Trima Accel®의 leukoreduction chamber내 세포의 성상분석과 수지상세포의 분화유도

연세대학교 대학원
의학과
이 양 순

Trima Accel®의 leukoreduction chamber내 세포의 성상분석과 수지상세포의 분화유도

지도교수 김 현 옥

이 논문을 석사 학위논문으로 제출함

2008년 12월

연세대학교 대학원

의학과

이 양 순

이양순의 석사 학위논문을 인준함

심사위원_____인

심사위원_____인

심사위원_____인

연세대학교 대학원

2008년 12월

감사의 글

부족한 제자를 받아주시고 석사학위논문을 완성할 수 있도록 많은 지도와 가르침을 주신 김현옥 교수님, 실험의 기초를 다져주시고 세포배양에 대한 저의 처음 시도를 세심하게 가르쳐 결과에 이르게 도와 주신 김한수 부교수님, 자상한 지도로 연구자로서의 한걸음을 뗄 수 있게 도와주신 이승태 부교수님께 머리 숙여 감사를 드립니다. 또한 실험에 필요한 LRS chamber를 모아주시고, FACS 결과를 같이 판독하여 주시고, 실험 단계마다 많은 도움을 주신 진단검사의학과 배인철, 이경애, 안미숙선생님, 세포치료센터의 최유정, 김형진 선생님, 대한적십자사 중앙혈액원 이미경 원장님, 그리고 추억의 전공의 시절을 같이 보낸 진단검사의학과 의국동료 및 선후배님들에게 감사의 마음을 전합니다. 끝으로 본 논문을 완성하는데 있어 기도해 주시고, 물심양면으로 섬겨주신 사랑하는 교회식구들과 가족들에게 감사와 사랑을 드립니다.

2008년 이양순 올림

차 례

국문요약 ·····1

I. 서 론 ·····3

II. 재료 및 방법 ·····5

1. LRS chamber 수집 ·····5

2. 세포의 성상분석 ·····6

가. 세포수집방법 ·····6

나. 혈액학적분석 ·····7

다. 단핵세포층 분리 ·····7

라. 유세포분석기를 이용한 면역표현형 분석 ·····8

마. CD34+세포수 측정 ·····8

3. 수지상세포의 분화 유도 ·····8

4. 통계학적 분석 ·····8

III. 결과 ·····9

1. 세포의 성상분석 ·····9

2. 수지상세포의 분화 유도 ·····12

IV. 고찰 ·····14

V. 결론 ·····18

참고문헌 ·····19

영문요약 ·····22

그림 차례

Figure 1. Trima Accel® apheresis machine and LRS chamber. ·····6

Figure 2. Wright-Giemsa stain of cells which isolated from LRS chambers (A), CD14+cells seperated by MACS®Seperation (B), immature dendritic cells on Day 5 (C), mature dendritic cells on Day 7 (D). ·····12

Figure 3. The immunophenotypic characteristics of mature dendritic cells (mDC) and immature dendritic cells (mDC) on Day 0, 5 and 7. (A) CD14+cells seperated from LRS chambers on Day 0. (B) The iDC were generated by culturing CD14+cells with GM-CSF and IL-4 on Day 5. (C) The mDC were generated from iDCs for additional 2 days culture with TNF-α, IL-1β, IL-6, and PGE2.·····13

표 차례

Table 1. Cell count of leukocytes and comparision of cells between in LRS chambers and in buffy coats from whole blood ·····10

Table 2. Flow cytometric characterization and comparision of mononuclear cells isolated from LRS chambers and buffy coats from whole blood ·····11

국문요약

Trima Accel®의 leukoreduction chamber내 세포의 성상분석과 수지상세포의 분화유도

인체유래 백혈구를 연구용으로 얻는 것은 용이하지 않다. 일반적으로 연구용으로 사용된 백혈구 소재는 전혈로부터 얻어낸 백혈구연층(buffy coat)이나 백혈구제거용 필터에 걸러진 백혈구층을 모아서 연구용으로 사용하여 왔으며 최근에는 성분헌혈채집기인 Trima Accel® (CaridianBCT, Lakewood, CO, USA)의 LRS chamber내 세포가 새로운 연구 소재라고 소개된 바 있다. 본 연구에서는 Trima Accel®의 LRS chamber내 백혈구 구성만을 분석하였던 기존 보고에 비해 LRS chamber내에 모아진 세포의 면역학적 분석과 연구용의 활용 가능성을 확인하고자 수지상세포로의 분화실험을 통하여 그 기능성을 평가하였다.

건강한 성인 26명으로부터 동의를 받고 Trima Accel®을 이용하여 혈소판 성분채집을 실시한 후 폐기되는 채집 kit에서 LRS chamber를 분리하였다. LRS chamber내 세포수를 측정하였고 T세포, B세포, NK세포, CD14+세포의 구성성분을 유세포분석기를 이용하여 분석하였으며, Stem kit® (Beckman Coulter Inc., Fullerton, CA, USA)를 사용하여 CD34+세포수를 측정하였다. MACS® Seperation (Miltenyi Biotec Inc., Auburn, CA, USA)로 CD14+세포를 분리하였으며 GM-CSF와 IL-4를 첨가하여 5일간 배양하고 2일간 TNF-α, IL-1β, IL-6, PGE2로 자극하여 수지상세포의 성숙을 유도하였다.

LRS chamber내의 총백혈구수는 10.8 x 10^8 (범위 7.7 x 10^8 - 18.0 x 10^8) 였으며, T세포, B세포, NK세포, CD14+세포의 백분율은 총백혈구의 61.1% (범위 31.6 - 66.1), 5.5% (범위 2.2 - 12.1), 15.7% (범위 13.7 - 19.9), 12.4% (범위 8.6 - 32.3)였다. 대조군으로

비교한 기존의 400 mL 전혈유래 백혈구연층으로부터 회수한 총백혈구수는 14.9 x 10^8 (범위 10.5 x 10^8 - 22.0 x 10^8)였다. T세포, B세포, NK세포, CD14+세포의 백분율은 총백혈구의 65.5% (범위 31.6 - 66.1), 10.2% (범위 3.4 - 16.2), 12.9% (범위 4.8 - 26.5), 8.7% (범위 3.2 - 15.2)였다. 두 그룹간에 총백혈구수에 통계학적으로 유의한 차이가 있었으나, 림프구와 단핵구수는 통계학적인 차이가 없이 비등한 세포수를 가지고 있었다. 특히 CD4+세포수와 B세포수가 두 그룹간에 통계학적으로 유의한 차이가 있었다(p<0.05). CD34+세포수가 말초혈액인데도 불구하고 0.95 x 10^6 (범위 0.15 x 10^6 - 2.60 x 10^6)가 포함되어 있었다. CD14+세포는 7일동안 배양하여 수지상세포로 분화 및 성숙함을 확인하였다. 폐기되는 세포를 회수함으로 백혈구계의 연구를 진행하는데 있어서 좋은 세포원임을 알 수 있었다. Trima Accel®의 LRS chamber에는 단핵구와 림프구가 풍부하였다. 생존력과 기능성을 가진 세포들로 구성되어 있어서 세포의 재활용 측면에서 뿐 아니라 백혈구 특히 림프구를 이용한 독성실험 연구, 수지상세포의 연구 소재, 그리고 CD34+양성세포를 얻을 수 있음으로서 말초혈액을 이용한 줄기세포 연구용 소재로도 매우 유용할 것으로 판단되었다.

