

사람 췌도 세포 분리의 표준화 및 분리 성적에 미치는 요인에 대한 분석

울산대학교 의과대학 서울아산병원 외과, 아산생명과학연구소¹

김송철 · 한덕종 · 김익희 · 위유미¹ · 김양희¹ · 김진희¹ · 백지혜¹ · 임동균¹

Standardization of Isolation Procedure and Analysis of Variables on Successful Isolation of Islet from the Human Pancreas

Song Cheol Kim, Duck Jong Han, Ik Hee Kim, Yoo Me We¹, Yang Hee Kim¹,
Jin Hee Kim¹, Ji He Back¹, Dong Gyun Lim¹

*Department of Surgery, Asan Institute for Life Science¹,
Ulsan University College of Medicine and Asan Medical Center, Seoul, Korea*

ABSTRACT

Background: Identifying the donor and isolation-related factors during the islet isolation would be greatly helpful to improve the result of human islet isolation for successful clinical islet transplantation.

Methods: Sixty-nine pancreata from cadaveric donors were isolated with standard protocol and analyzed to identify the donor factors and isolation variables for successful isolation. Islet isolations recovered $\geq 100,000$ Islet Equivalent (IEQ, n=53) were compared to islet mass less than 100,000 IEQ (n=16).

Results: The mean islet recovery was $216.0 \times 10^3 \pm 173.7 \times 10^3$ (IEQ) before purification and $130.6 \times 10^3 \pm 140.2 \times 10^3$ (IEQ) after purification. Mean purity was $54 \pm 31\%$. Mean age of donor was 31.2 ± 13.2 year and mean cold ischemic time was 6.9 ± 6.2 hour. Quality of isolated islets was acceptable in terms of bacterial culture, viability and secretory function *in vitro* and *in vivo*. In univariate analysis on successful isolation, status of pancreas was the only significant factor and sex, duration of collagenase expansion and digestion time were marginal factors. Stepwise multivariate logistic regression analysis showed donor sex, status of pancreas and digestion time were significant factors for the successful islet isolation.

Conclusion: This study confirms some donor factors and variables in isolation process can influence the ability to obtain the successful isolation of human islet. Enough experiences and pertinent review of donor and isolation factors can make islet isolation successful, supporting the clinical islet transplantation without spending of cost (J Kor Soc Endocrinol 21:22~31, 2006).

Key Words: Islet transplantation, Islet isolation, Human pancreas

서 론

당뇨병은 그 합병증 등으로 인하여 개인 및 사회적으로 심한 육체적, 경제적 손실을 초래하는 만성 질환이다. 당뇨병에 의한 합병증의 위험도는 정상인에 비하여 실명률 20배, 만성 신부전 25배, 사지 절단 40배, 심근 경색 2.5배, 뇌졸중 2.3배에 달해 사회 경제적으로 매우 소모적이며 환자 개인에

접수일자: 2005년 7월 13일

통과일자: 2005년 10월 18일

책임저자: 김송철, 서울아산병원 외과

* 이 논문은 2002년도 한국학술진흥재단의 지원에 의하여 연구되었음 (KRF-2002-041-E00135).

게도 수명은 물론 삶의 질을 크게 저하시키는 질환이다[1]. 당뇨병의 치료로는 현재 운동요법, 식이요법, 인슐린 주사요법 등이 시행되고 있다. 인슐린 치료가 1922년부터 시작된 후 당뇨병 환자가 적절한 치료를 받는다면 당뇨병성 급성 합병증에 의한 생명의 위협은 줄었으나 당뇨병에 의한 만성합병증의 위험은 항상 존재하는 상태이다. 1993년의 Diabetes Control and Complication Trial Group에서 시행한 보고에 의하면 거의 정상에 가까운 엄격한 혈당조절만이 만성합병증을 예방할 수 있다고 하였다[2]. 그러나 이를 위해서는 하루에도 수차례의 혈당검사 및 다회 인슐린 주사, 운동요법 및 식이요법이 병행되어야 하므로 환자에게는 정상적인 생활이 매우 어려운 상태를 초래하게 된다. 이러한 면에서 최근 시행되고 있는 췌장이식[3] 및 췌도 이식은 인슐린 요법이 지닌 치료의 한계를 극복할 수 있는 새로운 치료방법으로 각광을 받고 있다. 그러나 췌장이식은 높은 수술 합병증 및 이식 후 관리의 어려움 등이 문제시되고 있다. 반면에 췌도 이식은 분리한 췌도 세포를 체외에서의 배양 및 면역조절 등의 시험관 내 조작을 시행할 수 있으며 췌도 세포를 장기간 냉동 보관 할 수 있어 장거리 이송 및 추후 사용이 가능하다. 또한 이종이식의 면역반응이 극복될 경우 돼지 등을 이용한 무한한 췌도 세포의 공급도 가능하며 비교적 간편한 기술로 합병증 없이 쉽게 이식이 가능하다는 이점을 안고 있어 당뇨병 치료의 이상적인 치료법으로 부각되고 있다. 그러나 위에서 언급한 당뇨병의 중합과 췌도 이식의 효과와 안전성에도 불구하고 현재 이 치료법이 적극적으로 현실화 되지 못하는 가장 큰 문제는 췌도 세포 분리에 따른 비면역학적 손상 및 거부반응으로 인하여 충분한 양의 췌도 세포가 생착하지 못하는데 있다[4,5]. 따라서 현재는 2명 내지 3명의 뇌사자에서 분리한 췌도 세포를 한 사람의 수여자에게 이식해야하는 비효율적인 상황이다. 이러한 문제점의 해결

