

동일인의 골수와 말초혈액 단핵세포에 대한 조혈 성장인자의 효과

계명의대 내과학교실 및 의과학연구소

권 기 영

= Abstract =

Effects of Hematopoietic Growth Factors on the Bone Marrow and Mobilized Peripheral Progenitors from the Same Person

Ki Young Kwon, M.D.

Department of Internal Medicine & Institute for Medical Science
Keimyung University School of Medicine, Taegu, Korea

Background: Peripheral blood progenitor cell(PBPC) is now widely used as alternate source to bone marrow for transplantation. The objectives of this study are to compare the clonogenic potential of marrow and mobilized peripheral progenitors obtained from the same person. To examine the activity and effectiveness of G-CSF in different concentration, and to compare the influence of different period of exposure with growth factors, mononuclear cells from the bone marrow and peripheral blood were enriched in RPMI media containing different sets of growth factors for various durations.

Material and Method: Bone marrow cells were obtained from 5 lymphoma patients with normal marrow function. PBPCs mobilized by cyclophosphamide plus 10 μ g/kg of G-CSF or daily 10 μ g/kg of G-CSF alone for 4 days and harvested by leukapheresis with Cobe-Spectra apheresis unit. After Ficoll-Hypaque separation, viable 2×10^6 mononuclear cells were inoculated in RPMI media containing 10% autologous serum, and 6 sets of different combination of cytokines. Each set of media contains 100ng/mL of stem cell factor, 1,000U/mL of G-CSF, 5,000U/mL of G-CSF, 100ng/mL stem cell factor + 1,000U/mL G-CSF, 100ng/mL stem cell factor + 5,000U/mL G-CSF and control group which didn't add any growth factor. After 1, 7, 10 days of culture in liquid media, test for viability with trypan blue were done and 1×10^5 cells were seeded in methylcellulose media and were cultured in duplicate. After 14 days incubation, CFU-GM count were done under inverted microscopy.

Results: CFU-GM were generally increased even in 1 day exposure with growth

본 연구는 동산의료원 특수과제 연구비 지원으로 이루어졌음.

권기영 : 700-712, 대구시 중구 동산동 194 계명의대 내과학교실

Tel : (053)250-7412 Fax : (053)250-7434

factors than control in both bone marrow and PBPC group. Prominent increase were noted in the combination of 2 cytokines. Seven and 10 days of exposure with growth factors, there showed similar findings but the bone marrow derived mononuclear cells had a tendency of peak level in 1 day exposure but the highest level of CFU-GM in PBPC group was noted in 7 days exposure with growth factors. Assessment of clonogenic activity of marrow and mobilized PBPC, both group yield similar number of CFU-GM.

Conclusion : These results indicated the bone marrow and PBPC can be enriched *ex-vivo* with G-CSF and stem cell factor. The degree of expansion of PBPC and marrow CFU-GM were significantly increased with combination of cytokines. Compare to their clonogenic potential of mononuclear cells from the bone marrow and peripheral blood failed to demonstrate any significant difference.

Key Words : Bone marrow, Mobilized mononuclear cell, CFU-GM

서 론

통상의 고식적인 방법으로는 치료가 불가능하던 일련의 질병을 골수이식으로 완치를 일으킬 수 있다는 사실^{1, 2)}이 알려지면서 조혈모세포에 대한 관심이 고조되었으며 이에 대한 연구가 활발히 이루어지게 되었다. 초기의 골수이식은 HLA 형이 동일한 형제간에서 시행되었으나 항생제와 혈소판 수혈의 발달, HLA와 이식편대 숙주반응 등에 대한 지식의 축적으로 HLA의 1 또는 2 locus가 다른 비혈연자까지 동종 골수이식의 범위를 넓혀가고 있지만 다수의 환자들에서 적합한 골수 공여자를 찾을 수 없는 경우가 흔하며 또한 혈구세포들의 냉동보존술의 개발 등에 힘입어 자가 골수이식이 치료의 한 방편으로 제시되기에 이르렀다^{3, 4)}.

한편 골수 이외의 조직에서 조혈모세포의 존재가 알려져 말초혈액에도 이식이 가능한 조혈 전구세포가 소량이나마 존재하며 또한 이를 이용하여 이식을 하였을 때 생착이 골수이식보다 더 조기에 일어난다는 보고가 있은 후^{5, 6)} cyclophosphamide 등의 항암제나^{7, 8)} 여러 조혈 성장인자를 투여하는 경우^{9, 10)} 말초혈액으로 조혈모세포의 이동이 증가되어 더 많은 조혈 전구세포를 얻을 수 있음을 알게 되었고 근래에는 수집한 조혈모세포를 체외에서

증식하여 이식하므로써^{11, 12)} 이들 세포의 분화가 체외에서 이미 진행된 상태로 이식하게 되어 성숙한 백혈구의 출현이 더 조기에 일어날 수 있으리라고 믿어지고 있다. 그외에도 제대혈을 이용한 이식이나¹³⁾ 말초혈액내 CD34 양성세포를 선택하여 이식하는 방법 등¹⁴⁾이 사용되고 있으며 최근에는 말초혈액의 조혈 전구세포를 이용한 동종이식도 가능해져 앞으로는 골수이식을 완전히 대신할 수 있으리라 여겨지고 있다¹⁵⁾. 골수와 말초혈액의 조혈 전구세포에 있어 이식후 골수기능의 회복을 일으킨다는 점은 동일하나 그 성상 등을 비교한 많은 연구가 진행되어 Suzuki 등¹⁶⁾은 말초혈액의 CD34 양성세포가 골수 CD34 양성세포보다 CD33 및 CD13을 표현하는 빈도가 더 높고 BFU-E와 CFU-GM의 수에도 차이가 있다고 보고하였으며 CD34 양성세포가 동일한 시점에서 채취한 골수보다 항암제와 G-CSF로 이동시킨 후 백혈구 분반법으로 얻은 말초혈액의 단핵세포에 약 1.4배의 비율로 존재하며 더 원시적인 세포가 많다는 결과도 보고된 바 있다¹⁷⁾. 이들 조혈 전구세포를 체외에서 배양하는 경우 여러 조혈 성장인자가 서로 상호보완적으로 작용함을 알 수 있는데 그 중 stem cell factor, GM-CSF, G-CSF, erythropoietin, interleukin-1(IL-1), IL-3 및 IL-6 등을 첨가하면 granulocyte-macrophage colony-forming unit(CFU-GM)의 증가가 나타나며 특

히 이들을 복합적으로 사용하였을 때 상승작용이 관찰되는 반면^{18, 19)} transforming growth factor β 1, 2, 3 및 tumor necrosis factor α 나 interferon γ 등은 CFU-GM 형성을 억제한다고 알려져 있다²⁰⁻²⁴⁾.

