4종의 혈소판보존액을 첨가한 성분채혈혈소판의 품질평가

김재현¹ · 강정원¹ · 권소영² · 오덕자¹

대한적십자사 혈액수혈연구원¹, 서울남부혈액원²

In vitro Quality Evaluation of Apheresis Platelets in Four Kinds of Platelet Additive Solutions

Jaehyun Kim¹, Jungwon Kang¹, So-Yong Kwon², Deok-Ja Oh¹

Blood Transfusion Research Institute, Korean Red Cross¹, Wonju, Seoul Nambu Blood Center, Korean Red Cross², Seoul, Korea

Background: Platelets (PLTs) stored in platelet additive solution (PAS) presents potential benefits in clinical use by reducing the risk of several plasma-associated adverse transfusion reactions and more plasma may be recovered for fractionation. In this study, we compared *in vitro* characteristics of apheresis PLTs stored in CompoSol PS (Fenwal, Lake Zurich, IL, USA), InterSol (Fenwal, Lake Zurich, IL, USA), SSP⁺ (MacoPharma, Tourcoing, France), T-PAS⁺ (Terumo BCT, Lakewood, CO, USA), or plasma to evaluate the effectiveness of PAS.

Methods: PLTs were collected two times by apheresis from 12 healthy volunteers in a study comparing four kinds of PASs with 35% autologous plasma and 100% plasma-stored apheresis PLTs. The parameters of PLTs, including PLT counts, pH, PLT activation markers, blood gases, and metabolic variables were assessed up to 7-day.

Results: The results of *in vitro* assay including PLT concentration, mean PLT volume, pH, and blood gases for PLTs in four kinds of PASs were similar to those in 100% plasma PLTs. All units had Day 5 pH greater than 6.2. *In vitro* quality rating results, PLTs in T-PAS⁺ had a rating of 5, 4 for CompoSol PS, 2 for SSP⁺, 1 for InterSol, and 2 for plasma on Day 5.

Conclusion: Partial replacement of plasma with CompoSol PS, SSP⁺, or T-PAS⁺ in PLTs showed better or equivalent quality and preservability of PLTs compared to PLTs in 100% plasma. The use of PAS for storage of PLTs in clinical practice may have an advantage as PAS-stored PLTs have a reduced volume of plasma. (Korean J Blood Transfus 2016;27:55-67)

Key words: Apheresis platelets, Platelets additive solution, Storage

서론

혈소판은 채혈과 보존과정 중 구조와 기능에

많은 변화를 겪게 되는데, 20~24°C에 보관하는 동안 해당과정(glycolysis)을 통해 젖산(lactate)을 생성하여 pH가 감소하고, 혈소판의 형태가 변화

Received on December 7, 2015. Revised on January 19, 2016. Accepted on January 20, 2016

Correspondence to: Deok-Ja Oh

Blood Transfusion Research Institute, Korean Red Cross, 50 Hyeoksin-ro, Wonju 26465, Korea

Tel: 82-33-811-0001, Fax: 82-33-811-0007, E-mail: dj57_2000@redcross.or.kr

© This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.
Copyright ©2016 The Korean Society of Blood Transfusion

며 기능이 저하되어 유효기간이 5일에 불과하다. 보관 중에 일어나는 혈소판의 변화를 최소화하기 위해 혈장을 대체할 수 있는 혈소판보존액(platelet additive solution, PAS)이 1950년대 후반부터 개발되었다.¹⁾ PAS의 주요성분은 PAS 종류에 따라 조성 및 함량이 조금씩 다르지만 주로 혈소판의 에너지원으로써 아세테이트(acetate), 혈소판 응집과 활성화를 억제하기 위한 구연산염(citrate), 삼투압 유지를 위한 염화나트륨(NaCl), pH 저하를 방지하기 위한 인산염(phosphate)과 기타 전해질 등으로 구성되어 있다. 1980년대에는 PAS에 보존한 혈소판제제의 품질이 입증되면서 유럽을 중심으로 사용되었으며,²⁻⁴⁾ 미국에서도 2009년도에 Intersol (Fenwal, Lake Zurich, IL, USA)이 미국 FDA (US Food and Drug Administration)의 승인을 받아 사용되고 있다.

PAS를 사용하면 혈장으로 인한 발열성 반응이나 알레르기성 반응 등의 수혈부작용을 줄일 수 있는 임상적 이점과 혈소판제제 내의 혈장을 대체하여 응고인자 VIII (coagulation factor VIII)과 같은 분획제제의 제조를 위한 추가 혈장을 보다 많이 확보할 수 있다는 장점이 있는 것으로 보고되고 있다.⁴⁾ 그러나 지난 10년 동안 일본에서는 농축혈소판제제의 보존액을 혈장에서 PAS로 전환하여야 하는 근본적인 이유가 분획용 혈장 채집의 목적에서 비용혈성수혈부작용 예방을 위한 것으로 개념이 바뀌게 되었으며, PAS에 보존한 혈소판은 혈장에 보존한 혈소판에 비해 혈소판의 특성 유지에 보다 유리한 것으로 보고되었다.⁵⁾ 한편 최근 Saunders 등⁶⁾의 연구에 의하면 혈소판을 보존하는 동안 혈소판의 기능 및 생존에 포도당이 매우 중요한 역할을 하고 있음을 보고하였다. 현재 혈소판제제에 대한 PAS의 적용은 포도당이 포함되어 있지 않은 PAS가 약 65~70%의 혈장을 대체함으로써 혈소판제제에 남아있는 30

~35%의 잔여 혈장 안에 포함되어 있는 포도당으로 하여금 혈소판의 에너지원으로 사용되도록 하고 있다.⁷⁾ 혈장의 65~70%를 PAS로 대체하여 보존한 혈소판제제의 경우 100% 혈장에 보존되어 있는 혈소판제제에 비해 알레르기성 반응을 약 50% 정도 감소시킬 수 있는 것으로 보고되고 있다.^{8,9)}

