

말초혈액 단핵세포의 CFU-GM 및 CD34 세포에 대한 조혈성장인자의 효과

계명의대 내과학교실 및 의과학연구소

권 기 영

= Abstract =

Influences of Hematopoietic Growth Factors on CFU-GM and CD34 Positive Cells of Mobilized Peripheral Blood Progenitors

Ki Young Kwon, M.D.

Department of Internal Medicine, and Institute for Medical Science
Keimyung University College of Medicine, Taegu, Korea

Background : Peripheral blood progenitor cells(PBPC) mobilized by hematopoietic growth factors such as G-CSF or GM-CSF are increasingly being used instead of bone marrow to allow hematopoietic reconstitution after myeloablative therapy for variety of malignancies. *Ex vivo* expansion of PBPC with growth factors leads marked increase in CFU-GM and CD34⁺ cells. To define the influence of G-CSF and stem cell factor alone and in combination on *in vitro* culture of PBPC, and to address the question of optimal duration of exposure with growth factors and the effects of G-CSF according to dosages, mobilized progenitors were incubated in liquid media containing autologous serum, stem cell factors and different dose of G-CSF. After 1, 7 and 10 day culture, viable cells were collected and inoculated to methylcellulose media, CFU-GM assay and evaluation of CD33 and CD34 positive cells were done.

Method : PBPC were obtained from 10 patients by apheresis using COBE Spectra after chemotherapy with or without G-CSF. After Ficoll Hypaque separation, viable 2×10^6 PBPC were incubated in each 6 sets of RPMI media containing 10% autologous serum and addition of 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 of G-CSF, 100ng/mL stem cell factor + 5,000U/mL G-CSF in each culture flask and control group which didn't contain any growth factor. After 1, 7 and 10 day of culture, viable cells were collected and 1×10^5 cells were seeded in methylcellulose media containing PHA-LCM and were cultured in duplicate. After 14 day incubation, aggregated with over 50 cells were scored as colony. And 1 day and 10 day of

culture of control group and 10 day culture of stem cell factor + 5,000U/mL G-CSF group, 1×10^5 cells were also collected for evaluation of CD33 and CD34 positive cells using flow cytometry.

Result : CFU-GM were significantly increased even in 1 day exposure with combination of stem cell factor and G-CSF and there showed synergistic effect of stem cell factor and G-CSF. Seven day exposure with growth factor also represented similar increase in CFU-GM. In 10 day exposure of PBPC with growth factor showed significant increase in CFU-GM except 1,000ng/mL G-CSF group. The peak increase of CFU-GM was noted on 7 day culture with G-CSF+stem cell group and on 10 day culture of stem cell group. Number of CD33 & CD34 positive cells were increased in growth factor group and most of them were $CD33^+$ $CD34^+$ cells. There revealed significant positive correlation between $CD34^+$ cells and day 14 CFU-GM.

Conclusion : G-CSF and stem cell factor act synergistically and their action on ex vivo expansion of PBPC was prominent even in 1 day exposure with stem cell factor and G-CSF. $CD34^+$ cells were also increased under the effect of growth factors and showed good positive correlation with CFU-GM.

Key Words : Peripheral blood mononuclear cell, Stem cell factor, G-CSF, CFU-GM, CD34 positive cell

서 론

골수 이외에 말초 혈액에도 조혈전구세포가 소량이나마 존재하므로 이를 얻어 환자에 이식 치료를 할 수 있으며 골수 기능의 완전한 회복을 가져올 수 있다는 보고^{1~3)}가 있는 아래 조혈전구세포가 백혈병 또는 림프종 환자의 치료 후 회복기나 고령 종양 환자의 항암화학요법 후 말초 혈액에 다수 나타난다는 사실이 확인되어 이를 이용한 자가 이식이 여러 질병의 치료에 널리 쓰여지고 있다^{4~8)}. 그리고 Dreger 등⁹⁾이 동종 골수이식 치료를 받은 백혈병 환자에서 생착이 일어나지 않은 경우 말초 혈액의 조혈전구세포를 다시 투여하여 회복이 가능해짐을 보고한 뒤 자가 이식외에 말초 혈액의 조혈전구세포를 이용한 동종 이식이 각광을 받기에 이르렀다¹⁰⁾. 백혈구 분반법을 이용한 조혈전구세포의 수집이 골수 천자로 얻을 때보다 부작용도 적을 뿐만 아니라 이식 후 혈소판이나 백혈구의 회복이 골수이식보다 더 신속히 일어난다는 점과 조혈 및 면

역 기능의 재건이 장기간에 걸쳐 확고하게 유지된다는 사실도 잘 알려져 있다^{6~8, 10)}. COBE Spectra 나 Fenwell CS-3000 등을 이용하여 백혈구 분반법으로 단핵세포를 얻어 일반적으로 체중 kg당 약 $4 \sim 6 \times 10^8$ 개를 이식에 이용한다. 이를 세포로 인해 조혈 기능의 회복에 이르는 기간은 얻어진 세포 중 granulocyte, macrophage colony forming unit (CFU-GM)^{12~14)}나 CD34 양성세포의 수^{13, 14)}가 많을수록 비례하여 그 기간이 단축되는 것으로 보고되어 있다. 조혈전구세포를 수집할 때 특별한 약제 등을 사용하지 않고 일상적인 상태에서도 얻을 수 있지만 이는 말초 혈액으로 전구세포의 가동에 대한 개념이 개발되기 전에 이루어졌거나³⁾ 과거 광범위한 치료로 인해 전구세포의 가동이 일어나지 않는 경우 및 악성 종양에 의한 골수의 전이나 오염이 심하게 진행되었을 때 등에서만 일부 시도되고 있을 뿐이다^{15, 16)}. 근래 고용량의 cyclophosphamide 등을 투여한 후 백혈구가 감소되었다가 증가할 때 백혈구 분반법으로 조혈전구세포를 수집하면 일상적인 상태에서 얻을 때보다 더 많은 CFU-GM 양

