

## 제대혈의 적혈구 분리 및 제거 방법에 관한 연구

연세대학교 의과대학 소아과학교실, <sup>1</sup>임상병리학교실, <sup>3</sup>산부인과학교실  
및 <sup>2</sup>한림대학교 의과대학 소아과학교실

유철주 · 박승희 · 조현상<sup>2</sup> · 김현옥<sup>1</sup> · 임종백<sup>1</sup>  
박세명 · 양창현 · 김길영 · 조재성<sup>3</sup> · 박용원<sup>3</sup>

### Method of RBC Depletion from Human Umbilical Cord Blood

Chuhl Joo Lyu, M.D., Song Hee Park, M.D., Hyun Sang Cho, M.D.<sup>2</sup>  
Hyun Ok Kim, M.D.<sup>1</sup>, Jong Baeck Lim, M.D.<sup>1</sup>, Sae Myung Park, M.D.  
Chang Hyun Yang M.D., Kir-Young Kim, M.D., Jae Sung Cho, M.D.<sup>3</sup>  
and Yong Won Park, M.D.<sup>3</sup>

Department of Pediatrics, <sup>1</sup>Clinical Pathology, <sup>3</sup>Obstetrics & Gynecology,  
Yonsei University, College of Medicine, Seoul, Korea,  
<sup>2</sup>Department of Pediatrics, Hallym University,  
College of Medicine, Seoul, Korea

**Background:** Cord blood(CB) has been suggested as an alternate source of stem cells in transplantation because of lower incidence of graft versus host disease and ease of collection. To optimize storage space cord blood needs to be stored as separated product. Additionally, for cord blood bank to be economical and efficient, volumes smaller than that of whole packs needs to be stored. However, CB processing procedures described so far involve open systems and/or reagents which are not licensed for use in humans. Consequently, these procedures poorly match the needs for closed-system, large-scale CB banking. In our study, we use the triple bag system in which the CB is separated by centrifugation to maintain of sterility and volume reduction. And simple and effective RBC depletion method was evaluated with 10% pentastarch and 4% modified gelatin.

**Methods:** The collection of CB was performed from 45 full term newborns. The collection was made by gravity and uterine contraction before placental expulsion with triple transfusion bag containing CPD-A1. 10% Pentastarch(Group A) or 4% modified gelatin(Group B) is added directly to the CB containing bag. After RBC sedimentation, the WBC-rich supernatant is collected in a satellite bag. After RBC depletion, recovery of mononuclear cells(MNC), CD34+ cells were compared between two groups.

**Results:** Mean volume of collected CB and final RBC-depleted products were  $68.1 \pm 17.0$  mL and  $18.1 \pm 4.1$  mL in Group A and  $68.0 \pm 15.8$  mL,  $23.1 \pm 6.3$  mL in Group B, respectively. After RBC depletion, the number of MNC and CD 34+ cells were  $2.61 \pm$

책임저자 : 유철주, 서울시 서대문구 신촌동 134, 연세의료원 소아과학교실, 120-752  
본 연구는 1997년도 연세대학교 의과대학 연구지원으로 이루어진 것임.

$1.51 \times 10^8$ ,  $1.19 \pm 0.96 \times 10^6$  in Group A and  $4.03 \pm 3.16 \times 10^8$ ,  $1.43 \pm 0.86 \times 10^6$  in Group B. Mean recovery of MNC, CD34+ cells were  $70.2 \pm 43.7\%$ ,  $60.2 \pm 31.5\%$  in Group A, and  $84.7 \pm 39.9\%$  and  $87.7 \pm 7.5\%$  in Group B, respectively.

**Conclusion:** CB processing in closed-system using triple bag with 4% modified gelatin appears to be safe, easy, effective and particularly suitable for large-scale CB banking. (Korean J Pediatr Hematol Oncol 1998; 5: 163-170)

**Key Words:** Cord blood, Triple bag system, RBC depletion

## 서 론

조혈 모세포 이식(hematopoietic stem cell transplantation)은 여러 종류의 치료에 있어서 중요한 치료법 중의 하나이다. 그러나 형제간에서 적당한 공여자를 찾을 수 있는 확률은 25% 이하로서 공여자가 형제간에 없는 경우에는 골수정보은행을 통해 비혈연 공여자(unrelated donor)를 찾고 있다.

