

대한진단검사의학회지 제29권 제4호 2009
Korean J Lab Med 2009;29:353-60
DOI 10.3343/kjlm.2009.29.4.353

■ Original Article · Transfusion Medicine ■

Trima Accel[®]의 Leukoreduction Chamber 내 단핵세포의 성장분석과 수지상세포의 분화유도

이양순¹ · 김신영¹ · 이승태² · 김한수³ · 백은정¹ · 김형진³ · 이미경⁴ · 김현옥^{1,3}

연세대학교 의과대학 진단검사의학교실¹ · 내과학교실² · 세포치료센터³, 대한적십자사 중앙혈액원⁴

Analysis of Characteristics of Mononuclear Cells Remaining in the Leukoreduction System Chamber of Trima Accel[®] and Their Differentiation Into Dendritic Cells

Yangsoon Lee, M.D.¹, Sinyoung Kim, M.D.¹, Seung-Tae Lee, M.D.², Han-Soo Kim, Ph.D.³, Eun-Jung Baek, M.D.¹,
Hyung Jin Kim, Ph.D.³, MeeKyung Lee, M.D.⁴, and Hyun Ok Kim, M.D.^{1,3}

Departments of Laboratory Medicine¹ and Internal Medicine², Yonsei University College of Medicine; Yonsei Cell Therapy Center³, Seoul; Blood Center, Korean Red Cross⁴, Seoul, Korea

Background : We investigated the characteristics of the mononuclear cells remaining in the leukoreduction system (LRS) chambers of Trima Accel[®] in comparison with those of standard buffy coat cells, and evaluated their potential for differentiation into dendritic cells.

Methods : Twenty-six LRS chambers of Trima Accel[®] were collected after platelet pheresis from healthy adults. Flow cytometric analysis for T, B, NK, and CD14+ cells was performed and the number of CD34+ cells was counted. Differentiation and maturation into dendritic cells were induced using CD14+ cells separated via Magnetic cell sorting (MACS[®]) Separation (Miltenyi Biotec Inc., USA).

Results : Total white blood cell (WBC) count in LRS chambers was 10.8×10^6 (range $7.7-18.0 \times 10^6$). The median values (range) of proportions of each cells were CD4+ T cell 29.6% (18.7-37.6), CD8+ T cell 27.7% (19.2-40.0), B cell 5.5% (2.2-12.1), NK cell 15.7% (13.7-19.9), and CD14+ cells 12.4% (8.6-32.3) respectively. Although total WBC count was significantly higher in the buffy coat (whole blood of 400 mL) than the LRS chambers, the numbers of lymphocytes and monocytes were not statistically different. The numbers of B cells and CD4+ cells were significantly higher in the buffy coat than the LRS chambers ($P < 0.05$). The median value (range) of CD34+ cells obtained from the LRS chambers was 0.9×10^6 ($0.2-2.6 \times 10^6$). After 7 days of cytokine-supplemented culture, the CD14+ cells were successfully differentiated into dendritic cells.

Conclusions : The mononuclear cells in LRS chambers of Trima Accel[®] are an excellent alternative source of viable and functional human blood cells, which can be used for research purposes. (*Korean J Lab Med 2009;29:353-60*)

Key Words : Trima Accel, Leukoreduction chamber, Dendritic cell

Received : February 13, 2009

Revision received : July 10, 2009

Accepted : July 14, 2009

Corresponding author : Hyun Ok Kim, M.D.

Department of Laboratory Medicine, 134 Shinchon-dong,
Seodaemun-gu, Seoul 120-752, Korea
Tel : +82-2-2228-2444, Fax : +82-2-313-0908
E-mail : hyunok1019@yuhs.ac

*본 과제는 Seoul Research and Business Development Program (10816)에 의해 지원되었음.

Manuscript No : KJLM09-031

서 론

최근 인체유래 백혈구세포 이용과 활용에 대한 연구가 많이 진행되고 있으나[1, 2], 이에 필요한 정상 백혈구를 얻는 것은 쉽지 않다. 연구에 자발적으로 혈액을 제공하는 사람이 적을 뿐만 아니라, 한 사람으로부터 얻을 수 있는 세포의 수에는 한계가 있기