저자는 동일인에서 골수천자와 말초혈액으로 구동을 일으켜 백혈구 분반법을 이용해 얻은 단핵세포에 상승작용이 있는 것으로 잘 알려진 stem cell factor와 G-CSF의 2 종류 조혈 성장인자^{19, 24, 25)}를 첨가하여 체외 증식시켰을 때 일어나는 변화와 성장인자와의 접촉기간을 달리한 경우 나타나는 차이 및 G-CSF의 용량 차이에 의한 변화 등을 알아보기 위하여 얻어진 단핵세포를 액체 배양액에 2가지 용량의 G-CSF와 stem cell factor를 첨가하여 1일간, 7일간 및 10일간 배양한 후 methylcellulose 배지에 옮겨 다시 배양한 뒤 CFU-GM assay를 시행하여 그 결과를 비교하였다.

대상 및 방법

1. 골수 및 말초혈액의 단핵세포 수집

골수 침범이 없이 정상적인 골수 기능을 지닌 5명의 성인 악성 림프종(Hodgkin병 2명, 비Hodgkin 림프종 3명) 환자에서 후상장골극을 국소마취후 천자하여 15~20mL의 골수혈액을 얻었다. 또한 이들에 매일 G-CSF를 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 씩 3~4일간 투여한 후 또는 4~7g/ m^2 의 cyclophosphamide와 동일량의 mesna를 1회 투여후 1일 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 의 G-CSF를 주사하고 혈액내 백혈구수가 감소되었다가 10일 이후 정도에서 1,000/ μL 이상이 되었을 때 Cobe-Spectra apheresis system을 이용하여 약 10리터를 3시간에 걸쳐 처리하여 단핵세포를 분리하였다. 얻어진 2종류의 가검물에 보존제가 섞이지 않은 heparin 50U/mL을 혼합하여 원심으로 혈장을 분리하였고 수집된 혈구는 0.1% bovine serum albumin (BSA)을 함유한 phosphate buffered saline(PBS)으로 희석한 다음 Ficoll-Hypaque 용액에 서서히 넣은 후 3,000RPM으로 brake를 사용하지 않고 원심하여 단핵세포를 얻었다. 얻어진 단핵세포를 다시

0.1% BSA를 함유한 PBS에 넣어 1,200RPM으로 10분간 원심하여 상층부를 제거한 뒤 Isocove's modified Dulbecco's medium(IMDM)을 첨가하여 2회 이상 세척하였고 그 후 trypan blue 염색을 하여 생존해 있는 단핵세포의 수를 측정하였다.

2. 액상 배지의 조성

18mL의 액상 배지를 조성하였는데 1.8mL의 자가혈장, 0.18mL의 L-glutamine과 0.18mL의 penicillin 및 streptomycin 혼합액, 0.018mL의 2-mercaptoethanol에 15.822mL의 RPMI 1640을 넣어 최종 농도를 자가혈장이 10%, L-glutamine 1%, penicillin 및 streptomycin 혼합액 1%, 2-mercaptoethanol이 0.1%가 되도록 하였다. 조성된 18mL의 액상 배지를 6개의 culture flask에 3mL씩 분리하였다.

3. 조혈 성장인자 첨가와 단핵세포의 배양

조혈 성장인자는 stem cell factor(Terry Fox Laboratory, Vancouver, Canada)와 G-CSF(Filgrastim, Amgen, Thousand Oaks, CA, USA)를 사용하였다.

1개의 액상 배지는 성장인자를 넣지 않은 대조군으로 하고 5개의 culture flask에 각각 300ng의 stem cell factor(100ng/mL), 3,000U/mL G-CSF (1,000U/mL), 15,000U/mL G-CSF(5,000U/mL)를 넣은 단독 성장인자군 3개와 100ng/mL stem cell factor와 1,000U/mL G-CSF 및 100ng/mL stem cell factor와 5,000U/mL G-CSF를 함께 넣은 복합투여군 2개로 하여 각 군마다 생존 단핵세포를 각각 2×10^6 개씩 넣어 잘 혼든 후 37°C 5% CO₂ 존재하에 배양하였다. 배양 제1일, 7일, 10일에 trypan blue 염색으로 생존단핵세포의 수를 측정하였다.

4. Methylcellulose 반고형 배지의 조성

Methylcellulose 배지는 성장인자가 함유되지 않은 80mL의 Isocove's methylcellulose-ready mix without growth factors(HCC-4230, Terry Fox Laboratory, Vancouver, Canada)를 사용하였으며 HCC-4230은 30mL의 fetal calf serum과 10mL의

10% bovine serum albumin, 1%의 $10^{-2}M$ 2-mercaptoethanol 및 40mL의 2.3% Isovove's methylcellulose로 조성되어 있으므로 여기에 5mL의 phytohemagglutinin-leukocyte conditioned media (PHA-LCM Terry Fox Laboratory, Vancouver, Canada)와 1mL의 200mM L-glutamine 및 14mL의 IMDM을 첨가하여 100mL로 만들어 methylcellulose의 최종 농도를 0.9%가 되도록 한 후 vortex를 이용하여 골고루 섞은 다음 4mL씩 분리하여 냉동보관하였다.

5. 단핵세포의 methylcellulose media 배양

6개군으로 나누어 액상 배지에서 배양하고 있던 단핵세포를 배양 1일, 7일 및 10일째 trypan blue 염색으로 생존 단핵세포를 측정하여 각군에서 2×10^5 개씩 채취한 뒤 미리 만들어 냉동보관한 methylcellulose 배지를 37°C waterbath에 넣어 해동시킨 다음 2.2mL을 취하여 2×10^5 개의 단핵세포를 넣고 IMDM을 첨가하여 3.0mL이 되도록 한 후 충분히 혼들어 섞었다. 각군마다 2개의 10×35mm petri dish에 1mL 주사기와 blunt needle을 이용하여 1.1mL씩 서서히 도말하여 1개 petri dish 당 1×10^5 개의 단핵세포가 접종되도록 한 뒤 건조되지 않도록 증류수 1mL만 넣은 또 하나의 petri dish를 같이 넣어 1군당 3개씩의 petri dish가 되도록 하여 37°C 5% CO_2 배양기에 배양하였다.

6. CFU-GM 측정

배양 후 12~14일에 도립위상차 현미경을 이용하여 methylcellulose 배지에서 50개 이상의 과립구와 대식세포 및 그 전구세포가 모여 집락을 이룬 경우 colony로 간주하였고 각군마다 2개의 petri dish에 나타난 CFU-GM 수를 측정하여 평균하였다.

7. 통계

결과는 평균과 표준오차로 나타내었고 동일군간의 비교는 1 way Analysis of Variance(ANOVA)로 시행한 후 student t-test로 검증하였으며 골수와 말초혈액군간의 유의성 비교는 Paired t-test로 검증하여 P value가 0.05 미만인 경우 유의한 것으로 간주하였다.

