

Immunomagnetic Bead 및 Avidin-Biotin Column을 이용한 CD34+ 조혈간세포 분리

연세대학교 의과대학 내과학교실

이승태 · 한지숙 · 이석 · 정소영 · 민유흥 · 고윤웅

= Abstract =

Separation of CD34+ Hematopoietic Stem Cells using Immunomagnetic Bead
and Avidin-Biotin Column

Seung Tae Lee, M.D., Jee Sook Hahn, M.D., Seok Lee, M.D., So Young Chung, M.D.
Yoo Hong Min, M.D. and Yun Woong Ko, M.D.

Department of Internal Medicine, Yonsei University College of Medicine, Seoul, Korea

Background: CD34 cell surface antigen(MY10, HPCA-1) is expressed selectively on the hematopoietic stem cells and CD34+ cells are supposed to have the characteristics of clonogenic hematopoietic progenitors. CD34+ cells would be an ideal population for clinical transplantation as well as for basic research on stem cells and offer an advantage for current clinical gene transfer methodology.

Methods: CD34+ cells were separated from the bone marrows of 9 normal persons and 13 patients with acute myelogenous leukemia on diagnosis by immunomagnetic bead method and avidin-biotin immunoabsorption column method and efficacy of the two separation methods were assessed.

Results:

1) CD34+ cells were separated from bone marrows of 5 normal persons and 10 patients with acute myelogenous leukemia on diagnosis by immunomagnetic bead and after separation, CD34+ cell purity of AML marrow had a higher tendency compared with that of normal marrow, as $82.9 \pm 6.3\%$, $73.4 \pm 12.4\%$, respectively, and enrichment of CD34+ cell of normal marrow, which had lower preseparation purity, was $41.9 \pm 12.5X$, significantly higher than AML marrow's $10.3 \pm 7.5X$ ($P < 0.05$) and yields of normal and AML marrow were comparable, as 59.1 ± 11.8 and $41.2 \pm 9.3\%$, respectively.

2) Total 15 sample's purity, enrichment and yield of CD34+ cells after separation by immunomagnetic bead were $79.8 \pm 5.7\%$, $20.0 \pm 7.4X$ and $47.2 \pm 7.4\%$, respectively.

3) CD34+ cells were separated from bone marrows of 4 normal persons and 3 patients with acute myelogenous leukemia on diagnosis by avidin-biotin column and after separation, CD34+ cell purity

이석, 120-752 서울특별시 서대문구 신촌동 134번지, 세브란스병원 내과
Tel: (02)361-7740, Fax: (02)363-7690

of AML marrow had a higher tendency compared with that of normal marrow, as $89.3 \pm 3.9\%$, $55.6 \pm 10.2\%$, respectively, and enrichment of CD34+ cell of normal marrow, which had lower preseparation purity, was $64.2 \pm 28.9X$, significantly higher than AML marrow's $3.0 \pm 1.4X$, and yields of normal and AML marrow were comparable, as 19.6 ± 8.8 and $10.7 \pm 4.0\%$, respectively.

4) Total 7 sample's purity, enrichment and yield of CD34+ cells after separation by avidin-biotin column were $70.3 \pm 8.9\%$, $38.0 \pm 19.8X$ and $15.8 \pm 5.3\%$, respectively.

5) In normal marrow, CD34+ cell purity of immunomagnetic bead had a higher tendency compared with that of avidin-biotin column, as $73.4 \pm 12.4\%$ and $55.6 \pm 10.2\%$, respectively, but yield of immunomagnetic bead was significantly higher than that of avidin-biotin column($47.2 \pm 7.4\%$ and 17.8 ± 5.8 , respectively)($P=0.05$).

6) In AML marrow, purity and enrichment of CD34+ cell were comparable between immunomagnetic bead and avidin-biotin column, but yield of immunomagnetic bead had a higher tendency compared with that of avidin-biotin column($41.2 \pm 9.3\%$ and 10.7 ± 4.0 , respectively).

7) Overall purity and enrichment of CD34+ cell were comparable between immunomagnetic bead and avidin-biotin column, but yield of immunomagnetic bead was significantly higher than that of avidin-biotin column($47.2 \pm 7.4\%$ and 15.8 ± 5.3 , respectively)($P=0.02$).

Conclusion: immunomagnetic bead method was effective CD34+ cell separation method with high CD34+ cell purity and less target cell loss. Further evaluation for clinical application of CD34+ cell separation may be warranted.

Key Words : CD34 cell surface antigen, Cell separation method

서 론

CD34 세포표면항원(MY10, HPCA-1)은 세포막내 존재하는 115KD-인산화 당단백질로 장기골수배양 개시세포(initiating cell), HPP-CFC, CFU-Blast, CFU-GEMM, CFU-GM, CFU-Mk, BFU-E 등 조혈간세포에 선택적으로 표현되며, 세포가 분화성숙단계를 거치면서 소실되어 CD34+ 세포는 클론형성 조혈간세포의 특성을 갖는 세포로 추론되고 있다^{1~6)}. 순수분리된 CD34+ 세포는 장기골수배양 및 생체외 집락 형성실험에서 강력한 조혈간세포 활동성을 보이며⁷⁾, 악성종양에서 자가골수이식 및 말초혈액 조혈간세포자이식 등 임상 골수이식 측면 뿐만 아니라 조혈간세포의 성상에 대한 기초연구 및 유전자 치료의 매개체로서 가장 이상적인 세포군으로 알려져 있다^{7,8)}. 따라서 CD34+ 세포분리의 순수도 및

효율을 높임으로써 골수이식의 임상응용 및 기초연구분야와 유전자전달 방법론의 발전에 기여할 수 있을 것으로 생각된다.

현재까지 CD34+ 세포의 분리법으로 immunoadsorption column method⁹⁾와 immunomagnetic bead method 등^{10,11)}이 가장 보편적으로 사용되고 있으며, 본 연구에서는 정상인의 골수와 급성 골수성 백혈병 환자의 초진시 골수를 이용, 이 두가지 방법으로 세포를 분리하고 그 효율성을 비교하여 보다 효과적인 순수분리법을 밝혀냄으로써 추후 임상적용의 가능성과 조혈간세포의 성상에 대한 기초연구에 도움이 되고자 하였다.

대상 및 방법

1. 대상

9례의 정상인 골수와 13례의 급성 골수성 백혈병

Immunomagnetic Bead 및 Avidin-Biotin Column을 이용한 CD34+ 조혈간세포 분리

환자의 초진시 골수를 채취한 후, immunomagnetic bead(Mini-MACS magnetic separation system, Miltenyi Biotec Inc)와 avidin-biotin column(CEPRATE LC34-Biotin kit, CellPro, Inc)중 한가지 방법으로 CD34+ 세포를 분리하였다.

2. 방법

1) 재료 채취 및 단핵세포분리

정상인과 초진시 급성 골수성 백혈병 환자의 후 상장골동에서 Jamshidi needle을 이용하여 골수 20 mL을 채취한 후, Ficoll-Hypaque(Nycomed, Norway: S.G. 1.077)에 중층하여 단핵세포를 분리하였다. 단핵세포분리는 채취한 골수를 1:1의 비율로 RPMI배양액으로 희석한 다음, 미리 4mL의 Ficoll-Hypaque을 넣어둔 15mL짜리 시험관에 희석한 골수를 중층한 후, 400g로 30분간 원심분리하고 단핵세포층을 pasteur pipette을 이용하여 채취하였으며, 3회 10% 우태아혈청(fetal bovine serum; FBS, Gibco, NY, USA)이 첨가된 RPMI 배양액으로 세척하였다. 세척 후 얻은 세포층을 10% 우태아혈청이 첨가된 Iscove's modified Dulbecco's medium(IMDM; Gibco, NY, USA)에 조심스럽게 부유시킨 다음 잘 혼합한 후 부착세포제거를 위하여 25cm² 플라스틱 배양기(Greiner, Netherland)에 넣고 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 90분간 배양하였다. 배양후 0.01mL 세포를 취하여 hemocytometer로 세포수를 계산하였으며, 유식세포분석기를 이용하여 분리전의 CD34+ 세포측정을 시행하였다.

