

국산 초저온 냉동보관 혈액백의 평가

김현옥, 김주원, 김홍련¹

연세대학교 의과대학 진단검사의학과학교실, BK 21 의과학 연구사업단¹

= *Abstract* =

Evaluation of Domestic Cryostorage Blood Bags

Hyun Ok Kim, Juwon Kim, Hong Lian Jin¹

*Department of Laboratory Medicine, Brain Korea 21 Project for Medical Science¹,
Yonsei University College of Medicine, Seoul, Korea*

Background: Recent studies have shown that the optimal temperature at which the cord blood and the peripheral blood stem cells need to be cryopreserved is below -160°C in a nitrogen tank. This study evaluated a domestic cryostorage cord blood processing bag (CBP set) made from poly (ethylene-co-vinylacetate) (EVA) recently produced by the Medi-Rution Company in Korea.

Methods: The domestic cryostorage bags was evaluated using 100 bags from Medi-Rution, which were divided into 3 different groups and compared with 20 bags produced by the Thermogenesis company from the United States as a control. In the first group, the mononuclear cells separated from the human blood sample were divided equally into the cryosolution using DMSO, auto plasma and RPMI media. The blood was preserved in 20 domestic bags and 20 bags produced by the Thermogenesis company. In the second group, the cells were stored in the cryosolution with either auto plasma or fetal bovine serum. In the third group, 20 bags were frozen at -70°C before being stored in the nitrogen tank whereas the other 20 bags were frozen in a controlled refrigerator before being stored in the nitrogen tank at -196°C . The bags containing the peripheral blood cells were stored in the nitrogen tank at vapor phase for a period of one year and evaluated for the rate of breakage during thawing, recovery rates and viability of the cell after thawing.

Results: None of the bags evaluated in this study showed any signs of breakage or leakage of the products. All three groups tested showed similar results regardless of where the bags were made, the composition of the cryosolution or the early freezing conditions.

Conclusion: The CBP set cryostorage bags recently produced by Medi-Rution can be used to preserve blood cells at extremely low temperatures for a one year period without any significant breakage. (**Korean J Blood Transfusion 17(1) : 48~53, 2006**)

Key words: Cryostorage blood bag, Cryosolution, Freezing condition

책임저자 : 김 현 옥 120-752 서울시 서대문구 신촌동 134번지 연세대학교 의과대학 진단검사의학교실
TEL: 02) 2228-2444, FAX) 02) 313-0956, E-mail: hyunok1019@yumc.yonsei.ac.kr

서론

혈액보관을 위한 플라스틱 백의 도입은 성분제 제조 제조에 획기적인 발전을 가져왔다¹⁾. 또한 혈액제제를 쉽게 냉동하였다가 이를 해동하여 사용할 수 있게 됨에 따라 일부 혈액제제를 장기간 보관할 수 있는 길을 제공하게 되었다^{2,3)}.

신선동결혈장은 -30°C에서 보관하고 냉동적혈구는 -65°C에 보관하고 있으며, 냉동 혈액제제에 대한 이동 시 드라이 아이스의 온도는 -78°C 까지 떨어질 수 있다. 최근 연구에 의하면 제대혈 뿐 아니라 골수이식을 위한 조혈모세포를 보관하는 온도는 -160°C 이하의 초저온으로서, 초저온 내구성이 요구되는 특수한 플라스틱 백이 필요하다. 보관 백에 대한 파손의 빈도는 정확히 보고된 바는 없으나 약 10~40%까지 발생하고 있다는 것이 일반적인 견해이며 -180°C의 초저온에서는 보관된 조혈모세포에 대한 백 파손의 경험을 최대 50%까지 보고한 기관도 있다⁴⁾. 특히 장기간 보관 시에는 백 파손율이 더 높게 보고되고 있다. 따라서 이런 초저온 냉동보관 혈액백인 경우에는 di-2-ethylhexylphthalate (DEHP) 또는 tri-2-ethyl-hex-

yl-tri-mellitate (TEHTM)를 가소제로 사용한 제1세대 폴리염화비닐(polyvinyl chloride, PVC)백이 아닌 가소제를 사용하지 않은 polyolefin백이나, poly ethylene-co-vinylacetate (EVA) 또는 fluorinated ethylene propylene (FEP) 등을 재질로 사용하여 Baxter Healthcare (Deerfield, USA), Gambro BCT (Lakewood, USA), Thermogenesis (Rancho Cordova, USA), Terumo Medical (Tokyo, Japan), MarcoPharma (Tourcoing, France) 등에서 초저온 냉동보관 백을 제조 판매하고 있다. 국내에서는 처음으로 메디루션(용인, 한국)이 EVA 재질을 사용하여 제대혈 보관용 초저온 냉동백을 생산하였다. 본 연구는 국내에서 제조된 백의 초저온 내구성을 평가함으로써 제대혈 장기보관의 가능성 여부를 판단하고자 하였다.

