

저장 전 백혈구제거 적혈구제제의
품질관리 및 싸이토카인 분석

연세대학교 보건환경대학원

의생명과학전공

성 기 만

저장 전 백혈구제거 적혈구제제의
품질관리 및 싸이토카인 분석

지도 김 태 우 교수

이 논문을 석사 학위논문으로 제출함

2005년 6월 일

연세대학교 보건환경대학원

의생명과학전공

성 기 만

성기만의 석사 학위논문을 인준함

심사위원 _____ 인

심사위원 _____ 인

심사위원 _____ 인

연세대학교 보건환경대학원

2005년 6월 일

감사의 글

지나온 길을 돌아보니 많은 분들의 도움과 희생이 있었음에 감사를 드립니다.

본 논문을 완성하기까지 끊임없는 사랑과 관심으로 지도해 주신 김태우 교수님, 이혜영 교수님께 감사와 존경을 올립니다. 바쁘신 가운데서도 많은 가르침을 주신 양용석 교수님, 오옥두 교수님, 김종배 교수님, 박용석 교수님께 깊은 감사를 드립니다. 늦은 밤까지 공부하며 서로 격려하고 힘이 되어준 신진수 선생님, 이채진 선생님, 정보영 선생님, 유경래 선생님께도 뜨거운 정과 함께 고마운 마음을 전합니다. 대학원 생활에 활력과 도전을 주신 안병락 선생님, 이경철 선생님, 조용희 선생님, 이성덕 선생님께도 고마움을 전합니다.

어렵고 힘들 때면 언제나 많은 도움과 용기를 주었던 친구들, 박경일, 임병혁, 천진영에게도 감사의 말을 전합니다. 논문실험에 대해 많은 조언과 실험을 도와주신 전북대학교 싸이토키인은행 정미선 선생님께도 감사를 드립니다. 더 많은 것을 보고 깨달을 수 있도록 충고해 주시고 배려해 주신 정창숙 과장님, 김종암 과장님, 직장에서 다른 사람을 향한 사랑과 관심을 보여준 김상철 선생님, 강복만 선생님, 그리고 중앙혈액원 제제과 식구들에게도 감사를 드립니다.

오늘이 있기까지 큰사랑과 정성으로 키워주신 사랑하는 아버지, 어머니께 고개 숙여 감사를 드리며 이 논문이 작은 기쁨이 되었으면 합니다. 또한 격려해주고 뒤에서 많은 배려와 도움을 주신 누나, 매형, 동생 기상이, 그리고 처제들에게도 감사의 마음을 전합니다.

보기만 해도 기쁨이 되는 주현, 도현, 수현 세 딸과 다음에 태어나도 다시 인생을 같이하고픈 사랑하는 사람 김은숙에게 사랑과 함께 감사의 마음을 전합니다.

부족한 자를 여기까지 인도하여 주신 하나님께 영광을 올립니다.

2005년 6월
성 기 만 올림

목 차

그림 및 표 차례	ii
약기호표	iii
국문요약	iv
제1장 서론	1
제2장 연구재료 및 방법	4
1. 품질평가	4
1) 재료	4
2) 방법	4
2. Cytokine 정량비교	5
1) 대상	5
2) 방법	5
제3장 결과	7
1. 백혈구여과제거 적혈구제제(LF-RBCs)의 품질평가	7
2. Cytokine의 정량비교	10
제4장 고찰	19
제5장 결론	22
참고문헌	24
Abstract	28

그림 및 표 목차

Table 1. Post-filtration residual WBC No. and Hematocrit % of LF-RBCs	8
Table 2. Post-filtration red cell recovery of LF-RBCs.....	9
Table 3. Analytical results of LF-RBCs.....	11
Table 4. Analytical results of NR-RBCs.....	12
Table 5. Concentration of IL-1 β in LF-RBCs(1-5) and NR-RBCs(6-10) during storage.....	13
Table 6. Concentration of IL-6 in LF-RBCs(1-5) and NR-RBCs(6-10) during storage.....	15
Table 7. Concentration of TNF- α in LF-RBCs(1-5) and NR-RBCs(6-10) during storage.....	17
Figure 1. Concentration of IL-1 β in LF-RBCs(1-5) and NR-RBCs(6-10) during storage.....	14
Figure 2. Concentration of IL-6 in LF-RBCs(1-5) and NR-RBCs(6-10) during storage.....	16
Figure 3. Concentration of TNF- α in LF-RBCs(1-5) and NR-RBCs(6-10) during storage.....	18

약기호표

AABB : American Association of Blood Bank
BSA : bovine serum albumin
CPD : citrate phosphate dextrose
ELISA : enzyme-linked immunosorbent assay
FNHTR : febrile non-hemolytic transfusion reaction
IL : interleukin
LF-RBCs : leukocyte-filtered red blood cells
NR-RBCs : non-leukocyte reduced red blood cells
PBS : phosphate buffered saline
PRP : platelet rich plasma
SAG-M : saline-adenine-glucose-mannitol
TNF-a : tumor necrosis factor a
TRALI : transfusion-related acute lung injury

국문요약

저장 전 백혈구제거 적혈구제제의 품질관리 및 싸이토카인 분석

수혈은 그 수혈 과정에서 수혈전파성감염, 용혈성 수혈부작용, 발열성수혈부작용 등 다양한 수혈 부작용을 유발할 수 있다. 특히 혈액제제내의 백혈구에 의해 생길 수 있는 발열성비용혈성 수혈부작용은 비용혈성 수혈부작용 중 가장 흔하게 나타난다. 따라서 수혈 시에 백혈구를 제거한 혈액제제를 수혈하는 것이 이러한 증상을 줄이는데 효과적이다. 선진국에서는 백혈구를 제거한 혈액제제를 사용하는 것이 일반화 되어 있다. 본 연구에서는 이러한 백혈구를 제거한 제제를 만드는 방법 중 국내에서 처음으로 제조된 저장 전 백혈구여과제거 적혈구제제(leukocyte-filtered red blood cells, LF-RBCs)를 가지고 이 제제에 대한 품질 평가를 실시하여 미국, 유럽의 기준과 비교하고자 하였다. 또한 발열성 비용혈성 수혈부작용(febrile nonhemolytic transfusion reaction, FNHTR)의 원인으로 알려지고 있는 IL-1 β , IL-6, TNF- α 등의 염증성 cytokine들의 생성 및 보관기간 중 정량변화를 분석하고, 백혈구를 여과하지 않은 적혈구제제(non-leukocyte reduced red blood cells, NR-RBCs)에서 cytokine들의 정량변화를 비교 분석하고자 하였다. 국내에서 400 mL 전혈을 헌혈받은 296단위의 LF-RBCs에 대한 품질평가를 하였다. 여과 후 남아있는 백혈구수는 $0.12 \pm 0.16(\times 10^6/\text{unit})$ 를 나타내 미국혈액은행협회(American association of blood banks, AABB)기준이나 유럽기준에 적합함을 알 수 있었다. 여과 후 적혈구의 hematocrit는 58.2 ± 0.2 였고, 여과 후 적혈구 회수율은 $98.5 \pm 1.26(\%)$ 로 AABB기준이나 유럽기준에 적합함을 알 수 있었다. 국내에

서 처음 제조되는 제제이지만 양호한 품질을 나타냄을 알 수 있었다.

