

貯藏血液중에 있는 淋巴球의 性狀變化에 關한 研究*

Changes in the E-rosette Formation and PHA Blastogenesis of Lymphocytes in Stored Blood

서울大學校醫科大學 및 서울大學校病院 臨床檢査科

金 相 仁·朴 明 姬

서 론

재료 및 방법

저장혈액내의 적혈구, 혈소판, 혈청내 인자들의 생존 및 기능에 대해서는 많은 연구가 있으나 림액은행의 일반적 조건하에서 저장된 백혈구의 생존 및 기능에 관한 연구는 비교적 적은 실정이다. 특히 면역학적으로 중요한 임파구에 대하여는 그 생존 및 기능을 평가할 만한 기술 및 방법의 부족으로 정확한 것을 모르다가 1962년 Petrakis 및 Politis가 4°C에서 22일간 저장한 혈액내에서 임파구가 유사핵분열을 하는 것을 증명함으로써 해서 수혈로 인하여 동종 임파구가 이식될 수 있음이 시사되었다(Petrakis & Politis, 1962). 따라서 선천적원인, 악성종양, 항암요법 혹은 인위적인 면역억제 등으로 면역기능이 저하된 환자들에서 수혈에 의해 들어간 면역학적으로 기능이 있는 임파구가 이식세포대숙주반응(Graft versus host reaction)을 일으킬 수도 있으므로 저장혈액내 임파구의 생존 및 기능등의 성상에 대한 중요성이 강조되고 있으나 국내는 물론 외국에서도 이에 대한 연구가 적은 실정이다(McCullough et al., 1969; Polesky & Helgeson, 1970; Khan et al., 1977; Ottesen et al., 1977; 柳 등, 1980).

혈액의 저장기간중 성분변화는 사용하는 항응고제나 저장용기에 따라 영향을 많이 받는다. 저자들은 현재 국내에서 사용되고 있는 ACD-B plastic bag과 외국에서 널리 사용되는 CPD bag에 저장한 혈액에서 저장기간중의 혈액학적 성분변화와 아울러 E-rosette 형성률 및 PHA에 의한 임파구유약화율(lymphocyte blastogenesis)등 임파구 성상의 변화를 관찰하였기에 보고하는 바이다.

† 접수일자: 1982. 11. 11.

* 본 연구는 1981년도 서울대학교병원 임상연구비의 보조로 이루어졌으며, 일부요지는 1982년도 제23차 대한혈액학회 학술대회(1982. 4. 30)에서 발표하였음.

1. 재 료

건강한 성인 9명을 대상으로 하였으며 5명은 acid citrate dextrose B(이후 ACD-B라 약함)용액 80ml가 들어 있는 plastic bag(독립자사)에 320ml의 혈액을 채혈하였고 나머지 4명은 citrate phosphate dextrose(이후 CPD라 약함)용액 67.5ml중 45ml만을 남긴 plastic bag(미국 Fenwall사)에 320ml의 혈액을 채혈한 후 4°C 혈액은행 냉장고에 보관하였다.

혈액은행 bag에 채혈시 각 공혈자로부터 10ml의 혈액을 따로 채혈하여 8ml은 보존제가 첨가 안된 heparin (preservative free heparin 10unit/혈액 1ml)과 혼합하여 임파구검사를, 2ml은 EDTA와 혼합하여 혈액학적 검사를 실시하였고 이들 검사성적을 original value로 사용하였다. 혈액은행 bag에 채혈한 혈액은 채혈당일(기준일: 0일)과 그 이후 1, 2, 3, 4, 7, 10, 14, 17일에 일부 혈액을 취하여 림액학적 검사를 실시하였고 일부 혈액은 항응고제가 들어있지 않은 plastic tube에 취하여 임파구분리를 하였다.

2. 방 법

1) 적혈구수, 혈색소, 적혈구용적, 백혈구수: Coulter counter Ssr.

2) 혈소판수: TOA platelet counter

3) 백혈구백분율:

① Hemalog D automated differential counter (Technicon사)

② 도말표본 Wright염색 검경

4) 백혈구생존율: 0.2% Trypan blue dye exclusion test

5) 임파구의 분리: 혈액 20ml을 450g(1500pm)에서 10분간 원심하여 buffy coat 5ml정도를 취하고 여기에 RPMI배양액 25ml을 혼합후 50ml conical plastic tube

에 넣고 시험관 밑바닥에 Ficoll-Hypaque(비중 1.077) 13ml을 중첩시킨다. 400g에서 30분간 원침한 후 혈장과 Ficoll-Hypaque층 사이의 단핵세포층을 Pasteur pipette로 취하여 RPMI 배양액으로 3회 세척한다. 세포수 산정과 생존율검사를 실시한 후 E-rosette검사를 위해서는 임파구수를 Hank's balanced salt solution (HBSS)에 4×10^6 /ml이 되도록 맞추고 임파구 배양검사를 위해서는 10% 牛胎仔血清이 든 RPMI배양액에 1×10^6 /ml로 맞춘다.

