혈소판보존액에 보존된 세척혈소판의 품질평가

김재현 · 강정원 · 최경영 · 허 광

대한적십자사 혈액수혈연구원

Evaluation of Quality of Washed Platelets Stored in Platelet Additive Solutions

Jaehyun Kim, Jungwon Kang, Kyoung Young Choi, Kwang Huh

Blood Transfusion Research Institute, Korean Red Cross, Wonju, Korea

Background: Because of a lack of substances for platelet (PLT) metabolism and preservation, normal saline (NS) washed PLTs can only be stored for short lengths of time. However, the use of platelet additive solutions (PAS) could help solve this problem. In this study, the *in vitro* quality of NS washed platelets (wPLTs) stored in two types of PAS were compared with those of wPLTs stored in NS.

Methods: Five units of NS washed apheresis platelets were pooled aseptically and separated into five aliquots for storage in NS only as well as T-PAS⁺ (Terumo BCT, Lakewood, CO, USA) and CompoSol PS (Fenwal, Lake Zurich, IL, USA) with or without 15 mM glucose. The parameters of wPLTs quality were assessed up to 48 hrs after washing and the whole experiment was repeated 10 times independently.

Results: wPLTs in two kinds of PAS had better quality than wPLTs in NS, and wPLTs in T-PAS⁺ showed better quality than those in CompoSol PS. PAS-stored wPLTs with added glucose maintained stable CD62P and Annexin V expression during storage, but exhibited increased lactate accumulation. Evaluation of *in vitro* quality revealed that all wPLTs had a rating of 4 immediately after washing. However, only T-PAS⁺-stored wPLTs with glucose maintained a rating of 4 up to 48 hrs of post-washing.

Conclusion: Using PAS storage for wPLTs may be beneficial compared to NS. The results presented herein suggest that T-PAS⁺ containing glucose has the potential to extend storage time by up to 48-hours. (Korean J Blood Transfus 2017;28:67-76)

Key words: Washed platelets, Platelet additive solution, Blood preservation

서 론

혈소판 수혈 시 발생할 수 있는 아나필락시스

(anaphylaxis) 및 비용혈성 발열 수혈부작용(febrile nonhemolytic transfusion reaction)은 백혈구 또는 혈소판에 의해 유도되는 사이토카인(cytokine)이

Received on January 19, 2017. Revised on March 28, 2017. Accepted on March 28, 2017

Correspondence to: Jaehyun Kim

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

Tel: 82-33-811-0221, Fax: 82-33-811-0240, E-mail: kimjh@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 ©2017 The Korean Society of Blood Transfusion

나 혈장단백질에 의해 야기되는 것으로 알려져 있다.^{1,2)} 최근에는 백혈구를 여과제거한 농축혈소판 제제를 수혈했을 때에도 수혈 부작용이 나타났다는 보고가 있으며, IgA가 걸립된 환자에게 IgA를 포함한 혈장을 수혈하였을 때 수혈 부작용을 야기하였다는 보고가 있다.^{2,3)} 따라서 농축혈소판 수혈 시 포함되는 잔존혈장의 양이 낮을수록, 수혈자의 안전을 확보하는데 이점이 있으며, 혈소판제제 수혈 후 두드러기, 알레르기반응, 아나필락시스 반응 등과 같이 혈장단백질 또는 혈장에 포함되어 있는 IgA에 의한 수혈부작용의 기왕력이 있는 환자의 경우 다음 혈소판 수혈에는 혈소판제제 내에 존재하는 혈장 및 혈장단백질을 제거한 세척혈소판(washed platelet) 수혈이 필요하다.

혈소판제제의 세척은 1 L 정도의 생리식염수(normal saline, NS)를 사용하여 수기법 또는 자동혈구세척기를 이용하여 2~3회 세척함으로써 혈장단백 대부분을 제거하게 된다. 그러나 세척혈소판은 혈소판 세척과정에서 혈소판의 33%까지 소실이 발생할 수 있으며, 세척에 사용되는 NS에는 포도당이나 bicarbonate 등 혈소판 대사 및 보존에 필요한 물질이 없기 때문에 혈소판이 쉽게 활성화되어 보존기간이 매우 짧다는 단점이 있다.^{4,6)} 이에 국내 관련법에서도 세척혈소판의 보존기간을 제조 후 4시간으로 규정하고 있다. 현재 혈소판의 세척은 무균봉합장치(sterile connecting device)를 이용한 수기법 또는 자동혈구세척기를 통한 폐쇄계(closed system)에서 제조됨에 따라 제조과정 중 세균 오염의 가능성은 매우 적다. 따라서 혈소판 세척 후 혈소판 대사 및 보존에 필요한 물질이 포함된 용액에 혈소판을 보존하게 되면 세척혈소판의 보존기간을 연장시킬 가능성도 고려해 볼 수 있다. NS로 세척 후 혈소판을 재 부유시키는 용액으로 혈소판 보존 중 혈소판의 기능