핵심되는 말 : Trima Accel, leukoreduction chamber, 수지상세포

Trima Accel®의 leukoreduction chamber내 세포의 성상분석과 수지상세포의 분화유도

<지도교수 김현옥>

연세대학교 대학원 의학과

이 양 순

I. 서 론

인체유래 백혈구세포 이용과 활용에 대한 연구들이 많이 진행되고 있다[1, 2]. 그러나 이에 필요한 정상 백혈구를 얻는 것은 쉽지 않다. 연구에 자발적으로 혈액을 제공하는 사람이 적을 뿐만 아니라, 한 사람에게서 얻을 수 있는 세포의 수는 한계가 있기 때문이다. 연구용으로 사용된 백혈구 소재는 주로 검사실에서 연구원들이 돌아가면서 자원하여 채혈한 혈액에서 얻거나 전혈에서 성분분리시 원심분리하여 얻은 백혈구연층 (buffy coat)을 주로 사용하여 왔다. 그러나 2000년대 초반에 동종면역을 방지하고 수혈로 인한 바이러스 감염의 전파를 줄이기 위해 백혈구여과제거 혈액제제가 소개되면서 이 때 사용한 백혈구제거용 필터를 얻어 역방향으로 생리식염수 등을 사용하여 세척함으로서 헌혈 혈액으로부터 제거된 백혈구를 이용하게 되었다[3-7]. 이는 폐기되는 필터에 걸린 백혈구를 사용한다는 장점이 있는 반면 생리적으로 적합한 필터라 하더라도 한번 부착하여 변형을 받은 백혈구를 회수하여 사용하는 것이 과연 그 기능에 변화를 발생시키지 않을까하여 연구 소재로서의 가능성에 대해 많은 논란이 이어지고 있다[7, 8]. 그러나 여러 종류의 백혈구제거용 필터가 소개되면서 제조회사별로 필터에서 회수한 세포의 성상에 관한 비교 연구논문들이 많이 발표되었다[7-11]. 한편 혈소판 성분채집에서도 백혈구여과제거 성분채집혈소판을 제조하는 기기가 소

개되면서 필터는 아니지만 세포의 비중과 원심분리 효과로 혈소판 성분채집과정에서 백혈구를 제거할 수 있는 leukoredution system (이하 LRS로 표기함) chamber를 장착한 kit가 개발되었다. 즉 혈소판 성분채집기인 Trima Accel® (CaridianBCT, Lakewood, CO, USA, 이하 생략함)에 사용하는 일회용 채집 kit에는 혈소판이 생리적인 여과기 역할을 하는 LRS chamber 장착을 통하여 백혈구를 제거하게 된다. 즉, 혈소판 채집이 시작되면, LRS chamebr 안이 혈소판으로 채워질때까지 혈소판이 축적되어 혈소판층을 형성하게 된다. Chamber 안의 혈장 이동에 의해 혈소판이 하나씩 chamber 밖으로 빠져나가서 모아지고 입자가 큰 백혈구는 혈소판층을 통과할 수 없어 chamber내에 그대로 남게된다. 따라서 혈소판 성분채집과정 중에 원심분리기 안에서 백혈구 제거가 완료되고, 최종 모아진 성분채집혈소판 농축액 내에는 백혈구수가 1×10^6 이하로 제거해 준다[12]. Trima Accel®를 이용한 성분채집혈소판은 LRS chamber를 통하여 혈소판내의 백혈구 오염을 감소시키고, 백혈구가 모아진 LRS chamber는 폐기하게 된다.

우리나라의 혈소판 성분채집술은 1980년 혈액성분채집기가 도입되면서 시작되어, 대한적십자사의 자료에 따르면 2007년에는 대략 71,000건이 시행되었고 총 수혈된 혈소판 176만 단위로 성분채집혈소판이 수혈되는 혈소판의 24%을 차지하고 있다[13]. 우리나라에 도입되어 사용되고 있는 혈소판 혈액성분채집기는 MCS® (Haemonetics, Braintree, MA, USA), Fenwal CS-3000plus® (Baxter, Deerfield, IL, USA), Amicus®Seperator (Baxter, Deerfield, IL, USA), COBE®Spectra (CaridianBCT, Lakewood, USA), Trima Accel® 등이[14, 15] 있으며 LRS chamber를 장착하고 있는 Trima Accel®은 2006년 현재 우리나라에 48대가 도입되어 있다. 따라서 Trima Accel®의 LRS chamber에 모아진 세포의 활용을 확대시킬 수 있다면 그동안 백혈구연층의 사용상의 단점을 쉽게 극복할 수 있을 것으로 생각되었다.

본 연구에서는 단순히 LRS chamber내의 세포의 성상만을 비교한 Neron 등의 연구[16, 17]에 비해 여기서 획득한 백혈구세포를 이용하여 수지상세포로의 분화를 유도하고 그 기능을 평가함으로서, 앞으로

LRS chamber내에 모아진 백혈구가 림프구와 수지상세포 등의 연구 소재로서 그 가능성을 평가해 보고자 하였다.

II. 재료 및 방법

1. LRS chamber 수집

세브란스병원 혈액원과 대한 적십자사 중앙혈액원에서 26명의 건강한 헌혈자로부터 Trima Accel®을 사용하여 혈소판성분채집을 시행한 후 폐기되는 kit에 부착된 LRS chamber를 수거하였다. 모든 헌혈자는 헌혈자의 기준에 적합한 사람이었으며 헌혈 전에 헌혈자로부터 채취한 백혈구를 연구용으로 사용할 것에 대한 서면 동의서를 받았다. Trima Accel®을 이용한 혈소판 성분채집술을 시행하기 전에 장비에 카셋트, 원심분리기, LRS chamber로 구성된 kit를 장착하였다. 카셋트를 장착하고, 혈액제제백에서 공기를 제거하고 입구 및 출구 튜브와 펌프가 작동하는지 확인한 후, 항응고제 acid citrate dextrose를 흘려보냈다. 헌혈자의 키와 몸무게 등의 헌혈자 정보를 입력한 후, 혈소판 채집을 시작하였고 혈소판 채집이 완료되는 경고음이 울린 후, 린스백을 진행하였다. 혈소판백과 항응고제백을 봉합한 후, 헌혈자에게서 바늘을 제거하였다. 장비에서 kit를 제거하기 전에 LRS chamber와 연결된 입구와 출구 튜브를 먼저 봉입하여 LRS chamber를 수득하고 나머지는 폐기하였다(Fig. 1).