6) E-rosette형성을 : Asever용액에 채혈하여 4°C에 보관한 면양직혈구를 HBSS로 2회 세척 후 1%적혈구 부유액을 만든다. 임파구부유액(4×10^6 /ml) 0.2ml과 1%면양직혈구부유액 0.2ml을 5ml tube에 넣고 37°C에 15분간 보온한 후 250rpm에서 5분간 원침 후 4°C 냉장고에 16~18시간 방치하였다. 다음날 tube를 꺼내 rosette가 파괴되지 않도록 잘 채부유시킨 후 Pasteur pipette로 취해 혈구계산관에 넣고 rosette 양성세포를 산정하였다. 200개의 임파구를 관찰하여 3개 이상의 면양적혈구가 부착된 임파구의 백분율을 구하였다.

7) 임파구 배양검사(임파구유약화율) : 10%우태자혈청을 포함한 RPMI 배양액에 임파구수를 1×10^6 /ml이 되도록 조정된 임파구부유액 0.2ml씩을 조직배양용 U형 microplate의 각 well에 넣은 후 자연유약화율(spontaneous blastogenesis)검사에는 PHA를 첨가하지 않고 PHA유약화율(PHA stimulated blastogenesis)검사에는 phytohemagglutinin M(Difco사) 220 μ g/ml농도 0.02ml씩을 각 well에 첨가하여 최종 PHA M 농도가 20 μ g/ml이 되도록 하였다. 완전 습윤된 CO₂부란기에

서 CO₂ 농도를 5%로 유지하며 37°C에서 72시간 배양하였고 배양종료 6시간 전에 각 well에 H³-thymidine (New England Nuclear사, specific activity 6.7 Ci/mmol) 1 μ Ci씩을 넣고 6시간 더 배양한 후 Titertek multiple cell harvester를 사용해 glass fiber filter에 임파구를 harvest하였다. filter를 minivial에 넣고 50~60°C에서 1시간 건조시킨 후 liquid scintillation counting cocktail을 넣고 β counter(Packard사)에서 방사능 cpm을 측정하였다. 모든 배양은 삼중검사(triplicate)로 시행하였고 그 평균치를 검사성적으로 취하였다.

성 적

1. 적혈구수, 혈색소, 적혈구용적, 혈소판수, 백혈구수의 변화(Table 1):

공혈자에서 직접 검사한 결과(original blood)에 비해 혈액은행 bag에 채혈한 직후 기준일(0일)의 검사치는 모든 항목에서 항응고제에 의한 희석효과로 인해 ACD-B혈액은 약 80%, CPD혈액은 약 90%로 감소된 검사치를 보였다. 모든 검사종목에서 ACD-B 및 CPD bag에 보존한 혈액 사이에 저장기간중 성분변화에 뚜렷한 차이는 발견할 수 없었다. 적혈구수, 혈색소 및 적혈구용적은 저장 21일까지 거의 변화가 없었다. 혈소판수는 저장기간중 서서히 감소하여 ACD-B 및 CPD 혈액에서 평균적으로 1일에 약 90% 1주에 약 80%, 2주에 약 70%, 3주(CPD)에 약 60%로 감소하였고 감소 정도는 ACD-B 혈액에서 약간 덜 하였으나 뚜렷한 차이는 없었다. 백혈구수도 저장기간중 서서히 감소하

Table 1. Sequential changes of hematological data in stored bank blood*

Days of storage	RBC($\times 10^6$ /mm ³)		Hb(g/100ml)		Hct(%)		Platelet($\times 10^9$ /mm ³)		WBC(/mm ³)	
	ACD-B	CPD	ACD-B	CPD	ACD-B	CPD	ACD-B	CPD	ACD-B	CPD
Original blood	5.40	4.93	16.3	15.7	48.7	44.7	251	216	7030	6030
0	4.25	4.38	12.9	13.8	38.3	40.8	220	198	5620	5310
1	4.18	4.38	12.6	13.9	39.8	40.7	215	171	5470	5270
2	4.13	4.65	12.5	14.7	39.8	43.0	220	154	5230	5500
3	4.31	4.31	13.0	13.5	40.9	39.8	215	156	5430	5070
4	4.34	4.23	13.0	13.5	41.3	39.6	210	—	5430	5230
7	4.25	—	12.9	—	40.7	—	183	152	5100	4550
10	4.27	4.14	13.0	12.8	40.4	39.0	180	—	5070	4170
14	4.25	4.44	12.9	13.6	39.9	42.1	166	139	—	4400
17	4.29	4.27	12.7	13.3	40.6	41.0	—	123	4500	4500
21	—	4.38	—	13.9	—	42.6	—	123	—	4470

* Mean, 5 units of ACD-B blood and 4 units of CPD blood.