및 특성 유지에 유리한 혈소판보존액(platelet additive solution, PAS)의 사용을 고려해 볼 수 있다. PAS에는 혈소판 대사에 중요한 대사 기질(metabolic substrate)과 혈소판 보존 중 적정 pH 유지에 중요한 인산(phosphate) 등이 포함되어 있기 때문이다. 세척혈소판 제조 후 수혈에 사용될 때까지의 보존기간을 일부 연장시킬 수 있다면 현재 세척혈소판이 가지는 운송한계점을 극복할 수 있을 것으로 생각된다.

PAS는 원래 혈소판 보관 중 일어나는 혈소판의 변화를 최소화하기 위해 개발된 용액으로 혈장으로 인한 발열성 반응이나 알레르기성 반응 등의 수혈부작용을 줄일 수 있는 임상적 이점과 혈소판제제 내의 혈장을 대체하여 분획용 혈장을 보다 많이 확보할 수 있다는 장점이 있는 것으로 보고되고 있다.^{7,8)} 한편, Alhumaidan과 Sweeney⁷⁾ 및 Hirayama 등⁹⁾은 90% 이상의 혈장을 PAS로 치환하였을 때 혈소판 수혈부작용을 줄이는 장점을 극대화할 수 있음을 보고하였다. 본 연구에서는 혈소판 수혈부작용을 최소화하고 보존기간이 매우 짧은 세척혈소판의 단점을 극복하기 위하여 NS로 세척한 후 PAS에 보존된 세척혈소판의 품질을 NS에 보존한 세척혈소판과 비교 평가하였다. 또한 현재 상용화되어 있는 PAS에는 포도당이 pH 5.5 이상의 용액에서 증기 멸균(steam sterilization)할 경우 포도당이 캐러멜화되고, 포도당이 많을수록 혈소판의 해당작용이 상승조절(up-regulation)되어 젖산이 증가되는 현실적인 제한에 따라 포도당이 포함되어 있지 않다.

이에 본 연구에서는 상용화 되어 있는 PAS에 혈소판 대사에 에너지원으로 매우 중요한 포도당을 적절한 농도로 추가하여 이에 보존된 세척혈소판의 품질을 평가하였다.

대상 및 방법

1. 연구용 혈액 및 PAS

연구용 혈액은 헌혈혈액선별검사 결과 ALT 65 IU/L 이상으로 폐기 대상인 백혈구여과제거성분 채혈혈소판(apheresis platelets, A-PLT) 중 혈소판 수가 3.0×10^{11} 개/단위 이상이며 보존온도 20~24°C를 유지하여 72시간이 경과 되지 않은 A-PLT 50단위를 이용하였다. PAS는 T-PAS⁺ (Terumo BCT, Lakewood, CO, USA)와 CompoSol PS (Fenwal, Lake Zurich, IL, USA)를 사용하였다. 포도당이 포함된 PAS 용액의 제조는 멸균된 45% 포도당용액(D-glucose, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)을 멸균주사기를 사용하여 최종농도가 15 mM이 되도록 T-PAS⁺와 CompoSol PS에 첨가하였다.

2. 세척혈소판의 제조와 보존

세척혈소판의 제조는 10회 시행하였는데, 매회마다 A-PLT 1단위(250 mL)를 20~24°C의 NS로 2회 세척하여 혈장 단백질을 제거한 후 NS 용액 250 mL에 부유시켜 A-PLT를 세척하였다. 세척된 A-PLT 5단위씩을 무작위로 Acrodose PL system (Haemonetics, Braintree, MA, USA)을 사용하여 무균적으로 수집(pooling)한 후 수집된 혈소판을 잘 혼합하여 균질화시킨 다음 5개의 혈소판보존백에 250 mL씩 나누어 분주하였다. 5개의 혈소판보존백에 분주한 혈소판은 원심분리 후 상층액을 제거한 후 NS, T-PAS⁺, T-PAS⁺/15 mM glucose, CompoSol PS, CompoSol PS/15 mM glucose 용액 250 mL을 각각의 혈소판보존백에 주입하고 혈소판을 부유시켜 최종적으로 세척혈소판을 제조하였다. 세척혈소판의 보존능 및 품질과 관련된 체외지표검사를 위해 세척혈소판 제조 직후, 세척혈소판 제조 후 24시간 및 48시간이 경과한 시점

에서 혈소판보존백으로부터 10 mL의 혈소판을 채취하였다. 혈소판의 채취는 sampling site coupler (Fenwal, Lake Zurich, IL, USA)를 혈소판보존백에 삽입한 후 18 G 주사기를 이용하여 무균적으로 시행하였다. 이러한 과정을 A-PLT 50단위에서 시행하였으므로 9회 더 반복하여 총 10회를 시행하였다.