Cytokine의 생성은 LF-RBCs 5단위와 NR-RBCs 5단위를 대상으로 검사하였다. 검체는 1일, 17일, 35일째 취하여 검사했다. 그 결과 IL-1 β , IL-6 및 TNF- α 의 cytokine들은 일부 검체에서만 검출되었다. 전체 10단위(LF-RBCs 5단위와 NR-RBCs 5단위)를 대상으로 시행한 IL-1 β 는 3단위에서만 검출되었고 IL-6에서는 5단위에서 검출되었다. TNF- α 에서는 5단위에서 검출되었지만 검출한계를 약간 넘는 낮은 농도로 측정되기도 하였다. LF-RBCs와 NR-RBCs와의 처음 발현 양상의 차이도 미미하였다. 그러나 시간경과에 따른 변화를 보면 차이를 보이고 있고 전체적으로 cytokine의 정량이 감소하는 양상을 보였고 LF-RBCs에서 감소율이 크게 나타났다. 시간경과에 따라 IL-1 β 의 경우 LF-RBCs에서는 평균 87% 감소한 반면, NR-RBCs에서는 반대로 25.5% 증가하는 양상을 보였다. IL-6의 경우 LF-RBCs에서는 42.0% 감소한 반면, NR-RBCs에서는 27.4% 감소하였다. TNF- α 의 경우 LF-RBCs에서는 79.0% 감소한 반면 NR-RBCs에서는 75.5% 감소하는 양상을 보였다. 시간이 경과함에 따라 cytokine의 정량이 NR-RBCs보다 LF-RBCs에서 더 많이 감소하는 것을 알 수 있었다.

핵심 되는 말 : LF-RBCs, NR-RBCs, FNHTR, Cytokine, ELISA

제 1 장 서 론

수혈은 빈혈이나 혈소판 감소증 등의 단순한 혈액학적 질환의 치료뿐만 아니라 암환자의 치료시 가장 문제가 되는 범혈구감소증이나 혈소판 감소증으로 인한 감염과 출혈 등을 예방함으로써 궁극적으로 환자의 치료에 도움을 주게 된다. 그러나 수혈은 수혈전과성 감염, 용혈성 수혈부작용, 발열성 비용혈성 수혈 부작용(febrile non-hemolytic transfusion reaction, FNHTR), 아니필락시스, 알러지, 혈액용적과다 및 수혈관련 급성폐손상(transfusion-related acute lung injury)등의 다양한 수혈부작용을 유발할 수 있다(Vengelen-Tyler, 1996). 특히 혈액제제내에 포함된 백혈구에 의해 생길 수 있는 수혈부작용에는 발열성 비용혈성 수혈부작용, 혈소판불응증, 이식편대숙주병, cytomegalovirus(CMV)나 human T cell lymphotropic virus type I 또는 II(HTLV-I or II)등에 의한 수혈전과성 감염증 등이 있다(Vengelen-Tyler, 1996).

이 중 비용혈성 수혈부작용중 가장 흔한 것은 발열성 수혈부작용이다. 발열성 비용혈성 수혈부작용은 체온이 상승될 다른 이유 없이 수혈과 관계되어 체온이 1℃ 이상 증가하는 것을 말하는데(Mangano, 1991) 발생빈도는 적혈구제제는 0.12 ~ 0.5%이며(Uhlmann, *et al.*, 2001; Menitove, *et al.*, 1982), 혈소판의 경우는 1.7 ~ 31%로 보고 되었다(Goodnough, *et al.*, 1993; Heddle, *et al.*, 1993). 우리나라에서는 농축적혈구 수혈시 1.4%의 빈도로 이 반응이 나타남이 보고 된 바 있다(Snyder, *et al.*, 1994). 발열성 비용혈성 수혈부작용의 원인은 백혈구, 혈소판, 림프구에 대한 항체에 의하여 일어나는 것으로 알려지고 있었다. 그러나 발열성 비용혈성 수혈부작용과 관련된 가장 중요한 위험인자가 혈액제제의 보관기간임이 알려졌고, 발열이 시작되는 시간이 수혈이 끝난 후가 대부분이며 수혈력이 전혀 없어 항 백혈구 항체가 생성될 가능성이 적은 환자에서도 발생하며, 발열성 비용혈성 수혈부작용이 발생한 환자의 약 30%에서는 항 백혈구 항체가 검출되지 않을 뿐 아니라, 세포성분이 없는 혈장성분 수혈 시에도 발생하기 때문에 새로운 발생 기전을 찾고자 하는 노력이 계속되어 왔다(Heddle, *et al.*, 1993; Snyder, *et al.*,

1994; Heddle, *et al.*, 1994).

최근에 발열성 비용혈성 수혈부작용이 보관중인 혈액제제에서 생성된 cytokines 때문일 것이라는 가설이 제기되고 이를 뒷받침하는 많은 연구가 진행되었다. Muylle 등과 Heddle 등은 혈소판제제를 보관할 때 IL-1, IL-6 및 tumor necrosis factor α (TNF- α)등이 생성된다는 것을 밝혔고(Muylle, *et al.*, 1993; Heddle, *et al.*, 1994), Stack 등은 IL-8이 다른 cytokine에 비하여 가장 높은 농도로 증가한다고 하였다(Stack, *et al.*, 1994). 또한 Stack 등은 4 $^{\circ}$ C에서 42일 동안 보관한 농축적혈구 제제에서도 IL-1과 IL-8이 보관 기간 중 증가하였다고 보고하였다(Stack, *et al.*, 1995).

