

체의 증폭한 제대혈 T 림프구의 면역학적 특성

한림대학교 의과대학 산부인과학교실¹, 울산대학교 의과대학 산부인과학교실²

정 지 윤¹ · 김 용 만² · 남 주 현²

목적 : 본 연구의 목적은 제대혈 T 림프구를 분리하여 성인의 혈액과의 차이를 알아보고, 여러 배양법을 시행하여 제대혈 T 림프구를 증폭시키는 최적 조건을 확립한 후, 증폭 전후의 T 림프구의 면역학적 특성을 비교 분석하고자 하였다.

연구 방법 : 제대혈과 정상 성인의 혈액 T 림프구의 세포 표식자 및 혈액학적 결과를 비교하였으며, 제대혈 T 림프구를 배양한 후 세포 표식자 분석을 시행하였다. 항CD3 항체의 T 림프구 증폭 여부를 알아보기 위해 여러 농도의 항CD3 항체를 첨가하여 배양한 후 결과를 비교하였다. 다음으로 증폭된 T 림프구의 면역학적 특성을 알아보기 위해 항CD3 항체로 전처리 한 플라스크에서 4일간 배양하고 IL-2 175 U/ml를 첨가하여 10일간 배양한 후 세포 표식자 분석, 증폭능, 세포 살해능을 분석하였다.

결과 : 배양 전 제대혈 T 림프구에는 성인의 말초 혈액에 비해 미성숙 세포를 의미하는 표식자들의 발현이 유의하게 높았다. 항CD3 항체를 이용한 증폭 실험 결과 항CD3 항체의 농도가 100 ng/ml인 경우에 유의한 증폭이 관찰되었다($p < 0.05$). 배양시간에 따른 비교에서는 항CD3 항체와 IL-2를 함께 사용한 경우 배양 제6일에서 8일 사이에 높은 증폭을 보였고, 세포의 생존력도 제6일까지는 평균 90% 이상이였다. 또한 배양 전에 비해 성숙 세포를 의미하는 세포 표식자의 증가가 관찰되었다. K562 세포 및 SK-OV-3 세포에 대한 세포 살해능을 비교한 결과 SK-OV-3 세포에 대한 살해능은 effector/target (E/T) 세포의 비율을 40 : 1로 하였을 때 체외 증폭 이전에 비해 증폭 후에 유의하게 증가하였다.

결론 : 항CD3 항체와 IL-2를 이용한 배양법은 제대혈 T 림프구의 분화를 선택적으로 증폭 및 성숙시킬 수 있음을 확인하였고, 증폭한 T 림프구의 세포 살해능도 확인하였다.

중심단어 : 제대혈, T 림프구, 체외 증폭, 면역학적 특성, 세포 살해능

서 론

제대혈에는 골수와 말초혈액에 비해 상당히 높은 비율의 조혈모세포(hematopoietic progenitor cell)가 존재한다. 제대혈에서 채취한 조혈모세포를 이식하는 경우 공여자에 대한 위험도가 낮고, 전염성 질환을 전파시킬 위험성도 낮으며, 동종 골수이식에서 가장 큰 문제의 하나인 이식편대 숙주반응(graft-versus-host disease)의 발생이 현저하게 약하게 나타난다.^{1,2} 이식편대 숙주반응이 현저하게 약한 이유는 주로 제대혈 조혈모세포가 가지는 면역학적 미성숙성이 가장 큰 요인으로 생각된다. 이와 같

은 장점으로 인해 1988년 Fanconi 빈혈 환자에서 처음으로 제대혈 이식이 성공한 이래 급성 림프구성 백혈병, 급성 골수성 백혈병, 만성 골수성 백혈병, 연소형 만성 골수성 백혈병, 골수 이형성 증후군 등의 악성 혈액질환과 재생 불량성 빈혈, 중증 복합 면역결핍증 등의 비악성 질환에서 제대혈 이식이 보고되어 왔다.^{3,4} 조혈모세포의 이식은 이들 이외에도 여러 유전병 및 대사 장애 등의 치료에 널리 유용하게 사용되고 있다.⁵ 현재까지는 성인의 골수에서 분리한 동종 조혈모세포 및 원시 세포가 가장 많이 사용되고 있으나 최근 골수이식의 대체 방법으로 제대혈 이식에 대한 관심이 높아지면서 이에 대한 많은 연구가 진행 중이다. 또한 제대혈은 간엽 줄기세포(mesenchymal stem cell)의 연구에도 적합한 조건을 갖추고 있기 때문에 이에 대한 연구도 활발하다.¹

동종 골수 및 혈액 이식의 가장 중요한 합병증인 이식편대 숙주 반응의 발생에는 수혜자의 성숙한 T 림프구

논문접수일 : 2005년 11월 28일 채택일 : 2005년 12월 6일
교신저자 : 남주현, 138-736 서울시 송파구 풍납동 388-1

서울아산병원 산부인과

전화 : (02) 3010-3628 · 전송 : (02) 476-7331

E-mail : jhnam@amc.seoul.kr

가 중요한 역할을 하는데, $CD4^+$, $CD8^+$ T 림프구들 및 자연 살해 세포가 이에 관여한다.² T 림프구는 면역반응을 결정하는 중요한 세포 중의 하나로 B 림프구에 작용하여 항체 생산을 유도하고, 대식 세포에 작용하여 대식 세포를 활성화시키며, 세포독성 림프구로 분화되어 세포 매개성 면역반응을 유도한다. 제대혈의 여러 세포 구성 중 림프구의 면역학적인 특성에 관한 연구는 미성숙 세포가 많아 배양이 어렵고, 현재까지 보고된 배양 방법들이 저자들마다 서로 차이가 많고, 결과가 일정치 않아⁶⁻⁸ 연구 방법 설정에 많은 어려움이 있어 다양한 연구가 이루어지지 못하고 있다. 성인에서도 림프구에 대한 연구는 실험실 배양 및 증폭(expansion)이 까다롭다는 점 때문에 많은 어려움이 있다. 제대혈 T 림프구에는 성인에서와 달리 림프구 수용체의 발현도가 낮고, 항CD3 항체와의 반응에 따른 Interleukin-2 (IL-2), Interferon- γ (IFN- γ)의 생성이 감소되어 있다. 또한 세포 독성 T 림프구의 활성화 유도도 쉽지 않다. 그렇지만 제대혈에서 분리해 낸 림프구, 특히 T 림프구는 적절한 배양 환경만 조성된다면 다양한 기능을 가진 여러 세포로 분화할 수 있고 자기 복제능이 탁월하며,⁹ 나아가서 종양학과 관련하여 특정 종양세포에 반응하는 면역세포 분획을 선택적으로 배양, 증폭시킨 후 항 종양성을 갖도록 하여 세포면역요법에 적용해보는 것과 같은 임상적 응용에 대한 기대효과도 크다. 따라서 본 연구는 제대혈 T 림프구를 분리하여 면역학적 표현형이 성인 말초혈액의 경우와 어떠한 차이를 보이는지 확인하고, 제대혈을 여러 방법으로 배양하여 T 림프구의 증폭을 위한 최적 조건을 확립한 후, 증폭 전후의 T 림프구의 면역학적 특성을 서로 비교 분석하고자 하였다.

