

## 백혈구성분채집술이 공여자 말초혈액단핵세포 유전자프로파일에 미치는 영향

신정원<sup>1</sup> · Ping Jin<sup>2</sup> · David Stroncek<sup>2</sup>

순천향대학교 의과대학 임상병리학교실<sup>1</sup>, Department of Transfusion Medicine<sup>2</sup>, NIH Clinical Center, National Institutes of Health

### Effect of Leukapheresis on Gene Expression Profiles of Donor's Peripheral Blood Mononuclear Cells

Jeung Won Shin, M.D.<sup>1</sup>, Ping Jin, Ph.D.<sup>2</sup>, and David Stroncek, M.D.<sup>2</sup>

Department of Laboratory Medicine<sup>1</sup>, Soonchunhyang University Hospital, Seoul, Korea; Department of Transfusion Medicine<sup>2</sup>, NIH Clinical Center, National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA

**Background** : Leukapheresis has commonly been used to obtain the cell products intended for clinical cell therapy. Hypocalcemia related to citrate toxicity and some circulatory effects such as hypovolemia and hypotension are well-known complications of leukapheresis. In this study, we analyzed the gene expression profiles of peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) obtained before and after leukapheresis to determine if the hemodynamic changes can affect the gene expression profiles of leukocytes.

**Methods** : PBMCs were isolated from EDTA blood from 5 healthy donors collected before and immediately after apheresis. RNA was isolated, amplified, and analyzed using a cDNA microarray with 17,500 genes. Hierarchical clustering analysis was performed to evaluate the differences of gene expression profiling.

**Results** : Hierarchical clustering separated PBMCs from different donors with each other, but did not separate PBMCs collected before and after leukapheresis. Comparison of gene expression by PBMCs collected before and after leukapheresis found only 25 genes were differentially expressed (15 were up-regulated and 10 were down-regulated after leukapheresis) (F-test,  $P < 0.005$ ). Stress induced apoptosis-related genes, *ANXA3*, *DEDD*, and *ATXN2L*, and cytokine-related genes, *IL13RA1* and *IK*, which were also related to stress, were up-regulated after leukapheresis. Genes involved in DNA and protein binding, such as *CLSTN3*, *LRBA*, *SATB2*, and *HSPA8*, were down-regulated.

**Conclusions** : Leukapheresis had little effect on gene expression of PBMCs. Some genes showing differences between before and after leukapheresis were mainly involved in stress-related reactions. (*Korean J Lab Med* 2008;28:130-5)

**Key Words** : Leukapheresis, Gene expression profile, cDNA microarray, PBMC

## 서론

접 수 : 2007년 12월 21일      접수번호 : KJLM2097  
수정본접수 : 2008년 2월 1일  
게재승인일 : 2008년 2월 21일  
교신저자 : 신정원  
우 140-743 서울시 용산구 대사관길 22  
순천향대학교병원 진단검사의학과  
전화 : 02-709-9423, Fax : 02-790-5820  
E-mail : jwshin@hosp.sch.ac.kr

최근 조혈모세포 이식 및 고형암 치료에 이용되고 있는 입양 면역요법(adoptive immune therapy)은 말초혈액단핵세포(peripheral blood mononuclear cell, PBMC)나 자연살상세포(natural killer cell, NK cell) 또는 수지상세포(dendritic cell, DC) 등을 이용하여 환자의 면역체계 회복을 촉진시킴으로

써 백혈병이나 고형암의 치료와 재발 방지에 도움을 주는 치료법이다. 이 중 NK 세포나 DC의 경우 말초혈액 내에서는 매우 소량만이 존재하기 때문에 치료를 위해 대량으로 이들 세포를 얻기 위해서는 주로 백혈구성분채집술로 PBMC를 얻은 후 이를 배양하는 방법이 이용되고 있다[1-5]. 백혈구성분채집술은 또한 G-CSF에 의한 조혈모세포 가동화와 병행하여 말초조혈모세포이식술(peripheral blood stem cell transplantation, PBSCT)에도 널리 이용되어 왔다[6-8]. 백혈구성분채집술 과정에서 나타날 수 있는 부작용으로는 구연산 사용에 따른 저칼슘혈증이나 체외혈액량 증가에 따른 문제 등이 알려져 있다[5, 8]. 그러나 이러한 성분채집 과정에서 발생하는 공여자의 혈액학적 변화가 유전자 발현에도 영향을 미칠 수 있는지에 관해서는 아직 보고된 바가 없다.