때문이다. 연구용으로 사용된 백혈구 소재는 주로 자발적인 자원의 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 이때 사용한 백혈구제거용 필터를 얻어 역방향으로 생리식염수 등을 사용하여 세척함으로써 현혈 혈액으로부터 제거된 백혈구를 이용하게 되었다[3, 4]. 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[4, 5]. 한편 혈소판 성분채집에서도 백혈구여과제거 성분채집혈소판을 제조하는 기기가 소개되면서 필터는 아니지만 세포의 비중과 원심분리 효과로 혈소판 성분채집과정에서 백혈구를 제거할 수 있는 leukoreduction system (LRS) chamber를 장착한 키트가 개발되었다. 즉, 혈소판 성분채집기인 Trima Accel® (CaridianBCT, Lakewood, CO, USA)에 사용하는 일회용 채집 키트에는 혈소판이 생리적인 여과기 역할을 하는 LRS chamber 장착을 통하여 백혈구를 제거하게 된다. 즉, 혈소판 채집이 시작되면, LRS chamber 안이 혈소판으로 채워질 때까지 혈소판이 축적되어 혈소판층을 형성하게 된다. Chamber 안의 혈장 이동에 의해 혈소판이 하나씩 chamber 밖으로 빠져나가서 모아지고 입자가 큰 백혈구는 혈소판층을 통과할 수 없어 chamber 내에 그대로 남게된다. 따라서 따라서 혈소판 성분채집과정 중에 LRS chamber 내로 백혈구 제거가 완료되고, 최종 모아진 성분채집혈소판 내에는 백혈구수가 1×10^6 이하로 거의 남아있지 않게 된다[6]. Trima Accel®를 이용한 성분채집혈소판은 LRS chamber를 통하여 혈소판 내의 백혈구 오염을 감소시키고, 백혈구가 모아진 LRS chamber는 폐기하게 된다.

본 연구에서는 단순히 LRS chamber 내의 백혈구수, 단핵구수, 백혈구의 백분율 등 세포의 성장만을 비교한 Neron 등[7, 8]의 연구에 비해 여기서 획득한 백혈구세포를 이용하여 수지상세포로의 분화를 유도하고 그 기능을 평가함으로써, 앞으로 LRS chamber내에 모아진 백혈구가 연구용 소재로서 그 활용이 가능한지를 평가해 보고자 하였다.

재료 및 방법

1. LRS chamber 수집

세브란스병원 혈액원과 대한 적십자사 중앙혈액원에서 26명

의 건강한 현혈자로부터 Trima Accel®을 사용하여 혈소판성분채집을 시행한 후 폐기되는 키트에 부착된 LRS chamber를 수거하였다. 모든 현혈자는 현혈자의 기준에 적합한 사람이었으며 현혈 전에 현혈자로부터 채취한 백혈구를 연구용으로 사용할 것에 대한 서면 동의서를 받았다. Trima Accel®을 이용한 혈소판 성분채집을 시행하였고, 장비에서 키트를 제거하기 전에 LRS chamber를 수득하고 나머지는 폐기하였다.

대조군으로는 400 mL 전혈에서 성분분리 시 원심분리하여 얻은 백혈구연층을 사용하였다. 현혈자 9명으로부터 삼중 현혈백에 400 mL 전혈을 현혈받은 후 실온에서 30분 동안 방치하고 2,000 rpm에서 3분 동안 원심분리한 후, 백혈구연층을 분리하였다. 모든 과정은 무균적으로 시행되었으며 성분제제는 수혈용으로 사용하였다.

2. 세포의 성장분석

1) 혈액학적 분석

LRS chamber와 연결된 입출구 튜브를 알코올로 소독하여 자르고 50 mL cone tube에 세포를 모았다. 50 mL 주사기에 phosphate buffer saline (PBS) 40 mL를 담고, 출구 튜브 쪽에 바늘을 삽입하고 분주하여 LRS chamber 내의 나머지 세포를 모았다. LRS chamber로부터 얻어진 세포 1 mL를 취하여 자동혈구계산기 Advia 2120 (Bayer Corporation, Tarrytown, NY, USA)로 통상혈액검사와 백혈구 감별계산을 하였다. 말초 혈액도말표본을 Wright-Giemsa 염색하여 백혈구 모양과 분포를 관찰하였다.