연구 대상 및 방법

1. 제대혈 및 성인의 말초 혈액 채취

질식분만 혹은 제왕절개술을 통해 분만한 정상 만삭 산모 40명을 대상으로 태반이 만출되기 전 제대를 결찰하고 소독한 다음, 175 ml의 멸균 백이 연결된 18-gauge 주사침으로 제대정맥을 천자하여 채혈하였다. 채취량은 평균 95 cc이었다. 멸균 백에는 항응고제로 citrate phosphate dextrose (CPD) 23 ml가 포함되었다. 모든 제대혈은 가능한 한 채혈 후 바로 실험에 사용하였다. 태반 및 제

대기형이 있는 경우, 감염이 있거나 의심되는 경우, 태아의 선천성 기형이 있는 경우, 선천성 대사질환에 대한 가족력이 있는 경우, 또는 채혈량이 60 ml 미만으로 분리한 단핵구 세포의 수가 적은 경우에는 연구 대상에서 제외하였다. 배양 전 제대혈 림프구의 세포 표식자 및 혈액학적 결과를 성인 말초 혈액의 경우와 비교하기 위해 정상 성인 10명의 정맥혈을 채취하였다.

2. 세포 표식자 분석

제대혈의 배양 전후 및 성인 혈액에서 세포 표식자 분석을 시행하여 비교하였다. 표식자 분석을 위해 fluorescein isothiocyanate (FITC) 또는 phycoerythrin (PE)에 결합된 단일 클론 항체를 이용하였다. 사용된 단일 클론 항체들은 항CD3 항체(R&D Systems, Minneapolis, USA), 항CD4 항체, 항CD8 항체, 항CD25 항체, 항CD16/56 항체(Serotec, Oxford, UK), 항CD38 항체, 항CD45RA 항체, 항CD45RO 항체(Becton-Dickinson, SanJose, USA)였다. 제대혈 5 ml를 취해 ammonium chloride를 이용하여 비유헤 세포의 용해법으로 적혈구를 제거한 후, 1,500 rpm에서 5분간 원심 분리하여 부유물은 제거하였다. 여기에 phosphate-buffered saline (PBS) 3 ml, 2% fetal bovine serum (FBS)과 0.02% NaN_3 를 첨가하였다. 각각의 항체를 10 μ l 씩 첨가한 후 30분간 4°C에서 배양하였다. 다시 PBS 3 ml, 2% FBS과 0.02% NaN_3 를 첨가한 후 두 차례 원심 분리하여 세척하였다. 성인의 말초 혈액도 위와 같은 방법으로 처리하였다. 배양 후 림프구 표식자의 분석은 Ficoll-Hypaque 밀도 기울기 원심 분리법으로 단핵구 세포를 분리하여 항CD3 항체와 IL-2를 이용하여 배양한 후 배양 제7일 내지 8일에 배양된 T 림프구에 PBS 3 ml, 2% FBS과 0.02% NaN_3 를 첨가하여 배양 전과 같은 방법으로 항체를 첨가하여 처리하였다. 표식자 분석은 FACSsort flow cytometry (Becton Dickinson Immunocytometry System, BDIS, USA)로 분석하였다. 각각의 림프구 분획의 상대적인 크기는 전체 림프구 중의 비율로 표시하였다. 림프구 게이트의 순도 및 회복성은 $CD14^+$ (Leu-M3)/ $CD45^+$ (Hle-1)의 염색을 이용하여 측정하였다. 이 방법은 림프구는 CD45에 대해서는 높은 발현 빈도를 나타내고 CD14의 발현은 거의 보이지 않지만, 적혈구, 혈소판 및 비혈액 세포의 경우에는 극히 소량의 CD45 발현을 보인다는 차이를 이용한 것이다. 다른 세포의 오염을 최

소화하고 림프구는 최대한 포함시킬 수 있도록 연구를 시행하기 이전에 광산란구의 림프구에 대한 순도 및 회복성을 85% 이상이 되도록 결정하였다.

3. 림프구의 체외 배양

Ficoll-Hypaque (비중=1.077) 밀도 기울기 원심 분리법으로 단핵구 세포를 분리하여 두 단계로 배양하였다.

1) 항CD3 항체의 농도별 림프구 증폭능 비교

분리한 단핵구 세포 중 유착성 단핵세포를 제거하기 위해 10% FBS를 함유한 RPMI 1640 배지에 부유시켰으며 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 2-3시간동안 배양시켜 부유 단핵 세포만 분리하였다. 첨가된 항CD3 항체의 농도에 따른 증폭능의 차이와 배양시간에 따른 차이를 알아보기 위하여 세포를 96 미세판(micro-plate)에 2×10^5 cells/well 씩 넣고 한 군은 항체를 첨가하지 않은 배지에서, 다른 군은 CD3항체를 1 ng/ml, 10 ng/ml, 100 ng/ml씩 각각 첨가하여 배양하였다. 또한 면역증강 물질인 *Loranthus yadoriki*의 첨가가 어떠한 영향을 미치는지 알아보기 위해 각각의 항CD3 항체의 농도에 *L. yadoriki* 10µg/ml를 첨가하여 모두 7군으로 나누어 배양하였다. 배양시간은 48시간, 72시간으로 구분하여 증폭정도를 [³H]-thymidine 결합력 분석을 이용하여 림프구 증폭능을 서로 비교하였다.

2) T 림프구 증폭능 실험

각각의 방법으로 배양시킨 후, 증폭능의 분석은 [³H]-thymidine을 각 미세판에 2µCi씩 처리하여 4시간 배양한 다음 세포를 수확하여 방사능 측정기로 측정하여 방사능 동위 원소인 thymidine과의 결합력을 측정하여 dpm 값을 얻었다. 각 실험은 4배수로 하였다.

3) 항 CD3 항체와 IL-2를 이용한 체외증폭

항CD3 항체의 직접적인 첨가는 증폭 후의 세포 표식자 분석 결과에 영향을 줄 수 있기 때문에 면역학적 분석을 위한 배양에는 위의 방법과는 달리 Azuma 등⁶ 제시한 체외증폭 방법의 단점을 보완하여 사용하였다. 먼저 T25 플라스크를 항CD3 항체 용액으로 (5µg/ml in PBS) 2-3시간 전처리한 후, 배양에 사용하기 전에 3-4회 PBS로 플라스크를 세척하였다. 단핵구 세포를 10% FBS과

175 U/ml IL-2를 함유한 RPMI 1640 배지에 부유시켜 세포 수를 $5 \times 10^6/6.6$ ml로 고정하였다. 5×10^6 의 세포가 들어있는 6.6 ml 용액을 항CD3 항체로 전처리한 플라스크에서 4일간 배양시킨 후, 전처리 없는 플라스크로 옮겨 IL-2 175 U/ml를 추가하여 10일간 배양하였다. 이 경우에도 각각의 배양시간에 따른 증폭정도 및 세포 생존력을 측정하였다. 측정은 매일 배양된 T 림프구 100µl를 취하여 trypan blue (Gibco, Grand Island, USA) 염색을 시행한 후, 혈구계를 이용하여 측정하였다. 항CD3 항체의 림프구 배양 효과를 알아보기 위한 비교 방법으로 항CD3 항체로 전처리한 플라스크에서 배양하지 않고 IL-2 175 U/ml만을 단독으로 첨가하여 7일간 배양한 후 두 가지를 함께 사용한 군과 IL-2 단독 사용한 군의 결과를 서로 비교하였다.