최근 제대 혈액 내에 조혈 모세포가 상당량 포함되어 있어 고용량 항암요법 후 동종 골수 이식 대신에 투여함으로써 골수의 조혈 기능을 회복시킬 수 있다는 것이 알려지게 되어, 비혈연간 이식(unrelated donor transplantation)의 새로운 방법으로 시도되고 있다.<sup>1)</sup>

초기에 시도된 제대혈 이식은 조혈 모세포의 손실을 우려하여 제대혈 전혈(whole blood)을 이용하였으나 이로 인한 ABO 부적합 및 냉동보관제인 DMSO의 과량 투여에 의한 부작용이 불가피하였다.<sup>2)</sup> 1994년 Pahwa등<sup>3)</sup>은 급성 백혈병 환자에서 3% gelatin 침강법을 이용하여 적혈구를 분리, 제거한 제대혈을 이용하여 이식에 성공하여 적혈구 분리 등 제대혈 처리 과정을 거친 후에도 제대혈 이식이 성공할 수 있음을 보여 주었다. 또한 아리조나 대학병원에서는 Ficoll-hypaque 원심분리법을 이용하여, 파비아 대학병원에서는 6% hydroxyethyl starch(HES)를 이용하여 적혈구를 분리한 과정을 거친후 제대혈 이식을 성공하였다고 보고하였다.<sup>4)</sup> 따라서 제대혈 이식에 있어서 적혈구의 분리는 ABO 부적합 수혈에 의한 수

혈 부작용 및 냉동보관제 투여에 의한 부작용을 줄일 수 있다는 점도 중요하지만 조혈 모세포가 포함된 혈액 분획의 양을 줄일 수 있어 향후 제대혈 이식이 골수 이식을 대신하여 보편적인 치료 방법으로 자리 잡기 위해서 반드시 필요한 기반 기술이다. 여태까지 보고된 제대혈 적혈구 분리 방법은 제대혈을 항응고제가 담긴 용기에 받은 후 시험관으로 옮겨 처리 과정을 거치는 방법(open method)이<sup>5-8)</sup> 보편적으로 이용되고 있으나 조혈 모세포 수득을 위해서 무균 상태에서 조작해야 하는 번거로움과 그 과정 중에 세균 오염이 있을 수 있어 문제가 되어왔다. 이러한 문제점은 제대혈을 이식에 사용하는데 있어, 한꺼번에 많은 제대혈을 처리하고 궁극적으로 제대혈 은행을 운영하는데 해결되어야 할 시급한 문제로 지적되어 왔다. 또한 적혈구 분리에 사용되는 여러 용액이 인체에 투여 가능하지 않은 제제를 사용하였던 문제점이 있으며, 인체에 투여 가능한 제제라도 제작시 공정관리, 제작 및 판매되는 것이 아니라 하는 점 등 제대혈 이식을 위한 현실적인 문제점이 있어 왔다.

저자들은 혈액 채혈 triple bag을 이용한 closed-system 방법으로, 제대혈 채혈 및 적혈구 분리 제거, 과정에서 다른 용기로 옮기는데 따른 문제점을 해결하였으며, 제대혈 채혈후 채혈된 백에 상품화된 주사용 제제인 10% pentastarch, 혹은 4% modified gelatin을 직접 주입하여 적혈구를 침강시킨 후, 상층의 연층(buffy coat)을 다른 연결된 백으로 옮기는 방법을 사용하여 효과적으로 조혈 모세포가 포함된 혈액 분획의 양을 줄일 수 있는

방법을 모색하였다. 또한 각각 용액에 따른 세포 분리과정 전후의 세포 손실 및 조혈 모세포의 수를 비교함으로써 향후 제대혈 이식 및 제대혈 은행 설립에 필요한 제대혈 채혈과 적혈구 분리의 기반 기술을 획득하고자 본 연구를 시행하였다.

## 대상 및 방법

### 1) 대 상

1997년 12월부터 1998년 1월까지 연세대학교 의과대학 세브란스병원 산부인과에서 시행하는 정상 질식분만 45례에서 제대혈을 얻었다.

### 2) 방 법

(1) 제대혈 수집: 신생아가 분만된 뒤 제대를 이중으로 결찰하고 소독한 후에 제대를 절단하고 태반이 만출되기 전 제대 정맥에 수혈백의 바늘을 주입하여 중력과 자궁수축에 의해 흘러내리는 제대혈을 CPD-A1 항 응고제 45 mL가 포함된 수혈백(혈액 채혈 triple bag, 녹십자 의료공업[주], 한국)에 받았다. 채혈시 제대를 짜 내리지 않았으며, 태반 만출후 태반으로부터 천자 등의 방법으로 잔여 채혈하는 방법을 사용하지 않았다.

