말초혈액조혈모세포 채집물의 고농도 냉동보존 유용성 평가

박종은¹ · 정혜경¹ · 박혜경¹ · 이승태¹ · 김석진² · 장준호² · 김기현² · 김원석² · 정철원² · 강은숙¹ · 김대원¹
성균관대학교 의과대학 삼성서울병원 진단검사의학과¹, 혈액종양내과²

A Feasibility Study for Cryopreserving Peripheral Blood Stem Cell Collects at High Cell Concentration

Jong Eun Park¹, Hae-Kyoung Choung¹, Hye-Kyung Park¹, Seung-Tae Lee¹, Seok-Jin Kim²,
Joon-Ho Jang², Ki-Hyun Kim², Won-Suk Kim², Chul-Won Chung², Eun-Suk Kang¹, Dae Won Kim¹

Department of Laboratory Medicine and Genetics¹, Division of Hematology-Oncology, Department of Internal Medicine², Samsung Medical Center, Sungkyunkwan University School of Medicine, Seoul, Korea

Background: For autologous hematopoietic stem cell transplantation (HSCT), the volume of infused and DMSO contained in graft are the major causes of complications related to infusion. In this study, we evaluated feasibility of cryopreserving peripheral blood stem cell collects (PBSCC) at high cell concentration.

Methods: PBSCC from 40 patients with multiple myeloma or lymphoma were split and cryopreserved at two different concentrations of TNCs; one for standard concentration (SC) (2×10^8 cells/mL) and the other for high concentration (HC) (3×10^8 cells/mL). The viability of total nucleated cells and CD34+ cell count were examined before cryopreservation and after thawing. CFU-GM was examined with thawed products. Data were analyzed as two groups between good mobilizer (GM) and poor mobilizer (PM).

Results: There were no differences in TNC viability between SC and HC of all patients ($P=0.0656$) and PM ($P=0.9658$), however HC of GM showed significantly lower viability than SC ($P=0.0314$). CD34+ cell viability did not differ between SC and HC. CD34+ cell recovery was decreased in HC of all patients ($P=0.459$) and GM ($P=0.0164$), but no differences between SC and HC in PM ($P=0.9658$). CFU-GM clonogenic efficiency between SC and HC was not different in all patients ($P=0.0635$) and PM ($P=0.8984$), but was decreased in HC of GM ($P=0.0427$).

Conclusion: Cryopreservation of PBSCC at 3×10^8 cells/mL seems to have minimal adverse effect on the quality of PBSC after thawing, particularly in PM. This approach may help to reduce infusion related complications while decreasing the cost of processing and storage of PBSCC. (Korean J Blood Transfus 2015;26:26-37)

Key words: CD34 antigen, Cryopreservation, Peripheral blood stem cell transplantation

Received on January 16, 2015. Revised on March 15, 2015. Accepted on March 16, 2015

Correspondence to: Eun-Suk Kang

Department of Laboratory Medicine and Genetics, Samsung Medical Center, Sungkyunkwan University School of Medicine, 81 Irwon-ro, Gangnam-gu, Seoul 135-710, Korea

Tel: 82-2-3410-2703, Fax: 82-2-3410-2719, E-mail: eskang@skku.edu

© This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.
Copyright © 2015 The Korean Society of Blood Transfusion