본 연구에서는 백혈구성분채집술 시행 전, 후의 공여자 혈액으로부터 분리한 PBMC의 유전자프로파일을 cDNA microarray로 분석하여, 성분채집술이 공여자의 유전자 발현 양상에 미치는 영향을 알아보았다.

## 대상 및 방법

### 1. 검체 채취 및 준비

건강한 성인 5명으로부터 백혈구성분채집술 전, 후에 EDTA 검체 1개씩을 채취한 후, Ficoll-Hypaque (Pharmacia Biotechnology, Uppsala, Sweden)을 이용하여 PBMC를 분리하였다. 대상이 된 성인들은 모두 실험에 참가하기 전 NIH Institutional Review Board (IRB)에서 승인한 프로토콜에 동의하였다. 백혈구성분채집술은 5명 중 4명은 Cobe Spectra leukapheresis system (Gambro BCT, Lakewood, CO, USA)으로, 1명은 CS3000 Plus blood cell separator (Baxter Healthcare Corp., Fenwal Division, Deerfield, IL, USA)로 시행하였다.

### 2. RNA 분리, 증폭 및 labeling

RNeasy minikit (Qiagen, Valencia, CA, USA)를 이용하여 PBMC로부터 분리한 총 RNA 중 0.01-5  $\mu$ g를 취하여 oligo dT(15)-T7 primer (5' AAA CGA CGG CCA GTG AAT TGT AAT ACG ACT CAC TAT AGG CGC T(15)3')와 TS primer (5' AG CAG TGG TAA CAA CGC AGA GTA CGC GGG 3') 및 SuperScript II RT (Invitrogen Clrp., Carlsbad, CA, USA)를 이용하여 Wang 등[9]의 방법으로 mRNA를 합성하였다. 대

조군으로는 NIH IRB 프로토콜에 동의한 정상헌혈자 6명의 PBMC를 혼합한 검체로부터 분리, 증폭한 mRNA를 사용하였다. 대상 검체로부터 증폭된 mRNA는 Cyanine 5-dUTP (NEN Co., Boston, MA, USA)로, 대조군의 mRNA는 Cyanine 3-dUTP (NEN Co.)로 표지한 후, NIH Clinical Center 내 Immunogenetic Laboratory에서 자체 제작한 17.5K cDNA (UniGene cluster) microarray에 교잡시켰다[10]. Microarray 프린팅에 사용된 클론은 Research Genetics RG\_HsKG\_031901 8k clone set와 RG\_Hs\_seq\_ver\_070700 40k clone set 중 9000 클론이었으며, 이에 포함된 유전자 목록은 <http://nciaray.nci.nih.gov/>에서 열람 가능하다.

### 3. 자료 처리 및 통계 분석

교잡반응이 끝난 microarray를 스캔한 후 GenePix Pro 4.0 (Axon Instruments, Union City, CA, USA)을 이용하여 background signal을 제거하였고 형광강도가 300 미만인 경우와 스팟의 크기가 25  $\mu$ m 미만인 경우 분석에서 제외시켰다. 얻어진 데이터는 Lowess Smoother로 normalization을 시행한 후 BRB ArrayTool (<http://linus.nci.nih.gov/BRB-ArrayTools.html>)을 이용하여 분석하였고, 연구 대상 검체의 80% 이상에서 발현된 8,661개의 유전자만을 선택하여 hierarchical cluster analysis를 시행하였다[10, 11]. 해당 유전자에 관한 자세한 정보는 GeneCards website를 (<http://www.genecards.org/index.shtml>) 참고하였다.

성분채집술 전, 후 검체 간 세포 수 및 유전자 발현 차이의 통계학적 의미를 분석하기 위해서는 paired t-test 및 F-test를 이용하였으며, P값이 0.05 이하인 경우 유의한 차이가 있는 것으로 판단하였다.

## 결 과

### 1. 대상군의 특징

대상군의 연령은 29-68세였고 5명 중 1명만이 여자였으며, 인종 분포는 백인 2명, 흑인 2명, 그리고 히스패닉이 1명이었다. 백혈구성분채집술을 통해 얻어진 산물의 양은  $137 \pm 8$  (mean  $\pm$  SD) mL이었다(Table 1). 성분채집술 전, 후에 각각 얻은 검체들의 헤모글로빈 수치와 백혈구 수는 서로 유의한 차이가 없었으나 ( $P > 0.05$ , paired t-test), 혈소판 수의 경우 성분채집술 후의 수치가 성분채집 전보다 통계적으로 유의하게 낮았다( $P = 0.002$ ).