결과

1. 1일간 성장인자와 접촉한 골수와 말초혈액 단핵세포의 CFU-GM

성장인자와 1일간 접촉한 골수 단핵세포의 CFU-GM은 대조군에 비해 전반적인 증가를 보였는데 통계적인 유의성은 100ng/mL의 stem cell factor+1,000U 및 5,000U/mL의 G-CSF 복합첨가군의 2군에서 관찰되었다(P value 0.018, 0.014) (Table 1). 표에 나타내지는 않았으나 각군별로 비

Table 1. CFU-GM of D1 Bone Marrow and Peripheral Blood Mononuclear Cells

	BM	P value	PB	P value
Control	34.20 ± 5.76		17.60 ± 8.07	
SCF	49.30 ± 8.92	>0.05	29.38 ± 14.00	>0.1
GCSF1	43.25 ± 8.88	>0.1	29.70 ± 13.86	>0.1
GCSF5	49.30 ± 9.78	>0.1	46.80 ± 22.69	>0.1
SGCSF1	81.63 ± 14.31	0.018	53.30 ± 19.82	>0.05
SGCSF5	73.90 ± 12.69	0.014	60.30 ± 28.30	>0.1

SCF : Stem cell factor 100ng/mL

GCSF1 : G-CSF 1,000U/mL

GCSF5 : G-CSF 5,000U/mL

SGCSF1 : Stem cell factor 100ng/mL + G-CSF 1,000U/mL

SGCSF5 : Stem cell factor 100ng/mL + G-CSF 5,000U/mL

교하였을 때 stem cell factor 군과 다른 군간에는 유의성이 나타나지 않았으나 1,000U/mL의 G-CSF 군에 비해 1,000U 및 5,000U/mL G-CSF+stem cell factor의 복합투여군 모두에서 CFU-GM의 유의한 증가를 볼 수 있었다(*P* value 0.035, 0.044). 반면 구동시킨 말초혈액 단핵세포의 CFU-GM 역시 대조군에 비해 성장인자 첨가군에서 증가를 보였으나 모든 군에서 통계적인 유의성은 나타나지 않았다. 그러나 성장인자의 단독투여군보다 복합적으로 같이 투여한 군에서 집락의 더 많은 증가를 나타내었다. 골수와 말초혈액군간을 비교하였을 때 모든 군에서 골수 단핵세포의 집락 형성이 말초혈액군보다 더 많이 형성되었음을 확인할 수 있었으나 통계적인 유의성은 없었다.

2. 7일간 성장인자와 접촉한 골수 및 말초혈액 단핵세포의 CFU-GM

골수 단핵세포의 CFU-GM은 1일간 접촉시킨 군에서와 유사하게 성장인자를 첨가시킨 군에서 전반적인 증가를 나타내었다. 대조군의 CFU-GM은 13.63개로 1일군보다 많이 감소되어 있었고 stem cell factor 군이 G-CSF 군보다 더 많은 CFU-GM을 형성하였다. 대조군과 비교하여 stem cell factor 군, 1,000U/mL의 G-CSF 군 및 5,000U/mL G-CSF+stem cell factor의 3개군에서 유의한 증가를 관찰할 수 있었다(*P* value 0.002, 0.044, 0.0002) (Table 2). 또한 stem cell factor 단독군과 다른 군간의 비교에서 5,000U/mL G-CSF+stem cell factor 군에서 유의한 증가를 볼 수 있었고(*P* value 0.002) 1,000U/mL의 G-CSF 군과 비교시에도

5,000U/mL G-CSF+stem cell factor 군에서 유의한 증가가 관찰되었다(*P* value 0.001). 그리고 말초혈액의 단핵세포 배양에서도 대조군에 비해 stem cell factor 및 1,000U와 5,000U/mL의 G-CSF 복합투여군에서 유의한 증가가 나타났으며(*P* value 0.029, 0.017) 1,000U/mL G-CSF 군과 복합투여군(*P* value 0.028, 0.02) 및 5,000U/mL G-CSF 군과 역시 복합투여군간에 유의한 집락형성의 증가(*P* value 0.047, 0.024)가 관찰된 반면 stem cell factor 군과 복합투여군을 서로 비교했을 경우나 1,000U/mL 및 5,000U/mL G-CSF의 용량 차이에 의한 유의한 변화는 보이지 않았고 골수와 말초혈액의 단핵세포에서 나타난 CFU-GM 역시 유의성이 있는 차이는 나타나지 않았다.

3. 10일간 성장인자와 접촉한 골수 및 말초혈액 단핵세포의 CFU-GM

골수 단핵세포의 배양에서 대조군에 비해 1,000U/mL G-CSF 첨가군을 제외한 나머지 4개군은 모두 집락의 유의한 증가가 나타났으며(Table 3) 성장인자 첨가군들을 비교하였을 때 복합투여군에서 G-CSF 농도가 5,000U/mL인 경우 1,000U/mL 보다 CFU-GM 증가의 유의성이 확인되었다(*P* value 0.039). 10일째 RPMI 용액에서 채집하여 검사한 말초혈액 단핵세포의 CFU-GM은 stem cell factor 군과 2인자의 복합투여군에서 역시 대조군보다 유의한 증가가 나타났으며(*P* value 0.019, 0.026, 0.025) stem cell factor와 G-CSF 군(*P* value 0.045) 사이, G-CSF 1,000U/mL 단독군과 복합투여군 및 1,000U와 5,000U/mL로 G-CSF의 용량을 달리한 군

Table 2. CFU-GM of D7 Bone Marrow and Peripheral Blood Mononuclear Cells

	BM	<i>P</i> value	PB	<i>P</i> value
Control	13.63± 4.31		21.90± 5.07	
SCF	41.63± 4.72	0.002	52.60± 15.95	>0.05
GCSF1	28.83± 5.25	0.044	31.70± 8.41	>0.1
GCSF5	50.50± 21.70	>0.05	34.20± 8.83	>0.1
SGCSF1	55.67± 17.84	>0.05	86.60± 24.01	0.029
SGCSF5	74.63± 5.94	0.0002	106.90± 26.72	0.017

Table 3. CFU-GM of D10 Bone Marrow and Peripheral Blood Mononuclear Cells

	BM	P value	PB	P value
Control	18.10 ± 12.15		16.88 ± 6.04	
SCF	44.70 ± 7.98	0.011	60.90 ± 14.70	0.019
GCSF1	30.13 ± 15.19	>0.1	27.80 ± 7.43	>0.1
GCSF5	35.80 ± 3.34	0.001	32.13 ± 9.47	>0.1
SGCSF1	31.63 ± 5.12	0.035	71.88 ± 19.40	0.02
SGCSF5	65.30 ± 14.39	0.015	95.63 ± 24.16	0.025

