

## ABO 혈액형 및 D 혈액형 판정용 시약의 품질관리용 동결 적혈구 표준품 확립

송성욱<sup>1</sup> · 최종현<sup>1</sup> · 김신영<sup>1</sup> · 김현옥<sup>1</sup> · 민혜경<sup>2</sup> · 김재옥<sup>2</sup> · 신 원<sup>2</sup>

연세대학교 의과대학 진단검사의학교실<sup>1</sup>, 식품의약품안전청 생물진단의약품과<sup>2</sup>

= Abstract =

### Development of Cryopreserved Red Blood Cell Panels for Verifying ABO and D Blood Grouping Reagents

Sungwook Song<sup>1</sup>, Jonghyeon Choi<sup>1</sup>, Sinyoung Kim<sup>1</sup>, Hyun Ok Kim<sup>1</sup>,  
Hyekyoung Min<sup>2</sup>, Jaeok Kim<sup>2</sup>, Won Shin<sup>2</sup>

Department of Laboratory Medicine, Yonsei University College of Medicine<sup>1</sup>,  
Biological In Vitro Diagnostics Division Team, Korea Food and Drug Administration<sup>2</sup>, Seoul, Korea

**Background:** ABO blood grouping reagent verification is essential to ascertain safe blood transfusions. However, the research use of donated blood products has been hampered in Korea by the blood transfusion law and management policies. In this study, we developed cryopreserved red blood cell (RBC) panels utilizing the high glycerol method to verify the ABO and D blood grouping reagents. In addition, we evaluated the stability of ABO and D antigenicity.

**Methods:** Fresh blood was frozen by the high glycerol method, aliquoted and cryopreserved in 2 mL cryotubes. Twenty-four vials of bloods with types A (n=5), B (n=5), AB (n=4) and O (n=10) for ABO RBC panels, and eleven vials of blood types D positive (n=5), D negative (n=5) and D weak (n=1) for D RBC panels were established. Potency, avidity and specificity tests were carried out with four different commercial ABO and D blood grouping reagents.

**Results:** The potency of cryopreserved RBCs after thawing showed no statistical difference compared with pre-freezing RBCs. Avidity time measurements were 5 seconds in ABO blood and 20 seconds in D positive blood. Specificity test uniformly showed 100% specificity. When thawed RBCs were stored at 4°C for 7 days, the potency test measured at intervals of 2 days showed no variation.

**Conclusion:** Cryopreserved RBC panels produced by the high glycerol method showed excellent results in stability test with reagents produced by manufacturers in Korea. Therefore, these panels can be utilized as a reliable method of verifying blood grouping reagents. (**Korean J Blood Transfus 2009;20:46-54**)

**Key words:** Blood grouping reagent, High glycerol method, Cryopreserved red blood cell

접수일 : 2009년 4월 3일, 승인일 : 2009년 4월 20일

책임저자 : 김 현 옥 120-752 서울시 서대문구 신촌동 134 연세대학교 의과대학 진단검사의학교실

TEL: 02) 2228-2444, FAX: 02) 313-0956, E-mail: hyunok1019@yuhs.ac

본 연구는 식품의약품안전청 학술연구용역사업(07102국제협735)의 지원에 의해 이루어졌음.

