改良融解サイフォン法により調製した クリオプレシピテートの性状

井 上 香 代 松 田 利 夫

東京都赤十字血液センター研究部

(昭和58年12月13日受付)

THE PROPERTIES OF CRYOPRECIPITATE PREPARED BY THE MODIFIED THAW-SIPHON METHOD

Kayo Inoue and Toshio Mazda

Japanese Red Cross Tokyo Metropolitan Blood Center

Recent investigation by Kang (1980) suggested that the recovery of factor VIII activity was remarkably increased in cryoprecipitate prepared by the modified thaw-siphon (MTS) method. In the present study, cryoprecipitate was prepared by the MTS method and compared with slow-thaw and rapid-thaw methods. Assays for factors II, V, VIII, IX and XIII, von Willebrand factor, fibrinogen, total protein and albumin were performed on cryoprecipitates and on supernatant plasmas. The stability of factor VIII activity in cryoprecipitates after thawing was observed during incubations at 4°, 22° and 37°C for 24 hours. Relative viscosities were also determined on cryoprecipitate preparations.

Recoveries of factor VIII activity in cryoprecipitate were obtained $46.0 \pm 4.5\%$ by slow-thaw, $64.1 \pm 4.1\%$ by rapid-thaw and $72.0 \pm 5.1\%$ by MTS method. The results indicated that the recovery of factor VIII activity in MTS cryoprecipitate was more than 100 units from 180 ml of fresh frozen plasma, while recoveries of other plasma proteins, particularly fibrinogen, are reduced. Therefore the relative viscosity of MTS cryoprecipitate preparations were also less than slow-thaw preparations. However factor VIII activity in MTS cryoprecipitate preparations after thawing was less stable than slow-thaw preparations. In MTS supernatant plasma, there was little loss of plasma proteins except factor VIII, fibrinogen and von Willebrand factor.

序 言

赤十字血液センターでは現在、第Ⅷ因子製剤としては Pool により提唱された方法に準じて、クリオプレシピテートを調製している。しかし、クリオプレシピテートは第Ⅷ因子の回収率に比し、フィブリノーゲンの混入が多く、長期大量投与により過フィブリノーゲン血症を発症すること、また剤型も家庭療法には不便なことなどから、ほとんど用いられていないのが現状である。しかし、現在使用されている濃縮第Ⅷ因子製剤(AHG)は、その副作用として輸血後肝炎、AIDS などが問題になっているが、小バッチの血漿から調製されるクリオプレシピテートを用いることにより、これらの副作用を減少できる可能性がある。一方、

AHG 製剤の出発物質としてクリオプレシピテートが用いられることもあり、回収率の高いクリオプレシピテートの調製法を開発する必要がある。

クリオプレシピテート調製時の融解法を現行の調製法である緩速融解から急速融解に切り換えることによって第Ⅷ因子の収率が上昇する^{2)~4)}が、さらに最近、改良融解サイフォン法⁵⁾が考案され、第Ⅷ因子の回収率が大幅に向上することが報告されている。しかし、この改良融解サイフォン法により調製されたクリオプレシピテートの第Ⅷ因子の性状や第Ⅷ因子以外の血漿蛋白については、まだ報告されていない。そこで今回、この融解法が第Ⅷ因子をはじめ、他の血漿蛋白のクリオプレシピテートへの回収率等に及ぼす影響について比較

検討を行った。

材料および方法

1. クリオプレシピテートの調製

6単位のCPD加新鮮血漿をプールし、分離バッグ（テルモ製）に180mlずつ分注し、ドライアイス・エタノール中で凍結（30分）後、次の3法で融解し、融解終了後、4,300×g、5℃、10分で遠心し、上清血漿を約20ml残して3種のクリオプレシピテートを調製した。