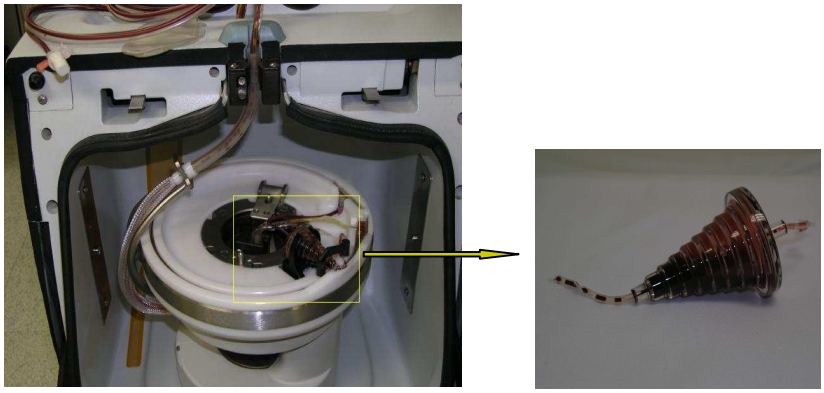

Fig.1. Trima Accel® apheresis machine and LRS chamber

대조군으로는 전혈에서 성분분리시 원심분리하여 얻은 백혈구연층을 사용하였다. 헌혈자 9명으로부터 삼중 헌혈백에 400 mL 전혈을 헌혈받은 후 실온에서 30분 동안 방치하고 2000 rpm 에서 3분 동안 원심분리를 하였다. 혈소판풍부혈장을 다른 백으로 옮긴 후, 나머지 농축적혈구백의 상층부위에 있는 백혈구연층을 분리하였다. 모든 과정은 무균적으로 시행되었으며 성분제제는 수혈용으로 사용하였다.

2. 세포의 성상분석

가. 세포수집방법

수집 kit로부터 봉입하여 분리한 LRS chamber와 연결된 입구와 출구 튜브를 알코올로 잘 닦는다. 입구 튜브를 잘라내고 50 mL falcon 튜브 위에 입구 부위가 아래로 향하도록 올려 놓은 후 출구 튜브를 가위로 자른다. 50 mL 주사기에 phosphate buffer saline (PBS) 40 mL를 넣고, 출구 튜브 쪽에 바늘을 삽입하고 분주하여 LRS chamber내 세포를 수집한다. 전혈로부터 분리하여 얻은 백혈구연층이 담긴 백은 50 mL 생리식염수로 충분히 세척하여 50 mL falcon 튜브에 모았다.

나. 혈액학적분석

LRS chamber로부터 수집한 세포농축액과 전혈로부터 얻어진 백혈구연층의 세포를 각각 1 mL씩 시험용 튜브에 옮기고 자동혈구분석기 Advia®2120 (Bayer Corporation, Tarrytown, NY, USA)을 이용하여 통상혈액검사와 백혈구 감별계산을 하였다. 말초혈액도말표본을 만들어 Wright-Giemsa 염색을 하였고 백혈구 모양과 분포를 관찰하였다.

다. 단핵세포층 분리

Ficoll-Hypaque (비중 1.077, Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden)을 50 mL falcon 튜브에 25 mL을 넣고, LRS chamber와 전혈로부터 얻어진 세포를 각각 25 mL씩 그 위에 천천히 분주하였다. 900 x g로 20℃에서 20분간 원심분리하여 상층액을 버리고, 단핵세포층을 다른 50 mL falcon 튜브에 모았다. PBS 50 mL을 넣고 500 x g에서 10분 동안 원심분리하고, 다시 PBS 50mL을 넣고 300 x g에서 10분간 원심분리하여 모아진 세포를 두번 세척하였다. 남겨진 침전물은 손으로 흔들어 풀고 PBS 2-3 mL을 넣어 세포가 고루 분포하도록 하였다. 세포와 PBS를 1:100으로 희석하여 10 μL를 Neubauer chamber에 넣고 세포수를 측정하였다.

라. 유세포분석기를 이용한 면역표현형 분석

면역표현형 분석을 위하여 CD45-FITC, CD3-FITC, CD4-FITC, CD8-PE, CD19-PE, CD16+56-PE, CD14-PE (Beckman Coulter Inc., Marseille, France)에 대한 단클론성 항체를 사용하였다. IgG1/IgG1, CD45/CD14, CD4/CD8, CD3/CD19, CD3/CD16+56 조합으로 검사를 진행하였다. 5개의 튜브에 검체 100 μL씩 넣고, 조합된 항체도 각각 100 μL씩 넣은 후 20분 동안 암실에 두었다. 적혈구 분해 용액 1 mL을 넣고 10분 동안 암실에 두었다. PBS 2mL를 넣고 5분 동안 원심분리한 후에 상층액을 버렸다. 침전물을 손으로 흔들어 풀고, PBS 1mL를 넣어 유세포분석기 EPICS®XL (Beckman Coulter Inc., Miami, FL, USA)로 분석하였다.

마. CD34+세포수 측정

CD34+세포수는 Stem-kit® (Beckman Coulter Inc., Fullerton, CA, USA)을 이용하여 측정하였다. 2개의 튜브에 각각 검체 100 μL씩 넣고 CD45/IgG1와 CD45/CD34 항체의 조합으로 각각 20 μL씩, 7-aminoactinomycin D (7-AAD) 20 μL씩 넣고 20분간 암실에 두었다. 적혈구 분해 용액 2 mL을 각각 넣고, 10분 동안 암실에 두었다. Stem cell count 시약인 fluorosphere을 100 μL씩 넣고 5분간 암실에 둔 다음, 유세포분석기 EPICS®XL (Beckman Coulter Inc., Miami, FL, USA)로 분석하였다[18].