을 수집할 수 있으며^{17, 18)} 이식 후 과립구와 혈소판의 회복이 더 일찍 일어난다는 사실을 알게 되었고¹⁹⁾ 또한 조혈 성장인자인 granulocyte colony stimulating factor(G-CSF)^{11, 20)}나 granulocyte, macrophage, colony stimulating factor(GM-CSF)²¹⁾ 및 interleukin-3 (IL-3) 등²²⁾을 일정 기간 투여하였을 때 말초 혈액으로 조혈전구세포가 이동하게 되므로 많은 양의 수집을 한층 더 용이하게 할 수 있게 되었다. 조혈모세포는 자가 복제와 증식 및 분화 등을 거쳐 성숙된 혈구로 진행하게 되는데 이 과정에서 많은 수의 조혈 성장인자들이 골수의 미세 환경들과 더불어 상호보완적으로 작용하여 면밀히 조절되고 있으며²³⁾ 이들 성장인자들은 각각의 독자적인 기능 이외에도 서로 복합적으로 작용하였을 때 월등한 상승 작용을 나타낼 수 있어 erythropoietin, G-CSF, GM-CSF, stem cell factor(SCF) 및 interleukin 등을 같이 사용하는 경우 효과가 증대된다고 알려져 있다^{24, 25)}. 조혈모세포의 특성 등에 관한 연구를 하기 위해서는 이들 세포를 체외에서 배양하여 실험이 이루어져야 하는데 비교적 단기간을 배양하는 경우에는 주로 methylcellulose를 주성분으로 하는 반고형 배양법이 이용되고 장기간에 걸친 배양에는 stroma를 사용한 Dexter liquid culture 가 주로 쓰여지고 있다^{26, 27)}. 이들 세포의 생존 여부와 조혈 기능의 보존 및 재생 능력을 판정하는 방법으로는 반고형 배지에서 증식된 CFU-GM을 측정하거나 유세포분석기(flow cytometry)를 통해 CD34 양성을 나타내는 세포를 관찰하여 확인하는 방법이 널리 사용되고 있다^{12~15)}. 저자는 항암제와 G-CSF를 투여하여 말초 혈액으로 가동화가 일어난 조혈전구세포를 백혈구 분반법을 이용하여 얻은 후 생존한 단핵세포를 분리한 다음 10%의 자가 혈장을 포함한 RPMI 액체 배양액에 SCF와 1,000U/mL 및 5,000U/mL로 농도를 달리한 G-CSF를 넣은 단독군 및 이들을 복합적으로 넣은 5개군과 성장인자를 넣지 않은 대조군의 6개군으로 나누어 2×10^6 개의 단핵세포를 액체 배양액에서 배양하였다. 그리고 성장인자와의 접촉 기간에 차이를 주었을 때 일어나는 변화를 알아보기 위하여 단핵세포

를 액체 배양액에 1일, 7일 및 10일간 기간을 달리 하여 배양한 후 methylcellulose 배지에 옮겨 CFU-GM을 측정하였으며 또한 CD33 및 CD34 양성 세포의 변화를 관찰함으로써 조혈 성장인자의 효과 및 G-CSF의 농도 차와 조혈 성장인자와의 접촉 기간에 따른 변화 등을 비교하였다.

재료 및 방법

1. 말초 혈액 단핵세포 분리

9명의 악성 림프종과 1명의 유방암 환자 등 10명에서 cyclophosphamide나 etoposide 투여 후 백혈구가 감소되었다가 1,000/ μ L 이상으로 증가되는 시점부터 또는 G-CSF를 1일 10 μ g/kg의 양으로 4일간 주사한 후 COBE Spectra apheresis system (Lakewood, CO, USA)을 이용하여 백혈구를 분리하였다. 얻어진 가검물 중 10mL을 원심하여 혈청을 분리하였고 수집된 혈구를 0.1% bovine serum albumin(BSA)을 함유한 phosphate buffered saline (PBS)으로 희석시킨 다음 비중이 1.078을 넘지 않는 Ficoll-Hypaque 용액에 서서히 첨가시킨 후 3,000 RPM으로 30분간 원심하여 단핵세포를 얻었다. 단핵세포를 다시 PBS와 0.1% BSA에 넣어 1,200 RPM으로 10분간 원심하여 상층부를 제거한 뒤 Isocove's modified Dulbucco's medium (IMDM)을 첨가하여 2회 세척한 후 trypan blue 염색으로 생존 단핵세포의 수를 측정하였다.

2. RPMI 액상 배지 조성

18mL의 액상 배지를 만들어 3mL씩 6개의 culture flask에 나누었는데 액상 배지는 RPMI 1640 15.822mL에 1.8mL(10%)의 자가 혈장, 0.18mL(1%)의 L-glutamine, penicillin 및 streptomycin 혼합액 0.18mL(1%)와 0.018mL(0.1%)의 2-mercaptoethanol을 혼합하여 조성하였다.

3. 조혈 성장인자 첨가와 단핵세포 배양

조혈 성장인자는 stem cell factor(Terry Fox Laboratory, Vancouver, BC, Canada)와 G-CSF(Fil-

grastim, Amgen, Thousand Oaks, CA)를 사용하였으며 1개의 액상 배지는 성장인자를 첨가하지 않은 대조군으로 하였고 나머지 5개군은 성장인자를 첨가하여 300ng의 SCF(100ng/mL)를 넣은 군, 3,000 unit의 G-CSF(1,000U/mL)를 넣은 군, 15,000 unit(5,000U/mL)의 G-CSF를 넣은 단독군 3개와 100ng/mL의 SCF와 1,000U/mL의 G-CSF군 및 100ng/mL의 SCF와 5,000U/mL의 G-CSF를 복합적으로 첨가한 2개군 등 모두 6개군으로 나누어 각 군에 2×10^6 개의 생존 단핵세포를 넣은 후 37°C 5% CO₂ 존재하에 배양하였으며 배양 제1일, 7일 및 10일에 trypan blue 염색으로 생존 단핵세포수를 측정하였다.

4. Methylcellulose 배지 조성

30mL의 fetal calf serum과 10mL의 10% BSA, 1mL의 10⁻²M 2-mercaptoethanol 및 40mL의 2.3% Isocove's methylcellulose를 함유한 80mL(1mL의 mercaptoethanol의 양은 계산에 포함시키지 않음)의 methylcellulose 배지(Isocove's methylcellulose-ready mix without growth factors, HCC-4230, Terry Fox Laboratory, Vancouver, BC, Canada)에 5mL의 phytohemagglutinin-leukocyte-conditioned media(PHA-LCM, Terry Fox Laboratory, Vancouver, BC, Canada)와 1mL의 200mM L-glutamine 및 14mL의 IMDM을 넣어 methylcellulose의 농도를 0.9%가 되도록 한 후 진탕기로 골고루 혼합한 다음 4mL씩 분리하여 -20°C에서 냉동 보관하였다.

5. 단핵세포의 methylcellulose 배지 배양

6개군으로 나누어 액상 배지에서 배양 중인 단핵세포를 배양 제1일, 7일, 10일에 trypan blue 염색을 이용하여 생존 단핵세포수를 측정하고 각 군에서 2×10^5 개씩 채취하였으며 냉동 보관하던 methylcellulose 배지를 37°C 수조에서 해동시켰다. Methylcellulose 배지 2.2mL에 2×10^5 개의 단핵세포를 넣은 후 IMDM을 첨가하여 3mL이 되도록 충분히 섞은 뒤 각군마다 2개의 35mm petri dish

에 blunt needle을 이용하여 공기방울이 생기지 않도록 1mL씩 서서히 분주하여 이를 37°C 5% CO₂ 배양기에 배양하였다.

6. CFU-GM 측정

배양 후 12~14일에 도립위상차 현미경을 이용하여 methylcellulose 배지에서 50개 이상의 세포가 집락을 이루었을 때 colony로 간주하였고 각군마다 2개의 petri dish에 나타난 CFU-GM의 수를 관찰하여 평균하였다.

7. CD34 양성 세포 측정

5례에서 1일 및 10일의 대조군과 10일째 액상 배지에 배양 중인 100ng/mL의 SCF와 5,000U/mL의 G-CSF 복합첨가군에서 1×10^5 개의 생존 단핵구를 FACSscan(Becton Dickinson, CA)을 이용하여 CD33 및 CD34 양성세포를 측정하였고 동시에 시행한 CFU-GM 결과와 서로 상관관계를 검증하였다.