책 중의 하나는 췌도 세포 분리 시 효율을 최대화하여 가능한 적은 비용으로 많은 양의 췌도 세포를 분리하는 것이다.

현재까지 췌도 세포의 분리 성적에 관여하는 인자들에 대한 보고는 부족한 실정이며, 국내에서는 사람 췌도 세포이식에 대한 연구가 초보적인 단계에 머무르고 있다. 본 연구는 69예의 뇌사자에서 실험적 사람 췌도 세포 분리에 대한 경험을 바탕으로 국제적인 분리 시설 및 분리 방법에 대한 경험과 성공적인 췌도 세포 분리에 관여하는 인자에 대한 분석을 시도하였다.

대상 및 방법

1. 분리 및 이식을 위한 표준 시설 및 분리된 췌도 세포의 품질관리 (quality control) 방법의 설정

본 연구를 위해 연구자들은 미국 FDA 및 c-GMP (current Good Manufacturing Practice)에 맞는 시설과 분리 및 이식 방법, 분리된 췌도 세포의 품질관리를 표준화하였다

2. 뇌사 기증자로부터의 췌장 구득

1996년 1월부터 2003년 6월 사이에 69예의 장기 구득에 대한 동의를 구한 뇌사자로부터 일반적인 췌장 이식시의 췌장 구득과 같이 췌장을 구득하였다. 뇌사자의 복부를 정중상으로 개복한 후 췌장과 다른 장기의 이상소견을 관찰하였다. 추후 췌도 세포의 효과적인 분리를 위해 뇌사자의 혈당을 200 mg/dL 이내에서 조절하도록 인슐린을 사용하였다. 또한 비위관을 십이지장에 삽입하여 항생제 등으로 십이지장을 세척하였다. 타장기와의 공동 적출을 위한 대동맥 및 대정맥 주위의 박리를 마친 후 헤파린 20000 U를 정맥 주입하였다. 대동맥을 통해 histidine buffered tryptophan ketoglutamate (HTK) 용액 또는 University of Wisconsin

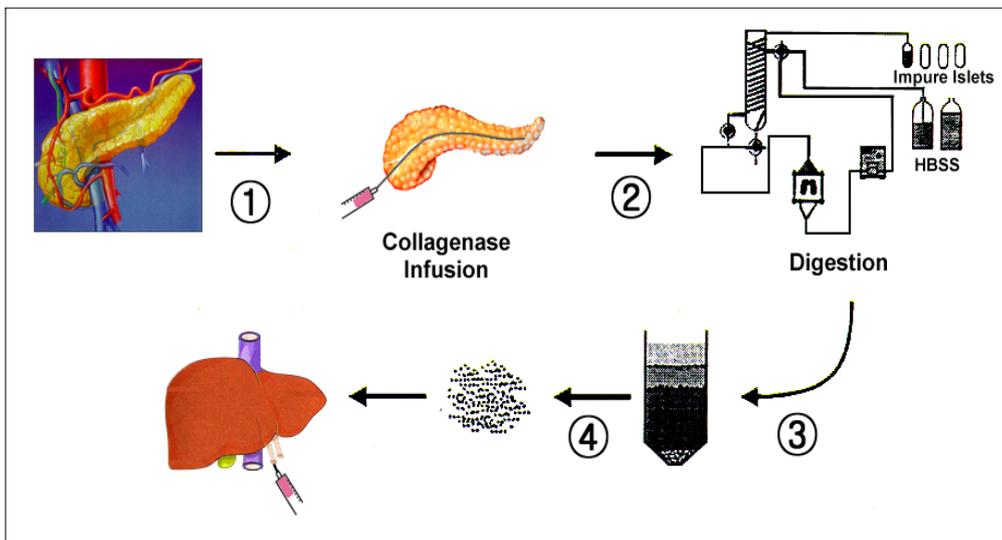


Fig. 1. Schematic diagram on islet isolation and transplantation of human pancreas islet cell.