融解法は（1）緩速融解（ST）法¹⁾：バッグを冷蔵庫（4℃）に約16時間放置して融解させた。（2）急速融解（RT）法²⁾：バッグを攪拌式恒温槽（4℃）に入れて平均87.5分で融解させた。（3）改良融解サイフォン（MTS）法³⁾：凍結血漿入バッグの長さの1/4と3/4の位置に幅広のゴムバンドをし、攪拌式恒温槽（4℃）に入れて融解を行った。子バッグを連結し、凍結血漿入バッグより低い位置に置き、融解開始10分後に連結管のクリップをはずしてサイフォン作用で融解部分を徐々に流出させた。流出量が120mlになったところでサイフォンを止め、融解を完了させた。

2. 凝固因子活性の測定

第VIII因子、第IX因子は各因子欠乏血漿（Dade製）を基質として、活性部分トロンボプラスチン時間（APTT）を用いた一段法⁴⁾により測定した。

第II因子、第V因子は各因子欠乏血漿（Dade製）を基質として用い、プロトロンビン時間（PT）⁷⁾を測定した。第XIII因子、フォンウィルブランド因子は各々ヘキスト製第XIII因子定量試薬、同フォンウィルブランド試薬を用いて定量した。フィブリノーゲンはDade製フィブリノーゲン測定用試薬を用いて測定した。製剤中の各凝固因子の回収率（又は混入率）は凝固因子活性から次の式により求めた。

$$\% \text{ recovery} = \frac{\% \text{ activity in product} \times \text{ml product}}{\% \text{ activity in original plasma} \times \text{ml original plasma}} \times 100$$

3. 蛋白の測定

総蛋白はBiuret法⁸⁾、アルブミンはプロモクレゾールグリーン（BCG）法⁹⁾でオリンパスACA6000自動分析装置により定量した。

4. 粘度の測定

粘度は変形ウベローデ型粘度計を用いて測定し、相対粘度を求めた。

成 績

各々の融解法で調製したクリオプレシピテートへの第VIII因子の回収率とその他の血漿蛋白の混入率を表1に示した。第VIII因子の回収率はST法で46.0±4.5%，RT法で64.4±4.1%，MTS法で72.0±5.1%となり、ST法に対してRT法が約

Table 1 Comparative of plasma proteins in cryoprecipitates prepared by different thawing methods.

	Slow-thaw	Rapid-thaw	Modified thaw-siphon
Thawing time (min)	996.7±66.4(6)	87.5±19.8(6)	51.5± 3.9(6)
Volume (ml)	21.5± 0.7(6)	20.7± 1.0(6)	19.5± 1.5(6)
Factor VIII (% Recovery)	46.0± 4.5(6)	64.4± 4.1(6)	72.0± 5.1(6)
(Units per bag)	88.7± 6.1(6)	121.7± 8.0(6)	139.4±16.3(6)
Total protein (% Recovery)	15.0± 0.4(6)	11.9± 0.7(6)	11.2± 1.3(6)
Albumin (% Recovery)	14.4± 0.8(6)	11.7± 0.7(6)	10.9± 1.1(6)
Fibrinogen (% Recovery)	40.5± 5.1(6)	33.6± 1.5(6)	29.4± 2.8(6)
Factor II (% Recovery)	12.3± 2.4(3)	12.3± 2.0(3)	10.6± 1.3(3)
Factor V (% Recovery)	14.2± 2.0(3)	12.3± 0.5(3)	11.4± 1.9(3)
Factor IX (% Recovery)	20.1± 4.5(3)	21.7± 2.3(3)	20.2± 5.0(3)
Factor XIII (% Recovery)	34.2± 3.1(3)	22.0± 5.3(3)	22.0± 4.4(3)
von Willebrand factor (% Recovery)	92.1± 4.2(3)	92.6± 1.3(3)	80.8± 7.1(3)

Mean±S.D.(number of samples)

Table 2 Specific activity of factor VIII and von Willebrand factor in cryoprecipitates.