그러나 Flegel 등은 혈소판제제의 보관중 IL-1, IL-6, IL-8 및 TNF- α 의 증가를 관찰할 수 없었다고 보고하였고(Flegel, *et al.*, 1995), Kluter 등도 유사한 연구 결과를 얻었다고 상반된 견해를 피력하였는데(Kluter, *et al.*, 1995) 이와 같은 상이한 결과를 얻은 이유를 혈액제제의 제조방법의 차이 때문일 것으로 설명하였다. 즉, 혈액제제를 제조하는 과정에서 단구와 T 림프구 등 cytokine 생성세포들의 활성화가 이루어지고 이로 인해 cytokine 생성이 유발되는데 실험에 사용한 혈액제제를 어떠한 방법으로 조작하였는가에 따라 cytokine 생성 세포들의 활성화 정도가 다를 수 있다는 것이다(Flegel, *et al.*, 1995; Kluter, *et al.*, 1995). 그러므로 cytokine 생성능력을 가진 세포들을 활성화시키지 않는 방법으로 혈액제제를 제조할 경우에는 보관 기간 중 cytokine 생성이 적거나 없을 것도 예상할 수 있다. 그뿐 아니라 Shanwell 등은 백혈구를 미리 제거시킨 농축적혈구제제에서 측정된 IL-1, IL-2 및 TNF- α 가 보관기간에 따른 증가양상을 보이지 않았다고 보고하여 저장전 백혈구를 감소시킨 제제에서 cytokine의 생성이 유발되지 않았음을 보고하기도 하였다(Shanwell, *et al.*, 1997). 전혈, 적혈구제제는 4 ~ 6 $^{\circ}$ C에서 보존하고 혈소판 제제는 22 ~ 24 $^{\circ}$ C에서 보존한다. 특히 실온보존의 혈소판제제의 염증성 cytokine인 IL-1, IL-6, TNF- α 는 보존과 함께 증가하고 특히 5일째 이후에 급속하게 증가한다고 보고되었다(中條聖子, 1997).

그러나 현재까지 발열성 비용혈성 수혈부작용에서의 cytokine의 역할이 완전히 규명되지 않았고 뿐만 아니라 현재까지 시행된 대부분의 연구가 주로 혈소판

제제를 이용한 경우가 많고 적혈구제제에서는 인위로 조작하여 농축적혈구 제제에 백혈구를 첨가하여 cytokine의 생성여부를 관찰한 실험결과들이 대부분이다. 혈액제제에 포함된 백혈구 수는 전혈과 적혈구제제 각 1단위당 약 $1\sim 3 \times 10^9$ 개이다(Meryman *et al.*, 1986; Sirchia *et al.*, 1987). 혈액제제에서 백혈구를 여과 제거함으로써 발열성 비용혈성 수혈부작용을 예방하고 동종면역과 혈소판불응증을 예방하며 CMV를 예방하고 면역억제 효과의 방지 등의 장점들을 가지고 있다(Mangano, 1991; Blumberg, 1997; Bowden, 1995).

백혈구를 여과 제거하는 방식은 여과시기에 따라 크게 pre-storage(보관 전)와 post-storage(보관 후)로 나뉜다. post-storage 방식은 다시 병동으로 출고 전 혈액은행에서 여과하는 post-storage filtration in the laboratory와 환자에게 수혈하는 과정에서 여과하는 bed-side filtration으로 나눌 수 있다. 보관전 백혈구의 제거 방식은 bed-side에서의 제거 방식보다 효율이 높고 백혈구 제거율을 확인할 수 있는 품질관리가 용이하며 보존중의 cytokine이 축적되지 않아 발열성 비용혈성 수혈부작용을 방지 할 수 있다(Mark *et al.*, 2004; Blood transfusion therapy, 2002; FDA CBER Guidance for Industry, 2001).

이러한 여러 가지 장점들로 인해 대한적십자사 혈액원에서는 백혈구로 인한 여러 가지 수혈부작용을 줄여 환자의 치료에 도움을 주고자 2004년부터 저장 전 백혈구 여과제거 적혈구제제 (leukocyte-filtered red blood cells, LF-RBCs)를 제조하여 의료기관에 공급하기 시작 했다. 본 연구에서는 국내에서 처음으로 도입된 저장 전 백혈구 여과제거 적혈구제제의 품질관리를 통해 미국 및 유럽 기준과 비교하고, 발열성 비용혈성 수혈부작용의 원인으로 알려진 IL-1 β , IL-6, TNF- α 등의 염증성 cytokine의 생성 및 보관기간중의 정량변화를 분석하고, 또한 백혈구를 여과하지 않은 적혈구제제(non-leukocyte reduced red blood cells, NR-RBCs)와의 cytokine의 정량 변화를 비교 분석하고자 하였다.

제 2 장 연구재료 및 방법

1. 품질평가

1) 재료

적혈구농축액제제 1단위용 필터인 RCM1(Pall Medical, USA)필터, 전혈용 항응고제액 CPD(citrate phosphate dextrose)액 및 적혈구농축액제제 첨가용액 SAG-M(saline-adenine-glucose-mannitol)이 포함된 국내에서 제조된 400 mL 전혈 채혈용 사중백(보인메디카, 한국)을 사용하였다. 혈액은 대한적십자사 중앙적십자 혈액원에서 2004년 10월 1일부터 12월 31일 까지 400 mL 전혈을 헌혈 받은 1,887명 중 무작위로 296단위를 대상으로 하였다.

2) 방법

(1) LF-RBCs 제조

사중백(Quadruple Bag)에 전혈을 400 mL을 채혈하여 채혈후 8시간 이내에 원심분리기(Jouan KR422, France)로 22℃, 2890 rpm에서 3분 45초간 원심한 후, 혈장추출기를 이용하여 혈소판 풍부혈장(platelet-rich plasma, PRP)을 추출하여 적혈구농축액제제를 제조하였다. 백혈구 여과는 높이 190 cm의 자연중력을 이용하였으며 먼저 필터를 수직위치(vertical position)로하여 혈액 첨가액인 SAG-M 용액을 filter로 통과시키는 priming작업을 통해 적혈구농축액제제의 백 쪽으로 옮긴다. SAG-M용액이 들어간 적혈구농축액을 부드럽게 충분히 잘 혼합하고 SAG-M혼합 적혈구를 다시 높이 190 cm에서 중력을 이용해서 여과를 시행한다.

(2) 잔여백혈구수 측정, 적혈구용적율, 적혈구회수율 측정 및 세균배양검사

백혈구 여과제거 후 잔여백혈구 측정은 turk 용액으로 10배 희석 한 후 Nageotte chamber를 이용한 수기법을 사용하였으며, 적혈구 용적율은 자동혈구계수기(Sysmex KX21, Japan)를 이용하여 측정하였다. 적혈구회수율은 filter전의 용량과 적혈구용적율을 곱한 값(A)과 filter후의 용량과 적혈구용적율을 곱한 값

(B)을 가지고 $B/A * 100$ 으로 계산하였다. 각각의 용량은 혈액백의 무게를 측정 한 후 빈 혈액백 고유무게를 뺀 나머지 무게를 비중 1.05로 나눈 값으로 하였다. 세균배양검사는 액체배지(thioglycolate broth, 한국배지, 한국)에서 1주간 배양 후 확인하였다.