2) Immunomagnetic Bead를 이용한 CD34+ 세포 분리

Ficoll-hypaque 중층법으로 골수 단핵세포를 분리하여 세포농도를 $4 \times 10^8/\text{mL}$ 이하로 맞춘 후, Mini-MACS magnetic separation system(Miltenyi Biotec Inc. CA, USA)을 이용하여 CD34+ 세포를 분리하였다.

Phosphate buffered saline(PBS; Gibco, NY, USA)에 0.5% 우혈청알부민(bovine serum albumin; BSA, Gibco, NY, USA)과 5mM EDTA(Kokusan chemical works, Ltd. Tokyo, Japan)를 첨가하여 만든 완충액을 이용, 10⁸세포당 300μL의 비율로 부유시킨 후,

reagent A1(FC-receptor blocking reagent; human IgG, Miltenyi Biotec Inc. CA, USA)과 reagent A2 (modified CD34 antibody; clone 8G12, IgG1, Miltenyi Biotec Inc. CA, USA)를 각각 10⁸세포당 100μL의 비율로 첨가하여 조심스럽게 섞은 후 4°C에서 15분간 배양하였다. 배양후 다시 10⁸세포당 완충액 5mL의 비율로 부유시켜서 300g로 5분간 원심분리시켜 세척하고 남은 완충액을 모두 제거후, 역시 10⁸세포당 완충액 400μL의 비율로 재부유시켰다. 이 세포층에 10⁸세포당 100μL의 비율로 reagent B(colloidal superparamagnetic MACS microbead, Miltenyi Biotec Inc. CA, USA)를 첨가하여 조심스럽게 섞고 4°C에서 15분간 배양한 후, 다시 10⁸세포당 완충액 5mL의 비율로 부유시켜서 300g로 5분간 원심분리시켜 세척하고 남은 완충액을 모두 제거후, 역시 10⁸세포당 완충액 400μL의 비율로 재부유시켰다. MiniMACS separation column을 MiniMACS separation unit에 연결시키고 500μL의 완충액을 column에 통과시켜 표면을 건조하지 않은 상태로 유지시킨 후, 준비된 세포를 MiniMACS separation column에 넣어 통과시키고, 다시 500 μL 완충액을 column에 4회 통과시켜 세척하여 15 mL 원심분리용 시험관에 CD34- 세포를 받아 내었다. 이후 MiniMACS separation column을 MiniMACS separation unit에서 분리시키고 column에 1 mL의 완충액을 넣은 후, plunger를 사용하여 column의 내벽에 붙어있는 CD34+ 세포를 1mL의 10% IMDM이 들어있는 15 mL 원심분리용 시험관에 받아 내었다. 분리가 끝난 후 CD34- 세포군과 CD34+ 세포군 모두에서 각각 0.01mL를 취하여 hemocytometer로 세포수를 계산하고, 10⁶의 세포를 이용하여 유식세포분석기를 통한 CD34+ 세포측정을 시행하였다.

3) Avidin-Biotin Column을 이용한 CD34+ 세포 분리

Ficoll-hypaque 중층법으로 분리한 골수 단핵세포를 avidin-biotin column(CEPRATE LC34- Biotin kit, CellPro, Inc. Bothel, WA, USA)을 이용하여 CD34+ 세포를 분리하였다. 우선 골수 단핵세포를 PBS(phosphate buffered saline, CellPro, Inc. Bothel, WA,

USA)와 혼합하여 만든 1% 우혈청알부민(bovine serum albumin; FBS, CellPro, Inc. Bothel, WA, USA)으로 중층하여 300g로 15분간 원심분리, 2회 세척한 후 역시 1% 우혈청알부민을 이용, 세포농도를 $1\sim2\times10^8/mL$ 로 맞추었다. 여기에 mouse anti-human CD34 biotin(CellPro, Inc. Bothel, WA, USA)을 세포 mL당 40 μ L의 비율로 첨가하여 조심스럽게 섞은 후, 실온에서 25분간 배양하였다. 배양후 1% 우혈청알부민으로 세포층을 5배 희석하고 300g로 15분간 원심분리한 후 부유물을 제거하였다. 남은 세포층을 5% 우혈청알부민을 이용, 세포농도를 $1\sim2\times10^8/mL$ 로 맞추었으며 세포의 용적은 5mL가 넘지 않도록 하였다. 세포를 배양하는 동안 CEP RATE LC34-Biotin kit를 준비하였는데, 즉 sample/wash chamber (CellPro, Inc. Bothel, WA, USA)를 operating platform에 고정한 후 avidin column을 sample/wash chamber에 연결시켰다. PBS로 sample chamber와 wash chamber를 채우고 avidin column을 통과시켜 연결부위의 기포를 모두 제거한 후, avidin column의 연결부위 반대편의 pumping tube를 소독가위로 자르고 15mL 원심분리용 시험관에 끝부분을 위치시켜 sample을 받을 준비를 해 놓았다. Sample chamber에 preGel (CellPro, Inc. Bothel, WA, USA)을 첨가하여 0.7mL의 preGel bed를 형성시키고 이 위에 다시 5mL의 PBS를 통과시킨 후 5mL의 5% 우혈청알부민을 넣어 preGel bed의 상부에 도달할 때까지 통과시켰다. 준비가 된 sample chamber에 배양이 끝난 세포를 넣고 outlet clamp를 열어 avidin column을 통과시켰으며 통과속도는 분당 1mL로 조절하였다. 세포층이 preGel bed의 상부에 도달했을 때 $1\sim2mL$ 의 5% 우혈청알부민을 첨가하여 남아 있는 세포까지 모두 avidin column을 통과시킨 후 wash chamber 내의 PBS 3mL를 avidin column에 통과시키고 outlet clamp를 60초간 잡았다가 다시 나머지 2mL를 통과시켜 column을 세척하였다. 미리 준비하였던 15mL 원심분리용 시험관에 모아진 것은 CD34- 세포이며 다시 5% 우혈청알부민 2mL를 넣어둔 새로운 15mL 원심분리용 시험관으로 대치한 후 avidin column내에 붙어있는 CD34+ 세포를 column의 길이 방향으

로 10회 이상 강력하게 짜줌으로써 시험관 내로 4mL 이상이 될 때까지 모았으며, CD34- 세포군과 CD34+ 세포군 모두에서 각각 0.01mL를 취하여 hemocytometer로 세포수를 계산하고 10^6 세포를 이용하여 유식세포분석기를 통한 CD34+ 세포측정을 시행하였다.

4) 유식세포분석(Flow Cytometry Assay)

Ficoll-hypaque 중층법으로 분리한 골수 단핵세포를 대상으로 CD34+세포를 분리한 후, 분리 전과 후의 골수세포를 대상으로 유식세포분석기를 이용하여 CD34+ 세포 측정을 시행하였다. CD34+ 세포 측정은 FITC-conjugated 8G12 antibody(anti-HPCA-2; Becton Dickinson, CA, USA)를 이용한 direct immunofluorescence방법을 사용하였다. 10^6 세포를 0.1% azide가 첨가된 IMDM 배양액 50 μ L에 부유시킨 다음, 희석된 Anti-HPCA-2(CD34) FITC(Becton Dickinson) 20 μ L를 첨가하였으며, 4°C 암실에서 30분간 배양하였다. 배양후 0.1% sodium azide/PBS로 2회 세척하고, 이어 488 nm, 0.3 W로 조정된 argon-ion laser 가 장착된 FACStar^{PLUS}(Becton Dickinson)를 이용한 유식세포분석을 시행하되, green fluorescence(FITC)는 550nm, red fluorescence는 585nm에서 수집하였다. Acquisition gate는 세포등괴와 세포파편을 제외하고, side scatter axis(x)와 anti- HPCA-2-FITC fluorescence axis(y) channel상 lymphoid gate로 하며, lymphoid gating이 애매한 경우에는 Simultest LeucoGATE (Anti-Leukocyte FITC+Anti- Leu-M3 PE; Becton Dickinson)를 이용하여 gating하였다. FACStar^{PLUS} LYSIS II research software를 이용한 Consort 30 Data Management Program list mode에서 최소한 30,000개의 events를 분석하였으며, 분석한 백혈구 및 단핵구가 운데 CD34+ 세포의 빈도를 계산하고, 음성대조군은 nonspecific anti-mouse IgG1- FITC+IgG2a-PE (Simultest Control; Becton Dickinson)로 시행하였다. CD34+ 세포수는 유식세포분석기로 분석한 events 수 및 CD34+ 세포의 순수도(purity, %)를 곱하여 산정하였으며, 분리후 산정한 CD34+ 세포수를 분리전의 CD34+ 세포수로 나누어 백분율로 처리하여 재생률(yield, %)을 산정하였고, 분리전과 분리후의

CD34+ 세포의 빈도의 비율로 배율(enrichment, X) 을 산정하였다.