## 서론

안전한 수혈을 위하여 정확한 혈액형 검사는 필수적이다. 따라서 이에 사용되는 혈액형 판정용 시약의 품질관리는 매우 중요하다. 대부분의 국가에서는 그 나라에서 생산되거나 수입하여 시판되고 있는 항-A, 항-B 및 항-D 시약에 대한 허가 기준을 갖고 있다. 유럽연합의 혈액형 판정용 시약 기준은 In vitro Diagnostic Medical Device Directive의 Annex II, List A로 분류되어 Common Technical Specifications for in vitro diagnostic medical devices (2002/364/EC)의 규정에 따라서 통합적으로 관리된다.<sup>1,2)</sup> 미국에서 혈액형 판정용 시약은 CFR Title 21, Subchapter F Biologics, Part 660 Additional standards for diagnostic substances for laboratory test에 규정되어 있다.<sup>3)</sup> 국내에서 사용 중인 혈액형 판정용 시약은 약사법 제44조 규정에 의한 생물학적 제제기준 및 시험방법 고시(고시번호 제2006-57호)에 따라 제조 및 시험평가되고 있다. 즉 ABO 및 D 항혈청을 수입 또는 제조하는 경우 위의 기준에 의해 특이성 시험, 응집력 시험, 응집소 역가 시험을 시행하고 식약청에 “국가검정의약품 자가시험성적서”를 제출하여 품목 허가를 획득한 후 판매할 수 있다. 그러나 국내에서는 혈액관리법 관련 규정에 따라 매혈이 가능하지 않고, 헌혈 받은 혈액은 수혈 이외의 목적으로는 출고될 수 없으며, 의료기관의 검사 후 잔여 검체 역시 해당 기관윤리심의위원회의 승인을 받아야 하므로 현실적으로 생물학적 제제기준 및 시험방법 고시에 따른 혈액형 판정용 시약의 시험평가를 위한 검사용 혈액을 구하기 쉽지 않다. 또한 A<sub>2</sub>나 A<sub>2</sub>B와 같은 희귀 혈액형의 경우에는 더욱 구하기 어려운 실정이다.

글리세롤을 이용한 적혈구의 동결 보관은 1950년 Smith<sup>4)</sup>에 의해 최초로 시도되었으며, 현재 글

리세롤을 이용하는 방법에는 40% 고농도 글리세롤법과 20% 저농도 글리세롤법의 두 가지 방법이 있다. 2003년 Lelkens 등<sup>5)</sup>은 고농도 글리세롤법이 저농도 글리세롤법에 비해 해동 후 저온 저장하는 동안 용혈이 더 적었다고 보고하였다. 액체질소를 이용한 적혈구의 동결 보관은 1960년 Huntsman 등<sup>6)</sup>에 의하여 시도되었다. 이러한 방법으로 적혈구를 동결 보관할 경우 10년 이상 장기 보관이 가능하다는 보고<sup>7,8)</sup>들이 있으며, 특히 동결 적혈구를 해동한 후 additive solution (AS), citrate phosphate dextrose adenine (CPDA) 등에 보관할 경우 15일에서 21일까지도 보관상태가 양호하였다는 보고들이 있다.<sup>8,9)</sup> 그러나 이러한 방법은 수혈에 사용하기 위한 적혈구의 동결 및 해동 방법이며, 혈액형 판정용 시약의 품질관리를 위한 적혈구 표준품 제조 방법에 대한 연구는 거의 없었다. 따라서, 본 연구에서는 고농도 글리세롤법을 이용하여 혈액형 판정용 시약의 품질관리용 동결 ABO 및 D 적혈구 표준품을 제작하였다. 또한 표준품의 품질평가는 국내에서 시판 중인 혈액형 판정용 시약을 사용하여 동결 전후 적혈구의 ABO 및 D 항원성의 변화를 평가하여 적혈구의 장기보관에 따른 적혈구 항원성의 변화를 측정함으로써 ABO 및 D 혈액형 판정용 동결 적혈구 표준품으로서의 사용 가능성 여부를 판정하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 동결 적혈구 표준품 제조

세브란스병원 혈액원에서 본 연구에 자발적인 참여 동의를 받은 헌혈자로부터 CPDA-1 항응고 보존제가 56 mL 포함된 헌혈백에 400 mL 전혈을 채혈하고 이를 원심 분리하여 농축적혈구를 제조