국내에서 농축혈소판제제는 혈소판풍부혈장(platelet rich plasma, PRP)법에 의해 제조되고 있다. PAS를 모든 혈소판제제에 적용하려면 혈소판제제의 제조방식 중 하나인 PRP법에 적용할 수 있는 PAS가 현재로서는 없기 때문에 먼저 혈소판제제 제조방식인 PRP법을 백혈구연층(buffy coat, BC)법으로 전환하여야 한다고 보고되고 있다.¹⁰⁾ 혈소판제제 제조방식을 PRP법에서 BC법으로 전환하기 위해서는 장비도입에 따른 직접 경비 이외에 근무환경에 대한 영향 평가와 교육, 훈련 및 관계 법령의 정비와 정부 부처와의 협의가 이루어져야 하므로 즉각적으로 시행하기는 어렵다. 그러나 혈소판성분채혈(platelet apheresis)로 얻어진 성분채혈혈소판제제(apheresis platelets, A-PLT)의 경우에도 혈장을 제거하고 PAS를 첨가하여 보존할 수 있는데,¹¹⁻¹³⁾ 이는 수혈부작용의 예방과 우수한 성능의 혈소판제제를 위해 중요하다고 여겨진다. 이에 본 연구에서는 외국에서 임상적 사용이 승인된 4종의 PAS에 보존한 성분채혈혈소판의 *in vitro* 특성을 비교 평가하였다.

대상 및 방법

1. 혈소판성분채혈과 성분채혈혈소판의 보존

본 연구는 대한적십자사 혈액관리본부 생명윤리심의위원회의 승인을 받았으며, 2015년 2월부터 10월까지 연구 참여에 동의한 건강한 성인 남·

여 12명으로부터 혈소판성분채혈을 실시하였다. 성분채혈혈소판은 대한적십자사 강원혈액원 원주터미널센터에서 Amicus 혈액성분채집기와 성분채혈키트(Fenwal, Lake Zurich, IL, USA)를 사용하여 250 mL을 채집하였고, 1개월 간격으로 1명의 연구 참여자로부터 2번의 채혈을 실시하였다. 채집한 성분채혈혈소판의 평균 부피는 250 ± 5 mL이었다. 채집한 성분채혈혈소판 중 1회는 PAS를 첨가하지 않고 원상태로 보존하였고, 다른 1회는 혈장의 65%를 PAS로 치환한 후 보존하였다. PAS는 InterSol, CompoSol PS (Fenwal, Lake Zurich, IL, USA), SSP⁺ (MacoPharma, Tourcoing, France), T-PAS⁺ (Terumo BCT, Lakewood, CO, USA) 등 4종을 사용하였으며, 각각의 내용물 조성은 Table 1과 같다. 각각의 PAS를 첨가한 성분채혈혈소판의 품질평가를 위해 무작위로 3명씩의 연구 참여자에게 채혈된 성분채혈혈소판을 사용하였다.

성분채혈혈소판은 채혈 후 교반하지 않는 조건으로 상온에서 1시간 존치한 후 Helmer PC900i

혈소판보존기(Helmer Scientific, Noblesville, IN, USA)에서 22°C 조건으로 교반하면서 7일(168시간)간 보관하였다. 혈소판 생존능 및 성능과 관련된 체외지표검사를 위해 혈소판 교반 전을 0일로 정의하고, 교반을 시작한 후 1일(24시간), 3일(72시간), 5일(120시간), 7일(168시간)이 경과한 시점에서 혈소판보존액으로부터 10 mL의 혈소판을 채취하였다. 혈소판보존액으로부터 혈소판의 채취는 sampling site coupler (Fenwal, Lake Zurich, IL, USA)를 혈소판보존액에 삽입한 후 18 게이지 주사기를 이용하여 무균적으로 채취하였다.

2. 성분채혈혈소판 품질평가 지표

혈소판 농도와 평균혈소판부피(mean platelet volume, MPV)는 자동혈구분석기 Sysmex KX-21N (Sysmex, Kobe, Japan)을 사용하여 측정하였다. pH, pCO₂, pO₂는 자동가스분석기 i-STAT (Abbott Laboratories Point of Care, Princeton, NJ, USA)를 사용하여 측정하였다. 자동가스분석기로 측정된 pH_{37°C}는 Ashwood 등¹⁴⁾의 다음과 같은 계산식에 의해 pH_{22°C}로 변환하였다.

$$\text{pH}_{22^\circ\text{C}} = \text{pH}_{37^\circ\text{C}} + [-0.0146 + 0.0065 (7.4 - \text{pH}_{37^\circ\text{C}})] \quad (22-37)$$

Glucose와 lactate의 정량은 혈소판 5 mL을 1,000 xg에서 10분간 원심 분리한 뒤, 상층액을 3 mL의 전용용기에 담아 glucose 검사는 Gluco-quant Glucose/HK 시약(Roche Diagnostics, Basel, Switzerland)과 Hitachi Modular 7600 장비(Roche Diagnostics, Basel, Switzerland), lactate 검사는 Lactate Gen.2 시약(Roche Diagnostics, Basel, Switzerland)과 Cobas Integra 800 장비(Roche Diagnostics, Basel, Switzerland)로 시행하는 수탁검사기관에 검사를 의뢰하였다. 혈소판 보존 중 세균검사는 혈소판

Table 1. Composition of four kinds of platelet additive solutions in this study (mmol/L based on the package insert)

	InterSol	CompoSol PS	SSP ⁺	T-PAS ⁺
NaCl	77.3	90.0	69.3	69.3
Na ₃ Citrate	10.8	10.9	10.8	12.3
Na Acetate	32.5	27.0	32.5	53.8
NaH ₂ PO ₄ /Na ₂ HPO ₄	28.2	-	28.2	28.2
KCl	-	5.0	5.0	5.0
MgCl ₂	-	1.5	1.5	1.5
Na Gluconate	-	23.0	-	-

InterSol (Fenwal, Lake Zurich, IL, USA), CompoSol PS (Fenwal, Lake Zurich, IL, USA), SSP⁺ (MacoPharma, Tourcoing, France), T-PAS⁺ (Terumo BCT, Lakewood, CO, USA).