Table 2. Sequential changes of leukocyte differential count and viability in stored bank blood*

Days of storage	Differential count**		Viability***		Lymphocyte purity(%)****
	Lympho(%)	Neutro(%)	Lympho(%)	Neutro(%)	
Original blood	27.9	54.9	96.6	79.3	80.6
0	30.3	52.6	97.8	91.2	82.9
1	30.3	52.6	98.0	74.0	63.9
2	29.5	52.4	96.4	75.1	54.0
3	32.9	49.2	96.8	54.7	44.9
4	—	—	97.1	55.3	37.3
7	33.2	48.7	93.5	31.7	29.8
10	36.5	43.8	93.8	—	16.3
14	—	—	90.0	—	—

* Mean, 5 units of ACD-B blood and 4 units of CPD blood

** Leukocyte differential count by Hemalog D automated differential counter

*** Leukocyte viability by trypan blue dye exclusion test

**** Lymphocyte purity: % lymphocytes in mononuclear cell layer separated by Ficoll-Hypaque density gradient

여 ACD-B 및 CPD혈액에서 1주에 약 90%로 감소하였고 그후 ACD-B에서는 17일에 약 80%로 감소하였으나 CPD에서는 3주까지 뚜렷한 감소가 없었다.

2. 백혈구백분율, 생존율 및 임파구분리도의 변화 (Table 2):

백혈구백분율은 도말표본에 의한 검사성적은 재현성이 적고 기록이 심하였다. 세포화학적 방법을 이용한 Hemalog D 자동분석기기에 의한 백혈구백분율은 채혈시 기준일에 임파구 30%, 호중구 53%로서 채혈후 2일까지 변화가 없고 제 3일부터 임파구의 완만한 증가와 호중구의 완만한 감소를 보여 제 10일에는 임파구 37% 호중구 44%였다.

저장기간이 경과함에 따라 도말표본상 백혈구, 특히 호중구의 형태변화가 현저하게 나타났고 ACD-B 및 CPD혈액에 약간의 차이는 있으나 대체로 유사한 양상을 보였다. 호중구는 채혈후 2일까지는 대부분이 정상 형태를 보이나 제 3~4일로부터 약 1/2에서 핵염색질의 변화 등 정도의 퇴행성변화가 나타나고 제 7일에는 핵염색질의 농축, 과립의 저하, 세포질의 소실 등 중등도의 퇴행성변화가 나타나나 제 10일까지 약 2/3이상에서 세포질이 남아있어 세포 형태가 유지되어 있다가 제 14일에는 세포가 모두 파괴되어 세포질을 갖는 세포가 거의 없고 심한 퇴행성 변화를 보이는 핵만 남아있었다. 임파구의 변화는 덜 심하여 제 3일까지는 대부분 정상 형태를 유지하고 제 4일부터 소수의 임파구에 경도의 핵염색질의 퇴행성 변화가 나타나기 시작하여 제 7일에는 약 1/3에 이르고 제 10일에는 핵염색질의 농축, 세

포질내 과립의 출현 등 중등도의 퇴행성 변화를 보이는 세포수가 증가하여 제 14일에는 거의 대부분을 차지하나 제 21일까지도 세포질은 보존되어 세포형태는 잘 유지되어 있었다.

Trypan blue dye exclusion 방법을 이용한 세포생존율 검사에서 임파구의 생존율은 채혈 당시 98%이었던 것이 그 이후 별 변화가 없다가 제 7일에는 94%로 약간 감소하였으나 제 14일에도 90%의 높은 생존율을 나타냈다. 호중구의 생존율은 채혈당시 91%이었던 것이 제 1일에 74%, 제 3일에 55%, 제 7일에 32% 등으로 급격히 저하되었다.

E-rosette검사와 임파구배양검사를 실시하기 위해 Ficoll-Hypaque density gradient를 이용해 분리한 단핵세포층(mononuclear cell layer)에서 임파구의 순도(purity)는 채혈 당시 83%이었던 것이 저장기간중 급격한 감소를 보여 제 1일에 64%, 제 2일에 54%, 제 3일에 45%, 제 4일에 37%, 제 7일에 30%, 제 10일에는 16%였고 임파구의 순도와 역비례하여 과립구의 오염이 증가하였다.