3. 수지상세포의 분화 유도

LRS chamber로부터 얻은 세포에서 단핵세포층을 분리한 후 MACS ®Seperation (Miltenyi Biotec Inc., Auburn, CA, USA) kit를 이용하여 CD14+세포를 분리하고 Neubauer chamber 혈구계산기로 세포수를 측정하였다. 5.0 x 10^5개의 세포를 10%우태아혈청 (fetal calf serum) (Hyclone; Logan, UT, USA)가 포함된 RPMI-1640 (Gibco, Grand Island, NY, USA) 배지 1 mL에 넣고, 20 ㎍/mL granulocyte-macrophage colony stimulating factor (GM-CSF) (Leucogen, LG Life Science, Seoul, Korea), 20 ng/mL interleukin-4 (IL-4) (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) 첨가하여 37℃, 5% CO_2 배양기에서 5일간 배양하였다. 5일째 되는 날에 세포를 수확한 후 RPMI-1640 (Gibco, Grand Island, NY, USA) 배지에 다시 부유시킨다. Tumor necrosis factor-α (TNF-α, 20 ng/mL), interleukin-1 β (IL-1β, 500 U/mL), interleukin-6 (IL-6, 500 U/mL), prostaglandin E2 (PGE2, 2 x 10^{-7} M) 를 넣어 수지상세포의 성숙을 유도하였다[19, 20]. 접종 5일과 7일째에 각각 세포를 수확하였고, CD40-FITC, CD80-PE, CD86-PE, HLA-DR-FITC, CD1a-FITC, CD83-PE (Beckman Coulter Inc., Marseille, France)에 대한 단클론성 항체를 이용하여 세포표지자의 변화를 관찰하였다. IgG1/IgG1, CD1a/CD83, HLA-DR/CD86, CD40/CD80 조합으로 검사하였다[19, 21-23]. 일부 세포는 cytospin하고, Wright-Giemsa 염색하여

세포의 형태를 관찰하였다.

4. 통계학적 분석

통계학적인 분석은 Mann-Whitney U test를 이용하였다.

III. 결과

1. 세포의 성상분석

LRS chamber내의 총백혈구수는 10.8 x 10^8 (범위 7.7 x 10^8 - 18.0 x 10^8) 개였고 림프구와 단핵구(monocyte)는 각각 총백혈구수의 67.5% (범위 0.0 - 86.5) 와 13.9% (범위 7.9 - 57.3)를 구성하고 있었다. 또 중성구는 총백혈구수의 4.2% (범위 1.8 - 14.4)이었다(Table 1). Ficoll-Hypaque (Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden)으로 백혈구연층을 분리한 후 얻어진 총단핵세포수는 9.7 x 10^8 (범위 4.0 x 10^8 - 14.3 x 10^8)로 90%의 회수율을 보였다.

면역표현형 분석시에 CD4+ T세포, CD8+ T세포, CD16+CD56 NK세포, CD14+세포가 각각 총단핵세포의 29.6% (범위 18.7 - 37.6), 27.7 % (범위 19.2 - 40.0), 15.7 % (범위 13.7 - 19.9), 12.4% (범위 8.6 - 32.3)를 구성하였다(Table 2). CD34+세포수는 0.95 x 10^6 (범위 0.15 x 10^6 - 2.60 x 10^6)였고, 7-AAD로 염색하였을때 세포의 생존률은 100%로 관찰되었다(n=8). 대조군으로 사용한 전혈유래 백혈구연층과 비교하였을 때 총백혈구수는 통계학적으로 유의한 차이($p<0.05$)를 보였으며, 전혈유래 백혈구연층의 총백혈구수가 더 많았다. 그러나, 림프구와 단핵구수에는 두 그룹간에 통계학적으로 유의한 차이는 없었다($p>0.05$) (Table 1).

Table 1. Cell count of leukocytes and comparision of cells between in LRS chambers and in buffy coats from whole blood

	LRS chamber (n=18)				Buffy coat (n=9)				*p* -value*
	Median ($x10^8$)	Range ($x10^8$)	Median (%)	Range (%)	Median ($x10^8$)	Range ($x10^8$)	Median (%)	Range (%)	
Total WBC count	10.8	7.7 - 18.0	-	-	14.9	10.5 - 22.0	-	-	0.010
Neutrophils	0.5	0.1 - 1.4	4.2	1.8 - 14.4	4.2	2.0 - 13.4	36.8	18.1 - 60.9	0.000
Lymphocytes	7.1	0.0 - 14.4	67.5	0.0 - 86.5	5.9	4.5 - 10.4	41.1	27.5 - 57.0	0.165
Monocytes	1.7	0.6 - 6.3	13.9	7.9 - 57.3	1.5	0.8 - 2.0	8.9	5.6 - 16.4	0.258
Eosinophils	0.0	0.0 - 0.1	0.1	0.0 - 0.5	0.1	0.0 - 0.2	0.7	0.3 - 1.1	0.000
Basophils	0.1	0.0 - 0.2	0.7	0.1 - 2.3	0.2	0.1 - 0.5	1.0	0.6 - 2.3	0.001

* A *p*-value of less than 0.05 was considered a statistically significant difference by Mann-Whitney U test.

Table 2. Flow cytometric characterization and comparision of mononuclear cells isolated from between LRS chambers and buffy coats from whole blood

Component	LRS chamber (n=8)		Buffy coat (n=10)		*p* -value*
	Median (%)	Range (%)	Median (%)	Range (%)	
CD4+cell	29.6	18.7 - 37.6	38.5	26.0 - 51.9	0.016
CD8+cell	27.7	19.2 - 40.0	25.2	14.2 - 33.1	0.177
B cell	5.5	2.2 - 12.1	10.2	3.4 - 16.2	0.016
NK cell	15.7	13.7 - 19.9	12.9	4.8 - 26.5	0.272
CD14+cell	12.4	8.6 - 32.3	8.7	3.2 - 15.2	0.062

* A *p*-value of less than 0.05 was considered a statistically significant difference by Mann-Whitney U test.

2. 수지상세포의 분화 유도

LRS chamber내의 백혈구 단핵세포에서 CD14+세포를 분리하였을 때 세포수는 1.25 x 10^7 개였다. 말굽모양의 핵을 가진 전형적인 단핵구였고, 배양 4일째까지 세포막이 원형의 형태로 유지되며 그 수가 점차 증가하였다. 배양 5일째에 수지상모양의 세포들이 출현하였고 Wright-Giemsa 염색하였을 때 세포질 내의 공포들을 관찰할 수 있었다(Fig. 2). 배양 5일째 TNF-α (20 ng/mL), IL-1β (500 U/mL), IL-6 (500 U/mL), PGE2 (2 x 10^{-7} M)를 넣어 수지상세포의 성숙을 유도하였고, 7일째 수지상모양이 잘 보이는 세포들을 관찰할 수 있었다(Fig. 2). 배양 7일째에 면역표현형을 비교하였는데 성숙을 유도시킨 군에서 그렇지 않은 군보다 CD86/HLA-DR, CD40/CD80의 발현정도가 강하였고 CD1a의 발현은 약화된 것을 볼 수 있었다. 또, 성숙을 유도한 군에서 성숙한 수지상세포에서만 발현이 증가되는 CD83의 발현이 증가하였다(Fig. 3).