2. Cytokine 정량비교

1) 대상

LF-RBCs 중 무작위로 취한 5단위와 삼중백으로 제조된 백혈구를 제거하지 않은 NR-RBCs 중 무작위로 취한 5단위를 대상으로 실험하였다. 두 그룹 모두 채혈 후 8시간 이내에 2,890 rpm, 3분45초의 조건으로 원심하여 체제분리를 완료하였다. Cytokine을 측정하기 위한 검체는 무균백출 연결장치(TSCD, Terumo, Japan)를 이용하여 보조 백을 연결하여 혈액을 5-10 mL를 취하였다. 원심분리기(Kubota 8100, Japan)로 3,100 rpm에 10분간 원심한 후 혈장을 분리하여 conical tube(Corning, USA)에 담아 -45°C 에서 동결 보관 후 검사하였다. LF-RBCs와 NR-RBCs에서 각각 1일, 17일, 35일째마다 검체를 채취 하였다.

2) 방법

(1) 백혈구수 측정 및 적혈구용적율 측정

백혈구수 측정은 LF-RBCs와 NR-RBCs를 각각 잘 혼합 후 LF-RBCs는 Nageotte chamber를 이용한 수기법을 사용하였으며 NR-RBCs는 자동혈구계수기(Sysmex KX21, USA)를 이용하여 측정하였다. 적혈구용적율은 LF-RBCs 및 NR-RBCs 모두 자동혈구계수기(Sysmex KX21, Japan)를 이용하여 측정하였다.

(2) Cytokine 측정

Cytokine은 sandwich ELISA 방법을 이용하여 IL-1 β , IL-6, TNF- α 를 측정하였다. Capture antibody를 coating buffer(0.1M sodium carbonate buffer)로 1:250으로 dilution하여 각 well에 100 μL 씩 주입하여 4°C 에서 overnight시켰다. 3

회 세척(0.02% Tween 20 in PBS)후 blocking buffer(0.5% bovine serum albumin, Sigma, U.S.A)을 well당 200 μ l씩 주입하여 실온에서 2시간 배양시켰다. 표준 단백질은 recombinant protein(R&D system, USA)을 사용하였으며, 표준과 실험군을 2 fold serial dilution 후 실온에서 2시간 반응시켰다. 이것을 5회 세척한 후 detection antibody(R&D system, USA)를 blocking buffer에 1:250으로 희석하여 각 well에 100 μ l씩 주입한 후 실온에서 1시간 반응시켰다. 5회 세척 후 streptavidin-horseradish peroxidase conjugated antibody(HRP)를 blocking buffer에 1:1,000으로 희석하여 100 μ l씩 각 well에 주입한 후 실온에서 30분 방치한 후 7회 세척 하였다. TMB substrate reagent를 well당 100 μ l씩 첨가하여 실온에서 빛을 차단한 후 20분 동안 방치하였다. Stop solution을 100 μ l씩 첨가하여 반응을 정지시키고 ELISA reader를 사용하여 430 nm에서 흡광도를 측정하였다. Plate는 immunoplate(Nunc, Denmark)를 사용하였으며, anti-cytokine인 hIL-1 β 는 50 ng/mL, hIL-6는 20 ng/mL, hTNF- α 는 20 ng/mL을 시작으로 2 fold serial dilution하였다. 각각의 검출한계는 IL-1 β 은 20 pg/mL, IL-6은 5 pg/mL, TNF- α 는 10 pg/mL이었다.

제 3 장 결 과

1. 백혈구여과제거 적혈구제제(LF-RBCs)의 품질평가

296단위 모든 제제에서 여과 후 평균 잔여 백혈구 수는 단위당 $0.12 \times 10^6 \pm 0.16$ 개로 계산되었다. 미국기준(Standards for blood banks and transfusion services 22nd, 2003)은 단위당 5.0×10^6 미만이고 유럽기준(Guide to the preparation, use and quality assurance of blood components 9th, 2003)은 1.0×10^6 으로 비교하여 보면 양호한 결과를 나타내었다. 적혈구용적율은 평균 $58.2 \pm 2.0(\%)$ 로 나타났다(Table 1). 적혈구회수율은 평균 $98.5 \pm 1.26(\%)$ 로 나타났다(Table 2). 12단위에 대한 세균배양검사에서는 모두 음성을 나타냈다.

Table 1. Post-filtration residual WBC No. and Hematocrit % of LF-RBCs

	Mean	SD	Standard value
rWBCs($\times 10^6$ /unit)	0.12	0.16	≤ 5.0
Hct(%)	58.2	2.0	60 ± 10

Table 2. Post-filtration red cell recovery of LF-RBCs

	Pre- filtration		Post-filtration		Red cell Recovery (%)
	Vol(mL)	Hct(%)	Vol(mL)	Hct(%)	
Mean	299	57.9	293.2	58.2	98.5
SD	18.5	2.29	18.6	2.00	1.26

2. Cytokine 정량비교

백혈구여과제거 적혈구제제(LF-RBCs) 5단위의 평균 부피는 208.8 ± 9.6 mL, hematocrit는 $51.2 \pm 2.3\%$, hemoglobin은 16.8 ± 0.9 g/dL였다. Nageotte chamber를 이용한 잔여 백혈구 수는 $0.1 \pm 0.1(\times 10^6/\text{unit})$ 로 우수한 백혈구 제거율을 보였다(Table 3). 백혈구를 제거하지 않은 적혈구제제(NR-RBCs)의 5단위의 평균 부피는 252.4 ± 15.5 mL, hematocrit은 $73.2 \pm 2.0\%$, hemoglobin은 25.1 ± 1.2 g/dL였다. 자동혈구계수기(Sysmex KX21, USA)를 이용한 백혈구 수는 $2.8 \pm 0.3(\times 10^9/\text{unit})$ 였다(Table 4). IL-1 β 는 검체 1번, 6번, 10번에서 검출 되었다(Table 5). LF-RBCs 1번 검체는 시간의 경과에 따라 정량이 약 87% 감소한 반면 NR-RBCs 9번, 10번 검체는 시간의 경과에 따라 평균 약 25.5% 증가하는 양상을 보였다(Fig. 1). IL-6는 검체 1번, 2번, 3번, 6번, 8번, 10번에서 검출 되었다(Table 6). LF-RBCs 1번, 3번 검체는 시간의 경과에 따라 정량이 감소하였고 2번 검체는 변화가 미비하였다. 평균적으로 42.0% 감소하였다. 반면 RBCs 6번 검체는 시간의 경과에 따라 검출 되어졌고 NR-RBCs 8번 검체는 정량이 감소하였으며, 10번 검체는 변화가 미비 하였다. 평균적으로 27.4%의 감소하는 양상을 보였다(Fig 2). TNF- α 는 검체 1번, 2번, 3번, 8번, 10번에서 검출 되었다 (Table 6). LF-RBCs 1번, 2번, 3번 검체는 시간의 경과에 따라 정량이 감소하였다. 평균적으로 79.0% 감소한 반면, NR-RBCs 8번, 10번 검체는 시간의 경과에 따라 정량이 약 75.5% 감소하는 양상을 보였다(Fig 3).