4. 세포 살해능 분석

세포 살해능 분석은 MTT (3-[4,5-dimethylthiazole-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) 대사를 이용하는 장비를 이용하였다(Biomedica, MA, USA). 표적 세포는 K562 세포주(human erythroleukemic cell line)와 SK-OV-3 세포주(ovarian cancer cell line)를 이용하였다. 배양된 세포 숫자와 생존력 상태가 좋은 배양 제7일 혹은 8일째 림프구를 표적 세포 (1×10^4 개)와 40 : 1, 10 : 1, 4 : 1 등의 다양한 비율로 혼합하여 96 미세판에 넣어 5% CO₂ 배양기에서 37°C를 유지하며 하룻밤 배양시켰다. 2.5 ml의 활성 용액에 색소 생성 물질을 용해시킨 뒤, 이 용액 20µl씩을 각각 첨가하였다. 37°C에서 각 표적 세포의 대사능에 따라 2시간 내지 5시간 정도 배양하고, 효소결합 면역흡수분석(enzyme-linked immunosorbent assay; ELISA) 측정기를 이용하여 450 nm에서 표적 세포, 림프구 및 표적 세포와 림프구 혼합된 용액의 흡수력을 각각 측정하여 다음과 같은 공식으로 세포 살해능을 측정하였다.

$$\frac{[\text{림프구의 흡수력} + \text{표적 세포 흡수력}] - [(\text{림프구} + \text{표적 세포}) \text{흡수력}]}{\text{림프구 흡수력} + \text{표적 세포 흡수력}} \times 100$$

5. 통계 분석

통계적인 분석은 평균값의 비교에는 Mann-Whitney U test, paired t-test, Wilcoxon's signed rank test를 시행하였고, p값이 0.05 미만인 경우에 통계적으로 유의한 차이가

있는 것으로 판정하였다.

결 과

1. 혈액학적 분석

제대혈에서는 성인 혈액에 비해 대구증(macrocytosis), 백혈구 증가증 및 혈색소치가 높게 관찰되었다. 백혈구는 제대혈과 성인 말초혈액에서 각각 12.04 ± 3.24 vs $6.83 \pm 1.76 \times 10^3/\text{mm}^3$ ($p < 0.001$), 혈색소치는 15.73 ± 1.30 vs 13.01 ± 0.66 g/dl ($p < 0.001$), 대적혈구는 110.33 ± 7.42 vs 91.33 ± 3.86 fl ($p < 0.005$)이었다. 적혈구, 혈소판 및 림프구 등의 수치는 두 군 사이에 통계적으로 유의한 차이를 보이지 않았다(Table 1).

2. 배양 전 제대혈과 성인 말초 혈액 T 림프구의 세포 표식자 분석

체외 배양 이전의 제대혈과 성인 말초혈액의 T 림프구의 세포 표식자의 분포의 차이를 보면 T 림프구($\text{CD}3^+$)는 성인의 말초혈액(79.37 ± 5.74)보다 제대혈에서(71.31 ± 9.69) 유의하게 낮은 빈도로 측정되었다($p < 0.05$). $\text{CD}4^+$

및 $\text{CD}8^+$ 각각에 대해서는 두 군 간의 차이를 보이지 않았으나, 면역 조절의 지표로 사용되는 $\text{CD}4^+/\text{CD}8^+$ 의 비는 제대혈에서 성인에 비해 유의하게 높았다(2.98 ± 1.01 vs 1.50 ± 0.28 , $p < 0.05$). 특징적으로 제대혈에서는 미성숙 세포의 표현형인 $\text{CD}3^+\text{CD}38^+$ (58.98 ± 6.43), 비분열 T 림프구의 표식자인 $\text{CD}3^+\text{CD}45\text{RA}^+$ (64.42 ± 6.68) 등의 발현이 성인의 말초혈액에 비해 유의하게 높았다($p < 0.001$). 반면 기억 세포인 $\text{CD}3^+\text{CD}45\text{RO}^+$ 의 경우는 제대혈에서 성인에 비해 매우 낮은 빈도로 측정되었다(3.78 ± 0.51 vs 26.54 ± 6.90 , $p < 0.001$). 자연 살해 세포에 특징적인 $\text{CD}3^+/\text{CD}16^+\text{CD}56^+$ 의 발현은 두 군 간에 유의한 차이를 보이지 않았다(Table 2).

3. 림프구 증폭능 분석

1) 항CD3 항체의 농도에 따른 증폭

10% FBS를 함유한 RPMI 1640 배지에서 여러 농도의 항CD3 항체를 각각 첨가하여 72시간동안 배양하여 48시간, 72시간에 각각의 증폭능을 분석하였다. 배양 시간에 관계없이 모두 항CD3 항체의 농도를 100 ng/ml로 첨가한 경우(48시간: 16.71 ± 6.01 , 72시간: 23.83 ± 11.0)와 항CD3 항체 100 ng/ml+*L. yadoriki* 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 을 첨가하여

Table 1. Comparison of automatized blood cell count of umbilical cord blood (UCB) with adult peripheral blood (PB)

	UCB (n=10)	Adult PB (n=10)	p value
White cells ($\times 10^3/\text{mm}^3$)	12.04 ± 3.24	6.83 ± 1.76	< 0.001
Red cells ($\times 10^6/\text{mm}^3$)	4.42 ± 0.52	4.22 ± 0.25	NS
Hemoglobin (g/dl)	15.73 ± 1.30	13.01 ± 0.66	< 0.001
Hematocrit (%)	47.59 ± 4.34	38.31 ± 2.36	< 0.001
MCV (fl)	110.33 ± 7.42	91.33 ± 3.86	< 0.005
MCH (pg)	35.73 ± 1.94	31.23 ± 1.53	< 0.005
MCHC (g/dl)	33.1 ± 1.32	34.18 ± 0.69	NS
RDW (%)	16.71 ± 0.61	12.63 ± 0.77	< 0.001
Platelet ($\times 10^3/\text{mm}^3$)	279.14 ± 166.89	291.67 ± 59.47	NS
Neutrophils (%)	60.8 ± 12.95	59.97 ± 7.45	NS
Lymphocytes (%)	29.15 ± 8.15	30.63 ± 8.21	NS
Monocytes (%)	5.36 ± 2.18	6.11 ± 1.69	NS
Eosinophils (%)	4.06 ± 1.30	2.77 ± 1.82	NS
Basophils (%)	0.38 ± 0.33	0.52 ± 0.25	NS