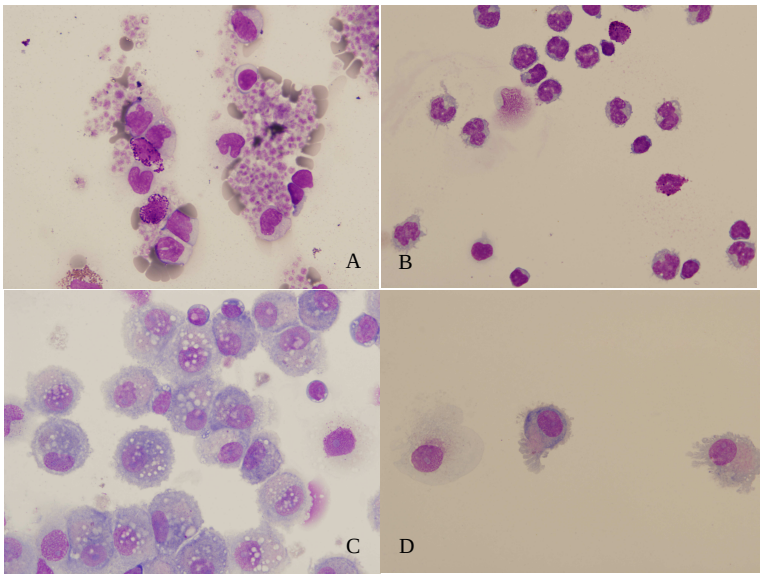

Fig. 2. Wright-Giemsa stain of cells which isolated from LRS chambers (A), CD14+ cells seperated by MACS®Seperation (B), immature dendritic cells on Day 5 (C), mature dendritic cells on Day 7 (D).

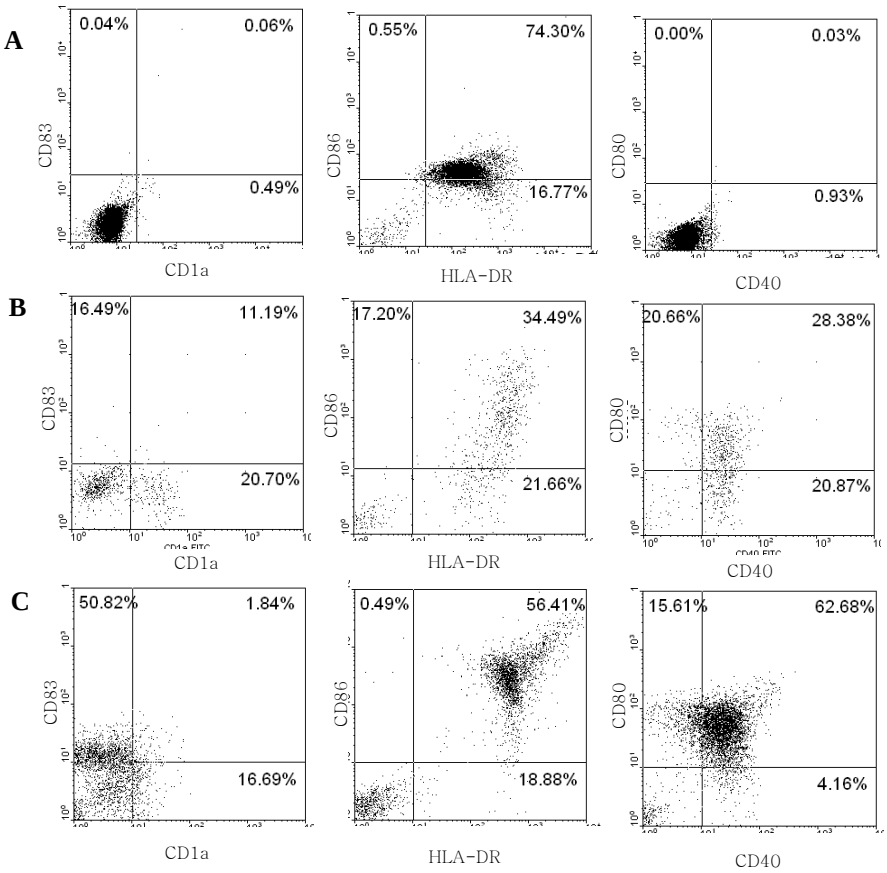

Fig. 3. The immunophenotypic characteristics of mature dendritic cells (mDC) and immature dendritic cells (mDC) on Day 0, 5 and 7. (A) CD14+ cells seperated from LRS chambers on Day 0. (B) The iDC were generated by culturing CD14+ cells with GM-CSF and IL-4 on Day 5. (C) The mDC were generated from iDCs for additional 2 days culture with TNF-α, IL-1β, IL-6, and PGE2.

IV. 고찰

줄기 세포를 비롯하여 인체유래 백혈구를 이용한 많은 연구들이 진행되고 있다. 암세포의 특수한 부위를 목표로 암세포 특이적인 항원에 대해 T세포의 면역반응을 유도하는 면역치료에 대한 연구[24-26], NK세포를 이용한 연구, CD34+세포를 이용하여 각기 다른 세포를 유도하는 연구 등 다양한 주제들이 있다[1, 2, 25, 27]. 이러한 연구들은 충분한 연구 소재를 갖추는 것에서부터 출발할 수 있다. 그러나 건강한 사람으로부터 연구에 이용할 세포를 충분히 얻고 지속적으로 구하는 것은 쉽지 않은 일이다.

현재까지는 주로 전혈에서 성분분리시에 얻어지는 백혈구연층을 분리하여 연구에 사용하였다. 전혈로부터 세가지의 성분혈액 제조시 삼중백을 이용하게 되는데 백혈구연층을 얻기 위해서는 사중백을 이용하거나 삼중백에 추가적으로 혈액백을 연결해야 하는 번거로움이 있고, 수혈용 혈액성분제제이므로 모든 과정을 철저히 무균적으로 시행하며 이에 따른 추가비용이 따른다. 또한 이를 제조하는 사람에 따라서 얻어지는 세포수의 차이가 날 수 있으며, 혈액은행의 업무에 따라 헌혈채집 후 성분분리할 때까지 시간이 지체될 수 있어서 연구자가 백혈구연층을 얻기까지는 수시간이 소요된다. 또 헌혈자의 동의를 얻어 헌혈을 받은 후에라도 부적합 혈액으로 판정되는 경우에는 그 백혈구를 이용하는데 신뢰도가 떨어진다. 전혈유래 백혈구연층은 전혈로부터 얻은 것이므로 백혈구의 세포구성과 분포가 혈중 백혈구와 유사하다. 이는 정상인의 혈중에 중성구가 백혈구의 절반이상을 차지함으로 전혈유래 백혈구연층의 중성구의 분포도 절반이상을 차지할 것으로 예상할 수 있었다. 본 연구에서 전혈로부터 얻은 백혈구연층의 중성구수는 총백혈구 14.9 x 10^8 (범위 10.5 x 10^8 - 22.0 x 10^8) 중 36.8 % (범위 18.1 - 60.9) 를 차지하였다. 상대적으로 연구에 주로 사용되는 림프구와 단핵구의 수는 줄어드는 단점이 있었다[7].