Table 1. Quality Control Items

<u>Islet quantity</u>	<u>Islet purity</u>
Counting by size	Determined by dithizone stain
Islet equivalent count	
Islet volume	
<u>Islet sterility</u>	
Samples	
Donor pancreas/Reagents/Processing steps/Preserved islets/ media	
Testing:	
Endotoxin	
Bacteria + fungus	
Mycoplasma	
<u>Islet viability and function</u>	
Counting living and dead islets	
In vitro: Insulin stimulation index	
In vivo: Rodent transplants (Nude mouse)	

solution (UW 용액) (Dupont Pharm, Wilmington, Del, USA) 3 L를 관류하며 대장맥을 방류시켰다. 관류와 동시에 차가운 얼음을 췌장 및 구득할 장기에 덮어 장기의 손상을 최소화하였다. 비장과 함께 적출된 췌장은 미리 마련된 다른 수술실에서 장기이식 시와 마찬가지로 차가운 UW 용액 속에 췌도 세포 분리 시까지 보관하였다. 냉장 보관된 췌장은 가능한 빨리 췌도 세포 분리실로 옮겼다. 가장 이상적인 냉허혈 보존 시간은 3~6시간으로 하였으며 췌도 세포 분리실은 다른 장기 이식과 같이 철저한 무균적 조작을 원칙으로 하였다. 비장을 췌장의 손상이 가지 않게 분리한 후 적출된 췌장의 무게를 재었으며 구득된 췌장은 전체적인 지방의 침윤정도나 경도 (hardness), 또는 외적인 손상 정도에 따라 좋음, 보통, 나쁨의 3단계로 구분 하였다.

3. 췌도 세포의 분리 과정 (Fig. 1)

췌도 세포의 분리를 위해서는 변형된 Ricordi 등[6]의 방법을 사용하였다. Liberase HI (Roche Lab. USA)는 수술 당일 Hank's balanced salt solution (Gibco-BRL, Rockville, MD, USA)에 1.5 mg/mL의 농도로 녹여 pH가 7.38이 되게 하여 사용하였다. 분리실로 옮겨진 췌장은 췌관을 통해 liberase 효소를 주입하여 팽창시켰다. 팽창된 췌장을 6-8개로 절단하여 Ricordi의 분리기에 넣은 후 폐쇄순환 상태에서 부드럽게 흔들면서 분리를 시작하였다. 순환액의 온도는 온도조절장치를 이용하여 liberase 효소가 췌장 내에서 균등하게 작용하게 하기 위해 분당 1°C씩 천천히 상승시켰다. 분리 시작 후 10분 후부터 1-2분 간격으로 400 μm 크기의 쇄그물을 통해 나오는 용액을 수거하여 0.2 mM Dithizone (Diphenyl thiocarbazon, Sigma, St. Louis, MO, USA)으로 염색한 후 현미경하에서 관찰하였다. 췌도 세포가 췌장의 외분비세포로부터 분리되는 정도를 현미경 하에서 관찰하면서 소화 (digestion) 정도가 적절하다고 판단되었을 때 소화

를 중지시켰다. 소화의 중지를 위해 차가운 RPMI 용액을 펌프를 이용하여 분당 200 mL로 빠르게 주입하고 온도조절장치를 얼음에 두어 분리의 온도를 빠르게 내렸다. 분리된 소화액은 미리 얼음 속에 준비된 10% 우태아 혈청 (Fetal bovine serum, Gibco-BRL, Rockville, MD, USA) 또는 사람 알부민이 담긴 250 mL의 원추형 튜브에 모으고 모아진 튜브를 1000 rpm에서 3분간 3회 원심분리한 후 분리된 조직에 100 mL의 HBSS를 채워 췌도 세포의 획득 정도 (islet yield)를 평가하기 위해 50 μL를 채취하였다. 순수 분리를 위해서는 전반기에는 Ficoll (Sigma, St. Louis, MO, USA)을 이용한 비연속성 방법 (static gradient)을 사용하였으며, 2001년 이후에는 기계를 이용한 자동화된 연속성 방법 (continuous gradient)을 사용하였다. Ficoll을 이용한 비연속성 방법은 8개의 튜브에 나누어 1000 rpm에서 4-5분간 원심분리 후 Ficoll 비연속성 비중치를 이용하여 순수 분리를 하였다. Ficoll 540 g을 Euro-Collins용액 (Fresenius pharm, Hamburg, Germany) 1.5 L에 용해시킨 후 Ficoll 500 g당 HEPES (N-2 Hydroxy ethyl-piperazine-N'-2- ethanesulfonic acid, Fisher, Gibco-BRL) 8.937 g을 첨가한 후 pH를 7.4가 되게 하여 기본 용액을 제조하였다. 만들어진 용액에 Euro-Collins용액을 이용하여 농도가 1.108, 1.085, 1.069의 밀도로 제조하여 사용하였다. 밀도가 1.085와 1.069 사이에 모여진 세포층을 채취하여 췌도 세포임을 확인한 후 항생제가 섞인 차가운 HBSS로 채워 2분간 1000 rpm에서 2회 원심분리한 후 상층액은 버린 후 최종적으로 이식할 조직을 모았다. 이식을 위하여는 도세포의 정도관리 (quality control) 후 heparin이 들어있는 CMRL용액에 도세포를 모아 정해진 방법에 의해 이식하였다. 자동화된 연속적 순수분리를 위해서는 Cobe 2991 (Cobe, Lakewood, USA)을 이용하였다.