하였다. 적혈구의 동결은 최 등<sup>10)</sup>의 방법을 참고하여 다음과 같은 방법으로 시행하였다. 채혈 후 7일 이내의 냉장 보관된 농축적혈구를 37°C 수조에 30분간 가온한 후 무균연결장치를 이용하여 1,000 mL 백과 연결하고 혈액을 옮겼다. 120 rpm에 회전속도를 맞춘 수평 혼합기에 혈액백을 올려놓은 후 수혈셋트를 이용하여 Glycerolyte 57 solution (Baxter Healthcare Corp., Deerfield, IL, USA) 50 mL를 4분간 주입한 후 혼합기를 5분간 정지시킨 상태로 방치하였다. 동일한 방법으로 50 mL를 추가로 주입하고 5분간 방치 후 다시 동일한 방법으로 Glycerolyte 57 solution 250 mL를 20분 동안 주입하였다. 22°C에서 2,200 rpm으로 10분간 원심분리한 후 상층액을 40 mL정도 남기고 농축적혈구가 담겨있던 빈 bag으로 상층의 glycerol을 옮긴 후 봉합하여 백을 분리하였다. 내용물을 잘 혼합한 후 수혈세트와 연결하여 미리 준비한 2 mL cryotube (Axygen Scientific Inc., Union City, CA, USA)에 적혈구 농축액과 글리세롤의 혼합액을 1.5 mL씩 분주한 후 각 혈액형별로 150 vial씩 제조하여 -70°C 냉동고에 보관하였다. 동결 ABO 적혈구 표준품 판넬은 A형 및 B형 각각 5개, AB형 4개, 그리고 혈액형 판정시약의 특이성 판정을 위해 O형 10개를 포함하여 24개로 구성하였으며, 동결 D 적혈구 표준품 판넬은 D 양성 혈액 5개와 D 음성 혈액 5개 그리고 D 약양성 1개를 포함하여 11개로 구성하였다.

## 2. 동결 적혈구 표준품의 해동 및 탈글리세롤 방법

적혈구의 해동은 뉴욕혈액센터의 적혈구 해동 방법에 대한 표준 지침서<sup>11)</sup>를 참조하여 시행하였으며, 방법은 다음과 같다. 보관되어 있던 vial을 꺼내 37°C 수조에서 흔들며 주면서 빠르게 해동하였다. 혼합액을 13×100 mm의 테스트 튜브(녹

십자)에 옮기고 동량의 9.0% NaCl 용액을 천천히 흔들어 주면서 혼합한 후 실온에서 최소 1분간 정치하였다. 추가로 2.5% NaCl 용액으로 튜브를 가득 채운 후, 잘 혼합한 뒤 3,400 rpm에서 15초간 원심분리를 하였다. 용혈된 상층액은 버리고, 2.5% NaCl 용액으로 한 번 더 세척한 뒤, 0.9% NaCl 용액으로 상층액이 깨끗해질 때까지 세척하였다. 해동한 적혈구는 Alserver's solution (Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, MO, USA)에 2% 적혈구 부유액을 만들어 4°C에 냉장 보관하면서 항원성의 변화를 측정하였다.

## 3. 해동 적혈구 표준품의 품질평가와 장기 보관 후의 안정성 평가

동결 전후의 적혈구 ABO 및 D 항원의 안정성을 평가하기 위해 모든 적혈구에 대하여 동결 전과 동결 6개월 후의 응집력, 특이성 및 응집소 역가를 측정하였다. 또한 해동 후 냉장보관에 따른 적혈구 항원의 안정성을 평가하기 위하여 A형, B형, AB형, D 양성 적혈구를 대상으로 동결 전 7일 동안 2일 간격으로 응집소 역가를 측정하였고, 6개월 후 해동하여 7일간 냉장보관 하면서 2일 간격으로 응집소 역가를 측정하였다. D 약양성 혈액은 동결 전, 동결 6개월 후의 응집력, 특이성 검사 및 항글로블린 검사를 시행하였다. 검사에 사용된 혈액형 판정용 시약은 Novaclone (Dominion Biologicals, Dartmouth, Canada), Bioclone (Ortho-Clinical Diagnostics, Raritan, NJ, USA), Monotype (Medion Diagnostics, Düringen, Switzerland), Bioscot (Millipore, Livingston, UK)의 4개 회사 제품을 사용하였다.