2000년대 초부터는 백혈구제거용 필터로부터 연구용 세포를 얻게 되었다[13, 28]. 백혈구가 혼입되어 있는 농축혈소판과 농축적혈구가

환자에게 수혈됨으로 발생되는 부작용을 줄이기 위해서 백혈구제거용 필터를 사용하게 되었고, 그 수가 점차 증가하게 되었다. 연구자들은 백혈구 여과 후에 버려지는 필터를 역방향으로 세척하여 분리한 세포를 사용하였다. 이는 폐기되는 것이므로, 혈액은행에서 얻기가 쉽고 이미 헌혈기준을 통과한 헌혈자로부터 얻어진 것이므로 부적격 혈액으로 판정되어 버려지는 경우는 없을 것이다. 몇몇 연구에 의하면 백혈구제거용 필터로부터 얻은 총백혈구수는 전혈로부터 얻은 것보다 적지만 단핵구와 림프구수는 거의 비슷함을 보고하였고, 이 세포들의 생존력과 기능성도 같이 증명하였다[7, 10, 11, 22]. 그러나 백혈구제거용 필터를 이용하는데 한계점이 있었다. 백혈구제거용 필터를 이용한 연구에서는 대부분 500 mL 정도의 전혈을 여과시켜 얻어진 것이었다. 그러나 우리나라에서 백혈구제거농축적혈구는 이미 제조되어있는 보관전백혈구제거 (prestorage leukocyte redution)혈액을 혈액원으로부터 구입하여 사용하는 경우가 대부분이고, 병원에서 전혈을 직접 백혈구제거여과과정을 거쳐 사용하는 경우는 많지 않다. 또 백혈구제거용 필터로부터 세포 손실없이 분리하기 위해서 낮은 속도로 세척해야 하고, 150 - 200 mL 정도의 많은 양의 용매를 필요로 하였다. 여과된 백혈구를 충분히 분리하기 위해서 특별히 제조된 dextran용매 등을 사용하기도 하였다[8]. 백혈구제거용 필터는 농축혈소판에서 백혈구를 여과하기 위해서도 사용한다. 그러나 농축혈소판 6단위를 하나의 백혈구제거용 필터에 여과시켜 사용하게 되는데, 하나의 필터에 6명 헌혈자의 백혈구가 혼입되므로 이용에 한계가 있다.

성분헌혈채집기의 발달과 함께 성분채집혈소판의 사용이 증가하였다. 수기로 혈액내 백혈구를 제거하는 필터를 사용하듯이 성분헌혈채집기는 채집과정 중에 백혈구를 여과시켜 백혈구제거 성분혈액을 수집하는 방식이다. Trima Accel®의 LRS chamber는 전통적으로 이용하던 소재와 달리 유용한 점들이 있다. 이미 모여져 있는 세포를 다른 과정없이 바로 이용할 수 있는 장점이 있다. LRS chamber 내에 있는 세포를 직접 흘러 내리게 할 수도 있고, 50 mL 정도의 적은 양의 PBS로 LRS chamber를 세척하여 모든 세포를 얻어 낼 수

있다. 폐쇄된 시스템에서 성분헌혈수집이 이루어지므로 오염의 위험이 적은 장점이 있다. LRS chamber내 세포들이 연구용으로 사용할 수 있을 만큼 충분한 수가 모이고, 세포의 생존력과 기능성이 증명된다면 장래에 연구용으로 좋은 소재가 될 것으로 생각되었다. 본 연구에서는 LRS chamber내에 있는 세포성분의 구성을 혈액학적 방법과 유세포분석을 통하여 알아보았고, CD34+세포수를 측정하였다.

LRS chamber내의 총백혈구수는 10.8 x 10^8 (범위 7.7 x 10^8 - 18.0 x 10^8)로 전혈로부터 얻는 백혈구연층보다 작았고, Meyer 등이 보고한 백혈구제거용 필터로부터 얻어진 세포수와 큰 차이는 보이지 않았다[7]. 세포의 구성은 LRS chamber내 중성구는 총백혈구의 4.2% (범위 1.8 - 14.4) 로 매우 적고, 림프구와 단핵구는 각각 67.5% (범위 0.0 - 86.5) 와 13.9% (범위 7.9 - 57.3)로 많은 부분을 차지하고 있었다. 반면에 전혈로부터 분리된 백혈구연층에는 중성구 36.8% (범위 18.1 - 60.9), 림프구 41.1% (범위 27.5 - 57.0), 단핵구 8.9% (5.6 - 16.4)로 중성구의 비율이 매우 높았다.

두 그룹간에 총백혈구수에는 통계학적으로 유의한 차이가 있었고 전혈유래 백혈구연층에서 세포수가 더 많았다($p<0.05$). 그러나 연구용으로 주로 사용되는 림프구와 단핵구수는 두 그룹간에 통계학적으로 유의한 차이($p>0.05$)를 보이지 않아서 기존의 전혈유래 백혈구연층의 림프구와 단핵구를 대치를 할 수 있음을 확인하였다.

LRS chamber와 전혈로부터 분리한 백혈구연층의 중성구가 차지하는 비율이 크게 차이가 난다. 이는 Trima Accel® 장비에서 전혈이 원심분리되어 혈소판층이 chamber를 통과하게 되는데 혈소판층과 가까운 단핵세포층이 혈소판과 함께 chamber내로 진입되기 때문이다. 즉 전혈을 원심분리하였을때 비중이 큰 적혈구-중성구-단핵구-림프구-혈소판 순서로 분리된다. LRS chamber에는 혈소판층과 가까운 림프구와 단핵구가 주로 들어가기 때문에 chamber내에는 이 세포들이 많이 모아지고, 분리층이 혈소판과 먼 중성구는 상대적으로 적게 모아지는 것이다. 반면에 전혈로부터 얻은 백혈구연층의 경우에는 색깔을 육안으로 보면서 분리하기 때문에 광범위한 백혈구연

층을 모으게 되고 중성구의 비율도 상대적으로 높게 된다.

