

백혈구연층법으로 분리 제조한 농축적혈구, 혼합혈소판 및 동결혈장 제제의 품질 평가

홍덕진¹ · 최승준¹ · 김신영¹ · 김현옥¹ · 박규은²

연세대학교 의과대학 진단검사의학교실¹, 대한적십자사 혈액관리본부²

= Abstract =

Quality Assessment of Red Blood Cells, Pooled Platelets and Frozen Plasma Processed by the Buffy Coat Method

Duck Jin Hong¹, Seungjun Choi¹, Sinyoung Kim¹, Hyun Ok Kim¹, Quehn Park²

*Department of Laboratory Medicine, Yonsei University College of Medicine¹,
Blood Service Headquarters, Korean Red Cross², Seoul, Korea*

Background: Buffy coat method is one of the blood components processing methods widely used in many countries including Europe and Canada. For the first time in Korea, we evaluated the qualities of blood components manufactured by buffy coat method.

Methods: We collected 400 mL whole bloods using the quadruple top and bottom blood bag from thirty-five donors. Whole bloods were processed into leukoreduced RBC, leukoreduced pooled platelet, and 24 hr frozen plasma by the buffy coat method with blood bags and instruments of Fenwal and Fresenius. The qualities of each blood component were analyzed at each scheduled day, and compared with the standard guidelines of quality control in Korean Red Cross.

Results: The volume and hemoglobin of RBCs were lower than the standard guidelines. Comparing with the standard of apheresis platelets, leukoreduced pooled platelets showed higher total platelet yield with the median 3.70×10^{11} /unit. Frozen plasma showed increased volume recovery than the standard guideline, but the activity of factor VIII at Day 35 was decreased to 0.66 ± 0.14 IU/mL.

Conclusion: We have found that the yields of pooled platelet and the frozen plasma processed by buffy coat method were higher than the standard guidelines. To introduce the buffy coat method to routine blood component separation process in Korea, further evaluations about the cost-effectiveness of buffy coat method are required. (Korean J Blood Transfus 2010;21:254-65)

Key words: Buffy coat method, Blood separation, Pooled platelet, 24 hr frozen plasma

접수일 : 2010년 10월 15일, 수정일 : 2010년 10월 20일, 승인일 : 2010년 10월 22일

책임저자 : 김 현 옥 120-140 서울시 서대문구 신촌동 134 연세대학교 의과대학 진단검사의학교실

TEL: 02) 2228-2444, FAX: 02) 364-1583, E-mail: hyunok1019@yuhs.ac

서론

혈액제제는 헌혈을 통해서만 구할 수 있는 유한한 인체 자원으로, 최근 인구 구조의 고령화와 수혈연관급성폐손상(transfusion related acute lung injury)의 예방을 위해 임신력이 있는 여성 헌혈자의 헌혈을 배제¹⁾하는 등의 원인들에 의해 앞으로는 혈액제제 공급이 감소하는 반면, 진단기술과 의학기술의 발전으로 임상에서 좀 더 적극적인 치료가 가능해짐으로써 혈액제제의 수요량은 더욱 증가할 것으로 예상된다. 그 가운데에서도 국내 혈액원에서 가장 많은 비율로 제공받는 400 mL 전혈(여성의 경우 320 mL 전혈)의 분리 제조 방법의 선택은 혈액 이용의 효율성 증대뿐만 아니라 더 나아가 국가 혈액사업의 운영에도 큰 영향을 미칠 수 있는 요소라고 할 수 있다.

우리나라는 혈소판풍부혈장법(platelet rich plasma method)으로 전혈로부터 농축 적혈구, 농축혈소판 그리고 신선동결혈장 등의 혈액성분 제제를 분리하여 생산하고 있다. 혈소판풍부혈장법은 1960년대 말 미국에서 처음 소개되었으며, 이 방법은 채혈 8시간 이내에 혈액제제 분리가 완료되어야 하기 때문에 혈액원에서는 야간업무 부담이 생기고, 혈소판과 혈장의 회수율이 다른 방법에 비해 낮으며, 혈소판 활성도가 높다는 단점이 있다.²⁾ 반면 1980년대 후반 Pietersz 등에 의해 처음 소개된 백혈구연층법(buffy coat method)은 일차 혈액백의 위쪽과 아래쪽에 각각 혈장백과 적혈구백이 연결된 top and bottom 방식의 사중백(quadruple blood bag)에 헌혈을 받은 후, 혈소판풍부혈장법과는 다르게 채혈 후 24시간 내에 강한 1차 원심분리로 혈장과 적혈구를 분리하고, 남겨진 백혈구연층을 4~6개 정도 혼합하여 약한 2차 원심분리를 하여 혼합혈소판(pooled platelet)을 제조한다는 것과 신선동결혈장이 아닌 24시간 내에

제조된 동결혈장이 만들어진다는 점이 특징이다.^{3,6)} 현재까지 백혈구연층법으로 제조한 혈액제제의 성상 및 품질관련 항목들의 변화에 대한 연구는 유럽을 중심으로 활발하게 이루어져 왔으며, 독일, 프랑스, 캐나다 등은 농축혈소판 제제를 백혈구연층법으로 제조 공급하고 있는 대표적인 국가이다. 하지만 국내에서는 백혈구연층법에 대한 연구와 top and bottom 방식의 자동화 기기를 이용한 혈액제제 분리제조 경험은 전혀 보고된 바 없다. 이에 본 저자들은 백혈구연층법으로 농축적혈구, 혼합혈소판 및 혈장 제제를 제조한 후 기존의 혈소판풍부혈장법과 비교하여 성분제제 생산에서의 그 장점과 특징을 평가하고 우리나라에서의 백혈구연층법의 도입 가능성 여부에 대한 기초자료를 제공하고자 하였다.

