

트롬보프라스틴의 保存法에 關한 研究

Preservation of Reconstituted Thromboplastin of various Products

서울대학교 醫科大學 臨床病理科

趙 漢 翊 · 金 相 仁

緒 論

「트롬보프라스틴」을 동물 및 사람의 뇌조직에서 만들어 사용하게 됨으로 혈액응고시험에 많은 발전을 가져왔다. 그러나 트롬보프라스틴제제는 생물학적제제이므로 이를 사용하는에는 많은 불편이 따르게 된다. 그중에 가장 큰 문제가 역가의 보존이다. 최근 대부분의 검사실에서 사용하고 있는 「트롬보프라스틴」은 상품화된 냉동건조된 것인데 이 제품들은 대부분 단위병당 20회 검사를 할 수 있게 되어 있다. 우리나라에서 프로트롬빈시간 측정건수는 하루에 20건을 시행할 수 있는 병원이 몇몇 밖에 되지 못하고 있어 대부분의 병원은 한번 사용하기 위하여 냉동건조된 트롬보프라스틴에 증류수를 탄후 이를 보관하였다가 그다음에 다시 사용한한다. 그럴경우에 트롬보프라스틴 역가의 감소를 초래하고 또한 우리의 현실에서 이런 감소를 정확히 인지하고 여기에 대한 대책을 세워 교정해 줄 수 있는 표준혈장을 갖고 있지도 못하다. 그래서 현재 우리나라에서 각 병원마다 트롬보프라스틴을 이용한 프로트롬빈시간 검사결과가 아주 달라 검사결과의 “정도관리”라는 면에서 아주 많은 문제를 제기하고 있다. 특히 심근경색등의 질환에 항응고제요법의 요구가 점점 많아지고 있는 현실에서 우리나라에서 쓰는 혈액응고시험에 관한 기초적인 조사 내지는 연구가 절실히 요구되고 있다.

현재 우리나라에는 Simplastin(Warner-Lambert Inc.)이 가장 널리 쓰이는 트롬보프라스틴제제이고 그의 DADE회사의 Thromboplastin reagent가 최근 몇몇 병원에

서 시도되고 있다.

저자는 냉동건조된 트롬보프라스틴을 사용하기 위하여 일단 증류수로 희석시킨 후 여러 상태에서 그 활성을 어떻게 유지하는가를 살펴보고 이들 트롬보프라스틴이 각 응고인자들의 결핵에 대한 민감도가 어느정도인가를 살펴보고자 이 연구를 시도하였다.

재료 및 방법

재 료

1. 트롬보프라스틴제제
 - a. Simplastin (Warner Lambert Inc. Morris Plains, New Jersey, U.S.A)
 - b. Thromboplastin Reagent (DADE Inc., Miami, Florida, U.S.A)
 - c. Activated Thromboplastin(國際試藥株式會社. 日本)
2. 혈 장
 - a. Citrated Normal plasma (DADE, USA)
 - b) Citrated abnormal plasma (DADE, USA)
 - c) Standard normal plasma (DADE, USA)
 - d) V deficient plasma (DADE, USA)
 - e) VII deficient Plasma (DADE, USA)
 - f) X deficient plasma (DADE, USA)
3. 냉동건조기 (Virtis Co. Newyork USA)

方 法

1) 매일 사용하고 남은 트롬보프라스틴을 냉동보존시켰을 때 트롬보프라스틴의 안정성:

매일 프로트롬빈시간을 측정하기 위하여 트롬보프라스틴에 증류수를 탄 후에 사용하는 동안 약 1시간동안 실험대위에 두게 되고 일상검사가 끝난후에 바로 냉장고의 냉동실에 두어 열린다. 열리는데 소요되는 시간

* 본 연구 논문은 1976년도 서울대학교 의과대학 부속병원 임상연구비 보조로 이루어진 것임.

<1976년 9월 15日 接受>

은 약 15~20분이고 이를 1일 내지 14일간 보관한 후 normal plasma(citrated normal plasma: CNP)와 abnormal plasma (Citrated abnormal plasma, CAP)로 프로트롬빈시간을 측정하였다.

2) Thromboplastin제품들을 증류수로 희석한 다음에 이를 0.2cc씩 나누어 kahn시험관에 소분한 다음 -20°C 냉동기와 $4^{\circ}\text{C}\sim 6^{\circ}\text{C}$ 의 냉장고에 보존시켰다. Activated thromboplastin(Thromboplastin C)은 액체상태이므로 $4^{\circ}\text{C}\sim 6^{\circ}\text{C}$ 의 냉장고에 보관하였다. 이들은 10일까지 보존하면서 매일 하나씩 꺼내서 정상혈장(CNP)과 비정상혈장(CAP)으로 프로트롬빈 시간을 측정하였다.