Table 3. Analytical results of LF-RBCs

sample	Vol(mL)	Hct(%)	Hb(g/dL)	rWBCs($\times 10^6$ /unit)
1	301	53.0	17.8	0.06
2	296	47.6	15.3	0.06
3	317	51.8	17.1	0.19
4	315	50.5	16.5	0.13
5	315	53.0	17.1	0.1
mean \pm SD	308.8 \pm 9.6	51.2 \pm 2.3	16.8 \pm 0.9	0.1 \pm 0.1

Table 4. Analytical results of NR-RBCs

sample	Vol(mL)	Hct(%)	Hb(g/dL)	rWBCs($\times 10^9$ /unit)
6	246	72.8	24.8	2.9
7	247	74.8	24.8	2.4
8	275	70.0	23.9	2.7
9	237	74.3	25.0	3.1
10	257	74.3	27.2	2.8
mean \pm SD	252.4 \pm 14.5	73.2 \pm 2.0	25.1 \pm 1.2	2.8 \pm 0.3

Table 5. Concentration of IL-1 β in LF-RBCs(1-5) and NR-RBCs(6-10) during storage

	LF-RBCs(ng/mL)					NR-RBCs(ng/mL)				
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Day 1	0.223	ND*	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Day 7	0.188	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0.047
Day 35	0.029	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0.011	0.059

* ND : Not Detected.

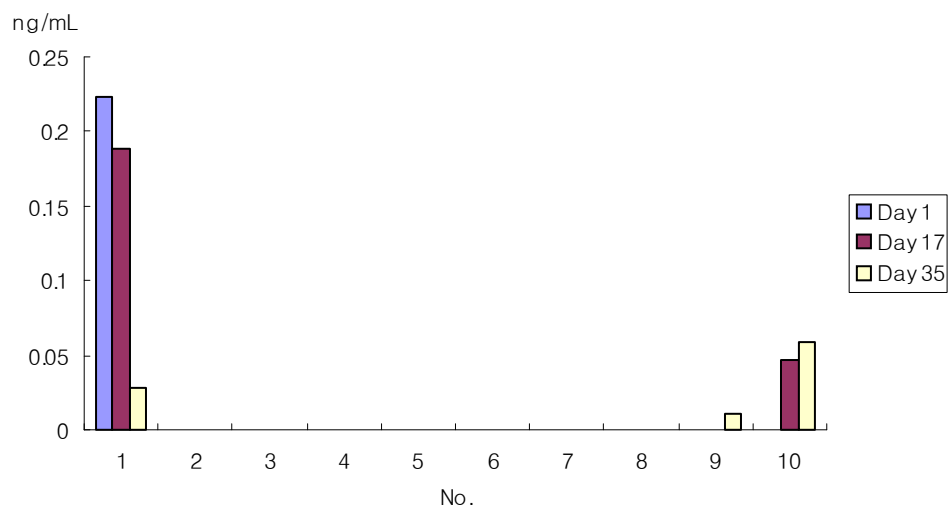


Figure 1. Concentration of IL-1 β in LF-RBCs(1-5) and NR-RBCs(6-10) during storage.

Table 6. Concentration of IL-6 in LF-RBCs(1-5) and NR-RBCs(6-10) during storage

	LF-RBCs(ng/mL)					NR-RBCs(ng/mL)				
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Day 1	1.737	0.034	0.448	ND*	ND	ND	ND	0.532	ND	0.066
Day 7	0.245	0.047	0.301	ND	ND	0.003	ND	0.417	ND	0.054
Day 35	0.524	0.035	0.183	ND	ND	0.007	ND	0.265	ND	0.063

* ND : Not Detected.

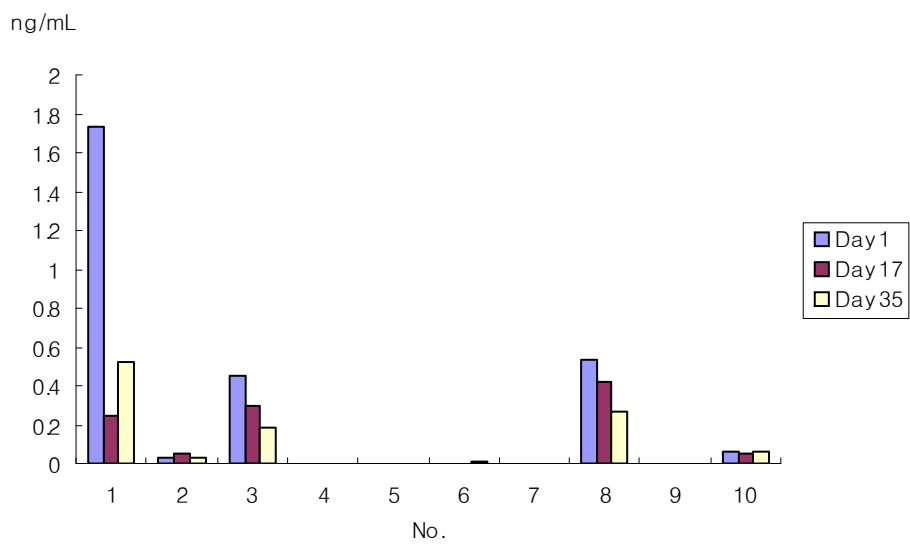


Figure 2. Concentration of IL-6 in LF-RBCs(1-5) and NR-RBCs(6-10) during storage.

Table 7. Concentration of TNF- α in LF-RBCs(1-5) and NR-RBCs(6-10) during storage

		LF-RBCs(ng/mL)					NR-RBCs(ng/mL)				
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Day	1	2.327	0.040	0.340	ND*	ND	ND	ND	0.239	ND	0.066
Day	7	1.698	0.003	0.258	ND	ND	ND	ND	0.157	ND	0.080
Day	35	0.556	0.003	0.107	ND	ND	ND	ND	0.070	ND	0.013

* ND : Not Detected.

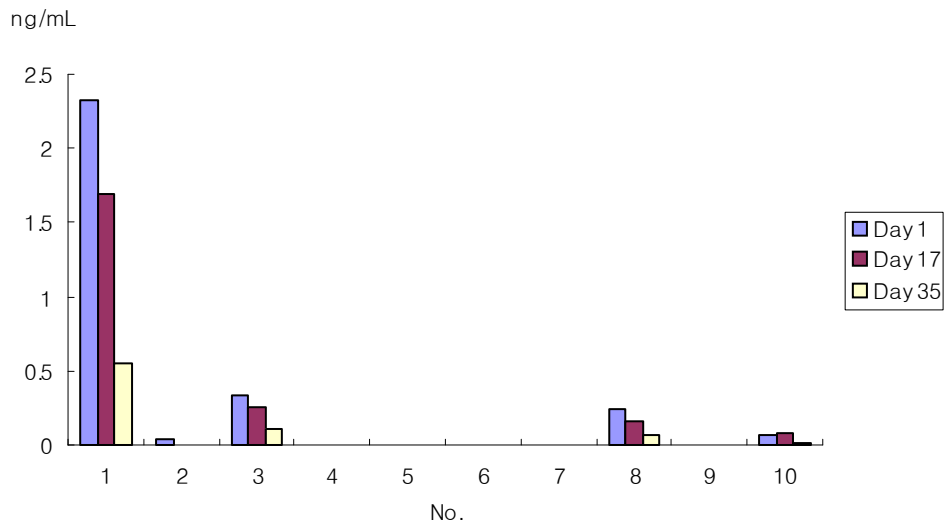


Figure 3. Concentration of TNF- α in LRFRC(1-5) and RBCs(6-10) during storage.