대상 및 방법

1. 전혈 기증자

본 연구 참여에 동의한 총 35명의 건강한 헌혈자로부터 전혈을 채혈하였다. 모든 실험 참가자들은 본 연구의 목적과 방법, 혈액제제의 향후 관리, 채혈 과정에서 발생할 수 있는 부작용, 연구 과정에서의 피험자의 안전성, 연구 참여의 자발적 동의 및 취소에 대한 내용을 충분히 이해하고 연구에 자발적으로 참여한다는 내용이 포함된 동의서를 작성하였다. 헌혈자는 국내 400 mL 전혈 헌혈자 기준에 따라서 헌혈 전 말초혈액의 혈색소 농도가 12.5 g/dL 이상인 체중 50 kg 이상의 건강한 만 17세 이상의 남녀로 제한하였다.

2. 혈액백

혈액백은 1차 전혈 분리용으로 백혈구여과필터가 장착된 top and bottom 방식의 450 mL 전혈

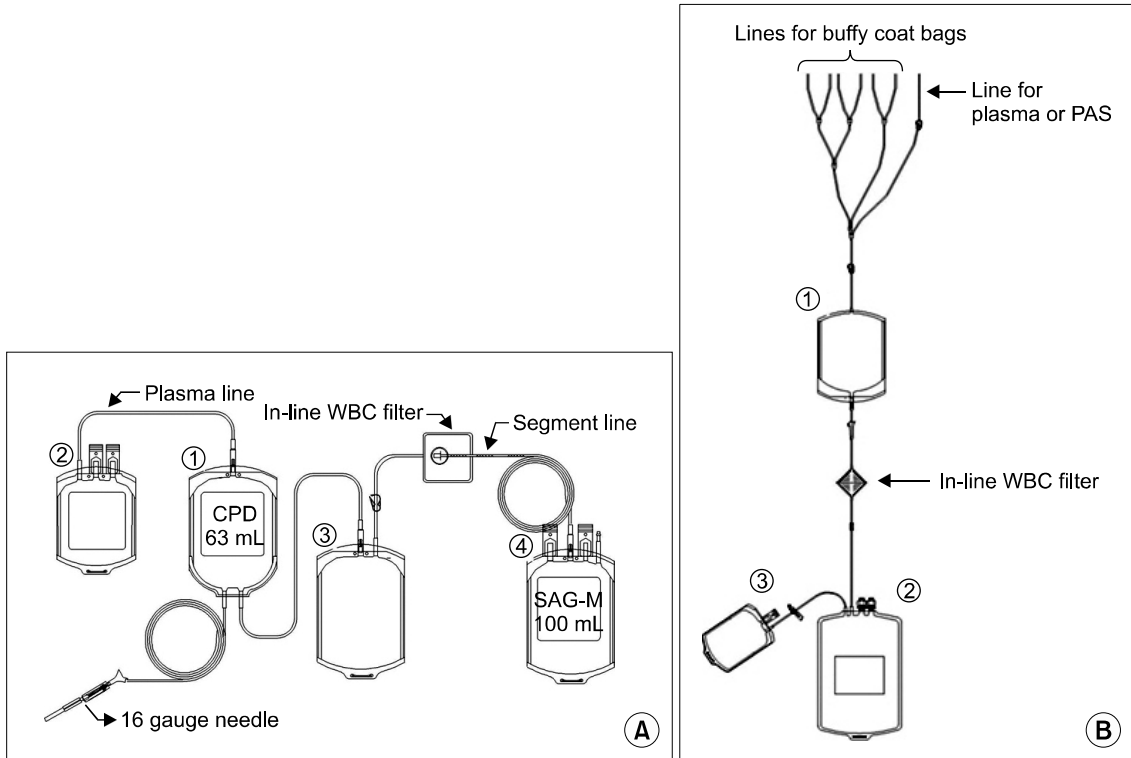


Fig. 1. Top and bottom quadruple blood bag and octopus-type platelet pooling and storage bag for buffy coat method. (A) Top and bottom quadruple blood bag. ① Primary bag containing 63 mL of CPD solution, ② Plasma bag, ③ RBC transfer bag connected to in-line WBC filter and RBC bag, ④ RBC bag containing 100 mL of SAGM. (B) Octopus-type platelet pooling and storage bag. ① Platelet pooling bag connected to in-line WBC filter and platelet storage bag, ② Platelet storage bag, ③ Pouch for platelet component sampling and air removal.

용 4-Optipure RC (Fenwal, Round Lake, IL, USA)과 Composelect T&B (Fresenius HemoCare, Emmer-Compascuum, the Netherlands)를 사용하였다(Fig. 1). 국내 기준의 항응고제량을 맞추기 위해 63 mL의 항응고제 CPD 액(citrate-phosphate-dextrose solution)에서 7 mL를 채혈 직전에 버리고 전혈 400 mL를 채혈하였다. 혼합혈소판 제제 제조는 2차 혼합백혈구연층 분리용으로 백혈구여과 필터가 장착된 혈소판백 PL2410 (Fenwal, Round

Lake, IL, USA)을 사용하여 시행하였다(Fig. 1).