Values are expressed as mean \pm SD. p value by Mann-Whitney U test

Table 2. Comparison of immunophenotypic features between fresh umbilical cord blood (UCB) and adult peripheral blood (PB) T lymphocytes

Subpopulation of T lymphocytes	UCB (n=40)	Adult PB (n=10)	p value
$\text{CD}45^+\text{CD}14^+$	1.29 ± 0.86	1.28 ± 0.78	NS
$\text{CD}3^+$	71.31 ± 9.69	79.37 ± 5.74	< 0.05
$\text{CD}4^+$	52.87 ± 13.78	48.15 ± 5.89	NS
$\text{CD}8^+$	23.31 ± 7.28	30.47 ± 3.99	NS
$\text{CD}3^+\text{CD}4^+$	53.74 ± 13.29	45.35 ± 4.09	< 0.05
$\text{CD}3^+\text{CD}8^+$	17.07 ± 6.77	28.36 ± 5.74	< 0.005
$\text{CD}4^+\text{CD}8^+$ ratio	2.98 ± 1.01	1.50 ± 0.28	< 0.05
$\text{CD}3^+\text{CD}16^+\text{CD}56^+$	12.11 ± 6.96	9.69 ± 3.31	NS
$\text{CD}3^+\text{CD}16^+\text{CD}56^+$	0.28 ± 0.50	1.07 ± 0.50	NS
$\text{CD}3^+\text{CD}38^+$	58.98 ± 6.43	9.07 ± 0.91	< 0.001
$\text{CD}3^+\text{CD}38^-$	7.43 ± 6.28	66.3 ± 3.71	< 0.001
$\text{CD}3^+\text{CD}25^+$	9.12 ± 2.60	42.1 ± 5.23	< 0.001
$\text{CD}3^+\text{CD}45\text{RA}^+$	64.42 ± 6.68	37.23 ± 11.69	< 0.001
$\text{CD}3^+\text{CD}45\text{RO}^+$	3.78 ± 0.51	26.54 ± 6.90	< 0.001

Data are expressed as mean percentage values \pm SD. p value by Mann-Whitney U test

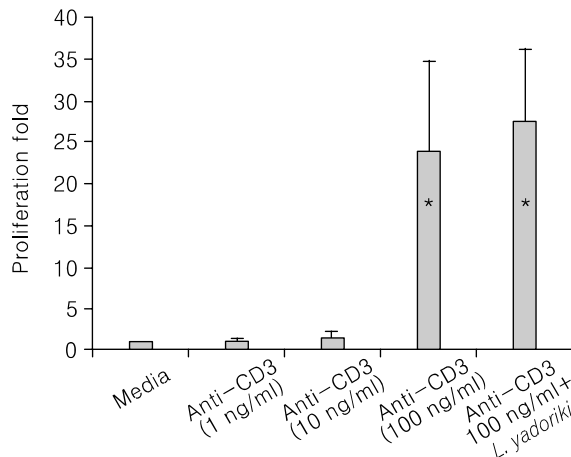


Fig. 1. Proliferation of umbilical cord blood T lymphocytes after 72 hours in culture as determined by the [3 H]-thymidine uptake assay (* $p < 0.05$).

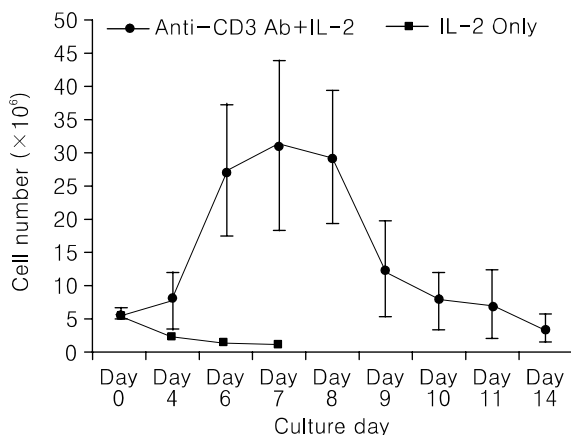


Fig. 2. Changes in the expanded T lymphocyte numbers in cultures as a function of time supplemented with either anti-CD3 antibody and IL-2 (n=20) or IL-2 alone.

배양한 경우(48시간: 20.62 ± 6.41 , 72시간: 27.40 ± 8.68)가 항CD3 항체 1 ng/ml 혹은 10 ng/ml 첨가하여 배양한 경우보다 림프구의 증폭이 유의하게 증가하였다($p < 0.05$). *L. yadoriki*를 첨가한 군과 첨가하지 않은 군에서는 통계적으로 유의한 차이는 없었다(Fig. 1).

2) 항CD3 항체와 IL-2를 이용한 체외증폭

항CD3 항체 5 μ g/ml로 전처리한 플라스크에서 10% FBS과 175 U/ml IL-2를 함께 4일간 배양한 후, 항CD3 항체의 전처리가 없는 플라스크로 옮겨 IL-2 175 U/ml를

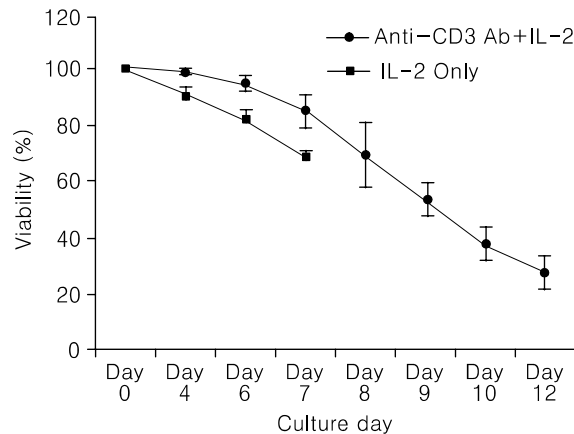


Fig. 3. Changes in the expanded T lymphocyte viability in cultures as a function of time supplemented with either anti-CD3 antibody and IL-2 (n=20) or IL-2 alone.

첨가하여 10일간 총 14일 동안 배양하였다. 또한 T 림프구의 증폭에 대한 항CD3 항체의 효과를 알아보기 위한 대조군으로 제대혈 T 림프구를 IL-2 175 U/ml만을 단독으로 사용하여 배양하고 결과를 분석하였다. 각각의 제대혈에 따라 같은 조건 하에서도 림프구의 증폭 정도에 차이를 보였다. IL-2만을 이용하여 배양한 경우에는 대부분 배양 제1일 이후 계속적으로 세포수의 감소가 관찰되어 제3일 이후에는 세포수가 50% 이상으로 감소되었고, 세포의 생존력도 90% 이하였다. 반면 항CD3 항체와 IL-2를 이용한 배양에서는 제6일에서 8일 사이에 가장 높은 증폭을 보였고, 8일 이후에 증폭 속도가 감소하였다(Fig. 2). 세포의 생존력은 제6일까지는 평균 90% 이상이었으나, 그 이후에는 90% 미만으로 감소하였다(Fig. 3).