분리된 세포는 초기에는 배양을 실시하지 않았으나 정도관리를 본격화 한 후에는 24시간 또는 48시간 배양을 원칙으

Table 2. Donor Characteristics of 69 Human Pancreata for Islet Isolation

Age (mean ± SD)	31.2 ± 13.2 (years)
Sex (M:F)	54:15
Cause of death (trauma:non-trauma)	46:23
Cold ischemic time (mean ± SD)	6.9 ± 6.2 (hours)
Weight of pancreas (mean ± SD)	70 ± 28 g
Blood glucose (mean ± SD)	150 ± 69 (mg/dL)
Gross appearance of pancreas (good:moderate:bad)	27:23:19
Body mass index (mean ± SD)	21.3 ± 3.1 (kg/m ²)

로 하였다. 췌도 세포의 배양을 위해서는 M199배양액과 10% FBS, 2 mL glutamine, 10 mM HEPES, 100 u/mL penicillin, 100 u/mL streptomycin이 함유된 용액을 이용하였다. 분리 후 첫날밤 동안은 37°C, 5% CO₂의 조건에서 배양하고 그 후 48시간 동안은 24°C에서 배양하였다.

4. 췌도 세포의 정도관리

분리된 췌도 세포의 정도관리는 Table 1에 의거하여 분리 당일 및 48시간 배양 후 균 배양 검사 (bacteria, fungus, plasmid), 인슐린 분비능 검사, DNA당 세포내 인슐린 함유량, 자극지수 (stimulation index), viability 검사, 당노가 유발된 nude 마우스에 이식 후 혈당 측정 등을 실시하였다. 이중 균 배양 검사는 규정된 기관에 의뢰하여 검사하였으며 그 외에는 본 실험실에서 실시하였다.

a. 인슐린 분비능 측정

5 µL의 췌도 세포 표본을 30 mg/mL와 300 mg/mL의 포도당을 함유한 RPMI배양액이 담긴 petri dish에 각각 기초 인슐린 분비와 포도당 자극을 가한 후 인슐린 분비 검사를 위해 정해진 포도당 농도를 혼합하여 37°C에서 1시간 동안 물중탕 하였다. 그 후 3분 간 3000 rpm에서 원심분리 한 후 200 µL의 표본을 채취하여 효소면역방법 (Enzyme immunoassay, EIA)을 이용하여 인슐린을 측정하였다. 표본의 보관 시에는 -20°C에 보관하였다. 인슐린의 분비능 정도는 자극을 가한 후 인슐린 분비와 기초 인슐린의 양의 비를 구하여 자극 지수 (stimulation index)로 표현하였다. 각 실험은 5개의 표본으로 실시하여 평균값을 취하였다.

b. 세포내 인슐린 함유량 (Intracellular insulin content) 및 DNA의 정량검사

조직 50 µL를 채취하여 1 mL의 PBS에 세척한 후 0.5 mL의 차가운 acid ethanol (37.5 mL absolute ethanol/ 0.75 mL conc. HCl/11.75 mL H₂O)를 첨가한 후 10초간 초음파 (Labsonic, Braun, Melsungen, Germany)를 사용하여 세포를 분쇄하였다. 그 후 18시간 이상 4°C에서 둔 후 15분간

원심분리 한 후 250 µL를 채취하여 효소면역방법을 이용하여 인슐린을 측정하였다. DNA의 측정을 위해서는 원심분리 한 후 남아있는 검체를 진공을 통해 완전히 건조시킨 후 각 시험관에 500 µL의 AT 완충 용액을 첨가한 후 10초간 sonication 시킨 후 100 µL를 채취하여 99.5 µL의 TE와 0.5 µL의 picogreen을 이용하여 fluometrical DNA assay를 실시하였다. 이때 표준 용액으로 2 µg/ml의 calf thymus DNA type (Sigma, St. Louis, MO, USA)를 이용하였다. 각 실험은 5개의 표본으로 실시하여 평균값을 취하였다.