3. 혈액제제 자동 분리기기 및 원심분리

혈액제제 분리 제조를 위한 자동화 기기로서 Optipress II (Fenwal)와 Compomat G4 (Fresenius HemoCare)를 이용하였다(Fig. 2). 혈액백은 원심분리기 RC3C (Sorvall, Newtown, CT, USA)를 사용하여, 4,293 g에 8분 간 1차 강한 원심분리를 하였고 2차 약한 원심분리는 419 g에 9분 간 시행하

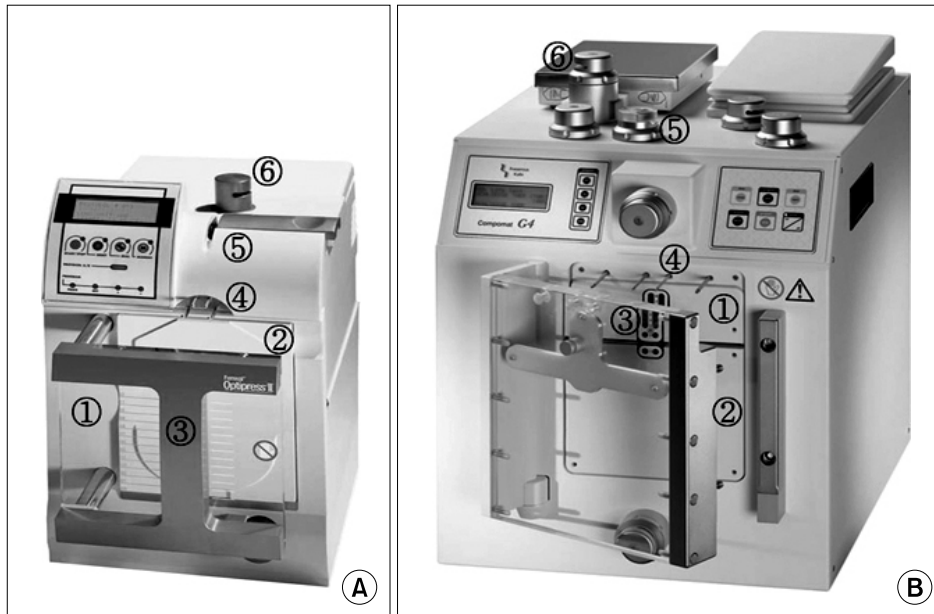


Fig. 2. Automated blood components separating devices. (A) Optipress II. ① Press plate, ② Back plate, ③ Optic sensor, ④ Blood bag hanger, ⑤ Hb detector, ⑥ Clamp and sealer. (B) Compomat G4. ① Upper press plate, ② Lower press plate, ③ Optic sensor, ④ Blood bag hanger, ⑤ Hb detector, ⑥ Clamp and sealer.

였다.

4. 성분제제의 제조 및 품질 측정

전혈 채혈일(Day 0)에 혈소판제제의 혼합을 위해 혈액형이 같은 5명 단위로 채혈하였다. 채혈 직후 전혈은 4°C 냉장고 또는 냉각관을 이용하여 20°C까지 온도를 내린 다음, 실온(20°C)에서 다음 날 오전까지 보관하였다. 제조 당일(Day 1)에는 채혈 후 24시간이 지나기 전에 두 회사의 자동화 혈액 분리기기를 이용하여 전혈을 농축적혈구, 혼합혈소판 및 혈장 제제로 분리하였다. 농축적혈구는 1차 분리 후 중력을 이용하여 백혈구여과 제거하였고, 혼합혈소판은 백혈구연층을 5단위씩 혼합하여 2차 분리와 동시에 백혈구여과 제거하면서 제조하였다. 농축적혈구는 냉장 보관하면

서 제조 직후(Day 1), 15일(Day 15)과 35일(Day 35)에 부피, 적혈구 수, 혈색소, 적혈구용적률 그리고 백혈구 수를 자동 혈액분석기 Advia 2120 (Bayer Diagnostics, Tarrytown, NY, USA)을 이용하여 측정하였고 그 결과를 대한적십자사의 혈액 제제의 제조 및 품질관리 지침⁷⁾의 백혈구여과제거 농축적혈구의 품질관리 기준과 비교하였다. 여과 후의 혈액 내 잔여 백혈구 수는 Nageotte chamber (Ballast chamber Koch Products, Friedrichsdorf, Germany)를 사용하여 수기로 산정하였다. 혼합혈소판은 실온에서 혈소판 교반기 Helmer (Helmer Inc., Noblesville, IN, USA)에서 보관하면서 제조 2시간 후(Day 1), 3일(Day 3)과 5일(Day 5)에 부피와 혈소판 수, 적혈구 수, 백혈구 수 그리고 혈소판 대사지표로써 pH, pO₂, pCO₂,

젖산, 포도당, potassium 농도를 혈액가스 분석기인 NOVA CCX (Nova Biomedical, Waltham, Miami, USA)를 이용하여 측정하였다. 부피 및 혈액관련 항목은 대한적십자사의 백혈구여과제거 성분채 집혈소관의 품질관리 기준과 비교하였다. 여과 후의 혼합혈소관 내의 잔여 백혈구 수는 Nageotte chamber를 사용하여 구하였다.

혈장은 혈액냉동고에 보관하면서 제조 직후 (Day 1)와 제조 35일(Day 35)에 해동하여 부피, prothrombin time (PT), activated partial thromboplastin time (aPTT), V와 VIII응고인자의 활성도, 그리고 섬유소원 농도를 ACL TOP (Instrumentation Laboratory, Milan, Italy)을 이용하여 측정하였다.

5. 국내 혈액제제 품질관리기준 자료 수집

혈소판공부혈장법으로 제조한 혈액에 대한 자료는 대한적십자사의 혈액제제 품질관리 기준 및 자료를 대상으로 비교 분석하였으며, 대한적십자사의 연구윤리 심의위원회의 승인을 받았다.

6. 통계 분석

통계 분석은 Analyze-it for Microsoft Excel (version 2.22, Analyze-it Software Ltd., Leeds, UK)을 이용하였고, 통계적 유의 수준은 P value 0.05를 기준으로 하였다.