Table 4. Comparison of CFU-GM According to the Different Duration of Exposure with Growth Factors

	D1 & D7		D1 & D10		D7 & D10	
	BM	PB	BM	PB	BM	PB
Control	0.005*	0.312	0.030*	0.099	0.170	0.137
SCF	0.267	0.067	0.285	0.027*	0.365	0.139
GCSF1	0.056	0.407	0.057	0.443	0.461	0.263
GCSF5	0.461	0.266	0.128	0.205	0.218	0.369
SGCSF1	0.028*	0.035*	0.003*	0.089	0.043*	0.169
SGCSF5	0.479	0.016*	0.288	0.039*	0.301	0.251

*: P value < 0.05

간에서도 역시 CFU-GM의 유의한 증가가 관찰되었다(P value 0.045, 0.05, 0.027, 0.035). 10일간 성장인자와 접촉한 경우에도 조혈 전구세포의 기원에 따른 변화는 통계적 유의성을 찾을 수 없었다.

4. 성장인자와 접촉기간의 차이에 따른 CFU-GM 변화

골수 단핵세포의 배양시 성장인자를 넣지 않은 대조군에서 배양기간이 길어짐에 따라 집락의 감소가 뚜렷이 나타났으며 1,000U/mL의 G-CSF와 stem cell factor 복합투여군에서 집락의 감소가 나타난 것 이외에는 성장인자와 접촉기간에 따른 변화는 특별히 나타나지 않았다. 그리고 전반적으로 성장인자와 1일간 접촉한 군에서 가장 많은 집락의 형성이 관찰되었으나 통계적 유의성이 나타나지 않았다. 반면 말초혈액 단핵세포는 stem cell factor와 5,000U/mL의 G-CSF 군을 제외하고 모두 7일간 성장인자와 접촉한 군에서 가장 많은 집락의 형성이 관찰되었다. Stem cell factor와 G-CSF의 복합

투여군은 접촉기간이 1일에 비해 7일 및 10일 접촉시켰을 때 모두에서 1일간에 비해 유의한 증가를 관찰할 수 있었다(Table 4).

고 칠

말초혈액에도 조혈모세포가 존재한다는 사실이 알려진 후 이를 세포를 이용하여 이식을 하는 경우 생착이 더 조기에 일어나게 되므로^{5, 6)} 백혈구의 감소로 인한 심각한 감염의 위험을 줄일 수 있으며 골수천자의 필요성이 없어져 이로 인한 부작용도 사라지게 되었다. 반면 백혈구 분반법으로 얻은 조혈 전구세포의 양이 이식의 성공여부를 가리는 중요한 지표가 되며 포함된 CD34 양성세포나 CFU-GM의 수가 많을수록 조혈기능의 회복이 일어날 때까지 걸리는 기간이 단축되는 것으로 보고되어 있다^{26, 27)}. 그러므로 말초혈액으로 조혈 전구세포를 구동화하기 위한 방법에 대해 연구가 지속되어 cyclophosphamide를 4~7g/m²으로 투여한 후 말초

혈액의 백혈구가 증가되는 시점에서 백혈구 분반술을 일반적으로 3~4회 시행하여 충분한 양을 얻을 수 있다고 알려져 있다^{7, 8)}. 이러한 약물투여후 조혈전구세포의 수집법은 조혈기능의 억제기간 동안 감염의 기회가 증가되고 백혈구 회복이 일어나는 시점이 다양하므로 백혈구 분반법의 시작시점에 대한 정확한 계획의 수립이 어렵다는 등의 단점이 있지만 이식시 과립구와 혈소판의 회복이 11일 및 13.5일에 일어나게 되어 자가골수 이식의 22일 및 32일과 동종 골수이식의 24.5일 및 33일에 비해 유의하게 신속하다고 보고되어 있다^{28, 29)}. 근래에는 조혈 성장인자를 이용하여 조혈 전구세포를 말초혈액으로 이동시키는 방법이 주로 사용되고 있는데 이 경우 사용되는 조혈 성장인자로는 G-CSF^{9, 30)}, GM-CSF^{10, 31)}, IL-3 등³²⁾이 있으며 최근 stem cell factor와 G-CSF를 같이 투여하면 상승작용으로 효과의 극대화가 나타날 수 있어 말초혈액의 조혈 전구세포와 CFU-GM의 수를 훨씬 증가시키고 주로 높은 증식력을 지닌 원시적인 세포의 colony가 형성되므로 백혈구 분반술의 시행 횟수를 줄이면서 다수의 myeloid 및 megakaryocytic precursor를 얻을 수 있다고 보고되어 있다^{24, 25)}. 이외에도 Roman 등³³⁾은 GM-CSF와 IL-3의 fusion protein인 PIXY 321을 사용하여 조혈 전구세포를 구동화한 후 수집하여 투여하였을 때 혈소판이 20,000/ μL 이상으로 회복되는데 평균 13일밖에 걸리지 않아 혈소판 회복에 도움이 될 것이라 소개하였으며 또한 성장인자만 사용하는 것보다 고용량 화학요법후 회복기에 조혈 성장인자를 투여하면 말초혈액으로 조혈 전구세포가 정상상태의 약 1,000배 이상 구동화가 일어나고 화학요법만 단독으로 사용한 경우보다 10~50배 증가된다고 알려져 있다³⁴⁾. Lane 등³⁵⁾은 정상 공여자에 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 의 G-CSF와 동일량의 GM-CSF 및 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 의 G-CSF와 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 의 GM-CSF를 피하로 4일 투여한 뒤 5일째 백혈구 분반법을 실시하여 얻은 CD34⁺ 세포를 측정하였을 때 정상상태에서는 CD34⁺ 세포가 0.07%인데 비해 G-CSF군은 0.99%, GM-CSF 군은 0.25%였으며, G-CSF와 GM-CSF를 같이 투여한 군은 0.65%로 G-CSF 투

