

## 급성 백혈병환자에서 말초혈액 조혈모세포 수집을 위한 대용량 백혈구분반술

연세대학교 의과대학 내과학교실, 임상병리학교실\*

민유홍 · 남정연\* · 정소영 · 이석 · 이승태  
이정운\* · 김현옥\* · 권오현\* · 한지숙 · 고윤웅

= Abstract =

### Large-Volume Leukapheresis for Collection of Peripheral Blood Stem Cells in Patients with Acute Leukemia

Yoo Hong Min, M.D., Jung Yun Nahm, M.D.,\* Soh Young Chong, M.D.,  
Seok Lee, M.D., Seung Tae Lee, M.D., Jung Woon Lee, M.D.,\* Hyun Ok Kim, M.D.,\*  
Oh Hun Kwon, M.D.,\* Jee Sook Hahn, M.D. and Yun Woong Ko, M.D.

*Department of Internal Medicine and Clinical Pathology,\* Yonsei University College of Medicine, Seoul, Korea*

**Background:** The use of peripheral blood stem cells(PBSCs), an alternative hematopoietic rescue product to bone marrow, is limited by the low progenitor cell content of peripheral blood. To overcome this limitation, PBSCs mobilization with cytotoxic chemotherapy and/or hematopoietic growth factors is used, but, in general, multiple leukaphereses are still needed to collect an adequate number of PBSCs for transplantation. Thus, to improve the usefulness of PBSCs, a more efficient collection strategy is necessary.

**Methods:** PBSC collections were evaluated in 12 patients with acute leukemia in complete remission who underwent large-volume leukapheresis(LVL) on a Fenwall CS3000 Plus blood cell separator. Granulocyte colony-stimulating factor(G-CSF) was administered subcutaneously(5 $\mu$ g/kg/day) after induction or consolidation chemotherapy. Patients underwent leukaphereses designed to maximize PBSC yield(blood flow rate, 85mL/min).

**Results:** Thirty LVL procedures were done on twelve patients(mean 2.5, range, 1~3). Mean( $\pm$ SD) volume processed was 20.0 $\pm$ 0.4L at a single apheresis. The collection volume was 131.7 $\pm$ 28.6mL that contained 36.1mL of red blood cells. The mean percentage of mononuclear cells(MNCs) was

민유홍: 120-752, 서울특별시 서대문구 신촌동 134, 연세의대 세브란스병원 내과  
Tel: (02)361-5438, Fax: (02)332-0718

97.1±7.4%, and the MNC collection efficiency was 54.9±20.4%. The PBSC product per LVL contained a mean  $3.39 \times 10^8$  MNCs/kg,  $6.82 \times 10^6$  CD34<sup>+</sup> cells/kg, and  $6.08 \times 10^4$  CFU-GMs/kg, respectively. A mean of 2.5 leukaphereses resulted in a mean of  $8.21 \times 10^8$  MNCs/kg,  $12.2 \times 10^6$  CD34<sup>+</sup> cells/kg, and  $14.0 \times 10^4$  CFU-GMs/kg, respectively. The phenotype characterization of collected CD34<sup>+</sup> cells showed that a mean of 94.2% coexpressed HLA-DR, 97.1% coexpressed CD38. The percentage of CD34<sup>+</sup>/CD33<sup>+</sup> and CD34<sup>+</sup>/c-kit<sup>+</sup> cells was 85.6% and 14.2%, respectively. Postapheresis hematocrit and platelets were reduced from preapheresis value by 12.0%, and 53.5%, respectively. No adverse events were related to the leukapheresis.

**Conclusion:** We conclude that large-volume leukapheresis, following chemotherapy plus G-CSF, for patients with acute leukemia was tolerable, and allowed the collection of adequate numbers of PBSC in a few procedures.

**Key Words:** Large-volume leukapheresis, Peripheral blood stem cell, Acute leukemia

## 서 론

악성 혈액질환 및 진행성 고형암 환자에서 고용량 화학요법 혹은 방사선화학요법후 조혈세포원으로 말초혈액 조혈모세포(peripheral blood stem cell; PBSC)를 이식하는 말초혈액 조혈모세포 이식술(peripheral blood stem cell transplantation; PBSCT)이 적극적으로 검토되고 있으며<sup>[1~3]</sup>, 자가골수이식에 비해 많은 수의 수임 조혈전구세포(committed hematopoietic progenitor cell) 이식으로, 과립구 및 혈소판 회복 등 골수 기능 회복이 조기에 유도될 수 있다는 장점이 있다<sup>[4~8]</sup>. 급성 백혈병에 있어서는 자가 골수 이식과 비교하여 유사한 무병생존율을 보이고 있으나<sup>[9]</sup>, 전신마취가 필요없다는 장점이 있고, 골수 기능이 조기에 회복되어 이식에 따른 합병증을 줄일 수 있으며, 추후 PBSCT와 연관하여 유전자치료(gene therapy) 및 입양면역요법(adoptive immunotherapy)이 가능할 것으로 예상되어 급성 백혈병의 중요한 치료방침이 될 수 있을 것으로 생각된다.

PBSC 가동화(mobilization) 시기 및 정도는 항암요법의 종류 및 용량, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor(GM-CSF), granulocyte colony-stimulating factor(G-CSF), interleukin-3(IL-3) 사용 등 가동화 방법에 따라 차이가 있으며, 질병상태 및 개인에

따라서 상이하고<sup>[10~13]</sup>, 가동화 기간이 수일에 불과한 점을 고려할 때<sup>[14]</sup>, 객관적인 가동화 예측지표를 설정하고, 효과적인 백혈구분반술 술기를 확립하여, 최소한의 백혈구분반술로 이식에 충분한 조혈모세포를 수집하여야 한다. 저자 등은 유식세포분석기를 이용한 말초혈액 CD34-양성(CD34<sup>+</sup>) 세포의 정량적 측정이 조혈모세포 가동화를 객관적으로 나타낼 수 있는 지표임을 보고한 바 있다<sup>[15,16]</sup>.

혈류량 20~60mL/min로 8~10L의 혈액을 처리하는 고식적인 백혈구분반술은 PBSCT에 필요한  $6\sim 8 \times 10^8$ /kg 이상의 단핵세포,  $2\sim 5 \times 10^6$ /kg 이상의 CD34<sup>+</sup> 세포를 수집하기 위해서 평균 10회(4~14회)의 분반술이 필요하며<sup>[17~19]</sup>, 많은 '횟수의 백혈구분반술은 환자 및 의료진에 부담을 줄 수 있으며, dimethyl sulfoxide(DMSO)의 주입양이 많아지는 문제가 있어 백혈구분반술의 술기적인 개선이 요구되어 왔었다. 혈류량을 85mL/min 이상으로 증가시켜 일회의 분반술 당 20~30L 이상의 혈액을 처리하는 대용량 백혈구분반술(large-volume leukapheresis; LVL)은 일회당  $2\sim 4 \times 10^8$ /kg 이상의 단핵세포를 수집할 수 있어, 1~3회의 분반술로 PBSCT에 필요한 단핵세포, CD34<sup>+</sup> 세포 및 colony-forming unit granulocyte-macrophage(CFU-GM) 등을 수집할 수 있으며, 높은 수집효율도(collection efficiency) 및 낮은 과립구, 적혈구 오염도로 볼 때 바람직한 백혈구분반

술로 생각되고 있다<sup>20~23)</sup>. 본 연구에서는 화학요법 후 G-CSF를 투여한 12례의 급성 백혈병환자에서 말초혈액 CD34<sup>+</sup> 세포 monitoring을 통해 백혈구분반술 시기를 정하였으며, CS3000 Plus 혈액분반기를 이용한 LVL 방법으로 PBSC를 수집하였으며, 분반술 전후에 걸쳐 특별한 합병증없이 평균 2.5회의 분반술로  $8 \times 10^8/\text{kg}$  이상의 단핵세포,  $5 \times 10^6/\text{kg}$  이상의 CD34<sup>+</sup> 세포를 수집하였기에 보고하는 바이다.