5) 통계 처리

모든 자료값은 평균±표준오차로 처리하였으며, CD34+ 세포 분리후 두가지 분리방법의 분리효과(순수도 및 배율, 재생률)를 비교하기 위하여 비모수 통계(nonparametric test)를 시행하였다.

결 과

1. Immunomagnetic Bead의 CD34+ 세포 분리성적

정상인 5례와 급성 골수성 백혈병 10례의 골수를 대상으로 CD34+ 세포를 분리하였으며 분리결과는 Table 1과 같다. 정상인과 급성 골수성 백혈병 환자의 골수에서 CD34+ 세포의 순수도는 각각 73.4±12.4%, 82.9±6.3%로 차이가 없었으며, 분리후 세포 순수도의 증가 배율은 각각 41.9±12.5배, 10.3±7.5배로 분리전의 CD34+ 세포 순수도가 낮았던 정상인 골수에서 높았고($P<0.05$), 재생률은 각각 59.1±11.8%, 41.2±9.3%로 차이가 없었다. 전 15례의 CD34+ 세포의 순수도는 79.8±5.7%이었고, 분리후의 증가 배율은 20.0±7.4배 이었으며 재생률은 47.2

±7.4%이었다.

2. Avidin-Biotin Column의 CD34+ 세포 분리성적

정상인 4례와 급성 골수성 백혈병 3례의 골수를 대상으로 CD34+ 세포를 분리하였으며 분리결과는 Table 2와 같다. 정상인과 급성 골수성 백혈병 환자의 골수에서 CD34+ 세포 순수도는 각각 55.6±10.2%, 89.3±3.9%로 백혈병 환자의 골수에서 높은 경향을 보였으며, 분리후 세포 순수도의 증가 배율은 각각 64.2±28.9배, 3.0±1.4배로 분리전의 CD34+ 세포 빈도가 낮았던 정상인 골수에서 높은 경향을 보였고, 재생률은 각각 19.6±8.8%, 10.7±4.0%로 차이가 없었다. 전 7례의 분리후 CD34+ 세포의 순수도는 70.3±8.9%이었고, 분리후의 증가 배율은 38.0±19.8배이었으며 재생률은 15.8±5.3%이었다.

3. Immunomagnetic Bead와 Avidin-Biotin Column의 CD34+ 세포분리 성적 비교

정상 골수에서 분리후 CD34+ 세포의 빈도는 bead에서 column에 비해 높은 경향을 보였으나 유의한 차이는 없었으며(73.4±12.4% vs 55.6±10.2%, Fig. 1), 재생률은 역시 bead의 경우 유의하게 높았다

Table 1. Separation of CD34+ Cells from Normal Marrow and AML Marrow by Immunomagnetic Bead

	Population	Total cell($\times 10^6$)	CD34+ cell($\times 10^6$)	CD34+ (%)	Enrichment*(X)	Yield†(%)
Normal (n=5)	Start	94.9 ± 5.2	1.96 ± 0.3	1.9 ± 0.3		
	Non-adsorbed	49.9 ± 8.9	11.5 ± 11.1	1.5 ± 0.7	41.9 ± 12.5	59.1 ± 11.8
	Adsorbed‡	1.8 ± 0.6	1.1 ± 0.3	73.4 ± 12.4		
AML (n=10)	Start	93.7 ± 9.4	41.0 ± 10.5	44.2 ± 9.8		
	Non-adsorbed	32.2 ± 5.4	9.5 ± 4.2	22.0 ± 8.9	10.3 ± 7.5	41.2 ± 9.3
	Adsorbed	14.7 ± 4.6	12.9 ± 4.1	82.9 ± 6.3		
Total (n=15)	Start	94.1 ± 6.4	27.9 ± 8.4	30.1 ± 8.3		
	Non-adsorbed	38.1 ± 5.0	10.2 ± 4.6	15.1 ± 6.3	20.0 ± 7.4	47.2 ± 7.4
	Adsorbed	10.4 ± 3.1	9.0 ± 3.1	79.8 ± 5.7		

* % of CD34+ cells in the enriched fraction divided by % of CD34+ cells in the starting population.

† Total number of CD34+ cells collected divided by the total number of CD34+ cells in the starting population.

‡ Adsorption means the affinity between CD34 antigen and anti-CD34 monoclonal antibody.

Table 2. Separation of CD34+ Cells from Normal Marrow and AML Marrow by Avidin-Biotin Column

	Population	Total cell($\times 10^6$)	CD34+ cell($\times 10^6$)	CD34+ (%)	Enrichment*(\times)	Yield [†] (%)
Normal (n=4)	Start	249.9 \pm 147.9	3.4 \pm 1.0	1.9 \pm 0.9		
	Non-adsorbed	237.0 \pm 146.3	2.9 \pm 1.1	1.2 \pm 0.4	64.2 \pm 28.9	19.6 \pm 8.8
	Adsorbed	1.9 \pm 1.1	0.5 \pm 0.32	55.6 \pm 10.2		
AML (n=3)	Start	277.5 \pm 168.3	115.2 \pm 85.7	41.7 \pm 22.3		
	Non-adsorbed	139.9 \pm 58.5	42.8 \pm 23.5	36.6 \pm 11.4	3.0 \pm 1.4	10.7 \pm 4.0
	Adsorbed	7.5 \pm 3.0	6.7 \pm 2.8	89.9 \pm 3.9		
Total (n=7)	Start	261.8 \pm 101.7	51.4 \pm 39.5	19.0 \pm 9.5		
	Non-adsorbed	222.6 \pm 92.5	25.2 \pm 11.2	18.6 \pm 7.7	38.0 \pm 19.8	15.8 \pm 5.3
	Adsorbed	7.3 \pm 1.7	3.2 \pm 1.6	70.3 \pm 8.9		

* % of CD34+ cells in the enriched fraction divided by % of CD34+ cells in the starting population.

† Total number of CD34+ cells collected divided by the total number of CD34+ cells in the starting population.