4. 증폭 전후의 제대혈 세포 표식자 분석

항CD3 항체와 IL-2를 이용하여 배양한 후, 제8일에 시행한 세포 표식자 분석의 결과를 보면 제대혈 T 림프구에서는 배양된 세포의 95% 이상에서 CD3에 양성을 나타내었다. 세포독성 T 림프구를 나타내는 $CD3^+CD8^+$ 의 발현도 배양 전보다 유의하게 증가하였다(17.07 ± 6.77 vs 47.24 ± 13.37 , $p < 0.001$). $CD4^+/CD8^+$ 의 비는 배양 후 감소하였으나, 배양 제8일에서도 1보다는 높게 유지되었다. $CD3^+CD25^+$ 는 배양 이후 통계적으로 유의한 증가를 보였고(9.12 ± 2.60 vs 96.61 ± 12.93 , $p < 0.001$), $CD3^+CD38^+$ 도 배양 후 현저한 증가를 보였다(58.98 ± 6.43 vs 97.42 ± 1.65 , $p < 0.05$). $CD3^+CD45RA^+$ 의 발현은 배양 후

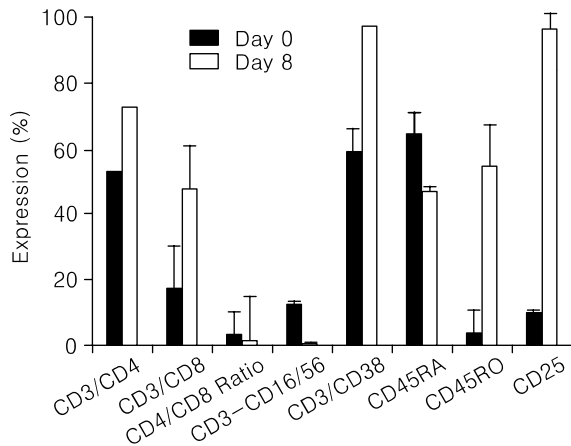


Fig. 4. Comparison of cell surface phenotypes before and after culture.

유의하게 감소한 반면(64.42 ± 6.68 vs 46.77 ± 12.84 , $p < 0.05$), $CD3^+CD45RO^+$ 의 빈도는 유의하게 증가되었다(3.78 ± 0.51 vs 54.59 ± 4.79 , $p < 0.001$). 자연 살해 세포인 $CD3^+/CD16^+CD56^+$ 의 발현은 배양 이전에는 12.11 ± 6.96 이었으나, 배양 후 0.37 ± 0.27 로 유의하게 빈도가 감소하였다($p < 0.001$)(Fig. 4).

5. 세포 살해능 분석

먼저 배양하기 이전의 세포를 이용하여 제대혈 T 림프구의 세포 살해능을 분석하였다. 그 결과 이들 세포에서는 낮은 세포 살해능이 관찰되었다. 항CD3 항체와 IL-2를 첨가하여 배양시킨 후 세포 생존력이 80% 이상인 제7일 내지 8일째 시행한 세포 살해능 검사상 SK-OV-3세포에 대해서는 effector/target (E/T) 세포의 비율을 40 : 1로 한 경우 88.8%, 10 : 1에서는 20%, 4 : 1에서는 18.7%의 세포 살해능을 보였다. 한편 K-562 세포에 대해서는 40 : 1의 비율의 경우에서는 22.7%, 10 : 1의 경우는 29.7%, 4 : 1에서는 31.7%를 나타내었다. SK-OV-3 세포의 경우에서 E/T 세포의 비율을 40 : 1로 하였을 때 배양 전에 비해 유의한 세포 살해능의 증가가 관찰되었다($p < 0.05$). 그러나 K562 세포에 대한 살해능은 배양 전후에 유의한 차이가 없었다(Fig. 5).

고 찰

제대혈에 관한 연구는 1989년 Broxmeyer 등¹⁰이 제대

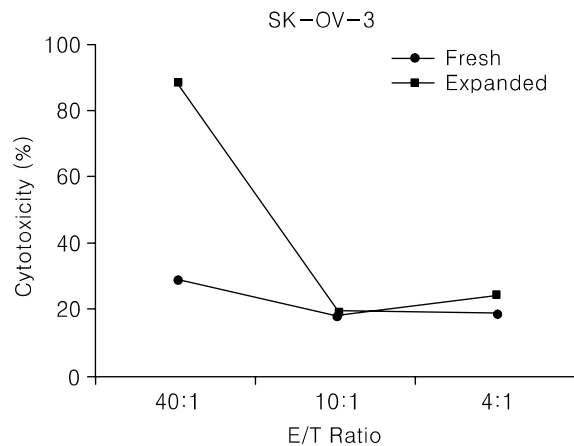


Fig. 5. Cytotoxicity assay of T-lymphocytes before and after culture.

혈의 혈액학적 조성을 처음 밝힌 이후로 계속되어 왔다. 이들은 제대혈에도 성인의 말초혈액과 유사한 클론원성 원시 세포들이 존재한다고 보고하였고, 이러한 세포들은 성인의 조혈모세포에 비해 높은 증식능 및 자기 복제능을 지닌다고 주장하였다. 반면 이 세포들은 면역학적으로 성인의 림프구에 비해 미숙하고 동종항원에 반응하여 증식할 수 있지만, 세포 독성 작용은 성인의 림프구에 비해 매우 미약하고, 백혈구 혼합 배양 시 동종 세포 독성 작용을 나타낼 수 있는 능력이 제한되어 있다.² 그러나 $CD8^+$ T 림프구가 적고 $CD4^+/CD8^+$ 의 비율이 높아 이식 시에 대숙주 반응이 적게 나타난다는 장점이 있다.^{8,10} 이러한 주장들을 배경으로 1988년 처음으로 Fanconi 빈혈 환자에서 성공적으로 제대혈 이식이 시행된 이래 제대혈은 새로운 조혈모세포의 공급원으로 평가받고 있다.