서론

자가말초조혈모세포이식은 조혈모세포를 채집한 후 이식 전에 고농도 항암화학 요법을 시행하기 때문에 조혈모세포의 냉동 보관이 반드시 필요하다.^{1,2)} 조혈모세포의 냉동 보존제로는 5~10% 농도의 dimethyl sulfoxide (DMSO)를 가장 많이 사용하고 있다.³⁾ DMSO는 세포 내로 신속하게 확산되어 세포내의 물분자와 결합하여 얼음결정의 생성을 억제시키고, 세포내외의 용질농도 차이를 줄여 세포 내 탈수를 감소시키는 기전을 통하여 냉동된 세포의 손상을 극소화 시키는 역할을 한다.⁴⁾ DMSO는 냉동보존제 뿐만 아니라 항염증 작용, 국소 마취와, 이뇨작용, 혈관확장 등의 효과를 가지고 있어 이에 관련된 피부질환 및 류마티스 질환의 보조적인 약제로 쓰이기도 하였다.⁵⁾ 현재 DMSO는 주로 냉동 보존제로 사용되고 있으나 조혈모세포이식 시 조혈모세포와 함께 DMSO의 양이 많이 들어가는 경우 오심 및 구토, 열감, 복통 심하게는 경련, 급사 등의 부작용이 보고되고 있으며, 조혈모세포 이식 건당 56.9%에서 부작용이 발생하는 것으로 보고되고 있고,⁶⁾ 이는 주입된 DMSO의 양과 연관이 있다고 알려져 있다.⁷⁻⁹⁾ 주입되는 DMSO의 양이 환자 몸무게 1 kg 당 0.6 g (약 0.5 mL) 이상인 경우 신경학적 증상이 유발 될 수 있다는 것이 알려져 있고,¹⁰⁾ 조혈모세포이식시 주입되는 DMSO 양이 몸무게 1 kg 당 1 g (약 0.9 mL)이 넘지 않도록 권고하고 있다.¹¹⁾ 또한 하루에 주입하게 될 DMSO가 24 mL 이상이라면 2일에 나누어서 주입하는 것이 좋다고 알려져 있다.⁸⁾ 본 기관에서는 냉동 보존하는 조혈모세포채집물 1백의 부피는 대략 50 mL로 DMSO가 5 mL 들어있다. 즉 70 kg 체중을 가진 성인을 기준으로 7백 이상을 주입한다면 신경학

적 증상을 비롯한 부작용이 발생할 수 있다. 그러므로 조혈모세포 이식 시 함께 주입되는 DMSO의 양을 줄이면서도 세포의 생존율이나 기능에 영향을 적게 주는 냉동보존 방법을 찾는 것이 중요하다.

그동안 체내 주입되는 DMSO 양을 줄이기 위해서 냉동 보존 시 사용되는 DMSO의 양을 10% 미만으로 줄이거나,¹²⁾ 다른 냉동보존제와 혼합하여 사용하거나,¹³⁾ 해동 후 조혈모세포를 이식하기 전 DMSO를 세척하는 방법¹⁴⁾들이 보고되었다. 또한 저장하는 세포의 농도를 높임으로 해서 상대적으로 이식 시 주입되는 DMSO 양을 줄이는 방법도 보고되고 있다.¹⁵⁾

국외 연구들에 따르면 조혈모세포의 저장 농도를 $0.2-3 \times 10^8$ cells/mL로 다양하게 사용하고 있고,¹⁶⁾ 한 기관에서는 $3.7 \pm 1.9 \times 10^8$ cells/mL로 저장하여도 생착능의 소실이 없다고 보고하였다.¹⁷⁾ 그러나 말초조혈모세포 이식후 발생한 간질발작이 체내 높은 백혈구 수치와 관련이 있음이 보고된 바 있어¹⁸⁾ 단위 용적당 적정 세포 수로 체제를 희석 혹은 농축하는 과정은 중요할 것으로 생각된다. 한편 국내에서는 기관별 냉동세포 농도에 대해서는 조사된 바 없으며 조혈모세포 냉동 보존 시 적정 세포 수에 대한 연구 또한 전무하다.

본 기관에서는 말초조혈모세포 이식을 시작할 이래로 냉동보존에 앞서 총유핵세포의 농도를 2×10^8 cells/mL로 조정하여 저장해 오고 있다. 그러나 채집효율이 낮은 poor mobilizer 및 소아 환자의 경우에는 DMSO 및 주입용량으로 인한 부작용에 취약하다. 따라서 이로 인한 문제를 해결하고자 기존 냉동보관시 농도보다 1.5배 농도인 3×10^8 cells/mL로 냉동 저장 후 조혈모세포의 생존율, 회수율, 집락형성능을 평가함으로써 고농도 저장의 임상적용 효용성을 확인하고자 하였다.