여가 GM-CSF 보다 효과적일 수 있다고 제시한 바 있다. 골수 대신 말초혈액의 조혈 전구세포를 이용한 이식에서 조혈 기능의 회복이 골수이식 때보다 더 신속히 일어나며 골수 재건 및 면역기능의 회복이 어느 정도 장기간에 걸쳐 지속된다고 보여지나 아직 불확실한 측면도 남아 있는 상태이다. 골수의 전구세포와 구동화된 말초혈액의 조혈 전구세포의 특성에도 차이가 있다고 알려져 있는데 말초혈액의 CD34⁺ 세포는 골수의 CD34⁺ 세포보다 CD33 및 CD13을 더 흔히 나타내며 또한 CFU-GM 보다 burst forming unit-erythroid(BFU-E)가 더 많이 함유되어 있는 반면 G-CSF를 투여한 경우 말초혈액에 CD34⁺ 세포의 수가 급격히 증가되나 이들 중 CD33, CD13 및 C-kit를 나타내는 세포의 비율은 G-CSF 투여 전에 비해 별 변화가 없었고 건강인의 말초혈액에 존재하는 CD34⁺ 세포와 환자에서 화학요법후 성장인자를 투여하여 얻은 CD34⁺ 세포의 비교에서 환자에서 구동화된 CD34⁺ 세포는 C-kit의 표현이 낮은 것을 제외하고는 유의한 변화는 보이지 않았다고 보고되어 있다¹⁶⁾. 그리고 제대혈과 조혈 성장인자 투여로 얻은 말초혈액 조혈 전구세포의 CD34⁺ 세포는 골수구 계열의 CD33, CD13이 약 90%에서 양성이며 3% 이상이 HLA-DR⁻ 및 CD38⁻인 반면 골수의 CD34⁺ 세포에서는 CFU-GM과 BFU-E가 풍부하며 제대혈과 골수세포의 CD34⁺ 세포에서 CD45R0⁺가 제대혈은 20%이나 골수세포에는 7%로 제대혈과 말초혈액에서 얻은 전구세포가 더 원시적일 것이라고 여겨지고 있다^{36, 37)}. 또한 같은 날 얻은 골수와 백혈구 분반술로 수집한 말초혈액에서 CD34⁺ 세포는 골수가 1.0%, 말초혈액이 1.4%로 말초혈액에서 1.4배 가량 더 많으나 C-kit의 발현은 적다는 보고도 있다¹⁷⁾.

본 연구에서 조혈 전구세포의 말초혈액으로 구동화에는 가장 널리 쓰여지고 있는 4~7 g/m^2 의 cyclophosphamide와 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 의 G-CSF 또는 G-CSF를 단독으로 투여하였으며 cyclophosphamide와 G-CSF 투여후 7일 정도에 백혈구수가 가장 최저치에 달하며 10일 이후부터 회복이 일어나게 되는데 백혈구수가 1,000/ μL 이상 되었을 때 백혈구

분반법을 시작하였다. 얻은 조혈 전구세포의 배양은 주로 methylcellulose 반고형 배지에서 행해지며 이들 세포의 clonogenic activity는 CFU-GM을 측정하여 평가할 수 있는데 CD34⁺ 세포의 수와 CFU-GM의 양은 비례하여 나타난다고 알려져 있다^{27, 28)}. 조혈 전구세포를 체외에서 배양할 때 성장의 자극을 목적으로 인혈청이나 우태혈청(fetal calf serum, FCS) 또는 human placenta conditioned media(HPCM), PHA-LCM 및 여러 성장인자들이 필요한데 각각에는 장단점이 있어 혈청을 사용하는 경우 혈청에 소량 존재할 수 있는 여러 cytokine과 세포들에 의해 영향을 받을 수 있어 serum free media가 필요할 수도 있으나 자가혈청을 첨가하므로써 증폭의 정도가 증가될 수 있고 오히려 활성도의 변화가 적으며 megakaryocyte 집락의 형성도 증가된다는 장점과 더불어 본 연구에서 얻은 조혈 전구세포를 체외 증식시킨 후 다시 환자에게 투여한다는 것을 전제로 하였기에 자가 혈청을 사용함으로써 그로 인한 부작용을 최소화할 수 있도록 하였다. Bruyn 등³⁹⁾은 제대혈을 체외 배양하여 IL-3, IL-6, GM-CSF 및 stem cell factor의 성장 인자를 투여하여 CFU-GM에 미치는 영향을 관찰하였는데 이들 성장인자 투여군에서 HPCM을 사용하였을 때 많은 집락이 형성됨을 관찰하였으며 제대혈이 골수 세포보다 CFU-GM의 증가가 뚜렷하였고 FCS를 첨가한 군이 첨가하지 않은 군보다 집락의 형성이 억제됨을 확인하여 FCS 내에 CFU-GM 형성에 억제를 일으키는 물질의 존재 가능성과 transforming growth factor β (TGF β)가 억제 인자의 일부일 것이라고 보고한 바 있다.

조혈 전구세포를 체외에서 증식시킬 때 IL-1 β , IL-3, IL-6, G-CSF, GM-CSF 및 stem cell factor를 같이 사용한 경우에서 가장 강력한 효과가 나타났으며 CFU-GM 형성은 배양 14일째 약 66배로 증가됨을 관찰하였다는 보고도 있다^{40, 41)}. 이와는 대조적으로 tumor necrosis factor α (TNF α)²⁰⁾나 TGF β ^{21, 22)} 및 interferon γ ²³⁾, macrophage inflammatory protein(MIP) 등⁴²⁾은 CFU-GM 형성을 억제하는 기능을 나타내어 성장인자와 상호보완적

으로 잘 조화된 조혈 기능을 유지시키도록 조절하고 있다^{20~23)}.

본 연구에서는 조혈 전구세포를 RPMI 1640 액체 배양액에 넣고 자가 혈청을 10%가 되도록 넣은 후 G-CSF와 stem cell factor를 첨가하여 그로 인해 나타나는 상승작용을 CFU-GM의 집락 증가를 통해 관찰하고자 하였다. 또 G-CSF는 별다른 부작용이 없이 안전범위가 넓으며 용량에 비례하는 효과가 있다고 알려져 있는데 일반적으로 백혈구의 증가를 일으키기 위해서 G-CSF를 사용할 경우 1일 4~8 μ g/kg 범위가 가장 널리 사용되고 있어⁴³⁾ 이를 확인하기 위하여 1,000U/mL 및 5,000U/mL로 용량을 달리한 G-CSF를 액체 배양액에 첨가하여 영향을 평가하였다. 액상 배지에 배양하는 경우 매주마다 일정량의 성장인자와 medium을 첨가하거나 2일마다 medium을 바꾸어줌으로써 성장인자의 효과를 극대화시킬 수 있다는 사실도 보고되어 있다^{44, 45)}. 본 연구는 골수 및 말초혈액의 단핵세포를 액체 배양에 넣어 성장인자와의 접촉기간을 달리하였을 때 나타나는 CFU-GM 집락형성 능력을 관찰하여 체외 증폭에 필요한 적정기간을 평가하기 위하여 1일간, 7일간, 10일간 접촉시킨 3개의 군으로 나누어 이들간에 나타나는 변화를 비교분석하였다. 골수 단핵세포를 성장인자와 1일간 접촉시켰을 때에도 대조군보다 모든 군에서 CFU-GM의 증가가 나타났으며 특히 G-CSF와 stem cell factor의 두 가지 성장인자와 접촉한 군에서 한가지 성장인자와 접촉한 군보다 CFU-GM의 증가가 두드러졌으며 유의성도 관찰되었지만 stem cell factor 군과 G-CSF 단독군보다 성장인자를 복합적으로 첨가한 군에서 유의성을 보여 1일간 접촉하였을 때에도 성장인자의 효과가 시작되며 복합사용으로 인한 효과의 증대를 나타내었다. 반면 말초혈액에서는 1일간 성장인자와 접촉한 경우 역시 대조군에 비해 CFU-GM의 증가가 나타났으나 통계적인 유의성은 없었다. 7일간 접촉하였을 때에는 골수 단핵세포에서 stem cell factor 군에서 CFU-GM의 유의한 증가가 나타났고 말초혈액 단핵세포는 복합적인 성장인자 투여군에서 유의성이 관찰되었으며 10일간 접촉한