2) 유세포분석기를 이용한 면역표현형 분석

Ficoll-Hypaque (비중 1.077, Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden)을 50 mL cone tube에 25 mL 넣고, LRS chamber에서 분리한 세포 25 mL을 그 위에 중첩하였다. $900 \times g$ 로 $20^\circ C$ 에서 20분간 원심분리하여 상층액을 버리고, 백혈구연층을 다른 50 mL cone tube에 모은 후, PBS로 두번 세척하였다. 면역표현형 분석을 위하여 CD45-FITC, CD3-FITC, CD4-FITC, CD8-PE, CD19-PE, CD16+56-PE, CD14-PE (Beckman-Coulter Inc., Immunotech, Marseille, France)에 대한 단클론성 항체를 사용하였다. mIgG1/mIgG1, CD45/CD14, CD4/CD8, CD3/CD19, CD3/CD16+56 조합으로 EPICS®XL (Beckman Coulter Inc., Miami, FL, USA)을 이용하여 분석하였다. CD34+ 세포 수는 Stem-kit® (Beckman Coulter Inc., Fullerton, CA, USA)로 CD45-FITC, CD34-PE에 대한 단클론성

항체를 이용하였고, 세포의 생존성을 확인하기 위해서 7-aminonactinomycin D (7-AAD)로 염색하였다. 유세포분석기 EPI-CS®XL (Beckman Coulter Inc.)로 분석하였다. 결과값은 중앙값(범위)로 나타내었다.

3. 수지상세포로 분화 유도

말초혈액으로부터 분리한 단핵세포 중에서 CD14+ 세포를 Magnetic cell sorting (MACS) Separation (Miltenyi Biotec Inc., Auburn, CA, USA)으로 분리하였다. 순수분리한 CD14+ 세포(5.0×10^5 /mL)를 10% fetal calf serum 이 포함된 RPMI-1640 (Gibco-BRL, Grand Island, NY, USA) 배지에 넣고, 200 ng/mL granulocyte-macrophage colony stimulating factor (GM-CSF), 20 ng/mL interleukin-4 (IL-4, R&D Systems, Minneapolis, MN, USA)를 넣고 37°C 에서 배양하였다. 5일째 되는 날에 세포를 수확한 뒤, 세척 및 원침하고, RPMI-1640 (Gibco-BRL) 배지에 재부유시켰다. Tumor necrosis factor- α (TNF- α , 20 ng/mL), IL-1 β (500 U/mL), IL-6 (500 U/mL), prostaglandin E2 (PGE2, 2×10^{-7} M)를 넣어 주어 48시간 동안 수지상세포 성숙을 유도하였다. 성숙유도물질을 넣지 않고, GM-CSF, IL-4만 넣은 세포를 동시에 배양하였다. 접종 0일, 5일(immature dendritic cell (iDC)), 7일(mature dendritic cell [mDC])에 각각 세포를 수확하였고, CD40-FITC, CD80-PE, CD86-PE, HLA-DR-FITC, CD1a-FITC, CD83-PE (Beckman-Coulter Inc.)에 대한 단클론성 항체를 이용하여 세포표지자의 변화를 관찰하였다. mIgG1/mIgG1, CD1a/CD83, HLA-DR/CD86, CD40/CD80 조합으로 검사하고 분석하였다. 일부 세포는 Wright-Giemsa 염색하여 세포의 형태를 관찰하였다.

4. 체외 림프구 혼합 배양법

CD14+ 세포, iDC 및 mDC에 의한 동종(allogeneic) T 림프구 활성화 정도를 평가하기 위해 혼합배양법(mixed lymphocyte reaction)을 시행하였다. 위에서 기술한 방법으로 분리한 CD14+ 세포 및 배양한 iDC와 mDC를 2×10^4 cell/well로부터 1/4로 연쇄 희석한 96-well microtiter plate에 건강한 정상인의 혈액에서 T 세포 분리 키트(pan T cell isolation kit, Miltenyi Biotec Inc.)을 이용하여 분리한 T 림프구(2×10^5 cells/well)를 넣어 혼합 배양하였다. 배양 4일 후 각 well에 [3 H]TdR 1 μ Ci를 넣고 16시간 동안 더 배양하였다. 반응이 끝난 후 multi-well 세포 수확기를 이용하여 세포를 분리한 후 [3 H]TdR의 세포내 포획 정도를 평가하였다. 실험은 3회 반복하였고, 평균값과 표준편차를 구하였다.

5. 통계학적 분석

통계학적인 분석은 Analyse-it (Analyse-it Software Ltd., Leeds, UK)의 Mann-Whitney U test를 이용하였다.