3. 세척혈소판의 품질 및 보존능 평가

혈소판의 농도, 평균혈소판부피(mean platelet volume, MPV), 혈액가스분석, 포도당 및 젖산의 정량, 세척혈소판에 대한 무균시험은 Kim 등¹⁰⁾의 방법에 따라 시행하였으며, 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.

혈소판 품질에 대한 *in vitro* rating은 van der

Meer 등¹¹⁾의 방법에 따라 CD62P 발현량, Annexin V, 젖산(lactate) 농도 등 3가지 지표를 각각 0점 (poor quality)에서 2점(good quality)까지 점수화하여 평가하였다. 각 지표에 대한 점수 구간은 CD-62P의 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. 혈소판 세척 후 잔여 단백질의 양은 Roche DDP Molecular System (Roche Diagnostics, Basel, Switzerland) 장비로 뷰렛법(biuret method) 검사를 시행하는 수탁검사기관에 검사를 의뢰하였다.

4. 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

본 연구에서 사용한 세척 전 A-PLT의 평균 혈소판 수는 $12.94 \pm 1.12 \times 10^{11}$ 개/L이었으며, NS로 세척한 직후의 평균 혈소판 수는 $8.29 \pm 0.66 \times 10^{11}$ 개/L로 혈소판 회수율이 $70.8 \pm 6.8\%$ 이었다(Table 1). NS 세척 후 세척혈소판의 잔여혈장단백의 양은 0.1 ± 0.1 g/dL 이하로 세척이 잘 이루어졌으며 NS에 보존한 세척혈소판 및 PAS에 보존한 세척혈소판에 대한 미생물 배양검사 결과, 모든 혈액에서 미생

물 오염은 발견되지 않았다.

NS로 세척한 후 NS에 보존한 세척혈소판의 세척 직후의 pH는 5.7 ± 0.3 으로 혈소판제제에 대한 식품의약품안전처 생물학적제제 품질관리기준인 pH 6.2 이상을 충족하지 못했다. 이에 반하여 NS로 세척하고 PAS에 보존한 세척혈소판의 경우 pH가 6.2 이상이었으며, 대부분 세척 후 48시간까지도 pH 6.2 이상을 유지하였으나, 15 mM의 포도당을 첨가한 CompoSol PS에 보존한 혈소판은 pH 5.8로 저하되었다(Table 2). 포도당을 첨가한 CompoSol PS에 보존한 세척혈소판의 경우 세척 직후의 pH는 6.9이었으나 48시간 경과 후에는 6.2 이하로 떨어졌다. MPV의 경우 세척혈소판을 보존한 보존액에 상관없이 모든 세척혈소판에서 증가하는 경향을 보였으나, NS에 보존한 세척혈소판에서 증가 폭이 가장 컸으며, 포도당이 포함되어 있는 T-PAS⁺와 CompoSol PS에 보존된 세척혈소판에서의 증가 폭이 상대적으로 적었다.

혈장이 완전히 제거되고 포도당이 포함되어 있지 않은 NS, T-PAS⁺, CompoSol PS에 보존된 세척혈소판에서 포도당의 농도 및 젖산의 농도는

Table 1. Characteristics of platelets before and after washing with normal saline (*n*=50, mean±SD)

Variable	Before washing	After washing
Volume (mL)	291.6±18.7	320.1±29.0
PLT count ($\times 10^{11}$ /L)	12.94±1.12	8.29±0.66
PLT content ($\times 10^{11}$ /unit)	3.71±0.23	2.62±0.24
Recovery rate of PLT (%)	N/A	70.8±6.8
Total plasma protein (g/dL)	5.9±0.2	0.1±0.1
Plasma protein removal (%)	N/A	99.1±0.8

Abbreviations: PLT, platelet; N/A, not applicable.