Table 1. Characteristics of donors and samples

Donor No	Age	Sex	Race	Cell separator	Product volume	Cell counts of products					
						Hb (g/dL)		WBC ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ )		PLT ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ )	
						pre*	post <sup>†</sup>	pre	post	pre	post
1	48	F	African-American	Cobe Spectra	136 mL	11.9	11.0	4.8	4.5	275	174
2	68	M	Caucasian	Cobe Spectra	128 mL	13.6	13.6	5.4	5.7	196	135
3	32	M	African-American	CS3000	136 mL	14.5	14.1	3.8	3.4	244	176
4	29	M	Hispanic	Cobe Spectra	137 mL	14.3	14.6	6.1	5.7	281	218
5	56	M	Caucasian	Cobe Spectra	150 mL	15.0	15.0	4.5	4.4	239	156

\*PBMCs obtained before leukapheresis; <sup>†</sup>PBMCs obtained after leukapheresis.

Table 2. Genes differentially expressed by post-leukapheresis PBMCs compared to pre-leukapheresis PBMCs

	Genes	Descriptions	Fold changes	Functions involved
Up-regulated genes (15)	ANXA3	Annexin A3	4.4	Apoptosis
				Inhibitor of phospholipase A2
	CREB1	CAMP responsive element binding protein 1	2.9	Transcription activator
	DEDD	Death effector domain containing	2.9	Apoptosis
	ATXN2L	Ataxin 2-like	2.6	Apoptosis
	SLC6A3	Solute carrier family 6	2.5	Transcription
				Membrane transport
	MLANA	Melan-A	2.4	Metabolism
	GRLF1	Glucocorticoid receptor DNA binding factor 1	2.3	Transcription suppressor
	IL13RA1	Interleukin 13 receptor alpha 1	2.2	Cytokine
	IK	IK cytokine down-regulator of HLA II	2.2	Cytokine
	RFXANK	Regulatory factor X-associated ankyrin-containing protein	1.9	Transcription activator
	GPR56	G protein-coupled receptor	1.9	Cell-to-cell interactions
	RGS14	Regulator of G-protein signaling 14	1.8	Signal transduction inhibitor
	NR2F6	Nuclear receptor subfamily 2 group F, member 6	1.8	Transcription activator
Down-regulated genes (10)	KNS2	Kinesin 2	1.7	Nucleotide/ATP binding
	NARF	Nuclear prelamin A recognition factor	1.7	Iron/protein binding
	CLSTN3	Calsyntenin 3	-3.1	Calcium ion/protein binding
	LRBA	LPS-responsive vesicle trafficking	-2.7	Protein binding
	ANKRD50	Ankyrin repeat domain 50	-2.2	Transcription suppressor
	SATB2	SATB family member 2	-2.2	DNA binding
	MAPK2	Mitogen-activated protein kinase 2	-1.9	Apoptosis/anti-Apoptosis, Stress response
	HSPA8	Heat shock 70kDa protein 8	-1.8	Nucleotide/ATP binding
	NMB	Neuromedin B	-1.8	Hormone activity
	EPS8L1	EPS8-like 1	-1.7	Membrane remodeling of the actin cytoskeleton
	GAB2	GRB2-associated binding protein 2	-1.6	Protein binding
	PPP2R5C	Protein phosphatase 2, regulatory subunit B, gamma isoform	-1.5	Peptidase activity

## 2. 백혈구성분채집술 전, 후 PBMC 검체들의 유전자 프로파일 분석

5명의 공여자로부터 얻은 10개의 PBMC 검체를 대상으로 시행한 hierarchical clustering 결과, 동일 공여자로부터 얻어진 백혈구성분채집술 전, 후 PBMC는 서로 분리되지 않고 함께 cluster를 이루었으며, 공여자 간에는 서로 구분이 되었다(Fig. 1).

백혈구성분채집술 전과 후의 PBMC 간에 유의한 차이를 보이는 유전자는 모두 25개였는데, 이 중 성분채집술 후에 발현이 증가된 유전자는 15개였고, 나머지 10개의 유전자는 성분채집술 후 그 발현이 감소되었다(F-test,  $P < 0.05$ ) (Table 2).