제 4 장 고 찰

수혈은 여러 가지 병적상태로 인하여 혈구 혹은 혈장 성분이 부족한 환자를 치료하기 위해 건강한 공여자나 환자 본인으로부터 채혈한 혈액 성분을 보관하였다가 환자에게 투여하는 행위이다(기창석 등, 1998). 그러나 수혈은 수혈전파성 감염, 용혈성 수혈부작용, FNHTR, 수혈관련 급성폐손상(TRALI)등의 다양한 수혈부작용을 유발할 수 있다. 특히 혈액제제에 포함되어 있는 백혈구로 인한 수혈부작용으로 FNHTR, HLA 동종면역, 감염질환의 전파 등이 발생할 수 있으므로 이를 줄이기 위해 환자에게 혈액을 수혈하기 전에 백혈구를 제거 하고 있다(Lane *et al.*, 1992; Saarinen *et al.*, 1990). 백혈구 제거를 위한 FDA 표준 권고안에 의하면 백혈구제거 적혈구제제와 백혈구제거 혈소판제제내의 잔여 백혈구 수는 5×10^6 /unit미만이고, 유럽권고안은 1×10^6 /unit미만으로 정하고 있다(Zoon KG, 1996; Guide to the preparation, use and quality assurance of blood components, 7th ed, 2001). 특히 FNHTR이 보관중인 혈액제제에서 생성된 cytokine 때문일 것이라는 가설이 제기 되었고 이를 뒷받침하는 많은 연구가 진행되었다. 대한적십자사 혈액원에서는 2004년부터 백혈구를 필터를 이용하여 제거한 저장 전 LF-RBCs를 제조하여 의료기관에 공급하고 있다.

본 연구는 국내에서 처음으로 도입되어 공급되고 있는 LF-RBCs의 품질관리를 통해 미국 및 유럽기준과 비교, 평가하고자 하였으며, FNHTR의 원인으로 알려진 IL-1 β , IL-6, TNF- α 등의 염증성 cytokine의 생성 및 보관기간중의 정량 변화를 분석하고, 또한 백혈구를 제거하지 않은 적혈구제제(non-leukocyte reduced RBCs, NR-RBCs)와도 cytokine의 정량 변화를 비교 분석하고자 하였다. LF-RBCs 296단위를 가지고 실시한 품질평가에서 적혈구용적율(Hematocrit)은 평균 $58.2 \pm 2.0(\%)$ 를 나타냈고 적혈구회수율(Red cell recovery)은 평균 $98.5 \pm 1.26(\%)$ 를 나타내었다. 이는 미국혈액은행협회의 적혈구회수율 기준인 85%이상을 충족시키는 것이다. 또한 대한적십자사 혈액사업 관련지침집의 혈액제제의 품질관

리기준에 의하면 적혈구회수율 85%이상, 적혈구용적율 $60 \pm 10(\%)$ 를 만족시키고 있다(대한적십자사 혈액사업관련지침집, 2004). 여과 후 평균 잔여 백혈구 수는 단위당 평균 $0.12 \times 10^6 \pm 0.16$ 개로 계산 되었다. 이는 미국기준(Standards for Blood Banks and Transfusion Services 22nd, 2003)의 단위당 5.0×10^6 미만과 유럽기준(Guide to the preparation, use and quality assurance of blood components, 9th, 2003)의 1.0×10^6 미만을 충족시키는 양호한 성적을 나타냈다. 국내에서 이 등의 보고와도 유사한 결과를 나타냈다(이미경 등, 2004). 혈액배양 검사결과는 모두 음성이었다.

Cytokine의 생성은 LF-RBCs 5단위와 NR-RBCs 5단위를 대상으로 검사하였다. 그 결과 IL-1 β , IL-6 및 TNF- α 등의 cytokine은 전혀 검출되지 않거나 일부 검체에서만 검출 되었다. LF-RBCs와 NR-RBCs와의 처음 발현양상의 차이도 미미하였다. 전체 10단위를 대상으로 시행한 IL-1 β 는 3단위에서만 검출되었고 IL-6에서는 5단위에서 검출되었다. TNF- α 에서는 5단위에서 검출되었지만 검출한계를 약간 넘는 낮은 농도로 측정되기도 하였다. 그러나 시간경과에 따른 변화를 보면 차이를 보이고 있고 전체적으로 cytokine이 감소하는 양상을 보였다. 시간경과에 따라 IL-1 β 의 경우 LF-RBCs에서는 평균 87% 감소한 반면, NR-RBCs에서는 25.5% 증가하는 양상을 보였다. IL-6의 경우 LF-RBCs에서는 42.0% 감소한 반면, NR-RBCs에서는 27.4% 감소하였다. TNF- α 의 경우 LF-RBCs서는 79.0% 감소한 반면 NR-RBCs에서는 75.5% 감소하는 양상을 보였다. 시간이 경과함에 따라 cytokine의 정량이 NR-RBCs보다 LF-RBCs에서 더 많이 감소하는 것을 알 수 있었다.

혈액제제의 보관중 cytokine 생성에 관한 본 연구는 혈소판제제 뿐만 아니라 적혈구제제에서도 cytokine이 생성된다고 보고하였던 기존의 연구 결과와는 다른 것이다. 즉 농축적혈구제제에서 IL-8이 생성된다고 보고하였던 Stack 등의 연구나 (Stack *et al.*, 1995) 같은 제제에서 IL-1 β , IL-8 및 TNF- α 가 증가한다고 보고하였던 Shanwell 등의 연구결과와는 달리(Shanwell *et al.*, 1997) 본 연구에서는 모든 cytokine이 검출되지 않거나 매우 낮은 농도로 측정 되었다. 이러한 결과는 본 연구의 대상이 10개의 적혈구제제(LF-RBCs 5단위, NR-RBCs 5단위)로서 비

교적 적은 수의 제제를 대상으로 했기 때문일 수 있다. 적혈구제제로 인한 FNHTR의 발생빈도가 0.12 ~ 0.5%이고(Uhlmann *et al.*, 2001; Menitove *et al.*, 1982) 우리나라에서는 적혈구제제에서 수혈시 1.4%의 빈도로 이 반응이 나타남이 보고 되었기 때문이다(Snyder *et al.*, 1995). 따라서 연구대상 혈액제제의 수가 적을 경우 cytokine이 생성되지 않는 적혈구제제만 선택되었을 가능성을 배제할 수 없다. 하지만, Shanwell등의 연구에서도 IL-1 β , IL-6 및 TNF- α 가 매우 낮은 농도로 측정되었고 IL-2는 검출되지 않았기 때문에(Shanwell *et al.*, 1997) 실제로 적혈구제제에서는 cytokine이 생성되지 않을 수도 있다. 또한 국내에서 기등에 의한 보고에 의하면 IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-8 및 TNF- α 등의 cytokine은 전혀 검출되지 않거나 검출한계를 약간 넘는 낮은 농도로 측정되었다고 한다(기창석 등, 1998).