결 과

1. 세포의 성상분석

LRS chamber 내의 총 백혈구 수는 10.8×10^8 (범위 7.7-18.0 $\times 10^8$)개였고 림프구와 단핵구(monocyte)는 각각 총 백혈구 수의 67.5% (범위 0.0-86.5)와 13.9% (범위 7.9-57.3)를 구성하고 있었다. 또 중성구는 총 백혈구 수의 4.2% (범위 1.8-14.4)이었다(Table 1). Ficoll-Hypaque (Pharmacia Biotech)으로 백혈구연층을 분리한 후 얻어진 총 단핵세포 수는 9.7×10^8 (범위 4.0-

Table 1. Total WBC count and differential count: comparison between cells isolated from LRS chambers and buffy coats separated from whole blood

	LRS chamber (n=18)				Buffy coat (n=9)				P value* of median
	Median ($\times 10^6$)	Range ($\times 10^6$)	Median (%)	Range (%)	Median ($\times 10^6$)	Range ($\times 10^6$)	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. Abbreviations: LRS, leukoreduction system; WBC, white blood cell.

14.3 × 10⁶)로 90%의 회수율을 보였다.

면역표현형 분석 시에 CD4+ T 세포, CD8+ T 세포, CD16+CD56 NK 세포, CD14+ 세포가 각각 총 단핵세포의 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+ 세포 수는 0.9 × 10⁶ (범위 0.2-2.6 × 10⁶)였고, 7-AAD로 염색하였을 때 세포의 생존율은 100%로 관찰되었다(n=8). 대조군으로 사용한 400 mL 전혈유래 백혈구연층과 비교하였을 때 총 백혈구 수는 통계학적으로 유의한 차이(P<0.05)를 보였으며, 전혈유래 백혈구연층의 총 백혈구 수가 더 많았다. 특히 CD4+ 세포 수와 B 세포 수

에서 두 그룹 간에 통계학적으로 유의한 차이(P<0.05)가 있었고, 전혈유래 백혈구연층에서 그 수가 더 많았다. 그러나, 림프구와 단핵구수에는 두 그룹 간에 통계학적으로 유의한 차이는 없었다(Table 1) (P>0.05).

Table 2. Flow cytometric characterization of mononuclear cells: comparison between LRS chamber-derived and buffy coat-derived cells

Component	LRS chamber (n=18)		Buffy coat (n=9)		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.
Abbreviations: LRS, leukoreduction system; NK cell, natural killer cell.

2. 수지상세포의 분화 유도

LRS chamber내의 백혈구 단핵세포에서 CD14+ 세포를 분리

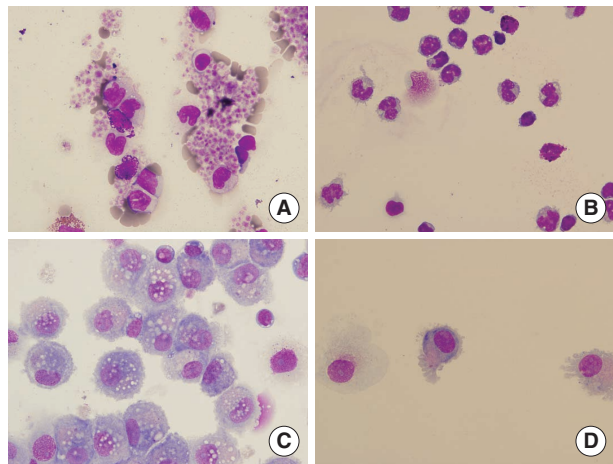


Fig. 1. Wright-Giemsa stain (×400) of cells isolated from LRS chambers (A), CD14+ cells separated by MACS® Separation (B), immature dendritic cells on Day 5 of culture (C), and mature dendritic cells on Day 7 of culture (D).