Ficoll-Hypaque (Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden)을 이용하여 LRS chamber내 세포에서 단핵세포를 분리하였을 때, 총단핵세포수는 9.7×10^8 (범위 4.0×10^8 - 14.3×10^8)로 90%가 회수되었다. 면역표현형을 분석하였을때 LRS chamber내에는 NK세포 15.7% (범위 13.7 - 19.9), CD14+세포 12.4% (범위 8.6 - 32.3)로 구성되어 있었고, 전혈유래 백혈구연층의 NK세포, CD14+세포보다 평균값이 높았다. 그러나, 이 세포들의 두 그룹간에 통계학적 유의한 차이는 없었다 ($p>0.05$). CD4+세포와 B세포는 두 그룹간에 통계학적으로 유의한 차이를 보였고($p<0.05$), LRS chamber내에 세포수가 더 많았다(Table 2). CD34+세포를 백혈구제거용 필터로부터 분리하여 이용한 연구에 따르면 필터로부터 0.45×10^6 - 1.1×10^6의 세포수를 분리하였다고 보고하였다[7, 27]. 본 연구에서 LRS chamber내 CD34+세포수는 0.95×10^6 (범위 0.15×10^6 - 2.60×10^6)로 백혈구제거용 필터로부터 분리한 세포와 비슷한 양의 CD34+세포수를 얻을 수 있었다.

LRS chamber내 세포에 비하여 전혈로부터 얻은 백혈구연층의 세포는 적은 스트레스에 노출된다. LRS chamber세포는 혈소판성분채집기 안에서 성분채집하는 1시간 동안 원심력에 노출되는 반면에 전혈유래 백혈구연층의 세포는 3분 동안 원심분리함으로 적은 스트레스를 받는다. 원심력의 스트레스로 인한 세포의 변성이 있을 것으로 생각되나, 이에 대해서는 좀더 많은 연구가 필요할 것이다. 본 연구에서는 LRS chamber에서 분리한 CD14+세포가 수지상세포로 잘 분화함을 확인하였다. CD14+세포를 분리하여 분화 및 성숙을 유도하였고, 수지상세포에서 강해지는 면역표현형인 CD40/CD80, CD86/HLA-DR의 발현이 강함을 확인하였다. 성숙한 수지상세포에서만 발현이 증가하는 CD83가 증가하였고, CD1a의 발현은 감소하였다. LRS chamber내 CD14+세포가 수지상세포로 분화 및 성숙함으로서 LRS chamber내 세포가 살아있고 기능성을 가진 세포로 이용할 수 있다는 가능성을 확인하였다.

V. 결론

제한된 연구 소재에도 불구하고 인체유래 백혈구를 이용한 연구들이 점차 활발해지고, 성분헌혈채집기의 발달과 성분채집혈액의 장점으로 인해 그 이용이 늘어나고 있다. 본 연구에서는 우리나라에 도입되어 많이 사용되고 있는 성분헌혈채집기의 일종인 Trima Accel®의 LRS chamber내 세포를 분석함으로 인체유래 백혈구의 연구 소재로서 그 유용성을 평가하였고 다음의 세가지 결론에 이르렀다. 첫째, Trima Accel®의 LRS chamber는 전혈유래 백혈구연층에 비하여 준비과정이 단순하며, LRS chamber를 획득한 후 다루기가 쉽고 신속하게 세포를 분리할 수 있다. 둘째, LRS chamber내 총백혈구수는 전혈유래 백혈구연층의 총백혈구수보다 적음에도 불구하고 연구용으로 주로 이용되는 림프구와 단핵구의 함량이 전혈유래 백혈구연층의 수와 비슷하고 필요한 충분한 양을 가지고 있었다. 셋째, 수지상세포 분화유도를 통하여 LRS chamber내 세포들의 생존력과 기능의 활용 가능성을 확인할 수 있었다. 이상에서 Trima Accel®의 LRS chamber에서 분리한 세포는 인체유래 백혈구의 연구용 소재로서 매우 유용하다고 판단되었다.

참고문헌

1. Shehata N, Lin Y, Pendergrast J, Branch DR. Cellular therapies: a Canadian blood services research and development symposium. Transfus Med Rev 2007;21:317-36.

2. Mellman I, Steinman RM. Dendritic cells: specialized and regulated antigen processing machines. Cell 2001;106:255-8.

3. Jung OJ. Apheresis in Korean Red Cross Nambu Blood Center. Korean J Blood Transfus 2006;17:32-8.

4. Sniecinski I, O'Donnell MR, Nowicki B, Hill LR. Prevention of refractoriness and HLA-alloimmunization using filtered blood products. Blood 1988;71:1402-7.

5.Meryman HT. Transfusion-induced alloimmunization and immunosuppression and the effects of leukocyte depletion. Transfus Med Rev 1989;3:180-93.

6. Bowden RA, Slichter SJ, Sayers MH, Mori M, Cays MJ, Meyers JD. Use of leukocyte-depleted platelets and cytomegalovirus-seronegative red blood cells for prevention of primary cytomegalovirus infection after marrow transplant. Blood 1991;78:246-50.

7. Meyer TP, Zehnter I, Hofmann B, Zaisserer J, Burkhart J, Rapp S, et al. Filter Buffy Coats (FBC): a source of peripheral blood leukocytes recovered from leukocyte depletion filters. J Immunol Methods 2005;307:150-66.

8. Ebner S, Neyer S, Hofer S, Nussbaumer W, Romani N, Heufler C. Generation of large numbers of human dendritic cells from whole blood passaged through leukocyte removal filters: an alternative to standard buffy coats. J Immunol Methods 2001;252:93-104.

9. Triulzi DJ, Meyer EM, Donnenberg AD. WBC subset analysis of WBC-reduced platelet components. Transfusion 2000;40:771-80.

10. Weitkamp JH, Crowe JE, Jr. Blood donor leukocyte reduction filters as a source of human B lymphocytes. Biotechniques 2001;31:464-6.