(2) 적혈구 분리: 3개의 수혈백에서 사용하지 않은 2개의 백 중 한쪽 백에 적혈구 분리를 위한 용액을 넣고, 연결 줄을 통하여 직접 채혈된 제대혈에 첨가시켰다. 첨가후 용액을 넣었던 백은 연결된 줄을 밀폐후 제거하였다. 적혈구 분리 및 제거를 위하여 사용된 용액은 두가지로, 10% pentastarch(Pentaspan, 제일약품, 한국)을 1 : 4(Pentaspan: 제대혈)의 비율로 첨가한 후 4°C에서 30분간 침전시켰고, 다른 방법으로는 주사용 제제인 4% modified gelatin(Gelofusin, 대한약품, 한국)을 1 : 1의 비율로 제대혈에 첨가한 후 실온에서 30분간 침전시켰다. 두가지 방법 모두에서 혈액 성분 분리대(Seperation stand, Teruflex ACS-201, Japan)를 이용하여 상층의 혈장과 백혈구 연층(buffy coat)을 사용하지 않은 나머지 수혈백으로 옮긴 후 2500 rpm에서 3분간 원심분리시켜 상층의 혈장을 제

거하였다. 수혈백에 남아있는 백혈구 연층을 0.9% 생리 식염수로 세척한후 2500 rpm에서 3분간 원심분리시켜 상층액을 제거하여 최종 냉동 보관 가능한 적혈구 제거된 제대혈을 얻었다. 냉동 보관은 자가 혈청과 RPMI-1640 배지와 함께 최종 10% DMSO 농도가 되도록 하여 프로그램 냉동기(Custom BioGenics MI, USA)를 사용하여 냉동한 후 액화질소 탱크에 넣어 보관하였다.

### (3) 조혈 모세포 분석

① 단핵구수의 측정; 단핵구 측정을 위하여 제대혈 전혈과 각각의 분리 방법으로 얻어진 유핵세포의 검체를 채취하여 말초 혈액 자동 혈구 계산기인 SE-9000(Sysmex, Toa Medical Electronics, Kobe)으로 백혈구 수치를 측정하였고, 도말표본을 하여서 백혈구 감별계수를 구하여 단핵구 비율을 측정하였다.

② CD34 양성 세포의 측정; 제대혈 전혈과 각각의 분리방법으로 얻어진 유핵세포의 검체로부터 각각 50  $\mu$ L씩 두 개의 시험관에 분주한 뒤 fluorescein isothiocyanate(FITC)가 부착된 anti-CD34 단일클론항체 (Becton Dickinson, USA) 10  $\mu$ L를 첨가한 후, 4°C암실에서 25분간 항온 배양하였다. 이를 0.2% sodium azide(Sigma, USA)와 2%의 우혈청 알부민을 함유한 세척액 1 mL 및 2 mL로 400 g에서 5분간 원심분리한 후 2회 세척하였다. 1 mL의 세척액에 세포를 부유시킨 후에 488 nm, 0.3 w로 조정된 argon-ion laser가 장착된 FACScan (Beckton Dickinson, CA, USA)으로 세포를 분석하였다. 정확한 CD34 양성세포 측정을 위하여 phycoerythrin(PE)이 부착된 anti-CD45 단일클론항체 (Beckton Dickinson, USA)를 동시에 사용한 두 가지 색 형광염색법을 사용하였다. 이때 음성 대조군으로는 anti-mouse IgG<sub>2</sub> 단세포군 항체를 동일한 조건으로 반응시킨 세포부유액을 사용하였다.

### 3) 통계 분석

SAS(statistical analysis system) software program을 이용하여 시행하였으며 Wilcoxon paired rank test로 단핵구수득률, CD34 양성 세포 수득률을

비교하여 어떤 방법에서 조혈 모세포의 손실이 적은지 비교하였다.

**결 과**

**1) 제대혈의 용량**

총 45례의 제대혈을 수집하였으며 27례에서 Pentaspan(A군)으로 적혈구 분리, 제거를 하였고 18례에서 Gelifusin(B군)으로 적혈구 분리, 제거를 시행하였다. A군의 평균 제대혈 채혈량은 68.1±17.0 mL이었고, 적혈구 분리, 제거후의 양은 18.1±4.1 mL이었다. B군에서 평균 제대혈의 양과 적혈구 분리, 제거후의 양은 각각 68.0±15.8 mL과

23.1±6.3 mL이었다(Table 1, Fig. 1).