8. 통 계

CFU-GM 측정 결과는 평균과 표준편차로 나타내었고 대조군과 조혈 성장인자를 투여한 군 및 액체 배양액에서 성장인자와 접촉시간을 1일, 7일 및 10일로 달리한 군간의 차이를 paired t-test로 검정하였다.

결 과

1. 조혈 성장인자와 1일간 접촉한 군의 CFU-GM

조혈 성장인자를 투여하지 않은 대조군의 CFU-GM은 평균 24.8개인데 비해 자가혈청을 함유한 RPMI 배지에서 1일간 성장인자에 노출된 말초혈액 단핵세포의 CFU-GM은 SCF군이 38.07개, 1,000U의 G-CSF군 26.06개, 5,000U의 G-CSF군 49.38개, SCF+1,000U G-CSF군 44.69개, SCF+5,000U G-CSF군 53.15개로 성장인자에 노출된 군에서 전반적인 증가를 나타내었으며 t-test로 검정

하였을 때 SCF와 G-CSF의 복합투여군에서 유의한 증가가 관찰되었다($P < 0.05$)(Table 1). SCF군은 1,000 U의 G-CSF군보다는 집락이 더 많이 형성되었으나 5,000U의 G-CSF군보다는 적었으며 이들간에 통계적 유의성은 없었다. 또한 G-CSF의 투여량에 따른 집락의 수도 1,000U보다 5,000U에서 증가를 보였으나 역시 통계적 유의성은 없었으며 성장인자를 단독으로 첨가한 군보다 2종류 첨가한 군에서 집락의 증가를 확인할 수 있었는데 SCF군에 비해 SCF+1,000U의 G-CSF군과 1,000U의 G-CSF군에 비해 역시 SCF+1,000U의 G-CSF군에서 유의한 증가가 나타남을 알 수 있었다($P < 0.05$ 및 $P < 0.01$).

2. 조혈성장인자와 7일간 접촉한 군의 CFU-GM

성장인자가 첨가되지 않은 대조군의 28.75개에 비해 SCF군 56.2개, 1,000U의 G-CSF군 33.06개, 5,000U G-CSF군 39.7개, 1,000U G-CSF+SCF군 81개, 5,000U G-CSF+SCF군 93.85개로 성장인자 첨가군에서 집락의 증가가 있었으며 특히 SCF 단독군과 1,000U G-CSF+SCF군 및 5,000U G-CSF+SCF군에서 유의성이 있는 증가가 관찰되었다($P < 0.05$, $P < 0.01$, $P < 0.01$)(Table 2). SCF와 G-CSF 군을 비교하였을 때 SCF군에서 유의한 증가를 보였다.

Table 1. CFU-GM Assay of D1 PB Mono-nuclear Cells

	No. of CFU-GM	P value
Control	24.80±21.84	
SCF	38.07±26.41	>0.05
GCSF1	26.06±24.62	>0.05
GCSF5	49.38±41.38	>0.05
SGCSF1	44.69±36.78	0.018
SGCSF5	53.15±47.37	0.035

Abbreviations : 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
D1 PB, Day 1 peripheral blood

가 나타났고($P < 0.05$) SCF 단독군에 비해 G-CSF 와 복합 투여군에서 역시 유의한 증가를 보였다($P < 0.01$). G-CSF의 투여량 차이로 인한 변화는 특별히 없었으며 G-CSF 단독군과 SCF 와의 복합군 간에는 1,000U G-CSF에 비해 $P < 0.01$, 5,000U G-CSF에 비해 $P < 0.01$ 로 모두 유의한 증가를 보였고 복합투여군 간에서도 1,000U G-CSF+SCF 보다 5,000U G-CSF+SCF군에서 $P < 0.001$ 의 유의한 증가를 나타내었다.

3. 10일간 성장인자와 접촉한 군의 CFU-GM

대조군의 33.5개에 비해 1,000U의 G-CSF군은 29.83으로 오히려 집락수의 감소가 나타났으나 나머지 성장인자에 10일간 노출된 5개군 중 G-CSF를 첨가한 2개군을 제외한 3개군에서 유의한 증가를 보였다($P < 0.05$). SCF군과 G-CSF군을 비교하였을 때 SCF군이 1,000U나 5,000U의 G-CSF군보다 유의한 증가가 관찰되었고 1,000U와 5,000U G-CSF 간에는 5,000U 군이 더 많은 집락을 형성하였으나 역시 통계적인 유의성은 없었다(Table 3). 성장인자를 복합적으로 사용한 군에서 단독군보다 집락의 증가가 두드러졌으며 SCF군과 SCF+G-CSF군, G-CSF군과 SCF+G-CSF군 모두 성장인자를 복합적으로 투여한 군에서 통계적으로

Table 2. CFU-GM Assay of D7 PB Mono-nuclear Cells

	No. of CFU-GM	P value
Control	28.75±18.79	
SCF	56.20±30.08	0.013
GCSF1	33.06±16.57	>0.05
GCSF5	39.70±22.95	>0.05
SGCSF1	81.00±47.75	0.009
SGCSF5	93.85±49.42	0.003

Abbreviations : 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
D7 PB, Day 7 peripheral blood

유의한 증가를 볼 수 있었다. 또한 G-CSF의 투여량 차이에 따른 변화를 비교하였을 때 복합투여군에서 통계적으로 유의한 증가가 관찰되었다 ($P<0.05$).

4. 성장인자와의 접촉기간의 차이에 의한 CFU-GM의 변화

SCF군은 접촉기간이 증가됨에 따라 집락의 증가가 동반되었는데 1일간 노출된 군에 비해 7일간 및

10일간 노출된 경우 각각 $P<0.05$ 로 유의한 증가가 보였고 10일간 접촉한 군에서 7일간 접촉한 군보다 역시 유의한 증가가 관찰되었다. G-CSF 1,000U 및 5,000U군에서는 접촉기간에 따른 변화가 나타나지 않았으나 1,000U G-CSF+SCF군은 1일간 접촉하였을 때보다 7일간 접촉한 경우 $P<0.01$ 로 유의한 증가가 보였지만 1일간과 10일간 접촉시켰을 때와 7일 및 10일 사이에는 유의한 차이

Table 4. Comparison of Influence according to Duration of Exposure with Growth Factors

	D1&D7	D1&D10	D7&D10
Control	>0.1	>0.1	>0.1
SCF	0.029	0.015	0.031
GCSF1	>0.1	>0.1	>0.1
GCSF5	>0.1	>0.1	>0.1
SGCSF1	>0.1	>0.1	>0.1
SGCSF5	0.003	0.028	>0.1

Data were expressed as P value by paired t-test

Abbreviations : 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
D1, Day 1 ; D7, Day 7 ; D10, Day 10

Table 3. CFU-GM Assay of D10 PB Mononuclear Cells

	No. of CFU-GM	P value
Control	33.50 ± 31.91	
SCF	64.06 ± 30.69	0.013
GCSF1	29.83 ± 15.68	>0.1
GCSF5	41.50 ± 26.08	>0.1
SGCSF1	69.50 ± 34.01	0.020
SGCSF5	90.07 ± 44.69	0.013