Table 2. Changes of *in vitro* parameters during storage of normal saline washed platelets in various storage medium (mean±SD)

<i>In vitro</i> parameters	Storage medium	<i>n</i>	Time after washing		
			0 hr	24 hrs	48 hrs
PLT count ($\times 10^{11}/L$)	NS	50	8.29±0.66	7.69±1.48	7.51±2.09
	T-PAS ⁺	10	7.42±1.28	7.57±1.31	7.94±1.39
	T-PAS ⁺ w/glucose	10	7.54±1.33	8.03±1.36	7.64±1.51
	CompoSol PS	10	7.62±1.42	7.86±1.31	7.87±1.27
	CompoSol PS w/glucose	10	7.77±1.40	7.63±1.70	7.31±1.65
	<i>P</i> value*		0.899	0.970	0.926
pH (22°C)	NS	50	5.7±0.3	5.7±0.1	5.7±0.2
	T-PAS ⁺	10	7.4±0.0	7.3±0.4	7.3±0.1
	T-PAS ⁺ w/glucose	10	7.3±0.0	7.1±0.2	6.9±0.3
	CompoSol PS	10	6.9±0.1	6.8±0.2	6.9±0.2
	CompoSol PS w/glucose	10	6.9±0.0	6.2±0.3	5.8±0.2
	<i>P</i> value*		<0.001	<0.001	<0.001
MPV (fL)	NS	50	7.9±0.6	10.9±1.1	11.2±4.6
	T-PAS ⁺	10	8.0±0.3	8.5±0.8	9.0±1.1
	T-PAS ⁺ w/glucose	10	7.9±0.3	7.9±0.3	8.3±0.4
	CompoSol PS	10	8.0±0.4	8.5±0.6	9.1±1.0
	CompoSol PS w/glucose	10	8.2±0.5	8.6±0.4	9.0±0.6
	<i>P</i> value*		0.737	<0.001	<0.001
pCO ₂ (mmHg at 37°C)	NS	50	8.3±1.0	8.4±0.6	7.6±0.7
	T-PAS ⁺	10	8.5±0.8	11.2±1.6	13.5±1.9
	T-PAS ⁺ w/glucose	10	8.7±0.4	12.4±1.8	16.0±2.6
	CompoSol PS	10	9.6±1.0	12.7±1.2	12.9±1.2
	CompoSol PS w/glucose	10	10.0±0.8	13.9±3.0	10.6±4.4
	<i>P</i> value*		<0.001	<0.001	<0.001
Glucose (mmol/L)	NS	50	0.22±0.16	0.06±0.02	0.08±0.04
	T-PAS ⁺	10	0.06±0.02	0.11±0.04	0.11±0.04
	T-PAS ⁺ w/glucose	10	16.39±1.15	14.37±2.55	12.95±3.29
	CompoSol PS	10	0.14±0.06	0.06±0.02	0.06±0.02
	CompoSol PS w/glucose	10	16.89±1.67	15.26±2.09	13.55±1.96
	<i>P</i> value*		<0.001	<0.001	<0.001
Lactic acid (mmol/L)	NS	50	0.46±0.17	0.88±0.41	0.86±0.40
	T-PAS ⁺	10	0.52±0.35	0.48±0.30	0.45±0.30
	T-PAS ⁺ w/glucose	10	1.19±0.33	3.67±1.81	6.46±3.94
	CompoSol PS	10	0.40±0.29	0.63±0.31	0.64±0.31
	CompoSol PS w/glucose	10	0.61±0.25	2.92±1.17	6.77±1.75
	<i>P</i> value*		<0.001	<0.001	<0.001

Table 2. Continued

In vitro parameters	Storage medium	n	Time after washing		
			0 hr	24 hrs	48 hrs
CD62P (%)	NS	50	18.0±7.8	37.3±5.0	40.9±10.7
	T-PAS ⁺	10	14.0±6.3	19.3±11.7	21.2±12.2
	T-PAS ⁺ w/glucose	10	7.8±4.4	10.3±6.3	12.2±8.8
	CompoSol PS	10	14.5±9.4	20.1±10.6	22.9±13.9
	CompoSol PS w/glucose	10	8.6±5.5	15.5±8.2	28.5±15.8
	P value*		0.008	<0.001	0.001
Annexin V ⁺ (%)	NS	50	28.0±8.0	73.3±12.4	95.9±3.4
	T-PAS ⁺	10	26.0±7.6	31.9±8.7	44.6±19.8
	T-PAS ⁺ w/glucose	10	25.2±6.1	25.7±6.7	28.9±6.1
	CompoSol PS	10	25.4±6.4	30.2±10.7	40.6±17.9
	CompoSol PS w/glucose	10	25.5±7.4	26.6±7.7	44.1±13.5
	P value*		0.859	<0.001	<0.001

*P values were obtained by the Kruskal-Wallis test compared to time point matched normal saline control.