결 과

1. 헌혈자의 혈액학적 검사소견

전혈 기증자의 평균 연령(범위)은 24.4±6.2 (18~54)세였고, 남녀비율은 남자 29명: 여자 6명이었다. 기증받은 전혈의 부피는 400±5 (386~413) mL로, 혈색소와 적혈구용적률은 각각 14.3±1.0 (12.5~16.0) g/dL와 42.2±2.6 (38.0~46.5) %였고, 혈소판 수는 270.3±61.6 (182~452)×10³/μL였다. PT (INR), aPTT, 섬유소원의 농도 역시 각각 0.98±0.06 (0.88~1.15) INR, 30.2±2.6 (23.3~36.6)

Table 1. The characteristics of donors and hematologic parameters in whole blood collected

Parameters	Total	Fenwal group*	Fresenius group*
No. of collection	35	25	10
Age (years)	24±6 (18~54)	24±7 (18~54)	25±3 (19~30)
Sex (Male : Female)	29 : 6	21 : 4	8 : 2
Blood type (Non-O : O)	30 : 5	20 : 5	10 : 0
Whole blood volume (mL)	400±5 (386~413)	399±5 (386~409)	402±5 (397~414)
Hb (g/dL)	14.3±1.0 (12.5~16.0)	14.3±1.0 (12.5~16.0)	14.3±1.1 (12.6~16.0)
Hct (%)	42.2±2.6 (38.0~46.5)	42.2±2.5 (38.0~46.5)	42.0±3.0 (38.2~46.5)
RBC count (×10 ⁶ /μL)	4.75±0.4 (3.93~5.37)	4.76±0.4 (3.93~5.23)	4.72±0.4 (4.15~5.37)
WBC count (×10 ³ /μL)	5.89±1.0 (2.98~8.33)	6.07±0.1 (4.44~8.33)	5.43±1.1 (2.98~7.02)
PLT count (×10 ³ /μL)	270±62 (182~452)	265±57 (182~435)	283±73 (196~452)
PT (INR)	0.98±0.06 (0.88~1.15)	0.98±0.07 (0.88~1.15)	0.96±0.03 (0.92~0.99)
aPTT (second)	30.2±2.6 (23.3~36.6)	30.0±3.0 (23.3~36.6)	30.6±1.5 (28.2~32.6)
Fibrinogen (g/dL)	245±36 (182~333)	249±37 (182~333)	232±30 (191~278)

Data are shown as means±SD (range).

*There was no parameter showing statistically significant difference between Fenwal and Fresenius group.

초, 244.5 ± 36.0 (182~333) g/dL로 정상 범위였다. Fenwal사의 혈액백과 자동화 혈액 분리기기를 이용한 전혈 기증자 군은 25명, Fresenius사의 기증자 군은 10명이 포함되었고, 검사항목들에서 두 군 사이에 통계학적으로 유의한 차이는 없었다 (Table 1).

2. 농축적혈구 제제의 품질

백혈구연층법으로 제조한 백혈구여과제거 농축적혈구의 품질을 대한적십자사의 백혈구여과제거 적혈구의 품질관리 기준과 비교하였다. 부피의 평균은 239 ± 12 mL이었고 최대 용량이 260 mL로 대한적십자사의 기준(75% 이상의 혈액이 300 ± 30 mL에 포함되어야 함)과 비교했을 때 통계적으로 유의하게 낮았다($P < 0.001$). 하지만 적혈구용적률의 평균은 $58.6 \pm 2.4\%$ 였지만, 75% 이상의 혈액이 $60 \pm 10\%$ 에 해당되어야 하는 대한적십자사의 기준과 비교해서는 통계학적인 차이를 나타내지 않았다.

혈색소의 평균은 42.4 ± 2.4 g/dL였으며, 현혈 전 기증자의 혈액백 내 적혈구 수를 감안한 제조 당

일(Day 1)의 적혈구 회수율은 $74.0 \pm 3.0\%$ 였다. 백혈구여과제거 농축적혈구의 잔존 백혈구 수는 0.3×10^6 /단위 미만이었으며, 잔존 혈소판 수는 모두 $4.0 \times 10^3/\mu\text{L}$ 이하로 매우 낮았다. 제조 당일(Day 1), 15일(Day 15), 35일(Day 35)에 측정된 적혈구용적률, 혈색소 및 적혈구 수에서는 시간 경과에 따른 통계학으로 유의한 차이는 관찰되지 않았다(Table 2).

3. 혼합혈소판 제제의 품질

백혈구연층법으로 제조한 혼합혈소판 제제의 부피는 최소 290 mL에서 최대 456 mL까지 다양하였는데, 2차 원심분리 시 적혈구 오염을 줄이기 위해 혼합혈소판 부피를 400 mL 이상으로 만든 2개 제제를 제외하면, 혼합혈소판 제제의 부피는 290~369 mL로 모두 성분채집혈소판 부피의 품질관리 기준인 400 mL 이하에 해당하였다. 혈소판 수확량의 중앙값은 3.70 (3.21~4.63) $\times 10^{11}$ /단위로 75% 이상의 제제에서 3.0×10^{11} /단위 이상이어야 한다는 대한적십자사 기준을 모두 만족시켰다. 혈소판 수의 현혈 전 기증자의 혈액백

Table 2. The change of hematologic parameters in stored leukoreduced red blood cells processed by buffy coat method (n=35)

Parameters	Day 1	Day 15	Day 35
Volume* (mL)	239 ± 12 (213~260)		
Initial RBC yield ($\times 10^{12}$ /unit)	1.41 ± 0.1 (1.08~1.64)		
Initial RBC recovery [†] (%)	74.0 ± 3.0 (67.9~80.7)		
Hematocrit (%)	58.6 ± 2.4 (52.4~62.3)	58.4 ± 2.7 (52.0~62.4)	58.2 ± 2.8 (51.1~62.4)
Hb (g/unit)	42.4 ± 2.2 (37.6~47.2)	42.6 ± 2.4 (36.9~47.4)	42.4 ± 2.4 (37.6~47.0)
RBC count ($\times 10^9/\mu\text{L}$)	5.87 ± 0.3 (5.08~6.46)	5.84 ± 0.3 (5.03~6.44)	5.78 ± 0.4 (4.91~6.30)
Residual WBCs	All $< 0.5 \times 10^6$ /unit		
Residual PLTs	All $\leq 4.0 \times 10^3/\mu\text{L}$		

Data are shown as means \pm SD (range).