보존 0일차에 10 mL의 검체를 채취하여 40 mL의 BacT/ALERT SA 배양액과 40 mL의 BacT/ALERT SN 배양액(bioMérieux, Marcy l'Etoile, France)에 각각 5 mL씩 접종하고 BacT/ALERT 3D에서 14일간 배양하여 검사하였다.

3. 혈소판 활성화 지표

혈소판의 활성화 정도는 혈소판 표면에 발현되는 CD62P (P-Selectin)를 유세포 분석방법(flow cytometric method)으로 측정하여 평가하였다. 혈소판 10 μ L를 PBS (phosphate-buffered saline) 990 μ L에 부유시킨 다음, PE mouse anti-human CD62P (BD Biosciences, San Jose, CA, USA)와 FITC mouse anti-human CD42b (BD Biosciences, San Jose, CA, USA)를 사용하여 염색하였다. 음성대조로는 κ 동형항체(κ isotype antibody)인 PE mouse IgG1과 FITC mouse IgG1 (BD Biosciences, San Jose, CA, USA)을 각각 사용하였다. CD62P+ 혈소판과 CD42b+ 혈소판은 BD FACSCanto II (BD Biosciences, San Jose, CA, USA)를 사용하여 10,000 counts까지 측정하였다. CD62P+ 혈소판의 비율은 CD62P+/CD42b+로 표현하였다. 수용성 P-Selectin (soluble P-Selectin, sP-Selectin/CD62P)은 Human sP-Selectin/CD62P Immunoassay (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA)를 사용하여 측정하였고, Annexin V는 FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit I (BD Biosciences, San Jose, CA, USA)과 BD FACSCanto II (BD Biosciences, San Jose, CA, USA)를 사용하여 분석하였다.

4. 혈소판 품질에 대한 *in vitro* rating

혈소판 품질에 대한 *in vitro* rating은 van der Meer 등¹⁵⁾의 방법에 따라 CD62P 발현량, Annexin V, 젖산(lactate) 농도 등 3가지 지표를 각각 0점 (poor quality)에서 2점(good quality)까지 점수화하

여 평가하였다. 각 지표에 대한 점수 구간은 CD62P의 경우 혈소판에서 발현량이 >30%인 경우 0점, 20~30%는 1점, <20%인 경우 2점으로 하였고, Annexin V의 경우 >20%는 0점, 10~20%는 1점, <10%는 2점으로 하였다. 젖산 농도는 >20 mM이 0점, 10~20 mM이 1점, <10 mM을 2점으로 하였다. 3가지 지표의 점수를 합하여 0점(poor quality)부터 6점(excellent quality)까지 혈소판 품질에 대한 *in vitro* rating하였다.

5. 통계분석

혈소판 보존 중 보존액에 따른 혈소판 품질관리 지표 및 활성화 지표 값의 차이는 IBM SPSS statistics ver. 23 (IBM Co., Armonk, NY, USA)을 사용하여 비모수검증인 Kruskal-Wallis test로 분석하였다. *P* value 값은 0.05 미만일 때, 유의한 차이가 있는 것으로 간주하였다.

결 과

혈소판 수는 혈소판 보존 0일차에서부터 실험 기간인 보존 7일까지 모든 시험군에서 큰 변화가 없었다. pH의 경우 100% 혈장에 보존한 혈소판 및 PAS에 보존한 혈소판 모두 보존 7일차 까지도 큰 변화 없이 잘 유지되었으며, 식품의약품 안전처 생물학적제제 품질관리기준인 pH 6.2 이상을 충족하였다. 혈소판 보존액 안의 산소분압(pO_2)은 사용한 보존액의 종류에 상관없이 모두 혈소판 보존 7일 동안 지속적으로 증가하였으며 이산화탄소분압(pCO_2)은 지속적으로 감소하였다. MPV의 경우에도 100% 혈장에 보존한 혈소판 및 PAS에 보존한 혈소판 모두 보존 7일까지 변화가 없었으며, 미생물 배양실험 결과 100% 혈장에 보존한 혈소판 및 PAS에 보존한 혈소판 모두에서 세균오염은 발견되지 않았다(Table 2).

Table 2. Platelet survival and metabolic parameters of Amicus-derived apheresis platelets over 7-day storage in 100% plasma and four kinds of platelet additive solutions with 35% autologous plasma (mean±SD)