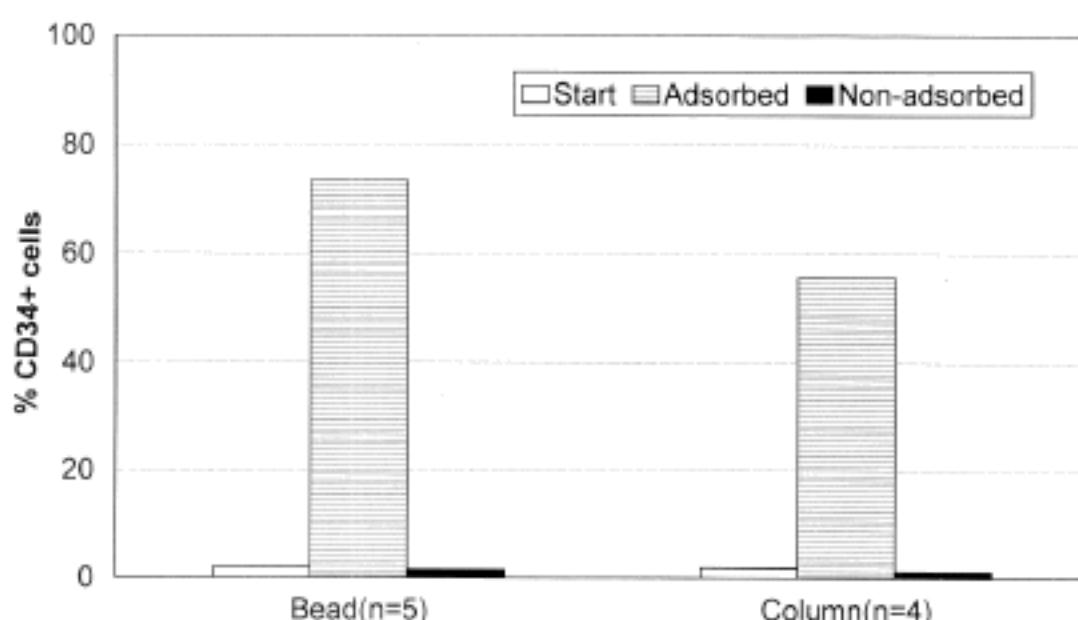


Fig. 1. Comparison of CD34+ cell purity before and after separation of normal bone marrow between immunomagnetic bead and avidin-biotin column.

(59.1 \pm 11.8% vs 19.6 \pm 8.8%, $P=0.05$, Table 3). 급성골수성 백혈병 환자 골수의 경우, bead와 column에서 CD34+ 세포의 빈도 및 분리후 배율, 재생률에 모두 유의한 차이는 없었으나 재생률에서 bead를 사용한 경우 높은 경향을 보였다(41.2 \pm 9.3% vs 10.7 \pm 4.0%, Table 3, Fig. 2). 전체 표본에서 CD34+ 세포의 분리 후 빈도 및 배율의 증가는 bead와 column에서 유의한 차이가 없었으나, 재생률은 bead에서 유의하게 높았다(47.2 \pm 7.4% vs 15.8 \pm 5.3%, $P=0.02$, Table 3, Fig. 3).

고 칠

CD34 세포표면항원은 세포막내 존재하는 115 KD-인산화 당단백질로, 이의 기능은 정확히 알려져 있지 않으나 장기골수배양 개시세포, HPP-CFC, CFU-Blast, CFU-GEMM, CFU-GM, CFU-Mk, BFU-E 등 조혈간세포에 선택적으로 표현되며, 세포가 분화 성숙단계를 거치면서 소실되어 CD34+ 세포는 클론형성 조혈간세포의 특성을 갖는 세포로 추론되고

Table 3. Comparison of CD34+ Cell Separation Results Between Immunomagnetic Bead and Avidin-Biotin Column

	Bead (n=5)	Column (n=4)	P value
Normal			
Purity (% CD34+)	73.4 ± 12.4	55.6 ± 10.2	0.22
Enrichment (X)	41.9 ± 12.5	64.2 ± 28.9	0.77
Yield (%)	59.1 ± 11.8	19.6 ± 8.8	0.05
AML	(n=10)	(n=3)	
Purity (% CD34+)	82.9 ± 6.3	89.9 ± 3.9	0.82
Enrichment (X)	10.3 ± 7.5	3.0 ± 1.4	0.27
Yield (%)	41.2 ± 9.3	10.7 ± 4.0	0.09
Total	(n=15)	(n=7)	
Purity (% CD34+)	79.8 ± 5.7	70.3 ± 8.9	0.29
Enrichment (X)	20.0 ± 7.4	38.0 ± 19.8	0.65
Yield (%)	47.2 ± 7.4	15.8 ± 5.3	0.02

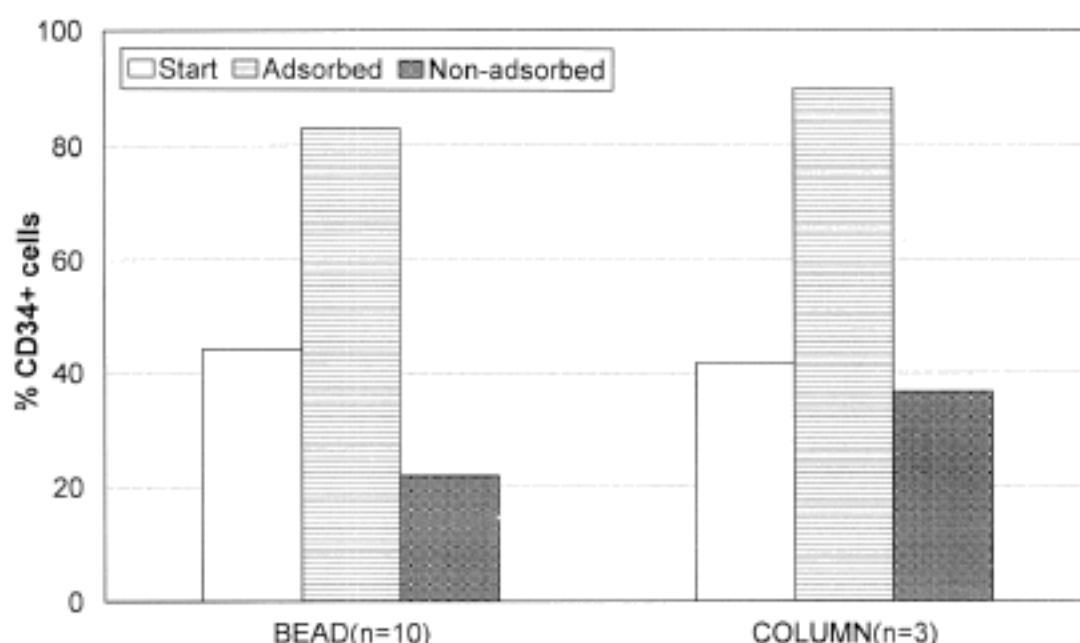


Fig. 2. Comparison of CD34+ cell purity before and after separation of AML bone marrow between immunomagnetic bead and avidin-biotin column.

있다^{1~6)}. 순수분리된 CD34+ 세포는 형태학적으로 아세포 및 초기 림프계세포와 유사하며 장기골수배양 및 생체외 집락형성실험에서 강력한 조혈간세포 활동성을 보인다^{7,12)}. 정상인에서 CD34+ 세포는 골수내 단핵세포의 1~4%, 말초혈액세포의 0.1%를 점유하며 제대혈액 및 항암제치료후 가동화된 말초혈액에서도 골수와 비슷한 양성을 보인다^{1~5,13)}. 골수이식에서 CD34+ 세포의 적용은 이 세포군이 장

기 골수생착을 주도하는 조혈간세포라는 점과 이식 후 과립구, 혈소판 및 적혈구의 조기 회복에 중요한 조혈간세포를 포함하고 있다는 점에서 이상적이라고 할 수 있다⁷⁾. 각종 종양의 자가골수이식 및 말초혈액 조혈간세포이식에 있어서 이식편 내의 암세포 오염이 이식후의 재발 등에 중요한 요인으로 문제가 되고 있는 바, CD34+ 세포군의 최초의 임상적 용은 고령 악성종양에 대한 자가이식에서 시도되었