일부 cytokine이 생성된 제제는 전혈에서 적혈구제제를 제조하기 위해 원심 분리하는 과정에서 cytokine 생성 세포들의 활성화가 이루어져서 LF-RBCs나 NR-RBCs에서 cytokine이 생성되어진 것일 수 있다. 따라서 여과작업을 하기 전 생성된 cytokine은 LF-RBCs제조 후에도 존재하고 시간의 경과에 따라 감소하는 양상을 보였다. NR-RBCs는 LF-RBCs에 비해 포함 된 백혈구에 의해 시간의 경과에 따라 감소되는 양상이 상대적으로 적음을 알 수 있었다. 저장 전 백혈구제거 적혈구제제의 저장 동안에는 cytokine은 증가하지 않았으며 발열 반응이 cytokine과는 연관성이 적은(Lin *et al.*, 2002) 대신 다른 기전과 연관됨을 시사하고 있다. FNHTR을 유발하는 또 다른 요인이 존재하는지에 대한 추가적인 연구가 필요할 것이다. 또한 본 연구의 결과를 기초로 좀 더 많은 혈액제제를 대상으로 한 cytokine의 생성에 대한 규명과 임상적 의의를 밝히는 연구가 필요할 것으로 생각된다.

제 5 장 결 론

저장 전 백혈구여과제거 적혈구제제(leukocyte-filtered RBCs, LF-RBCs)의 품질평가를 적혈구용적율, 적혈구회수율, 잔여백혈구수등의 항목을 검사하여 미국, 유럽의 기준과 비교 평가하였다. 또한 FNHTR의 원인으로 백혈구에 의한 cytokine의 보관기간에 따른 발현 양상을 알아보하고자 하였다. LF-RBCs 5단위와 비교군으로 백혈구를 제거하지 않은 적혈구제제(non-leukocyte reduced RBCs, NR-RBCs) 5단위를 대상으로 하였다. 발현된 cytokine의 양을 측정하기 위해 ELISA법을 실시하여 IL-1 β , IL-6, TNF- α 를 측정 하였다. 본 실험에서 얻은 결과는 다음과 같다.

1. LF-RBCs 제조에 따른 품질 평가

1) 여과 후 남아있는 백혈구는 $0.12 \pm 0.16(\times 10^6/\text{unit})$ 로 미국 AABB기준이나 유럽기준에 적합함을 확인하였다.

2) 여과 후 Hematocrit는 $58.2 \pm 0.2(\%)$ 로 미국 AABB기준 및 적십자 기준에 적합 함을 확인하였다.

3) 여과 후 적혈구 회수율은 $98.5 \pm 1.26(\%)$ 로 미국 AABB기준 및 적십자 기준에 적합 함을 확인 하였다.

2. LF-RBCs에서의 Cytokine의 정량측정

1) IL-1 β : 5단위 중 1검체에서만 검출되고 보관기간이 경과함에 따라 감소하는 양상을 나타냈다. 약 87%의 감소를 보였다.

2) IL-6 : 5단위 중 3검체에서 검출되었고 보관기간이 경과함에 따라 감소하는 양상을 나타냈다. 평균적으로 약 42.0%의 감소를 보였다.

3) TNF- α : 5단위 중 3검체에서 검출되었고 보관기간이 경과함에 따라 감소하는 양상을 나타냈다. 평균적으로 약 79%의 감소를 보였다.

3. NR-RBCs에서의 Cytokine의 정량측정

1) IL-1 β : 5단위 중 2검체에서 검출되었고 보관기간이 경과함에 따라 증가하는 양상을 나타냈다. 평균적으로 약 25.5%의 증가를 보였다.

2) IL-6 : 5단위 중 3검체에서 검출되었고 보관기간이 경과함에 따라 약하게 감소하거나 증가하는 양상을 나타냈다. 평균적으로 약 27.4%의 감소를 보였다.

3) TNF- α : 5단위 중 2검체에서 검출되었고 보관기간이 경과함에 따라 약하게 감소하는 양상을 나타냈다. 평균적으로 약 75.5%의 감소를 보였다.

위의 실험 결과를 볼 때 대한적십자사 혈액원에서 제조되고 있는 LF-RBCs 제제는 품질관리가 양호하게 이루어지고 있음을 알 수 있었으며 cytokine의 발현은 LF-RBCs와 NR-RBCs의 유의한 차이는 없었지만 보관기간의 경과에 따른 정량의 변화는 LF-RBCs에서 NR-RBCs보다 더 급격하게 감소하는 것을 알 수 있었다.

참 고 문 헌

- Blood transfusion therapy: *A physician's Handbook* 7th, 11p, AABB, 2002
- Blumberg, N. Allogeneic transfusion and infection: economic and clinical implication, *Seminars in Hematology* 1997;34(3S2):34-40
- Bowden, R.A. A comparison of filtered leukocyte-reduced and cytomegalovirus(CMV) seronegative blood products for the prevention of transfusion-associated CMV infection after marrow transplant, *Blood* 1995;86(9):3598-3603
- FDA CBER Guidance for Industry. Draft-Not for implementation, Pre-storage leukocyte reduction of whole blood and blood components intended for transfusion, 2001. (<http://www.fda.gov/cber/gdlns/preleuk.pdf>)
- Flegel WA, Wiesneth M, Stampe D, Koerner K. Low cytokine contamination in buffcoat-derived platelet concentrates without filtration. *Transfusion* 1995;35:917-20
- Goodnough LT, Riddell J, Lazarus H, et al. Prevalence of platelet transfusion reaction reactions before and after implementation of leukocyte-depleted platelet concentrates by filtration. *VoxSang* 1993;65:103-7.
- Guide to the preparation, use and quality assurance of blood components*, 7th ed. Strasbourg, France, council of Europe Publishing, 2001:103-26
- Guide to the preparation, use and quality assurance of blood components*, 9th, Council of Europe Publishing, 2003:113-4
- Heddle NM, Klama LN, Griffith L, Roberts R, Shukla G, Kelton JG. A prospective study to identify the risk factors associated with acute reactions to platelet and red cell transfusions. *Transfusion* 1993;33:794-7
- Heddle NM, Klama L, Singer J, Richards C, Fedak P, Walker I, Kelton JG. The role of the plasma from platelet concentrates in transfusion