<i>In vitro</i> variable	Media	<i>n</i>	Days				
			0	1	3	5	7
PLT Count ($\times 10^{10}/L$)	100% plasma	12	133.4±12.9	132.8±9.2	131.0±9.1	131.4±9.3	127.4±10.8
	InterSol	3	121.3±13.9	127.2±5.2	121.5±9.9	122.0±11.9	123.5±11.3
	CompoSol PS	3	129.8±21.2	124.5±18.1	122.7±18.0	120.3±14.9	122.5±17.3
	SSP ⁺	3	146.3±3.3	134.0±7.6	134.8±10.3	126.7±9.4	125.7±8.0
	T-PAS ⁺	3	132.2±15.3	130.8±16.8	132.7±17.7	131.8±13.3	128.7±14.8
pH (22°C)	<i>P</i> value*		0.341	0.975	0.715	0.793	0.990
	100% plasma	12	7.24±0.04	7.44±0.04	7.44±0.10	7.34±0.14	7.21±0.18
	InterSol	3	7.29±0.02	7.25±0.00	7.20±0.04	7.14±0.05	7.18±0.08
	CompoSol PS	3	7.14±0.03	7.25±0.02	7.30±0.01	7.29±0.03	7.27±0.05
	SSP ⁺	3	7.27±0.03	7.29±0.06	7.23±0.16	7.27±0.15	7.28±0.12
MPV (fL)	T-PAS ⁺	3	7.32±0.02	7.34±0.02	7.37±0.01	7.39±0.02	7.38±0.03
	<i>P</i> value*		0.004	<0.001	0.007	0.067	0.059
	100% plasma	12	7.6±0.7	7.4±0.6	7.5±0.6	7.4±0.6	7.5±0.7
	InterSol	3	8.0±0.6	8.0±0.6	8.2±0.6	8.2±0.6	8.2±0.6
	CompoSol PS	3	7.0±0.1	7.0±0.1	7.0±0.1	7.0±0.1	7.0±0.1
pCO ₂ (mmHg at 37°C)	SSP ⁺	3	7.9±0.5	7.3±0.0	7.9±0.8	8.0±0.7	8.1±0.9
	T-PAS ⁺	3	7.4±0.4	7.3±0.4	7.4±0.3	7.5±0.4	7.5±0.3
	<i>P</i> value*		0.289	0.251	0.154	0.181	0.099
	100% plasma	12	73.7±6.1	41.9±4.4	34.1±5.0	32.0±4.8	29.2±3.0
	InterSol	3	28.0±1.1	28.9±1.9	26.8±4.3	23.4±4.0	19.1±2.3
pO ₂ (mmHg at 37°C)	CompoSol PS	3	31.0±3.0	24.5±1.8	22.4±1.6	22.2±2.3	22.1±2.7
	SSP ⁺	3	27.4±2.3	27.1±3.1	27.3±5.9	24.8±4.0	22.5±1.9
	T-PAS ⁺	3	26.3±1.7	25.4±1.9	24.5±1.8	23.2±1.4	22.7±1.2
	<i>P</i> value*		<0.001	<0.001	0.006	0.004	0.008
	100% plasma	12	82.5±7.2	86.5±9.3	91.2±10.6	90.0±10.7	102.8±11.5
pO ₂ (mmHg at 37°C)	InterSol	3	108.8±20.6	84.5±9.4	95.8±19.3	106.3±21.7	105.7±17.1
	CompoSol PS	3	87.0±12.4	92.8±16.0	101.8±9.4	106.7±11.6	104.3±10.9
	SSP ⁺	3	69.7±7.17	82.2±8.72	77.8±10.62	79.7±14.27	82.8±13.70
	T-PAS ⁺	3	80.7±4.9	91.3±12.3	89.8±0.2	94.2±7.2	98.0±7.0
	<i>P</i> value*		0.099	0.907	0.302	0.166	0.464

Table 2. Continued

<i>In vitro</i> variable	Media	<i>n</i>	Days						
			0	1	3	5	7		
Glucose (mmol/L)	100% plasma	12	18.30±1.00	17.44±1.04	15.23±1.04	13.05±1.61	10.73±2.46		
	InterSol	3	6.25±0.32	5.55±0.27	3.16±0.43	0.98±0.66	0.07±0.03		
	CompoSol PS	3	6.51±0.28	6.14±0.18	5.11±0.39	3.89±0.50	2.53±0.48		
	SSP ⁺	3	6.90±0.85	6.57±0.80	5.73±0.19	3.02±2.11	2.18±1.52		
	T-PAS ⁺	3	6.42±0.58	5.92±0.39	4.81±0.14	3.77±0.09	2.33±0.05		
	<i>P</i> value*		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001		
Lactic acid (mmol/L)	100% plasma	12	3.27±0.75	4.49±0.55	8.43±1.46	12.04±2.07	16.31±3.87		
	InterSol	3	2.45±0.34	4.00±0.05	8.38±0.81	12.17±0.89	14.10±0.85		
	CompoSol PS	3	1.51±0.29	2.85±0.35	4.81±0.24	7.10±0.71	9.78±0.67		
	SSP ⁺	3	2.32±0.47	3.74±0.98	5.10±0.47	10.20±3.45	12.28±1.90		
	T-PAS ⁺	3	1.73±0.44	2.69±0.49	4.90±0.54	7.19±0.66	9.77±0.76		
	<i>P</i> value*		0.005	0.009	0.003	0.013	0.006		

InterSol, CompoSol PS, SSP⁺, T-PAS⁺: See Table 1.

**P* values were obtained by Kruskal-Wallis test between PLTs in 100% plasma and PLTs in four kinds of PASs with 35% autologous plasma. Abbreviations: PLT Count, platelet concentration; MPV, Mean platelet volume.

보존 중 혈소판 대사(metabolism)의 변화는 포도당과 젖산 농도를 측정하여 평가하였다. 혈소판 보존 7일 동안 모든 시험군에서 포도당의 감소와 젖산 증가가 관찰되었으며 증감의 양상은 혈소판을 보존한 보존액에 따라 차이가 있었다(Table 2). 즉, 포도당 농도의 감소 비율은 보존 0일차 때의 포도당 농도를 100%라고 했을 때 100% 혈장에 보존한 혈소판에서 보존 1일차에 95.3%, 3일차에 83.2%, 5일차에 71.3%, 7일차에 58.6%로 감소하였다. 포도당의 감소비율은 100% 혈장에 보존한 혈소판보다 PAS에 보존한 혈소판에서 감소비율이 컸으며, 특히 InterSol에 보존한 혈소판에서 포도당 농도의 감소비율이 보존 1일차에 88.8%, 3일차에 50.6%, 5일차에 15.7%, 7일차에 1.1%로 크게 나타났다. 그러나 포도당의 절대량으로 보면 100% 혈장에 보존한 혈소판이 보존 0일차에서부터 보존 7일차까지 약 7.57 mmol/L를 소모하여 포도당의 소비량은 100% 혈장에 보존한 혈소판에서 가장 높은 것으로 나타났다. 보존기간에 따른 젖산의 증가도 100% 혈장에 보존한 혈소판에서 가장 높게 나타났다. 그러나 젖산 농도의 증가 비율도 포도당 농도와 마찬가지로 100% 혈장에 보존한 혈소판보다는 PAS에 보존한 혈소판에서 증가비율이 큰 것으로 나타났다(Table 2).