## 결 과

### 1. 동결 전 및 해동 후 적혈구의 ABO 및 D 항원성 변화 평가

#### 1) 응집소 역가 평가

A형 동결적혈구(n=5)와 AB형 동결적혈구(n=4)를 사용하여 동결 전과 동결 6개월 후의 항-A 응집소 역가를 평가하였다(Table 1). 동일 방법으로 B형 동결적혈구(n=5)와 AB형 동결적혈구(n=4)를 사용하여 항-B 응집소 역가를 평가하였으며(Table 2), D 양성 동결적혈구(n=5) 사용하여 항-D 응집소 역가를 비교 평가하였다(Table 3). 각 항-A, 항-B 및 항-D의 동결 전후 응집소 역가에는 통계적인 차이가 없어 동결적혈구의 항원성이 안

정적으로 유지됨을 확인하였다.

#### 2) 응집력 평가

4개 회사의 항-A, 항-B 혈액형 판정용 시약을 사용하여 응집력을 시험하였으며, A형, B형 및 AB형 적혈구는 모두 5초 내외의 빠른 응집을 보이며 동결 전후 통계학적 차이를 보이지 않았다. D 양성 적혈구는 혈액을 동결시키기 전에 응집력 검사를 시행하지 않아 동결 전후의 차이를 알 수 없지만 해동시킨 적혈구로 시행한 응집력 검사에서 모든 시약에 대해 약 20초 내외의 빠른 응집을 보여 D 항원의 안정성을 확인할 수 있었다(Table 4).

#### 3) 특이성 평가

항-A 시약에 B형과 O형의 혈구가, 항-B 시약에는 A형과 O형의 혈구가, 항-D 시약에는 D 음성

**Table 1.** Titers of anti-A reagents with 2% saline suspended fresh and post-thawing red cells

Manufacturers	Pre-freezing (N=9)		Post-thawing (N=9)		P-value*
	Median	(Range)	Median	(Range)	
A	1,024	(512~2,048)	1,024	(1,024~2,048)	1.0
B	1,024	(512~1,024)	1,024	(512~1,024)	0.5
C	512	(512~1,024)	1,024	(512~1,024)	0.75
D	1,024	(1,024~2,048)	1,024	(1,024~2,048)	0.5

\*P-value of more than 0.05 was not considered as statistically significant difference by Wilcoxon signed rank test.

**Table 2.** Titers of anti-B reagents with 2% saline suspended fresh and post-thawing red cells

Manufacturers	Pre-freezing (N=9)		Post-thawing (N=9)		P-value*
	Median	(Range)	Median	(Range)	
A	2,048	(1,024~2,048)	2,048	(1,024~2,048)	1.0
B	512	(512~1,024)	512	(512~1,024)	1.0
C	1,024	(512~1,024)	1,024	(512~1,024)	0.5
D	2,048	(1,024~4,096)	2,048	(1,024~2,048)	0.5

\*See Table 1.

**Table 3.** Titers of anti-D reagents with 2% saline suspended fresh and post-thawing red cells

Manufacturers	Pre-freezing (N=5)		Post-thawing (N=5)		P-value*
	Median	(Range)	Median	(Range)	
A	256	(128~256)	256	(128)	0.5
B	128	(64~256)	128	(64~256)	0.5
C	128	(128)	128	(128~256)	1.0
D	64	(128)	128	(128)	0.06

\*See Table 1.