## 대상 및 방법

### 1. 대상

연세의대 세브란스병원 혈액종양내과에 입원하여 관해유도 화학요법으로 완전관해가 유도되었거나, 강화된 공고요법을 시행받은 성인 급성 백혈병 환자 중 Karnofsky 행동지수가 80% 이상이고, 백혈구 분반술에 동의한 12례의 급성 백혈병환자를 대상으로 하였다(Table 1). 관해유도요법은 급성 골수성백혈병(acute myelogenous leukemia; AML)에서는 TAD 병용요법(6-TG 100 mg/m<sup>2</sup>/d PO, for 7 days; cytosine arabinoside 100 mg/m<sup>2</sup>/d IV, for 7 days; daunorubicin

45 mg/m<sup>2</sup>/d IV, for 3 days), 급성 림프구성백혈병(acute lymphoblastic leukemia; ALL)에서는 VPD 병용요법(vincristine 1.4 mg/m<sup>2</sup> IV, day 1, 8, 15, 22; prednisolone 60 mg/m<sup>2</sup>/d PO, for 28 days; daunorubicin 45 mg/m<sup>2</sup> IV, day 1, 8, 15, 22)을 사용하였다. 공고요법으로는 MEC 병용요법(mitoxantrone 10 mg/m<sup>2</sup>/day IV, day 1~3; VP-16 100mg/m<sup>2</sup>/day IV, day 1~4; intermediate-dose cytosine arabinoside 1,000mg/m<sup>2</sup> IV, q 12hrs, day 1~5)을 시행하였다. 관해유도요법을 시행받았던 환자는 화학요법후 M<sub>0</sub> 골수상태가 확인된 다음, 인형 재조합 과립구 집락촉진인자(G-CSF; Filgrastim, Kirin) 5μg/kg을 매일 페하주사하였으며, 공고요법이 시행된 환자에서는 화학요법 종료 72시간후부터 G-CSF를 투여하였다. 말초혈액내 CD34<sup>+</sup> 세포 측정은 화학요법 개시후 14일째부터 매일 말초혈액 2mL를 채취하여 측정하였다. G-CSF는 분반술 시행기간내에 계속 투여하였고, 분반술 종료후 투여종료 하였다.

### 2. 대용량 백혈구분반술

말초혈액내 CD34<sup>+</sup> 세포분율이 전체 백혈구당 1%

Table 1. Patient Characteristics

UPN	Age(year)/Sex	Diagnosis	Status	Chemotherapy	Cytokine
1	35/M	AML(M2)	CR2	ID Ara-C/Ida	G-CSF
2	35/F	AML(M2)	CR1	ID Ara-C/Ida	G-CSF
3	16/M	AML(M3)	CR1	MEC	G-CSF
4	38/F	AML(M3)	CR1	MEC	G-CSF
5	22/F	AML(M4)	CR1	MEC	G-CSF
6	25/M	AML(M4)	CR1	MEC	G-CSF
7	30/M	AML(M4)	CR1	MEC	G-CSF
8	52/M	AML(M2)	CR1	MEC	G-CSF
9	57/M	AML(M4)	CR1	TAD	G-CSF
10	21/M	ALL(L2)	CR2	ID Ara-C/Ida	G-CSF
11	31/M	ALL(L2)	CR3	HD Ara-C/Amsa	G-CSF
12	47/M	ALL(L2)	CR2	ID Ara-C/Ida	G-CSF

CR: complete remission; ID Ara-C: intermediate-dose cytosine arabinoside; Ida: idarubicin; MEC: mitoxantrone, VP-16, and intermediate-dose cytosine arabinoside; TAD: 6-TG, cytosine arabinoside, daunorubicin; HD Ara-C: high-dose cytosine arabinoside; Amsa: amsacrine

이상, 혹은 CD34<sup>+</sup> 세포수가 3,000/mL 이상으로 처음 관찰된 날로부터 PBSC 수집을 위한 백혈구분반술을 매일 1회 시행하였으며, 처음 2일간은 매일 시행하고, 추가적인 백혈구분반술이 필요한 경우에는 1일간의 휴식일을 둔 다음 분반술을 시행하였다. CD34<sup>+</sup> 세포의 가동화가 관찰되지 않았으나, 백혈구 수가 nadir에서  $2 \times 10^9/L$  이상으로 급격히 증가하는 동시에, 혈소판이  $50 \times 10^9/L$  이상 증가하고, 미숙 과립구가 관찰되었던 일부의 경우에도 백혈구분반술을 시행하였다. 첫번째 분반술 시행 전일 double lumen apheresis catheter(Mahurkar Catheter, Quinton Instrument Company, Seattle)를 삽입하였다. 백혈구분반술은 CS3000 Plus blood cell separator(Baxter, HealthCare Co. Deerfield, IL)를 이용한 mononuclear cell program으로 시행하였으며, 초기 5분 이내에는 혈류량 60mL/min부터 시작하여 점차적으로 증량하였으며, 분반술 시작 5분후부터는 85mL/min 혈류량으로 유지하였다. 매회 분반술은 전혈처리량이 20L가 되도록 시행하였다. Granulocyte separation chamber와 A35 collection chamber를 사용하였으며, ACD-A 대전혈의 비율은 1:11~13이 되게 하였으며, 원심분리 속도는 1,600rpm으로 하였고, interface offset detector는 150에 설정하였다. 최종적으로 말초혈액 단핵세포수가 총  $8 \times 10^8/kg$  이상 혹은 CD34<sup>+</sup> 세포수가 총  $5.0 \times 10^6/kg$  이상 수집시 백혈구분반술을 종료하였다. 수집된 단핵세포를 대상으로 단핵세포수, CFU-GM치, CD34<sup>+</sup> 세포수 및 CD34<sup>+</sup> 세포 아형분석을 시행하였으며, 분반술 전후에 걸쳐 말초혈액 백혈구, 단핵구, 혈소판 및 CD34<sup>+</sup> 세포수를 측정하였다.