3. 임파구 E-rosette형성율(Table 3):

ACD-B에 채혈한 5unit의 채혈당시 E-rosette형성율은 71.8%로 CPD에 채혈한 4 unit의 72.1%와 유사하였다. Heparin에 채혈한 original blood에 비해 ACD-B 혈액은 별 차이가 없고 CPD혈액은 약 10% 정도 높은 E-rosette형성율을 보였다. 저장기간 경과에 따라 ACD-B 및 CPD혈액 모두에서 제 3일까지 완만한 감소를 보이거나 큰 변화가 없다가 제 4일에 ACD-B 혈액

Table 3. Sequential changes of E-rosette formation(%) in stored bank blood

Days of storage	ACD-B (n=5)		CPD (n=4)	
	M±SD	(Range)	M±SD	(Range)
Original blood	69.1±4.9	(62.5—74.0)	62.3±4.3	(56.0—65.0)
0	71.8±5.8	(65.0—80.5)	72.1±7.9	(60.5—78.0)
1	68.2±1.2	(66.5—69.0)	69.3±7.1	(60.0—75.0)
2	65.2±5.7	(59.0—74.0)	69.4±4.4	(65.0—75.5)
3	62.0±7.3	(52.0—71.5)	68.1±9.0	(56.5—78.0)
4	40.6±10.6	(28.0—51.5)	50.5±17.2	(27.5—69.0)
7	35.5	(35.5)	42.3±33.6	(18.5—66.0)
10	31.7±4.6	(29.0—37.0)	—	—
14	—	—	34.0	(34.0)

40.6%, CPD혈액 50.5%로 현저히 감소하였으나 제 10~14일까지도 30%이상의 E-rosette형성율을 보였다.

4. 임파구 자연유약화율(Table 4, 5 및 Fig. 1):

임파구 자연유약화율(spontaneous blastogenesis)은 채혈당일에 ACD-B혈액 670cpm, CPD혈액 6,167cpm으로 CPD혈액에서 현저히 높고 Heparin에 채혈한 original_blood에 비해 ACD-B혈액은 약간 낮고 CPD혈액은 4배정도 높은 cpm을 보였다. 그후 저장기간 경과에 따라 점차 감소하여 ACD-B혈액은 제 3일에 약 1/3로 감소하였으나 그후 제 14일까지 비슷한 정도로 유지되었다. CPD혈액에서는 감소 정도가 더 현저하여 제 1일에는 약 1/6, 제 2~4일에 약 1/10, 제 7~10일에 1/30이하로 감소하였다. 저장 제 4일까지는 CPD혈액의 자연유약화율이 ACD-B혈액에 비해 높은 경향을 보였으나 제 7일 이후에는 별 차이가 없었다.

phytohemagglutinin 자극에 의한 임파구유약화율(PHA-stimulated blastogenesis)은 채혈당일에 ACD-B

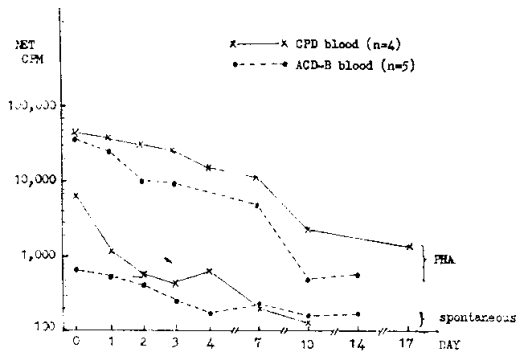


Fig. 1. Sequential changes of PHA-stimulated and spontaneous blastogenesis from stored CPD blood and ACD-B blood.

혈액 36,845cpm, CPD혈액 43,507cpm이었던 것이 저장기간중 점차 감소하였으나 제 7일에도 각각 5,158cpm 및 11,891cpm으로 기준일의 1/7 및 1/4 정도의 비교적 높은 유약화율을 보였다. 제 10일 이후에는 기준일의

Table 4. Sequential changes of spontaneous blastogenesis (cpm) in stored bank blood