**Table 4.** Avidity time of thawing RBCs by the slide test

Reagent	Thawing RBCs	Manufacturers			
		A	B	C	D
Anti-A	A (N=5)	4.6±2.6	3.2±1.8	6.5±3.2	5.6±1.5
	AB (N=4)	5.5±1.7	2.8±1.2	7.3±2.1	5.6±1.4
Anti-B	B (N=5)	6.9±2.8	3.1±1.1	5.3±1.4	5.5±1.5
	AB (N=4)	7.9±2.8	3.2±2.0	6.3±1.6	6.1±1.3
Anti-D	D positive (N=5)	8.0	5.8±4.8	9.6±3.5	23.6±2.4

Avidity time (seconds) was expressed as a mean±standard deviation value.

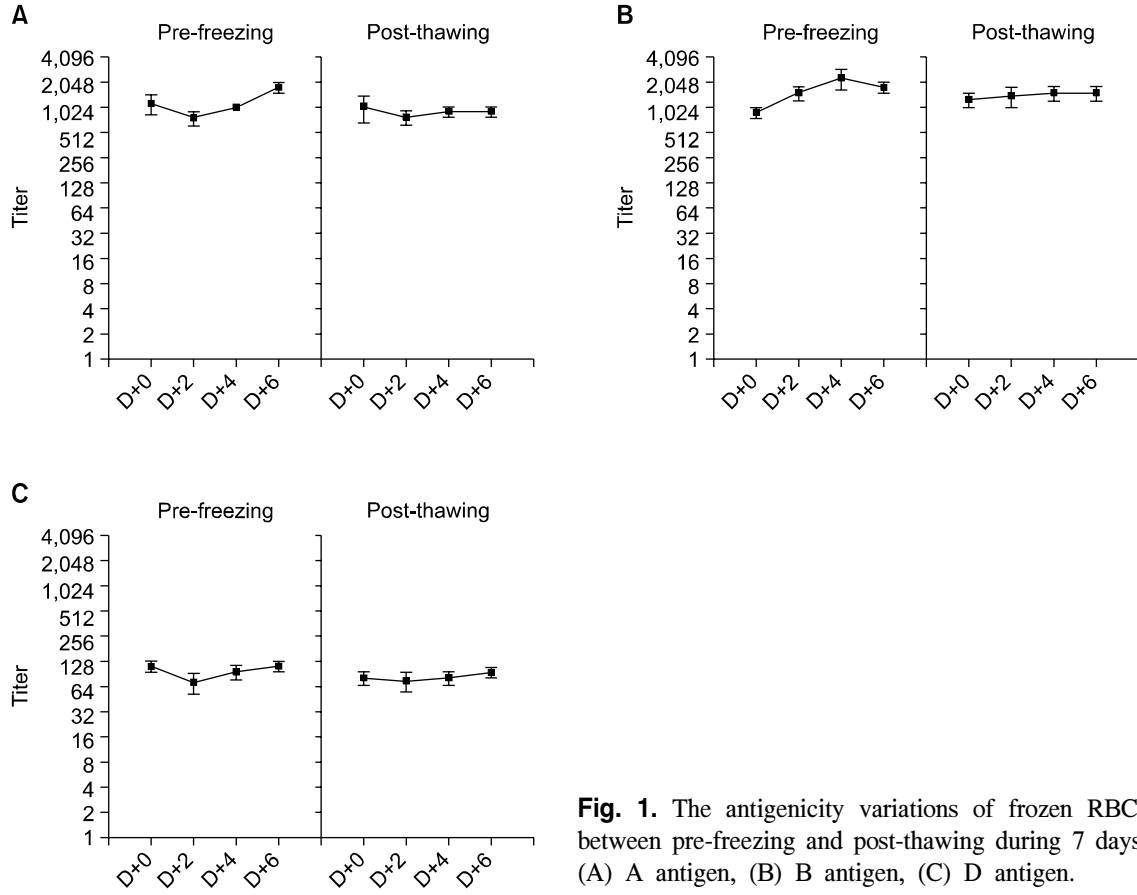
의 혈구가 반응하지 않아 모든 혈액형 판정용 시약에 대해 특이성 100%의 우수한 결과를 얻었다. D 약양성 적혈구는 동결 전후 모든 항-D 시약에 음성이었으나 항글로불린 단계에서 3회사의 제품은 양성을, 한 회사만은 음성 결과를 보였다.