### 3. 유식세포분석기를 이용한 CD34<sup>+</sup> 세포 측정

말초혈액 및 수집된 단핵세포내 CD34<sup>+</sup> 세포 및 CD34<sup>+</sup> 세포아형은 유식세포분석기를 이용한 직접 면역형광법으로 측정하였다<sup>[16,24,25]</sup>. 약술하면 적혈구 용해액으로 처리한 말초혈액 백혈구 및 수집된 단핵세포를 0.1% azide가 첨가된 IMDM 배양액 50μL에 부유시킨 다음, 희석된 anti-HPCA-2(CD34)-FITC (Becton Dickinson, Mountain view, CA) 20μL를 첨가

하였으며, CD34<sup>+</sup> 세포 아형분석을 위해서 anti-CD33-PE(Becton Dickinson), anti-HLA-DR-PE(Becton Dickinson), anti-c-kit-PE(Serotec), anti-CD38-PE(Becton Dickinson) 20μL를 첨가하여 조심스럽게 섞은 후 4°C 암실에서 30분간 배양하였다. 배양후 0.1% sodium azide/PBS로 2회 세척하고, 이어 488nm, 0.3W로 조정된 argon-ion laser가 장착된 FACStar Plus (Becton Dickinson)를 이용한 유식세포분석을 시행하였다, green fluorescence(FITC)는 550nm, red fluorescence (PE)는 585nm에서 수집하였다. CD34<sup>+</sup> 세포수는 fluorescence channel(CD34-FITC; Becton Dickinson)과 side scatter channel에서 규정되는 "CD34 gate" 내에 있는 세포수를 측정하여 산정하였으며, "CD34 gate" 내에 있는 세포들을 대상으로 dual-color method를 이용한 CD34<sup>+</sup> 세포의 HLA-DR, CD33, CD38 및 c-kit 항원의 표현정도를 분석하였다. FACStar Plus Lysis II research software를 이용한 Consort 30 Data Management Program list mode에서 최소한 20,000개의 events를 분석하였다.

### 4. 조혈전구 세포 배양

배양방법은 반고형 한천배지배양법(agar culture technique)을 이용하였으며, 집락촉진인자로는 포화농도(5 ng/mL)의 인형 GM-CSF(LBD005; Lucky Biotech, Korea)를 사용하였다. 35mm 배양접시(Nunc, Denmark)에 15% fetal bovine serum(Gibco, USA), penicillin 100U/mL, streptomycin 100μg/mL(Gibco, USA)이 포함된 McCoy 배양액(Gibco, USA)과 최종농도 0.3% Bacto agar(Difco, USA)를 분주하였으며, 단핵세포수는 최종 농도가  $2 \times 10^5/mL$  되게 조절하였다. 배양은 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, 완전습윤된 조건하의 배양기내에서 시행하여 배양 14일째 세포집락수를 산정하였다. 역위현미경으로 관찰시 세포집락은 40개 이상의 세포모임으로 정의하였으며, 모든 실험은 삼중복하여, 그 평균으로 성적을 취하였다.

### 5. 조혈모세포 초기온 냉동

백혈구분반술로 수집된 말초혈액 단핵세포는 controlled rate programmed freezing 방법을 이용하여 초

저온 냉동시켰다<sup>26)</sup>. 냉동은 Cryoson사의 BV-24/TRA-14 system(Cryoson GmbH, Germany)를 이용한 computerized monitoring을 통하여 -100°C까지 시행하였으며, 냉동된 단핵세포는 liquid nitrogen refrigerator(Cryoson, GmbH, Germany) gas phase에 냉동보관하였다. 냉동백은 Gambio Hemofreeze bag(DF700)을 사용하였으며, 최종 DMSO 용액의 농도는 10%가 되도록 하였다.

## 6. 통계 처리

결과는 mean±SD로 표시하였으며, 통계처리는 Mann-Whitney test를 사용하였다.

## 결 과

### 1. 대상 및 백혈구분반술

12례에서 총 30회의 백혈구분반술이 시행되어 환자 당 2.5회(1~3회)의 분반술이 시행되었다(Table 1, 2). 첫번째 분반술시의 말초혈액 백혈구수는  $1.68 \pm 1.47 \times 10^9/L$  였으며, 혈소판치는  $45 \pm 34 \times 10^9/L$  였다. 일회의 분반술당 평균  $20.0 \pm 0.4L$ 의 혈액량을 처리하였으며, ACD-A 용액은 1,500mL가 사용되었다. 분반술은 일회당 평균 4시간 10분이 소요되었으며, 초기 5분을 제외하고는 분반술 전반에 걸쳐 혈액량

$85mL/min$ 을 유지하였다. A35 collection chamber에 수집된 단핵세포의 용량은  $131.7 \pm 28.6mL$ (91.4~190.5mL)로, 단핵세포분율은  $97.1 \pm 7.4\%$ , CD34<sup>+</sup> 세포분율은  $2.1 \pm 3.6\%$ (0.70~3.78%)였다(Table 2). 일회의 분반술 당 총  $2.05 \pm 0.97 \times 10^{10}$ 개의 단핵세포가 수집되어, 일회 분반술당  $3.39 \pm 1.64 \times 10^8/kg$ 의 단핵세포,  $6.82 \pm 1.08 \times 10^6/kg$ 의 CD34<sup>+</sup> 세포,  $6.08 \pm 7.3 \times 10^4/kg$ 의 CFU-GM이 수집되었다. 단핵세포의 수집률은  $54.9 \pm 20.4\%$ (14.6~86.7%)였다. 일회 분반술로 수집된 산물내 해마토크리트는  $28.65 \pm 8.94\%$  (12.0~46.1%), 적혈구 용적은 평균  $36.1 \pm 9.5mL$ (20.9~60.6mL)로 1L의 혈액량 처리시 평균 1.8mL의 적혈구가 수집되었다. 혈소판은 매회 산물 당 평균  $2.4 \pm 2.2 \times 10^{11}$ 이 포함되었다(Table 2). 백혈구분반술로 수집된 총 단핵세포수는 환자 당  $8.21 \pm 3.16 \times 10^8/kg$  이었으며, CD34<sup>+</sup> 세포는 총  $12.2 \pm 9.8 \times 10^6/kg$ 개 이상이, CFU-GM은 총  $14.0 \pm 15.1 \times 10^4/kg$  이상이 수집되었다(Table 3). 수집된 단핵세포내 CD34<sup>+</sup> 세포분율은  $2.1 \pm 3.6\%$ 로, CD34<sup>+</sup> 세포 중 CD34<sup>+</sup>/HLA-DR<sup>+</sup> 세포분율은  $94.2 \pm 6.1\%$ , CD34<sup>+</sup>/CD33<sup>+</sup> 세포는  $85.6 \pm 12.4\%$ , CD34<sup>+</sup>/CD38<sup>+</sup> 세포는  $97.1 \pm 5.2\%$ , CD34<sup>+</sup>/c-kit<sup>+</sup> 세포는  $14.2 \pm 17.5\%$ 였다(Table 4). 환자당 백혈구분반술 날짜에 따른 CD34<sup>+</sup> 세포 아형 분율의 유의한 변화는 관찰되지

Table 2. Volumes, Efficiencies and Cell Content of Large-Volume Leukapheresis(LVL) (n=30)