3) 각 트롬보프라스틴제제의 자혈액응고인자에 대한 민감도를 측정하고 이 민감도가 보존상태에 따라서 어떻게 변화하는가를 관찰하였다. 트롬보프라스틴을 0.2 ml씩 소분하여 -20°C 에 보존하고 1일, 2일, 3일 4일에 꺼내서 관찰하였다. Activated thromboplastin은 1일과 2일만 관찰하였다. 관찰된 응고인자는 제 V응고인자와 제 VIII응고인자, 제 X응고인자들이었고 정상혈장으로 Standard normal plasma(SNP)를 사용하였다.

4) 각 시험관에 나누어 보존한 트롬보프라스틴으로 트롬보프라스틴시간 측정할 때 그 재현도를 관찰하기 위하여 1개의 트롬보프라스틴 제제를 0.1cc씩 나누어 1일 내지 10일간 $4^{\circ}\text{C}\sim 6^{\circ}\text{C}$ 와 -20°C 에 보존하는 동안에 1일, 3일, 5일, 10일에 각각 6개의 시험관을 꺼내어 이를 Citrated abnormal plasma (CAP)를 가지고 프로트롬빈시간을 측정하였다.

5) 냉동건조시키는 과정이 트롬보프라스틴의 안정성에 어떤 영향을 미치는가를 관찰하기 위하여 여러가지 역가의 트롬보프라스틴을 냉동 건조시키기 전후에 프로트롬빈시간을 측정하였다. 즉 일단 증류수로 희석시킨 트롬보프라스틴을 다시 냉동건조시켰을 때 어떤 변화가 나타나는가를 관찰한 것이다. 냉동건조에 소요시간은 2cc에 약 4시간였다.

6) 위에서 다시 냉동건조시킨 트롬보프라스틴으로 프로트롬빈시간을 측정할 때, 그 재현도를 측정하기 위하여 2가지 트롬보프라스틴 각각에 대하여 3종류의 역가가 다른 트롬보프라스틴을 10개로 소분한 다음에 냉

동건조시킨 다음 이를 CNP로 프로트롬빈시간을 측정하였다.

7) 냉동시킨 트롬보프라스틴을 다시 녹히는 과정이 트롬보프라스틴측정에 어떤 영향을 미치는가를 관찰하기 위하여 실온에서 녹히는 경우와 37°C 수온조에서 녹히는 두가지 방법을 이용하였다. 증류수로 희석한 트롬보프라스틴을 6일간 보존시키면서 매일 매일 관찰하였다.

8) 트롬보프라스틴을 증류수로 희석한 다음에 이를 냉동시키고 -20°C 에서 보존하고 그 다음날 이를 실온에서 녹여 30분간 실온에 둔다음 다시 냉동시켜 -20°C 에 보존하고 이같은 일을 10일간 계속하면서 매일 매일 프로트롬빈시간을 측정하였다. 즉 융해시키고 냉동시키는 과정을 반복시킬때 트롬보프라스틴역가에 어떤 변화가 나타나는가를 관찰하고자 하였다.

結 果

1) 트롬보프라스틴을 냉동보존(-8°C)시킬 때 트롬보프라스틴의 안정성의 변화는 Table 1과 같다.

매일 사용하고 남은 트롬보프라스틴을 버리지 않고 냉장고 냉동실에 보관하였을 때(이런 방법은 대부분의 검사실에서 가능한 방법임) 트롬보프라스틴은 점차로 역가가 감소되지만 정상혈장에 2초, 비정상혈장에 5초의 한계를 정한다면 약 1주일까지 프로트롬빈시간 측정에 사용할 수 있음을 나타내고 있다.

2) 트롬보프라스틴을 소분하여 kahn시험관에 넣어 냉장고와 냉동기에 보존시킬때 각각의 트롬보프라스틴의 역가의 변화는 Table 2와 같다.

트롬보프라스틴 A는 저온냉동기(-20°C)에서 10일까지 안정하나 냉장고($4\sim 6^{\circ}\text{C}$)에서는 그 역가가 점차 감소한다. 그러나 냉장고에 보관되었어도 프로트롬빈시간측정에는 사용할 수 있었다. 이기에서 10일 이후에는 관찰하지 않았지만 10일까지의 추세로 감소한다면 냉장고에 보관될 경우는 프로트롬빈 시간 측정에는 사용할 수 없음을 추측할 수 있다.