## 2. 해동 적혈구의 냉장 보관 후의 안정성 평가

해동 후 냉장 보관에 따른 항원의 안정성을 평가하기 위하여 해동 후 일주일간 냉장 보관하면서 2일 간격으로 응집소 역가를 측정하였으며, A 항원, B 항원 및 D 항원 모두에서 동결 전후에 각각 7일간 냉장 보관하는 동안 차이를 보이지 않고 거의 일정하게 유지되었다(Fig. 1).

## 고 찰

혈액 공급을 쉽고 안전하게 하기 위해서는 적혈구를 장기간 보존하는 것이 중요하다.<sup>12)</sup> 현재 수혈용으로 제조되어 공급되는 적혈구의 항응고제는 CPDA-1이며, 이 경우 유효기간은 35일이다. 그러나 첨가액을 사용하면 1~6°C에서 42일까지도 보관이 가능하다.<sup>13)</sup> 그 이상의 기간을 보관하기 위해서는 혈액을 동결해야 하며, 이미 국내<sup>14-19)</sup> 및 국외<sup>5-9)</sup>에서 액체 질소나 hydroxyl ethyl starch (HES), dimethyl sulfoxide (DMSO), glycerol 등을 이용하여 동결적혈구를 제조한 뒤, 이를 해동하여 적혈구 회수율, 적혈구 생존율 등에 대한 많은 평가를 시행한 바 있다. 특히 국내 연구에서는 대



**Fig. 1.** The antigenicity variations of frozen RBCs between pre-freezing and post-thawing during 7 days. (A) A antigen, (B) B antigen, (C) D antigen.

부분 고농도 글리세롤법을 이용하였고,<sup>14-19)</sup> 예외로 동결보호제로 HES를 사용한 연구도 있었다.<sup>18)</sup> 그러나 이 연구들은 주로 동결적혈구를 제조하여 전쟁시 혈액 공급 위한 대책, 수혈을 통한 감염 및 후천성 면역 결핍증 예방, 희귀혈액형 보존 및 재고 확보, 자가 수혈 등에 사용하려는 데 목적을 두고 있었다. 최근에는 항체 동정용 희귀 적혈구의 동결 보존에 고농도 글리세롤법과 액체질소법을 6개월간 비교하였을 때, 고농도 글리세롤법이 응집강도의 변화가 거의 없어 동결 적혈구 보존에 더 우수하였다는 보고도 있다.<sup>19)</sup> 본 연구에서

는 국내 혈액형 판정용 시약을 공급하는데 있어서 국내 혈액관리법상 시약 회사에서 품질 관리를 위한 표준 적혈구를 확보하는데 어려움이 있음을 알고, 적혈구를 안정적으로 공급하기 위한 방법으로 동결적혈구를 제조하는 방법을 확립하고자 하였다.

고농도 글리세롤법을 이용하여 제조한 동결 적혈구 표준품은 현재 국내 시판 중인 4종의 혈액형 판정용 시약을 사용하여 동결 전후의 ABO 및 D 항원성의 변화를 평가하였다. 적혈구 표준품은 동결 전후의 항원성이 거의 변화 없이 유지되고