Abbreviations: NS, normal saline; PLT, platelet; MPV, mean platelet volume; w/glucose, with glucose.

Fig. 1. The mean (n=10) percentage of CD62P expression and Annexin V⁺ platelets of washed platelets stored in normal saline and T-PAS⁺ with or without glucose.

매우 낮았으며 보존 48시간까지 큰 변화가 없었다 (Table 2). 반면, 15 mM의 포도당을 첨가한 T-PAS⁺ 및 CompoSol PS에 보존한 세척혈소판의 경우 예

상되는 바와 같이 보존 시간이 경과함에 따라 포도당 소비와 젖산 생성이 증가하는 것이 관찰되었다. 특히, 포도당이 포함된 CompoSol PS에 보존한 세척혈소판 보다 포도당이 포함된 T-PAS⁺에 보존한 세척혈소판에서 포도당 소비 및 젖산 증가비율이 큰 것으로 나타났다.

CD62P를 발현하는 혈소판의 수와 Annexin V의 발현량은 세척 직후에는 세척혈소판을 보존한 보존액에 상관없이 모두 비슷한 수준을 보였으며 보존 시간이 경과함에 따라 발현량이 급격히 증가하였으나, 15 mM의 포도당을 첨가한 PAS에 보존한 세척혈소판에서 CD62P의 발현량은 낮게 나타났다. 15 mM 포도당이 포함된 T-PAS⁺에 보존한 혈소판의 경우에는 세척 후 48시간이 경과한 후에도 CD62P 및 Annexin V의 발현량이 크게 증가하지 않았다. NS 세척 후 48시간이 경과된 시점에서 CD62P와 Annexin V의 발현량은 NS에 보존한 세척혈소판에서 가장 높았고 포도당이 포

함된 T-PAS⁺에 보존한 혈소판에서 가장 낮게 나타났다(Table 2). 특히 혈소판 활성화에 따라 증가되는 CD62P의 발현량과 혈소판 활성화 및 세포자멸사(apoptosis)와 관련이 있는 지표인 Annexin V 결합 혈소판의 비율은 보존시간이 경과함에 따라 세척 후 NS에 보존한 혈소판보다 15 mM 포도당이 포함된 T-PAS⁺에 보존한 세척혈소판에서 매우 낮게 나타났다(Fig. 1).

세척혈소판을 보존한 보존액에 따른 혈소판 품질 차이를 종합적으로 평가하기 위하여 CD62P 발현량, Annexin V, 젖산농도 등 3가지 지표를 점수화하여 *in vitro* rating한 결과, 세척 직후 NS에 보존한 세척혈소판 및 15 mM 포도당 유무에 상관없이 PAS에 보존한 세척혈소판 모두 4점이었으나, 15 mM 포도당이 포함된 T-PAS⁺에 보존한 세척혈소판을 제외한 다른 보존액에 보존한 세척혈소판의 경우 보존 시간이 경과함에 따라 점수가 급격히 하락하였다. 반면, 15 mM 포도당이 포함된 T-PAS⁺용액에 보존한 세척혈소판의 품질은 세척 후 48시간까지 4점을 유지하여 품질의 변화가 없었다(Table 3).

고 찰

세척혈소판은 제조 후 수혈에 사용될 때까지의 보존 기간이 매우 짧아 세척혈소판을 제조하는 공급혈액원에서 수혈이 시행되는 의료기관에 세척혈소판을 적시에 원활히 공급하는데 많은 문제가 있다. 본 연구에서는 세척혈소판의 보존 성능을 개선하기 위한 PAS의 적용 가능성을 평가하기 위하여 2종 PAS에 각각 포도당을 첨가한 PAS와 첨가하지 않은 PAS 및 NS에 보존된 세척혈소판의 품질을 비교 평가하였다.