대상 및 방법

1. 대상

2013년 6월부터 2014년 3월까지 삼성서울병원 혈액종양내과에 자가조혈모세포 채집을 위해 내원한 40명(남자: 18, 여자: 22)의 성인환자를 대상으로 하였다. 환자의 평균나이는 57세로 44세부터 65세까지의 분포를 보였으며 환자의 진단명은 형질세포 골수종(plasma cell myeloma, MM) 26례, 미만성 큰 B세포 림프종(diffuse large B-cell lymphoma, DLBL) 8례, NK/T세포 림프종(NK/T cell lymphoma) 6례를 포함하였다. 항암 화학 요법 후 과립구집락자극인자(G-CSF, 10 µg/kg)를 피하주사 하여 조혈모세포를 말초 혈액 내로 가동화시켰다. 대용량 백혈구성분채집술을 시행하여 말초 조혈모세포 채집물(peripheral blood stem cell collects, PBSCC)을 얻었다. 이때 3회 이하의 채집술로 CD34+ 세포 2.0×10^6 /kg 이상을 수집할 수 있었던 환자를 Good mobilizer로, 4회 이상의 채집이 필요했던 환자를 Poor mobilizer로 정의 하였다

Table 1. Patient demographics

Characteristic	All	Good mobilizer	Poor mobilizer
No. of Patients	40	29	11
Gender (men/women)	18/22	16/13	2/9
Age (year)	57 (44 ~ 65)	56 (44 ~ 65)	58 (52 ~ 63)
Diagnosis (n)			
MM	26	23	3
DLBCL	8	4	4
Mature T- and NK-cell neoplasm	6	2	4

Abbreviations: MM, multiple myeloma; DLBCL, diffuse large B-cell lymphoma.

고,¹⁹⁾ Good mobilizer는 29명, Poor mobilizer는 11명 이었다(Table 1).

2. 채집 및 냉동보관

대상자에서 G-CSF를 투여해 말초로 조혈모세포를 가동시킨 후 백혈구 수치가 3.0×10^9 /L을 넘을 때 혈액 성분 분리기(Cobe Spectra, CaridianBCT Inc., Lakewood, CO, USA)를 사용하여 대용량 백혈구성분채집술을 시행하였다. 한 환자당 첫째날에 얻어지는 제제를 대상으로 채집물을 반으로 나누어 각각 4000×g 5분간 원심 분리를 하여 총 유핵세포(total nucleated cells, TNC)를 기준농도 2×10^8 cells/mL (Standard concentration)과 고농도 3×10^8 cells/mL (High concentration)가 되도록 농축하여 자가혈장과 10% DMSO를 사용하여 냉동저장 하였다. 본 연구에서 비교농도로 3×10^8 cells/mL를 선택한 것은 환자에게 주입될 말초조혈모세포 채집물을 직접 반으로 나누어 두가지 농도로 농축, 냉동하여야 하므로 기존 농도보다 높으면서도 이전 보도된 논문들을 근거로 안전한 농도라고 생각되었기 때문이다. 추후 각종 검사를 위하여 기준농도군과 고농도군 각각의 PBSCC로부터 2 mL을 소분하였다. Programmed freezer (CRYOMED Model1010, Thermo Fisher Scientific, Marietta, OH, USA)를 이용하여 서서히 냉동 시킨 후 -130°C 이하의 기체 질소 상태에 보관하였다. 채집물의 냉동 보관기간의 중앙값은 96.5일(최소 20일~최대 160일)이었다.

3. 세포의 생존율과 CD34+세포의 회수율 측정

PBSCC 중 총유핵세포의 세포 생존율은 Trypan blue (trypan blue 0.4% solution, Life Technologies, Grand Island, NY, USA)로 염색한 다음 전체 세포 중 염색되지 않은 세포의 비율을 구하는 trypan

blue exclusion test를 통하여 측정하였고, CD34+ 세포의 생존도는 aminoactinomycin D (7-ADD, Beckman Coulter Inc., Marseille, France) 염색을 하여 유세포분석기로 측정하였다.

존재하는 CD34+ 세포의 정량은 BD Stem Cell Enumeration Kit (Becton, Dickinson and Company, San Jose, CA, USA)를 이용하여 PBSCC 100 μ L에 FITC가 부착된 항CD45 단클론항체 20 μ L과 PE가 부착된 항CD34 단클론항체 20 μ L를 첨가하여 유세포분석기(FACS Canto II, Becton, Dickinson and Company, San Jose, CA, USA)를 이용하여 측정하였다. 냉동 전과 해동직후의 CD34+ 세포 수의 비교를 통해 CD34+ 세포의 회수율을 구하였다.