11. Teleron AA, Carlson B, Young PP. Blood donor white blood cell reduction filters as a source of human peripheral blood-derived endothelial progenitor cells. Transfusion 2005;45:21-5.
12. Adams MR, Dumont LJ, McCall M, Heaton WA. Clinical trial and local process evaluation of an apheresis system for preparation of white cell-reduced platelet components. Transfusion 1998;38:966-74.
13. Han K, Park M, Cho HI. Transfusion medicine. 3rd ed. Seoul: Korea Medical Book Publisher; 2006.
14. Yockey C, Murphy S, Eggers L, Garratty G, Dingle A, Helms C, et al. Evaluation of the Amicus Separator in the collection of apheresis platelets. Transfusion 1998;38:848-54.
15. Moog R, Muller N. White cell reduction during plateletpheresis: a comparison of three blood cell separators. Transfusion 1999;39:572-7.
16. Neron S, Thibault L, Dussault N, Cote G, Ducas E, Pineault N, et al. Characterization of mononuclear cells remaining in the leukoreduction system chambers of apheresis instruments after routine platelet collection: a new source of viable human blood cells. Transfusion 2007;47:1042-9.
17. Dietz AB, Bulur PA, Emery RL, Winters JL, Epps DE, Zubair AC, et al. A novel source of viable peripheral blood mononuclear cells from leukoreduction system chambers. Transfusion 2006;46:2083-9.
18. Rivadeneyra-Espinoza L, Perez-Romano B, Gonzalez-Flores A, Guzman-Garcia MO, Carvajal-Armora F, Ruiz-Arguelles A. Instrument- and protocol-dependent variation in the enumeration of CD34+ cells by flow cytometry. Transfusion 2006;46:530-6.
19. Kim S, Kim HO, Baek EJ, Choi Y, Kim HS, Lee MG. Monocyte enrichment from leukapheresis products by using the Elutra cell separator. Transfusion 2007;47:2290-6.
20. Jonuleit H, Kuhn U, Muller G, Steinbrink K, Paragnik L, Schmitt E, et al. Pro-inflammatory cytokines and prostaglandins induce maturation of potent immunostimulatory dendritic cells under fetal

calf serum-free conditions. Eur J Immunol 1997;27:3135-42.
21. Min YH, Lee ST, Choi KM, Chong SY, Kim HO, Hahn JS, et al. Ex vivo generation of functional dendritic cells from mobilized CD34+ hematopoietic stem cells. Yonsei Med J 1998;39:328-38.
22. Kim S, Kim HO, Kim HJ, Lee K, Kim HS. Generation of functionally mature dendritic cells from elutriated monocytes using polyinosinic : polycytidylic acid and soluble CD40 ligand for clinical application. Clin Exp Immunol 2008. Epub ahead.
23. Bender A, Sapp M, Schuler G, Steinman RM, Bhardwaj N. Improved methods for the generation of dendritic cells from nonproliferating progenitors in human blood. J Immunol Methods 1996;196:121-35.
24. Karimi K, Boudreau JE, Fraser K, Liu H, Delanghe J, Gauldie J, et al. Enhanced Antitumor Immunity Elicited by Dendritic Cell Vaccines Is a Result of Their Ability to Engage Both CTL and IFNgamma-producing NK Cells. Mol Ther 2007;16:411-8.
25. Lee JJ, Nam CE, Nam JH, Lee HC, Chung IJ, Park MS, et al. Generation of cytotoxic donor CD8+ T cells against relapsing leukemic cells following allogeneic transplantation by stimulation with leukemic cell- or leukemic lysate pulsed donor cell-derived dendritic cells. Leuk Res 2004;28:517-24.
26. Lee JJ, Choi BH, Kang HK, Park MS, Park JS, Kim SK, et al. Induction of multiple myeloma-specific cytotoxic T lymphocyte stimulation by dendritic cell pulsing with purified and optimized myeloma cell lysates. Leuk Lymphoma 2007;48:2022-31.
27. Ivanovic Z, Duchez P, Morgan DA, Hermitte F, Lafarge X, Chevaleyre J, et al. Whole-blood leuko-depletion filters as a source of CD 34+ progenitors potentially usable in cell therapy. Transfusion 2006;46:118-25.
28. Mark E, Brecher M. Technical manual. 15th ed. Bethesda: American Association of Blood Banks; 2005.

Abstract

Analysis of cell components and differentiation of mononuclear cells into dendritic cells remaining in the LRS chamber of Trima Accel®

Yangsoon Lee

Department of Medicine
The Graduate School, Yonsei University

(Directed by Professor Hyun Ok Kim)

Procurement of large numbers of human cells for research purposes poses a challenge for researchers. Traditionally, standard buffy coats centrifugated from whole blood and WBCs separated from leukocyte removal filters have been used for scientific study. Recently, some studies reported a novel source of viable peripheral blood mononuclear cells (PBMNC) from leukoreduction system (LRS) chamber of Trima Accel® (CaridianBCT, Lakewood, CO, USA). In this study, we investigated the proportion of cellular components, and the viability and function of PBMNCs via a generation of dendritic cells from mononuclear cells remaining in the LRS chambers of Trima Accel®.

Twenty six LRS chambers of Trima Accel®, which were discarded after plateletapheresis, were collected. The immunophenotypic characteristics of leukocytes such as T cell, B cell, NK cell and CD14+ cell components were analysed by flow cytometry. CD34+ cells were counted with Stem kit® (Beckman Coulter Inc., Fullerton, CA, USA). Differentiation and maturation of CD14+ cells seperated via MACS® Seperation (Miltenyi Biotec Inc. Auburn, CA, USA) into

dendritic cells were induced.

Total white blood cell (WBC) counts in LRS chambers were 10.8 x 10^8 (range 7.7 x 10^8 - 18.0 x 10^8). The proportions of T cells, B cells, NK cells and CD14+ cells were 61.1% (range 31.6 - 66.1), 5.5% (range 2.2 - 12.1), 15.7% (range 13.7 - 19.9) and 12.4% (range 8.6 - 32.3) of total WBC in LRS chambers, respectively. In control group of buffy coats centrifugated from 400 mL of whole blood, total WBC counts were 14.9 x 10^8 (range 10.5 x 10^8 - 22.0 x 10^8). The proportions of T cells, B cells, NK cells and CD14+ cells in control group were 65.5% (range 31.6 - 66.1), 10.2% (range 3.4 - 16.2), 12.9% (range 4.8 - 26.5) and 8.7% (range 3.2 - 15.2), respectively. Although there were significant difference in the total number of WBC between the two groups by Mann-Whitney U test, the number of lymphocytes and monocytes were not considered statistically different. The number of B cells and CD4+ cells in LRS chambers were significantly higher than that of the buffy coat centrifugated from the whole blood ($p<0.05$). The mean total count of CD34+ cells obtained from the LRS chambers was 0.95 x 10^6, ranging from 0.15 x 10^6 to 2.60 x 10^6. No dead cells stained with 7-AAD were detected by flow cytometry analysis. After 7 days in cytokine supplemented culture, the CD14+ cells were differentiated into dendritic cells.

The PBMNCs in LRS chambers had plenty of lymphocytes and monocytes and were an abundant source of viable and functional human cells. Therefore, the cells in LRS chambers are useful in studies of the diverse immunotherapies using lymphocytes and dendritic cells as well as in studies using CD34+ hematopoietic stem cells. Furthermore, the cells in LRS chambers are used in cell recycling.

Key Words : Trima Accel, leukoreduction chamber, dendritic cell