본 연구에서 사용한 모든 PAS는 pH 감소, 혈소판 보존 중 혈소판 농도의 감소, MPV 증가 경향

이 NS에 보존한 세척혈소판보다 현저하게 낮게 나타나 세척혈소판의 보존액으로써 사용이 유용한 것으로 생각된다. ISBT128 분류상 PAS-E에 해당하는 T-PAS⁺와 PAS-D에 해당하는 CompoSol PS 모두 농도의 차이는 있지만 구연산나트륨($\text{Na}_3\text{citrate}$), 아세테이트(acetate), 염화칼륨(KCl), 염화마그네슘(MgCl_2)을 포함하고 있으며, T-PAS⁺는 인산염(phosphate)을, CompoSol PS는 글루콘산나트륨(Na gluconate)을 포함하고 있다.¹⁰⁾ 일반적으로 인

Table 3. Mean values (n=10) of *in vitro* rating of washed platelets based on CD62P expression, Annexin V binding and lactate concentration during storage (6=good quality, 0=poor quality)

Storage medium	Index	Time after washing		
		0 hr	24 hrs	48 hrs
0.9% normal saline	CD62P	2	0	0
	Annexin V	0	0	0
	Lactate	2	2	2
	<i>In vitro</i> rating	4	2	2
T-PAS ⁺	CD62P	2	2	1
	Annexin V	0	0	0
	Lactate	2	2	2
	<i>In vitro</i> rating	4	4	3
T-PAS ⁺ w/glucose	CD62P	2	2	2
	Annexin V	0	0	0
	Lactate	2	2	2
	<i>In vitro</i> rating	4	4	4
CompoSol PS	CD62P	2	1	1
	Annexin V	0	0	0
	Lactate	2	2	2
	<i>In vitro</i> rating	4	3	3
CompoSol PS w/glucose	CD62P	2	2	1
	Annexin V	0	0	0
	Lactate	2	2	2
	<i>In vitro</i> rating	4	4	3

Abbreviations: NS, normal saline; PLT Con., platelet concentration; MPV, mean platelet volume; w/glucose, with glucose.

산염은 PLT 제제의 pH 저하를 방지하는 역할과 글리세르알데히드-3-인산(glyceraldehydes 3-phosphate)에서 포스포글리세르산(3-phosphoglyceric acid)로 전환되는 단계의 해당작용(glycolysis)을 촉진하여 에너지를 생산하는 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 본 연구에서는 포도당의 함유 여부에 관계없이 T-PAS⁺에서 보존한 세척혈소판의 품질이 CompoSol PS에 보존한 세척혈소판에 비해 우수한 것으로 나타났는데, 이는 PAS에 포함되어 있는 인산염이 PLT 보존성을 개선시키는 등 PLT 대사에 중요한 영향을 미친다고 보고한 Gulliksson 등¹²⁾의 연구 결과와 일치한다. pH의 경우에도 인산염이 포함되어 있지 않은 NS에 보존한 세척혈소판의 pH가 세척 직후에도 6.2 이하로 나타났는데(Table 2), 이는 T-PAS⁺와 CompoSol PS의 pH가 7.2인데 반하여, 혈소판 세척 및 보존에 사용된 NS의 pH가 4.5 정도인 것에 기인한 것으로 보인다. 혈소판제제의 pH가 6.0 이하로 떨어질 경우 혈소판의 생존력에 상당한 영향을 미치고,¹³⁻¹⁵⁾ pH의 감소는 혈소판 구조의 변화를 반영하는 지표인 MPV의 증가와 밀접한 관계를 가지고 있으므로¹⁶⁾ 혈소판 보존 중 혈소판의 생존력을 유지하기 위해 혈소판제제의 pH를 적절하게 유지하는 것은 필수적이다. 일부 연구자들의 연구에 의하면 혈소판 세척을 위해 일반적으로 사용하고 있는 NS의 낮은 pH로 인하여 세척혈소판의 추가 손상이 발생할 수 있고,¹⁷⁾ 칼슘이 포함되어 있지 않은 링거아세트이트(calcium-free, Ringer's acetate)를 혈소판 세척액으로 사용하였을 때 혈소판회수율 및 혈소판 보존성이 개선되었음을 보고하였다.¹⁸⁾ 따라서 세척혈소판의 보존뿐만 아니라 혈소판의 세척에도 NS를 대신하여 pH를 안정적으로 유지할 수 있도록 인산염이 첨가된 pH 7.0~7.4의 인산완충생리식염수(phosphate buffered saline, PBS), 링거아세트이트 또는 PAS의 사용을 고

려해야 할 것으로 생각된다.

PLT 보존 중 PLT의 기능과 생존성 유지를 위한 포도당의 필요성에는 연구자에 따라 논란의 여지가 있지만 Holme 등¹⁹⁾의 연구를 보면 혈소판 보존을 위하여 보존액에 포도당의 유무가 매우 중요하였다. 본 연구에서 사용한 T-PAS⁺와 CompoSol PS 모두 PLT의 포도당 요구량을 감소시킬 수 있는 아세테이트를 포함하고 있으나, 혈장이 모두 제거되어 포도당이 전혀 포함되어 있지 않은 세척혈소판에서 보존액의 종류와 관계없이 혈소판의 기능과 생존성이 크게 저하되는 것으로 나타나, Holme²⁰⁾의 또 다른 연구 결과와 마찬가지로 PLT 보존 중 기능 유지와 에너지 대사에 포도당 없이 아세테이트만으로는 불충분하다는 것을 확인할 수 있었다.