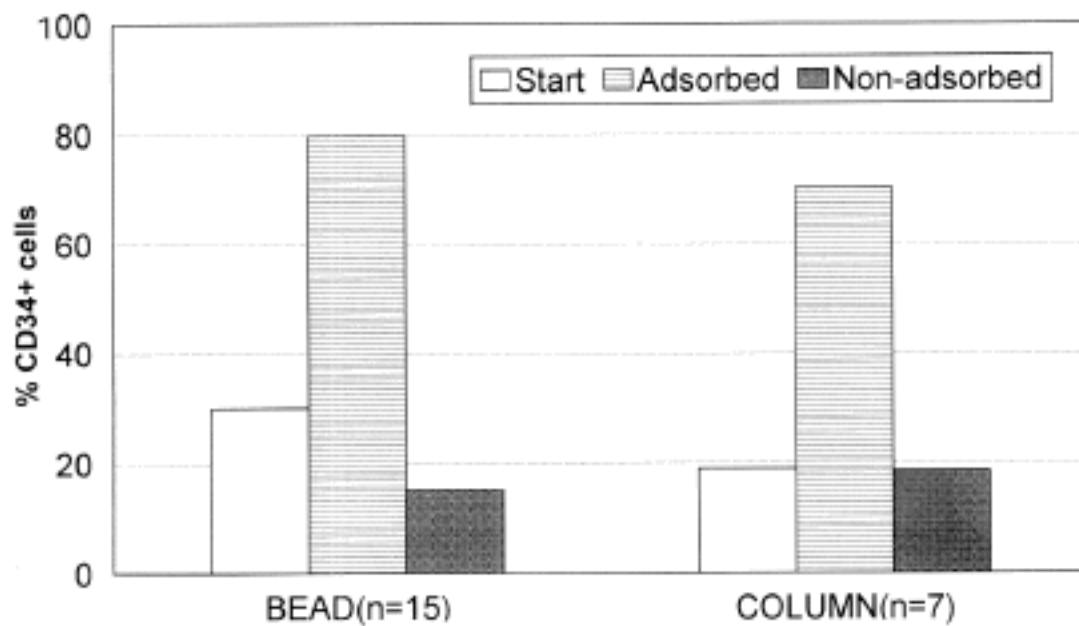


Fig. 3. Comparison of CD34+ cell purity before and after separation of both normal and AML bone marrow between immunomagnetic bead and avidin-biotin column.

으며, 분리과정에서 이식편내의 암세포의 수를 2~5 log까지 감소시켜 이식후 재발률을 저하시킬 수 있을 것으로 생각되고^{14,15)}, CD34 항원을 이용한 조혈간세포의 순수분리는 그 자체로서 “purging”의 역할을 수행하여 purging으로 인한 정상 조혈간세포에 미치는 손상을 배제할 수 있다^{7,8,16)}. 또한 조혈간세포만을 분리후 냉동보관하면 sample의 양이 50~100 배로 감소하므로 액체질소에 냉동보관시 필요한 dimethyl sulfoxide의 양을 현저히 줄일 수 있으며, 적혈구 혼합률도 분리전의 1% 미만의 빈도로 감소하므로 환자에 투여시 발생할 수 있는 용혈현상 등의 부작용을 감소시킬 수 있다는 장점이 있다.

동물실험 및 사람에서 고용량 항암제로 전처치후 골수 및 과립구 집락촉진인자에 의해 가동화된 말초혈액내의 CD34+ 세포를 분리후 자가이식을 하여 지속적인 골수생착을 보고한 2상 연구에서 CD34+ 세포가 장기 골수생착을 위한 조혈간세포로서의 기능을 수행할 수 있음이 입증되었다^{9,17,18)}. 동종골수이식에서도 이식편대숙주질환의 발현을 감소시키기 위한 T 세포제거방법의 일환으로 응용되고 있다^{7,12)}. 또한 CD34+ 세포는 장기 골수생착을 위한 조혈간세포 뿐 만 아니라 강화된 화학요법후 골수기능저하시기에 구제(rescue) 개념으로써 분화된 조혈간세포의 공급원으로도 가능할 것으로 여겨진다⁷⁾.

임상적 측면 외에 CD34+ 세포의 순수분리는 암연구 및 세포생물학 분야에서 이의 요구가 증가되고 있는 바, retrovirus와 표적세포(target cell)의 높은 비율을 요하는 최근의 유전자전달 방법론에서도 중요한 기여를 하고 있으며, 또한 여러 조혈촉진인자에 대한 조혈간세포의 반응 등 조혈간세포의 성상연구에 있어서도 매우 유용하다고 하겠다^{7,8,12)}.

CD34+ 세포의 분리방법으로는 형광활성화 세포분류법(fluorescence activated cell sorting), 면역흡착법(immunoadsorptive system) 및 세포의 물리적 성상을 이용한 원심분리법 등이 있다⁸⁾. 형광활성화 세포분류법은 매우 효과적인 고전적 세포분리 방법으로 알려졌으나 분리과정에 소모되는 시간이 길고 분리할 수 있는 세포의 수에 제한이 있는 등, 대규모의 세포분리에 적합치 않으며⁸⁾, 분리과정에서의 멸균상태유지 등이 어려워 면역흡착법이 개발되었다¹⁹⁾. 면역흡착법에는 다시 immunomagnetic bead method^{10,11,20)}, immunoabsorption column method⁹⁾, flat surface를 이용한 immunoadherence panning method 등^{16,21)}의 3가지 방법이 있는데, bead와 column이 널리 쓰여지고 있다. 면역흡착법의 세포분리효율은 항CD34 단클론항체의 CD34 항원에 대한 친화도 및 여러 분화성숙단계에 있는 조혈간세포의 CD34 항원결정기(epitope)의 분포와 분리된 세포를 흡착기질

에서 떼어 내는 과정의 효율성 등에 의해 좌우된다²²⁾. Immunomagnetic bead method에는 사용되는 bead의 직경이 4.5μm에서 60nm까지 다양하며⁸⁾, 본 연구에서는 직경 60nm의 microbead를 사용하였다. Immunomagnetic bead method의 원리는 골수단핵세포와 항 CD34 단클론항체가 결합된 paramagnetic bead를 섞어 CD34+ 세포와 국좌(rosette)를 형성시키고, 이에 자장을 이용하여 bead와 국좌가 형성된 CD34+ 세포를 분리하는 방법으로²²⁾, 직접 항체법과 2차 항체를 사용하는 간접 항체법이 있으며¹⁹⁾, 효율을 높이기 위해서는 목적세포와 bead간의 원활한 국좌 형성이 가장 중요하여, 국좌를 형성시키는 과정에서는 4°C에서 gentle tilt rotator로 계속적으로 혼합하여 목적세포가 단일세포부유층을 유지할 수 있도록 하고 국좌형성을 저해하는 세포응집괴를 방지해야 하며, 또한 비특이적인 국좌형성을 방지하기 위해 DNase 처리가 필요한 등 모든 과정 중에서 목적세포와 bead간의 결합과정이 세포분리의 효율에 결정적인 영향을 미친다고 하겠다^{19,22)}. 또한 분리후 chymopapain과 같은 효소나^{23,24)} 다클론 항체를 사용하여^{25~27)}, 목적세포에서 bead를 다시 제거하여야 하는데, 이는 분리후의 불필요한 국좌형성을 방지하기 위함이며, 이 과정에서 chymopapain을 사용할 경우 여러 세포표면항원에 손상을 줄 수 있는 단점이 있으며^{19,22)}, 다클론 항체를 사용하면 bead의 불충분한 방출 등의 문제점이 지적되고 있다¹⁹⁾. 따라서 일반적인 immunomagnetic bead method의 단점은 분리과정이 여러 단계를 거치는 등 복잡하고 이로 인해 목적세포의 유실의 가능성이 많아 숙련된 시술자를 필요로 하며, 분리후 bead의 완전한 제거가 어려운 점 등이다¹⁹⁾. Immunomagnetic bead method의 세포분리 효율은 일반적으로 목적세포 순수도 80~95%, 재생률 약 60%로 알려져 있으며^{11,26)}, 분리후 목적세포군에 포함된 CD34- 세포는 대부분 성숙 B세포(CD34- CD19+CD37+)로 알려져 있어 CD37에 대한 bead를 이용, 이를 제거하여 98% 이상의 CD34+ 세포 순수도를 얻을수 있는 방법이 제시되기도 하였다²²⁾. 또한 bead와 세포비율을 기존의 방법보다 높일수록 목적세포의 재생률을 높일 수 있다는 의

견도 제시된 바 있다²⁸⁾.