제대혈은 형태학적 및 면역학적으로 성인 혈액과 차이를 보인다. 본 연구의 혈액학적 분석 결과 이전의 보고³와 마찬가지로 제대혈에서는 적혈구 및 백혈구의 수치가 성인에서보다 높게 측정되었다. 면역학적 분석 결과 성인의 말초 혈액에 비해 미성숙 T 림프구의 빈도가 높은 반면 성숙한 T 림프구의 빈도는 낮았다. 이러한 차이들은 제대혈에는 충분한 기능을 할 수 없는 T 림프구가 많음을 의미한다. 일반적으로 제대혈 T 림프구는 항CD3 항체, IL-2의 사용만으로는 적절한 배양이 이루어지지 않으며, 여러 동종 항체 및 T 림프구의 증식에 관여하는 여러 interleukin의 첨가가 필요하다고 보고되는데

비해^{4,7} 본 연구에서는 항CD3 항체와 IL-2와 면역 연구에 기본적으로 사용되는 면역 증강 물질인 *L. yadoriki*를 이용하여 단기간의 배양을 통해 제대혈 T 림프구의 증폭을 시도한 결과, 항CD3 항체와 IL-2의 사용은 적절한 T 림프구의 증폭을 유도하였고 증폭 전후로 T 림프구의 면역학적 특성에 차이가 있음을 입증하였다.

CD4⁺와 CD8⁺은 T 림프구를 두 가지의 집단으로 구분하는 데 이용된다. T 림프구의 2/3는 CD4⁺, CD8⁺이며, 약 1/3은 CD4⁺, CD8⁺ T 림프구이다. CD4⁺는 조력 T 림프구의 세포 표지물질로 약 55 kilo-Dalton (kD) 정도의 세포막에 있는 당단백이다. 이들의 항원 인식은 class II major histocompatibility complex (MHC)에 의해 제한된다. CD8⁺는 세포독성 T 림프구의 기능을 나타내며 이들의 항원 인식은 class I MHC에 의해 제한된다.⁵ 증폭 이전의 제대혈 T 림프구의 경우에는 CD4⁺와 CD8⁺의 발현 빈도가 성인에서와 별다른 차이를 보이지는 않았으나, CD4⁺/CD8⁺의 비는 유의하게 차이를 나타내었다. 또한 CD4⁺/CD8⁺의 비는 배양 기간동안 점차적으로 감소하였으나 1 미만으로 감소하지는 않았다. 이러한 결과는 Skea 등⁴이 제대혈에서는 CD4⁺의 세포가 배양 초기에 CD8⁺ T 림프구보다 증폭이 잘 된다고 보고한 것처럼 CD4⁺ T 림프구가 더 왕성한 증폭을 하기 때문인 것으로 설명할 수 있다. 미성숙 T 림프구를 의미하는 CD3⁺CD38⁺는 제대혈에서 성인에 비해 유의하게 높게 측정되었다. 배양 후에는 배양 이전에 비해 거의 2배 가까이 증가된 수치를 보였다. 이러한 발현의 증가는 이들 CD3⁺CD38⁺의 발현은 미성숙 림프구에서 뿐만 아니라 초기 분열 및 활성화 세포에서 흔히 발견되는 당단백으로,³ 본 연구에서처럼 항CD3 항체 등의 자극에 의해 미성숙 T 림프구가 분화함에 따라 발현 빈도가 증가된 것으로 설명할 수 있다. IL-2 수용체인 CD3⁺CD25⁺의 발현은 배양 이전에는 9% 정도로 낮게 측정되었으나 배양 이후 97% 정도로 증가되었다. CD25⁺는 활성 림프구에 대한 표식자로 자가 면역질환 등과 관련이 있고, 이러한 질환에서 CD25⁺ 발현이 감소되어 있다고 알려져 왔다.⁷ 백혈구 공통 항원인 CD45⁺는 조혈계의 모든 핵화된 세포에서 표현되는 세포 표면 단백질로, 인공적 항원변환에서 중요한 역할을 하며 다른 세포 표면 분자와의 상호작용에 관여한다.^{12,13} CD45⁺는 분자량에 따라 220 kD의 CD45RA군과 분자량 180 kD의 CD45RO로 분류된다.¹⁴

CD45RA⁺는 미분화 세포(naive cells)를 나타내는 반면 CD45RO⁺는 T 림프구 내의 기억세포(memory cells)를 나타낸다. CD45RA⁺의 형태는 항원에 노출됨에 따라 CD45RO⁺의 형태로 대체된다. 본 연구에서도 배양 전 제대혈에는 CD3⁺CD45RA⁺의 발현이 높았던 반면 성인의 혈액에서는 CD3⁺CD45RO⁺의 빈도가 높게 관찰되었다. 또한 항CD3 항체와 IL-2를 이용하여 제대혈을 배양한 후에는 CD3⁺CD45RO⁺의 빈도가 배양 이전에 비해 유의하게 증가되었다. 이러한 결과들을 토대로 제대혈의 T 림프구가 면역학적으로 성인 말초 혈액에 비해 미성숙 상태에 있음을 증명하였다. CD3⁺CD16⁺CD56⁺인 진성 자연살해 세포(NK cell)는 몇몇 종양세포 및 바이러스 감염 세포를 파괴하고, 골수 이식 후 발생하는 급성 거부반응을 매개한다.¹⁵ 이전의 보고들에서 제대혈에서 자연살해세포의 빈도는 성인의 혈액에 비해 통계적으로 유의하게 높다고 하였으며 IL-2, IL-12 및 IL-7 등을 사용한 배양 이후 점차적으로 그 빈도가 높아짐을 관찰하여 이들 세포의 항 종양성에 대해 기술하였다.^{3,6,8} 본 연구에서는 배양전 제대혈에서 빈도가 높게 측정되었으나, 성인 혈액에서와 통계적으로 유의한 차이를 보이지 않았다. 또한 배양 방법에 따른 차이일 수 있겠으나 배양 후에는 자연살해 세포의 감소가 관찰되었다. CD3⁺CD16⁺CD56⁺는 세포독성을 갖는 T 림프구의 일종으로 생체 내에서 활성화된 세포독성 T 림프구로 생각된다. Natural T 림프구로 일컬어지는 이들 세포는 성인의 말초 혈액에서보다는 적게 존재하였다. 배양 후의 발현은 빈도상으로는 차이를 보이지 않았으나, 세포의 수는 림프구의 증폭 정도를 고려했을 때 배양 전보다 증가됨을 알 수 있었다. 이들 세포는 항 종양 효과를 가지며 이식편대 숙주반응의 유발 없이 세포 살해 효과를 나타내는 것으로 알려져 있다.⁶

제대혈은 한번에 채혈할 수 있는 양이 제한되어 있어 그 동안 주로 소아나 저체중의 성인 환자에게 이식이 시행되었다. 따라서 이러한 제한점을 극복하기 위해 제대혈 조혈모세포를 체외에서 배양, 증폭한 후 이식에 이용하는 연구들이 이어져 왔다. 조혈모세포를 체외에서 배양, 증폭한 후 다시 환자에게 사용하려는 시도는 1983년 Dexter 등¹⁶에 의해 최초로 시도되었고, IL-3, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF), erythropoietin 등의 성장 인자들이 조혈모세포 증폭에 이용되