*Leukoreduced red blood cells processed by buffy coat method showed statistically significant decrease in volume comparing with the standard guidelines of Korean Red Cross ($P < 0.001$).

[†]Initial RBC recovery (%) = $\frac{\text{Initial total RBCs in RBC bag}}{\text{Total RBCs in primary whole blood bag}} \times 100$.

내 혈소판 수와 비교한 제조 5일째의 최종 혈소판 회수율의 중앙값은 69.8 (65.5~75.3)%였다. 혈소판 대사와 관련한 항목들은 기존의 보고와 비슷한 양상을 나타냈는데,⁸⁾ 혈소판의 보관시간이

경과함에 따라 포도당 농도와 pCO₂는 감소하고, pH, 젖산, pO₂, potassium 농도는 통계학적으로 유의하게 상승하였다(*P* < 0.05) (Table 3).

Table 3. The change of hematologic and biochemical parameters in stored leukoreduced pooled platelets processed by buffy coat method (n=7)

Parameters	Day 1	Day 3	Day 5
Volume* (mL)	349 (290~456)		
Initial PLT yield (×10 ¹¹ /unit)	3.70 (3.21~4.63)		
Initial PLT recovery [†] (%)	69.8 (65.5~75.3)		
PLT count (×10 ⁹ /μL)	1,059 (848~1393)	1,014 (812~1,216)	1,007 (867~1,198)
Residual WBCs	All < 0.5×10 ⁶ /unit		
pH [‡]	7.12 (7.01~7.20)	7.30 (7.20~7.34)	7.36 (7.20~7.40)
Glucose [‡] (mg/dL)	429 (296~479)	391 (286~463)	373 (257~400)
Lactate [‡] (mmol/L)	7.6 (5.9~11.3)	10.0 (7.5~14.3)	12.7 (9.5~16.0)
pO ₂ [‡] (mmHg)	106.4 (90.6~124.3)	121.7 (99.4~143.4)	135.4 (106.8~156.4)
pCO ₂ [‡] (mmHg)	59.2 (49.8~65.8)	38.2 (29.0~41.8)	23.0 (20.1~34.0)
Potassium [‡] (mmol/L)	4.17 (3.68~4.40)	4.24 (3.82~4.43)	4.29 (3.91~4.52)

Data are shown as medians (range).

*Two pooled platelets of Fresenius with 400 mL or more volume was intentionally processed in order to increase the total volume of platelet storage bag.

[†]Initial PLT recovery (%) = $\frac{\text{Initial total PLTs in PLT bag}}{\text{Total PLTs in primary whole blood bag}} \times 100$.

[‡]These biochemical parameters showed statistically significant change from Day 1 to Day 5 (*P* < 0.05).

Table 4. Coagulation factor values in 24 hour frozen plasma processed by buffy coat method

Parameters	Day 1	Day 35
Volume* (mL)	236±14 (214~267)	
Factor VIII (IU/mL)	0.78±0.15 (0.52~1.18)	0.66±0.14 (0.39~1.15)
Factor V (IU/mL)	0.90±0.12 (0.66~1.20)	0.82±0.12 (0.62~1.11)
PT (INR)	0.98±0.06 (0.86~1.10)	1.03±0.06 (0.92~1.16)
aPTT (sec)	33.9±3.5 (26.0~42.3)	35.7±3.8 (27.2~44.2)
Fibrinogen [†] (mg/dL)	242±52 (168~458)	255±56 (167~420)
Residual WBCs	All ≤ 0.06×10 ³ /μL	
Residual RBCs	All ≤ 0.01×10 ⁶ /μL	

Data are shown as means±SD (range).

*24 hour frozen plasmas processed by buffy coatmethod showed statistically significant increase in volume comparing with the standard guidelines of Korean Red Cross (*P* < 0.001).

[†]Quality standard of fibrinogen concentration in cryoprecipitate is more than 133 mg/mL in 3/4 of tested blood components.

4. 동결혈장 제제의 품질 비교

백혈구연층법으로 제조한 동결혈장 제제의 부피는 235 ± 14 mL로 신선동결혈장의 품질기준인 145 mL와 신선동결혈장 200 단위의 품질관리 결과의 평균인 166 ± 10 mL보다 40~80 mL 이상 많았다($P < 0.001$). 반면, VIII응고인자의 활성도는 제조 당일(Day 1)에 0.78 ± 0.15 IU/mL, 제조 35일(Day 35)에 0.66 ± 0.14 IU/mL로 신선동결혈장의 품질기준인 0.7 IU/mL와 200 단위의 신선동결혈장의 품질관리 결과인 1.2 ± 0.3 IU/mL보다 통계적으로 유의하게 낮았다($P < 0.05$). V응고인자의 활성도는 제조 당일에 0.90 ± 0.12 IU/mL, 제조 35일에 0.82 ± 0.12 IU/mL였다.

PT (INR), aPTT, 섬유소원의 농도는 모두 검사실 내 참고치에 해당하는 범위였고, 잔존 백혈구와 적혈구 수도 각각 0.5×10^6 /단위 미만과 0.3×10^9 /단위 미만으로 매우 낮았다(Table 4).