	Mean ± SD
No. of LVL/patient	$2.5 \pm 0.7(1-3)$
Collection volume(mL)	$131.7 \pm 28.6$
MNC(%)	$97.1 \pm 7.4$
MNCs/LVL( $\times 10^8/kg$ )	$3.39 \pm 1.64$
CFU-GMs/LVL( $\times 10^4/kg$ )	$6.08 \pm 7.31$
CD34 <sup>+</sup> cells(%)	$2.1 \pm 3.6$
CD34 <sup>+</sup> cells/LVL( $\times 10^6/kg$ )	$6.82 \pm 1.08$
RBC/LVL(mL)	$36.1 \pm 9.5$
Platelets/LVL( $\times 10^{11}$ )	$2.4 \pm 2.2$
MNC efficiency(%)	$54.9 \pm 20.4$

Table 3. Large-Volume Leukapheresis Yields

	Mean ± SD
Total MNCs( $\times 10^8/kg$ )	$8.21 \pm 3.16$
Total CFU-GMs( $\times 10^4/kg$ )	$14.0 \pm 15.1$
Total CD34 <sup>+</sup> cells( $\times 10^6/kg$ )	$12.2 \pm 9.8$

Table 4. Immunophenotyping of Harvested CD34<sup>+</sup> Cells

Immunophenotype	% of Collected CD34 <sup>+</sup> Cells
CD34 <sup>+</sup> HLA-DR <sup>+</sup>	$94.2 \pm 6.1(80.8 \sim 99.4)$
CD34 <sup>+</sup> CD38 <sup>+</sup>	$97.1 \pm 5.2(80.0 \sim 99.8)$
CD34 <sup>+</sup> CD33 <sup>+</sup>	$85.6 \pm 12.4(66.3 \sim 98.6)$
CD34 <sup>+</sup> c-kit <sup>+</sup>	$14.2 \pm 17.5(0 \sim 58.3)$

MNC: mononuclear cells; CFU-GM: colony-forming unit granulocyte-macrophage; RBC:red blood cells

Table 5. Effects of Large-Volume Leukapheresis on Circulating Elements

	Before	After	%Change	P Value
Hematocrit (%)	30.1 ± 3.3	26.4 ± 2.9	12.0	<0.05
Platelets ( $\times 10^9/L$ )	93 ± 77	42 ± 35	53.3	<0.05
MNC ( $\times 10^9/L$ )	2.3 ± 1.6	1.5 ± 0.8	22.7	<0.05
CD34 (%)	2.1 ± 3.5	1.8 ± 2.9	14.2	>0.05

않았다.

## 2. 백혈구분반술에 따른 말초혈액 혈구변화

분반술 직전 말초혈액 헤마토크리트, 혈소판치는 각각  $30.1 \pm 3.3\%$ ,  $93 \pm 77 \times 10^9/L$ 였다. 분반술 직후 헤마토크리트는  $26.4 \pm 2.9\%$ , 혈소판치는  $42 \pm 35 \times 10^9/L$ 로 분반술 전 수치에 비해 각각 12.0%, 53.5% 감소하였다(Table 5). 분반술 직후 말초혈액 단핵세포수는  $1.5 \pm 0.8 \times 10^9/L$ , CD34<sup>+</sup> 세포분율은  $1.8 \pm 2.9\%$ 로, 분반술 직전의  $2.3 \pm 1.6 \times 10^9/L$ ,  $2.1 \pm 3.5\%$ 에 비해 각각 22.7%, 14.2%로 감소하였다. 12례 전례에서 대용량 백혈구분반술시 특별한 합병증은 관찰되지 않았으며, 분반술을 도중에 중지한 경우도 없었다.

## 고 찰

PBSCT에 충분한 PBSC를 수집하기 위해서는 PBSC 가동화를 극대화하고, 환자, 질병상태, 가동화 방법에 따라 상이한 가동화 정도 및 시기를 정확히 판별하여 PBSC를 수집해야하며<sup>10~13)</sup>, PBSC 수집을 위한 백혈구분반술 술기를 효과적으로 개선하여 최소한의 백혈구분반술로 PBSC를 수집해야 한다. 백혈구분반술의 효과를 비교분석하기 위해서 우선적으로 선결되어야 할 문제는 고용량 화학요법 혹은 전신 방사선조사(total body irradiation; TBI) 등이 포함된 골수기세성 방사선화학요법후 PBSCT시 조속하고(rapid), 완전한(complete), 그리고 지속적인(sustained) 조혈기전을 유지하기 위해 필요한 PBSC의 숫자가 얼마나 되는가 하는 점이다. 이식후 생착 및 지속적인 골수기능 유지를 위해 필요충분한 PBSC 수 및 과립구, 혈소판 등의 조기회복을 좌우하는 PBSC 기준치에 대해서는 아직 이론이 있으며, 질병

자체, G-CSF, GM-CSF 사용 등 가동화방법, 전처치로 시행되는 화학요법 혹은 방사선화학요법의 용량 혹은 골수거제 여부에 따라 연구기관마다 서로 다를 수 있다. 미숙 조혈모세포 측정이 아직 어렵기 때문에 일반적으로는 단핵세포수, CFU-GM치, CD34<sup>+</sup> 세포수가 조혈모세포수를 반영하는 지표로 사용되고 있다. 단핵세포수를 기준으로 할 때  $1 \sim 8 \times 10^8/kg$  이상의 단핵세포가 수집이식되어야 하는 것으로 보고되고 있으며<sup>2,14,21,27,28)</sup>, 가동화 방법을 사용하지 않고, static phase에서 수집한 단핵세포는 최소한  $6 \times 10^8/kg$  이상이, 가동화 경우에는  $4 \times 10^8/kg$  이상의 단핵세포가 제시되고 있으나<sup>2,8,14,27)</sup>, 화학요법 및 조혈촉진인자 병용으로 가동화 수집된 경우에는  $1 \times 10^8/kg$  이상의 단핵세포로도 생착에 문제가 없었다는 보고가 있다<sup>23)</sup>. CFU-GM치는 일반적으로  $20 \sim 50 \times 10^4/kg$ <sup>3,8,29)</sup> 이상이 제시되고 있으나, 배양법이 연구기관에 따라 다르고 표준화되지 않아 일관성 있는 수치를 제시하기 어렵다.  $20 \times 10^4$  CFU-GM/kg 이상을 이식받은 환자군에서의 혈소판회복일은 평균 9일로, 그 이하를 이식받은 환자군의 15일에 비해 유의하게 단축되었다는 보고가 있으나<sup>8)</sup>,  $40 \times 10^4$  CFU-GM/kg 이상에서는  $20 \sim 40 \times 10^4$  CFU-GM/kg과 비교하여 유의한 차이가 관찰되지 않았다<sup>8)</sup>. CFU-GM 측정법은 특히 7~14일간의 배양기간이 필요하기 때문에 PBSC 수집을 위한 real time assay로는 문제가 있어, 본 연구에서는 CFU-GM치로 분반술 목표를 정하지 않았으며, 일단 단핵세포 혹은 CD34<sup>+</sup> 세포수를 기준으로 분반술을 종료하고, 수집된 단핵세포주에서의 CFU-GM만을 측정하였다. 본 연구에서는 평균 2.5회의 분반술로  $14.0 \pm 15.1 \times 10^4/kg$  이상의 CFU-GM이 수집되었다.