**2) 단핵구 수득률**

A군에서 냉동 전 제대 전혈에 포함된 총단핵구 수는  $(3.87 \pm 1.41 \times 10^8)$ 이었으며, 적혈구 분리, 제거 후의 총단핵구수는  $(2.61 \pm 1.51 \times 10^8)$ 으로 수득률이 평균 70.2±43.7%였다. B군에서는 냉동 전 제대전혈에  $(4.82 \pm 2.84 \times 10^8)$ 의 단핵구가 있었으며, 적혈구 분리, 제거 후에는 그 수가  $(4.03 \pm 3.16 \times 10^8)$ 으로 수득률이 84.7±39.9%였다. 적혈구 분리 및 제거를 위한 두가지 방법 중 Gelifusin을 이용한 방법에서 수득률이 높았으나 통계학적으로 유의한 차이는 없었다( $P > 0.05$ )(Table 1, Fig. 2).

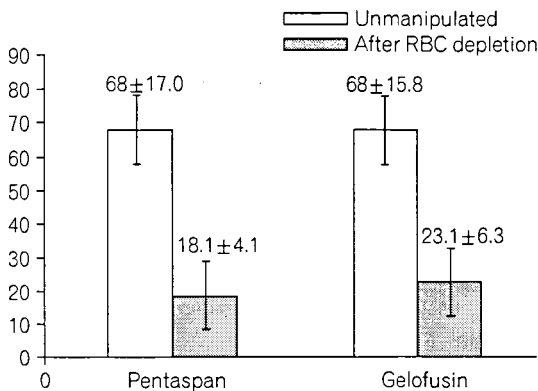


Fig. 1. Initial umbilical cord blood volume and final product volume after RBC depletion in two groups.

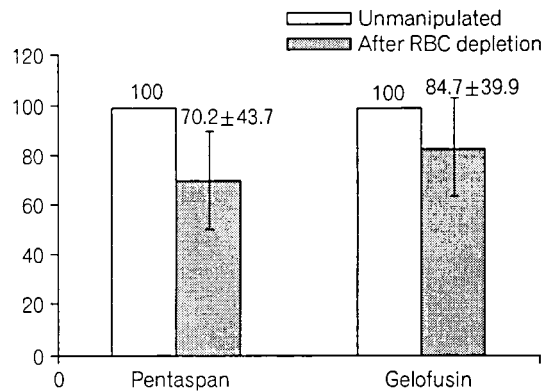


Fig. 2. Recovery of mononuclear cells after RBC depletion.

Table 1. Number and Recovery of Mononuclear Cells(mnc), cd34+ Cells in Unmanipulated Blood and after RBC Depletion

	Group A (N=27)		Group B (N=18)	
	Initial cord blood	RBC depleted product	Initial cord blood	RBC depleted product
Volume(ml)	68.1±17.0	18.1±4.1	68.0±15.8	23.1±6.3
Total MNC( $\times 10^8$ )	3.87±1.41	2.61±1.51	4.82±2.84	4.03±3.16
MNC(%)	100	70.2 <sup>1</sup>	100	84.7 <sup>1</sup>
Total CD34( $\times 10^6$ )	1.73±1.30	1.19±0.96	1.75±1.68	1.43±0.86
CD34(%)	100	60.2 <sup>2</sup>	100	87.7 <sup>2</sup>

Group A; RBC depleted by Pentaspan, Group B; RBC depleted by Gelifusin 1 and 2;  $P > 0.05$

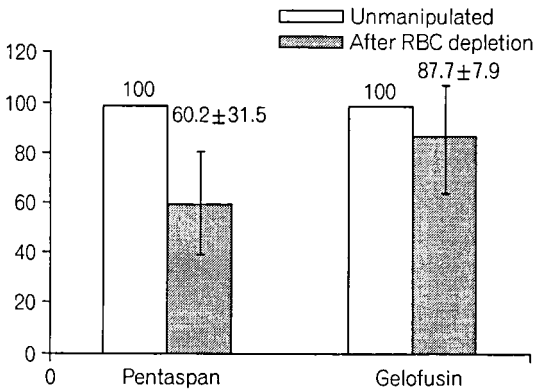


Fig. 3. Recovery of CD34+ cells after RBC depletion.

### 3) CD34 양성세포

A군에서 제대혈 전혈에 포함된 CD34 양성세포의 수는  $(1.73 \pm 1.30 \times 10^6)$ 이었으며, 적혈구 분리, 제거 후의 수는  $(1.19 \pm 0.96 \times 10^6)$ 으로 수득률이  $60.2 \pm 31.5\%$ 로 나타났다. B군에서는 제대혈 전혈에  $(1.75 \pm 1.68 \times 10^6)$ 의 CD34 양성세포가 있었으며, 적혈구 분리 후에는  $(1.43 \pm 0.86 \times 10^6)$ 으로 수득률이  $87.7 \pm 7.5\%$ 였다. Gelifusin을 이용한 적혈구 분리, 제거 방법이 상대적으로 높은 수득률을 보였으나 통계학적으로 유의한 차이는 없었다( $P > 0.05$ ) (Table 1, Fig. 3).