트롬보프라스틴 B는 -20°C 에 보존했을 때는 역가의

Table 1. The stability of stored frozen thromboplastins which are remainders of daily routine tests. (prothrombin time in second)

Day	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Normal plasma (CNP)	11.0	11.0	12.0	12.8	12.0	11.5	12.5	12.5	12.5	12.5	13.5	13.5	13.0	14.0	13.2
Abnormal plasma (CAP)	30.0	30.0	30.0	37.5	34.5	33.5	38.5	34.0	35.0	36.0	38.0	35.0	35.0	38.5	38.0

CNP: Citrated Normal Plasma

CAP: Citrated Abnormal Plasma

Table 2. Stability of thromboplastins divided into aliquots and stored in refrigerator and deep freezer.

		Day	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Thromboplastin -A	Normal plasma (CNP)	4°C-6°C	11.5	12.5	11.5	11.5	11.6	12.0	12.0	12.0	12.0	12.5	13.5
		-20°C	11.5	12.5	12.5	12.5	12.5	12.5	12.5	12.5	12.5	12.5	12.5
	Abnormal plasma (CAP)	4°C-6°C	30.0	30.8	32.5	32.5	32.7	32.5	33.5	33.0	33.0	34.5	34.5
		-20°C	30.0	30.0	31.5	31.5	32.0	32.5	32.0	32.0	32.5	32.0	32.0
Thromboplastin -B	Normal plasma (CNP)	4°C-6°C	13.5	15.3	14.6	17.5	15.0	16.5	17.5	17.5	15.5	16.5	17.0
		-20°C	13.5	14.4	14.4	14.5	14.5	13.5	13.5	13.5	13.5	14.0	14.0
	Abnormal plasma (CAP)	4°C-6°C	44.0	52.6	61.5	61.5	62.0	63.0	65.5	67.0	65.0	68.0	68.0
		-20°C	44.0	48.8	47.7	50.0	47.0	47.0	49.5	48.0	47.0	47.5	48.0
Thromboplastin -C	Normal plasma (CNP)	4°C-6°C	11.8	11.8	11.6	13.0	13.8	13.8	16.0	15.0	14.0	14.0	15.0
	Abnormal plasma (CAP)	4°C-6°C	32.0	44.5	45.0	56.0	60.5	65.0	71.5	75.0	78.0	75.0	70.0

감소가 미약하였으나 4°C~6°C의 냉장고에 보관하였을 때는 역가가 급속히 감소하여 48시간 이후에는 사용할 수 없을 정도로 감소되었다. 트롬보프라스틴 B의 경우에 제조회사의 제품설명서에는 종류수로 희석한 다음에 2-8°C에서 30일간 안정하다고 기재되어 있으나 본연구의 결과는 아주 다르다.

트롬보프라스틴 C(activated thromboplastin)의 경우에는 이것이 액체상태로 있어 4°C~6°C의 냉장고에만 보관하였다. 이때 역가가 급속히 감소한다. 대개 정상파라즈마로 시험한 결과는 5일정도 까지 안정성을 유지하나 비정상파라즈마로 시험한 결과는 24시간 후에도 사용할 수 없을 정도로 역가가 감소하였다. 이는 대개 이느 특정 응고인자에 민감하여 비정상혈장내에 그 응고인자가 급속히 저하되었기 때문이라 추측된다. 이 트롬보프라스틴 C의 경우에 위의 결과는 그 원인을 설명하기 어려운 점있다. 즉 이 트롬보프라스틴은 제조되어 사용할 때까지 오랫동안(최소한 3개월 이상) 액체상태로 4~6°C에 보존되어 왔든 것이다. 여기에 단순히 0.025M CaCl₂(같은 제조회사에서 생산되고 같은 package에 들어 있음)를 첨가한 상태로 만들어 4~6°C로 보존했을 뿐인데 역가가 급속히 감소된 것이다. 이때 추측되는 것은 CaCl₂를 첨가한 자체가 원인이 될 수 있는가? 하는 것과 조작중에 세균에 오염되었을 가능성이 있다.

이상의 결과로 트롬보프라스틴을 소분하여 -20°C에서 보관하는 것이 역가를 보존할 수 있는 방법이고 보관상태에 따라 제품사이에 역가의 안정도에 차이가 있음을 알 수 있다.