Long-term culture initiating cell(LTC-IC), CFU-blast

등의 미숙 조혈모세포 및 CFU-GM, burst-forming unit-erythroid(BFU-E) 조혈모세포에 CD34 세포항원이 선택적으로 발현되며, CD34<sup>+</sup> 세포 이식으로 조혈기능이 회복되었던 연구결과<sup>30~32)</sup> 및 CD34<sup>+</sup> 세포 수와 CFU-GM간의 높은 상관관계로 볼 때<sup>2,16,24)</sup>, 분반술로 수집되고, 이식된 CD34<sup>+</sup> 세포수가 PBSC 수집의 효율성 및 이식후 골수기능 회복 예측에 중요한 기준이 될 수 있으며, 이는 다인자 분석방법으로 PBSCT후 생착속도에 관여하는 인자들을 검토한 결과 이식된 CD34<sup>+</sup> 세포수가 유일한 예측인자로 분석되었던 최근의 연구결과가 이를 입증하고 있다<sup>33)</sup>. 특히 유식세포분석기를 이용한 말초혈액내 CD34<sup>+</sup> 세포 측정은 PBSC 가동화를 신속하고 비교적 객관적으로 측정하여 분반술 시기를 정할 수 있는 장점이 있다<sup>15,16,24,25)</sup>. PBSCT에 필요충분한 CD34<sup>+</sup> 세포 수는  $2.5\sim5.0\times10^6/kg$  이상이 제시되고 있으며<sup>2,3,8,34~36)</sup>, 골수거세성 화학방사선요법이 아닌 경우에는  $1\times10^6/kg$ 의 CD34<sup>+</sup> 세포로도 충분한 것으로 보고되었다<sup>36)</sup>.  $5\times10^6 CD34^+/kg$  이상에서는  $2.5\sim5\times10^6 CD34^+/kg$ 과 비교하여 혈소판 및 과립구 회복기간이 더 단축되지는 않았다는 연구결과가 있는 반면<sup>8)</sup>,  $5\times10^6 CD34^+/kg$ 를 이식받은 경우에서 혈구회복 특히 혈소판 회복이 유의하게 단축되었다는 최근의 연구결과도 있다<sup>3)</sup>. 본 연구에서는 백혈구분반술 목표를 추후 모든 환자에서 골수거세성 방사선화학요법이 고려될 것으로 예상하여  $8\times10^8 MNC/Kg$  이상의 단핵세포 혹은  $5\times10^6/kg$  이상의 CD34<sup>+</sup> 세포 수집으로 하였다. 이 정도의 PBSC를 수집하기 위해서는 혈류량 20~60mL/min으로 2~4시간동안 총 8~10L의 혈액을 처리하여 1회의 백혈구분반술로  $4\sim9\times10^9$  개의 단핵세포를 수집할 수 있는 고식적인 백혈구분반술로는 평균 10회(6~17회)의 분반술이 필요하다<sup>17~19)</sup>. 많은 횟수의 백혈구분반술은 환자 및 의료진에 큰 부담이 되며, PBSC 냉동시 사용되는 DMSO의 양이 많아지는 문제가 있기 때문에 분반술 횟수를 줄일 수 있는 백혈구분반술 술기개선이 요구되어 왔다.

백혈구분반술당 수집할 수 있는 PBSC 수는 수집 당시의 환자의 질병상태, 골수 조혈예비능의 크기,

가동화 방법에 대한 반응정도, 약물치료 경력에 따라 달라질 수 있으며, 특히 백혈구분반술시 처리되는 혈액량에 따라 달라질 수 있다. 혈류량을 85mL/min 이상으로 증가시켜 일회의 분반술 당 20~30L 이상의 혈액량을 처리하는 대용량 백혈구분반술은 많은 양의 혈액을 처리함으로써, 정상인 및 악성림프종, 고형암환자에서 일회당  $2\sim4\times10^8/kg$ 개의 단핵세포,  $1\sim2\times10^6/kg$ 개의 CD34<sup>+</sup> 세포를 수집할 수 있어, 단 1~3회의 분반술로 이식에 필요한 PBSC를 수집할 수 있으며, 높은 수집효율도 및 낮은 과립구, 적혈구 오염도를 나타내어 바람직한 백혈구분반술 방법으로 기대되고 있다<sup>20~23)</sup>. 본 연구에서는 화학요법후 골수기능 회복기에 있는 급성 백혈병환자에서도 대용량 백혈구분반술이 환자에 큰 부담없이 최소한의 백혈구분반술로 목표치 이상의 PBSC를 수집할 수 있는지를 검토하고자 하였는 바, CS3000 Plus 분반기를 이용하여 분당 85mL의 혈류량으로 4시간의 분반술을 시행하여, 결과적으로 일회 분반술 당  $3.39\pm1.64\times10^8/kg$ 의 단핵세포,  $6.82\pm1.08\times10^6/kg$ 의 CD34<sup>+</sup> 세포,  $6.08\pm7.3\times10^6/kg$ 의 CFU-GM을 수집하였으며, 환자 당 평균 2.5회 정도의 백혈구분반술이 시행되었다. 단핵세포 수집율은  $54.9\pm20.4\%(14.6\sim86.7\%)$ 로, 일반적으로 보고되고 있는 50~70%의 수집율과 유사하였다<sup>20~23,37)</sup>. 분반술 후 말초혈액내 헤마토크리트, 단핵세포, CD34<sup>+</sup> 세포는 술기전에 비해 각각 평균 12.0%, 22.7%, 14.2 % 감소하였으며, 일반적인 대용량 백혈구분반술 결과와 비교하여<sup>21,22,28,38)</sup> 차이가 없었다. 고식적인 분반술로는 분반술 후 25%의 혈소판 감소, LVL시에는 50% 정도의 혈소판 감소가 보고되고 있으며, 본 연구에서는 53.3%의 혈소판 감소가 있었다. 분반술 전 혈소판 수치가  $20\times10^9/L$  이상시는 혈소판수혈이 필요 없다고 하나, 본 연구에서는 분반술후 측정한 말초혈액내 혈소판이  $20\times10^9/L$  이상을 유지하도록 방침을 정하여, 분반술전 혈소판이  $40\times10^9/L$  이하인 경우에는 분반술전 혈소판수혈을 시행하였고, 혈소판 감소에 따른 특별한 문제점은 없었다. 수집된 산물 내 혈소판 수치는 평균  $2.4\times10^{11}$ 개로 다른 보고와 유사하였다<sup>21,28,38)</sup>. 대용량 백혈구분반술 시행시 수집

산물내 적혈구오염도는 전혈 1L 처리 당  $1.3\text{mL}^{20}$ , 평균 4~10%의 헤마토크리트가 보고되고 있으며<sup>21,38)</sup>, 20L의 혈액을 처리한 본 연구에서는 평균  $131.7 \pm 28.6\text{mL}$ 의 산물에 평균  $36.1 \pm 9.5\text{mL}$ 의 적혈구가 포함되어 다소 적혈구 오염도가 높았으나, small volume collection chamber(SVCC)를 이용한 경우<sup>28)</sup>에 비해서는 적었다. 분반술을 매일 시행하는 것이 바람직한지 혹은 격일제로 시행하는 것이 바람직한지는 아직 확실치 않으나, 혈소판 감소 여부로 결정하기도 한다<sup>12)</sup>. 본 연구에서는 2회까지의 분반술로 목표치의 단핵세포 혹은  $\text{CD34}^+$  세포를 수집하지 못한 경우에는 하루의 휴식을 둔 다음 4일째 분반술을 시행하였다. PBSC 수집외에 대용량 백혈구분반술시 고려되어야 할 사항은 분반술에 따른 합병증 및 안전성이다. 일반적으로 분반술이 시작되는 시기의 환자 상태는 “회복되기 시작”하는 상태로서, 감염 및 출혈의 가능성이 잔존하는 시기로 볼 수 있으며, 특히 골수억제성 고용량 화학요법을 시행받는 급성 백혈병환자에서는 더욱 그러하다. 그러나 본 연구에서 관찰한 바에 의하면 분반술 기간 중 특별한 합병증은 없었으며, double-lumen catheter가 막히는 경우도 관찰되지 않았다.