발현이 증가된 유전자는 세포자멸사에 관여하는 *ANXA3*, *DEDD*, *ATXN2L*과 세포전사에 관여하는 *CREB1*, *SLC6A3*, *GRLF1*, *RFXANK*, *NR2F6*, 그리고 사이토카인 관련 유전자인

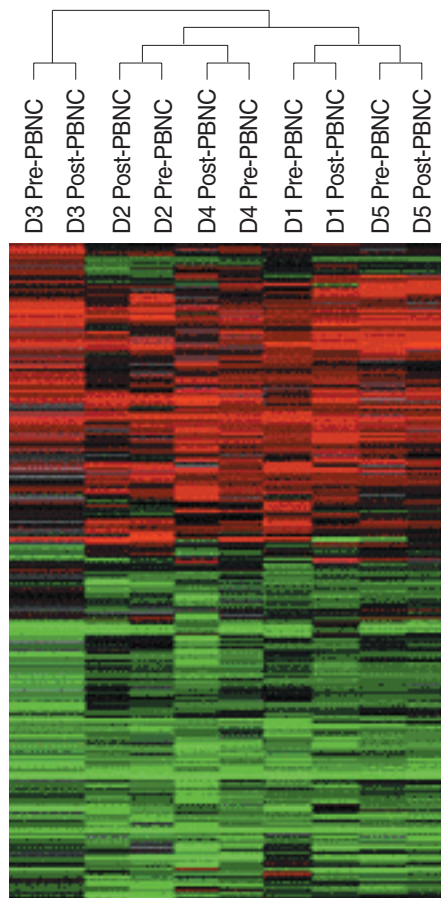


Fig. 1. Gene expression profiles of PBMCs obtained before and after leukapheresis. The 8,661 genes that remained after filtering (expressed in 80% of samples) were analyzed. Hierarchical clustering separated PBMCs from different donors with each other, but did not separate PBMCs collected before and after leukapheresis. Pre-PBMC, PBMCs obtained before leukapheresis; Post-PBMC, PBMCs obtained after leukapheresis.

*IL13RA1*, *IK* 등이었으며, *CLSTN3*, *LRBA*, *SATB2*, *HSPA8* 등 핵산 및 단백 결합에 관여하는 유전자들은 발현이 감소되었다(Table 2).

## 고 찰

Gene expression profiling은 microarray 술기를 이용하여 적은 수의 세포만으로도 수천 개의 유전자 발현 양상을 동시에 확인할 수 있는 검사 기법으로써, 이용하는 표식자에 따라 cDNA microarray, oligo microarray 등이 있으며, 임상적으로 암의 진단과 종양세포의 유전적 변이, 바이러스 백신 및 약제 독성 실험 등 다양한 분야에 응용되고 있다[12, 13]. 본 연구에서는 최근 각광받고 있는 여러 가지 세포치료를 위한 기본 산물을 얻기 위

해 흔히 이용되는 백혈구성분채집술이 공여자의 유전자 발현 양상에 미치는 영향을 확인하기 위해 cDNA microarray를 이용하여 백혈구성분채집술 전, 후 공여자로부터 얻은 PBMC의 유전자 프로파일 분석을 시행하였다.

Hierarchical clustering을 이용하여 유전자 발현 양상을 분석한 결과, 5명의 공여자에서 모두 백혈구성분채집술 전, 후 PBMC는 서로 분리되지 않고 공여자 별로 함께 cluster를 이루었으며, 서로 유의한 발현 차이를 보였던 유전자는 전체 8,661 개의 대상 유전자 중 25개에 불과하여, 백혈구성분채집술이 공여자의 유전자적인 변화 측면에서 매우 안전한 술기임을 알 수 있었다. 참고로, Baecher 등[14]은 건강한 공여자로부터 얻은 PBMC를 4°C에서 8시간 동안 아무런 조작을 가하지 않고 단순히 보관한 것만으로도 2,034개 유전자의 발현 양상에 차이가 생겼다고 보고한 바 있다.

한편, 백혈구성분채집술 시행 전, 후 유전자 발현 차이를 보였던 25개 유전자 중 성분채집술 후에 발현 정도가 증가한 유전자는 15개였는데, 이 중 *ANXA3*, *DEDD*, *ATXN2L*는 스트레스 관련 세포자멸사에 관여하며, 발현 정도가 감소한 유전자 중 *MA-PK2*와 *HSPA8*은 이러한 세포자멸사를 억제하는 반응에 관여하는 것으로 보고되어 있어[15–17], 백혈구성분채집술이 스트레스와 관련된 세포자멸반응에 일부 영향을 미친 것으로 생각되었다. 또한 스트레스 반응과 관련되어 증가하는 사이토카인 유전자인 *IL13RA1*과 *IK*의 발현도 성분채집술 후에 증가되었다.