4. CFU-GM 집락형성능력의 측정

기존농도군과 고농도군으로부터 각각 세포 10^5 개를 methylcellulose media (MethoCult™ H4035 Optimum without EPO, Stem cell Technologies Inc, Vancouver, Canada)와 혼합 후 이를 37°C, 5% CO₂ 환경에서 14일간 배양하였고 도립 현미경에서 형성된 집락의 수와 모양을 관찰하였다. CFU-GM 집락은 50개 이상의 과립계세포가 모인 것으로 정의하였고 총 3회 반복검사의 평균을 구하였다.

5. 통계분석(Statistical analysis)

기존농도군과 고농도군간의 생존율, CD34+ 세포의 회수율, 집락형성능을 검정하기 위하여 Wilcoxon signed rank test, Pearson's correlation test, Bland-Altman plot analysis를 시행하였다. 자료는 중앙값과 사분위수범위(interquartile range, IQR)로 표현하였으며, P 값이 0.05 미만인 경우에 통계적으로 유의하다고 판단하였다. MedCalc Version 14 (Medcalc Software, Mariakerke, Belgium)를 사용하였다.

결 과

1. 세포생존율

Trypan blue exclusion test로 측정한 총유핵세포의 생존율은 기존농도군에서 86.6% (79.6~90.4) 고농도군에서 83.2% (78.9~88.3)로 두 군간에 서로 통계학적으로 유의한 차이를 보이지 않았다 ($P=0.0656$). Good mobilizer군에서는 각각 86.6% (80.8~90.3)와 83.5% (78.6~88.6)로 고농도군이 기존농도군에 비하여 통계적으로 유의하게 낮은 세포생존율을 보인 반면($P=0.0314$), Poor mobilizer군에서는 82.6% (76.5~90.3)와 82.8% (79.3~86.6)으로 두 농도군간 통계학적으로 유의한 차이를 보이지 않았다($P=0.9658$) (Fig. 1).

7-AAD 염색법으로 측정한 CD34+ 세포의 생존율은 기존농도군 86.2% (81.2~92.6)와 고농도군 87.5% (79.1~93.4)로 두 농도 군간 통계학적으로 유의한 차이를 보이지 않았다($P=0.8666$). 또한 Good mobilizer와 Poor mobilizer군 내에서도 기존농도군 87.8% (78.5~92.2)와 고농도군 86.5% (78.4~92.8) 그리고 기존농도군 84.0% (81.5~95.6)와 고농도군 90.0% (80.6~93.9)로 두 농도군간에 통계학적으로 유의한 차이를 보이지 않았다($P=0.9483$, $P=0.7646$) (Fig. 2).

2. CD34 양성세포의 회수율

말초혈액조혈모세포채집물에서의 CD34+ 세포의 회수율은 기존농도군 78.5% (48.1~98.7)와 고농도군 67.0% (48.3~91.3)로 고농도군에서 유의하게 낮은 회수율을 보였다($P=0.0459$). 가동화 능력에 따라서는 Good mobilizer군에서 기존농도군 81.4% (48.7~97.6)와 고농도군 68.4% (48.5~90.3)로 통계학적으로 유의한 차이를 보이며($P=0.0164$) 고농도군에서 낮은 회수율을 보였다.

Fig. 1. Total nucleated cell viability by trypan blue exclusion test, correlation of cell viability and Bland-Altman plot in patients (A)(D)(G) total, (B)(E)(H) good mobilizer, (C)(F)(I) poor mobilizer.

Fig. 2. CD34+ cell viability by 7-AAD analysis, correlation of cell viability and Bland-Altman plot in patients (A)(D)(G) total, (B)(E)(H) good mobilizer, (C)(F)(I) poor mobilizer.

Fig. 3. Recovery rate of CD34 positive cells in patients (A)(D) total, (B)(E) good mobilizer, (C)(F) poor mobilizer.

나, Poor mobilizer군에서는 기존농도군 69.4% (42.5~98.9)와 고농도군 57.1% (46.3~97.8)로 두 군간에 통계학적으로 유의한 차이를 보이지 않았다($P=0.9658$) (Fig. 3).