경우 골수 단핵세포는 1,000U/mL 군을 제외한 모든 군에서, 말초혈액 단핵세포는 G-CSF의 2개군을 제외한 나머지 군에서 유의성이 있는 증가를 보였으나 골수와 말초혈액 단핵세포간을 비교하였을 때 유의한 차이가 나타나는 군은 없었다. 접촉기간의 차이에 따른 변화는 1일간과 7일간, 1일간과 10일간, 7일간과 10일간을 비교하여 1일간과 7일간 사이에는 유의한 증가를 보인 경우가 많았으나 7일간 및 10일간을 비교한 경우 두 군간에 차이는 보이지 않았다. 이상의 결과로 성장인자의 복합사용시 효과가 더욱 커지며 골수군에서 효과가 더 빠른 것으로 나타났고 G-CSF의 농도차에 의한 변화는 10일간 배양한 복합투여군에서만 관찰되었다. 검사 예수가 많지는 않으나 이상의 결과 G-CSF의 투여량에서 4,000U/mL 정도의 차이로는 그 효과의 변화가 뚜렷하지 않다고 보여지며 또한 골수 단핵세포를 체외에서 배양할 때 성장인자와 하루만 접촉하여도 CFU-GM의 유의한 증가가 나타날 수 있으나 효과를 더 한층 높이기 위해서는 성장인자의 혈중 반감기를 고려하여 지속적으로 성장인자를 투여함과 동시에 새로운 배지의 교환이 필요할 수 있다고 판단되었다. 이에 반해 말초혈액의 단핵세포는 성장인자와 7일간 접촉하였을 때 효과가 가장 높이 나타났는데 이렇게 골수 단핵세포가 말초혈액의 단핵세포보다 효과가 신속하게 나타난 양상은 말초혈액으로 구동화가 일어난 단핵세포가 골수의 단핵세포보다 더 원시적이고 미분화되어 있다는 보고와 일치하는 소견일 수도 있다고 보여진다. 조혈모세포의 생체외 배양을 통하여 증식시킨 후 이식을 하는 경우 제대혈에서와 같이 한정된 조혈 전구세포를 얻을 수밖에 없거나 드문 조직 적합형을 지닌 환자에서의 동종이식, 생착이 되지 않은 경우 골수 천자로 다시 전구세포를 얻어야 할 필요성이 없어지며 반복적인 고용량 화학요법을 추가의 골수나 조혈모세포를 얻지 않아도 가능해지는 외에도 유전자 치료 등 응용의 대상이 계속 넓어질 것으로 보이며 앞으로 조혈 전구세포를 기능의 손실이 없이 체외 증식할 때 증식에 가장 적합한 배지의 조성, 성장인자의 선정 및 배양기간 등에 대한 연구가 지

속되어야 할 것으로 기대된다.

요 약

배경 : 근래 여러 질병에 말초혈액의 조혈모세포를 이용한 이식치료가 널리 이용되고 있으며 이들 조혈모세포를 체외에서 증식시킨 후 환자에 투여하는 방법도 개발되어 있다. 골수와 말초혈액에서 얻은 조혈 전구세포들의 성상에는 차이가 있다고 보고되어 있어 동일인에서 골수와 말초혈액에서 단핵세포를 얻어 stem cell factor와 용량을 달리한 G-CSF를 사용하여 체외 증식을 하므로써 골수와 말초혈액 단핵세포간에 동일한 조건에서 증식을 하였을 때 차이가 있는지와 G-CSF의 용량 차이에 의한 변화를 알아보았으며 또한 체외 증식시 단핵세포와 성장인자간의 접촉기간에 차이를 두어 나타나는 CFU-GM의 변화를 비교하고자 하였다.

방법 : 골수의 침범이 없는 5명의 악성 림프종 환자를 대상으로 골수천자로 얻은 골수혈액과 cyclophosphamide 및 G-CSF를 투여하여 조혈 전구세포를 구동화시킨 후 백혈구 분반법을 통해 얻어진 말초혈액을 Ficoll-Hypaque로 단핵세포를 분리하였다. RPMI 1640 액체 배양액에 자가혈청을 10%가 되도록 첨가하고 성장인자를 넣지 않은 대조군과 100ng/mL의 stem cell factor 군, 1,000U/mL G-CSF 군, 5,000U/mL G-CSF 군, 100ng/mL stem cell factor + 1,000U/mL G-CSF 군 및 100ng/mL stem cell factor + 5,000U/mL G-CSF 군의 6개군으로 나누어 각각 2×10^6 개의 단핵세포를 넣어 배양한 뒤 배양 제1일, 7일 및 10일에 성장인자를 넣지 않은 methylcellulose 반고형 배지에 PHA-LCM을 첨가한 후 1×10^5 개의 단핵세포를 접종배양하여 CFU-GM을 측정하였다.

결과 :

- 1) 성장인자와 1일간 접촉한 골수 단핵세포의 CFU-GM은 대조군에 비해 유의한 증가를 보인 반면 말초혈액 단핵세포 역시 증가를 보였으나 통계적으로 유의하지는 않았다. 또한 성장인자는 복합적으로 투여한 군에서 단독군보다 유의한 집락의

증가가 관찰되었다.

2) 7일간 접촉한 경우 역시 전반적인 CFU-GM의 증가가 있었으며 골수와 말초혈액의 단핵세포 두군 모두 복합적으로 성장인자를 투여하였을 때 CFU-GM의 유의한 증가를 나타내었다.

3) 10일간 성장인자와 접촉한 군에서도 유사한 결과를 얻었으며 5,000U/mL의 G-CSF 군에서 1,000U/mL G-CSF 군보다 CFU-GM의 유의한 증가가 관찰되었다.

4) 성장인자와 접촉기간의 차이에 따른 변화는 대조군에서 시간이 지남에 따라 집락의 감소가 나타난 반면 골수는 성장인자와 1일간 접촉시, 말초혈액 단핵세포는 7일간 접촉한 경우 가장 많은 CFU-GM을 형성하는 경향을 볼 수 있었다.