Abbreviations : 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
D10 PB, Day 10 peripheral blood

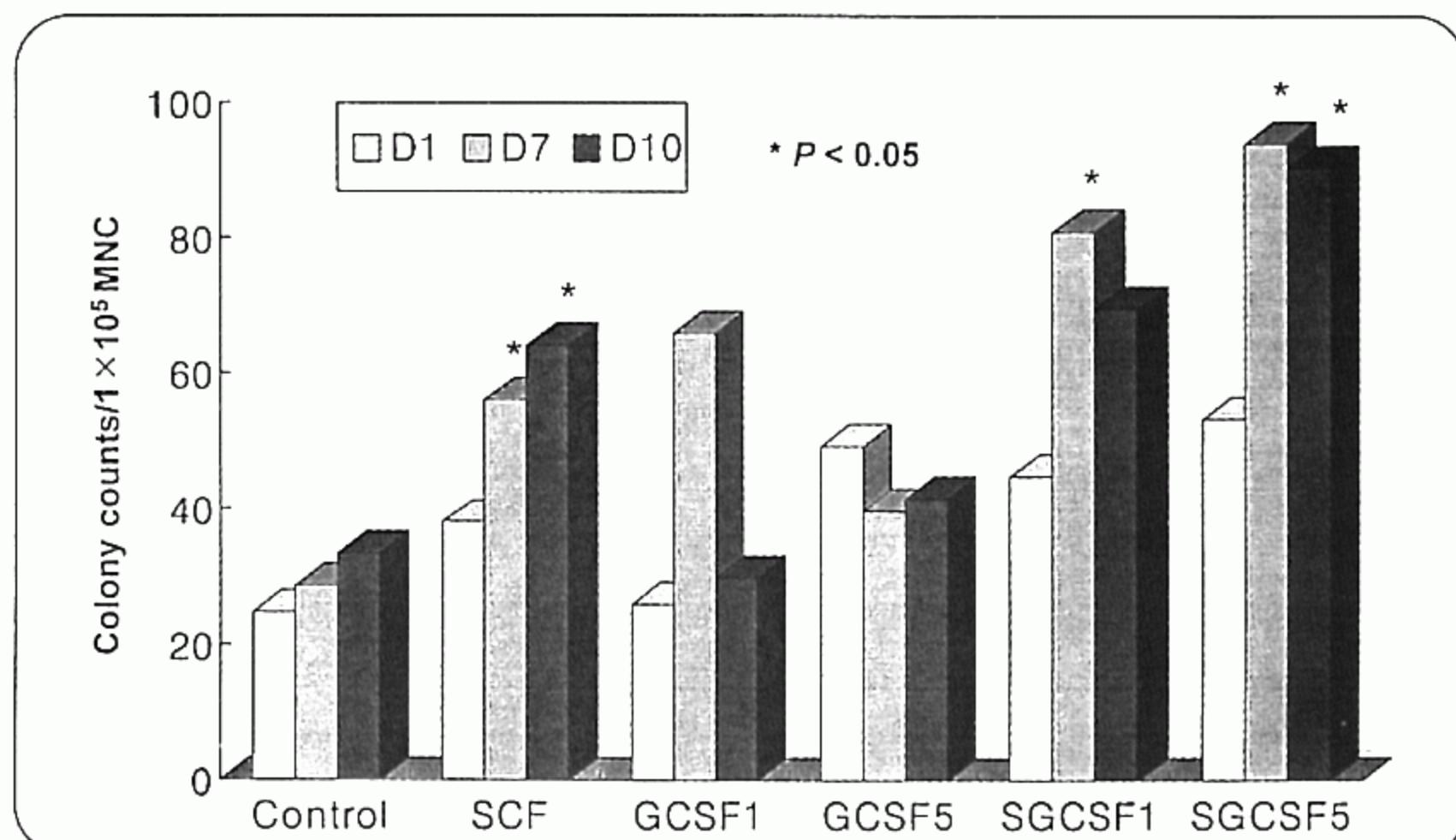


Fig. 1. Effect of various combinations of growth factors and duration of exposure on CFU-GM of PB MNC.

Table 5. Comparison of CD34⁺ cell Population and CFU-GM Assay

	D1 control	D10 control	D10 SGCSF5
No. of CFU-GM(mean)	42	36	112
CD34 ⁺ 33 ⁻ cells(%)	0.64	0.5	0.97
CD34 ⁺ 33 ⁺ cells(%)	0.11	0.6	2.87
Total CD34 ⁺ cells(%)	0.75	1.11	3.84

가 없었고 5,000U G-CSF+SCF군에서는 1일간 접촉하였을 때보다 7일간 및 10일간 접촉하였을 때 $P < 0.01$ 및 $P < 0.05$ 로 유의한 집락의 증가가 관찰되었다. 복합적으로 성장인자를 투여한 군에서 7일간 접촉하였을 때 집락의 증가가 가장 많은 경향을 볼 수 있었으나 10일간 접촉시와 비교하여 유의성은 나타나지 않았다(Table 4, Fig. 1).

5. CD34 양성세포의 변화와 CFU-GM assay의 비교

CD33 및 CD34 양성세포는 5명의 액체 배양액에서 배양중인 제 1일과 제10일의 대조군 및 제10일의 5,000U의 G-CSF+SCF군에서 실시하였으며 이들 5례에서 CFU-GM의 평균을 비교하였을 때 대조군은 제 1일이 42개, 10일이 36개인데 비해 10일간 성장인자와 접촉한 군은 112개로 제 1일의 대조군에 비해 3배의 증가를 보였고 CD33 음성, CD34 양성세포는 0.64%, 0.60% 및 0.97%로 약 1.5배의 증가가 나타난 반면 CD33 양성, CD34 양성세포는 0.108%, 0.503% 및 2.87%로 제1일의 대조군에 비해 26배의 증가를 보였으며 전체 CD34 양성세포는 0.75%, 1.11% 및 3.84%로 약 5배의 증가를 보여 CD33에 양성이며 CD 34 양성을 나타내는 세포의 증가가 CD34 양성세포 증가의 주된 요인이다(Table 5).

CD34 양성세포의 비율과 CFU-GM 간의 Pearson's correlation coefficient는 $r=0.612$ ($P < 0.05$)로 상호 유의한 상관관계를 나타내었다.