## 고 찰

조혈 모세포 이식은 재생 불량성 빈혈, 악성 종양 및 여러 혈액 질환의 치료에 있어서 중요한 치료법 중의 하나이다.<sup>2,5)</sup> 조혈 모세포 이식은 고용량 항암 화학 요법(high-dose intensive chemotherapy) 및 전신 방사선조사에 따른 골수부전을 회복시키기 위하여 공여자(donor)로부터 얻은 조혈 모세포(hematopoietic progenitor cell)를 주입하는 것이다. 이때 공여자의 조직적합항원(human leukocyte antigen)은 환자의 조직적합항원과 일치하는 것이 이상적이나 적당한 공여자를 찾는 것이 쉬운 일이 아니다.

최근 제대 혈액내에 다기능 조혈 모세포(multi-

potential stem cell)가 포함되어 있다는 것이 알려지게 되어 새로운 이식치료법의 하나로 시도되고 있다. 제대혈에는 이식시 이식능과 밀접한 관련이 있다고 알려진 CFU-GM(colony forming unit-granulocyte, macrophage)이 성인의 골수에 비해 비슷하거나 더 많이 존재하는 것으로 알려져 있으며<sup>10-12)</sup> CD34양성 세포도 제대혈에 많이 포함되어 있으며 특히 CD38-/DR- 혹은 CD45RO+인 원시세포 들이 성인의 골수보다 많아 이식후 생착에 유리하다고 알려져 있다.<sup>1)</sup> 또한 골수의 미성숙세포가 HLA-DR(-)인 점에 비해 제대혈에는 HLA-DR(+))를 표현하는 조혈 모세포가 세포의 분화에 관계되는 것으로 알려져 있다.<sup>13)</sup> 제대혈의 조혈 모세포는 자기 복제능이 뛰어나 배양시 형성되는 세포 집락에서 이차 배양을 하면 형성된 이차 집락의 수는 골수보다 많으며 장기간 액체 배양을 하였을 때<sup>14)</sup> 16주 이상까지도 생존이 가능한 것으로 보고되고 있고 LTC-IC(long term culture-initiating cell)의 수가 골수보다 많은 것으로 알려져 있다.<sup>15)</sup>

면역학적으로도 제대혈의 림프구는 성인의 림프구에 비해 미숙하며 T 림프구는 동종항원에 반응하여 증식할 수 있지만 세포독성작용은 성인의 림프구에 비해 매우 미약하며, 일차 혼합 림프구 배양시 동종세포독성을 나타낼 수 있는 능력이 제한되어 있다.<sup>16)</sup> 또한 CD8(+) T 림프구가 적고 CD4/CD8의 비율이 높아 이식시 이식편대숙주병이 동종 골수 이식에 비해 적고 약하게 나타난다.<sup>17)</sup> 이외에도 제대혈로부터 얻어진 조혈 모세포를 이용한 이식술은 재료가 풍부하고, 제공자에 대한 신체적 부담이 없다는 것 등의 이점이 있다. 결론적으로 제대혈은 이식에 사용하기에 많은 장점을 가지고 있는 것이 밝혀졌다.<sup>2,18)</sup>

1989년 처음으로 성공적인 제대혈 이식이 보고<sup>6)</sup>된 이래 200례 이상의 제대혈 이식이 보고되었고 향후 골수 이식을 대신할 수 있는 치료방법으로 기대되고 있다.<sup>4)</sup> 그동안 시행되었던 대부분의 제대혈 이식은 제대혈 전혈을 이용하여 시행되었고 적혈구의 분리과정이나 해동 후의 냉동보관제의

세척은 조혈 모세포의 손실을 우려하여 시행하지 않아 ABO 부적합 수혈, 다량의 냉동보관제의 투여 및 냉동보관시의 보관량의 과다 등의 부작용이 불가피하여 조혈 모세포의 손실을 최소화하고 보관되는 혈액량 감소에 대한 필요성이 대두되었다.