	Slow-thaw	Rapid-thaw	Modified thaw-siphon
Factor VIII			
units/mg protein	0.054±0.004(6)	0.093±0.008(6)	0.108±0.017(6)
units/mg fibrinogen	0.55 ±0.13 (6)	0.89 ±0.08 (6)	1.17 ±0.10 (6)
von Willebrand factor			
units/mg protein	0.060±0.004(3)	0.076±0.002(3)	0.075±0.004(3)

Mean±S.D.(number of samples)

1.4倍, さらに MTS 法が約1.5倍で, 急速融解を行うとクリオプレシピテート 1 単位あたり100unitsを越える収率を得た. 総蛋白は MTS 法で ST 法の回収率に対して約25%, フィブリノーゲンは約27%の減少率を示した. クリオプレシピテート 1 単位あたりの総蛋白は, ST 法で1652.8±23.9 mg, MTS 法で1226.9±118.2mg, フィブリノーゲンはST法で166.3±31.6mg, MTS法で120.1±18.4mgとなり, 総蛋白が約400mg, フィブリノーゲンが約40mg 減少したことになる. このため, 蛋白, フィブリノーゲンに対する第VIII因子の比活性は各々MTS 法でST 法の約 2 倍になった(表 2). また, RT 法でも ST 法の回収率に対して総蛋白が約20%, フィブリノーゲンが約17%の減少率を示した. フォンウィルブランド因子の回収率が, MTS 法で80.8±7.1%と ST 法の92.1±4.2%より減少したが, クリオプレシピテート調製後の上清血漿中には, 融解方法によらず, 我々の用いた測定法では検出できなかった. また, フォンウィルブランド因子の比活性は MTS 法で増加していた. 一方, クリオプレシピテートへのその他の血漿蛋白の混入率も MTS 法で減少する傾向がみられた.

図 1 に, 原料血漿中の第VIII因子活性を100%とした時の, クリオプレシピテート調製後の上清血漿における第VIII因子の残存率を, クリオプレシピテートの回収率とともに示した. 上清血漿における残存率は, クリオプレシピテートへの回収率と同様に, ST 法の11.1±3.0%に対して, RT 法で20.7±4.3%, MTS 法で23.3±3.2%と増加した. 従って, クリオプレシピテート調製中の第VIII因子活性の失活は, ST 法で約40%, RT 法で約15%, MTS 法で約 5 %で, 融解方法による差が顕著で

Fig. 1 Recoveries of factor VIII in cryoprecipitates and supernatant plasma.
□: cryoprecipitate. ▨: supernatant plasma.
Data are mean values±S.D. (n=6)

あることがわかった.
表 3 に, 上清血漿中の各血漿蛋白を原料血漿に対する残存比で示した. フィブリノーゲン, 第VIII因子, フォンウィルブランド因子以外の血漿蛋白は80%以上が上清血漿中に残存することが認められた. さらに, これらの上清血漿中の蛋白の残存比は, ST 法の0.76~0.95に比して, MTS 法で0.89~1.00と高く, 原料血漿により近い状態となった.
MTS 法と ST 法で調製したクリオプレシピテート中の第VIII因子活性を 4℃, 22℃, 37℃の各温度において経時的に測定した(図 2). 融解直後

Table 3 Ratio of plasma proteins in supernatant plasma to original plasma

	Slow-thaw	Rapid-thaw	Modified thaw-siphon
Total protein	0.95±0.02(6)	0.98±0.05(6)	1.00±0.03(6)
Albumin	0.95±0.02(6)	0.98±0.03(6)	1.00±0.02(6)
Fibrinogen	0.65±0.07(6)	0.76±0.05(6)	0.77±0.04(6)
Factor II	0.95±0.07(3)	0.96±0.07(3)	1.00±0.05(3)
Factor V	0.83±0.09(3)	0.97±0.10(3)	1.01±0.14(3)
Factor VIII	0.13±0.03(6)	0.24±0.05(6)	0.27±0.04(6)
Factor IX	0.76±0.12(3)	0.95±0.07(3)	0.89±0.01(3)
Factor XIII	0.79±0.11(3)	0.97±0.05(3)	0.97±0.01(3)
von Willebrand factor	n.d. (3)	n.d. (3)	n.d. (3)

Mean±S.D.(number of samples)

n.d.=non detected for supernatant plasma

Fig. 2 Stabilities of factor VIII activity in cryo-precipitates.