고 찰

1968년 Gatti 등²⁸⁾이 중증복합면역결핍증 환자를 골수이식으로 완치시킨 아래 동종골수이식을 통해 재생불량성 빈혈이나 백혈병 등 다양한 질병의 완치가 가능해졌으나 일부의 환자에서만 적합한 골수공여자를 찾을 수 있다는 점과 또한 기능에 큰 손실 없이 조혈모세포를 장기간 체외 보존시킬 수 있는 기술의 개발 등²⁹⁾이 뒷받침이 되어 자가골수이식이 가능해짐에 따라 여러 혈액질환과 진행된 고형암 환자에서 고용량 화학요법 후 골수회복의 방법으로 널리 사용되고 있다³⁰⁾. 그러나 이미 골수가 심하게 침범된 암환자나 과거 골반에 방사선 조사를 받았거나 반복적인 화학요법으로 인해 골수의 세포 충실패도가 심하게 저하된 경우 암세포가 포함되지 않은 충분한 양의 골수 조혈전구세포의 수집이 어려울 수도 있다. 근래 말초혈액에도 골수의 1~10% 밖에 되지 않지만 조혈모세포가 존재한다는 사실이 알려져 이식에 이용하게 되었으며^{1~8, 31)} 백혈구 분반법을 이용한 말초혈액의 조혈전구세포 수집이 골수전자보다 용이하면서도 부작용이 별로 없고 이식 후 혈소판이나 백혈구의 회복이 더 신속하게 일어난다는 점 등^{6~8, 10)}으로 여러 질병의 치료에 쓰여지게 되었는데 최근 말초혈액 조혈전구세포의 동종이식¹⁰⁾의 성공에 힘입어 앞으로 골수이식을 상당부분 대신할 수 있을 것이라고 여겨지고 있다. 자연적 상태에서는 극소수에 불과한 말초혈액의 조혈모세포가 보통 $4\sim7\text{g}/\text{m}^2$ 의 cyclophosphamide나 $2\text{g}/\text{m}^2$ 의 etoposide 등을 투여한 후 혈액내 백혈구 수가 감소되었다가 회복될 때 백혈구 분반법을 이용하여 조혈전구세포를 다량 수집할 수 있는데 이 경우 약 3~4회의 apheresis로 충분한 양을 얻을 수 있다고 보고되어 있다^{17, 18, 32)}. 이렇게 수집한 조혈전구세포의 CFU-GM은 자연상태에서 얻은 전구세포의 CFU-GM보다 양이 많으며¹⁹⁾ 동종 또는 자가골수 이식시보다 조혈기능의 회복이 더 신속히 일어난다는 장점이 있는 반면 백혈구가 감소되어 있는 기간 동안 중증 감염의 위험성과 더불어 백혈

구가 회복되는 시점의 개인차가 심하여 백혈구 분반술 및 이식 등을 정확한 계획 아래에서 시행할 수 없다는 문제점을 지니고 있다^{19, 32)}. 근래 조혈성장인자를 투여하였을 때 역시 말초혈액으로 조혈전구세포의 이동이 증가된다는 사실이 알려져 G-CSF^{11, 20)}, GM-CSF^{21, 33)} 및 IL-3²²⁾를 6~14일간 사용한 후 3~6회의 백혈구 분반법을 통해 충분한 수의 조혈전구세포를 얻을 수 있으며 이 경우 CFU-GM의 양도 많은 동시에 혈소판의 회복을 훨씬 단축시킬 수 있다고 보고되어 있는데 이는 말초혈액에 존재하는 거핵세포가 성장인자에 의해 자극되어 일어났을 것으로 추측되고 있다^{11, 20, 33)}.

최근 항암제와 성장인자를 같이 사용하여^{32, 34)} 항암제의 골수억제 능력을 최소화하고 전구세포의 이동을 극대화시킬 수 있으며 또한 소량의 SCF와 G-CSF를 동시에 복합적으로 투여함으로써 상승적인 효과와 함께 다량의 CFU-GM과 더 원시적이고도 증식력이 뛰어난 조혈전구세포를 얻을 수 있다는 보고도 있다^{35, 36)}. 본 연구에서는 조혈전구세포의 이동에 주로 cyclophosphamide와 G-CSF를 사용하였는데 G-CSF의 용량은 10 µg/kg를 사용하였다. 그리고 얻어진 조혈전구세포를 액체 배양액에 넣어 배양시 SCF와 G-CSF를 사용하여 이미 알려진 상승효과^{35, 36)}를 확인하였다. 일반적으로 G-CSF의 투여시 심각한 부작용이 드문데다 용량의 증가에 따라 효과도 상승된다고 알려져 있지만 보통 5 µg/kg 정도가 제시되고 있으며 전구세포의 말초혈액으로 가동화에는 2 µg/kg부터 60 µg/kg까지 다양하게 사용되고 있으나 대개의 경우 5~10 µg/kg의 용량이 보편화되어 있다^{37, 38)}. 본 연구에서 cyclophosphamide 및 10 µg/kg의 G-CSF 투여 후 대부분에서 7일정도 지나 백혈구 수치가 최소에 달하며 10일 이후부터 회복이 일어났는데 백혈구치가 1,000/µL 이상 되었을 때 백혈구분반술을 시작하였다. 얻어진 조혈전구세포로 이식 후 생착의 가능성 여부를 예측하기 위해 이들 세포의 조혈기능에 대한 평가가 필요하게 되었는데 현재 주로 CFU-GM의 clonogenic assay와 유세포분석기를 사용하여 CD34 양성세포를 측정하는 방법이 이용되고 있

다^{12~14, 39~41)}. CFU-GM 집락의 배양은 methylcellulose를 주성분으로 하는 반고형배지를 사용하여 관찰할 수 있는데 약 2주 정도의 배양기간이 필요하고 또 서로 다른 세포들 간에 일어날 수 있는 상호작용을 완전히 차단할 수 없으며 비교적 단기간에 분화 및 증식이 중단된다는 점과 이들 집락 형성이 진정한 조혈모세포의 repopulation 능력을 대변하기 어렵다는 등의 단점이 있는 반면 반고형배지의 높은 점도로 인해 세포들이 분산되지 않고 집락을 이루는 특성에 부합되며 조작의 용이성과 집락 수의 측정이 간단하고 개개의 집락을 분리하여 동정이 가능한 외에 조혈전구세포의 증식능과 CFU-GM 집락의 크기 및 수가 잘 일치된다는 면이 있어 널리 이용되고 있다^{27, 39~41)}. 또한 CD34 항원이 조혈모세포에 나타난다는 사실이 알려지고⁴²⁾ CD34 양성세포는 태생기의 간이나 골수세포의 2~10%, 성인 골수세포의 1.5% 정도로 분포하며 정상상태의 말초혈액에는 총 유핵세포의 0.06% 밖에 되지 않으나 G-CSF로 가동화한 후 백혈구 분반법으로 얻어진 단핵세포에서는 0.75%를 차지하는데 이들의 90~95%는 적혈구나 골수구 또는 림프구 계열로 분화가 이미 일어나 있으므로 진정한 의미의 조혈모세포는 태생기 간세포의 0.1~0.5%, 성인골수세포의 0.05~0.25%밖에 되지 않을 것으로 여겨지고 있다³¹⁾. 그리고 림프구 계열의 표지자를 지닌 세포를 제거한 후 methylcellulose 배지에 배양한 경우 집락형성에 별 변화가 없으나 적혈구계나 골수구계의 표지자를 지닌 세포를 제거한 후 배양하였을 때는 colony의 수가 유의하게 감소하는 양상이 나타나는 것으로 미루어 methylcellulose 배지에서 colony를 형성하는 세포는 분화가 일부 진행된 것이 대부분으로 이들은 CD33 양성을 나타내고 있는 반면 long-term marrow culture로 얻어진 blast colony는 CD34+이며 CD33- 세포로 구성되어 있다^{31, 43)}. 현재 알려진 가장 원시적인 조혈모세포는 CD34+, CD38-, CD71-, Lin-, HLA DR-, Thy-1.1^{lo}, Rho 123^{lo}, C-kit R+, CD45RO+ 등으로 표현되고 있다³¹⁾. 또한 CD34 양성세포 수가 백혈구 분반법에 의한 조혈전구세포의 수확량과 상