한편, 5명의 공여자 중 4명은 Cobe Spectra leukapheresis system (Gambro BCT)으로 성분채집술을 시행하였고, 1명(donor No. 3)만이 CS3000 plus blood cell separator (Baxter Healthcare Corp.)를 이용하였는데, hierarchical clustering 결과를 전체적으로 크게 두 cluster로 나누어보면 donor 1, 2, 4, 5가 한 cluster를 이루고, donor 3만이 다른 cluster를 이루는 것으로 나타나, cell separator 종류에 따라 유전자 프로파일이 영향을 받았을 가능성을 배제할 수 없었다. Cobe Spectra와 CS3000 plus 간의 collection efficiency (CE)에 관한 비교는 여러 연구에서 시행되어 왔는데, Mehta 등[18]은 Cobe Spectra의 CD34+CE가 CS3000보다 우수하다고 한 반면, Ford 등[19]은 CS3000 plus의 CE가 더 우수하다고 하는 등 일치된 연구 결과를 보이지는 않고 있다. 따라서 이에 대해서는 앞으로 유전자 프로파일과 CE의 관련 여부에 관한 추가 연구가 필요할 것으로 생각된다.

그밖에, 본 연구에서는 대상군의 인종 분포가 다양했는데 이러한 인종 차이가 성분채집술 전, 후 유전자발현양상에 영향을 미치는지는 않았으나, 대상군의 수가 작고 황인종이 포함되어 있지 않아,



향후 국내 공여자를 포함한 연구 역시 필요할 것으로 생각된다.

결론적으로, 백혈구성분채집술은 말초혈액단핵세포의 유전자 프로파일에 큰 영향을 끼치지 않는 것으로 발현 양상에 차이가 있었던 일부 유전자들의 경우 주로 스트레스 관련 반응에 관여하는 것으로 나타났다.

## 요 약

**배경 :** 백혈구성분채집술은 최근 각광받고 있는 여러 가지 세포치료를 위한 기본 산물을 얻기 위해 흔히 이용되고 있다. 시행 과정에서 나타날 수 있는 부작용으로는 흔히 구연산 사용에 따른 저칼슘혈증이나 체외혈액량 증가에 따른 문제 등이 보고되어 있다. 본 연구에서는 백혈구성분채집술 시행 전, 후의 공여자 혈액으로부터 분리한 말초혈액단핵세포(peripheral blood mononuclear cell, PBMC)의 유전자 발현양상을 분석하여, 성분채집술이 공여자의 유전자 프로파일에 미치는 영향을 알아보았다.

**방법 :** 5명의 건강한 성인의 백혈구성분채집술 전, 후 EDTA 검체로부터 얻은 PBMC에서 RNA를 분리, 증폭한 후 cDNA microarray를 시행하였다. Hierarchical clustering analysis를 이용하여 성분채집술 전, 후 PBMC 간의 유전자 프로파일 차이를 분석하였다.

**결과 :** 동일 공여자로부터 얻어진 백혈구성분채집술 전, 후 PBMC는 서로 분리되지 않고 함께 cluster를 이루었으며, 공여자 간에는 서로 구분이 되었다. 성분채집술 전, 후 PBMC 간에 유의한 차이를 보인 유전자는 모두 25개였는데, 이 중 성분채집술 후 발현이 증가된 유전자는 15개였고, 나머지 10개는 발현이 감소되었다(F-test,  $P < 0.005$ ). 스트레스 관련 세포자멸사에 관여하는 유전자인 *ANXA3*, *DEDD*, *ATXN2L*과 사이토카인 관련 유전자인 *IL13RA1*, *IK* 등의 발현은 증가되었고, *CLSTN3*, *LRBA*, *SATB2*, *HSPA8* 등 핵산 및 단백질결합에 관여하는 유전자들은 발현이 감소되었다.