있었으며, 해동 후 7일간 시행한 항원성 변화 평가 시험에서도 응집소 역가의 감소가 관찰되지 않았다. 이러한 실험 결과로 혈액형 판정용 시약의 품질 관리를 위한 적혈구 표준품 제조 기술을 확보할 수 있었다. 그러나 본 연구에서는 연구기간의 한계로 10년 이상의 장기간 보관에 따르는 항원성 변화를 평가하지 못했다. 이를 위해 추가적인 실험이 필요할 수도 있겠다. 그러나 고농도 글리세롤법을 이용한 동결 적혈구 제조에 관한 관련 연구들 중에, 21년간 보관하였을 때 적혈구 상태가 수혈에 적합할 정도로 안정적이었다는 보고가 있으며,<sup>7)</sup> 특히 37년간 보관하였을 때에도 적혈구의 상태가 양호하였다는 보고도 있다.<sup>20)</sup> 그러므로 본 연구에서 확보한 기술로 제조한 혈액형 판정용 시약의 품질관리용 적혈구의 장기간 보관에 따르는 안정성도 문제가 없을 것이라고 판단되었다. 본 연구는 수혈이 목적이 아닌, 혈액형 판정용 시약의 품질관리용 적혈구를 제조하는 것이 목적이므로 적혈구 회수율에 대한 평가는 하지 않았다.

본 연구에서 확립한 동결 적혈구 제조법을 사용하면 장기간 ABO 및 D 항원성이 유지되는 안정한 적혈구 표준품을 제조할 수 있을 것으로 생각되며 이렇게 만들어진 적혈구 표준품은 혈액형 판정용 시약의 품질 관리를 위한 표준품으로써 국내 실정에 맞게 안정적으로 사용될 수 있을 것이다. 또한 국내 혈액형 판정용 시약의 품질 관리에 대한 신뢰성의 향상은 물론이고, 시약의 질 향상 및 국산 시약의 개발 등에 이용될 수 있을 것이다.

### 요 약

**배경:** 안전한 수혈을 위하여 정확한 혈액형 검사가 필수적이며, 따라서 혈액형 판정용 시약의

품질관리는 매우 중요하다. 그러나 품질관리를 위한 혈액 공급이 국내 혈액관리법 관련 규정에 의해 어려운 실정이다. 따라서 본 연구에서는 고농도 글리세롤법을 이용하여 혈액형 판정용 시약의 품질관리용 적혈구 표준품을 제조하고, ABO 및 D 항원의 동결 전후 안정성을 평가하고자 하였다.

**방법:** 신선한 농축적혈구 A형 5개, B형 5개, AB형 4개, O형 10개 그리고 D 양성 5개, D 음성 5개, D 약양성 1개를 고농도 글리세롤법을 이용하여 동결 적혈구 표준품을 제조하였고 2 mL cryotube에 각각 배분하여 보관하였다. 각 항원의 안정성 평가를 위해 국내 시판중인 혈액형 판정용 시약 4종을 이용하여 응집소 역가, 응집력 및 특이성 변화를 측정하였다.

**결과:** 동결 적혈구의 응집소 역가 평가 결과 동결 전후 통계적인 차이가 없었으며, 응집력 검사의 결과에서도 동결 전후에 항 ABO 혈액은 5초 내외, D 양성 혈액은 20초 내외로 항원성이 잘 유지됨을 알 수 있었다. 또한 특이성 평가 시험에서도 모두 100%의 우수한 결과를 얻었다. 특히 해동 후 7일간 냉장 보관하며 2일 간격으로 측정하는 응집소 역가 평가에서 역가의 감소는 관찰되지 않았다.

**결론:** 고농도 글리세롤법을 이용하여 제조한 동결 적혈구 표준품은 국내 시판중인 모든 혈액형 판정용 시약을 사용한 안정성 평가에서 우수한 결과를 얻었다. 따라서 이렇게 제조된 동결 적혈구 표준품은 혈액형 판정용 시약의 품질 관리를 위해 안정적으로 공급될 수 있을 것으로 평가되었다.