c. 췌도 이식

Nude 마우스는 이식 10일전 streptozotocin (Sigma, St. Louis, MO, USA) 240 mg/dL를 정맥 주사하여 혈중 혈당이 350 mg/dL 이상이 3일 이상 계속된 마우스에 한하여 췌도 세포를 이식하였다. 췌도 세포의 생체 내 기능정도를 알기 위해 48시간 배양한 췌도 세포를 각각 750, 1000, 2000 Islet Equivalent (IEQ)를 준비하였다. 마우스의 머리는 thiobromoethanol을 복강 내 주사하였으며 좌측 등쪽 절개를 통해 신장을 노출시켰으며 신장피막을 절개 후 절개창을 통해 신장의 앞쪽에 폴리에틸렌 관에 수집된 췌도 세포를 이식하였다. 이식 후 1주일간 매일 혈당을 검사하였으며 그 후부터는 관찰기간동안 1주에 3회씩 검사하였다. 이식 받은 마우스의 혈당이 200 mg/dL 이하로 유지되고 1개월 후 도세포를 이식한 쪽의 신장을 절제하여 혈당의 상승이 확인된 경우 당뇨병이 조절되는 것으로 정의하였다.

d. Viability test

분리된 췌도 세포를 fluorescence diacetate (FDA, Sigma, USA)와 propidium iodide (PI, Sigma, USA)를 이용한 생체염색으로 관찰하였다. FDA는 acetone에 5 mg/mL로, PI는 HBSS에 0.75 M로 농축액을 만들어 냉동보관 하였으며 배양된 췌도 세포 50개를 PBS 1 mL과 함께 24 well plate에 두고 여기에 농축된 FDA 5 µL와 PI 100 µL를 넣고 신속하게 형광 현미경 (IX70, Olympus, Japan) 아래에서 관찰하였다. FITC 필터를 사용하면 녹색과 적색 형광이 동시에

관찰되어 FDA에 염색된 살아 있는 세포는 녹색형광으로 죽은 세포의 DNA에 직접 결합하는 PI는 적색 형광이 동시에 관찰되어 나타난다. Viability의 판단은 주관적인 오차를 피하기 위해 가능한 한 연구자에 의해 판단하도록 하였으며 50개의 췌도 세포를 각각 5%의 차이로 등급을 하여 점수화한 후 이를 평균하였다.

5. 통계

췌도 세포의 분리 성적에 영향을 미치는 요인을 알아보기 위해 연구의 전체적인 흐름과 다른 보고를 참조로 성공적인 분리를 100,000 (IEQ) 이상으로 기준하여 100,000 (IEQ) 이상을 성공한 군, 100,000 (IEQ) 미만 군을 실패한 군으로 분류하여 비교하였다. 한 뇌사자 요인으로 뇌사자의 연령, 성별, 관류액의 종류, 체질량지수, 냉허혈시간 (cold ischemic time) 등을 분석하였으며, 췌도 세포 분리에 관여하는 요인으로 췌장의 육안적 상태, collagenase 또는 liberase 주입 시 팽창 정도, collagenase의 종류 (collagenase vs. liberase), 주입시간 및 작용시간 등을 조사하였다. 모든 통계는 Statistical Package for the Social Sciences (SPSS, 6.1; SPSS Inc, Chicago, IL)를 사용하였으며 연속 변수의 경우 모수적 검정은 Student t-test, 비모수적 검정은 Wilcoxon rank sum test, 비연속 변수의 경우 chi-square test를 이용하였다. 다변량 분석을 위해서는 multivariate stepwise logistic regression 방법을 사용하였다.

결 과

1. 전체적인 췌도 세포 분리 결과

연구 기간 동안 69예의 인체 췌도 세포 분리가 이루어졌

으며 이들 예에 대하여 통계적 분석이 이루어졌다. 뇌사 기증자 및 췌장의 특성은 Table 2와 같다. 뇌사자의 평균 연령은 31.2 ± 13.2 세, 남녀 비는 3.6:1이었으며 평균 냉허혈 시간은 6.9 ± 6.2 시간 이었다. 기증자의 평균 체질량지수는 $21.3 \pm 3.1 \text{ kg/m}^2$ 이었으며 collagenase 평균 주입시간은 27.2 ± 12.6 분이었다. Collagenase 순환 시간은 평균 23.7 ± 13.6 분 이었고 순수 분리 (purification) 전 평균 췌도 세포의 수는 $216.0 \times 10^3 \pm 173.7 \times 10^3$ (IEQ)이었다. 평균 순수도 (purity)는 $54 \pm 31\%$ 이었으며 순수 분리 후의 평균 도세포의 수는 $130.6 \times 10^3 \pm 140.2 \times 10^3$ (IEQ)이었다. 이는 췌장 1g당 1676 ± 1475 (IEQ)이었다. 순수 분리 후의 췌도 세포 수거율은 평균 54%였다. 실험적 분리 69예에서의 췌도 세포 분리에 대한 결과는 Fig. 2와 같다.