었다. 선택적인 T 림프구의 증폭은 면역치료 등에 필요한 부분만을 다량으로 획득하는데 유용하게 이용될 수 있다. 예를 들어 CD8⁺ 세포독성 T 림프구는 종양 환자에서 잔존하는 종양세포의 파괴나 후천성 면역 결핍증 또는 여러 감염성 질환의 환자에서 감염 세포의 제거에 유용하다. 또한 Epstein-Barr 바이러스 항원에 대한 CD8⁺ 세포독성 T 림프구는 이들 바이러스에 의한 질환에 효과적인 치료 방법이 될 수 있다.¹⁷ CD4⁺ 세포의 경우에는 생체 내에서 세포독성 림프구의 조력자로 작용할 수도 있고, 그 자체적으로 항 종양성 및 항 바이러스성 특성을 나타내거나 자가 면역질환의 치료에 효과적으로 이용될 수 있다.¹ 이러한 치료에 충분한 용량을 획득하기 위해 다양한 방법으로 제대혈 T 림프구의 배양이 시도되었다. 1990년대 초 Bertotto 등¹⁸은 제대혈과 성인의 말초 혈액 내에 순회하는 CD3⁺ 세포의 존재 빈도는 유사하지만 항CD3 항체에 의한 제대혈 T 림프구의 증폭이 부진한 것은 이러한 자극에 대한 T 림프구 표면의 IL-2 유전자 표현의 저하와 이로 인한 IL-2 생성 부족에 기인한다고 하였다. 따라서 IL-2의 공급은 항CD3 항체에 의한 림프구 증폭을 촉진시킬 수 있다고 하였다. 그러나 일반적으로 항CD3 항체와 IL-2를 이용한 기본적인 배양 방법으로는 제대혈에서 충분한 수의 T 림프구를 획득하기는 어렵기 때문에^{6,19} 일부 연구들은 특정 처리한 배지를 사용하거나, 여러 가지 동종 항원이나 단일 클론 항체 등을 복합적으로 사용하여 제대혈 림프구를 수천배까지도 증폭시킬 수 있다고 하였다.^{1,7} 그러나 concanavalin A, mezerein 등의 식물 추출물이 포함된 특정 배지의 경우 이들 물질을 고용량으로 사용하여야 하기 때문에 세포독성 T 림프구의 반응을 저하시킬 수 있고, 배양한 세포들은 임상적으로 사용하기에는 안전성 등의 문제가 있어 용이하지 않다. 또한 항CD-3 항체, IL-2, IL-12 및 IL-7 등을 함께 이용하여 배양한 후 제대혈 T 림프구의 증폭 및 증가된 세포 독성을 보고하기도 하였지만 경제적인 측면에 많은 문제점이 있었다.⁷ 따라서 본 연구에서는 제대혈 림프구, 특히 T 림프구의 증폭을 분석하기 위해 림프구 배양에 기본적으로 사용되는 항CD3 항체, IL-2 및 면역 증강 물질인 *L. yadoriki* 등을 사용하여 제대혈 T 림프구를 증폭시키고자 하였다. IL-2 단독으로 사용한 경우에는 배양 제1일 이후 세포의 수가 지속적으로 감소하고 생존력도 감소하여, IL-2는 단독으로 사용하기

보다는 항CD3 항체와 함께 사용하여야 림프구를 증폭시키는 효과를 나타낸다는 것을 확인하였다. 본 연구에서 사용한 *L. yadoriki*는 mistletoe라고도 하며, 이 식물의 추출물은 진토제나 신경안정제, 이뇨제 등으로 사용되고 재생능력이 탁월한 식물로 현재 유럽에서는 혈액순환 개선의 목적으로도 사용된다. 최근의 보고에서는 이러한 mistletoe lectin을 항원과 함께 투여하는 경우 과립구와 백혈구의 수적 증가 및 활동성을 증가시키고, 제2형 조력 T 림프구의 면역반응을 유도한다고 하였다.²⁰ 또한 종양 치료 연구에서도 면역 조절 효과를 보이며, 간이나 폐로의 전이 빈도를 낮추는데 기여한다고 하였다.²¹ 따라서 본 연구에서는 T 림프구의 증폭을 더욱 촉진시킬 목적으로 이와 같은 물질을 사용하였는데 결과적으로 항CD3 항체만을 사용한 경우에 비해 증폭능의 유의한 증가는 없었다.

세포 살해능 분석에는 인간 난소 선암에서 유래한 SK-OV-3 세포주와 인간 골수성 백혈병에서 유래한 K562 세포주를 사용하였다. 본 연구에서 사용한 방법으로 배양한 T 림프구는 SK-OV-3 세포에 대해 E/T 세포의 비율을 40 : 1로 하였을 때 유의한 세포 살해능의 증가가 관찰되었다. 세포 살해능에 관한 연구의 결과는 보고자들마다 다양하다. Harris 등⁸은 유사분열 물질을 사용하여 배양한 경우 세포 살해능의 증가가 관찰되지 않았다고 보고하였고, Joshi 등²²은 IL-2만을 사용하여 72시간 배양한 결과 세포 살해능의 증가가 관찰되어 종양세포에 대한 면역 치료에 이용할 수 있을 것으로 보고하였다. 본 연구에서는 배양 후 세포 표식자 분석의 결과 자연살해 세포 CD3⁺CD16⁺CD56⁺의 발현이 감소되어 있어 자연살해 세포 분석에 특징적으로 사용되는 K562 세포에 대한 살해능이 증가하지는 않을 것으로 예측하였으나 활성화된 세포 독성 T 림프구로 알려진 CD3⁺CD16⁺CD56⁺는 증가되어 있어 이들 세포를 통한 세포 살해를 예상할 수 있었다. 연구자마다 림프구 배양 방법에 차이가 있고, 세포 살해능 분석 방법도 본 연구에서와 같은 MTT 분석을 이용하기도 하였고, 일부에서는 ⁵¹Cr 분석, euporium 분석 등 다양하므로 본 연구의 결과를 다른 연구의 기준에 맞추어 해석하는 데는 무리가 있다. 본 연구에서는 증폭된 림프구에서는 증폭 전과 비교하였을 때 일정치는 않으나 세포 살해능이 증가하는 추세를 보였고, 특히 SK-OV-3 세포에 대해서는 E/T의 비율을 40 : 1로 하였을 때

통계적으로 유의한 세포 살해를 관찰하여 향후 여러 종양 세포에 대한 항 종양 효과를 기대해 볼만하다.

결론적으로 본 연구에서 사용된 항CD3 항체, IL-2는 제대혈 T 림프구의 적절한 증폭 및 성숙을 유발하였고, SK-OV-3 세포에 대한 살해능의 증가를 확인하였다. 따라서 이러한 배양 방법으로 제대혈 T 림프구를 선택적으로 배양, 증폭시켜 면역학적인 치료에 이용하는 것도 가능할 것으로 생각된다. 그러나 본 연구 방법에서 T 림프구의 증폭률의 변화가 많고, 임상에 적용하기에는 충분한 수의 림프구로 증폭시키기에는 다소 부족한 점이 있어 지속적으로 최적의 배양 방법을 결정하기 위한 연구가 이루어져야 할 것이며 또한 배양된 세포의 안전성 및 효과에 대해서도 연구가 필요한 것으로 생각된다.