Days of storage	ACD-B (n=5)		CPD (n=4)	
	M±SD	(Range)	M±SD	(Range)
Original blood	956±502	(523—1687)	1561±549	(818—2086)
0	670±155	(431—759)	6167±5536	(2271—14184)
1	552±304	(149—891)	1083±402	(532—1468)
2	408±217	(278—790)	537±253	(167—706)
3	219±87	(132—366)	462±133	(286—608)
4	150±60	(109—241)	667±324	(299—963)
7	218±100	(123—355)	206±101	(154—359)
10	167±61	(101—224)	118	(118)
14	212±79	(156—268)	—	—

Table 5. Sequential changes of PHA blastogenesis (cpm) in stored bank blood

Days of storage	ACD-B (n=5)		CPD (n=4)	
	M±SD	(Range)	M±SD	(Range)
Original blood	40168±15661	(16759—56802)	36526±7183	(26836—43680)
0	36845±16922	(7401—40700)	43507±15656	(21632—57173)
1	25019±15190	(8522—38809)	38204±10268	(26015—50192)
2	9830±6550	(2698—18962)	30204±21389	(15079—45329)
3	9068±6717	(6390—19722)	26427±7380	(20146—36775)
4	—	—	14223±20349	(9476—44229)
7	5158±7876	(384—16935)	11891±5121	(7643—19329)
10	499±540	(163—1123)	2549	(2549)
14	675±630	(229—1121)	—	—
17	—	—	1615	(1615)

5% 또는 그 이하로 더 현저히 감소하였으나 제 14~17 일 까지도 자연유약화율보다 높은 cpm을 보여 PHA 자극에 대한 임파구 유약화반응이 유지되어 있음을 나타냈다. 저장기간중 계속 CPD혈액이 ACD-B 혈액에 비해 높은 유약화율을 보였다.

5. Original blood와 혈액은행혈액의 비교

(Table 6) :

채혈당일 Heparin에 채혈한 혈액(original blood)에 비해 CPD혈액에서는 E-rosette형성율이 10%정도 높고 임파구 자연유약화율도 평균 4배 정도로 현저히 증가되었으며 PHA유약화율도 1.2배 정도 증가되었다. 임파구 자연유약화율은 4명의 공혈자 모두에서, PHA

유약화율은 4명중 3명에서 증가되었다. 이에 비해 ACD 혈액에서는 E-rosette형성율의 차이가 별로 없고 임파구 자연유약화율은 5명중 3명에서 감소하였고 2명에서 약간 증가하였으며 PHA유약화율은 2명에서 감소, 1명에서 증가, 2명은 별 차이가 없이 나타나 일정한 경향을 볼 수 없었다.

고 안

수혈용 혈액의 저장기간중의 성분변화는 저장온도나 기간에 따라 좌우되며 항응고제의 종류나 저장용기에도 큰 영향을 받는다. 본 실험에서 적혈구수, 현색소 및

Table 6. Comparison of E-rosette formation and blastogenesis in original blood and bank blood.

Case No.	E-rosette(%)	Spontaneous blastogenesis(cpm)	PHA blastogenesis(cpm)
	Bank/Original(Ratio)	Bank/Original(Ratio)	Bank/Original(Ratio)
1	80.5/74.0 (1.09)	845/575 (1.47)	7401/34145 (0.22)
2	69.5/65.5 (1.06)	431/736 (0.59)	40700/16759 (2.43)
3	74.0/72.5 (1.02)	683/1261 (0.54)	41317/42193 (0.98)
4	70.0/71.0 (0.99)	759/1687 (0.45)	44187/56802 (0.78)
5	65.0/62.5 (1.04)	632/523 (1.21)	50623/50941 (0.99)
ACD-B Total	71.8/69.1(1.04±0.04)	670/956 (0.85±0.46)	36845/40168(1.08±0.82)
6	78.0/67.5 (1.16)	2271/818 (2.78)	43345/26836 (1.62)
7	75.0/65.0 (1.15)	5524/1508 (3.66)	51880/39601 (1.31)
8	60.5/56.0 (1.08)	14184/1834 (7.73)	21632/35988 (0.60)
9	75.0/63.0 (1.19)	2691/2086 (1.29)	57173/43680 (1.31)
CPD Total	72.1/62.3(1.15±0.05)	6167/1561(3.87±2.76)	43507/36526(1.21±0.43)

적혈구용적이 ACD-B 및 CPD bag에서 저장 21일 동안 별 변화가 없음을 다른 보고자들의 성적과 유사하다(Limbrid & silver, 1974; 趙 및 金, 1978; 柳 및 蘇 1980).