2. 분리된 췌도 세포에 대한 품질관리 (quality control)

1) 균 동정

최종 분리된 운반용액 및 췌도 세포에서 일정량을 채취하여 세균 및 곰팡이균, 플라스미드 균에 대한 배양 검사 결과 3예에서 운반 용액의 그람 염색에서 Gram (-) rod 균이 발견되었으나 매우 적은 양으로 실제 균 배양에서는 자라지 않았다. 그 외에 발견된 균은 없었다.

2) 인슐린 분비능 및 세포내 인슐린 함유량

포도당 30 mg/dL에서 1시간 배양 후 분비된 인슐린의 양은 포함된 췌도 세포의 DNA를 기준으로 하는 경우 평균 0.045 U/ng/hr이었으며, 300 mg/dL의 포도당으로 1시간 자극 배양 후 분비된 인슐린의 양은 평균 0.208 U/ng/hr로 자극지수 (stimulation index)는 4.67였다. 세포내의 인슐린 함유량은

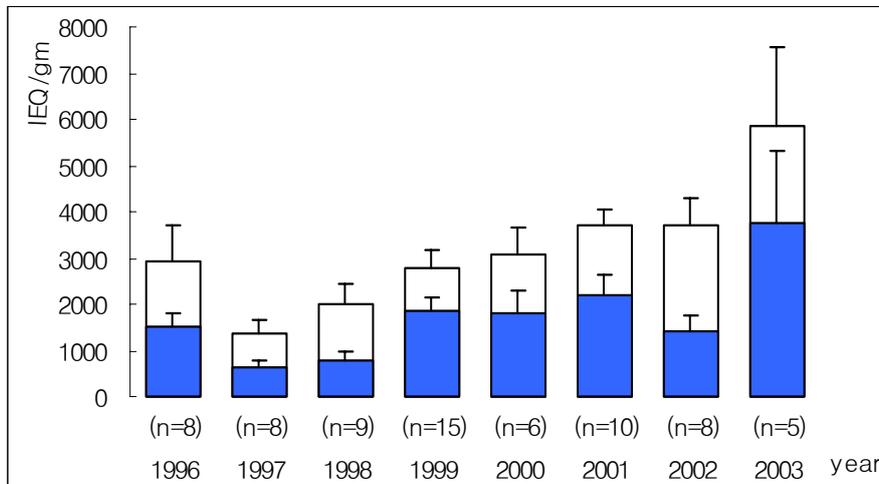


Fig. 2. Chronological change of islet yield (IEQ) from human cadaveric pancreas. It shows gradual increase of islet yield since first year of isolation. Shaded bar shows islet yield after purification.

Table 3. Insulin Release and Intracellular Insulin Content

Insulin at 30 mg glucose/DNA (mean ± SD, U/ng/hr)	0.045 ± 0.02
Insulin at 300 mg glucose/DNA (mean ± SD, U/ng/hr)	0.208 ± 0.11
Stimulation Index (mean ± SD)	4.67 ± 2.33
Insulin content /DNA (mean ± SD, U/ng) after COBE	5.64 ± 3.23
Insulin content /DNA (mean ± SD, U/ng) after 48hrs culture	6.47 ± 3.23