3) 트롬보프라스틴을 소분하여 보관할 때 각 응고인

자에 대한 감도의 변화는 Table 3과 Fig. 3 및 Fig. 4와 같다.

트롬보프라스틴 A는 사용된 혈장의 종류에 상관없이 일정한 증감을 나타내고 있다. 즉 Fig. 3에서 잘 나타

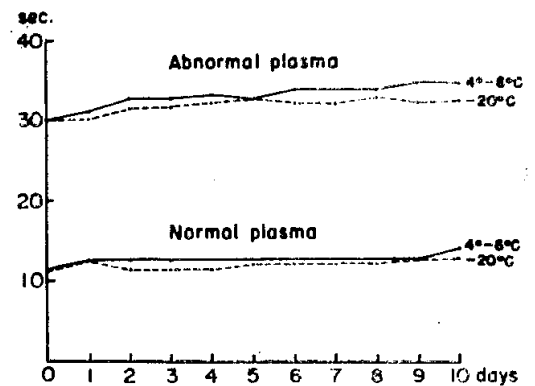


Fig. 1. Stability of thromboplastin A divided into aliquots and stored in refrigerator and deep freezer.

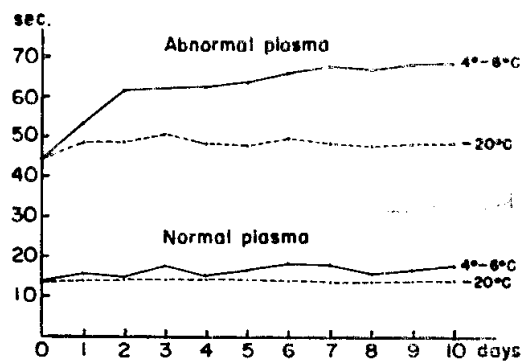


Fig. 2. Stability of thromboplastin B divided into aliquots and stored in refrigerator and deep freezer.

Table 3. The sensitivity of thromboplastin reagents divided into aliquot and stored in freezer, tested on normal plasma, factor V deficient plasma, factor VII deficient plasma and factor X deficient plasma. (prothrombin time in second)

Tube No.	Thromboplastin-A				Thromboplastin-B				Thromboplastin-C	
	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2
Normal plasma (SNP)	17.0	18.0	19.0	33.0	30	32	34	35	19.0	22.0
V def. plasma	30.0	38.0	50.0	138.0	65	60	53	54	68.0	83.0
VII def. plasma	33.0	36.0	40.0	59.0	57	60	80	56	65.0	136.0
X def. plasma	55.0	65.0	68.0	139.0	122	205	161	160	85.0	182.0

SNP: Standard Normal Plasma

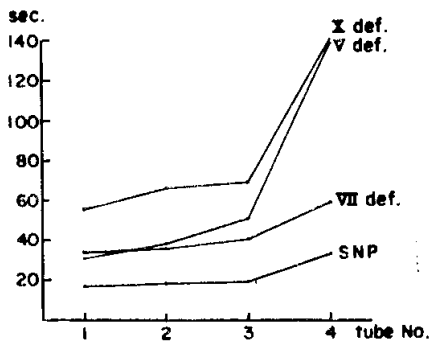


Fig. 3. The sensitivity of thromboplastin A reagent, tested on normal and Factor V, VII and X deficient plasmas.

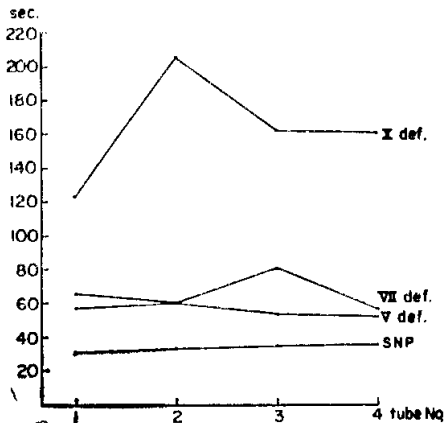


Fig. 4. The sensitivity of thromboplastin B reagent, tested on normal and Factor V, VII and X deficient plasmas.

나 있듯이 정상혈장(SNP)이나 제Ⅶ인자결핍혈장, 제Ⅴ인자결핍혈장, 제Ⅹ인자결핍혈장에서 모두 트롬보프라스틴의 감도가 일정하였다. 그러나 트롬보프라스틴 B는 (Fig. 4) 각 결핍인자에 대한 감도와 정상혈장(SNP)에 대한 감도가 서로 달랐다. 그 원인은 확실하지 않으나 일반적으로 프로트롬빈시간측정이 Ⅶ과 Ⅹ에 대하여 더 민감한 것으로 알려져있어(Biggs, 1962) 각 결핍혈장에 대한 민감도가 다르게 나타날 수도 있음을 추측할 수 있다. 그러나 여기서 알 수 있는 것은 트롬보프라스틴 제제에 따라 그 감도가 다르다는 점이다.