대부분의 CD34+ 세포 분리방법은 목적하는 세포의 거시적인 면역특이 표면으로의 부착에 기초를 두고 있는, 즉 목적세포의 부착을 위해 비교적 큰 표면을 사용하는 방법들이다²⁹⁾. 면역친화력을 이용한 방법에서 큰 표면을 이용할수록 세포화산이 원활치 못하여 비특이적 부착이 빈번하고 또한 일단 부착되면 다가성 부착으로 인한 세포로부터의 방출이 어려운 점 등의 문제점이 지적되고 있다²⁹⁾. 특히 CD34+ 세포군과 같이 분리전 세포군의 5% 미만의 적은 순수도의 세포군의 분리에 있어서 비특이적 결합을 감소시키는 것이 중요하다고 하겠다²⁹⁾. Magnetic cell sorting(MACS) system은 기존의 magnetic bead보다 현저히 작은 직경 60nm 가량의 superparamagnetic microbead를 이용하여 비특이적 결합을 감소시키고 목적세포에의 신속한 결합을 도모하였다³⁰⁾. 기존의 bead를 이용한 분리방법에서는 세포분리 후 새로운 국좌의 형성을 막기 위해서 bead를 목적세포로부터 완전히 방출시키는 것이 분리과정에서 중요한 단계의 하나이지만, 이경우 세포분리 후 bead의 방출을 위한 과정이 필요 없으며, 따라서 분리시간을 더욱 단축시킴과 더불어 분리과정이 단축됨으로 인해 목적세포의 유실을 최소화 할 수 있는 점 등의 장점이 있다²⁹⁾. 또한 microbead의 크기가 광학적 방법으로 탐지할 수 없는 크기이므로 세포분리후의 유식세포분석기를 이용한 분리후 CD34+ 세포의 측정에 미치는 영향도 배제할 수 있다²⁹⁾. 부착된 microbead가 세포의 기능에 미치는 영향은 없으며³¹⁾, 또한 분리된 세포를 1일간 배양하면 자연방출되는 것으로 알려져 있다²⁹⁾. MACS system으로 CD34+ 세포분리한 성적들을 보면 정상골수 및 말초혈액단핵구를 대상으로 CD34+ 세포를 분리하여 각각 95~99%와 80%의 순수도를 보였으나²⁹⁾, 20례의 정상 말초혈액단핵구를 대상으로 분리한 보고는 $54.5 \pm 12.3\%$ 의 순수도와 39.0~72.0%의 재생률을 보여³¹⁾, 실험실마다의 차이를 보여 주고 있다. 본 연구에서는 이 분리방법을 이용하여 정상인의 골수에서 $73 \pm 12.4\%$, 급성 골수성 백혈병에서 $82.9 \pm 6.3\%$ 의 CD34+ 세포 순수도를 얻었으며, 기존의 immuno-

magnetic bead method와 마찬가지로 MACS system 역시 목적세포와 bead간의 결합단계가 분리효율에 가장 중요한 요소로, 분리전 세포준비과정에서 세포 응집괴를 제거하기 위해 단핵세포를 30~50 μm 크기의 나일론 망사를 통과시킬 것이 권장되었으나²⁹⁾, 본 연구에서는 분리후의 재생률을 고려하여 사용하지 않았던 것이 세포분리 후의 세포빈도에 영향을 미친 요인으로 생각된다. 반면에 재생률에 있어서 59.1 \pm 11.7%로 avidin-biotin column의 19.6 \pm 8.8%에 비해 유의하게 높은 결과를 얻을 수 있어, 역시 나일론 망사를 사용하지 않은 영향을 배제할 수 없을 것으로 생각된다. CD34+ 세포 분리의 목적에 있어서 골수이식 등의 임상적용 목적인 경우에는 세포 분리 후의 재생률이, 연구목적인 경우에는 분리후의 목적세포의 순수도가 중요하다고 하겠으며³⁰⁾, 따라서 분리목적에 따라 분리방법의 효율성이 다르게 평가될 수 있어, 목적에 따라 분리과정을 일부 수정하여 원하는 효율을 얻을 수 있겠다.

Immunoabsorption column method는 연구분야 뿐만 아니라 실제 임상 골수이식에도 도입되고 있는 세포 분리체계로^{18,32~35)}, 이의 원리는 biotin 결합 항 CD34 단클론 항체를 CD34+ 세포와 결합시킨 후 avidin column을 통과시켜 avidin과 biotin의 강력한 친화력을 이용하여 목적세포를 분리해 내는 방법이며 세포가 column을 통해 연속적으로 유출되므로 비특이적 결합을 극소화 할 수 있다¹⁵⁾. 분리된 목적 세포를 column에서 방출해 내는 방법으로써 column 을 길이방향으로 강력하게 짜주는 물리적 방법을 사용하며, 이 과정에서 세포에 주는 손상은 거의 없다고 한다^{15,33)}. 분리과정에서 중요한 것은 세포의 column통과 과정으로 CD34+ 세포가 avidin에 흡착됨과 동시에 CD34- 세포가 충분히 유출될 수 있도록 통과속도를 조절해 주어야 한다¹⁹⁾. 본 연구에서는 단순히 중력에 의존하지 않고 분당 1mL의 세포가 유입되도록 유입속도를 조절하였다. 전 과정에 소요되는 시간은 2시간 내외로 시술과정이 bead에 비해서 간단한 것이 장점이나 비용면에서 bead에 비해 비싼 단점도 있다¹⁹⁾. Immunoabsorption column method의 CD34+ 세포분리 성적들을 보면 정상을

수 9례를 대상으로 분리하여 83%의 CD34+ 세포순수도와 32%의 재생률을 보였으며¹⁵⁾, 임상 적용례에서는 66.9-72.1%의 CD34+ 세포순수도와 32~42%의 재생률을 보였다^{14,18)}. 본 연구에서는 동일 방법으로 CD34+ 세포순수도에서 70.3 \pm 8.9%로 기존의 보고와 비슷한 결과를 볼 수 있었으나, 재생률에 있어서는 15.8 \pm 5.3%로 비교적 저조하였으며, 세포의 column통과 과정에서 세포의 유실이 가장 많았을 것으로 생각되어 분리과정에 있어서 이에 대한 고려가 요구된다. 가동화된 말초혈액을 이용하여 immunomagnetic bead method와 immunoabsorption column method의 효율을 비교한 보고에 의하면 분리후 목적 세포빈도에서 immunomagnetic bead method는 57.5 \pm 14%, avidin-biotin column method 66.1 \pm 11.1%로 유의한 차이가 없었으며, 각 표본간의 세포순수도의 변이도는 bead method에서 큰 것으로 나타났다²⁸⁾. 세포 재생률은 bead와 column에서 각각 15 \pm 5%와 18 \pm 9%로 초기보고의 60% 재생률에 비해 저조하였으며, CD34- 세포군에서 CD34+ 세포가 각각 39 \pm 9.6%, 31 \pm 9.9%의 높은 순수도로 나타나 분리과정에서 목적세포의 많은 유실을 볼 수 있었다²⁸⁾. 초기의 분리성적 보고와 비교적 객관화된 분리성적을 비교한 보고에서 차이가 있는 점 등으로 보아 두가지 방법의 분리성적이 모두 각각의 연구실마다 현저한 차이가 있을 수 있음을 시사하며, 특히 bead법의 경우 복잡한 과정 및 숙련된 시술자를 요하는 점 등으로 각 표본마다의 변이가 더욱 현저할 수 있을 것으로 생각된다^{19,28)}.

본 연구에서는 정상인 골수단핵세포에서 분리후 CD 34+ 세포순수도가 immunomagnetic bead method에서 73.4 \pm 12.4%로 avidin-biotin column method의 55.6 \pm 10.2%에 비해 높은 경향을 보였으나, 급성 골수성 백혈병 환자의 골수세포에서는 immunomagnetic bead method 82.9 \pm 6.3%, avidin-biotin column method 89.9 \pm 3.9%로 비슷하였으며, 이는 avidin-biotin column method에서 사용된 항 CD34 단클론항체(IgM CD34- antibody, clone 12.8)가 bead method의 항 CD34 단클론항체(HPCA-1)에 비해 비교적 친화도가 낮은 때문으로 생각된다²³⁾.