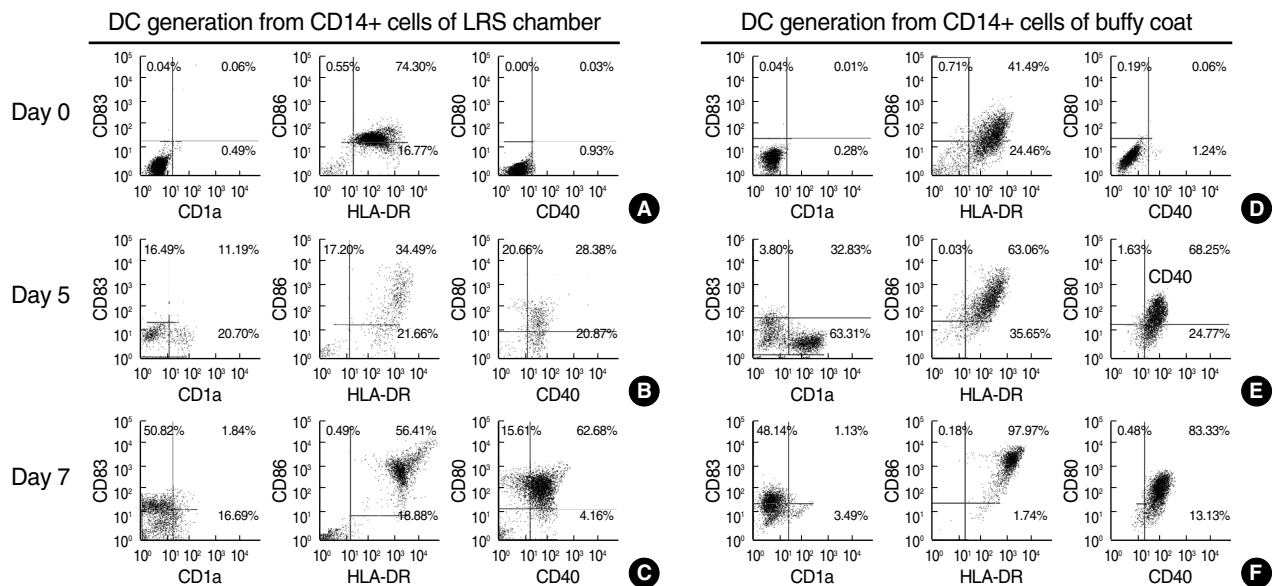


Fig. 2. The immunophenotypic characteristics of mature dendritic cells (mDCs) and immature dendritic cells (iDCs) on Day 0, 5 and 7 of culture. Phenotypic analysis was performed with CD14+ cells separated from LRS chamber (A) and buffy coat (D) on Day 0; iDCs generated by culturing CD14+ cells from LRS (B) and buffy coat (E) with GM-CSF and IL-4 for 5 days; and mDCs generated from LRS CD14+ cell-derived iDCs (C) and buffy coat-CD14+ cell-derived iDC (F) for additional 48 hr in the presence of TNF-α, IL-1β, IL-6 and PGE2.

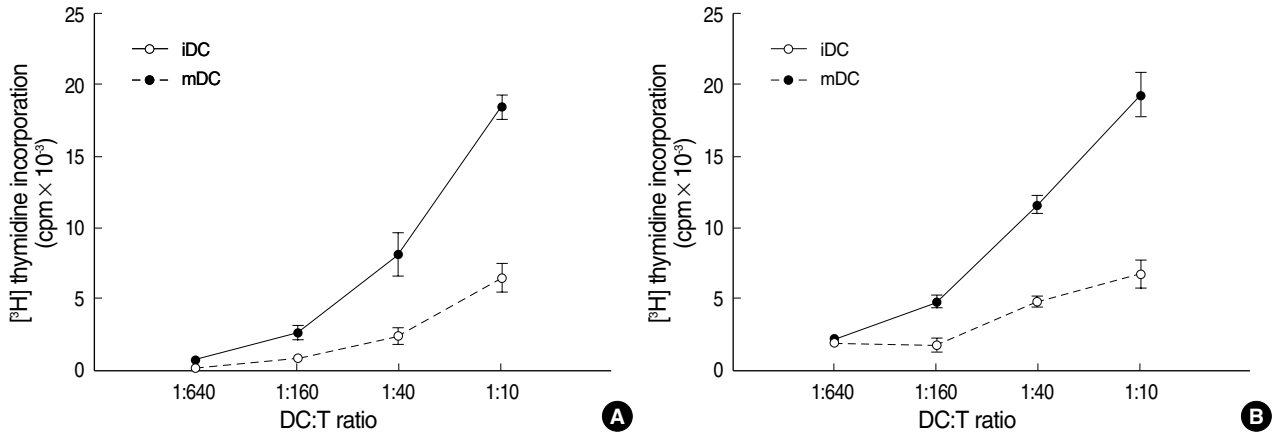


Fig. 3. Mature dendritic cells (mDCs) generated from CD14⁺ monocytes possess strong allostimulatory capacities. Allostimulatory capacities of DCs from LRS-derived MNCs (A) and DCs from buffy coat-derived MNCs (B) were analyzed by using identical allogeneic T cells. Allogeneic T cells proliferated more vigorously when they were stimulated with mDCs than stimulated with immature DCs (iDCs) on various DC:T cell ratio. Results shown are mean values (circle) \pm SD (bar) of triplicate wells.