관관계를 나타내므로 분반술의 시기와 횟수의 결정에 응용이 될 수 있으며^{14, 34, 39, 40, 44)} 채집된 골수나 구동화된 전구세포에서 조혈모세포의 분포를 아는 것 이외에도 암세포의 정화요법, 이식편대 숙주반응을 피하기 위한 T 림프구 제거나 이식시 필요한 조혈전구세포의 양을 감소시킬 수 있을 뿐 아니라 조혈모세포의 체외증식 및 유전자 치료 등에 사용될 수 있고 백혈병의 진단 및 예후를 예측하는데 도움을 얻을 수 있는 것으로 알려져 있다^{44~47)}. 조혈전구세포를 체외에서 증폭시킴으로 소량의 세포 수집만으로 이식이 가능해지며 고용량 화학요법을 재차 백혈구 분반법의 시행없이 반복하여 시도할 수 있다는 장점이 있고³²⁾ 또한 증폭된 전구세포는 이미 분화가 진행되어 있으므로 이식 후 성숙된 백혈구의 초기 출현으로 백혈구 감소 기간을 더욱 단축시킬 수 있어 고식적인 골수이식을 대신하게 될 것으로 예측되고 있다^{32, 48)}.

체외 증폭시 Haylock 등⁴⁵⁾은 SCF, IL-1, IL-3, GM-CSF와 G-CSF 등의 조혈성장인자를 첨가하여 7일간 배양하였을 때 CFU-GM이 30배 정도 증가됨을 관찰하였으며 그외에도 G-CSF 구동화로 얻은 말초혈액 CD34 양성 조혈전구세포 1×10^6 개를 SCF, IL-3, IL-6 및 G-CSF로 역시 7일간 배양하여 8.65×10^5 개의 CFU-GM을 얻을 수 있었다는 보고도 있다³²⁾.

본 연구에서는 가동을 일으킨 말초혈액의 단핵세포를 RPMI 1640 액체 배양액에 서로간의 상승효과가 뚜렷하다고 알려진 SCF와 G-CSF^{24, 25, 35, 36)}를 투여하였고 이 때 G-CSF의 양을 1,000U/mL 및 5,000U/mL로 달리하여 용량에 따른 변화를 관찰하였으며 또한 이들 성장인자와 단핵세포간에 접촉기간을 1일, 7일, 10일로 차이를 두어 이에 의한 CFU-GM과 CD33 및 CD34 양성세포의 증폭을 측정하였다. 그리고 액체 배양액에 일반적으로 첨가하는 fetal calf serum 대신 자가혈장을 10% 농도가 되도록 넣어 배양하였는데 이 경우 자가혈장에 소량 존재할 수 있는 여러 cytokine 및 세포들에 의해 다양한 영향이 나타날 수 있다는 점은 있으나^{49, 50)} 반면 증폭의 효과가 증대되고 활성도의

변화가 적으며 거핵구의 집락 형성도 증가된다는 등의 장점⁵¹⁾ 외에 조혈전구세포의 체외증식 후 환자에게 투여한다는 것을 전제로 하여 자가혈장을 사용하였다. 본 연구결과 말초혈액의 조혈전구세포가 체외에서 1일간만 성장인자와 접촉한 경우에도 대조군에 비해 CFU-GM의 증가가 나타났으며 특히 SCF와 G-CSF를 복합적으로 첨가한 군에서 유의한 증가를 보였고 단독투여군과 복합투여군의 비교시 복합투여군의 집락증가가 관찰되었으나 G-CSF의 용량 차이에 의한 변화는 뚜렷하지 않았다. 7일간 및 10일간 성장인자와 접촉한 군에서도 유사한 결과를 얻었으며 SCF군 및 복합투여군에서 역시 유의한 차이가 확인되었다. SCF군은 접촉기간이 길어질수록 집락 증가가 나타났으며 복합투여군은 대조군과는 물론 어느 단독투여군보다 집락의 유의한 증가를 확인할 수 있었는데 이는 SCF가 더 원시적인 전구세포에 작용한다는 것을 시사해 주는 소견이라 여겨진다.

그리고 10일간 접촉시켰을 때 SCF군에서 대조군 및 G-CSF군에 비해 유의한 증가가 나타났으며 복합투여군에서는 G-CSF의 양에 따라 집락의 의미 있는 증가가 관찰되었다. 성장인자와의 접촉기간에 따른 변화는 복합투여군에서 집락수가 7일간 접촉 시 peak에 오른 후 차츰 감소되는 추세를 보였으나 통계적인 의의는 나타나지 않았다. G-CSF의 농도를 1,000U/mL과 5,000U/mL로 달리하였을 때의 비교시 5,000U/mL군에서 집락의 증가가 더 일어나는 경향을 보이나 통계적 의미가 없는 것으로 미루어 용량에 더 이상의 차이를 두었을 때에 변화가 나타날 수 있을 것으로 여겨진다. 그리고 1일간, 7일간 및 10일간 접촉기간을 달리하였을 때 SCF와 복합투여군에서 유의한 차이가 나타났으나 그외의 경우에는 별 차이가 없는 것으로 미루어 이는 체외증폭시 액체배양액에 성장인자를 지속적으로 투여해야만 할 가능성을 제시해 주며 또한 단기간의 체외배양으로도 어느 정도의 증폭이 가능하다는 것을 시사해 주고 있지만 차후 검증되어야 할 것으로 믿어진다. 본 연구에서 CFU-GM의 증가가 일반적으로 성장인자를 투여한 군에서 증가되고 복합투여군

에서 상승효과를 보인다는 점은 다른 여러 보고와 거의 비슷하나 증폭의 정도에 있어 각 보고마다 나타나는 차이는 자가혈장의 사용 여부, 성장인자의 용량 및 배지의 성상 등에 의한 결과라고 보여진다. CD34 및 CD33 양성세포의 측정에서 CD33 음성이고 CD34 양성인 세포는 CD33 양성세포에 비해 분화가 덜 진행된 세포이며 methylcellulose media에서 CFU-GM 집락을 형성하는 대부분의 세포는 CD33과 CD34에 양성이라고 알려져 있다^{31, 39, 40)}. 유세포분석기를 통한 측정 결과 가동화된 말초혈액에서 CD34 양성세포가 차지하는 비율이 0.75%로 다른 보고와 거의 일치하였으며 조혈성장인자를 이용한 체외증식으로 CD33⁻ CD34⁺ 세포는 1.5배 증가한데 비해 CD33⁺ CD34⁺ 세포는 26 배가 증가되어 총 CD34⁺ 세포의 5배 증가에 주된 역할을 하였음이 확인되었다. 이는 체외 증식으로 CD33+ 세포군이 훨씬 더 증가된다는 것을 의미하는데 조혈모세포에 더 가까운 원시세포의 배양에 사용되는 blast colony assay⁴³⁾나 stroma dependent long-term Dexter culture 등²⁶⁾을 이용하여 long-term culture-initiating cell 등에 대한 검사로 추후 더욱 명확해지리라고 여겨진다. 또한 동시에 측정한 CFU-GM은 3배의 증가를 보여 CD34+ 세포와 CFU-GM간에 유의한 상관관계를 볼 수 있었다. 이러한 조혈전구세포를 단기 체외 배양으로 증식시킨 후 이식에 이용할 경우 소량을 얻어 반복적인 사용이 가능하므로 생착이 되지 않았을 때 골수의 천자로 다시 조혈전구세포를 수집할 필요성이 줄어들고 고용량 화학요법을 여러 차례 할 수 있는 등 많은 응용이 가능하게 되며 특히 전구세포의 수가 한정된 제대혈 이식에서 더 많은 요구가 있을 것으로 기대되는 바 체외배양시 가장 적절한 배지의 조건, 배양기간, 성장인자의 선택 및 그 용량 등에 대한 연구가 지속되어야 할 것이다.