백혈병세포의 경우 일반적으로 CD34 항원 표현도가 각 세포마다 비교적 균일하고 항원 표현도도 높은 것으로 알려져 있으므로 항체의 낮은 친화도를 극복할 수 있었을 것으로 생각된다. 전체 예의 CD34+ 세포 분리후 재생률은 immunomagnetic bead method $47.2 \pm 7.4\%$, avidin-biotin column method $15.8 \pm 5.3\%$ 로 immunomagnetic bead method에서 유의하게 높았으며, 이는 immunomagnetic bead method에서 분리전에 세포응집과 제거과정을 배제하여 재생률을 높일 수 있었던 반면, avidin-biotin column method에서는 column내의 avidin에 흡착된 CD34+ 세포가 충분히 배출되지 못한 때문으로 생각된다. 또한 두가지 방법 모두에서 비특이적 결합을 배제하기 위한 부착단구제거과정에서의 CD 34+ 세포 유실도 재생률을 낮추는 요인으로 작용했을 것으로 보인다.

본 연구의 결과를 토대로 평가한다면 MACS system은 목적세포의 유실이 적으면서 높은 CD34+ 세포의 순수도를 얻을 수 있는 효과적인 세포분리법으로 생각되며, 따라서 높은 CD34+ 세포의 순수도를 요구하는 조혈간세포의 성상연구 및 유전자전달 등 연구목적을 위한 세포분리 뿐 아니라 높은 재생률이 요구되는 임상 골수이식에서도 적용이 가능할 것으로 생각되나, bead의 방출 및 대규모 세포분리체계의 도입 등 개선할 문제가 있는 것으로 보인다^[19,29].

요 약

연구배경: CD34 세포표면항원은 조혈간세포에 선택적으로 표현되고, CD34+ 세포는 클론형성 조혈간세포의 특성을 갖는 세포로 추론되고 있으며, 임상 골수이식측면 뿐 만 아니라 조혈간세포의 성상에 대한 기초연구 및 유전자치료의 유전자 매개체로서 가장 이상적인 세포군으로 알려져 있다.

방법: 정상인 9례의 골수 및 급성 골수성 백혈병 환자 13례의 초진시 골수를 이용하여 immunomagnetic bead와 avidin-biotin column의 두가지 방법으로 CD34+ 세포를 분리하였다.

결과:

1) Immunomagnetic bead를 이용하여 정상인 5례의 골수와 급성 골수성 백혈병 10례의 초진시 골수를 대상으로 CD34+ 세포를 분리하였는데 정상인과 급성 골수성 백혈병 환자의 골수에서 CD34+ 세포 순수도는 각각 $73.4 \pm 12.4\%$, $82.9 \pm 6.3\%$ 로 차이가 없었으며, 분리후 세포 순수도의 증가 배율은 각각 41.9 ± 12.5 배, 10.3 ± 7.5 배로 분리전의 CD34+ 세포 순수도가 낮았던 정상인 골수에서 높았고($P < 0.05$), 재생률은 각각 $59.1 \pm 11.8\%$, $41.2 \pm 9.3\%$ 로 차이가 없었다.

2) Immunomagnetic bead로 CD34+ 세포분리 후 전 15례의 CD34+ 세포의 순수도는 $79.8 \pm 5.7\%$ 이었고, 분리 후의 증가 배율은 20.0 ± 7.4 배 이었으며, 재생률은 $47.2 \pm 7.4\%$ 이었다.

3) Avidin-biotin column을 이용하여 정상인 4례의 골수와 급성 골수성 백혈병 3례의 초진시 골수를 대상으로 CD34+ 세포를 분리하였는데, 정상인과 급성 골수성 백혈병 환자의 골수에서 CD34+ 세포 순수도는 각각 $55.6 \pm 10.2\%$, $89.3 \pm 3.9\%$ 로 백혈병 환자의 골수에서 높은 경향을 보였으며, 분리후 세포 순수도의 증가 배율은 각각 64.2 ± 28.9 배, 3.0 ± 1.4 배로 분리전의 CD34+ 세포 순수도가 낮았던 정상인 골수에서 높은 경향을 보였고, 재생률은 각각 $19.6 \pm 8.8\%$, $10.7 \pm 4.0\%$ 로 차이가 없었다.

4) Avidin-biotin column으로 CD34+ 세포분리후 전 7례의 분리후 CD34+ 세포의 순수도는 $70.3 \pm 8.9\%$ 이었고, 분리후의 증가 배율은 38.0 ± 19.8 배이었으며, 재생률은 $15.8 \pm 5.3\%$ 이었다.

5) Immunomagnetic bead와 avidin-biotin column의 CD34+ 세포분리 결과를 비교하면 정상 골수에서는 분리후 CD34+ 세포의 순수도는 immunomagnetic bead에서 $73.4 \pm 12.4\%$ 로 avidin-biotin column의 $55.6 \pm 10.2\%$ 에 비해 높은 경향을 보였으나 유의한 차이는 없었으며, 재생률은 immunomagnetic bead의 경우 $59.1 \pm 11.8\%$ 로 avidin-biotin column의 $19.6 \pm 8.8\%$ 보다 유의하게 높았다($P=0.05$).

6) 급성 골수성 백혈병 환자 골수의 경우 immuno-

magnetic bead와 avidin-biotin column에서 CD34+ 세포의 순수도 및 분리후 배율, 재생률에서 모두 유의한 차이는 없었으나, 재생률은 immunomagnetic bead의 경우 $41.2 \pm 9.3\%$ 로 avidin-biotin column의 $10.7 \pm 4.0\%$ 보다 높은 경향을 보였다.

7) 전체 표본에서 CD34+ 세포의 분리 후 순수도 및 배율의 증가는 immunomagnetic bead와 avidin-biotin column에서 유의한 차이가 없었으나, 재생률은 immunomagnetic bead와 avidin-biotin column에서 각각 $47.2 \pm 7.4\%$ 와 $15.8 \pm 5.3\%$ 로 immunomagnetic bead에서 유의하게 높았다($P=0.02$).

결론: Immunomagnetic bead 방법은 목적세포의 유실이 적으면서 높은 CD34+ 세포의 순수도를 얻을 수 있는 효과적인 세포분리법으로 생각되며, 추후 임상적용 여부에 대한 연구검토가 필요하겠다.

참 고 문 헌

- 1) Civin CI, Strauss LC, Brovall C, Fackler MJ, Schwartz JF, Shaper JH: *Antigenic analysis of hematopoiesis. III. A hematopoietic progenitor cell surface antigen defined by a monoclonal antibody raised against KG-1a cells.* *J Immunol* 133: 157-165, 1984
- 2) Katz FE, Tindle R, Sutherland DR, Greaves MF: *Identification of a membrane glycoprotein associated with hematopoietic progenitor cells.* *Leuk Res* 9:191-198, 1985
- 3) Tindle RW, Nichols RAB, Chan L, Campana D, Catovsky D, Birnie GD: *A novel monoclonal antibody BI-3C5 recognizes myeloblasts and non-B non T lymphoblasts in acute leukemias and CGL blast crisis, and reacts with immature cells in normal bone marrow.* *Leuk Res* 9:1-9, 1985
- 4) Andrews RG, Singer JW, Bernstein ID: *Monoclonal antibody 12.8 recognizes a 115 kD molecule present on both unipotent and multipotent hematopoietic colony-forming cells and their precursors.* *Blood* 67:842-845, 1986
- 5) Watt SM, Karhi K, Gatter K, Furley AJW, Katz FE, Healy LE, Atlass LJ, Bradley NJ, Sutherland DR, Levinsky R, Greaves MF: *Distribution and epitope analysis of the cell membrane glycoprotein(HPCA-1) associated with human hemopoietic progenitor cells.* *Leukemia* 1:417-423, 1987
- 6) Simmons DL, Satterthwaite AB, Tenen DG, Seed B: *Molecular cloning of a cDNA encoding CD#4, a sialomucin of human hematopoietic stem cells.* *J Immunol* 148:267-274, 1992
- 7) Civin CI: *Purified progenitor/stem cells: Background, feasibility, and prospects for clinical transplantation.* *Int J Cell Cloning* 10:16-19, 1992
- 8) Wunder E, Wynter E: *Basics of CD34+ cell purification, evaluation and use of the separated products.* In Wunder E, Sovalat H, Henon PR, Serk S, eds. *Hematopoietic stem cells.* Dayton, Alpha Med Press, 1994, pp125-131
- 9) Berenson RJ, Andrews RG, Bensinger WI, Kalamasz DF, Knitter G, Buckner D, Bernstein ID: *Antigen CD34+ marrow cells engraft lethally irradiated baboons.* *J Clin Invest* 81:951-960, 1988
- 10) Marsh JC, Sutherland DR, Davidson J, Mellors A, Keating A: *Retention of progenitor cell function in CD34+ cells purified using a novel O-sialoglycoprotease.* *Leukemia* 6:926-934, 1992
- 11) Smeland EB, Funderud S, Kvalheim G, Gaudernak G, Rasmussen AM, Rusten L, Wang MY, Tindle RW, Blomhoff HK, Egeland T: *Isolation and characterization of human hematopoietic progenitor cells: an effective method for positive selection of CD34+ cells.* *Leukemia* 6:845-852, 1992B
- 12) Henon HR: *Peripheral blood stem cell transplants: Past, present and future.* *Stem Cells* 11:154-172, 1993
- 13) Beschorrer WE, Civin CI, Strauss LC: *Localization of hematopoietic progenitor cells in tissue with the anti-MY-10 monoclonal antibody.* *Am J Pathol* 119:1-4, 1985