1989년 Broxmeyer등<sup>7)</sup>은 적혈구를 분리하기 위해 사용되었던 중력, methylcellulose, 원심분리, 혹은 ammonium chloride 등에 의한 적혈구 분리시 60~70%의 조혈 모세포의 손실을 증명함으로써 제대혈은 세포분리의 과정을 거처서는 안될 것으로 주장하기도 하였다. 반면 1994년 Pahwa등<sup>3)</sup>은 8세된 급성 백혈병 여아에서 3% gelatin 침강법을 이용하여 적혈구를 분리하여 이식에 성공하였음을 보고하여 적혈구 분리과정을 거친 후에도 제대혈 이식이 성공할 수 있음을 보여주었다. 그러나 최상의 수득률을 낼 수 있는 적혈구 분리 과정은 아직 알려져 있지 않으며 여러 나라에서 서로 각기 다른 방법으로 제대혈을 분리 보관하고 있다.<sup>19-21)</sup>

제대혈의 적혈구 분리 방법에 대한 연구로는, Nagler등<sup>9)</sup>이 여러 방법에 의한 제대혈의 적혈구 분리 후의 유핵세포의 수득률을 비교 분석한 결과 3% gelatin 침강법에서 가장 우수하여  $72.4 \pm 7.3\%$ 로 나타났다. 이에 대한 연구는 국내에서도 시행되어, 성등<sup>22)</sup>에 의하면 Ficoll-hypaque( $d=1.077$  g/mL, Pharmacia, Sweden)을 이용한 원심분리법과, 3% gelatin을 이용한 침강법을 비교한 결과, 3% gelatin 침강법이  $98.3 \pm 37.2\%$ 의 CD34 양성세포 수득률을 보여 Ficoll-hypaque 원심분리법의  $74.0 \pm 25.8\%$ 보다 효과적임을 보고하였으며, 대규모 제대혈 은행 설립의 기반 기술에 이용될 수 있다 하였다. 그러나 이때 사용된 gelatin은 실험용 시약이며 증류수에 녹여 3%로 만든 후 멸균하여 사용하여야 하는 문제점, 또한 세척을 한다 하여도 사람에게 투여 가능한지에 대한 의문이 남는다. 또한 적혈구 분리후 세포 수득률이 높았으나, 채혈된 제대혈중 일부(5~10 mL)를 원추형 시험관으로 옮긴 후 적혈구 분리를 한 것이므로,

채집된 제대혈 전체를 동량의 3% gelatin과 섞어서 적혈구를 침강시킨 후 상층액을 걷어내는 과정을 4차례 시행하는 방법은 다량의 제대혈을 효과적으로 무균 처리하는데 상당한 어려움이 있다. 이등<sup>23)</sup>이 발표한 결과 역시 3% gelatin이 Ficoll-hypaque와 비교했을 때 통계적으로 유의있는 높은 수득률을 보고한 바 있다(10 mL 제대혈을 시험관을 사용하여 검사함).

본 연구는 이와같은 불합리한 open-system을 지양하고, 보다 간편하고 무균적으로 처리할 수 있는 closed-system을 사용하자는데 목적을 두고 시작하였으며, 적혈구를 침강시키는 용액으로는 실험용 gelatin 대신 상용화된 정맥주사용 4% modified gelatin(Gelofusin)을 시도하였다. 또한 기존의 보고 중에 6% hydroxyethyl starch(HES)를 사용하였을 때 효과적으로 적혈구를 분리, 제거하였다는 보고가 있어,<sup>4)</sup> 같은 다당류 제제인 상용화된 10% pentastarch(Pentaspan)를 사용하여 Gelofusin과 비교하여 보았다. 결과적으로 Pentaspan을 사용한 경우  $60.2 \pm 31.5\%$  CD34 양성세포 수득률을 보여 기존의 방법<sup>9)</sup>에 비하여 좋은 결과는 아니었으나 침강 시간과 농도에 대한 연구가 뒷받침 된다면 그 효율성에 대하여 재고할 수 있으리라 생각된다. 저자들의 관찰에 의하면 농도와 침강 시간을 다르게 하였을 때 수득률에 차이가 나타나지 않았으며 Pentaspan의 농도가 높았을 때 백혈구의 이형성화와 응집이 관찰되어 농도를 높히는 것은 불합리하리라 생각된다. 반면 Gelofusin을 사용한 경우에는  $87.7 \pm 7.5\%$ 의 높은 CD34 양성세포 수득률을 관찰할 수 있었으며, 한차례의 Gelofusin 처리 과정과 완전 무균상태와 간편하고 짧은 시간 동안의 혈액백내에서의 처리 등 여러 가지 측면을 고려하여 본다면 앞으로 광범위하게 시행될 제대혈세포 이식을 위한 제대혈 은행 설립에 있어 공간적, 경제적 문제를 해결하는데 큰 도움을 줄 수 있으리라 생각된다. 본 연구에서 저자들의 결과는 최상의 조혈 모세포의 수득을 위한 방법의 하나로서 대두될 수 있으나 추가적인 연구가 진행되어야 할 것으로 생각되며 향후 제대

혈 이식의 보편화를 위해 대량의 제대혈 검체들을 냉동보관할 공간적인 문제와 경제적인 관리체계를 유지하기 위해 필요한 기반 기술로서 이용될 수 있는 기초적인 연구가 되리라 사료된다.