○: Modified thaw-siphon. △: Slow-thaw.
 ●: Modified thaw-siphon, incubated at 37°C for 5min before assay. ▲: Slow-thaw, incubated at 37°C for 5min before assay. Data are mean values±S.D. (vertical bars). (n=3)

には2units/mlの差があったが、6時間後にはほとんど差がなくなり、24時間後にはほぼ同じ活性を示した。すなわち、どの温度においてもMTS法

で調製したクリオプレシピテート中の第Ⅷ因子活性の低下は大きかった。4℃保存では、一見22℃保存より速く失活するようだが、活性測定直前に37℃で5分間インキュベートすることにより、活性が上昇し、経時変化は22℃保存の場合とほとんど相違がなかった。一方、37℃の場合には、MTS法、ST法とも、他の温度に比して活性の低下が大きく、特にMTS法では6時間目までに急激に低下した。

また、MTS法とST法で調製したクリオプレシピテートについて、粘度を測定したところ、MTS法のクリオプレシピテートの相対粘度は 1.57 ± 0.04 で、ST法の 1.70 ± 0.08 より低かった。粘度と蛋白量、フィブリノーゲン量との関係を図3に示した。両者とも相関が認められたが、特にフィブリノーゲン量と密接な関係があった。

考 案

クリオプレシピテートへの第Ⅷ因子の回収率は、クリオプレシピテート調製時の融解方法により著しい差が認められた。まず、融解時間を大幅に短縮することにより、クリオプレシピテートへの第Ⅷ因子の回収率が向上した。MTS法では、RT法よりもさらに融解時間が短縮したことから、調製中の第Ⅷ因子の失活が非常に少なくなり、第Ⅷ因子の活性がよりよく維持されて、クリオプレシピテートへの回収率もより上昇すると考えられる。

他の血漿蛋白についても、MTS法のクリオプレシピテートで最も混入が少なく、特に、フィブ

Fig. 3 Relative viscosity versus total protein concentration and fibrinogen concentration.

△ : original plasma. ○ : Slow-thaw cryoprecipitate.

● : Modified thaw-siphon cryoprecipitate.

リノーゲンの混入率が減少した。そのため、第Ⅷ因子の比活性は2倍に増加した。さらに、フィブリノーゲンは粘度に影響を与えることがわかった。ST法のクリオプレシピテートと比較した場合にMTS法のクリオプレシピテートでは粘度の低下も認められた。このことから、ST法のクリオプレシピテートより溶解血漿量を減じて製品化することもできよう。

一方、クリオプレシピテート調製後の上清血漿は、MTS法で調製した場合他法に比して、第Ⅷ因子、フォンウィルブランド因子、フィブリノーゲン以外の凝固因子や血漿蛋白量が原料血漿中の蛋白量とほとんど差がないので、血漿製剤や分画製剤原料としても十分に有効であると考えられる。以上のことから、クリオプレシピテートの調製は急速に融解することが重要であり、できればMTS法で行うべきであると考えられた。

しかし、クリオプレシピテート製剤を溶解後、液状で放置し、経時的に第Ⅷ因子活性を測定すると、保存温度に関らず、MTS法のクリオプレシピテート中の第Ⅷ因子活性は急激に失活して、24時間放置により、ST法のクリオプレシピテートの第Ⅷ因子活性と同じレベルまで低下した。Weaverら¹⁰⁾は期限切れの全血製剤の血漿中より第Ⅷ因子製剤を調製できることを報告し、第Ⅷ因子活性が21日間安定であるという。一方、クリオプレシピテート調製後の上清血漿中の第Ⅷ因子とクリオプレシピテート中の第Ⅷ因子の生化学的性状が異なること^{11),12)}が報告されている。我々の結