결 론 : 골수와 말초혈액 단핵세포간에 CFU-GM 형성에 있어 별다른 차이는 없었으나 양군 모두 stem cell factor와 G-CSF에 의해 증가가 나타났으며 복합적으로 사용한 경우 효과는 상승되었고 투여한 G-CSF의 양이 많을수록 CFU-GM의 증가가 관찰되었다. 골수 단핵세포는 1일간 접촉한 군에서, 말초혈액 단핵세포는 7일간 접촉한 군에서 가장 많은 CFU-GM이 형성되었다. 골수와 말초혈액의 단핵세포 양자 모두 체외 배양시 성장인자의 영향이 뚜렷하였고 양군간에 유의한 차이는 나타나지 않았다.

참 고 문 헌

- 1) Gatti RA, Neuwissen HJ, Allen HD, Hong R, Good RA : *Immunological reconstitution of sex-linked lymphopenic immunological deficiency*. *Lancet* 2:1366-1369, 1968
- 2) Storb R, Thomas ED, Buckner CD, Clift RA, Johnson FL, Fefer A : *Allogeneic marrow grafting for treatment of aplastic anemia*. *Blood* 43:157-180, 1974
- 3) Appelbaum FR, Herzig GP, Ziegler JL, Graw RG, Levine AS, Deisseroth AB : *Successful engraftment of cryopreserved autologous bone marrow in patient with malignant lymphoma*. *Blood* 52:85-95, 1978
- 4) Stewart P, Buckner CD, Thomas ED, Bagley C, Bensinger L, Clift RA : *Intensive chemotherapy with autologous bone marrow transplantation for small cell carcinoma of the lung*. *Cancer Treat Rep* 67:1055-1059, 1983
- 5) Castaigne S, Calvo F, Douay L, Thomas F, Benbunan M, Gerota J, Degos L : *Successful hematopoietic reconstitution using autologous peripheral blood mononuclear cells in a patient with acute promyelocytic leukemia*. *Br J Haematol* 63:209-211, 1986
- 6) Kessinger A, Armitage JO, Landmark JD, Weisenburger DD : *Reconstitution of human hematopoietic function with autologous cryopreserved circulating stem cells*. *Exp Hematol* 14:192-196, 1986
- 7) Kessinger A, Armitage JO, Smith DM, Landmark JD, Bierman PJ, Weisenburger D : *High dose therapy and autologous marrow and peripheral blood stem cell transplantation for patients with lymphoma*. *Blood* 74:1260-1265, 1989
- 8) To LB, Shepperd KM, Haylock DN, Dyson PG, Charles P, Thorp DL, Dale DM, Dart GW, Rogers MM, Sage RE, Juttner CA : *Single high dose of cyclophosphamide enable the collection of high numbers of stem cells from the peripheral blood*. *Exp Hematol* 18: 442-447, 1990
- 9) Sheridan W, Begley CG, Juttner CA, Szer J, To LB, Maher D, McGrath KM, Morstyn G, Fox RM : *Effect of peripheral blood progenitor cells mobilized by filgrastim(G-CSF) on platelet recovery after high dose chemotherapy*. *Lancet* 1:640-644, 1992
- 10) Peters WP, Rosner G, Ross M, Vredenburgh J, Meisenberg M, Gilbert C, Kurzberg J : *Comparative effects of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor(GM-CSF) and granulocyte colony-stimulating factor(G-CSF) on priming*

- peripheral blood progenitor cells for use with autologous bone marrow after high dose chemotherapy. Blood 81:1709-1719, 1993*
- 11) Haylock DN, To LB, Lowse CA, Juttner CA, Simmons PJ : *Ex vivo expansion and maturation of peripheral blood CD34+ cells into the myeloid lineage. Blood 80:1405-1412, 1992*
- 12) Brugger W, Heimfeld S, Berenson R, Mertelsmann R, Kanz L : *Reconstitution of hematopoiesis after high dose chemotherapy by autologous progenitor cells generated ex vivo. N Engl J Med 333:283-287, 1995*
- 13) Gluckman E, Broxmeyer HE, Auerbach AD, Friedman HS, Douglas GW, Esperou H, Thierry D, Socie G, Lehn P : *Hematopoietic reconstitution in a patient with Fanconi anemia by means of umbilical cord blood from an HLA-identical sibling. N Engl J Med 321: 1174-1178, 1989*
- 14) Berenson RJ, Bensinger WI, Hill RS, Andrew RG, Garc-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) Russell NH, Hunter AE, Rogers S, Hanley J, Anderson D : *Peripheral blood stem cell as an alternative to marrow for allogeneic transplantation. Lancet 341:1482-1485, 1993*
- 16) Suzuki T, Muroi K, Tomizuka H, Amemiya Y, Miura Y : *Characterization of enriched CD34+ cells from healthy volunteers and those from patients treated with chemotherapy plus granulocyte colony-stimulating factor(G-CSF). Stem Cells Dayt 13:273-280, 1995*
- 17) Haas R, Mohle R, Pforsich M, Fruechauf S, Witt B, Goldschmidt H, Hunstein W : *Blood derived autografts collected during colony-stimulating factor-enhanced recovery are enriched with early Thy-1 +hematopoietic progenitor cells. Blood 85:1936-1943, 1991*
- 18) 조도연, 김현수, 박상준, 김종숙, 최지영, 윤환중, 김삼용 : *골수세포의 단기 배양을 통한 조혈 전구세포의 증폭. 대한혈액학회지 31:259-274, 1996*
- 19) McNiece IK, Langely KE, Zsebo KM : *Recombinant human stem cell factor synergizes with GM-CSF, G-CSF, IL-3 and Epo to stimulate human progenitor cells of myeloid and erythroid lineages. Exp Hematol 19:226- 231, 1991*
- 20) Strife A, Lambek C, Perez A, DarzynKiewicz Z, Skierski J, Gulati S, Haley JD, ten Dijke P, Iwata KK, Clarkson BD : *The effect of transforming growth factor beta 3 on the growth of highly enriched hematopoietic progenitor cells derived from normal human bone marrow and peripheral blood. Cancer Res 51: 4828-4836, 1991*
- 21) Sargiacomo M, Valtieri M, Gabbianelli M, Pelosi E, Testa U, Camagna A, Peschle C : *Pure human hematopoietic progenitors : direct inhibitory effect of transforming growth factors-beta 1 and -beta 2. Ann N Y Acad Sci 628:84-91, 1991*
- 22) Geissler RG, Ottmann OG, Eder M, Kojouharoff G, Hoelzer D, Ganser A : *Effect of recombinant human transforming growth factor beta and tumor necrosis factor alpha on bone marrow progenitor cells of HIV-infected persons. Ann Hematal 62: 151-155, 1991*
- 23) Selleri C, Maciejewski JP, Sato T, Young NS : *Interferon-gamma constitutively expressed in the stromal microenvironment of human marrow cultures mediates potent hematopoietic inhibition. Blood 15:4149-4157, 1996*
- 24) Briddell RA, Hartley CA, Smith KA, McNiece IK : *Recombinant rat SCF synergizes with recombinant human G-CSF in vivo to mobilize PBPCs which have enhanced repopulating potential. Blood 82:1720-1723, 1993*
- 25) De Revel T, Appelbaum FR, Storb R, Schuening F, Nash R, Deeg J, McNiece IK,