## 요 약

**연구 배경:** 제대혈은 많은 양의 조혈 모세포를 함유하고 있어 여러 종양의 치료에 있어서 중요한 치료법의 하나인 골수이식을 대신하는 치료로서 이용되어지고 있다. 그러나 제대혈 전혈 사용시의 ABO 부적합 수혈 및 냉동보존제의 과량 투여에 의한 부작용이 불가피하였다. 따라서 가능한 적은 양의 조혈 모세포의 손실을 가져오면서 적혈구를 분리, 제거할 수 있는 방법에 대한 연구가 활발히 진행되어 Ficoll-hypaque, 3% gelatin을 이용한 분리방법이 가장 보편화되어 있다. 그러나 기존의 연구는 실험실에서 제대혈 일부를 가지고 원추형 시험관에서 적혈구를 분리, 제거하는 방법에 관한 연구이고, 이와같은 방법을 대량의 제대혈 검체에 적용하는 것은 현실적으로 불가능하다. 이에 저자들은 수혈백을 이용한 closed-system을 적용하고, 적혈구 분리 시약으로 상품화된 주사용 제제인 10% pentastarch와 4% modified gelatin을 이용하여 제대혈의 적혈구 분리시 세균 오염의 확률을 감소시키며, 간편하게 적용할 수 있는 적혈구 분리 방법의 효용성을 평가하고자 하였다.

**방 법:** 연세대학교 세브란스병원 산부인과에서 정상 질식분만한 45례에서 수혈백을 이용하여 제대혈을 채취한 후 10% pentastarch와 4% modified gelatin으로 적혈구를 분리한 후 원심분리기로 단핵구를 분리한 후 단핵구수와 CD34 양성세포의 수 및 각각의 수득률을 비교하였다.

**결 과:** 1) 27례에서 10% pentastarch로 적혈구 분리를 하였고 분리 전의 제대혈의 양은  $68.1 \pm 17.0$  mL이었고 분리 후의 양은  $18.1 \pm 4.1$  mL였다.

2) 18례에서 4% modified gelatin으로 적혈구 분리를 하였고 분리 전의 제대혈의 양은  $68.0 \pm 15.8$

mL이었고 분리 후의 양은  $23.1 \pm 6.3$  mL이었다.

3) 제대혈 총단핵구수는 10% pentastarch 사용시 분리 전  $3.87 \pm 1.41 \times 10^8$ 이었고, 분리 후  $2.61 \pm 1.51 \times 10^8$ 으로 수득률이  $70.2 \pm 43.7\%$ 였다. 4% Modified gelatin 사용시에는 분리 전과 후가 각각  $4.82 \pm 2.84 \times 10^8$ 과  $4.03 \pm 3.16 \times 10^8$ 으로 수득률이  $84.7 \pm 39.9\%$ 로 10% pentastarch보다 우수하였으나 통계학적으로 유의한 차이는 없었다( $P > 0.05$ ).

4) CD34 양성세포의 수는 10% pentastarch 사용시 적혈구 분리 전후에 각각  $1.73 \pm 1.30 \times 10^6$ 과  $1.19 \pm 0.96 \times 10^6$ 으로 수득률이  $60.2 \pm 31.5\%$ 로 나타났다. 4% modified gelatin 사용시에는 그 수가 각각  $1.75 \pm 1.68 \times 10^6$ 과  $1.43 \pm 0.86 \times 10^6$ 으로 수득률이  $87.7 \pm 7.5\%$ 로 높게 나타났으나 통계학적으로 유의한 차이는 없었다( $P > 0.05$ ).

**결 론:** 수혈백을 이용한 제대혈의 채혈과 4% modified gelatin(Gelofusin)을 이용한 적혈구 분리 및 제거 방법(closed-system)은 안전하고 간편하게 사용될 수 있으며, 비교적 높은 수의 조혈 모세포 수득이 가능하여, 제대혈 은행 설립시 적용할 수 있는 기반 기술이 될 수 있으리라 사료된다.