하였을 때 세포 수는 평균 1.25×10^7 개였다. 말굽모양의 핵을 가진 전형적인 단핵구였고, 배양 4일째까지 세포막이 원형의 형태로 유지되며 그 수가 점차 증가하였다. 배양 5일째에 수지상 모양의 세포가 출현하기 시작하였고 Wright-Giemsa 염색하였을 때 세포질 내에 공포를 다수 관찰할 수 있었다. 배양 5일째 TNF- α , IL-1 β , IL-6, PGE2를 넣어 수지상세포의 성숙을 유도하였고, 7일째 수지상 모양이 잘 보이는 세포들을 관찰할 수 있었다(Fig. 1). 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. 2).

3. 체외 림프구 혼합 배양법

수지상세포의 상대적인 항원제공 능력을 간접 측정하는 방식으로 동종의 T 림프구의 증식 유도를 분석하는 혼합배양법을 수행하였다. 총 5일간 혼합배양을 시행한 후 T 림프구의 증식 정도를 측정하였을 때, 다양한 세포비율의 혼합배양 모두에서 mDC에 의한 T 림프구 증식 정도가 iDC에 의한 T 림프구 증식 정도에 비해 높았고, 통계학적으로도 유의한 차이를 보였다($P < 0.05$) (Fig. 3).

고 찰

줄기 세포를 비롯하여 인체유래 백혈구를 이용한 많은 연구가

진행되고 있다. 암세포의 특수한 부위를 목표로 암세포 특이적인 항원에 대해 T 세포의 면역반응을 유도하는 면역치료에 대한 연구[9, 10], NK 세포를 이용한 연구, CD34⁺ 세포를 이용하여 각기 다른 세포를 유도하는 연구[1, 2, 10] 등 다양한 주제가 있다. 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 성분 분리 시에 얻어지는 백혈구연층을 분리하여 연구에 사용하였다. 전혈로부터 세 가지의 성분 혈액 제조시 삼중백을 이용하게 되는데 백혈구연층을 얻기 위해서는 사중백을 이용하거나 삼중백에 추가적으로 혈액백을 연결해야 하는 번거로움이 있고, 수혈용 혈액성분제이므로 모든 과정을 철저히 무균적으로 시행하며 이에 따른 추가비용이 따른다. 또한 이를 제조하는 사람에 따라서 얻어지는 세포수 차이가 날 수 있으며, 혈액은행의 업무에 따라 현혈채집 후 성분분리할 때까지 시간이 지체될 수 있어서 연구자가 백혈구연층을 얻기까지는 수시간이 소요된다. 또 현혈자의 동의를 얻어 현혈을 받은 후에라도 부적합 혈액으로 판정되는 경우에는 그 백혈구를 이용하는 데 신뢰도가 떨어진다. 전혈유래 백혈구연층은 전혈로부터 얻은 것이므로 백혈구의 세포구성과 분포가 혈중 백혈구와 유사하다. 이는 정상인의 혈중에 중성구가 백혈구의 절반 이상을 차지하므로 전혈유래 백혈구연층의 중성구의 분포도 절반 이상을 차지할 것으로 예상할 수 있었다. 본 연구에서 전혈로부터 얻은 백혈구연층의 중성구 수는 총 백혈구 14.9×10^8 (범위 $10.5 - 22.0 \times 10^8$) 중 36.8% (범위 18.1-60.9)를 차지하였다. 상대적으로 연구에 주로 사용되는 림프구와 단핵구의 수는 줄어드는 단점이 있

었다[4].

2000년대 초부터는 백혈구제거용 필터로부터 연구용 세포를 얻게 되었다. 백혈구가 혼입되어 있는 농축혈소판과 농축적혈구가 환자에게 수혈됨으로 발생하는 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 총 백혈구 수는 전혈로부터 얻은 것보다 적지만 단핵구와 림프구수는 거의 비슷함을 보고하였고, 이 세포들의 생존력과 기능성도 같이 증명하였다[4, 11, 12]. 그러나 백혈구제거용 필터를 이용하는데에는 한계점이 있었다. 백혈구제거용 필터를 이용한 연구를 살펴보면 대부분 500 mL 정도의 전혈을 여과시켜 백혈구를 얻는 것이었다. 그러나 우리나라에서 백혈구제거농축적혈구는 이미 제조되어 있는 보관전백혈구제거(*prestorage leukocyte reduction*) 혈액을 혈액원으로부터 구입하여 사용하는 경우가 대부분이고, 병원에서 전혈을 직접 백혈구제거 여과과정을 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 dextran 용매 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 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 chamber 내 세포들이 연구용으로 사용할 수 있을 만큼 충분한 수가 모이고, 세포의 생존력과 기능성이 증명된다면 장래에 연구용으로 좋은 소재가 될 것으로 생각되었다. 본 연구에서는 LRS chamber 내에 있는 세포성분의 구성을 혈액학적 방법과 유세포분석을 통하여

알아보았고, CD34+ 세포 수를 측정하였다.