저장혈액내 혈소판수의 변화는 일반적으로 현저하다고 알려져 있으나 본 연구에서 ACD-B 및 CPD bag에 채혈한 혈액을 4°C에서 보존할 때 혈소판수는 제 1일에 90%, 1주에 80%, 2주에 70%, 3주에 60%등으로 완만하게 감소되어 다른 보고자들에 비해 감소 정도가 덜 심하였다. Limbrid 및 Silver(1974)에 의하면 CPD plastic bag에서 저장 10일에는 50%로, 35일에는 10% 이하로 감소된다 하였다. ACD plastic bag에 채혈후 screw cap tube에 분주하여 보관한 柳 및 蘇(1980)에 의하면 저장 2일에 약 50%, 3주에 약 1/3로 감소하였고 ACD 유리병에 채혈한 趙 및 金(1978)의 성적은 더 심한 감소를 보였다.

백혈구수의 경우 ACD-B 및 CPD혈액에서 1주에 약 90%로 감소하였으나 그 이후 3주까지도 80~90%로 유지되어 뚜렷한 감소가 없었고 이는 McCullough등(1969), Limbrid 및 Silver(1974), Khan등(1977)의 보고와 유사하나 저장 20일에 약 30~40%로 감소한다는 보고들과는 차이가 있다(Bailey & Bove, 1975; 趙 및 金, 1978; 柳 및 蘇, 1980).

백혈구수는 저장기간중 심한 변화가 없으나 과립백혈구의 기능은 현저한 변화를 보이는 것으로 알려져 있다. 저장 24시간까지는 기능이 비교적 잘 유지되나 1주후에는 운동성, 탐식능등이 심히 저하되므로 일반적으로 과립구 수혈은 채혈후 24시간내에 시행하여야 한다(McCullough et al, 1969; Crowley & Valeri, 1974).

세포화학적 염색을 이용한 자동 백혈구백분율측정기기인 Hemalog D에서 측정되는 백혈구백분율은 도말표본 수기법에 비해 재현성이 매우 높는데, 흥미있는 것은 도말표본에서 호중구가 정상 형태를 유지하는 제 2일까지 Hemalog D로 검사한 백분율에 아무 변화가 없다가 제 3일부터 호중구가 약간 감소하기 시작하여 제 10일에는 기준일의 약 80%에 이르고 상대적으로 임파구 백분율이 증가하였다. 호중구의 생존율이 trypan blue dye exclusion 검사상 제 7일에 약 30%로 감소하는 것에 비해 호중구 백분율의 감소는 훨씬 덜 심한 것으로 보아 세포막의 투과성을 잃은 죽은 세포도 세포질 과립의 peroxidase활성은 10일까지 상당히 유지되는 것으로 추측할 수 있다.

정상성인의 말초혈액 임파구는 흉선의존성 T-임파구 60~75%, 골수유래성 B-임파구 16~28% 및 소수

의 Null cell로 구성되어 있으며 T-임파구 검출에는 일반적으로 면양적혈구와의 E-rosette형성율이 널리 사용되고 있다(Stites et al., 1982).

본 실험에서 관찰한 저장혈액의 채혈직후 E-rosette형성율은 ACD-B 및 CPD에서 모두 평균 72%로 정상 범위에 속했고 저장기간중 제 3일까지는 큰 변화가 없이 경미한 감소를 보이다가 제 4일에 뚜렷한 변화를 보여 기준일의 약 2/3인 40~50%로 감소하였고 제 10~14일에는 1/2이하인 30% 정도로 감소되었다. 이러한 성적은 저장 1~4일에 약 1/3로, 저장 7일에 1/10로 감소된다는 柳 및 蘇(1980)의 보고나 저장 7일에 거의 소실된다는 Khan등(1977)의 보고에 비해 현저히 높은 결과이다. 저자들이 본 실험에서 관찰한 저장기간중 E-rosette형성율의 변화는 도말표본상 관찰한 임파구 형태가 제 3일까지 변화가 없다가 제 4일부터 일부 세포에서 경도의 퇴행성 변화가 나타나기 시작해 10일 이후에 더 진행되는 사실과 어느 정도 부합된다.

E-rosette형성은 면양 적혈구막 표면의 glycoprotein이 T-임파구 표면에 있는 수용체에 부착하여 이루어지는 비면역성의 약한 결합으로 죽어 있는 임파구는 E-rosette를 형성할 수 없는 것으로 알려져 있다(Jondal et al., 1972). 그러나 본 실험에서 Trypan blue dye exclusion검사에 의한 임파구 생존율은 제 14일까지도 90% 정도로 유지되는 것으로 보아 이 검사로 생존한 것으로 판정되는 세포중의 일부는 E-rosette형성 능력을 상실하는 것으로 생각되며 trypan blue dye exclusion 검사가 임파구의 손상 정도를 정확히 반영하지 못하는 것으로 사료된다.