## 참 고 문 헌

1. Nimgaonkar M, Roscoe R, Winkelstein A, et al. Cord blood; a rich source of CD34+(BRIGHT)CD38-/DR-cells. *Blood* 1993; 82(suppl.1): 488a.
2. Broxmeyer HE: Cord blood as an alternative source for stem and progenitor cells transplantation. *Current Opi Pediatr* 1995; 7: 47-55.
3. Pahwa RN, Fleischer A, Than S, et al. Successful hematopoietic reconstitution with transplantation of erythrocyte depleted allogenic human cord blood cells in a child with leukemia. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 4485-8.
4. Davies SM, Wagner JE. Overview: Umbilical cord blood stem cells and transplantation. *Third International Cord Blood Stem Cells: Banking, Expansion, Transplants* 1996: 4.
5. Broxmeyer HE, Kurtzberg J, Glukman E, et al. Umbilical cord blood hematopoietic stem and repopulating cells in human clinical transplantation. *Blood Cells* 1991; 17: 313-9.

6. Glukman E, Broxmeyer HE, Auerbach AD, et al. Hematopoietic reconstitution in a patient with Fanconi's anemia by means of umbilical cord from an HLA-identical sibling. *N Engl J Med* 1989; 321: 1174-8.
7. Broxmeyer HE, Douglas GW, Hangoc G, et al. human umbilical cord blood as a potential source of transplantable hematopoietic stem/progenitor cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86: 3828-32.
8. Harris DT, Schumacher MJ, Rychlik S, et al. Collection, separation and cryopreservation of umbilical cord blood for use in transplantation. *Bone Marrow Transplant* 1994; 13: 135-43.
9. Nagler A, Peacock M, Tantoco M, et al. Red blood cell depletion and enrichment of CD34+ hematopoietic progenitor cells from human umbilical cord blood using soybean agglutinin and CD34 immunoselection. *Exp Hematol* 1994; 22: 1134-40.
10. Knudtson S. In vitro growth of granulocyte colonies from circulating cells in human cord blood. *Blood* 1974; 43: 357-61.
11. Gabutti V, Foa R, Mussa F. Behavoir of human hematopoietic stem cells in cord and neonatal blood. *Hematologica* 1975; 4: 60-4.
12. Falkenburg JHF, Zijlmans JM, Willemze R. Characterization of late appearing mixed colonies with high proliferative potential from human umbilical cord blood. *J Hematother* 1993; 2: 211.
13. Traycoff CM, Abboud MR, Laver J, et al. Human umbilical cord blood hematopoietic progenitor cells; are they the same as their adult bone marrow counterparts? *Blood Cells* 1994; 20: 382-91.
14. Carow C, Hangoc G, Broxmeyer HE. Human multipotential progenitor cells(CFU-GEMM) have extensive replating capacity for secondary CFU-GEMM; an effect enhanced by cord blood plasma. *Blood* 1993; 81: 942-9.
15. Moore MAS. presented in Anaheim, CA at the symposium Cord Blood Stem Cells:1992 Research and Progress Session
16. Risdon G, Gaddy J, Stehman FB, et al. Proliferative and cytotoxic responses of human cord blood T lymphocyte following allogenic stimulation. *Cell Immunol* 1994; 154: 14-24.
17. Neoman H, Gress RE, Bare CV, et al. Human bone marrow and umbilical cord blood cells generate CD4+ and CD8+ single positive T cells in murine fetal thymus organ culture. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 10778-782.
18. Hows JM. Human umbilical cord blood as a source of stem cells for unrelated donor transplants. *The Educational Program of American Society of Hematology* 1993: 142-51.
19. Ullman J, Perry E, Fautsch S, et al. Red blood cell depletion of umbilical cord blood for transplantation. *Blood* 1993; 82(suppl.1): 393a.
20. Agarwal R, Meagher R, Hurtubise P, et al. Umbilical cord blood separation; CD34+ selection following the use od hetastarch and soy bean agglutination. *Blood* 1993; 82(suppl.1): 14a.
21. Bertoloni F, Lazzari L, Lauri E, et al. Comparative study of different procedures for collection and banking of umbilical cord blood. *J Hematother* 1995; 4: 29-36.
22. 성기웅, 강형진, 이준아, 한효정, 최형수, 박현진 등. 제대혈은행 설립을 위한 제대혈의 적혈구 분리방법에 관한 연구. *대한혈액학회지* 1996; 31(3): 393-401.
23. Lee HY, Park JS, Choi AH, et al. Cord blood processing by gelatin sedimentation provides better yields of progenitor cells than by conventional or modified Ficoll-Hypaque method. *Blood* 1997; 90: 213a.