3. CFU-GM 집락형성능 비교

CFU-GM 집락형성능은 기존농도군 27.8 (7.8~58.2) colony/ 10^5 cells와 고농도군 19.3 (10.0~52.7) colony/ 10^5 cells로 두 농도군간에 통계학적으로 유의한 차이가 없었다($P=0.0635$). 그러나 Good mobilizer군에서는 기존농도군 33.8 (16.8~64.4) colony/ 10^5 cells, 고농도군 27.2 (13.5~55.4) colony/ 10^5 cells로 통계학적으로 유의한 차이를 보이며($P=0.0427$) 고농도군에서 낮은 집락형성능

을 보였다. 반면 Poor mobilizer군에서는 기존농도군 6.4 (3.6~24.1) colony/ 10^5 cells, 고농도군 10.6 (6.3~17.7) colony/ 10^5 cells로 기존농도군과, 고농도군간에 통계학적으로 유의한 차이가 없었다($P=0.8984$) (Fig. 4).

고 찰

본 연구는 고농도로 자가말초조혈모세포를 냉동보존함으로써 냉동보존백의 수를 줄이고 냉동보존제로 사용되는 DMSO의 양을 줄여 이식 시 환자에게 발생할 수 있는 과용량부하와 DMSO에 의한 부작용을 감소시키고자 시행하였다. 더 나아가 고농도의 세포로 저장함으로써 해서 부피를

Fig. 4. CFU-GM Clonogenic efficiency after thawing in patients (A)(D) total, (B)(E) good mobilizer, (C)(F) poor mobilizer.

줄여 냉동보관의 효율성 증대를 도모하고자 하였다. 따라서 현재 본 기관에서 적용하고 있는 기존 농도인 2×10^8 cells/mL보다 1.5배 농축한 3×10^8 cells/mL로 조혈모세포제제를 저장하였고 해동 후 조혈모세포의 생존율, 회수율, CFU-GM 집락 형성능을 비교하였다. 또한 가동화 능력에 따라 Good mobilizer와 Poor mobilizer 두 군으로 환자를 나누어 각 군에 미치는 영향이 어떤지를 알아보았다.

기존 2×10^8 cells/mL으로 저장한 경우를 기준군으로 삼았을 때, 3×10^8 cells/mL로 저장한 경우 Trypan blue exclusion test를 이용한 세포 생존율과 7-AAD 염색을 이용한 CD34+세포의 생존율은 전체 두 군간에 별차이가 없었지만 Good mo-

bilizer의 경우 trypan blue exclusion test에서 생존율이 감소하는 결과를 보였다. 세포생존율은 검사 방법에 따라 차이를 보일 수 있다고 알려져 있는데, trypan blue법은 총유핵세포의 생존율을 측정하기 때문에 CD34+ 조혈모세포의 생존율은 정확하게 반영하지 못할 가능성이 있다고 알려져 있다.²⁰⁾ trypan blue exclusion test로 측정한 생존율은 7-AAD로 측정한 생존율 보다 높게 나오는데 이는 과립구들이 손실되면서 발생하는 차이로 생각할 수 있다. 7-AAD를 이용해 유세포 분석을 시행할 경우 trypan blue보다 민감하게 세포사멸을 검출할 수 있고, CD34+세포 측정과 7-AAD 염색을 같이 시행함으로써 CD34+세포의 생존도를 직접 알 수 있는 장점이 있다.²¹⁾ 조혈모세포의 이

식 후 생착과 예후에 중요한 CD34+ 조혈모세포의 생존율은 7-AAD로 측정한 결과로 미루어 볼 때 두 군간에 차이가 없을 것으로 판단된다. 또한 본 연구와 유사한 총유헤세포의 저장농도를 평가한 타 연구결과²²⁾와 비교해 볼 때 본 연구에서의 trypan blue exclusion test를 이용한 세포 생존율이 더 높았다.

CD34+세포의 회수율은 전체 기존농도군과 고농도군을 을 비교해 보았을 때, 고농도군에서 낮은 회수율을 보였고, 이러한 차이는 Good mobilizer에서도 관찰되었으나, Poor mobilizer에서는 두 농도군간에 의미 있는 차이를 보이지 않았다. 타 연구²²⁾와 비교하였을 때(86.4%) 본 연구에서는 좀 더 낮은 CD34+세포의 회수율을 보였다(기존농도군: 78.5%, 고농도군: 67.0%). 가동화한 말초혈의 경우 분화된 과립구를 다수 포함하고 있는데 냉동 보관한 조혈모세포 제제를 해동 하는 경우 이들의 용해로 만들어지는 세포응집체 내에 생존 세포들이 다수 포함되어 있어 세포손실을 유발한다는 연구로 미루어 볼 때²³⁾ CD34+세포의 회수율의 감소는 이와 같은 원인으로 생각해 볼 수 있다.