- Andrews R, Graham T : Effects of granulocyte colony stimulating factor and stem cell factor, alone and in combination on the mobilization of peripheral blood cells that engraft lethally irradiated dogs. *Blood* 83:3795-3799, 1994
- 26) Sienna S, Bregni M, Brando B, Belli N, Ravagnani F, Gandola L, Stern AC, Lansdorf PM, Bonadonna G, Gianni M : Flow cytometry for clinical estimation of circulating hematopoietic progenitors for autologous transplantation in cancer patients. *Blood* 77: 400-406, 1991
- 27) Rawley SD, Zuehlsdorf M, Braine HG, Colvin DM, Davis J, Jones RJ, Saral C, Sensenbrenner LL, Yeager A, Santos GW : CFU-GM content of bone marrow graft correlates with time to hematologic reconstitution following autologous bone marrow transplantation with 4-hydroxycyclophosphamide-purged bone marrow. *Blood* 70:271-275, 1987
- 28) Juttner CA, To LB, Roberts MM : Comparison of hematologic recovery, toxicity and supportive care of autologous PBSC, autologous BM, and allogeneic BM transplants. *Int J Cell Cloning* 10:160-168, 1992
- 29) Shpall EJ, Jones BB : Mobilization and collection of peripheral progenitor cells for support of high dose cancer therapy. In : Forman SJ, Blume KG, Thomas ED eds. *Bone Marrow Transplantation*. Boston, Blackwell Scientific Publications pp913-918, 1994
- 30) Dreger P, Suttorp M, Haferlach T, Loeffler M, Schmitz N, Schroyens W : Allogeneic granulocyte colony-stimulating factor-mobilized peripheral blood progenitor cells for treatment of engraftment failure after transplantation. *Blood* 81:1404-1407, 1993
- 31) Gianni AM, Siena S, Bregni M, Tarella C, Stern AC, Pileri A, Bonadonna G : Granulocyte, macrophage colony-stimulating factor to harvest circulating hematopoietic stem cells for autotransplantation. *Lancet* 2:580-586, 1989
- 32) Vose JM, Kessinger A, Bierman P, Sharp G, Garrison L, Armitage JO : The use of rh-IL-3 for mobilization of peripheral blood stem cells in previously treated patients with lymphoid malignancies. *Int J Cell Cloning* 10:62-64, 1992
- 33) Roman US, Biltran JD, Garrison L, Proeschel C, Hanauer S, Schroeder L, Johnson L, Klein L, Martinec J : A phase II study of cyclophosphamide followed by PIXY 321 as a mean of mobilizing peripheral blood progenitor cells. *Exp Hematol* 24:823-828, 1996
- 34) Demirer T, Buckner CD, Bensinger WI : Optimization of peripheral blood stem cell mobilization. *Stem Cells* 14:106-116, 1996
- 35) Lane TA, Law P, Maruyama M, Young D, Burgess J, Mullen M, Mealiffe M, Terstappen LW, Hardwick A, Moubayed M, Oldham F, Corringham R, Ho AD : Harvesting and enrichment of hematopoietic progenitor cells mobilized into the peripheral blood of normal donors by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor(GM-CSF) or G-CSF : potential role in allogeneic marrow transplantation. *Blood* 85:275-282, 1995
- 36) Steen R, Tjonnefjord GE, Egeland T : Comparison of the phenotype and clonogenicity of normal CD34+ cells from umbilical cord blood, granulocyte colony-stimulating factor-mobilized peripheral blood, and adult human bone marrow. *J Hematotherapy* 3:253-262, 1994
- 37) Kinniburgh D, Russel NH : Comparative study of CD34-positive cells and subpopulations in human umbilical cord and bone marrow. *Bone Marrow Transplant* 12:489-494, 1993
- 38) Serke S, Sauberlich S, Abe Y, Huhn D : Analysis of CD34 positive hematopoietic progenitor cells from normal human adult peripheral blood : flow-cytometrical and in vitro colony studies. *Ann Hematol* 62:45-53, 1991

- 39) De Bruyn C, Delforge A, Bron D, Ley P, de Hemptinne D, Stryckmans P : *Modulation of human cord blood progenitor cell growth by recombinant human interleukin 3(IL-3), IL-6, granulocyte-macrophage colony stimulating factor(GM-CSF) and stem cell factor(SCF) in serum supplemented and serum-free medium.* *Stem Cells Dayt* 12:616-625, 1994
- 40) Haylock DN, To LB, Dowse TL, Juttner CA, Simmons PJ : *Ex vivo expansion and maturation of peripheral blood CD34+ cells into the myeloid lineage.* *Blood* 15:1405-1412, 1992
- 41) McNiece IK, Andrews K, Stewart M, Clark S, Boone T, Quensenberry P : *Action of interleukin-3, G-CSF, and GM-CSF on highly enriched human hematopoietic progenitor cells : Synergistic interaction of GM-CSF plus G-CSF.* *Blood* 74:110-114, 1989
- 42) Broxmeyer HE, Sherry B, Cooper S, Lu L, Maze R, Beckmann MP, Cerami A, Ralph P : *Comparative analysis of the human macrophage inflammatory protein family of cytokines(chemokines) on proliferation of human myeloid progenitor cells. Interacting effects involving suppression, synergistic suppression, and blocking of suppression.* *J Immunol* 15:3448-3458, 1993
- 43) Laughlin MJ, Kirkpatrick G, Sabiston N, Peters W, Kurtzburg J : *Hematopoietic recovery following high-dose combined alkylating-agent chemotherapy and autologous bone marrow support in patients in phase I clinical trials of colony-stimulating factor, G-CSF, GM-CSF, IL-1, IL-2, M-CSF.* *Ann Hematol* 67:267-276, 1993
- 44) Lemoli RM, Gulati SC : *Effect of stem cell factor(C-kit ligand) granulocyte-macrophage colony stimulating factor and interleukin-3 on hematopoietic progenitors in human long-term bone marrow culture.* *Stem Cells Dayt* 11: 435-444, 1993
- 45) Koller MR, Palsson MA, Monchel I, Palsson BO : *Long-term culture initiating cell expansion is dependent on frequent medium exchange combined with stromal and other accessory cell effects.* *Blood* 86:1784-1793, 1995