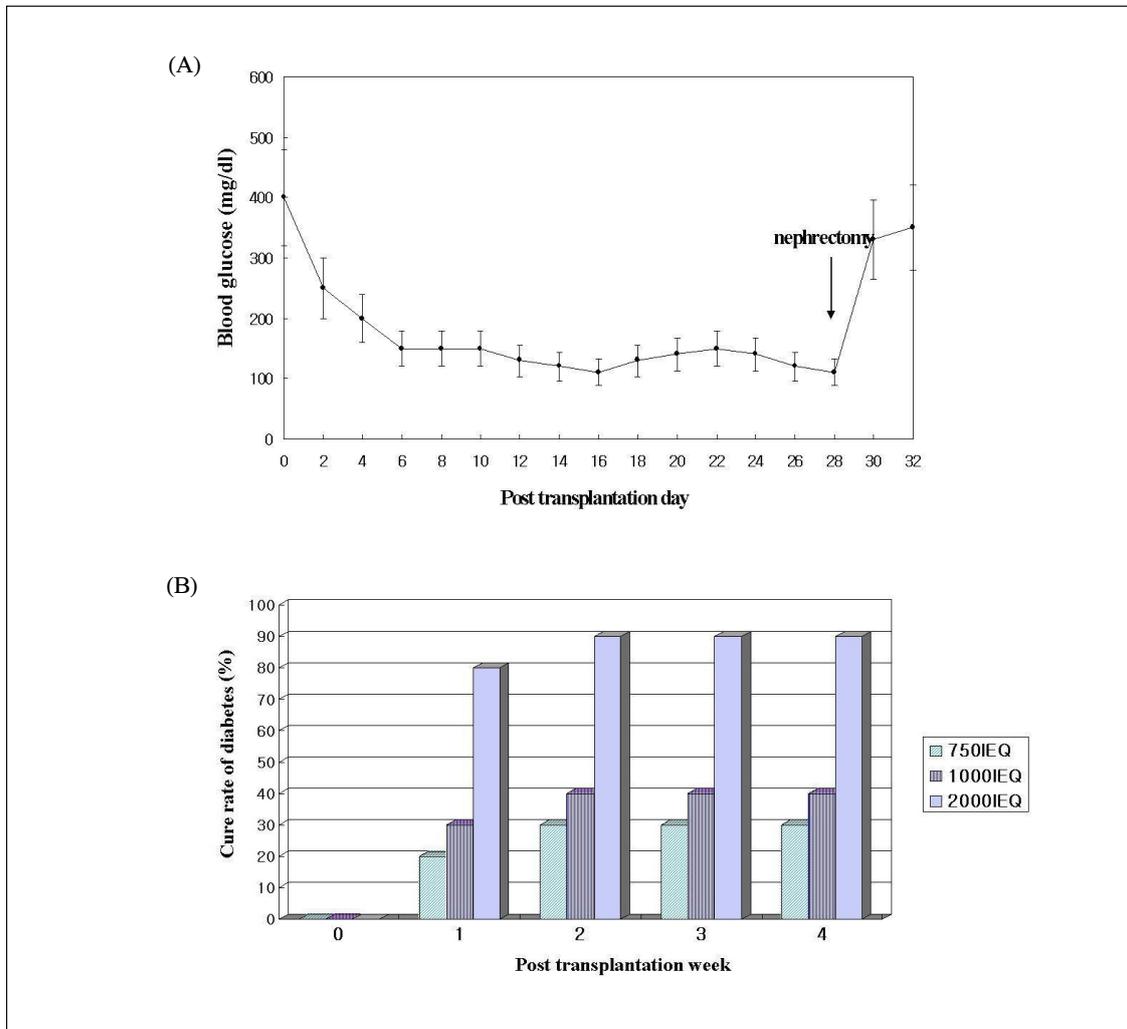


Fig. 3. (A) Glucose control after islet transplantation into nude mice in representative cases. Blood glucose level was elevated to more than 400 mg/dL after nephrectomy of islet-bearing kidney. (B) Cure rate of diabetes in nude mice according to number of transplanted islets. Euglycemia was obtained in 30% of nude mice for 750 (IEQ), 40% for 1,000 (IEQ), and 90% for 2,000 (IEQ) transplantation.

COBE 2991으로 분리 직후 평균 5.67 U/ng, 48시간 배양 후 6.47 U/ng이었다 (Table 3).

3) Vital staining

Fluorescein viability assay를 이용하여 측정한 평균 viability는 95% 이었다.

4) 췌도 이식 (Fig. 3A, B)

췌도 세포의 *in vivo* 기능을 시행하기 위하여 48시간 배양한 도세포를 각각 750, 1000, 2000 (IEQ)를 이식한 결과 750 (IEQ)를 이식한 경우 30%에서 혈당이 조절되었으며 1000 (IEQ)를 이식한 경우 40%에서, 2000 (IEQ)를 이식한 경우 90%에서 혈당이 조절되었다. 혈당이 조절된 생쥐에서 1개월 후 이식 절편을 수거한 다음 혈당의 상승이 있음을 관찰할 수 있

Table 4. Univariate Analysis on Factors for Successful Islet Isolation in Human Pancreas

	Fail (16)	Success (53)	P
Age (mean, years)	30.8	32.8	0.60
BMI (kg/m ²)	20.3	21.5	0.55
Trauma vs. non-trauma	12:4	34:19	0.35
Sex (M:F)	10:6	46:7	0.08
Cold ischemic time (hr)	6.8	6.9	0.95
Gross of pancreas			0.02
good	6	21	
moderate	2	21	
bad	8	11	
Expansion time (min)	22	28	0.13
Digestion time (min)	32	21	0.14
Collagenase:Liberase	15:1	43:10	0.27
Total islet yield ($\times 10^3$ IEQ)	40.9	268.8	< 0.001
Islet yield/pancreas (g)	471	3556	< 0.001

Table 5. Multivariate Analysis on Factors for Successful Islet Isolation in Human Pancreas

Variables	P	Odds ratio
Donor sex (M:F)	0.004	1.8
Status of pancreas (good:moderate:bad)	0.01	0.048
Digestion time (<:> 20 min)	0.009	0.895

었다.