### 참고문헌

1. Directive 98/79/EC of The European Parlia-

- ment and of the Council of 27 October 1988, Official Journal of the European Communities 1988;L331/1-L331/37
2. Commission decision of 7 May 2002 on common technical specifications for in vitro-diagnostic medical devices. Official Journal of the European Communities 2002;L131/17-L131/30
  3. United States Department of Health and Human Services. Code of federal regulations, title 21 part 660: Additional standards for diagnostic substances for laboratory test. <https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfCFR/CFRSearch.cfm?CFRPart=660>. [Online] (last visited 31 March 2009)
  4. Smith AU. Prevention of hemolysis during freezing and thawing of red blood cells. *Lancet* 1950;2:910-1
  5. Lelkens C, Noorman F, Koning JG, Truijens-de Lange R, Stekkinger PS, Bakker JC, et al. Stability after thawing of RBCs frozen with the high- and low-glycerol method. *Transfusion* 2003;43:157-64
  6. Huntsman RG, Hurn BAL, Lehmann H. Storage of red cells for blood-grouping after freezing in liquid nitrogen. *Br Med J* 1960; 2:118
  7. Valeri CR, Pivacek LE, Gray AD, Cassidy GP, Leavy ME, Dennis RC, et al. The safety and therapeutic effectiveness of human red cells stored at -80 degrees C for as long as 21 years. *Transfusion* 1989;29:429-37
  8. Valeri CR, Srey R, Tilahun D, Ragno G. The in vitro quality of red blood cells frozen with 40 percent (wt/vol) glycerol at -80 degrees C for 14 years, deglycerolized with the Haemonetics ACP 215, and stored at 4 degrees C in additive solution-1 or additive solution-3 for up to 3 weeks. *Transfusion* 2004;44:990-5
  9. Bandarenko N, Cancelas J, Snyder EL, Hay SN, Rugg N, Corda T, et al. Successful in vivo recovery and extended storage of additive solution (AS)-5 red blood cells after deglycerolization and resuspension in AS-3 for 15 days with an automated closed system. *Transfusion* 2007;47:680-6
  10. Choi KH, Rhu JH, Park HR, Kim HO. The preparation of frozen red blood cells and a procedure for deglycerolizing frozen RBCs using COBE 2991 blood cell processor. *Korean J Blood Transfus* 2001;12:189-96
  11. Cryopreservation of human red blood cells. Deglycerolization of frozen red blood cells New York Blood Center SOP manual. 2000
  12. Scott KL, Lecak J, Acker JP. Biopreservation of red blood cells: past, present, and future. *Transfus Med Rev* 2005;19:127-42
  13. Roback JD. Technical manual. 16th ed. Bethesda: American Association of Blood Banks, 2008:283-9
  14. Han KS, Kwon SW, Han BY, Kim SI, Oh YC, Choi BR, et al. Preparation and post-transfusion survival of frozen-deglycerolized red blood cells. *Korean J Blood Transfus* 1992; 3:1-7
  15. Han KS, Kang HJ, Han BY, Kim SI, Oh YC, Choi BR, et al. Preparation of frozen-deglycerolized red blood cells (I). *Korean J Blood Transfus* 1991;2:43-9
  16. Han TH, Paik IK. The preparation of frozen red blood cells and deglycerolization of frozen RBCs with Haemonetics V50 plus. *Korean J Blood Transfus* 2002;13:149-55
  17. Song AS, Kim YK, Oh YC, Cho MJ. A comparative study on the ATP and 2,3-DPG levels in stored blood after rejuvenation. *Korean J Hematol* 1987;22:205-9
  18. Han TH, Paik IK. The cryopreservation and thawing of red blood cells using 25% hydroxyethyl starch. *Korean J Lab Med* 2004;24:



- 314-9
19. Seo JW, Han KS. Comparison of cryopreservation methods of rare red blood cells used for antibody identification tests. *Korean J Blood Transfus* 2008;19:120-31
20. Valeri CR, Ragno G, Pivacek LE, Cassidy GP, Srey R, Hansson-Wicher M, et al. An experiment with glycerol-frozen red blood cells stored at -80°C for up to 37 years. *Vox Sang* 2000;79:168-74
-