が認

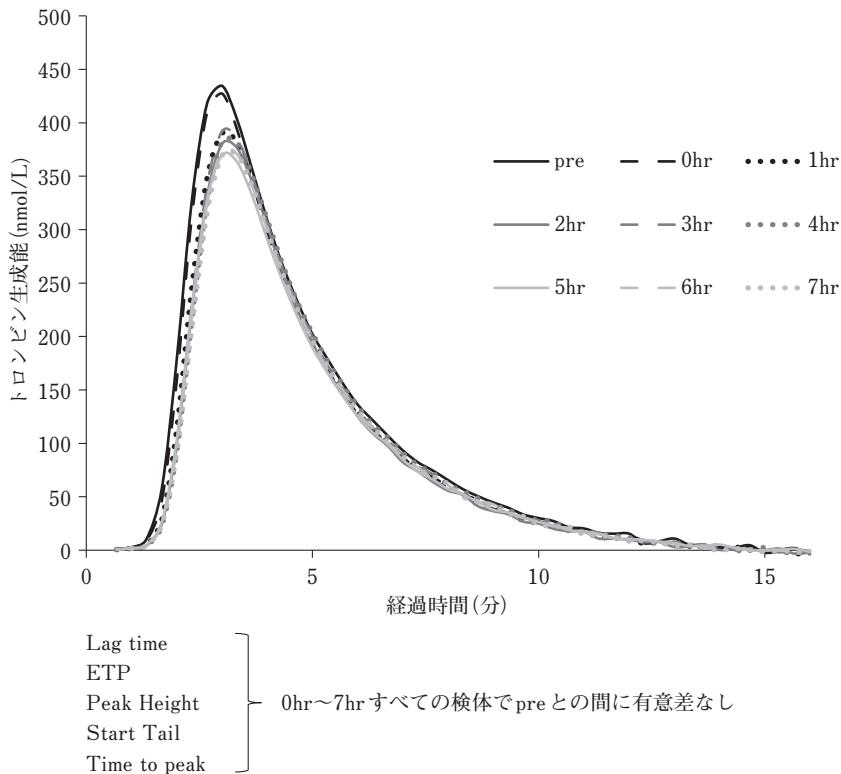


められた。また、VIII因子と同様に温度の影響を受けやすいV因子は^{4), 5)}、時間の経過とともに活性が低下する傾向を示し、2時間と4時間以降で有

意差が認められた。一方、II因子は、温度の影響を受けにくい凝固因子として知られており^{4), 5)}、活性の低下は今回の試験でも小さかった。これら

表1 PTおよびAPTTの経時変化

	pre	0hr	1hr	2hr	3hr	4hr	5hr	6hr	7hr
PT	10.8	10.9	10.9	10.9	10.9	10.9	10.9	11.0	11.0
APTT	28.6	28.7	28.9	29.1	29.2	29.4	29.7	29.9	30.2



のことから、氷水を用いて最大氷結晶生成帯を再現した今回の試験は、最大氷結晶生成帯における凝固因子活性の変化を正確に反映していると推察される。

FFPは凝固因子の補充を目的に使用されるため、凍結過程での血液凝固因子活性の低下は可能な限り小さくする必要がある。とくに、V因子は濃縮製剤がなくFFPでの補充が治療の第一選択となるため、FFPの品質にとって重要である⁴⁾。今回の試験で、V因子活性は2時間および4時間以降で有意差を認めたが7時間までの実測値で

90IU/ML以上の活性を維持していた。VIII因子活性は3時間以降に有意差を認めたが、7時間までの実測値で80IU/ML以上を維持していた。PTは、外因系と共に凝固因子活性が低下した時に延長する。また、APTTは、内因系と共に凝固因子活性が低下した時に延長する。最大氷結晶生成帯通過時間が長くなると、どちらも延長する傾向を示したが、その変化は小さかった。トロンビンは、止血の最終段階であるフィブリノーゲンをフィブリノーゲンにする過程で必要な酵素である。そのため、トロンビン生成能は、止血能力の指標とし

て用いられている^{6), 7), 8)}。トロンビン生成能は今回測定した7時間すべてのパラメーターで有意な差がなかった。このトロンビン生成能とPT, APTTおよび凝固因子活性の実測値から、一部の凝固因子活性の低下は確認されるものの止血能力に関しては最大氷結晶生成帯通過時間が7時間を経過してもpreと同等の能力を維持していると考えられる。

ただし、多くの製造所ではFFPと分画原料を同じ急速凍結装置で凍結しており、凝固因子製剤の原料となる分画原料は、なるべく凝固因子活性を高く維持する必要がある。なかでも先天的にVIII

因子を欠損する患者が多いため、分画原料においてVIII因子活性は重要である。

以上のことから、製造部門で使用する急速凍結装置は、分画原料の製造も考慮してVIII因子で最初に有意差が確認される3時間までに最大氷結晶生成帯を通過させる能力を有していることが望ましいと考える。今後、凍結基準の最高温度である-20°Cで凍結した際に、最大氷結晶生成帯通過時間が何時間になるか検証し、現在の基準が適切かどうかを凍結速度も考慮して再検討していく必要があると考える。

文 献

- 1) Swärd-Nilsson AM *et al.*: Factors influencing factor VIII activity in frozen plasma, Vox Sang. 90: 33-39, 2006
- 2) Dargaud Y., *et al.*: Standardisation of thrombin generation test—which reference plasma for TGT?: An international multicentre study, Thromb Res 125: 353-356, 2010
- 3) Henri M.H. Spronk, *et al.*: Assessment of thrombin generation: Validation of the Calibrated Automated Thrombogram in platelet-poor plasma in a clinical laboratory, Thromb Haemost, 100: 362-364, 2008
- 4) 厚生労働省医薬品食品局血液対策課：血液の使用指針(改定版) : 2007,
<http://www.mhlw.go.jp/new-info/kobetu/iyaku/kenketsugo/yuketuchiryou07/dl/yuketuchiryou07b.pdf>
- 5) 内藤祐ほか：新鮮凍結血漿の融解後の使用期限, 日輸血細胞治療会誌, 60 : 577-584, 2014
- 6) van Veen J.J., *et al.*: Thrombin generation testing inroutine clinical practice, are we there yet?, Br J haematol, 142: 889-903, 2008
- 7) 嶋緑倫ほか：トロンビン生成試験の実際と応用, 日血栓止血会誌, 18 : 217-225, 2007
- 8) 松本智子ほか：トロンビン生成試験, 検と技, 39 : 1138-1144, 2011