果では、MTS法によって調製したクリオプレシピテートやクリオプレシピテート調製後の上清血漿中の第Ⅷ因子活性の回収率、残存率は他法によるものより高かったが、その第Ⅷ因子活性はST法で得られた第Ⅷ因子よりも不安定な性質をもつと考えられた。

今後さらに、この性質の異なる理由について検討を行いたい。さらに、この不安定な第Ⅷ因子が輸注された際の臨床効果にどのように影響するのか、また、MTS法によるクリオプレシピテートをAHG製剤の出発物質として用いる場合に、収率向上に役立つかどうか検討を行う必要がある。

結 び

MTS法で調製したクリオプレシピテートの性状をST法、RT法で調製したクリオプレシピテートと比較検討した。この結果、MTS法は、クリオプレシピテートへの第Ⅷ因子の回収率が最も高く、1単位あたり100unitsを越える収率を得たのに加え、他の血漿蛋白の混入率が減少し、クリオプレシピテートの調製法としてすぐれていると考えられる。しかし、この融解法によって上昇した第Ⅷ因子の活性は、ST法に比較して、より不安定な性質を持っていることが認められた。

謝辞、本研究を行うにあたり、御懇篤なる御指導を賜った都立駒込病院清水 勝先生、また、有益な御助言と種々の御配慮を賜った東京都赤十字血液センター松永信夫所長、日本赤十字社中央血液センター笹川 滋課長に深甚の謝意を表します。

文 献

- 1) Pool, J.G. and Shannon, A.E.: Production of high-potency concentrates of antihemophilic globulin in a closed-bag system. *New Engl. J. Med.*, 273: 1443—1447, 1965.
 - 2) Brown, D.L., Hardisty, R.M., Kosoy, M.H. and Bracken, C.: Antihaemophilic globulin: Preparation by an improved cryoprecipitation method and clinical use. *Brit. Med. J.*, 2: 79—85, 1967.
 - 3) Slichter, S.J., Counts, R.B., Henderson, R. and Harker, L.A.: Preparation of cryoprecipitated factor VIII concentrates. *Transfusion*, 16: 616—626, 1976.
 - 4) Rock, G. and Tittley, P.: Variations in cryoprecipitate production. *Transfusion*, 17: 50—53, 1977.
 - 5) Kang, E.P.: An improved thaw-siphon method for the cryoprecipitate preparation. *Vox Sang.*, 38: 172—177, 1980.
 - 6) Langdell, R.D., Wagner, R.H. and Brinkhous, K.M.: Effect of antihemophilic factor on one-stage clotting tests. A presumptive test for hemophilia and simple one-stage antihemophilic factor assay procedure. *J. Lab. Clin. Med.*, 41: 637—647, 1953.
 - 7) Quick, A.J., Stanley-Brown, M. and Branscroft, F.W.: A study of the coagulation defect in hemophilia and in jaundice. *Amer. J. Med. Sci.*, 190: 501—511, 1935.
 - 8) Gornall, A.G., Bardawill, C.J. and David, M.M.: Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. *J. Biol. Chem.*, 177: 751—766, 1949.
 - 9) Dumas, B.T., Watson, W.A. and Biggs, H.G.: Albumin standards and the measurement of serum albumin with bromocresol green. *Clin. Chem. Acta*, 31: 87—96, 1971.
 - 10) Weaver, R.A., Gabriel, D.A. and Langdell, R.D.: Concentrated antihemophilic factor (AHF) from outdated blood. *Transfusion*, 7: 168—173, 1967.
 - 11) Weiss, H.J. and Kochwa, S.: Molecular forms of antihaemophilic globulin in plasma, cryoprecipitate and after thrombin activation. *Brit. J. Haematol.*, 18: 89—100, 1970.
 - 12) Over, J., Bouma, B.N., Van Mourik, J.A., Sixma, J.J., Vlooswijk, R. and Bakker-Wonderen, I.: Heterogeneity of human factor VIII. 1. Characterization of factor VIII present in the supernatant of cryoprecipitate. *J. Lab. Clin. Med.*, 91: 31—46, 1978.
-