고 찰

우리나라는 혈소판풍부혈장법을 이용하여 전혈로부터 농축적혈구, 농축혈소판 그리고 신선혈장 제제를 분리 생산하고 있다. 반면, 1970년대 중반 유럽에서는 백혈구연층을 제거할 경우 수혈시 농축적혈구에 포함된 백혈구에 의해서 발생하는 발열성 비용혈성 수혈부작용 등의 합병증을 줄일 수 있다는 사실과 백혈구연층 60 mL에는 30 mL의 적혈구, 30 mL의 혈장, 일차 혈액백 내 2/3의 백혈구와 대부분의 혈소판이 포함되어 있다⁹⁾는 점에 주목하여, 1980년대 말부터 백혈구연층법을 개발하여 전혈 유래 성분제제의 분리 제조법으로 이용하고 있다.³⁻⁶⁾ 대다수의 유럽 국가를 비롯하여 남아메리카 국가, 호주, 인도 및 동남아시아 등의 여러 나라에서 백혈구연층법을 이용한

혈액제제 제조가 이루어지고 있고, 특히 캐나다의 혈액사업을 담당하는 Canadian Blood Service (CBS)는 백혈구연층법으로 제조한 혈액제제의 수확량 증가, 24시간 상온 보관으로 인한 혈액원의 업무 감소 및 혈액제제의 물류개선 등의 경제성을 고려하여 2005년부터 2008년에 걸쳐서 전혈 분리방법을 기존의 혈소판풍부혈장법에서 백혈구연층법으로 완전히 전환하였다.¹⁰⁾

저자들은 국내에서는 처음으로 백혈구연층법을 이용해서 성분제제 제조를 시도하였는데, 본 연구에서 제조한 농축적혈구 제제의 부피는 대한적십자사의 품질관리 기준보다 약 60 mL 적고, 일차 혈액백 내 적혈구 수를 기준으로 계산한 적혈구 회수율의 평균이 74%로 기존의 백혈구연층법 관련 연구에서의 결과인 약 75~85%와 비교할 때 낮은 편에 속했다.¹¹⁻¹³⁾ 이것은 백혈구연층법의 경우 백혈구연층 분리 과정에서 일정량의 적혈구가 제거될 수 밖에 없으므로 혈소판풍부혈장법에 비해 상대적으로 적혈구의 소실이 많기 때문이며, 저자들이 사용한 자동화 혈액 분리기기는 450 mL 전혈용으로 프로그램이 내장되어 있어 1차 분리과정에서 적혈구가 충분히 적혈구백으로 나누어지기 전에 분리가 중단됨으로써 필요 이상의 적혈구가 일차 혈액백의 백혈구연층에 남아 있을 수 있고, 또한 농축적혈구를 백혈구제거필터로 여과하는 과정에서 약 10% 정도의 추가적인 부피 소실¹⁴⁾이 생긴 결과로 해석하였다. 저자들이 제조한 혼합혈소판의 수확량은 대한적십자사의 품질관리 기준을 모두 상회하고 일차 혈액백 내 혈소판과 비교한 회수율의 중앙값이 69.8% (65.5~75.3%)에 이를 정도로 높았다. 기존의 연구에서 보고된 혼합혈소판 수확량을 백혈구연층 5개를 혼합하여 제조했다고 가정하여 계산하면 $3.02 \sim 3.68 \times 10^{11}$ /단위^{8,13)}로 본 연구와 유사한 결과값을 나타낸다. 백혈구연층법의 장점 중 하

나인 혈소판 수획량의 최대화를 위해서는 2차 원심분리 조건을 적절하게 조절하는 것이 매우 중요하다. 2차 원심분리가 지나치게 강할 경우, 백혈구연층과 침가된 혈장 안에 존재하는 적혈구만이 아니라 혈소판 역시 가라앉아서 위쪽의 혈소판백으로 분리되지 않고 아래쪽의 폐기층에 남아 있게 된다. 반대로 원심분리 속도가 약할 경우에는 혈소판 회수율은 높아지지만, 육안으로는 관찰되지 않는 적혈구 부유가 발생하면서 혈색소 감지장치(Hemoglobin detector)의 임계치 이하에 해당하는 농도의 적혈구도 소량 포함된다. 실제로 저자들의 사전 실험에서 2차 원심분리를 1,073 g에 7분간 시행했을 때의 혈소판 회수율은 28.4~51.9% 밖에 되지 않았고, 원심력을 낮추어 386 g에 6분간 시행했을 때에는 혈소판 회수율은 79%로 높았지만, 잔존 적혈구 수가 $34.4 \sim 44.2 \times 10^9$ /단위로 혼합혈소판 또는 성분채집혈소판 제제의 기준인 5×10^9 /단위보다 높았고, 독일 적십자사의 품질관리 자료에서 보고된 중앙값 0.51×10^9 /단위와 상당한 차이를 보였다.¹⁵⁾ 하지만 1,073 g, 7분의 2차 원심분리 조건에서도 잔존 적혈구 수가 많았으므로 원심력의 부족에 의한 결과는 아닌 것으로 생각했고, 이에 따라 저자들은 450 mL 용으로 제작된 혈소판백이 전체의 약 3/4 정도 밖에 채워지지 않으면서 혈액백의 구겨진 부분 사이에 제대로 분리되지 않고 육안적으로 남아있는 적혈구가 혈색소 감지기의 임계치보다 낮은 수준으로 혈소판백에 같이 섞여서 분리되었기 때문으로 가정하였다. 그래서 최종 2개의 혼합혈소판 제조시에는 백혈구연층 혼합시 사용하는 린스용 혈장의 부피를 늘여서 혈소판백을 가득 채운 후 혈소판의 원심분리를 시행했는데, 그 결과 잔존 적혈구 수는 $21.5 \sim 27.4 \times 10^9$ /단위로 감소했지만, 2개의 결과값만으로 통계학적 유의성 여부를 판단하기는 어려웠다. 농축적혈구와 마찬가지로 혼합혈소