- reactions. *N Engl J Med* 1994;331:625-8
- Kluter H, Muller-Steinhardt M, Danzer S, Wilhelm D, Kirchner H. Cytokines in platelet concentrates prepared from pooled buffy coats. *Vox Sang* 1995;69:38-43
- Lane TA, Anderson KC, Goodnough LT, Kurtz S, Moroff G, Pisciotto PT, Sayers M, Silberstein LE. Leukocyte reduction in blood component therapy. *Ann Intern Med* 1992;117:151-62
- Lin JS, Tzeng CH, Hao TC, Hu HY, Ho YT, Lyou JY, Liu JM, Ho CH, Yung CH. Cytokine release in febrile non-haemolytic red cell transfusion reactions. *Vox Sang* 2002;82:156-60
- Mangano, M.M. Limited efficacy of leukocyte-depleted platelets for a prevention of febrile transfusion reaction, *American Journal of Clinical Pathology* 1991;95:733-738
- Yazer MH, Podlosky L, Clarke G, and Nahirniak SM. The effect of prestorage WBC reduction on the rates of febrile nonhemolytic transfusion reactions to platelet concentrates and RBC. *Transfusion* 2004;44:10-15
- Menitove JE, McElligott MC, Aster RH. Febrile transfusion reaction : what blood component should be given next? *VoxSang* 1982;42:318-21
- Meryman HT, Hornblower M. The preparation of red cells depleted of leukocytes. *Transfusion* 1986;26:101-6.
- Muyllé L, Joos M, Wouters E, De Bock R, Pectermans ME. Increased tumor necrosis factor α (TNF- α), interleukin 1, and interleukin 6 levels in the plasma of stored platelet concentrates: relationship between TNF α and IL-6 levels and febrile transfusion reaction. *Transfusion* 1993;33:195-9
- Saarinen UM, Kekomaki R, Siimes MA, Myllylä G. Effective prophylaxis against platelet refractoriness in multitransfused patients by use of leukocyte-free blood component. *Blood* 1990;75:512-7
- Shanwell A, Kristiansson M, Remberger M, Ringden O. Generation of

- cytokines in red cell concentration during storage is prevented by prestorage white cell reduction. *Transfusion* 1997;37:678-84
- Sirchia G, Rebulli P, Parravicini A, Carnelli V, Gianotti GA, Bertolini F. Leukocyte depletion of red cell units at bedside by transfusion through a new filter. *Transfusion* 1987;27:402-5.
- Snyder EL. The role of cytokines and adhesive molecules in febrile non-hemolytic transfusion reaction. *Immunol Invest* 1995;24:333-9
- Stack G, Baril L, Napychank P, Snyder EL. Cytokines generation in stored, white cell-reduced, and bacterially contaminated units of red cells. *Transfusion* 1995;35:199-203
- Stack G, Snyder EL. Cytokines generation in stored platelet concentrates. *Transfusion* 1994;34:20-5
- Standards for Blood Banks and Transfusion Services* 22nd, AABB, 2003
- Uhlmann EJ, Isgriggs E, Wallhermfecht M, Goodnough LT. Prestorage universal WBC reduction of RBC units does not affect the incidence of transfusion reaction. *Transfusion* 2001;41:997-1000
- Van de Watering, LM. Beneficial effects of leukocyte depletion of transfused blood on postoperative complications in patients undergoing cardiac surgery: a randomized clinical trial. *Circulation* 1998;97(6):562-568
- Vengelen-Tyler V. *Technical manual*. 12th ed. Bethesda, Maryland : American Association of Blood Banks 1996,543-62
- Zoon KG. Recommendations and licensure requirements for WBC-reduced blood products. *Bethesda, MD, FDA*, 1996
- 中條聖子. 백혈구 제거 필터 사용 후의 잔존 백혈구 수 측정. *検査と技術*. 1997.25: 660
- 기창석, 구홍희, 정혜림, 오덕자, 김대원. 냉장보관 전혈의 cytokine과 anaphylatoxin 생성에 관한 연구. *대한수혈학회지* 1998;9:2 227-33
- 이미경, 김대성, 조남선, 김현욱, 김대원. 저장 전 백혈구 제거 적혈구 제제를 위한

국내제조 필터부착 혈액백 평가. *대한수혈학회지* 2003;14:1 44-54
혈액사업관련지침집. 대한적십자사혈액사업본부, 2004년 개정안

Abstract

Quality Control and Cytokine Analysis of Pre-storage Leukocyte Filtered Red Blood Cells

Sung, Ki Man

Dept. of Biomedical Life Science

The Graduate School of Health and Environment

Yonsei University

Blood transfusion might be the cause of side effects, such as transfusion-transmitted infection, hemolytic transfusion reaction and febrile transfusion reaction. Febrile non-hemolytic transfusion reaction which can be affected from leukocyte in blood product is most often resulted. So, it will be efficient to reduce the side effect if the leukocyte should be eliminated from the blood product, and it has been in general among the advanced nations. In this study, prestorage leukocyte-filtered red blood cells (LF-RBCs) which was applied first in Korea were analysed and compared with the products manufactured by America or European countries. Cytokine such as IL-1 β , IL-6 and TNF- α known as the most common cause of febrile non-hemolytic transfusion reaction(FNHTR) were analysed by the storage period.

First, quality analysis was performed on randomly selected 296 units LF-RBCs. The numbers of post-filtration residual WBC were 0.12 ± 0.16 ($\times 10^6$)

/unit), that show little differences compared with American Association of Blood Bank(AABB) or European range. Hematocrit was 58.2 ± 0.2 , and red blood cell recovery was $98.5 \pm 1.26\%$, which were accepted range by AABB or European standard. Cytokines were tested on 5 units of LF-RBCs and NR-RBCs respectively. The specimens were collected on 1, 17 and 35 days after storage. The cytokines, IL-1 β , IL-6 and TNF- α were detected from only some specimens. IL-1 β was detected from 3 unit, IL-6 was detected from 5 unit and TNF- α was detected from 5 unit, when they were tested with 10 units. In case of IL-1 β , 87% disappearance was detected from LF-RBCs, but 25.5% of increase was observed from NR-RBCs. 42.0% of IL-6 disappearance was detected from LF-RBCs, but 27.4% of IL-6 decreased from NR-RBCs. For TNF- α , 79% disappearance was observed from LF-RBCs, but 75.5% was decreased from RBCs. These results show that the concentrations of cytokines which are known as causative agents of febrile non-hemolytic transfusion reaction(FNHTR) were more decreased from LF-RBCs than from NR-RBCs.

Key words : LF-RBCs, NR-RBCs, FNHTR, Cytokine, ELISA