앞서 해동 후 생존도와 CD34+세포 회수율 결과와 유사하게 Good mobilizer군에서는 기존농도군이 좀 더 좋은 CFU-GM 집락형성능을 보였다. 그러나 전체 환자군과 Poor mobilizer군에서는 CFU-GM 집락형성능이 두 농도군간에 유의한 차이가 없었으며 Poor mobilizer군에서는 고농도군과 기존농도군 사이에 CFU-GM 집락형성능이 통계적으로 유의한 차이를 보이지 않아 세포의 저장 농도는 해동 후 조혈모세포의 기능에 큰 차이를 보이지 않는 것으로 생각하였다.

자가조혈모세포의 고농도 저장(3×10^8 cells/mL)은 기존농도(2×10^8 cells/mL)로 저장했을 때 향후 환자에 이식되는 조혈모세포제제의 전체 부피를

30% 정도 감소시킬 수 있다. 이는 이식 시 조혈모세포 주입시간을 줄일 수 있을 뿐만 아니라 주입되는 DMSO의 양도 30% 정도 감소시킬 수 있어, 이식 후 DMSO에 의한 부작용의 발생도 줄일 수 있을 것이다. 또한 저장과정에서 사용되는 DMSO나 저장공간을 줄일 수 있어 말초조혈모세포 채집 후의 전처리 비용과, 저장 비용을 절감시키는데 효과가 있다. 그러므로 고농도 저장은 해동 후 세포의 생존율이나 기능에 영향을 미치지 않으면서도 사용되는 DMSO의 양을 줄일 수 있는 장점이 있다. 또한 국내에서 조혈모세포 냉동 보존 시 적정 세포 수에 대한 연구는 드물게 시행되었기 때문에 본 연구에서 총유헤세포의 농도에 따른 조혈모세포의 생존율, 회수율, CFU-GM 집락형성능의 평가는 유용한 것으로 생각된다.

그동안 연구에서 Good mobilizer와 Poor mobilizer를 분류하여 자가말초조혈모세포의 냉동 보존이 미치는 영향을 조사하지 않았던 점을 미루어 볼 때, 본 연구의 결과가 주는 의미가 있다. 본 연구의 결과에서는 총유헤세포의 생존도, CD34+세포의 회수율 및 CFU-GM 집락형성능이 고농도 저장시 감소되어 있었는데 이는 주로 Good mobilizer인 경우 영향을 미치고 Poor mobilizer의 경우에는 농축 농도에 따른 유의한 차이를 관찰할 수 없었다. 그러므로 채집량이 많은 Poor mobilizer의 경우에는 고농도 저장시 이식시 주입량 감소로 인하여 부작용 발생 가능성은 감소하면서 이식 후 생착에 영향을 미치는 CD34+세포의 수 및 기능의 변화는 미미할 것으로 생각된다. 이외 이식에 영향을 미칠 수 있는 이식 전 치료, 환자의 성별과 같은 타 요인들을²⁴⁾ 종합적으로 고려하여야 할 것이다.

본 연구의 제한점으로는 대상과 질환군이 국한되어 있으며 환자군의 규모가 작아 두 농도 군간의 차이가 명확하게 밝히고 적용범위를 정하기

는 어렵다는 것이다. 이를 위해서는 더 많은 수의 환자를 대상으로 한 연구가 진행되어야 할 것이며, 또한 전향적 연구를 통해 실제 환자에게 서로 다른 농도로 농축 보관한 말초혈액조혈모세포를 이식 후 생착 성적을 평가함으로써 좀 더 임상적 적절성을 확인 할 수 있을 것이다.

결론적으로 본 연구에서는 3×10^8 cells/mL로 조혈모세포제제를 농축 보관할 때 해동후 CD34+ 세포의 생존율 및 CFU-GM 집락형성능과 같은 세포의 질적 요소에 미치는 영향은 미미함을 보여주었으며, 오히려 이식 시 DMSO 및 용량 과부하와 같은 부작용을 줄이고 세포 처리 및 저장의 효율의 높일 수 있음을 제안하는 바이다.