판 역시 백혈구여과제거 후 잔존 백혈구는 모두 0.5×10^6 /단위 미만으로 뛰어난 여과 효율을 증명하였다. 동결혈장 제제의 부피는 실제 대한적십자사 신선동결혈장 200 단위의 품질관리 결과보다 약 70 mL 정도 더 많았는데, 이것은 기존의 450 mL 전혈을 대상으로 한 연구에서의 동결혈장의 부피를 400 mL로 변환하여 계산했을 때의 값과 유사한 결과였다.^{11,13)}

제조 35일의 동결혈장 제제에서 0.7 IU/mL 이상의 VIII응고인자의 활성도를 갖는 비율은 28.6% (10/35)로 대한적십자사의 채혈 8시간 내에 분리 제조한 신선동결혈장의 기준인 75%에는 훨씬 미치지 못하였고, 제조 당일의 활성도에 비해 통계적으로 유의하게 낮았다. 이것은 검사를 위해 여러 개의 검체를 분주하고 실제로 검사를 시행하기까지 상온에 노출되는 시간이 늘어났기 때문으로 판단된다. 또한 실제 혈액원에서와 같이 분리 제조가 끝남과 동시에 급속 냉동을 시키지 못하고 -35°C 혈액 냉동고에 보관함으로 인해 급속 냉동에 의한 응고인자의 활성도 보존 효과를 보지 못한 점, 그리고 제조 당일의 검체는 혈장제제를 냉동하지 않고 바로 검사하므로 해동 과정이 없는 반면, 제조 35일의 동결혈장은 이 혈액 가운기를 이용하여 15분간 해동 후 응고인자 활성도를 측정하기 때문에 이 과정에서의 활성도 저하 역시 이러한 결과가 나타난 원인으로 생각된다.

하지만 0.52 IU/mL 이상의 활성도를 나타내는 제제의 비율은 88.6% (31/35)로 75% 이상의 혈액에서 0.52 IU/mL 이상의 활성도를 보여야 하는 캐나다 CBS의 VIII 응고인자의 활성도 기준을 상회하였다. 신선동결혈장과 24시간 동결혈장의 VIII응고인자와 V응고인자의 활성도에 관해서는 이미 많은 연구가 되어 있고,^{16,17)} 본 연구에서의 결과값과 유사하였다. 24시간 동결혈장은 신선동결혈장과 비교할 때 VIII응고인자의 활성도가 낮

다고 알려져 있지만, 이미 백혈구연층법을 이용하는 국가에서는 냉동혈장 제제를 혈장 수혈에 사용하고 있고, 우리나라와 같은 신선동결혈장을 사용하고 있는 미국 내에서도 24시간 동결혈장을 임상적으로 사용할 수 있는가 대해서는 논의가 진행 중이다.¹⁸⁾ 신선동결혈장 제제의 임상적 적응증은 혈우병과 같은 단독적인 응고인자 결핍 질환이 아닌, 항응고제 사용과 연관된 출혈 상황 또는 침습적인 시술 전의 출혈 방지, 파중성혈관 내응고질환(disseminated intravascular coagulation disorder) 의심 시, 대량수혈이 필요할 경우 그리고 간 이식술 시 수술 중 지혈장애 등의 상황이다. 즉 다양한 응고인자의 보충이 필요할 경우에만 신선동결혈장이 유용하므로, 이런 일반적인 목적 하에서는 II, V, VII, X응고인자와 섬유소원 등의 다른 응고인자가 충분한 상태이고 VIII응고인자의 활성도가 0.3~0.4 IU/mL 이상이면 정상적인 지혈 작용을 보조하는데 임상적으로는 큰 영향을 미치지 않기 때문에, 동결혈장 제제가 신선동결혈장을 대체하여 사용할 수 있다는 주장이 최근 제기되고 있다.¹⁹⁾

본 연구의 가장 큰 한계점은 우선 전혈 분리를 위해 사용한 혈액백이 국내에서는 사용하지 않는 450 mL 용이었다는 점이다. 450 mL 혈액백에 400 mL 만큼의 전혈이 포함되어 상대적으로 혈액백 안의 여유공간이 많아지게 되고, 이로 인해서 혈액백을 일정한 압력으로 누르는 원리로 작동하는 자동화 혈액제제 분리기기가 이미 프로그램되어 있는대로 혈액을 분리할 경우, 감소한 혈액을 정확하게 분리할 수 없다. 농축적혈구의 회수율 감소, 혼합혈소판의 적혈구 오염 등의 결과도 상대적으로 큰 혈액백의 사용에서 기인했음을 예상할 수 있다.

결론

본 연구는 국내에서는 백혈구연층법을 이용한 첫 시도인 점은 있으나, 추가적인 백혈구연층법 관련 연구에서는 혈액백과 혈액량의 통일, 자동화 장비의 정확한 프로그램 세팅과 더불어서 좀 더 많은 수의 혈액을 분석하여 추가적인 혈소판 활성화 표지자 검사 등의 항목들이 시행되어야 할 것이다. 그리고 본 연구가 백혈구연층법의 국내 도입을 위한 기초 자료의 역할을 하여, 앞으로는 일반적인 혈액제조 공정으로서의 적용 가능성 및 새로운 기술 도입 시 요구되는 비용과 그로 인해 얻을 수 있는 효율 측면에서의 분석이 필요하다.

요약

배경: 백혈구연층법은 전혈 분리제조 방법 가운데 하나로 유럽과 캐나다를 포함한 여러 국가에서 널리 사용되고 있다. 저자들은 국내에서는 처음으로 백혈구연층법으로 성분제제 제조하고, 그 품질을 평가하였다.