LRS chamber 내의 총 백혈구 수는 10.8×10^8 (범위 7.7-18.0 $\times 10^8$)로 400 mL 전혈로부터 얻는 백혈구연층보다 적었고, Meyer 등[7]이 보고한 백혈구제거용 필터로부터 얻어진 세포 수와 큰 차이는 보이지 않았다. 세포의 구성은 LRS chamber 내 중성구는 총 백혈구의 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 400 mL 전혈로부터 분리된 백혈구연층에는 중성구 36.8% (범위 18.1-60.9), 림프구 41.1% (범위 27.5-57.0), 단핵구 8.9% (범위 5.6-16.4)로 중성구의 비율이 매우 높았다.

두 그룹 간에 총 백혈구 수에는 통계학적으로 유의한 차이가 있었고 전혈유래 백혈구연층에서 세포수가 더 많았다($P < 0.05$). 그러나 연구용으로 주로 사용되는 림프구와 단핵구 수는 두 그룹 간에 통계학적으로 유의한 차이를 보이지 않아서 기존의 전혈유래 백혈구연층의 림프구와 단핵구를 대치할 수 있음을 확인하였다.

LRS chamber와 400 mL 전혈로부터 분리한 백혈구연층의 중성구가 차지하는 비율이 크게 차이가 난다. 이는 Trima Accel® 장비에서 전혈이 원심분리되어 혈소판층이 chamber를 통과하게 되는데 혈소판층과 가까운 단핵세포층이 혈소판과 함께 chamber 내로 진입되기 때문이다. 즉 전혈을 원심분리하였을 때 비중이 큰 적혈구-중성구-단핵구-림프구-혈소판 순서로 분리된다. LRS chamber에는 혈소판층과 가까운 림프구와 단핵구가 주로 들어가기 때문에 chamber 내에는 이들 세포가 많이 모이고, 분리층이 혈소판과 먼 중성구는 상대적으로 적게 모이는 것이다. 반면에 전혈로부터 얻은 백혈구연층의 경우에는 색깔을 육안으로 보면서 분리하기 때문에 광범위한 백혈구연층을 모으게 되고 중성구의 비율도 상대적으로 높게 된다.

Ficoll-Hypaque (Pharmacia Biotech)을 이용하여 LRS chamber 내 세포에서 단핵세포를 분리하였을 때, 총단핵세포 수는 9.7×10^8 (범위 4.0-14.3 $\times 10^8$)로 90%가 회수되었다. 면역표현형을 분석하였을 때 LRS chamber 내에는 NK 세포 15.7% (범위 13.7-19.9), CD14+ 세포 12.4% (범위 8.6-32.3)로 구성되어 있었고, 전혈유래 백혈구연층의 NK 세포, CD14+ 세포보다 중간값이 높았다. 그러나, 이들 세포의 두 그룹 간에 통계학적 유의한 차이는 없었다($P > 0.05$). CD4+ 세포와 B 세포는 두 그룹 간에 통계학적으로 유의한 차이를 보였고($P < 0.05$), LRS chamber 내에 세포 수가 더 많았다(Table 2). CD34+ 세포를 백혈구제거용 필터로부터 분리하여 이용한 연구에 따르면 필터로부터 0.45×10^6 - 1.1×10^6 의 세포 수를 분리하였다고 보고하였

다[7, 13]. 본 연구에서 LRS chamber 내 CD34+ 세포 수는 0.9×10^6 (범위 $0.2-2.6 \times 10^6$)로 백혈구제거용 필터로부터 분리한 세포와 비슷한 양의 CD34+ 세포 수를 얻을 수 있었다.

LRS chamber 내 세포에 비하여 전혈로부터 얻은 백혈구연층의 세포는 스트레스에 덜 노출된다. LRS chamber 세포는 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, 수지상세포로 분화시 증가하는 면역표현형인 CD40/CD80, CD86/HLA-DR의 발현이 증가함을 확인하였다. 성숙한 수지상세포에 특이적인 CD83가 증가하였고, CD1a의 발현은 감소하였다. 체외 림프구 혼합 배양에서 mDC에 의한 T 림프구 증식 정도가 iDC에 의한 T 림프구 증식 정도에 비해 월등히 높음을 확인할 수 있었다. 전혈에서 유래한 수지상 세포의 표현 형질과 T 림프구 증식 유도 능력은 이전 연구[14, 15]에서 보고된 바와 같이, 본 논문의 LRS 유래의 수지상 세포에서도 동일한 양상을 관찰할 수 있었다. 즉 동일한 T 림프구에 대한 전혈 및 LRS 유래 수지상 세포가 유사한 정도의 T 림프구 증식을 유도함을 확인하여(data not shown) 전혈과 LRS 유래 수지상 세포가 표현 형질뿐만 아니라 기능성 면에서 매우 유사함을 확인하였다. 이로서 LRS chamber 내 CD14+ 세포가 수지상세포로 분화 및 성숙함으로써 LRS chamber 내 세포를 세포치료 목적으로 추가 조작이 가능한 기능성을 가진 세포로 이용할 수 있다는 가능성을 확인하였다.