**결론 :** 백혈구성분채집술은 PBMC의 유전자 프로파일에 큰 영향을 끼치지 않는 것으로, 발현 양상에 차이가 있었던 일부 유전자들의 경우에는 주로 스트레스 관련 반응에 관여하는 것으로 나타났다.

## 참고문헌

1. Hashimoto SI, Suzuki T, Nagai S, Yamashita T, Toyoda N, Matsushima K. Identification of genes specifically expressed in human activated and mature dendritic cells through serial analysis of gene expression. *Blood* 2000;96:2206-14.
2. Dauer M, Obermaier B, Herten J, Haerle C, Pohl K, Rothenfusser S, et al. Mature dendritic cells derived from human monocytes within 48 hours: a novel strategy for dendritic cell differentiation from blood precursors. *J Immunol* 2003;170:4069-76.
3. Sallusto F and Lanzavecchia A. Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha. *J Exp Med* 1994;194:1109-18.
4. Felzmann T, Witt V, Wimmer D, Ressmann G, Wagner D, Paul P, et al. Monocyte enrichment from leukapheresis products for the generation of DCs by plastic adherence, or by positive or negative selection. *Cytotherapy* 2003;5:391-8.
5. Han KS, Park MH, et al. eds. Transfusion medicine. 2nd ed. Seoul: Korea Medical Book Publisher Co, 1999:10. (한규섭, 박명희, 등. 수혈 의학. 제2판. 서울: 고려의학, 1999:10.)
6. Brecher ME, ed. Technical manual. 15th ed. Bethesda: American Association of Blood Banks, 2005:587.
7. Ottinger HD, Beelen DW, Scheulen B, Schaefer UW, Grosse-Wilde H. Improved immune reconstitution after allotransplantation of peripheral blood stem cells instead of bone marrow. *Blood* 1996;88:2775-9.
8. Whang DH, Hur M, Park KU, Shin S, Kim YH, Shin HY, et al. Experience with 671 peripheral blood stem cell collection. *Korean J Blood Transfus* 2000;11:145-56. (황동희, 허미나, 박경운, 신수, 김양현, 신희영 등. 말초혈액조혈모세포채집술 671예 시행 경험. 대한수혈학회지 2000; 11:145-56.)
9. Wang E, Miller LD, Ohnmacht GA, Liu ET, Marincola FM. High-fidelity mRNA amplification for gene profiling. *Nat Biotechnol* 2000; 18:457-9.
10. Wang E, Miller LD, Ohnmacht GA, Mocellin S, Perez-Diez A, Petersen D, et al. Prospective molecular profiling of melanoma metastases suggests classifiers of immune responsiveness. *Cancer Res* 2002; 62:3581-6.
11. Eisen MB, Spellman PT, Brown PO, Botstein D. Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:14863-8.
12. Han J, Farnsworth RL, Tiwari JL, Tian J, Lee H, Ikonogi P, et al. Quality prediction of cell substrate using gene expression profiling. *Genomics* 2006;87:552-9.
1. Hashimoto SI, Suzuki T, Nagai S, Yamashita T, Toyoda N, Matsushima K. Identification of genes specifically expressed in human activated and mature dendritic cells through serial analysis of gene

13. Park BJ and Kim GK. Gene expression profiling of meningioma by cDNA chip. *J Korean Neurosurg Soc* 2004;35:560-8. (박봉진 및 김국기. 수막종에서 cDNA chip을 이용한 유전자 발현 연구. *J Korean Neurosurg Soc* 2004;35:560-8.)
14. Baechler EC, Batliwalla FM, Karypis G, Gaffney PM, Moser K, Ortmann WA, et al. Expression levels for many genes in human peripheral blood cells are highly sensitive to ex vivo incubation. *Genes Immun* 2004;5:347-53.
15. Ng H, Pulst SM, Huynh DP. Ataxin-2 mediated cell death is dependent on domains downstream of the polyQ repeat. *Exp Neurol* 2007; 208:207-15.
16. Wiedemeyer R, Westermann F, Wittke I, Nowock J, Schwab M. Ataxin-2 promotes apoptosis of human neuroblastoma cells. *Oncogene* 2003;22:401-11.
17. Kim YM, Kim HJ, Song EJ, Lee KJ. Glucuronic acid is a novel inducer of heat shock response. *Mol Cell Biochem* 2004;259:23-33.
18. Mehta J, Singhal S, Gordon L, Tallman M, Williams S, Luyun R, et al. Cobe Spectra is superior to Fenwal CS 3000 Plus for collection of hematopoietic stem cells. *Bone Marrow Transplant* 2002;29:563-7.
19. Ford CD, Lehman C, Strupp A, Kelley L. Comparison of CD34+ cell collection efficiency on the COBE Spectra and Fenwal CS-3000 Plus. *J Clin Apher* 2002;17:17-20.