요 약

배경: 자가말초조혈모세포 이식 시, 이식되는 조혈모세포제제의 부피와 이와 함께 주입되는 DMSO는 이식관련 부작용의 주요 원인이다. 본 연구에서는 고농도로 말초혈액조혈모세포를 저장하였을 때의 임상적 효용성을 평가하였다.

방법: 40명의 형질세포 골수종과 림프종 환자에서 얻은 자가말초조혈모세포 채집물을 둘로 나누어 한 군은 유핵세포의 농도가 2×10^8 cells/mL인 기존농도, 나머지 한 군은 3×10^8 cells/mL인 고농도로 저장을 하였다. 냉동보존 전과 해동한 제제에서 각각 세포 생존율과 CD34+ 세포수를 측정하였고, CFU-GM 집락형성능은 해동 제제에서 측정하였다. 가동화 정도에 따라 환자군을 Good mobilizer (GM)과 Poor mobilizer (PM)로 나누어 분석하였다.

결과: 총유핵세포의 생존율은 전체 환자와, Poor mobilizer군에서 기존농도군과 고농도군간에 서로 통계학적으로 유의한 차이를 보이지 않았으나($P=0.0656$, $P=0.9658$), Good mobilizer군은

고농도군에서 기존농도군 보다 낮은 생존율을 보였다($P=0.0314$). 7-AAD로 측정된 CD34+ 세포 생존율은 기존농도군과 고농도군간에 서로 통계학적으로 유의한 차이를 보이지 않았다. CD34+ 세포의 회수율은 전체 환자와, Good mobilizer 군은 고농도군에서 낮은 회수율을 보였으나($P=0.459$, $P=0.0164$), Poor mobilizer군에서는 각각의 농도군 사이의 유의한 차이를 보이지 않았다($P=0.9658$). CFU-GM 집락형성능은 전체 환자와 Poor mobilizer군에서 기존농도군과 고농도군간에 서로 통계학적으로 유의한 차이를 보이지 않았으나($P=0.0635$, $P=0.8984$), Good mobilizer군은 고농도군에서 낮은 CFU-GM 집락형성능을 보였다($P=0.0427$).

결론: 3×10^8 cells/mL로 조혈모세포제제를 냉동 보관하는 것이 세포의 질적 요소에 미치는 영향은 특히 Poor mobilizer에서 미미하다. 고농도 냉동보존은 이식 시 DMSO 및 용량 과부하와 같은 부작용을 줄이고 세포 처리 및 저장의 효율의 높 이는데 도움이 된다.

References

1. Copelan EA. Hematopoietic stem-cell transplantation. N Engl J Med 2006;354:1813-26
2. Jang SJ, Park E, Park SB, Jung SK, Kim HS, Kang CM. Viability and colony forming capacity of hematopoietic stem cells after cryopreservation. Korean J Pediatr Hematol Oncol 2001;8:298-304
3. Akkk CA, Liseth K, Nesthus I, Lkeland T, Tefre K, Bruserud O, et al. Autologous peripheral blood progenitor cells cryopreserved with 5 and 10 percent dimethyl sulfoxide alone give comparable hematopoietic reconstitution after transplantation. Transfusion 2008;48:877-83