최소한의 백혈구분반술로 PBSC를 수집하기 위해서는 PBSC 가동화를 증가시키는 방법도 고려되어야 하며, 화학요법 단독보다는 G-CSF, GM-CSF 등의 조혈촉진인자 투여를 병용하는 것이 바람직하다<sup>5,16,39~41)</sup>. PBSC 가동화를 유도하기 위한 최적의 조혈촉진인자 용량을 정하는 것이 쉽지는 않다. G-CSF 등의 용량을 증가시키는 것이 PBSC 수집에 영향이 없다고 한 연구결과가 있는 반면<sup>33)</sup>, G-CSF 용량을 증량시키는 것이 유의하게 단핵세포 및  $\text{CD34}^+$  세포의 가동화 증가 및 백혈구분반술에 의한 수집을 증가시킬 수 있었다는 보고도 있다<sup>42)</sup>. G-CSF 투여로 과립구가 현저히 증가하는 경우에는 분화된 과립구 G-CSF 수용체와 조혈모세포 G-CSF 수용체가 서로 길항할 수 있으므로<sup>43)</sup>, 분반술 직전부터 분반술 기간에 걸쳐 G-CSF의 용량을 증가시키는 것이 고려되어야 한다. 또한 화학요법후 IL-3, GM-CSF 등을 순차적으로 병용하여 미숙 조혈모세포의 가동화를 증가

시키는 방법<sup>44)</sup> 및 미숙 조혈모세포에 선택적으로 작용하며, GM-CSF, IL-3, G-CSF 등의 조혈촉진인자와 병용시 상승효과가 있는 stem cell factor<sup>45,46)</sup>의 사용에 대한 연구검토가 필요하다.

PBSC 냉동시 차후 해동후의 혈소판응고 및 과립구 용해로 인한 세포응괴 증가 및 PBSC 손실을 줄이고, 혈색소 유리에 의한 신손상을 예방하기 위해 수집한 단핵세포를 ficolling 혹은 counter flow centrifugal elutriation 처리하여, 적혈구, 과립구 혹은 혈소판을 적극적으로 제거하는 방법이 사용되기도 하나<sup>12,20)</sup>, 본 연구에서는 수집된 단핵세포주내 단핵세포 분율이 평균 97.1%로 과립구 혼입이 미미하였으며, ficolling시 이식후 혈소판 회복 지연 및 생착실패가 관찰되었다는 보고도 있어, 특별한 처리없이 수집후 즉시 초저온 냉동을 시행하였다. A35 collection chamber 대신 SVCC를 사용시 혈소판 감소를 줄일 수 있으나<sup>28)</sup>, interface offset(I/O)를 150으로 올리더라도 1회 분반술 당  $1 \times 10^8/\text{kg}$ 의 단핵세포만이 수집되는 문제가 있다<sup>28)</sup>. 냉동시 세포농도는 일반적으로  $2 \times 10^7/\text{mL}$  이하가 바람직한 것으로 되었으나<sup>26)</sup>, 일부 기관에서는  $5 \sim 10 \times 10^7/\text{mL}$ 까지 냉동하기도 하며<sup>37)</sup>, 최근의 보고에 의하면  $3.7 \pm 1.9 \times 10^8/\text{mL}$  유핵세포의 농도로 냉동하였을 경우에도 해동후 유핵세포, 단핵세포의 생존도 및 세포회수율에 문제가 없었으며, CFU-GM,  $\text{CD34}^+$  세포의 회수율도 각각 45.3%, 71.5%도 일반적인 회수율과 차이가 없었으며, 이식후 과립구 및 혈소판회복에도 지장이 없음이 관찰되어<sup>47)</sup>, 이 방법이 DMSO 주입량을 줄이는 측면에서 바람직하며, 본 연구에서도  $2 \sim 5 \times 10^8/\text{mL}$  까지는 특별한 처리없이 냉동을 실시하여, 3개월후 표본 세포주 해동시 90% 이상의 생존도를 나타내었다. 결론적으로 화학요법후 G-CSF를 투여한 급성 백혈병환자에서 3회 이하의 대용량 백혈구분반술로 특별한 합병증없이 충분한 PBSC를 수집할 수 있어, 대용량 백혈구분반술이 PBSCT를 위한 효과적인 분반술 방법으로 생각되었다.

## 요 약

**연구배경:** 말초혈액 조혈모세포 이식술에 필요충분한 조혈모세포를 수집하기 위해서는 조혈모세포 가동화를 극대화하고, 환자, 질병상태, 가동화방법에 따라 상이한 가동화 정도 및 시기를 정확히 판별하여 백혈구분반술을 시행해야 하는데 이외에 백혈구분반술 술기를 효과적으로 개선하여 최소한의 백혈구분반술로 조혈모세포를 수집해야 한다.

**방법:** 본 연구에서는 화학요법후 과립구 집락촉진인자(G-CSF, 5 $\mu$ g/kg/day)를 투여한 12례의 급성 백혈병환자를 대상으로, 골수기능 회복시 CS3000 Plus 혈액분반기를 이용한 대용량 백혈구분반술로 말초혈액 조혈모세포를 수집하였다. 백혈구분반술은 혈류량 85mL/min으로 20L의 혈액량을 처리하였으며, 분반술 전후에 걸친 혈구수치 변화를 관찰하였고, 수집한 단핵세포내 CD34<sup>+</sup> 세포, CD34<sup>+</sup> 세포아형 및 CFU-GM을 측정하였다.