트롬보프라스틴 C는 트롬보프라스틴 A와 유사하게 일정한 경향을 나타내었다.

4) 증류수로 희석한 후 소분시켜 보관한 트롬보프라스틴으로 프로트롬빈 시간을 측정할 때 검사결과의 재현도는 Table 4와 같다.

이 재현도를 실험한 목적은 소분된 각트롬보프라스틴이 냉장 또는 냉동보존상태에서 증발, 또는 시험관의 차이에 따라 트롬보프라스틴의 역가변동에 차이가 나타나지 않을까 하는 점을 밝히고자 한 것이다. 트롬보프라스틴 A나 트롬보프라스틴 B에서나 모두 변이계수가 1.9~7.8%이어서 일반적인 검사의 허용변이계수 10%보다 낮았다.

5) 증류수로 일단 희석한 트롬보프라스틴을 다시 냉동건조시킬때의 트롬보프라스틴의 감도의 변화는 Table 5와 같다.

냉동건조후에 프로트롬빈시간이 1~4.5초간 연장되었다. 이는 냉동건조자체의 영향인지 또는 냉동건조시키기전에 보존상태에 의한 변화인지 확실하지 않다. 이런결과는 냉동건조과정을 개선시켜 단시간내에 냉동건조시키면 개선될 수 있을 것이다.

6) 증류수로 희석한 트롬보프라스틴을 다시 냉동건조시켰을 때 냉동건조시키는 과정에서 오는 조작에 의하여 프로트롬빈시간측정의 재현도에 미치는 영향을

Table 4. Reproducibility of prothrombin time on abnormal plasma with stored thromboplastins.

Day	Sec.	0		1		3		5		10	
				4°C-6°C	-20°C	4°C-6°C	-20°C	4°C-6°C	-20°C	4°C-9°C	-20°C
Thromboplastin-A	1	31.5	30.0	32.0	31.5	31.0	32.5	32.0	35.0	30.0	
	2	30.5	31.0	30.5	33.5	31.0	31.5	35.0	37.0	31.0	
	3	30.0	30.0	30.0	33.0	33.0	33.5	31.0	34.0	33.0	
	4	30.0	32.0	30.0	32.5	31.0	32.0	34.5	34.0	36.0	
	5	30.5	31.5	30.0	32.5	31.5	30.0	32.0	34.0	32.0	
	6	31.0	30.5	30.0	32.5	32.0	34.0	32.5	38.0	33.5	
	Mean	30.5	30.8	30.4	32.5	31.5	32.2	32.8	35.3	32.5	
CV	1.9	2.5	2.6	2.0	2.5	4.4	4.7	4.9	6.4		
Thromboplastin-B	1	44.5	52.0	47.0	60.0	50.0	64.0	50.0	68.5	51.5	
	2	42.0	56.0	46.0	61.5	49.0	63.5	48.5	60.0	50.0	
	3	45.0	53.0	51.5	61.0	51.0	65.5	50.0	7.50	48.0	
	4	45.0	53.5	46.0	59.0	50.0	61.5	48.0	73.0	49.0	
	5	41.5	48.0	49.5	57.0	47.5	67.0	47.0	68.0	47.5	
	6	44.0	54.5	50.0	64.0	47.0	60.0	47.0	65.5	49.0	
	Mean	43.6	52.8	48.3	60.4	49.0	63.5	48.4	68.3	49.1	
CV	3.5	5.3	4.7	3.9	3.1	4.0	2.8	7.8	2.9		

Table 5. Sensitivity of reconstituted thromboplastin after re-lyophilization.

	Reconstituted thromboplastin	After re-lyophilization	Difference
Thromboplastin-A	11.0 sec.	12.0	1.0
	11.0	14.0	3.0
	11.5	15.5	4.0
	11.5	13.0	1.5
	11.0	13.5	2.5
	12.0	15.5	3.5
	13.0	15.0	2.0
	13.0	15.5	2.5
	15.0	18.0	3.0
15.5	18.0	2.5	
Thromboplastin-B	13.0	12.0	4.0
	13.0	16.5	3.5
	13.5	14.6	1.1
	15.5	20.0	4.5
	21.0	25.0	4.0

조사한 결과는 Table 6과 같다.