4. Mandumpal JB, Kreck CA, Mancera RL. A molecular mechanism of solvent cryoprotection in aqueous DMSO solutions. *Phys Chem Chem Phys* 2011;13:3839-42
5. Santos NC, Figueira-Coelho J, Martins-Silva J, Saldanha C. Multidisciplinary utilization of dimethyl sulfoxide: pharmacological, cellular, and molecular aspects. *Biochem Pharmacol* 2003;65:1035-41
6. Bojanic I, Cepulic BG, Mazic S, Batinic D, Nemet D, Labar B. Toxicity related to autologous peripheral blood haematopoietic progenitor cell infusion is associated with number of granulocytes in graft, gender and diagnosis of multiple myeloma. *Vox Sang* 2008;95:70-5
7. Alessandrino P, Bernasconi P, Caldera D, Colombo A, Bonfichi M, Malcovati L, et al. Adverse events occurring during bone marrow or peripheral blood progenitor cell infusion: analysis of 126 cases. *Bone Marrow Transplant* 1999;23:533-7
8. Sauer-Heilborn A, Kadidlo D, McCullough J. Patient care during infusion of hematopoietic progenitor cells. *Transfusion* 2004;44:907-16
9. Cox MA, Kastrup J, Hrubisko M. Historical perspectives and the future of adverse reactions associated with haemopoietic stem cells cryopreserved with dimethyl sulfoxide. *Cell Tissue Bank* 2012;13:203-15
10. Rowley S, MacLeod B, Heimfeld S, Holmberg L, Bensinger W. Severe central nervous system toxicity associated with the infusion of cryopreserved PBSC components. *Cytotherapy* 1999;1:311-7
11. Shu Z, Heimfeld S, Gao D. Hematopoietic SCT with cryopreserved grafts: adverse reactions after transplantation and cryoprotectant removal before infusion. *Bone Marrow Transplant* 2014; 49:469-76
12. Smagur A, Mitrus I, Giebel S, Sadus-Wojciechowska M, Najda J, Kruzel T, et al. Impact of different dimethyl sulphoxide concentrations on cell recovery, viability and clonogenic potential of cryopreserved peripheral blood hematopoietic stem and progenitor cells. *Vox Sang* 2013;104:240-7
13. Hamm JY, Shon YH, Suh JS. Cryopreservation of collected peripheral blood hematopoietic stem cell product with 5% dms0 by adding nontoxic natural cryoprotectants. *Korean J Blood Transfus* 2011;22:89-98
14. Calmels B, Drezet A, Huynh C, Autret A, Stoppa AM, Bouabdallah R, et al. Automated washing of autologous hematopoietic stem cell grafts after thawing does not impair engraftment. *Bone Marrow Transplant* 2014;49:1127-8
15. Martin-Henao GA, Torrico C, Azqueta C, Amill B, Querol S, Garcia J. Cryopreservation of hematopoietic progenitor cells from apheresis at high cell concentrations does not impair the hematopoietic recovery after transplantation. *Transfusion* 2005;45:1917-24
16. Rowley SD. Hematopoietic stem cell cryopreservation: a review of current techniques. *J Hematother* 1992;1:233-50
17. Rowley SD, Bensinger WI, Gooley TA, Buckner CD. Effect of cell concentration on bone marrow and peripheral blood stem cell cryopreservation. *Blood* 1994;83:2731-6
18. Bachier C, Potter J, Potter G, Sugay R, Shaughnessy P, Chan K, et al. High white blood cell concentration in the peripheral blood stem cell product can induce seizures during infusion of autologous peripheral blood stem cells. *Biol Blood Marrow Transplant* 2012;18:1055-60
19. Olivieri A, Marchetti M, Lemoli R, Tarella C, Iacone A, Lanza F, et al; Italian Group for Stem Cell Transplantation. Proposed definition

- of 'poor mobilizer' in lymphoma and multiple myeloma: an analytic hierarchy process by ad hoc working group Gruppo ItalianoTrapianto di Midollo Osseo. Bone Marrow Transplant 2012;47:342-51
20. Yi DY, Huh JY, Kang MS. Assessment of cell viability in umbilical cord blood before cryopreservation. Korean J Blood Transfus 2010;21:140-7
 21. Humpe A, Beck C, Schoch R, Kneba M, Horst HA. Establishment and optimization of a flow cytometric method for evaluation of viability of CD34+ cells after cryopreservation and comparison with trypan blue exclusion staining. Transfusion 2005;45:1208-13
 22. Reich-Slotky R, Colovai AI, Semidei-Pomales M, Patel N, Cairo M, Jhang J, et al. Determining post-thaw CD34+ cell dose of cryopreserved haematopoietic progenitor cells demonstrates high recovery and confirms their integrity. Vox Sang 2008;94:351-7
 23. Koh SH, Choi HS, Park ES, Kang HJ, Ahn HS, Shin HY. Comparison of hematopoietic stem cell containing fractions between cryopreserved-thawed cord blood and mobilized peripheral blood. Korean J Pediatr Hematol Oncol 2005; 12:310-6
 24. Oran B, Malek K, Sanchorawala V, Wright DG, Quillen K, Finn KT, et al. Predictive factors for hematopoietic engraftment after autologous peripheral blood stem cell transplantation for AL amyloidosis. Bone Marrow Transplant 2005;35:567-75