대상 및 방법

메디루션사의 Cord Blood Processing (CBP set) 백 100개로 실험을 진행하였으며 실험에 사용한 백의 재질은 Table 1에 타사 제품과 비교하여 요약하였다. 냉동보관방법에 따라 3군으로 나누고 백에 말초혈액 단핵구 세포(mononuclear cell)를

Table 1. Comparison of cryostorage blood bags

	Medi-Rution (CBP-set)	Marco Pharma (Cellflex)	Baxter (Cryocyte)	Thermogenesis
Material				
Bag	EVA	EVA	EVA	EVA
Tubing	EVA	EVA+PVC	EVA+PVC	EVA
Port	EVA	EVA	EVA+PVC	EVA
Bag shape	Forming type	Flat type	Flat type	Forming type
Ports cover type	EVA cover	Twist-off	Cap	EVA cover
Connection in	Closed system	Open system	Open system	Closed system
Connection out	Outlet port	Outlet port	Outlet port	Outlet port
Closure after filling	Tube sealing	Tube sealing	Tube sealing	Tube sealing

EVA: poly ethylene-co-vinylacetate, PVC: polyvinyl chloride

Table 2. Comparisons of cell recovery count and viability according to the bag, cryosolution and freezing method

	Group I (bag)		Group II (cryosolution)		Group III (freezing method)	
	Thermogenesis	MediRution	Autoplasma	Fetal bovine serum	Controlled refrigerator	Deep freezer
Recovered cell count ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	9.5 \pm 1.7 ^a	9.8 \pm 1.7 ^b	10.5 \pm 3.1 ^c	10.4 \pm 3.3 ^d	5.9 \pm 3.6 ^e	5.6 \pm 3.3 ^f
Viability (%)	82.1 \pm 9.2 ^g	83.1 \pm 8.5 ^h	77.9 \pm 7.7 ⁱ	73.8 \pm 9.5 ^j	92.8 \pm 5.0 ^k	88.8 \pm 4.8 ^l

a vs. b, c vs. d, e vs. f, g vs. h, i vs. j, k vs. l: $p > 0.05$

넣어 냉동한 후 이를 1년간 질소 탱크에 보관한 후 백의 파손여부와 회수된 세포수 및 생존율을 비교하였다. 실험 방법은 다음과 같이 시행하였다.

1군은 초저온에서의 백의 내구성을 외제백과 비교하는 실험으로 국내에서 제대혈 보관용 초저온 냉동백으로 시판되고 있는 Thermogenesis사에서 생산한 초저온 냉동보관 백 20개와 메디루션에서 생산한 백 20개로 구성하였다. 보관 세포는 헌혈받은 혈액에서 buffy coat를 분리한 후 이를 Ficoll-Hypaque (Pharmacia Biotech, Sweden)로 단핵구세포를 분리하였다. 자가혈장, Dimethyl sulfoxide (DMSO, Sigma Chemical Co., St Louis, USA), RPMI-1640 (Invitrogen, Grand Island, USA) 배지를 2 : 2 : 6의 비율로 만든 냉동보존액에 동량의 세포부유액을 천천히 혼합한 후 Thermogenesis사 백과 메디루션 백에 각각 20 mL씩 나누어 분주한 후, -70°C 냉동고에서 1일간 보관하고 다음날 -196°C 냉동질소탱크 vapor phase에 1년간 보관하였다. 2군은 사용한 냉동보존액에 자가혈장과 우태아혈청(Fetal bovine serum; FBS, Invotrgen, Grand Island, NY)을 비교하기 위한 실험으로 메디루션사 백 20개에는 자가혈장, DMSO, RPMI-1640 배지로 만든 냉동보존액을, 또 다른 메디루션 백 20개에는 우태아혈청과 DMSO, RPMI-