**결과:** 12례에서 총 30회의 백혈구분반술이 시행되어 환자 당 평균 2.5회의 분반술이 시행되었다. 수집 산물의 용량은 131.7±28.6mL로, 단핵세포분율은 평균 97.1%, CD34<sup>+</sup> 세포분율은 2.1%였다. 일회의 분반술 당 3.39±1.64×10<sup>8</sup>/kg의 단핵세포, 6.82±1.08×10<sup>6</sup>/kg의 CD34<sup>+</sup> 세포, 6.08±7.3×10<sup>4</sup>/kg의 CFU-GM이 수집되었다. 단핵세포의 수집률은 54.9±20.4%였다. 일회 분반술로 수집된 산물내 적혈구 용적은 평균 36.1mL로 1L의 혈액량 처리시 평균 1.8 mL의 적혈구가 수집되었다. 혈소판은 매회 산물 당 평균 2.4±2.2×10<sup>11</sup>이 포함되었다. 백혈구분반술로 수집된 총 단핵세포수는 환자 당 8.21±3.16×10<sup>8</sup>/kg 이었으며, CD34<sup>+</sup> 세포는 총 12.2±9.8×10<sup>6</sup>/kg개 이상이, CFU-GM은 총 14.0±15.1×10<sup>4</sup>/kg이상이 수집되었다. CD34<sup>+</sup> 세포 중 CD34<sup>+</sup>/HLA-DR<sup>+</sup> 세포분율은 94.2±6.1%, CD34<sup>+</sup>/CD33<sup>+</sup> 세포는 85.6±12.4%, CD34<sup>+</sup>/CD38<sup>+</sup> 세포는 97.1±5.2%, CD34<sup>+</sup>/c-kit<sup>+</sup> 세포는 14.2±17.5%였다. 분반술 직후 해마토크리트는 26.4±2.9%, 혈소판치는 42±35×10<sup>9</sup>/L로 분반술 전 수치에 비해 각각 12%, 53.3% 감소하였다. 12례 전례에서 대용량 백혈구분반술시 특별한

합병증은 관찰되지 않았으며, 분반술을 도중에 중지한 경우도 없었다.

**결론:** 화학요법후 G-CSF를 투여한 급성 백혈병환자에서 대용량 백혈구분반술은 특별한 합병증없이 최소한의 분반술로 PBSCT에 필요충분한 조혈모세포를 수집할 수 있는 효과적인 백혈구분반술로 생각되었다.

## 참 고 문 헌

- 1) Reiffers J, Faberes C, Boiron JM, Marit G, Foures C, Ferrer AM, Cony-Makhoul P, Puntous M, Bernard P, Vezon G, Broustet A: *Peripheral blood progenitor cell transplantation in 118 patients with hematologic malignancies: Analysis of factors affecting the rate of engraftment.* *J Hematother* 3: 185-191, 1994
- 2) Hohaus S, Goldschmidt H, Ehrhardt R, Haas R: *Successful autografting following myeloablative conditioning therapy with blood stem cells mobilized by chemotherapy plus rhG-CSF.* *Exp Hematol* 21:508-514, 1993
- 3) Bensinger WI, Longin K, Appelbaum F, Rowley S, Weaver C, Lilleby K, Cooley T, Lynch M, Higano T, Klarnet J, Chauncey T, Storb R, Buckner CD: *Peripheral blood stem cells(PBSCs) collected after recombinant granulocyte colony stimulating factor(rhG-CSF): an analysis of factors correlating with the tempo of engraftment after transplantation.* *Br J Haematol* 87:825-831, 1994
- 4) Gianni AM, Bregni M, Siena S, Villa S, Sciorelli GA, Ravagnani F, Pellegrini G: *Rapid and complete hemopoietic reconstitution following combined transplantation of autologous blood and bone marrow cells. A changing role for high-dose chemo-radiotherapy?* *Hematol Oncol* 7:139-145, 1989
- 5) Sheridan WP, Begley CG, Juttner CA: *Effect of peripheral-blood progenitor cells mobilised by Filgrastim(G-CSF) on platelet recovery after high-*

- dose chemotherapy. *Lancet* 339:640-644, 1992
- 6) To LB, Roberts MM, Haylock DN, Dyson PG, Brandford AL, Thorp D, Ho JQK, Dart GW, Horvath N, Davy MLJ, Olweny CLM, Abdi E, Juttner CA: Comparison of haematological recovery time and supportive care requirements of autologous recovery phase peripheral blood stem cell transplants, autologous bone marrow transplants and allogeneic bone marrow transplants. *Bone Marrow Transplant* 9:277-284, 1992
  - 7) Bensinger WI, Singer J, Appelbaum F: Autologous transplantation with peripheral blood mononuclear cells collected after administration of recombinant granulocyte stimulating factor. *Blood* 81:3158-3163, 1993
  - 8) Schwarzenberg L, Brich R, Blanco R, Wittlin F, Muscato J, Tauer K, Hazelton B, West W: Rapid and sustained hematopoietic reconstitution by peripheral blood stem cell infusion alone following high-dose chemotherapy. *Bone Marrow Transplant* 11:369-374, 1993
  - 9) Korbling M, Fliedner TM, Holle R, Magrin S, Baumann M, Holdermann E, Eberhardt K: Autologous blood stem cell(ABSCT) versus purged bone marrow transplantation(pABMT) in standard risk AML: influence of source and cell composition of the autograft on hematopoietic reconstitution and disease-free survival. *Bone Marrow Transplant* 7: 343-349, 1991
  - 10) To LB, Haylock DN, Kimber RJ, Juttner CA: High levels of circulating haemopoietic stem cells in very early remission from acute nonlymphoblastic leukemia and their collection and cryopreservation. *Br J Haematol* 58:399-410, 1984
  - 11) To LB, Haylock DN, Dyson PG, Thorp D, Roberts MM, Juttner CA: An unusual pattern of hematopoietic reconstitution in patients with acute myeloid leukemia transplanted with autologous recovery phase peripheral blood. *Bone Marrow Transplant* 6:109-114, 1990
  - 12) Korbling M: Some principles of blood stem cell transplantation. *Transfus Sci* 14:61-64, 1993
  - 13) Cantin G, Marxhand-Laroche D, Bouchard MM, Leblond PF: Blood-derived stem cell collection in acute nonlymphoblastic leukemia: predictive factors for a good yield. *Exp Hematol* 17:991-996, 1989
  - 14) Kessinger A, Bierman PJ, Vose JM, Armitage JO: High-dose cyclophosphamide, carmustine and etoposide followed by autologous peripheral stem cell transplantation for patients with relapsed Hodgkin's disease. *Blood* 77:2322-2325, 1991
  - 15) 민유홍, 최동훈, 이승태, 남동기, 이선주, 한지숙, 고윤웅: 급성 백혈병에서 화학요법후 골수기능 회복시 말초혈액내 CD34<sup>+</sup> 세포 출현에 관한 연구. 대한혈액학회지 28:55-70, 1993
  - 16) 민유홍, 고윤웅, 이승태, 이선주, 한지숙: 급성 백혈병에서 화학요법후 가동화되는 말초혈액 CD34<sup>+</sup> 및 CFU-GM의 역동적 분석 및 CD34<sup>+</sup> 세포아형에 관한 연구. 한국 BRM 학회지 4:55-74, 1994
  - 17) Kessinger A, Armitage J, Landmark J, Smith D, Weisenburger D: Autologous peripheral hematopoietic stem cell transplantation restores hematopoietic function following marrow ablative therapy. *Blood* 71:723-727, 1988
  - 18) Kessinger A: Utilization of peripheral blood stem cells in autotransplantation. *Hematol Oncol Clin North Am* 7:535-545, 1993
  - 19) Lasky LC, Smith JA, McCullough J, Zanjani ED: Three-hour collection of committed and multipotent hematopoietic progenitor cells by apheresis. *Transfusion* 27:276-278, 1987
  - 20) Hillyer CD, Lackey DA, Hart KK, Stempora LL, Bray RA, Bender JG, Donnenberg AD: CD34<sup>+</sup> progenitors and colony-forming units-granulocyte macrophage are recruited during large-volume leukapheresis and concentrated by counterflow centrifugal elutriation. *Transfusion* 33:316-321, 1993