트롬보프라스틴의 제품이나 그 역가에 관계없이 재현도는 양호하였다. (변이 계수가 0.6~2.8%임)

7) 소분하여 냉동시킨 트롬보프라스틴을 용해시키는

Table 6. Reproducibility of prothrombin time on standard plasma with re-lyophilized thromboplastins.

Before lyophilization	Thromboplastin-A			Thromboplastin-B			
	11.0	13.0	15.5	13.5	15.5	21.0	
Re-lyophilized thromboplastin	1	13.0	15.0	18.5	14.5	20.0	24.5
	2	13.0	16.0	18.0	14.5	20.0	25.0
	3	13.0	15.5	18.0	14.5	20.0	25.0
	4	12.0	15.5	18.0	14.0	20.5	25.0
	5	12.5	15.0	18.0	15.0	20.0	25.0
	6	12.5	15.0	18.5	15.5	20.0	25.0
	7	12.5	15.5	19.0	15.0	20.0	25.0
	8	12.5	15.5	18.0	15.0	20.0	25.0
	9	12.5	15.0	18.0	15.0	20.0	25.0
	10	12.5	15.0	18.0	15.0	20.0	25.0
Mean	12.6	15.4	18.2	14.8	20.1	24.9	
CV(%)	2.4	2.2	2.2	2.8	1.0	0.6	

방법에 따른 감도의 변화는 Table 7과 같다.

일반적으로 실온에서 녹히는 것을 권장하고 있으나 본 실험결과는 실온에서 녹히는 것과 항온수조에서 녹히는 것 사이에 뚜렷한 차이가 없었다. 오히려 시간을 절약하는 의미에서라면 항온수조에서 녹히는 방법이 권장되어야 할 것이다.

Table 7. Variability of sensitivity of frozen thromboplastin reagent depending on thawing methods.

Day	thawing at	Refrigerator	Freezer		Deep freezer	
			Room Temp.	Water Bath	Room Temp.	Water Bath
0		11.0	11.0	11.0	11.0	11.0
1		12.3	12.3	12.5	12.3	12.5
2		12.0	12.5	12.5	12.5	12.5
3		12.5	12.5	12.5	12.5	12.5
4		12.0	12.5	12.5	12.5	12.5
5		12.5	12.5	12.5	12.5	12.5
6		12.0	12.5	12.5	12.5	12.5

8) 트롬보프라스틴을 종류수로 희석한 다음에 매일 냉동시키고(-20°C) 다시 녹히고 하는 과정을 반복하였을 때 트롬보프라스틴의 감도의 변화는 트롬보프라스틴 A의 경우에는 7일까지 안정하였다. 그러나 트롬보프라스틴 B는 심한 감도의 저하를 나타내었다. 즉 트롬보프라스틴의 종류에 따라 감도의 안정성에 심한 차이를 나타내었다(Table 8).

考 按

조직내에 응고인자가 존재한다는 것은 오래 전부터 알려져 왔으나(Salibi, 1952) 이물질이 프로트롬빈에 작용하여 트롬빈을 만든다는 것을 밝힌 것은 전세기 말이었다(Schmidt 1893). 이 물질에 트롬보프라스틴이라고 명명한 것은 Howell(1912)이다. 그뒤로 이물질에 대하여 본격적인 연구가 시작된 것은 1935년경부터이다. Quick(1936)가 one-stage prothrombin time을 개발하여 응고인자의 결핍상태를 정량적으로 나타낼 수 있게 되었고 이에 따라 혈우병이나 이와 유사한 각종 출혈성 경향을 가진 각종질환등을 진단하게 되었다. Quick(1938)가 다시 아세톤으로 탈수시킨 토끼뇌를 트롬보프라스틴제제로 사용함에 따라 다른 응고인자들이 오염되지 않고 안정된 제품을 만들 수 있게 되었다. 이 제품은 다른 동물에서 얻은 것보다 여러가지 정제를 갖고 있는

데 트롬보프라스틴활성이 강하고 프로트롬빈, 제 V 응고인자, 제 VII 응고인자, 제 X 응고인자가 오염되지 않았다 또한 여러가지 다른 방법으로 트롬보프라스틴을 만들 때는 트롬보프라스틴역가의 저하를 감수해야 했었다.