CD62P 발현량, Annexin V, 젖산농도 등 3가지 지표를 점수화하여 혈소판의 품질을 *in vitro* rating한 결과에서도 T-PAS⁺용액에 보존한 세척혈소판의 기능과 품질이 가장 잘 유지되었다. 특히 15 mM의 포도당이 포함된 T-PAS⁺용액에 보존한 세척혈소판은 NS 세척 후 최소 48시간까지 기능과 품질이 잘 유지되어, 포도당이 포함된 T-PAS⁺용액이 세척혈소판 제조 후 수혈에 사용될 때까지 보존 기간을 연장시킬 수 있는 물질인 것으로 생각된다.

본 연구 결과를 종합하여 보면 포도당이 포함된 T-PAS⁺에 보존한 세척혈소판은 세척 후 최소한 48시간까지 혈소판의 기능과 품질이 잘 유지되어 세척혈소판의 유효기간을 연장시킬 수 있을 것으로 생각된다. 현재 우리나라의 경우 공급혈액원에서 의료기관에 혈액을 운송하는 시간과 혈액공급 시스템을 고려해보면 세척혈소판을 제조 후 48시간 이내에 공급하는 것은 충분히 가능할 것으로 보여 세척혈소판을 필요로 하는 의료기관에 적시 공급하는 문제를 해결할 수 있으며, 세척

혈소판 자체 제조에 어려움을 겪었던 의료기관에서도 보다 용이하게 세척혈소판을 공급받을 수 있어 아나필락시스 반응과 같은 수혈부작용의 기왕력이 있는 환자의 치료에 크게 도움이 될 것으로 생각된다. 세척혈소판은 사용량이 많지 않은 혈액제제로 제조와 공급을 공급혈액원에 집중시키면 개별 의료기관에서 소규모로 생산함으로써 발생할 수 있는 품질관리의 어려움을 해결할 수 있을 것이다. 또한 수혈에 의한 혈액량 증가에 따라 순환 장애의 위험이 있는 일부 미숙아 등 소아환자에게 고농축혈소판(volume-reduced platelet, VR-PLT)^{21,22)} 또는 고농축세척혈소판(volume-reduced washed platelet, VR-wPLT)²³⁾의 사용이 유용하다고 보고되고 있는 바, VR-wPLT의 제조에도 PAS를 적용할 수 있을 것으로 생각된다.

요 약

배경: 혈소판 세척에 사용되는 생리식염수(normal saline, NS)에는 혈소판 대사 및 보존에 필요한 물질이 없기 때문에 혈소판의 보존기간이 짧다. 이러한 세척혈소판의 단점을 극복하기 위하여 혈소판보존액(platelet additive solution, PAS)의 사용을 고려해 볼 수 있다. 본 연구에서는 2종의 PAS와 NS에 보존된 세척혈소판의 품질을 비교 평가하였다.

방법: NS로 세척한 성분채혈혈소판 5단위씩을 무균적으로 수집하여 NS, T-PAS⁺ (Terumo BCT, Lakewood, CO, USA), 15 mM 포도당이 포함된 T-PAS⁺, CompoSol PS (Fenwal, Lake Zurich, IL, USA) 및 15 mM 포도당이 포함된 CompoSol PS이 각각 포함되어 있는 혈소판보존액 5개에 소분한 후 보존하였다. 세척혈소판의 품질 지표를 세척 후 48시간까지 분석하였으며, 전체 실험을 10회 반복하였다.

결과: 2가지 PAS 용액에 보존된 세척혈소판은 NS에 보존된 세척혈소판에 비하여 세척 후 혈소판 수, pH 등의 혈소판 품질평가지표에서 우수하였으며, CompoSol PS 보다는 T-PAS⁺가 더 우수하였다. 포도당 첨가 시 젖산의 농도는 증가하였으나, CD62P와 Annexin V 발현량은 안정적으로 유지되어 세척 직후 모든 보존용액에 보존한 세척혈소판의 *in vitro* rating 결과는 4점이었으나 48시간까지 이를 유지한 것은 포도당이 포함된 T-PAS⁺ 용액에 보존한 세척혈소판뿐이었다.