- 14) Berenson RJ, Bensinger WI, Hill RS, Andrews RG, Garcia-Lopez J, Kalamasz DF, Still BJ, Spitzer G, Buckner CD, Bernstein ID, Thomas ED: *Engraftment after infusion of CD34+ marrow cells in patients with breast cancer or neuroblastoma.* *Blood* 77:1717-1722, 1991
- 15) Heimfeld S, Berenson RJ: *Clinical transplantation of CD34+ hematopoietic progenitor cells: Positive selection using a closed, automated avidin-biotin immunoabsorption system.* In Wunder E, Sovalat H, Henon PR, Serk S, eds. *Hematopoietic stem cells.* Dayton, Alpha Med Press, 1994, pp231-239
- 16) Lebkowski JS, Schain LR, Okrongo D, Levinsky R, Harvey MJ, Okarma TB: *Rapid isolation of human CD34 hematopoietic stem cells-purging of human tumor cells.* *Transplantation* 53:1011-1019, 1992
- 17) Bensinger WI, Berenson RJ, Andrews RG, Buckner CD, Spitzer G, Garcia-Lopez J, Bernstein ID, Hansen JA: *Engraftment after infusion of CD34+ enriched marrow cells.* *Int J Cell Cloning* 10: 176-178, 1992
- 18) Shpall EJ, Jones RB, Bearman SI, Franklin WA, Archer PG, Curiel T, Bitter M, Claman H, Stemmer SM, Purdy M, Myers SE, Hami L, Taffs S, Heimfeld S, Hallogan J, Berenson RJ: *Transplantation of enriched CD34-positive autologous marrow into breast cancer patients following high-dose chemotherapy: Influence of CD34-positive peripheral blood progenitors and growth factors on engraftment.* *J Clin Oncol* 12:28-36, 1994
- 19) Wynter E, Countinho LH, Testa NG: *Common problems encountered in the separation of CD34+ cells using different purification systems.* In Wunder E, Sovalat H, Henon PR, Serk S, eds. *Hematopoietic stem cells.* Dayton, Alpha Med Press, 1994, pp281-288
- 20) Cairo M, Law P, van de Ven C, Plunkett JM, Williams D, Ishizawa L, Gee A: *The in vitro effects of stem cell factor and PIXY321 on myeloid progenitor formation(CFU-GM) from immunomagnetic separated CD34+ cord blood.* *Pediatr Res* 32:277-281, 1992
- 21) Saeland S, Caux C, Favre C, Aubry JP, Mannoni P, Pebusque MJ, Gentilhomme O, Otsuka T, Yokota T, Arai N, Arai K, Banchereau J, de Vries JE: *Effects of recombinant human interleukin-3 on CD34-enriched normal hematopoietic progenitors and on myeloblastic leukemia cells.* *Blood* 72: 1580-1588, 1988
- 22) Egeland T, Gaudernack G: *Immunomagnetic isolation of CD34+ cells: Methodology and monoclonal antibodies.* In Wunder E, Sovalat H, Henon PR, Serk S, eds. *Hematopoietic stem cells.* Dayton, Alpha Med Press, 1994, pp141-148
- 23) Civin CI, Strauss LC, Fackler MJ, Trischmann TM, Wiley JM, Loken MR: *Positive stem cell selection-basic science.* *Progr Clin Biol Res* 333: 387-410, 1990
- 24) Strauss LC, Trischmann TM, Rowley SD, Wiley JM, Civin CI: *Selection of normal human hematopoietic stem cells for bone marrow transplantation using immunomagnetic microspheres and CD34 antibody.* *Am J Pediat Hematol Oncol* 13:217-221, 1991
- 25) Smeland EB, Funderud S, Kvalheim G, Egeland T: *Effective isolation of human hematopoietic progenitor cells; a new method for detachment of immunomagnetic beads from positively selected CD34+ cells.* *Int J Cell Cloning* 10(Suppl 1):108-110, 1992
- 26) Egeland T, Tjonnfjord G, Steen R, Gaudernack G, Thorsby E: *Positive selection of bone marrow-derived CD34 positive cells for possible stem cell transplantation.* *Proceed Transpl Soc* 25:1261-1263, 1993
- 27) Herikstad BV, Lien E: *Immunomagnetic separation of hematopoietic progenitor cells using Dynabeads*

- CD34 and Detachabead. In Wunder E, Sovalat H, Henon PR, Serk S, eds. Hematopoietic stem cells. Dayton, Alpha Med Press, 1994, pp149-160*
- 28) Fruehauf S, Haberkorn M, Hoeft R, Zeller WJ, Haas R, Hunstein W: *Isolation of CD34+ cells from leukapheresis products: Evaluation of lymphoma cell purging. In Wunder E, Sovalat H, Henon PR, Serk S, eds. Hematopoietic stem cells. Dayton, Alpha Med Press, 1994, pp247-253*
- 29) Miltenyi S, Guth S, Radbruch A, Pfluger E, Thiel A: *Isolation of CD34+ hematopoietic cells by high-gradient magnetic cell sorting(MACS). In Wunder E, Sovalat H, Henon PR, Serk S, eds. Hematopoietic stem cells. Dayton, Alpha Med Press, 1994, pp201-213*
- 30) Miltenyi S, Muller W, Weichel W, Radbruch A: *High-gradient magnetic cell separation with MACS. Cytometry 11:231-238, 1990*
- 31) Kato K, Radbruch A: *Isolation and characterization of CD34+ hematopoietic stem cells from human peripheral blood by high-gradient magnetic cell sorting. Cytometry 14:384-389, 1993*
- 32) Berenson RJ: *Transplantation of CD34+ hematopoietic precursors: clinical rationale. Transpl Proceed 24:3032-3034, 1992*
- 33) Berenson RJ, Bensinger WI, Kalamasz D, Schuening F, Deeg HJ, Graham T, Storb R: *Engraftment of dogs with Ia-positive marrow cells isolated by avidin-biotin immunoabsorption. Blood 69:1363-1367, 1987*
- 34) Lemoli RM, Gobbi M, Tazzari PL, Grassi G, Dinota A, Gherlinzoni F, Mazza P, Tura S: *Avidin-biotin immunoabsorption for ex vivo bone marrow purging: effect of percentage of target cells and flow rate. Haematologica 73:183-185, 1988*
- 35) Heimfeld S, Fogarty B, McGuire K, Williams S, Berenson RJ: *Peripheral blood stem cell mobilization after stem cell factor of G-CSF treatment: rapid enrichment for stem and progenitor cells using the CEPRATE/immunoaffinity separation system. Transpl Proceed 24:2828-2835, 1992*