혈소판 보존 중 보존 7일차에 CD62P를 발현하는 혈소판의 수와 sCD62P의 양은 InterSol에 보존한 혈소판에서 가장 높게 나타났으며, T-PAS⁺에 보존한 혈소판에서 가장 낮게 나타났다. 혈소판 보존 중 CD62P 발현량 증가는 혈소판 보존 3일차까지는 InterSol, CompoSol PS, SSP+에 보존한 혈소판의 경우 100% 혈장에 보존한 혈소판보다 높았으나 보존 5일차부터 100% 혈장에 보존한 혈소판에서 CD62P의 발현량이 급격히 증가하여 보존 7일차에는 PAS에 보존한 혈소판에서 CD62P

의 발현 비율과 비슷하였다. 그러나 혈소판 보존 0일차부터 7일차까지 100% 혈장에 보존한 혈소판과 PAS에 보존한 혈소판 사이의 CD62P 발현량 차이는 통계적으로 의미가 없었다(*P* value, 0.123~0.401). 반면, CD62P가 세포표면에서 유리되어 혈장에 수용성 형태로 존재하는 또 다른 혈소판 활성화 지표인 sCD62P¹⁶⁾의 경우에는 혈소판 보존 0일차부터 7일차까지 InterSol을 제외한 PAS에 보존한 혈소판에서 100% 혈장에 보존한 혈소판에 비해 상대적으로 낮게 나타났다(*P* value, 0.004~0.021; Table 3).

Annexin V의 발현량은 100% 혈장에 보존한 혈소판에 비해 InterSol 과 SSP+에 보존한 혈소판의 경우 보존액에 따른 의미 있는 차이는 발견할 수 없었다(*P* value, 0.050~0.366; Table 3). 그러나 T-PAS⁺와 CompoSol PS에 보존한 혈소판의 경우 Annexin V 발현비율이 100% 혈장 및 다른 보존액에 보존한 혈소판 보다 상대적으로 낮게 나타났다(Table 3).

혈소판을 보존한 보존액에 따른 혈소판 품질 차이를 종합적으로 평가하기 위해 CD62P 발현량, Annexin V, 젖산농도 등 3가지 지표를 점수화하여 *in vitro* rating한 결과, 혈소판 보존 0일차에서 SSP⁺, T-PAS⁺에 보존한 혈소판이 5점으로 100% 혈장에 보존한 혈소판과 동일하게 우수한 품질을 나타내었다(Fig. 1). 보존 0일차에서 CompoSol PS에 보존한 혈소판의 품질이 6점으로 가장 우수한 것으로 나타났으며, InterSol에 보존한 혈소판이 4점으로 가장 낮게 나타났다. 한편 혈소판 보존 5일차에서는 100% 혈장에 보존한 혈소판의 품질이 2점인 반면, SSP+에 보존한 혈소판이 2점, CompoSol PS에 보존한 혈소판이 4점, T-PAS⁺에 보존한 혈소판이 5점으로 나타났다. 특히 T-PAS⁺에 보존한 혈소판의 경우 보존 0일차의 초기 혈소판품질에서 보존 5일차에 이르기

Table 3. Platelet activation and apoptosis parameters of Amicus-derived apheresis platelets over 7-day storage in 100% plasma and four kinds of platelet additive solutions with 35% autologous plasma (mean±SD)

<i>In vitro</i> variable	Media	<i>n</i>	Days				
			0	1	3	5	7
CD62P (%)	100% plasma	12	19.6±13.9	19.3±9.4	20.7±9.7	25.1±14.7	27.7±10.0
	InterSol	3	33.3±15.6	31.0±11.2	41.3±11.1	44.5±14.6	42.4±10.3
	CompoSol PS	3	14.6±2.0	17.5±3.3	23.5±6.2	23.9±0.9	25.3±4.2
	SSP ⁺	3	17.9±3.4	18.3±3.2	21.6±6.8	29.9±11.8	34.2±14.6
	T-PAS ⁺	3	15.7±2.4	16.0±2.2	15.0±1.2	15.4±2.2	19.6±1.5
	<i>P</i> value*		0.401	0.385	0.168	0.066	0.123
sCD62P (ng/mL)	100% plasma	12	69.5±30.5	81.2±45.0	98.7±48.5	123.1±87.0	144.5±50.6
	InterSol	3	46.7±57.1	51.5±39.5	154.8±74.6	250.7±88.7	279.8±64.8
	CompoSol PS	3	38.8±13.6	55.4±27.1	57.6±17.7	56.7±15.5	71.4±24.9
	SSP ⁺	3	14.0±1.5	24.0±5.0	47.0±15.5	66.3±19.7	90.3±22.7
	T-PAS ⁺	3	18.1±5.6	22.7±8.8	38.6±19.4	48.3±11.2	65.2±16.3
	<i>P</i> value*		0.014	0.021	0.008	0.004	0.005
CD42b (%)	100% plasma	12	97.3±3.5	97.7±2.3	96.9±2.0	93.1±8.5	92.0±8.0
	InterSol	3	90.6±6.1	93.4±2.7	89.9±5.1	88.4±2.5	85.8±4.7
	CompoSol PS	3	98.9±0.2	98.3±1.4	98.7±0.3	97.0±1.1	96.5±1.1
	SSP ⁺	3	98.8±0.3	98.2±0.9	98.0±1.0	96.9±1.8	93.9±5.0
	T-PAS ⁺	3	98.3±1.5	98.5±1.1	98.5±0.5	97.2±0.8	96.3±0.7
	<i>P</i> value*		0.554	0.569	0.036	0.052	0.210
Annexin V+ (%)	100% plasma	12	15.4±4.3	16.7±5.1	19.9±6.6	24.9±8.5	27.5±7.1
	InterSol	3	9.2±5.5	12.0±6.3	15.3±2.8	21.4±3.4	26.9±6.1
	CompoSol PS	3	9.0±5.5	9.9±4.9	11.9±2.6	14.4±3.5	15.9±5.1
	SSP ⁺	3	13.8±1.1	14.5±0.9	20.0±2.6	24.0±1.0	29.1±11.3
	T-PAS ⁺	3	15.7±1.3	14.5±1.2	16.2±1.7	16.5±3.2	18.2±3.4
	<i>P</i> value*		0.320	0.366	0.094	0.075	0.050