결론: 세척혈소판의 보존에 있어 NS보다는 PAS가 유리하였으며, 특히 포도당이 포함된 T-PAS⁺ 용액은 세척혈소판의 보존기간을 48시간까지 연장시킬 수 있는 잠재력이 있음을 확인하였다.

감사의 글

본 연구를 위한 PAS를 무상으로 공급하여 주신 프레지니우스카비코리아(주) 및 케이에스 메디칼(주) 관계자 분들께 감사의 뜻을 포함한다.

References

1. Snyder EL. The role of cytokines and adhesive molecules in febrile non-hemolytic transfusion reactions. *Immunol Invest* 1995;24:333-9
2. Pineda AA, Taswell HF. Transfusion reactions associated with anti-IgA antibodies: report of four cases and review of the literature. *Transfusion* 1975;15:10-5
3. Vyas GN, Perkins HA, Fudenberg HH. Anaphylactoid transfusion reactions associated with anti-IgA. *Lancet* 1968;2:312-5
4. Sloand EM, Fox SM, Banks SM, Klein HG. Preparation of IgA-deficient platelets. *Transfusion* 1990;30:322-6
5. Whisson ME, Nakhoul A, Howman P, Niu X,

- Guppy M. Quantitative study of starving platelets in a minimal medium: maintenance by acetate or plasma but not by glucose. *Transfus Med* 1993;3:103-13
6. Gulliksson H, AuBuchon JP, Vesterinen M, Sandgren P, Larsson S, Pickard CA, et al. Storage of platelets in additive solutions: a pilot in vitro study of the effects of potassium and magnesium. *Vox Sang* 2002;82:131-6
7. Alhumaidan H, Sweeney J. Current status of additive solutions for platelets. *J Clin Apher* 2012;27:93-8
8. Janetzko K, Klüter H, van Waeg G, Eichler H. Fully automated processing of buffy-coat-derived pooled platelet concentrates. *Transfusion* 2004;44:1052-8
9. Hirayama J, Azuma H, Fujihara M, Akino M, Homma C, Kato T, et al. Comparison between in vitro qualities of platelets washed with commercially available additive solutions and those washed with M-sol. *Vox Sang* 2010;99:131-5
10. Kim J, Kang J, Kwon SY, Oh DJ. In vitro quality evaluation of apheresis platelets in four kinds of platelet additive solutions. *Korean J Blood Transfus* 2016;27:55-67
11. 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
12. Gulliksson H, Larsson S, Kumlien G, Shanwell A. Storage of platelets in additive solutions: effects of phosphate. *Vox Sang* 2000;78:176-84
13. Murphy S. Platelet storage for transfusion. *Semin Hematol* 1985;22:165-77
14. Gulliksson H. Defining the optimal storage conditions for the long-term storage of platelets. *Transfus Med Rev* 2003;17:209-15
15. Dumont LJ, AuBuchon JP, Gulliksson H, Slichter SJ, Elfath MD, Holme S, et al. In vitro pH effects on in vivo recovery and survival of platelets: an analysis by the BEST Collaborative. *Transfusion* 2006;46:1300-5
16. de Wildt-Eggen J, Schrijver JG, Bouter-Valk HJ, Fijnheer R, Bins M, van Prooijen HC. Improvement of platelet storage conditions by using new polyolefin containers. *Transfusion* 1997;37:476-81
17. Shimizu T, Shibata K, Kora S. Plasma-depleted platelet concentrates prepared with a new washing solution. *Vox Sang* 1993;64:19-23
18. Kelley WE, Edelman BB, Drachenberg CB, Hess JR. Washing platelets in neutral, calcium-free, Ringer's acetate. *Transfusion* 2009;49:1917-23
19. Holme S, Heaton WA, Courtright M. Platelet storage lesion in second-generation containers: correlation with platelet ATP levels. *Vox Sang* 1987;53:214-20
20. Holme S. Effect of additive solutions on platelet biochemistry. *Blood Cells* 1992;18:421-30
21. Moroff G, Friedman A, Robkin-Kline L, Gautier G, Luban NL. Reduction of the volume of stored platelet concentrates for use in neonatal patients. *Transfusion* 1984;24:144-6
22. van der Meer PF, Bontekoe IJ, Kruit G, Peeters G, van Toledo PJ, Tomson B, et al. Volume-reduced platelet concentrates: optimization of production and storage conditions. *Transfusion* 2012;52:819-27
23. Hirayama J, Fujihara M, Akino M, Kojima S, Yanagisawa R, Homma C, et al. Storage of volume-reduced washed platelets in M-sol additive solution for 7 days. *Transfusion* 2014;54:3173-7