참고문헌

1. Davies SM, Wagner JE. Overview: Umbilical cord blood stem cells and transplantation. Third international cord blood stem cells. Expansion & Transplants 1996.p.4-5.
2. D'Arena G, Musto P, Cascavilla N, Di Giorgio G, Fusilli S, Zendolo F, et al. Flow cytometric characterization of human umbilical cord blood lymphocytes: Immunophenotypic features. Hematology 1998; 83: 197-203.
3. Gluckman E, Broxmeyer HE, Auerbach AD, Friedman HS, Douglas GW, Devergie A, et al. Hematopoietic reconstitution in a patient with Fanconi's anemia by means of umbilical cord blood from an HLA-identical sibling. N Engl J Med 1989; 321: 1174-8.
4. Skea D, Chang NH, Hedge R, Dabek B, Wong T, Wettlaufer B, et al. Large ex vivo expansion of human umbilical cord blood CD4⁺ and CD8⁺ T cell. J Hematol 1999; 8: 129-39.
5. Broxmeyer HE. Cellular characteristics of cord blood and cord blood transplantation. AABB Press;1998.
6. Azuma H, Yamada Y, Shibuya-Fujiwara S, Yamaguchi M, Murahashi H, Fujihara M, et al. Functional evaluation of ex vivo expanded cord blood lymphocytes: Possible use for adoptive cellular immunotherapy. Exp Hematol 2002; 30: 346-51.
7. Robinson KL, Ayello J, Hughes R, Ven C, Issitt L, Kurtaberg J, et al. Ex vivo expansion, maturation, and activation of umbilical cord blood-derived T lymphocytes with IL-2, IL-12, anti-CD3, IL-7: Potential for adoptive cellular immunotherapy post-umbilical cord blood transplantation. Exp Hematol 2002; 30: 245-51.
8. Harris DT, Schumacher MJ, Locascio J, Besencon FJ, Olson GB, DeLuca D, et al. Phenotypic and functional immaturity of human umbilical cord blood T lymphocytes. Immunology 1992; 89: 1006-10.
9. Kang WH, Hwang TJ, Kook H, Kim BJ. Immunophenotypic analysis of umbilical cord blood stem cells. Korean J Pediatrics 1997; 40: 1572-81.
10. Broxmeyer HE, Douglas GW, Hangoc G, Cooper S, Bard J, Arny M, et al. Human umbilical cord blood as a potential source of transplantable hematopoietic stem/progenitor cells. Proc Natl Acad Sci USA 1989; 86: 3828-33.
11. Yeoman H, Mellor A. Phenotypic and functional immaturity of human cord blood. Cell Immunol 1984; 89: 194-201.
12. Akar AN, Salmon M, Janossy G. The synergy between naive and memory T cells during activation. Immunol Today 1991; 12: 184-8.
13. Thomas ML. The leukocyte common antigen family. Annu Rev Immunol 1989; 7: 339-68.
14. Ralph SJ, Thomas ML, Morton CC, Troebridge IS. Structural variants of human T200 glycoprotein. EMBO J 1987; 6: 1251-7.
15. Ferrara JL, Guillen FS, van Dijken DJ, Marion A, Murphy GF, Burakoff SJ. Evidence that large granular lymphocytes of donor origin mediate acute graft-versus-host disease. Transplantation 1989; 47: 50-4.
16. Emerson SG. Ex vivo expansion of hematopoietic precursors, progenitors, and stem cells: The next generation of cellular therapeutics. Blood 1996; 87: 3082-8.
17. Henslop HE, Cynig C. Long term restoration of immunity against Epstein-Barr virus infection by adoptive transfer of gene-modified specific T lymphocytes. Nature Med 1996; 2: 551-5.
18. Bertotto A, Gerli R, Lanfrancione L, Crupi S, Arcangeli C, Cerneti C, et al. Activation of cord T lymphocytes. Cell Immunol 1990; 127: 247-59.
19. Papadogiannakis N, Johnsen SA, Olding LB. Monocyte-regulated hyporesponsiveness of human cord blood lymphocytes to OKT3-monoclonal antibody-induced mitogenesis. Scand J Immunol 1986; 23: 91-7.
20. Lavelle EC, Grant G, Pusztal A, Leavy E, McNeela KHG, Pfuller O. Mistletoe lectin enhances immune response to intranasally co-administrated herpes simplex virus glycoprotein D2. Immunology 2002; 107: 268-73.
21. Braun JM, Ko HL, Schierhola JM. Application of standardized mistletoe extract augments immune response and down regulates metastatic organ colonization in murine model. Cancer Lett 2001; 170: 25-31.
22. Joshi SS, Tarantolo SR, Kuszynski CA, Kessinger A. Anti-tumor therapeutic potential of activated human umbilical cord blood cells against leukemia and breast cancer. Clin Cancer Res 2000; 6: 4351-8.

Immunological evaluation of *ex vivo* expanded umbilical cord blood T lymphocytes

Ji Youn Chung¹, Young Man Kim², Joo Hyun Nam²

Department of Obstetrics and Gynecology¹, College of Medicine, Hallym University,

Department of Obstetrics and Gynecology², University of Ulsan College of Medicine, Seoul, Korea

Objective : The objectives of this study were, first to characterize the immunological differences of the T lymphocytes of umbilical cord blood (UCB) compared to those of adult; second to expand the T lymphocytes in *ex vivo* condition of a short term culture, and to assess the immunological function of the expanded T lymphocytes.

Methods : The immunophenotypic study of 40 UCB and 10 adult peripheral blood (PB) was performed. The fresh UCB mononuclear cells (MNCs) were isolated. The nonadherent MNC fractions were then cultured with the anti-CD3 antibody with or without *Loranthus yadoriki* (10 μ g/ml). The MNCs were cultured in the anti-CD3 antibody-coated flasks for 4 days, and then transferred to the non-coated flasks, which were added IL-2 175 U/ml and cultured for another 10 days. Proliferative ability of UCB T lymphocytes, cell surface markers, and cytotoxicity assays of the expanded T lymphocytes were performed.

Results : Cell surface markers of the UCB T lymphocytes were different from those of adult T cells. The UCB T lymphocytes cultured with the anti-CD3 antibody 100 ng/ml showed a significant increase in the proliferative ability ($p < 0.05$). After culture in the anti-CD3 antibody coated flask with IL-2, expression of the activated T lymphocytes were increased significantly. The cultured cells exhibited substantial killing activity on the SK-OV-3 target cells compared to the fresh UCB lymphocytes.

Conclusion : The *ex vivo* combination of the anti-CD3 antibody and IL-2 significantly enhanced proliferation, activation, and maturation of the UCB T lymphocytes. Moreover cytotoxic potential of expanded UCB T cells was observed.

Key Words : Umbilical cord blood, T lymphocyte, *Ex vivo* expansion, Immunological characteristics, Cytotoxicity