InterSol, CompoSol PS, SSP⁺, T-PAS⁺: See Table 1.**P* values were obtained by Kruskal-Wallis test between PLTs in 100% plasma and PLTs in four kinds of PASs with 35% autologous plasma.

Fig. 1. Paired evaluation of PAS solutions. CD62P, Annexin V, and lactate concentration collapsed into one rating value (6=excellent quality, 0=poor quality). InterSol, CompoSol PS, SSP⁺, T-PAS⁺: See Table 1.

까지 품질의 변화가 없이 잘 유지되고 있음을 보여 주었다. 반면 InterSol을 보존액으로 사용한 혈소판의 경우 보존 0일차에는 혈소판의 품질이 4점이었으나 보존 5일차에는 1점으로 품질변화의 폭이 상대적으로 크게 나타났다(Fig. 1).

고 찰

성분채혈혈소판에서 PAS 적용의 유용성을 평가하기 위해 100% 혈장에 보존된 혈소판과 4종의 서로 다른 PAS가 65%의 혈장을 대체한 혈소판을 비교 평가하였다. 본 연구결과 100% 혈장에 보존한 혈소판 및 평가한 4종의 PAS 모두 pH 유지기능은 우수하였다(Table 2). 혈소판 보존 기간 중 혈소판 농도의 감소, 평균혈소판부피(mean platelet volume, MPV)의 증가 경향은 혈장 및 InterSol, CompoSol PS, SSP⁺, T-PAS⁺에 보존한 혈소판 모두에서 나타났으며 증감의 비율도 각 보존제에 따른 유의한 차이는 발견할 수 없었다(Table 2). 또한 혈소판 보존액 안의 pO₂는 사용한

보존액의 종류에 상관없이 모두 혈소판 보존 7일 동안 지속적으로 증가하였으며, 반대로 pCO₂는 지속적으로 감소하였다. 일반적으로 혈소판 보존 중 혈소판은 대사 활동으로 산소를 소비하고 이산화탄소를 생성하여 혈소판 보존액 안에는 산소 농도가 감소하고 이산화탄소 농도는 증가하게 된다. 그러나 polyolefin 백이나 TOTM (Trioctyl trimellitate)을 가소제로 사용한 PVC (Polyvinyl Chloride) 백 등 제2세대 혈소판 보존백은 가스투과성을 높인 저장 백을 사용하므로 유기호흡(aerobic respiration)과 당대사로 발생된 이산화탄소를 배출하여 저장 백 내의 이산화탄소의 축적과 산소의 고갈을 예방하게 된다.¹⁷⁾ 따라서 혈소판 보존 7일 동안 혈소판 백 내부의 pO₂는 증가하고 pCO₂는 낮아지는 경향은 Kostelijk 등¹⁸⁾의 연구에서도 볼 수 있듯이 제2세대 혈소판 보존백에서 혈소판 저장손상(storage lesion)에 따른 혈소판의 산소소모 감소로 나타나는 것으로 생각된다.

CompoSol PS, SSP⁺ 및 T-PAS⁺에 보존한 혈소판에서 포도당 소비량이 100% 혈장 및 InterSol

에 보존한 혈소판 보다 낮았으며 CD62P의 발현량, Annexin V 등과 같은 혈소판의 기능적 지표들을 평가한 결과 CompoSol PS, SSP⁺, T-PAS⁺에 보존한 혈소판이 100% 혈장이나 InterSol에 보존한 혈소판보다 기능적으로 우수한 것으로 나타났다. 이는 InterSol에는 포함되어 있지 않으나, CompoSol PS, SSP⁺, T-PAS⁺에 포함되어 있는 칼륨과 마그네슘이(Table 1) 혈소판에서 해당작용(glycolysis)의 가속화를 억제하고 효과적으로 혈소판의 특성을 잘 유지할 수 있도록 했다는 것을 의미한다. 이러한 결과는 PAS에서 혈소판의 *in vitro* 특성을 유지하기 위해 칼륨과 마그네슘이 중요하다고 보고한 Gulliksson 등¹⁹⁾과 de Wildt-Eggen 등²⁰⁾의 연구 결과와도 일치하고 있다.