T-임파구의 기능을 평가하는 방법으로 널리 이용되는 phytohemagglutinin mitogen에 의한 H³-thymidine 섭취능의 변화는 본 실험에서 저장기간에 따라 점차 감소하였으나 제 7일까지도 기준일의 약 20% 전후의 수준을 유지하였으며 그 이후 제 10일에 10% 이하로 급격히 감소하나 제 14~17일까지도 자연유약화율보다 높은 cpm을 나타내 PHA자극에 의한 임파구 반응이 약하게나마 남아 있음을 알 수 있었다. 저장기간중 CPD혈액이 ACD-B혈액에 비해 높은 유약화율을 보이고 감소 정도도 덜 심하였다. 이러한 성적은 PHA자극에 의한 임파구 반응이 저장기간 경과에 따라 점차 감소하여 14일까지 지속된다는 McCullough등(1969)의 보고와 19~20일까지도 지속될 수 있다는 Polesky 및 Hegelson(1970)의 보고와 유사하다. 또한 Polesky 및 Hegelson(1970)은 저장혈액의 혼합임파구배양검사를 통해 PHA에 비해 훨씬 약한 자극인 동종 임파구의 HLA항원에 대한 저장혈액내 임파구의 분열반응이 저

장 15일까지도 지속된다 하였다.

이러한 저장현액내 임파구 기능의 유지는 실제로 면역기능이 저하된 환자에 있어서 수혈로 인해 면역학적 기능을 갖고있는 임파구가 들어가 이식세포대숙주반응 (Graft versus host reaction)을 일으킨 가능성 때문에 임상적으로 중요하다. Hathaway등(1967)은 thymic alymphoplasia 환자에서 12일 저장된 혈액의 1회 수혈 후에, Ford등(1976)은 화학요법을 받고 있는 백혈병환자에서 Haemonetics기계로 분리한 과립구의 수혈후에 각각 이식세포대숙주반응이 발생함을 보고하였다. 면역기능이 저하된 환자에서 수혈로 유발될 수 있는 이식세포대숙주반응을 방지하기 위해서는 수혈전에 혈액을 1,500rad 정도의 방사선조사처리론 하여야 한다(Graw et al., 1970).

채혈 당일에 CPD혈액은 heparin에 채취한 혈액에 비해 E-rosette형성율이 10%정도 높았고 임파구 자연 유약화율이 4배 정도 증가되었으며 PHA 유약화율도 약간 높은 경향을 보였다. Hadfield등(1975)은 Heparin이 E-rosette형성율을 감소시킨다고 하였고 Djeu등(1976)은 heparin자체보다 heparin제제에 들어 있는 benzyl alcohol과 같은 보존제에 의한 영향이라고 하였다. 본 실험에서는 보존제가 첨가되지 않은 heparin을 사용하였고 이러한 E-rosette형성율과 임파구 유약화반응의 차이가 CPD와 Heparin 항응고제에 의한 차이인지는 현재로서 확실치 않고 앞으로 규명되어야 할 것으로 사료된다.

결 론

ACD-B 및 CPD plastic bag에 채혈하여 4°C에 저장한 혈액에서 혈액학적 성분 및 임파구의 E-rosette형성율과 PHA 자극에 대한 유약화반응의 변화를 2~3주간 관찰하여 얻은 성적을 요약하면 다음과 같다.

1. 적혈구수, 흰색소 및 적혈구용적은 저장 21일까지 별 변화가 없었다.
2. 백혈구수는 저장 1주에 약 90%로 감소하였으나 그후 3주까지 큰 변화가 없었다. 임파구의 생존율은 저장 2주까지도 90%정도로 유지되었고 호중구의 생존율은 저장 1주에 1/3 정도로 급격히 감소되었다.
3. 현소판수는 저장 1주에 80%, 2주에 70%, 3주에 60%로 비교적 서서히 감소되었다.
4. T-임파구의 E-rosette 형성율은 저장 3일까지는 큰 변화가 없다가 4일에 약 2/3로 감소하였으나 저장 10~14일까지도 1/2이하 수준으로 유지되었다.
5. 임파구의 자연유약화반응 및 PHA 자극에 대한

유약화반응은 저장기간 경과에 따라 뚜렷이 감소하였으나 저장 14~17일까지도 약하게나마 지속되었다.

—ABSTRACT—

Changes in the E-rosette Formation and PHA Blastogenesis of Lymphocytes in Stored Blood.