그래서 현재는 대부분의 트롬보프라스틴제제가 아세톤 처리한 토끼뇌로 만들어진다. 그러나 회사제품에 따라 그 역가가 상당히 차이가 나서 결국 프로트롬빈시 간측정시 그 결과가 아주 다르게 된다. 돼지, 말, 사슴, 소등의 조직이나 장기도, 폐, 태반등 여러가지를 사용하게 됨에 따라 같은 병적상태일지라도 그 방법에 따라 결과가 다르게 된다. 더구나 최근에 항응고제요법이 널리 쓰이게 됨에 따라 이를 조절하기 위하여 트롬보프라스틴의 표준화가 요구되고 있다. 그래서 트롬보프라스틴의 안정성, 특이성, 재현성이 일정한 기준에 도달하여야 하고 그 한계를 많은 사람들이 제시하고 있다.

안정성은 열계 냉동건조법에 의하여 거의 완벽하게 이루어지고 있다. 그러나 제품사용시 그 사용법을 지시한 설명서 대로 따를 수 없을 때는 문제점이 생기게 된다.

트롬보프라스틴의 감도는 정상검체와 비교하여 비정상검체가 얼마나 비정상적인 결과를 나타내는가 하는 것을 말한다. 정상검체와 비정상검체를 완전히 구별할수록 감도가 높은 것이다. 그러나 요즘 문제가 되는 것은 전체적인 검체에 대한 감도보다 각인자에 대한 개별적인 감도가 어떻게 되느냐 하는 것이 관심의 대상이 되고 있다. 특히 항응고요법을 사용할 때는 목적하는 응고인자에 특이성이 높은 트롬보프라스틴을 사용하여야 한다. 대개 제 VII 응고인자와 제 X 응고인자에 대하여 감도가 낮다(Owren 1975). 그러나 결핍된 응고인자가 신천적으로 결핍된 경우와 인공적으로 상체에서 또는 상체내에서 결핍되었는가에 따라 트롬보프라스틴의 감수성에도 차이가 있다. 이 감수성을 나타내는데 "minimal sensitivity ratio"를 이용하여 정상혈장과 각 응고인자결핍혈장의 프로트롬빈시간의 비가 1:2.5(~3.0)이면 감수성이 있다고 말할 수 있다. 본 연구에서는 이런 방법을 사용하지 못한 것은 응고인자

Table 8. Sensitivity of thromboplastins which were frozen and thawed repeatedly.

	Day	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
		Thromboplastin-A	CNP	11.5	12.6	12.5	12.5	13.5	12.5	12.5	12.5	13.5
	CAP	30.0	32.5	35.3	35.3	35.3	36.0	36.0	36.0	37.0	36.5	38.5
Thromboplastin-B	CNP	13.5	14.5	14.5	14.7	13.6	15.0	15.0	15.5	14.5	15.5	16.0
	CAP	44.0	51.0	55.5	64.0	60.0	60.0	55.5	62.5	60.0	63.5	63.0

—ABSTRACT—

Preservation of Reconstituted Thromboplastin of various Products

Han Ik Cho, M.D. and Sang In Kim, M.D.

Department of Clinical Pathology, College of Medicine, Seoul National University, Seoul, Korea,

결핍현상을 국내에서 취득하기가 어렵기 때문이었고 단 순히 결핍상태에 대한 전체적인 감수성만 관찰하였다.

본 연구에서 시도된 소분시킨후 보존상태에 따른 감 수성의 변화는 제 X 응고인자나 제 VII 응고인자의 결핍 상태를 측정하는데 아무런 장애가 없음이 밝혀졌고 냉 동건조시키는 과정에서 트롬보프라스틴의 감수성이 감 소되었다든가 응해시키는 방법에 따라서는 별 차이가 없었다는 사실 등은 앞으로 트롬보프라스틴의 국내생산 하는데 중요한 재료가 되리라 믿는다. 앞으로 냉동건 조시키는 방법, 방부제의 선택 또한 응고시험판독에 합당한 미세한 과립상의 좋은 제품을 만드는 방법등을 더욱 추구하여야 할 것이다.

結 論

일단 희석된 트롬보프라스틴의 감도를 감소시키지 않 고 보존할 수 있는 방법을 모색하고자 여기까지 시도 를 한 결과는 다음과 같다.

1. 매일 매일 사용하고 남은 트롬보프라스틴을 보존 하면 지온냉동(-8°C) 상태에서 1주일까지 보존이 가능 하다.

2. 희석된 트롬보프라스틴을 장기간 보존할 수 있는 방법은 소분하여 지온냉동(-20°C)시키는 것이 10일까지 감도의 변화없이 보존할 수 있다. 그러나 제품에따 라 감도변화에 차이가 있었다.