1640 배지를 냉동보존액으로 사용하여 1군과 같은 방법으로 냉동 보존하였다. 3군은 세포의 초기 냉동방법에 따른 비교로서 단핵세포를 분리한 후 여기에 동량의 자가혈장, DMSO, RPMI 배지를 첨가하고 이를 다시 반으로 나누어 20개의 백은 1군과 같은 방법으로 -70°C에서 하룻밤은 보관한 후 -196°C로 옮기고, 다른 20개의 백은 controlled refrigerator (CBS 3000 series, Custom Biogenic System, Township, USA)를 이용하여 단계적으로 냉동한 후 이를 -196°C에 보관하였다. 1군, 2군, 3군 방법으로 냉동된 백은 모두 액체질소 탱크내의 vapor phase에서 보관하였으며 1년 뒤 해동하여 백의 파손여부와 회수된 세포수 및 해동된 세포의 생존율(viability)을 측정하였다. 해동 후 세포수는 자동혈구측정기(Gen-S2, Beckman Coulter, Fullerton, USA)를 이용하여 측정하였으며 세포 생존율은 methylene blue 염색 후 일정구간에 염색된 세포를 chamber counter를 이용하여 세포수를 세어서 희석배수를 곱하고 계수한 구간의 chamber의 용량으로 나누어 계산하였다. 통계 분석은 paired *t* test를 시행하였으며, p 값이 0.05 미만인 경우 통계학적으로 유의한 것으로 해석하였다.

결 과

1. -196°C 초저온 냉동 보관에서의 내구성

Thermogenesis사의 백 20개와 메디루션사 백 100개를 1년 후에 해동하여 육안으로 관찰하였을 때 백이 파손되거나 내용물이 누출된 것은 없었다.

2. 1년간 보관된 세포에서의 해동 후 회수된 세포수 및 세포 생존률

외제 백의 성장과 비교한 1군에서는 두 제조사의 백 간에 회수된 세포 수와 세포 생존율의 평균값에서 통계적으로 유의 있는 차이는 관찰되지 않았다($p > 0.05$). 2군의 시험 결과 회수된 세포수와 세포 생존율은 자가혈장을 사용한 경우가 평균값이 더 높았으나 통계적으로 유의한 차이는 없었다($p > 0.05$). 3군 결과도 회수된 세포 수와 세포 생존율 모두 controlled refrigerator를 이용한 경우에서 평균값이 조금 높았으나 이 역시 통계적으로 유의 있는 차이는 보이지 않았다($p > 0.05$) (Table 2).

고 찰

메디루션사의 CBP set는 국내에서 생산된 백으로, 제대혈로부터 분리한 줄기세포를 -196°C의 질소탱크에서 장기간 보관할 수 있도록 poly (ethylene- co-vinyl acetate) (EVA)의 재질로 제조되었다. 본 냉동보관용 백의 특징은 tubing에 열접착 및 고주파 접착이 가능하고, 가소제가 들어가 있지 않으며, 백의 내부에 세포가 균일하게 냉동되어질 수 있도록 3차원적 구조의 백으로 제조되었고 membrane ports는 외부로부터의 오염을 차단할 수 있는 구조로 되어 있다.

일반적으로 혈액 보관백에 대한 제품이 출시되는 경우 중금속(heavy metals), residue on ignition, pH 및 biological reactivity test 등에 대한 검사를 통해 플라스틱 재질의 physicochemical test를 통과해야 하는데⁵⁾ 본 제품은 이런 United States Pharmacopeia (USP) 규격을 통과한 제품이다. 따라서 본 연구는 실제 사용자 측면에서 세포를 이 백에 보관하여 1년간 -160°C 이하의 초저온 질소탱크에 보관한 후 37°C에서 해동 시 백의 손상 및 내용물의 leakage 여부를 관찰하는 내구성 평가 실험으로 진행되었다. 대조군으로 외제 백(Thermogenesis, Rancho Cordova, USA) 20개와 본 연구에 사용된 국산백 100개에 대해 동일한 조건의 단핵구 세포를 보관하였으며, 보관한 후 1년이 지난 시점에서 해동한 결과, 한 건에서도 백의 파손이나 내용물이 누출된 것은 없었다. 이미 polymer EVA는 초저온에서 다른 재질보다도 그 내구성이 뛰어나고 파손율뿐만 아니라 외부의 충격에서 가장 강한 내구성을 보이는 것으로 알려져 있기 때문에⁴⁾ 본 연구결과와는 예상했던 결과와 일치하였다. 그러나 본 연구는 1년간의 보관 후 해동한 결과로서 조혈모세포 및 제대혈 등의 보관 유효기간이 10년 이상 연장되고 있는 시점에서 1년이란 보관기간이 짧은 면이 있으며 10년 이상 초저온이란 환경에 노출될 경우 플라스틱 재제의 내구성을 완전히 보장할 수는 없다⁶⁾. 특히 냉동보존백의 생산기술이 점점 발달하고는 있으나 초저온 보관 시 파손율이 10~40%까지 보고되고 있기 때문에, 조혈모세포 및 제대혈 등의 보관 시 백의 파손 가능성은 항상 고려되어야 할 것으로 생각된다. 본 연구를 진행하면서 단순히 백의 초저온 환경에서의 내구성을 관찰하는 것 외에 동일한 조건으로 냉동보존액에 대해 자가혈장과 우태아 혈청을 사용하는 것을 비교하였는데, 통계적인 차이는 없었지만 자가혈장이 우태아 혈청을