Sang In Kim and Myoung Hee Park

Department of Laboratory Medicine, College of Medicine, Seoul National University and Seoul National University Hospital

Changes in the ability of lymphocytes in stored bank blood to form E-rosettes and to respond to PHA were studied together with change of other blood cell components at intervals during two to three weeks of storage at 4°C in ACD-B and CPD plastic bags. The results were as follows.

1. There was no significant change in red blood cell count, hemoglobin and hematocrit during 21 days of storage.
2. Leucocyte count decreased to 90% of the initial value after 1 week and then there was no significant decrease up to 3 weeks of storage. Viability of lymphocytes was maintained up to two weeks at 90% level and that of neutrophil declined rapidly to 1/3 of the initial value after 1 week's storage.
3. Platelet count decreased rather slowly and 60% of the initial value was present after 3 weeks' storage.
4. E-rosette formation of lymphocytes was relatively well maintained during the first 3 days and decreased to 2/3 on day 4, and to less than 1/2 after 10-14 days' storage.
5. Spontaneous and PHA stimulated lymphocyte blastogenesis decreased progressively during storage, but was not completely abolished after 14-17 days' storage.

REFERENCES

Bailey, D.N. and Bove, J.R.: *Chemical and hematological changes in stored CPD blood. Transfusion,*

- 15:244, 1975.
- 趙漢翊, 金柄國：保存血液의 血液學的 成分變化에 關한 觀察. 大韓血液學會雜誌, 13:35, 1978.
- Crowley, J.P. and Valeri, C.R.: *Recovery and function of granulocytes stored in plasma at 4°C for one week. Transfusion*, 14:574, 1974.
- Djeu, J., Payne, S. and Herbeman, R.B.: *Heparin and T-cell rosettes. N. Engl. J. Med.*, 291:1188, 1976.
- Ford, J.M., Lucey, J.J., Cullen, M.H., Tobias, J.S. and Lister, T.A.: *Fatal graft-versus-host disease following transfusion of granulocytes from normal donors. Lancet*, ii:1167, 1976.
- Graw, R.G. Jr, Buckner, C.D., Whang-Peng, Jacqueline, Leventhal, Brigid, G., Krüger, G., Berard, C. and Henderson E.S.: *Complications of bone-marrow transplantation. Graft-versus-host disease resulting from chronic-myelogenous-leukaemia leucocyte transfusions. Lancet*, ii:338, 1970.
- Hadfield, T.L., Marcus, S. and Smart, C.R.: *Heparin and T cells. N. Engl. J. Med.*, 293:1101, 1975.
- Hathaway, W.E., Fulginiti, V.A., Pierce, C.W., Githens, J.H., Pearlman, D.S., Muschenheim, F. and Kempe, C.H.: *Graft vs. host reaction following a single blood transfusion. J. Amer. Med. Assoc.*, 201:1015, 1967.
- Jondal, M., Holm, G. and Wigzell, H.: *Surface markers on human T and B lymphocytes. 1. A large population of lymphocytes forming nonimmune rosettes with sheep red blood cells. J. Exp. Med.*, 136:207, 1972.
- Khan, A., Wakasugi, K., Hill, N. Komezi, T., and Osamura, S.: *Changes in the immunocompetence and surface markers of lymphocytes in stored blood. Exp. Hemat.*, 5:8, 1977.
- Limbrid, T.J. and Silver, D.: *Sequential changes in blood preserved with citrate-phosphate-dextrose. Surg. Gynec. Obstet.*, 138:401, 1974.
- McCullough, J., Benson, S.J., Yunis, E.J. and Quie, P.G.: *Effect of blood-bank storage on leucocyte function. Lancet*, ii:1333, 1969.
- Ottesen, E.A., Poindexter, R.W. and Hiatt, R.A.: *'Long-distance' lymphocyte study—the effects of transporting blood on lymphocyte blastogenic responses. Clin. Exp. Immunol.*, 29:168, 1977.
- Petrakis, N.L. and Politis, G.: *Prolonged survival of viable, mitotically competent mononuclear leukocytes in stored whole blood. New Engl. J. Med.*, 267:286, 1962.
- Polesky, H.F. and Helgeson, M.: *Viability of lymphocytes in stored blood: Response to phytohemagglutinin and to allogenic leukocytes. J. Lab. Clin. Med.*, 76:134, 1970.
- 柳柱容, 蘇貞媛：貯藏血液의 T-淋巴球 E-Rosette形成率에 關한 研究. 大韓血液學會雜誌, 15:135, 1980.
- Stites, D.P., Stobo, J.D., Fudenberg, H.H. and Wells, J.V.: *Basic & clinical immunology, 4th ed., Los Altos, Lange Medical Publications, 1982.*