방법: 총 35명의 기증자로부터 400 mL의 전혈을 top and bottom 방식의 사중백에 채혈하고, Fenwal사와 Fresenius사의 자동화 기기를 이용하여 백혈구연층법으로 농축적혈구, 혼합혈소판 및 동결혈장 제제를 분리 제조하였다. 농축적혈구는 제조 당일, 15, 35일에, 혼합혈소판은 제조 당일, 3, 5일에, 그리고 동결혈장은 제조 당일과 35일에 각 품질관리 항목을 검사하였고, 그 결과를 대한적십자사 품질관리 기준과 비교하였다.

결과: 농축적혈구 제제의 부피 및 혈색소는 대한적십자사 품질관리 기준보다 낮았다. 혼합혈소판 제제의 수획량은 중앙값이 3.70×10^{11} /단위로 성분채집혈소판의 품질관리 기준보다 높았다. 동

결혈장 제제의 부피는 대한적십자사의 신선동결 혈장 부피 기준과 품질관리 결과보다 컸지만, 제조 35일에 VIII응고인자의 활성도가 0.66 ± 0.14 IU/mL로 낮았다.

결론: 백혈구연층법을 이용해서 분리 제조한 혼합혈소판과 동결혈장 제제의 수확량은 기존의 혈액제제의 기준보다 높았다. 그러나 국내에 백혈구연층법을 혈액 분리제조 공정에 도입하기 위해서는 비용-효율적 측면에서의 추가적인 연구와 논의가 더 필요하다.

참고문헌

1. Triulzi DJ, Kleinman S, Kakaiya RM, Busch MP, Norris PJ, Steele WR, et al. The effect of previous pregnancy and transfusion on HLA alloimmunization in blood donors: implications for a transfusion-related acute lung injury risk reduction strategy. *Transfusion* 2009; 49:1825-35
2. Metcalfe P, Williamson LM, Reutelingsperger CP, Swann I, Ouwehand WH, Goodall AH. Activation during preparation of therapeutic platelets affects deterioration during storage: a comparative flow cytometric study of different production methods. *Br J Haematol* 1997;98: 86-95
3. Pietersz RN, Loos JA, Reesink HW. Platelet concentrates stored in plasma for 72 hours at 22 degrees C prepared from buffycoats of citrate-phosphate-dextrose blood collected in a quadruple-bag saline-adenine-glucose-mannitol system. *Vox Sang* 1985;49:81-5
4. Pietersz RN, Reesink HW, Dekker WJ, Fijen FJ. Preparation of leukocyte-poor platelet concentrates from buffy coats. I. Special inserts for centrifuge cups. *Vox Sang* 1987;53:203-7
5. Pietersz RN, Reesink HW, Dekker WJ. Preparation of leukocyte-poor platelet concentrates from buffy coats. II. Lack of effect on storage of different plastics. *Vox Sang* 1987; 53:208-13
6. Pietersz RN, de Korte D, Reesink HW, van den Ende A, Dekker WJ, Roos D. Preparation of leukocyte-poor platelet concentrates from buffy coats. III. Effect of leukocyte contamination on storage conditions. *Vox Sang* 1988;55:14-20
7. Guidelines for manufacture and quality control of blood components. 3rd ed. Seoul: Blood Services Headquarters, Korean Red Cross, 2009: appendix 1, 2-4
8. Levin E, Culibrk B, Gyöngyösy-Issa MI, Weiss S, Scammell K, LeFresne W, et al. Implementation of buffy coat platelet component production: comparison to platelet-rich plasma platelet production. *Transfusion* 2008; 48:2331-7
9. Janetzko K, Klüter H, van Waeg G, Eichler H. Fully automated processing of buffy-coat-derived pooled platelet concentrates. *Transfusion* 2004;44:1052-8
10. Sheffield WP, Bhakta V, Jenkins C, Devine DV. Conversion to the buffy coat method and quality of frozen plasma derived from whole blood donations in Canada. *Transfusion* 2010; 50:1043-9
11. van der Meer P, Pietersz R, Hinloopen B, Dekker W, Reesink H. Automated separation of whole blood in top and bottom bags into components using the Compomat G4. *Vox Sang* 1999;76:90-9
12. Gulliksson H, van der Meer PF. Storage of whole blood overnight in different blood bags preceding preparation of blood components: in vitro effects on red blood cells. *Blood Transfus* 2009;7:210-5
13. Hurtado C, Bonanad S, Soler M, Mirabet V,

- Blasco I, Planelles M, et al. Quality analysis of blood components obtained by automated buffy-coat layer removal with a top & bottom system (Optipress (R)II). *Haematologica* 2000; 85:390-5
14. Pasqualetti D, Ghirardini A, Cristina Arista M, Vaglio S, Fakeri A, Waldman AA, et al. Blood component fractionation: manual versus automatic procedures. *Transfus Apher Sci* 2004;30: 23-8
15. Schrezenmeier H, Seifried E. Buffy-coat-derived pooled platelet concentrates and apheresis platelet concentrates: which product type should be preferred? *Vox Sang* 2010;99:1-15
16. O'Neill EM, Rowley J, Hansson-Wicher M, McCarter S, Ragno G, Valeri CR. Effect of 24-hour whole-blood storage on plasma clotting factors. *Transfusion* 1999;39:488-91
17. Serrano K, Scammell K, Weiss S, Culibrk B, Levin E, Gyöngyössi-Issa M, et al. Plasma and cryoprecipitate manufactured from whole blood held overnight at room temperature meet quality standards. *Transfusion* 2010;50:344-53
18. Katz LM, Kiss JE. Plasma for transfusion in the era of transfusion-related acute lung injury mitigation. *Transfusion* 2008;48:393-7
19. Downes KA, Wilson E, Yomtovian R, Sarode R. Serial measurement of clotting factors in thawed plasma stored for 5 days. *Transfusion* 2001;41:570