- 21) Hillyer CD, Tiegerman KO, Berkman EM: Increase in circulating colony-forming units-granulocyte macrophage during large-volume leukapheresis: Evaluation of a new cell separator. *Transfusion* 31:327-332, 1991
- 22) Malachowski ME, Comenzo RL, Hillyer CD, Tiegerman KO, Berkman EM: Large-volume leukapheresis for peripheral blood stem cell collection in patients with hematologic malignancies. *Transfusion* 32:732-735, 1992
- 23) Pettengel R, Morgenstern GR, Woll PJ, Chang J, Rowlands M, Young R, Radford JA, Scraffe JH, Testa NG, Crowther D: Peripheral blood progenitor cell transplantation in lymphoma and leukemia using a single pheresis. *Blood* 82:3770-3777, 1993
- 24) Siena S, Bregni M, Brando B, Belli N, Ravagnani F, Gandola L, Stern AC, Lansdorp PM, Bonadonna G, Gianni AM: Flow cytometry for clinical estimation of circulating hematopoietic progenitors for autologous transplantation in cancer patients. *Blood* 77:400-409, 1991
- 25) Siena S, Bregni M, Belli N, Ravagnani F, Notti P, Magni M, Nicola MD, Bonadonna G, Gianni AM: Practical aspects of flow cytometry to guide large-scale collection of circulating hematopoietic progenitors for autologous transplantation in cancer patients. *Int J Cell Cloning* 10:26-29, 1992
- 26) Gorin NC: Collection, manipulation, and freezing of hemopoietic stem cells. *Clin Haematol* 15:19-48, 1986
- 27) Korbling M, Juttner C, Henon P, Kessinger A: Autologous blood stem cell versus bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant* 10(Suppl 1):144-146, 1992
- 28) Rosenfeld CS, Cullis H, Tarosky T, Nemunaitis J: Peripheral blood stem cell collection using the small volume chamber in the Fenwall CS-3000 Plus blood cell separator. *Bone Marrow Trans-*
- plant 13:131-134, 1994
- 29) To LB, Dyson PG, Juttner CA: Cell-dose effect in circulating stem-cell autografting. *Lancet* 2:404-405, 1986
- 30) 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
- 31) Civin CI: Purified progenitor/stem cells: Background, feasibility, and prospects for clinical transplantation. *Int J Cell Cloning* 10:16-19, 1992
- 32) Berenson RJ, Bensinger WI, Hill RS, Andrews RG, Garcia-Lopez J, Kalamaz DF, Still BJ, Spitzer G, Buckner CD, Bernstein ID, Thomas ED: Engraftment after infusion of CD34<sup>+</sup> marrow cells in patients with breast cancer or neuroblastoma. *Blood* 77:1717-1722, 1991
- 33) Nademanee A, Snieski I, Schmidt GM, Dagis AC, O'Donnell MR, Snyder DS, Parker PM, Stein AS, Smith EP, Molina A, Stepan DE, Somlo G, Margolin KA, Woo D, Niland JC, Forman SJ: High-dose therapy followed by autologous peripheral-blood stem-cell transplantation for patients with Hodgkin's disease and non-Hodgkin's lymphoma using unprimed and granulocyte colony-stimulating factor-mobilized peripheral-blood stem cells. *J Clin Oncol* 12:2176-2186, 1994
- 34) Schwartzberg LS, Birch R, Hazelton B, Tauer KW, Lee P, Altemose R, George C, Blanco R, Wittlin F, Cohen J, Muscato J, West WH: Peripheral blood stem cell mobilization by chemotherapy with or without recombinant human granulocyte colony-stimulating factor. *J Hematother* 1:317-327, 1992
- 35) Henon PR: Peripheral blood stem cell transplantation: Past, present and future. *Stem Cells* 11:154-172, 1993

- 36) Haas R, Mohle R, Fruhauf S, Goldsmidt H, Witt B, Flentje M, Wannenmacher M, Hunstein W: *Patient characteristics associated with successful mobilizing and autografting of peripheral blood progenitor cells in malignant lymphoma.* *Blood* 83:3787-3794, 1994
- 37) Juttner CA, To LB, Haylock DN, Dyson PG, Thorp D, Dart GW, Ho JQK, Horvath N, Bardy P: *Autologous blood stem cell transplantation.* *Transplant Proc* 21:2929-2932, 1989
- 38) Padley D, Strauss RG, Wieland M, Randels MJ: *Concurrent comparison of the Cobe Spectra and Fenwall CS3000 for the collection of peripheral blood mononuclear cells for autologous peripheral stem cell transplantation.* *J Clin Apheresis* 6:77-80, 1991
- 39) Siena S, Bregni M, Brando B, Ravagnani F, Bonadonna G, Gianni AM: *Circulation of CD34<sup>+</sup> hematopoietic stem cells in the peripheral blood of high-dose cyclophosphamide-treated patients: Enhancement by intravenous recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor.* *Blood* 74:1905-1914, 1989
- 40) Hass R, Ho AD, Bredthauer U: *Successful autologous transplantation of blood stem cells mobilized with recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor.* *Exp Hematol* 18:94-98, 1990
- 41) Gianni AM, Siena S, Bregni M, Tarella C, Stem AC, Pileri A, Bonadonna G: *Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor to harvest circulating haemopoietic stem cells for autotransplantation.* *Lancet* 2:580-585, 1989
- 42) Hoglund M, Bengtsson M, Simonsson B, Smedmyr B, Totterman T: *leukapheresis with peripheral blood progenitor cell(PBSC) harvest in healthy volunteers receiving different doses of lenograstim-evidence of a dose response effect.* *Blood* 81(Suppl 1):348a, 1994
- 43) Layton JE, Hockamn H, Sheridan WP, Morstyn G: *Evidence for a novel in vivo control mechanism of granulopoiesis: Mature cell-related control of a regulatory growth factor.* *Blood* 74:1303-1309, 1989
- 44) Brugger W, Bross K, Frisch J: *Mobilization of peripheral blood progenitor cells by sequential administration of interleukin-3 and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor following polychemotherapy with etoposide, ifosfamide, and cisplatin.* *Blood* 79:1193-1200, 1992
- 45) McNiece IK, Stewart FM, Deacon DM, Temlles DS, Zsebo KM, Clark SC, Quesenberry PJ: *Detection of human CFC with a high proliferative potential.* *Blood* 74:609-612, 1989
- 46) Yoo Hong Min, Seung Tae Lee, Bong Ki Lee, So Young Chong, Seok Lee, Jee Sook Hahn, Yun Woong Ko: *Differential responses of CD34-positive acute myelogenous leukemic blasts to the costimulating effects of stem cell factor with GM-CSF and/or IL-3.* *YMJ* 36:26-36, 1995
- 47) Rowley SD, Bensinger WI, Cooley TA, Buckner CD: *Effect of cell concentration on bone marrow and peripheral blood stem cell cryopreservation.* *Blood* 83:2731-2736, 1994