요 약

배 경 : 말초혈액에서 조혈전구세포의 가동화를 일으킨 후 백혈구 분반법으로 얻은 단핵세포를 체

외에서 배양하여 조혈성장인자인 SCF와 G-CSF를 단독으로 사용하는 것과 복합적으로 사용하는 것을 비교하고 G-CSF의 투여량을 달리하여 그 효과를 알아보았다. 그리고 성장인자와 접촉기간을 달리하여 일어나는 변화를 살펴보고 이들을 평가하는데 CFU-GM 측정과 CD33 및 CD34 양성세포의 백분율을 통하여 비교관찰하였다.

방 법 : 10명의 환자에서 cyclophosphamide나 etoposide 항암화학요법 또는 G-CSF를 투여하고 말초혈액에서 단핵세포를 얻은 후 RPMI 1640에 자가혈장과 100ng/mL의 SCF, 1,000U/mL의 G-CSF, 5,000U/mL G-CSF, 1,000U/mL G-CSF + 100ng/mL SCF, 5,000U/mL G-CSF + 100ng/mL SCF를 첨가한 군과 성장인자를 넣지 않은 대조군의 6개군으로 나누어 각각 2×10^6 개씩의 단핵세포를 넣어 배양하였다. 배양 제 1일, 7일, 10일에 생존한 단핵세포를 2×10^5 개씩 채집하여 2개의 methylcellulose 배지에 나누어 배양하여 CFU-GM assay를 실시하고 5명에서 제 1일 및 10일의 대조군과 10일의 5,000U/mL G-CSF + SCF군에서 생존 백혈구를 1×10^5 개 채집하여 CD33 및 CD34 양성 세포의 수를 측정하였다.

결 과 :

- 1) 조혈성정인자와 1일간 접촉한 군에서도 전반적인 CFU-GM의 증가가 나타났으며 SCF + G-CSF의 복합투여군에서 유의한 증가가 관찰되었고 ($P < 0.05$) 5,000U/mL G-CSF + SCF군에서 가장 많은 집락이 형성되었다.
- 2) 7일간 접촉한 군에서도 비슷한 결과가 나타났으며 복합투여군에서 1,000U/mL의 G-CSF + SCF군보다 5,000U/mL의 G-CSF + SCF군에서 유의한 집락의 증가가 관찰되었다($P < 0.01$).
- 3) 10일간 성장인자와 접촉한 군 역시 SCF군이 G-CSF군보다, 5,000U의 G-CSF군이 1,000U의 G-CSF군보다, 단독으로 사용한 군보다 복합적으로 사용한 군에서 집락이 유의하게 증가되었다($P < 0.05$).
- 4) 성장인자와의 접촉기간에 따른 변화를 평가하였을 때 SCF군은 10일간 접촉한 군에서 가장 많은

집락을 형성한 반면 G-CSF 및 2개 인자를 복합적으로 사용한 군에서는 7일간 접촉하였을 때 집락 형성이 가장 많았다.

5) CD33 및 CD34 양성세포의 검사결과 CD33⁺/CD34⁺ 세포가 SCF와 5,000U의 G-CSF 복합투여 군에서 약 26배의 증가를 보였고 전체 CD34+ 세포는 약 5배의 증가를 보여 3배의 증가를 보인 CFU-GM 결과와 유의한 상관관계가 있다는 것을 관찰할 수 있었다($r=0.612$, $P < 0.05$).

결 론 : 말초혈액 단핵세포를 체외 배양하였을 때 SCF와 G-CSF를 첨가한 경우 1일간의 접촉으로도 CFU-GM 수가 증가하였고 성장인자를 복합적으로 첨가한 군에서 단독군보다 CFU-GM 증폭의 상승효과가 나타났으며 7일 및 10일간 접촉한 군에서도 유사한 결과를 얻을 수 있었다. 복합투여군에서 CFU-GM은 7일간 접촉한 경우 가장 많이 형성되었으며 유세포분석기에 의한 검사에서 CD34⁺ 세포는 5,000U G-CSF+SCF군이 대조군보다 5배, CD33⁺, CD34⁺ 세포는 26배의 증가를 보였고 CFU-GM은 약 3배의 증가를 나타내어 양자간에 유의한 상관관계가 있음을 알 수 있었다.

감사의 글

본 연구를 진행하는데 많은 도움을 준 Dr. Nelson Chao 및 Dr. Reem Al Sudairy께 깊은 감사를 드립니다.

참 고 문 헌

- 1) McCarthy DM, Goldman JM : *Transfusion of circulating stem cells*. Crit Rev Clin Lab Sci 20:1-24, 1984
- 2) Goldman JM, Catovsky D, Galton DAG : *Reversal of blast-cell crisis in CGL by transfusion of stored autologous buffy coat cells*. Lancet 1:437-438, 1978(Letter)
- 3) Kessinger A, Armitage JO, Landmark JD, Smith DM, Weisenburger D : *Autologous peripheral blood mononuclear cells in the treatment of patients with acute promyelocytic leukemia*. Br J Haematol 63:209-211, 1986
- 4) Korbling M, Burke P, Braine H, Elfenbein G, Santos G, Kaizer H : *Successful engraftment of blood derived normal hematopoietic stem cells in chronic myelogenous leukemia*. Exp Hematol 9:684-690, 1981
- 5) Juttner CA, To LB, Haylock DN, Branford A, Kimber RJ : *Circulating autologous stem cells collected in very early remission from acute non-lymphocytic leukemia produce prompt but incomplete haematopoietic reconstruction after high dose melphalan or supralethal chemoradiotherapy*. Br J Haematol 61: 739-745, 1985
- 6) Korbling M, Dorken B, Ho AD, Pezzutto A, Hunstein W, Fliedner TM : *Autologous transplantation of blood-derived hematopoietic stem cells after myeloablative therapy in a patient with Burkitt's lymphoma*. Blood 67:529-532, 1986
- 7) 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
- 8) 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
- 9) 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 bone marrow transplantation*. Blood 81:1404-1407, 1993
- 10) Russell NH, Hunter AE, Rogers S, Hanley J, pheral hematopoietic stem cell transplantation restores hematopoietic function following marrow ablative therapy