CD62P 발현량, Annexin V, 젖산농도 등 3가지 지표를 점수화하여 혈소판의 품질을 *in vitro* rating한 결과, T-PAS⁺가 혈소판의 기능과 품질을 유지하는데 가장 우수한 성능을 보였는데(Fig. 1), T-PAS⁺도 다른 3종의 PAS처럼 포도당을 함유하고 있지는 않다. 단 한 가지 흥미로운 것은 아세테이트(Na acetate) 농도를 제외하고 그 조성이 T-PAS⁺와 거의 동일한 SSP⁺의 경우 보존 0일차의 혈소판 품질은 T-PAS⁺와 동일하였으나 보존 5일차의 혈소판 품질은 *in vitro* rating 결과 2점으로 T-PAS⁺의 5점과 큰 차이를 보였다는 점이다. 아세테이트는 대사기질(metabolic substrate)로 TCA cycle에서 포도당이 젖산으로 전환되는 양을 감소시키는 것으로 알려져 있으며,²¹⁻²³⁾ 중탄산염을 생성하여 수소이온을 제거함으로써 혈소판 보관 중의 pH를 유지시키는 것으로 알려져 있다.¹³⁾ 또한 PAS에 아세테이트를 첨가하면 포도당의 소모를 줄일 수 있는 것으로 알려져 있다.²⁴⁾ 본 연구 결과에서도 pH는 혈소판 보존기간 동안 비교대상 중 T-PAS⁺에서 가장 잘 유지되었다. 한편 SSP⁺와 비교하여 T-PAS⁺에서 포도당의 소모량은 비

슷하였으나 젖산의 생성이 낮게 나타났고, 특히 CD62P와 Annexin V의 발현량이 낮게 나타나 아세테이트의 농도에 따라 혈소판의 생존 및 활성화에 영향을 미친 것으로 생각된다. 또한 혈소판을 7일차까지 보존하는 기간 중 평균 혈소판 수, MPV, pO₂, pCO₂ 등의 변화에서는 100% 혈장에 보존한 혈소판과 4종의 PAS에 각각 보존한 혈소판을 비교했을 때 큰 차이가 없어 PAS로 치환된 혈소판에서 35% 잔여 혈장에 포함되어 있는 포도당과 함께 PAS 용액 안에 있는 아세테이트가 혈소판 대사에 효과적으로 이용된 것으로 보인다. 한편, 100% 혈장에 보존한 혈소판과 비교하여 InterSol을 제외한 3종의 PAS에 보존한 혈소판이 세포사멸, 혈소판 활성화 및 젖산 생성 억제 측면에서 성능이 우수하게 나타나 혈소판 보존과 기능 유지에 100% 혈장보다 PAS가 유리한 것으로 생각된다. 그러나 본 연구의 제한 점으로 연구 대상이 되는 성분채혈혈소판의 수가 적어 검정력이 떨어진다는 점이 있다. 또 다른 제한점으로는 4종의 PAS와 100% 혈장에 보존한 혈소판의 특성 비교에서 두 그룹간에는 모두 동일 조건이기는 하지만 보존기간이 길수록 혈소판백내 혈소판제제의 부피는 줄어들었으므로 실제 동일한 부피의 혈소판제제 보관시의 영향을 그대로 반영하기에는 무리가 있다는 점이다.

결론적으로 혈소판제제에 포함되어 있는 혈장의 일부를 PAS로 대체하였을 경우, InterSol을 제외한 CompoSol PS, SSP⁺ 및 T-PAS⁺에 보존한 혈소판의 품질 및 보존성능은 100% 혈장에 보존한 혈소판 보다 동등하거나 우수한 결과를 보여 PAS 적용에 따른 발열성 반응이나 알레르기성 반응 등의 수혈부작용을 줄일 수 있는 임상적 이점과 분획용 혈장을 보다 많이 확보할 수 있다는 장점이 있어 혈소판제제에 PAS 적용의 유용성이 있는 것으로 사료된다. 한편 혈소판제제에 PAS

를 적용하여도 제제 안에는 30~35% 잔여 혈장이 포함되어 있으므로, 혈소판 수혈 후 심한 알레르기성 반응이나 아나필락시스 반응을 보인 환자에 적용하는 세척혈소판을 완전히 대체하기는 힘들다. 따라서 혈장을 완전히 제거한 세척혈소판이 필요한 경우 제조 후 보존기간을 증가시키기 위하여 100% PAS로 대체 후 보존이 가능할 수 있겠으나, 이 경우의 혈소판제제의 평가에 대해서는 추가적인 연구가 필요할 것으로 여겨진다.

요 약

배경: 혈소판을 혈소판보존액(platelet additive solutions, PAS)에 보존하면 혈장으로 인한 수혈부작용의 위험을 줄일 수 있는 임상적 이점과 분획용 혈장을 보다 많이 확보할 수 있다는 장점이 있다. 본 연구에서는 혈소판제제에서 PAS 적용의 유용성을 평가하기 위해 CompoSol PS (Fenwal, Lake Zurich, IL, USA), InterSol (Fenwal, Lake Zurich, IL, USA), SSP⁺ (MacoPharma, Tourcoing, France), T-PAS⁺ (Terumo BCT, Lakewood, CO, USA) 및 혈장에 보존한 성분채혈혈소판의 *in vitro* 특성을 비교 평가하였다.

방법: 건강한 연구참여자 12명으로부터 2회에 걸친 혈소판성분채혈로 혈소판을 채집하여 100% 혈장에 보존되어 있는 혈소판과 35% 자가혈장이 포함된 4종의 PAS 용액에 보존되어 있는 혈소판을 비교 분석하였다. 혈소판 수, pH, 혈소판 활성화 지표, 혈액가스, 물질대사 지표 등 혈소판 품질 지표를 보존 7일차까지 분석하였다.

결과: 4종의 PAS에 보존한 혈소판제제의 혈소판 수, 평균혈소판부피, pH, 혈액가스 등 대부분의 *in vitro* 품질관리 지표는 100% 혈장에 보존한 혈소판의 결과와 유사하였고, 모든 제제에서 pH는 보존 5일차까지 6.2 이상을 유지하였다. 혈소

판 품질에 대한 *in vitro* rating 결과, 혈소판 보존 5일차에서 T-PAS⁺에 보존한 혈소판이 5점, CompoSol PS에 보존한 혈소판이 4점, 혈장에 보존한 혈소판 2점, SSP⁺에 보존한 혈소판도 2점, InterSol에 보존한 혈소판이 1점으로 나타났다.