3. 트롬보프라스틴이 각종 응고인자결핍에 대한 감 도는 제품에 따라 차이가 있고 정상혈장에 대한 감도 와 인자 결핍혈장에 대한 감도사이에 평행관계를 나타 내지 않는 제품도 있다.

4. 희석한 트롬보프라스틴을 다시 냉동건조시키면 감 도가 감소되고 보존법으로 실용적 가치가 없는 것으로 사료된다.

5. 냉동시킨 트롬보프라스틴을 응해시키는 법에 따 른 프로트롬빈시간에 차이는 없었다. 실제적인 면에서 항온수온조에 응해시키는 법이 실용적인 것으로 사료 된다.

(본 연구를 수행하는데 시종 힘조하여주신 서울대학병 원임상검사과의 경연신양, 임연희양, 환복연양에게 감사 를 드린다)

Thromboplastin is one of the most widely used biological products in our country; and like most biological products it is quite expensive and it is difficult to obtain a proper commercial product of it. If it is reconstituted with distilled water it must be used within hours and the remainder is discarded even though the instruction of the maker indicates that they are stable for some days.

Moreover there is usually small number of daily requests for prothrombin time tests in small laboratories, and considerable amount of reconstituted thromboplastin, therefore, would be discarded.

It is quite apparent that large amount of reconstituted thromboplastin would become useless for this reason unless otherwise treated to save its sensitivity longer than several hours after reconstitution. In order to find a suitable method of its storage, which enables to maintain its sensitivity we performed a series of experiments, such as freezing, lyophilizing and several others.

First trial was to see the effect of freezing store; that is reconstituted remainder of thromboplastins were stored frozen up to 14 days and in the meantime the prothrombin time tests were performed every day with the frozen-stored sample.

Thromboplastins were thawed whenever we use it at room temperature and evaluate the sensitivity of them both on the normal and abnormal plasma.

Second trial was to observe the results when we divide them into several parts of aliquots in Kahn tubes to keep them in refrigerator or deep freezer for one through ten days. With these stored thromboplastin, prothrombin time were checked every day to

see the fluctuations in the thromboplastin sensitivity if there is any.

When we were following this method, we were particularly interested in the way how to thaw the frozen thromboplastin since varieties of thawing procedure would bring about different results; for example, thawing them at water bath or at room temperature may perhaps results in different ways.

Third trial was to re-lyophilize the reconstituted thromboplastin. The reconstituted thromboplastin were lyophilized once again and the changes in their sensitivity were evaluated in accordance with prothrombin time.

Fourth trial was to evaluate the effects of repeated freezing and thawing on the stability of thromboplastins.

The results made from the this study are as follows.

First, the remainders of daily reconstituted thromboplastin left over being used is not adequate for prothrombin time test even though stored in deep freezer. Only 2 days of storage is acceptable as the maximum of its allowance limit, if forced to use again.

Second, the best method for to store reconstituted is that thromboplastin is divide into several aliquots and storing in a deep freezer.

And the stability of thromboplastins was variable among the various products of thromboplastins.

Third, the sensitivity of thromboplastin to standard coagulation factor deficient plasmas are also variable

among the products examined.

Fourth, relyophilization of reconstituted thromboplastin, is not acceptable for storage.

Fifth, the problem how to thaw the frozen thromboplastin is insignificant and not affected whether the thromboplastin is thawed in room temperature or in water bath.

REFERENCE

- Biggs, R., R.G. MacFarlane: *Human Blood Coagulation and its Disorders, 3rd ed. Philadelphia; F.A. Davis Co. 1962 p. 134.*
- Howell, W.H.: *The nature and action of thromboplastic (Zymoplastic) substance of tissues. Am. J. Physiol., 331, 1912*
- Owren P.A.: *Criteria for an Acceptable Thromboplastin preparation Thrombos. Diathes. hemorrh (Stutlg) 33: 165, 1975*
- Quick, A.J.: *On Various properties of thromboplastin (acquons tissue extracts) Am. J. Physiol, 114, 282. 1936; Ibid, On the action of heparin and its relation tot hromboplastin, Am J. Physiol. 115 : 317, 1936*
- Quick, A.J.: *The nature of the bleeding in Jaundice. JAMA, 110 : 1658, 1938.*
- Salibi, B.S.: *The mechanism of blood coagulation, Historical review and outline of modern concepts. Surg. Gynec & Obst., 95 : 105, 1952.*
- Schmidt, A.: *Zur Blutlehre, Leipzig 1893.*