사용하는 것보다는 세포 생존율의 평균치가 높게 관찰되었다. 우리가 일반적으로 실험실에서 세포를 보관할 때는 편리성 때문에 우태아 혈청을 사용하고 있으나, 환자에게 사용하는 경우 동물에서 유래한 이종물질에 대한 부담과 치료용으로 사용할 수 있는 clinical grade의 제품을 구하기가 어려운 단점이 있다. 따라서 본 연구결과 제대혈이나 조혈모세포 등을 보관하는 경우 무혈청 배지를 사용하기보다는 자가혈장을 첨가하여 쓰는 것이 좀 더 안전하다는 측면과 세포생존율을 높일 수 있는 방법으로 생각된다. 최근 국내에서 세포치료에 대한 연구가 활발히 진행되고 있으며, 조혈모세포 이식뿐 아니라 제대혈 이식 등이 활성화되면서 초저온 냉동 보관백의 수요도 증가하고 있다. 따라서 장기간 보관해야 하는 보관백의 국산화는 고가의 초저온 냉동백의 사용을 대체하여 가격을 절감시키는 경제적인 측면에서도 바람직한 일로 생각된다.

요 약

배경 : 제대혈뿐 아니라 골수이식을 위한 조혈모세포를 보관하는 온도는 -160°C 이하의 초저온으로서, 초저온 내구성이 요구되는 특수한 플라스틱 백이 필요하다. 최근 국내에서 처음으로 제대혈 보관용 초저온 냉동백(메디루션, 용인, 한국)이 생산되었기에 초저온 환경에서의 내구성을 평가하였다.

방법 : 사용한 혈액은 헌혈받은 말초혈액에서 단핵구 세포를 분리해 실험하였다. 제1군은 메디루션사의 백 20개와 Thermogenesis (USA)사의 초저온 냉동보관 백 20개에 세포를 분주한 후 -70°C 에서 하루 보관 후 질소탱크에 1년간 보관하였다. 2군은 메디루션사 백 20개에는 냉동보존액에 자가혈장을, 다른 메디루션사 백 20개에는 우태

아혈청을 첨가해 1군과 같은 방법으로 냉동 보존하였다. 3군은 초기 냉동방법을 비교하는 것으로서, 20개의 메디루션 백은 1군과 같은 방법으로, 다른 20개의 메디루션 백은 controlled refrigerator를 이용해 단계적으로 냉동한 후 질소탱크에 보관하였다. 위 3군을 1년간 질소탱크에 보관한 후 백의 파손여부와 회복된 세포 수 및 생존율을 비교하였다.

결과 : Thermogenesis사의 백 20개와 메디루션사 백 100개를 1년 후에 해동하여 육안으로 관찰하였을 때 백이 파손되거나 내용물이 누출된 것은 없었다. 또한 백의 종류, 냉동보존액 조성 및 초기냉동방법에 관계없이 회수된 세포수와 세포 생존율에서 통계적으로 의미 있는 차이는 관찰되지 않았다.

결론 : 메디루션사에서 생산한 냉동보관백은 혈액 보관 시 초저온 환경에서 최소 1년간 적합한 내구성을 지닌 것으로 판단되었다.

참고문헌

1. Carmen R. The selection of plastic materials for blood bags. *Tranfus Med Rev* 1993;7:1-10
2. Aubuchon JP, Estep TN, Davey RJ. The effect of the plasticizer di-2 ethylhexyl phthalate on the survival of stored RBCs. *Blood* 1988; 71:448-52
3. Allan J. Cryoprecipitate and the plastic blood-bag system. *Hemophilia* 1998; 4:138-9
4. Hmel PJ, Kennedy A, Quiles JG, Gorogias M, Seelbaugh JP, Morrisette CR, Van Ness K, Reid TJ. Physical and thermal properties of blood storage bags: implications for shipping frozen components on dry ice. *Transfusion* 2002;42:836-46
5. Cheresch MC, McMichael S. Instrumented impact test data interpretation. In: Kessler SL,

Adams GC, Driscoll SB, Ireland DR. Instrumented impact testing of plastics and composite materials. ASTMSTP 936. Philadelphia: American Society for Testing and Materials, 1987:9-23

6. Adami V, Malangone W, Falasca E, Marini L,

Risso A, Crini S, Toniutti E, Passoni Ferraro E, Del Frete G, Pittino M, Biffoni F, Rinaldi C, Degrassi A. A closed system for the clinical banking of umbilical cord blood. *Blood Cells Mol Dis* 2005;35:389-97