- Anderson D : *Peripheral blood stem cells as an alternative to marrow for allogeneic transplantation.* Lancet 341:1482, 1993
- 11) 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
- 12) Juttner CA, To LB : *Peripheral blood stem cells : mobilization by myelosuppressive chemotherapy.* In : Dickey K, Armitage J, Dickey-Evinger M, eds : *Proceedings of the 5th International Symposium on Autologous Bone Marrow Transplantation.* University of Nebraska Press, 1991, pp 783-788
- 13) Rowley 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
- 14) 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
- 15) Kessinger A, Armitage JO : *The evolving role of autologous peripheral stem cell transplantation following high-dose therapy for malignancies.* Blood 77:211-213, 1991
- 16) Cantin G, Marchand-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
- 17) To LB, Shepperd KM, Haylock DN, Dyson PG, Charles P, Thorp DL, Dale BM, Dart GW, Roberts 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
- 18) Kessinger A, Armitage JO, Smith DM, Landmark JD, Bierman PJ, Weisenburger D : *High dose therapy and autologous marrow peripheral blood stem cell transplantation for patients with lymphoma.* Blood 74:1260-1265, 1989
- 19) 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
- 20) Chao NJ, Schriber JR, Grimes K, Long GD, Negrin RS, Raimondi CM, Horning SJ, Brown SL, Miller L, Blume KG : *Granulocyte colony-stimulating factor mobilized peripheral blood progenitor cells accelerate granulocyte and platelet recovery after high-dose chemotherapy.* Blood 81:2031-2035, 1993
- 21) 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
- 22) 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 (suppl 1):62-64, 1992
- 23) Ogawa M : *Differentiation and proliferation of*

- hematopoietic stem cells. *Blood* 81:2844-2853, 1993
- 24) McNiece IK, Andrews R, Stewart M, Clark S, Boone T, Quesenberry 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
- 25) McNiece IK, Langely KE, Zsebo KM : Recombinant human stem cell factor synergizes with GM-CSF, IL-3, and Epo to stimulate human progenitor cells of myeloid and erythroid lineages. *Exp Hematol* 19:226-231, 1991
- 26) Dexter TM, Allen TD, Lajtha LG : Conditions controlling the proliferation of hematopoietic stem cells in vitro. *J Cell Physiol* 91:335-344, 1977
- 27) Metcalf D : Clonal culture of hematopoietic cells: Techniques and applications. *Amsterdam*, Elsevier, 1984, pp 78-81,
- 28) Gatti RA, Neuwissen HJ, Allen HD, Hong R, Good RA : Immunological reconstitution of sex-linked lymphopenic immunological deficiency. *Lancet* 2:1366-1369, 1968
- 29) Wells JR, Sullivan A, Cline MJ : A technique for the separation and cryopreservation of myeloid stem cell from human bone marrow. *Cryobiology* 16:201-210, 1979
- 30) Armitage JO : New frontiers in cancer chemotherapy. *J Clin Oncol* 4:1577-1578, 1986
- 31) Baum CM, Uchida N, Peault B, Weissman IL : Isolation and characterization of hematopoietic progenitor and stem cells. In : Forman SJ, Blume KG, Thomas ED eds. *Bone Marrow Transplantation*. Boston : Blackwell Scientific Publications 913-918, 1894
- 32) Shpall EJ, Jones RB : Mobilization and collection of peripheral blood progenitor cells for support of high-dose cancer therapy. In : Forman SJ, Blume KG, Thomas ED eds. *Bone Marrow Transplantation*. Boston : Blackwell Scientific Publications, 1994, pp913-918
- 33) 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
- 34) Kanz L, Brugger W, Bross KJ, Mertelsmann R : Correlation analysis between CD34+ cells and clonogenic progenitors mobilized into the peripheral blood by IL-3 + GM-CSF following polychemotherapy in cancer patients. *Int J Cell Cloning* 10(suppl 1): 68-70, 1992
- 35) 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
- 36) 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
- 37) Marty M : The optimal dose of glycosylated recombinant human granulocyte colony stimulating factor for use in clinical practice: a review. *Eur J Cancer* 30A(suppl 3):S20-25, 1994
- 38) Kohno A, Takeyama K, Narabayashi M, Okamoto R, Adachi I, Tobinai K, Shimoyama M : Low-dose granulocyte colony stimulating factor enables the efficient collection of peripheral blood stem cells after disease-oriented, conventional dose chemotherapy for breast cancer, malignant lymphoma and germ cell tumor. *Bone Marrow Transplant* 15:49-54, 1995
- 39) Serke S, Sauberlich S, Huhn D : Multipara-

- meter flow cytometrical quantitation of circulating CD34+ cells: correlation to the quantitation of circulating hematopoietic progenitor cells by in vitro colony assay.* Br J Haematol 77:453-459, 1991
- 40) Serke S, Sauberlich S, Abe Y, Huhn D: *Analysis of CD34 positive hemopoietic progenitor cells from normal human adult peripheral blood: flow-cytometrical and in vitro colony studies.* Ann Hematol 62:45-53, 1991
- 41) Metcalf D: *The hematopoietic stem and progenitor cells demonstrable using in vitro cloning techniques.* In : Metcalf D ed. *The hematopoietic colony stimulating factors.* New York. Elsevier, 1984, pp 27-54
- 42) Andrews RG, Singer JW, Bernstein ID: *Mono-clonal 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
- 43) Bernstein ID, Leary AG, Andrews RG, Ogawa M: *Blast colony forming cells and precursor of colony-forming cells detectable in long-term marrow culture express the same phenotype(CD33 - CD34 +).* Exp Hematol 19: 680-682, 1991
- 44) Krause DS, Fackler MJ, Civin CI, May WS: *CD 34 : structure, biology, and clinical utility.* Blood 87:1-13, 1996
- 45) Haylock DN, To LB, Dowse CA, Juttner CA, Simmons PJ: *Ex vivo expansion and maturation of peripheral blood CD34+ cells into the myeloid lineage.* Blood 80:1405-1412, 1992
- 46) Bregni M, Magni M, Siena S, Nicola MD, Bonadonna G, Gianni AM: *Human peripheral hematopoietic progenitors are optimal targets of retroviralmediated gene transfer.* Blood 80: 1418-1422, 1992
- 47) Geller RB, Zahurak M, Hurwitz CA, Burke PJ, Karp JE: *Prognostic importance of immunophenotyping in adults with active myelocytic leukemia : the significance of the stem-cell glycoprotein CD34(My 10).* Br J Med 76:340-347, 1990
- 48) Brugger W, Heimfeld S, Berenson R, Mertelsman 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
- 49) Bouay L, Giarrantana MC, Droutet X, Bardinet D, Gorin NC: *The role of recombinant hematopoietic growth factors in human long-term bone marrow culture in serum free medium.* Br J Haematol 79:27-32, 1991
- 50) Xiao M, Leemhuis T, Broxmeyer HE, Lu L: *Influence of combination of cytokines on proliferation of isolated single cell sorted human bone marrow hematopoietic progenitor cells in the absence and presence of serum.* Exp Hematol 20:276-271, 1992
- 51) Messner HA: *Multipotent stem cells in vitro.* In : Golde DW ed. *Hematopoiesis,* New York, Churchill Livingstone 1984, pp73-86