결론: 혈소판제제에 포함되어 있는 혈장의 일부를 CompoSol PS, SSP⁺ 및 T-PAS⁺로 대체한 혈소판의 품질 및 보존성능은 100% 혈장에 보존한 혈소판 보다 동등하거나 우수한 결과를 보여, PAS의 임상적 사용은 혈소판 수혈 시 혈장의 양을 줄일 수 있어 장점이 있는 것으로 사료된다.

감사의 글

본 연구를 위한 PAS를 무상으로 공급하여 주신 프레지니우스 카비 코리아(주), 에크미메디칼(주), 케이에스 메디칼(주), 신왕(주) 관계자 분들께 감사의 뜻을 포함합니다.

References

1. Tullis JL, Surgenor DM, Baudanza P. Preserved platelets: their preparation, storage and clinical use. *Blood* 1959;14:456-75
2. Rock G, Swenson SD, Adams GA. Platelet storage in a plasma-free medium. *Transfusion* 1985;25:551-6
3. Bertolini F, Rebulli P, Riccardi D, Cortellaro M, Ranzi ML, Sirchia G. Evaluation of platelet concentrates prepared from buffy coats and stored in a glucose-free crystalloid medium. *Transfusion* 1989;29:605-9
4. Alhumaidan H, Sweeney J. Current status of additive solutions for platelets. *J Clin Apher* 2012;27:93-8
5. Nogawa M, Naito Y, Chatani M, Onodera H,

- Shiba M, Okazaki H, et al. Parallel comparison of apheresis-collected platelet concentrates stored in four different additive solutions. *Vox Sang* 2013;105:305-12
6. Saunders C, Rowe G, Wilkins K, Collins P. Impact of glucose and acetate on the characteristics of the platelet storage lesion in platelets suspended in additive solutions with minimal plasma. *Vox Sang* 2013;105:1-10
7. Morrison A, McMillan L, Radwanski K, Blatchford O, Min K, Petrik J. Storage of apheresis platelet concentrates after manual replacement of >95% of plasma with PAS 5. *Vox Sang* 2014;107:247-53
8. de Wildt-Eggen J, Nauta S, Schrijver JG, van Marwijk Kooy M, Bins M, van Prooijen HC. Reactions and platelet increments after transfusion of platelet concentrates in plasma or an additive solution: a prospective, randomized study. *Transfusion* 2000;40:398-403
9. Kerkhoffs JL, Eikenboom JC, Schipperus MS, van Wordragen-Vlaswinkel RJ, Brand R, Harvey MS, et al. A multicenter randomized study of the efficacy of transfusions with platelets stored in platelet additive solution II versus plasma. *Blood* 2006;108:3210-5
10. Yang JH, Kwon SY, Lee J, Jee YH, Kim M. Platelet additive solutions. *Korean J Blood Transfus* 2013;24:207-16
11. Ringwald J, Walz S, Zimmermann R, Zingsem J, Strasser E, Weisbach V, et al. Hyperconcentrated platelets stored in additive solution: aspects on productivity and in vitro quality. *Vox Sang* 2005;89:11-8
12. Vassallo RR, Adamson JW, Gottschall JL, Snyder EL, Lee W, Houghton J, et al. In vitro and in vivo evaluation of apheresis platelets stored for 5 days in 65% platelet additive solution/35% plasma. *Transfusion* 2010;50:2376-85
13. Johnson L, Winter KM, Hartkopf-Theis T, Reid S, Kwok M, Marks DC. Evaluation of the automated collection and extended storage of apheresis platelets in additive solution. *Transfusion* 2012;52:503-9
14. Ashwood ER, Kost G, Kenny M. Temperature correction of blood-gas and pH measurements. *Clin Chem* 1983;29:1877-85
15. van der Meer PF, Kerkhoffs JL, Curvers J, Scharenberg J, de Korte D, Brand A, et al. In vitro comparison of platelet storage in plasma and in four platelet additive solutions, and the effect of pathogen reduction: a proposal for an in vitro rating system. *Vox Sang* 2010;98:517-24
16. Blann AD, Lip GY. Hypothesis: is soluble P-selectin a new marker of platelet activation? *Atherosclerosis* 1997;128:135-8
17. Singh H, Chaudhary R, Ray V. Evaluation of platelet storage lesions in platelet concentrates stored for seven days. *Indian J Med Res* 2003;118:243-6
18. Kostelijk EH, Gouwerok CW, Veldman HA, de Korte D. Comparison between a new PVC platelet storage container (UPX80) and a polyolefin container. *Transfus Med* 2000;10:131-9
19. Gulliksson H, AuBuchon JP, Cardigan R, van der Meer PF, Murphy S, Prowse C, et al. Storage of platelets in additive solutions: a multicentre study of the in vitro effects of potassium and magnesium. *Vox Sang* 2003;85:199-205
20. de Wildt-Eggen J, Schrijver JG, Bins M, Gulliksson H. Storage of platelets in additive solutions: effects of magnesium and/or potassium. *Transfusion* 2002;42:76-80
21. Ohto H, Nollet KE. Overview on platelet preservation: better controls over storage lesion. *Transfus Apher Sci* 2011;44:321-5
22. Gulliksson H. Additive solutions for the storage of platelets for transfusion. *Transfus Med* 2000;10:257-64

23. Bertolini F, Murphy S, Rebulla P, Sirchia G. Role of acetate during platelet storage in a synthetic medium. *Transfusion* 1992;32:152-6
24. Gulliksson H. Storage of platelets in additive solutions: the effect of citrate and acetate in in vitro studies. *Transfusion* 1993;33:301-3