요 약

배경 : Trima Accel®의 leukoreduction system (LRS) chamber 내 세포의 성상을 전혈유래 백혈구연층과 비교, 분석함으로써 연구용으로 활용 가능성을 확인하고 수지상세포로의 분화실험을 실시하였다.

방법 : 건강한 성인 26명으로부터 Trima Accel®을 이용하여 혈소판 성분채집을 실시한 후 LRS chamber를 분리하였다. LRS chamber 내 T 세포, B 세포, NK 세포, CD14+ 세포의 구성성분을 유세포분석기를 이용하여 분석하였으며, CD34+ 세포 수를 측정하였다. Magnetic cell sorting (MACS®) Separation (Miltenyi Biotec Inc., USA)로 CD14+ 세포를 분리한 후 수지상세포의 성숙을 유도하였다.

결과 : LRS chamber 내의 총 백혈구 수는 10.8×10^8 (범위 $7.7-18.0 \times 10^8$)였으며, 각각의 백혈구가 차지하는 비율의 중간값(범위)은 CD4+ 세포 29.6% (18.7-37.6), CD8+ T 세포 27.7% (19.2-40.0), B 세포 5.5% (2.2-12.1), NK 세포 15.7% (13.7-19.9), CD14+ 세포가 12.4% (8.6-32.3)였다. LRS chamber와 400 mL 전혈유래 백혈구연층의 총 백혈구 수는 전혈유래 백혈구연층에서 유의하게 많았으나, 림프구와 단핵구 수는 두 그룹 간에 통계학적인 차이는 없었다. CD4+ 세포 수와 B 세포 수가 두 그룹 간에 통계학적으로 유의한 차이를 보였고, 전혈유래 백혈구연층에서 더 많았다($P < 0.05$). LRS chamber 내의 CD34+ 세포 수 중간값(범위)은 0.9×10^6 ($0.2-2.6 \times 10^6$)이었다. 또한 LRS CHAMBER에서 분리한 CD14+ 세포는 7일 동안 사이토카인 첨가 후 배양하여 수지상세포로 분화 및 성숙함을 확인하였다.

결론 : Trima Accel®의 LRS chamber 내의 말초혈액 단핵 세포는 생존력과 기능성을 가진 세포들로서 연구용 소재로 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 and Steinman RM. Dendritic cells: specialized and regulated antigen processing machines. *Cell* 2001;106:255-8.
3. Sniecinski I, O'Donnell MR, Nowicki B, Hill LR. Prevention of refractoriness and HLA-alloimmunization using filtered blood products. *Blood* 1988;71:1402-7.
4. Meyer TP, Zehnter I, Hofmann B, Zaissner J, Burkhardt 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.
5. 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.
6. 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.
7. 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.
8. 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.
 9. 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 IFN gamma-producing NK cells. *Mol Ther* 2007;16:411-8.
 10. 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.
 11. Weitkamp JH and Crowe JE Jr. Blood donor leukocyte reduction filters as a source of human B lymphocytes. *Biotechniques* 2001;31:464-6.
 12. 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.
 13. Ivanovic Z, Duchez P, Morgan DA, Hermitte F, Lafarge X, Chevalleyre J, et al. Whole-blood leuko-depletion filters as a source of CD34+ progenitors potentially usable in cell therapy. *Transfusion* 2006;46:118-25.
 14. Pickl WF, Majdic O, Kohl P, Stockl J, Riedl E, Scheinecker C, et al. Molecular and functional characteristics of dendritic cells generated from highly purified CD14+ peripheral blood monocytes. *J Immunol* 1996;157:3850-9.
 15. Reddy A, Sapp M, Feldman M, Subklewe M, Bhardwaj N. A monocyte conditioned medium is more effective than defined cytokines in mediating the terminal maturation of human dendritic cells. *Blood* 1997;90:3640-6.