3. 췌도 세포 분리에 관여하는 인자에 대한 분석

성공적인 분리를 100,000 (IEQ) 이상으로 기준하여 보았을 때 53예가 이에 속하였으며 100,000 (IEQ) 미만인 군이 16예가 있었다. 단변량 분석에서 각 군에 대하여 기증자의 나이, 체질량지수, 사망원인, 및 성별 비율 등의 기증자 관련 인자 중 성공한 군에서 남성 기증자의 비율이 높았다 ($P = 0.08$). 구득한 췌장의 조건 요인으로 냉허혈 시간, 췌장의 상태를 분석하였을 때 췌장의 상태가 유의하게 요인으로 작용하였다 ($P = 0.02$). 또한 분리 과정의 요인 중 collagenase type (collagenase vs. liberase), collagenase의 주입 시간, collagenase 작용 시간 등을 비교하였을 때 이들에서는 유의한 차이를 발견할 수 없었다 (Table 4). 이들 인자에 대하여 stepwise multivariate logistic regression 분석을 시행하였을 때 남성 기증자, 췌장의 상태, collagenase 작용 시간 등이 유의한 인자였다 (Table 5).

고 찰

췌도 이식의 최근 성적 향상과 함께[7], 미국 등에서는 췌도 이식이 당뇨병 치료의 획기적인 치료법으로 자리 잡을 것에 대비하여 췌도 세포의 분리 및 이식에 참여하려는 모

든 병원에 대하여 췌도 이식을 세포치료로 규정하여 FDA 및 c-GMP 규정에 맞는 시설 및 규정을 의무화하였다. 따라서 현재 미국 내에서 췌도 이식을 하고자 하는 병원에서는 이 규정을 갖추어야 한다. 이러한 추세는 전 세계적으로 확대될 전망이다. 우리나라에서도 향후 췌도 이식을 본격적으로 실시하고 국제적인 경쟁을 위해서는 췌도 세포의 분리 시설 및 기술, 이식술의 국제적 표준화 작업이 절실하다. FDA 기준을 맞추기 위해서는 기본 분리 시설에서 각 분리 과정의 국제 인정 기술의 습득, 프로토콜 및 이를 뒷받침할 수 있는 실험예의 확보 및 증기가 필요하다. 본 연구는 아직 우리나라에서는 초보적 단계인 췌도 이식의 임상적 활성화를 위하여 이러한 체계적인 준비 작업과 프로토콜의 정리를 기본으로 하여 69예의 뇌사자에서의 췌도 세포 분리 성적 및 성공적인 분리에 미치는 영향에 대하여 연구하였다. 비록 국외의 보고와 같이 많은 요인에 대한 분석이 이루어지지 않았으나 국내에서는 최초로 뇌사자에서 췌도 세포 분리에 대하여 체계적인 프로토콜에 의한 분리 작업을 수행하여 체계화 시킨 점과 이에 따른 성적 등을 분석하였다는 점에서 의의가 있다고 사료된다.

최근의 Islet Transplant Registry의 분석에 따르면[8], 동종 췌도 이식 시 이식 후 1년 이상 인슐린을 끊을 수 있었던 조건으로 수혜자 단위 체중 (kg) 당 8000-9000 IEQ 이상의 췌도 이식, 간문맥을 통한 이식, 8시간 이하의 냉 허혈 시간, 스테로이드를

포함하지 않은 면역억제 요법을 제시하였다. 따라서 충분한 양의 췌도 세포를 분리하는 일은 성공적인 췌도 이식을 위한 가장 중요한 과정이라고 할 수 있다.

뇌사자로부터의 췌도 세포 분리 시 고려할 때 많은 요인이 분리 과정에 관여하리라 사료되며 이는 크게 뇌사자와 관련된 요인과 뇌사자에서 췌장이 적출되어 췌도 세포를 분리하는 과정까지의 실험실 요인으로 나눌 수 있다. 본 연구는 c-GMP 규격에 맞게 췌도 세포 분리 시설과 기술에 대한 프로토콜을 마련하였으며 이를 바탕으로 췌도 세포 분리 성적에 미치는 요인을 공여자 및 분리 과정에 관련한 실험실 요인으로 나누어 분석하여 보았다. 본 연구에서는 인위적으로 100,000 IEQ 이상을 성공적인 분리로 보고 분석을 하였는데, 실제 10만개의 췌도 세포 분리는 임상적 의미로는 충분한 양의 췌도 세포 분리로 볼 수는 없다. 또한 성공적인 분리는 췌도 세포의 양, 순도 (purity), viability, 전체 세포의 부피, 기타 내독소의 측정 등이 종합적으로 이루어져야 할 것으로 사료되므로 이에 대한 충분한 연구가 이루어지지 못한 점은 본 연구의 한계점이라고 할 수 있다. 본 연구는 연구의 전체적인 흐름과 다른 보고[9,10]를 참조로 100,000 IEQ를 기준으로 분석하여 보았다. 또한 성공적인 분리의 기준이나 공여자의 임상적 특징 등이 다른 연구와 다르기 때문에 다른 문헌과의 비교가 다소 무리가 있을 수 있는 점 등은 추후 본 연구가 고려해야 할 과제일 것이다.

일반적으로 외국의 문헌 보고 상 췌도 세포 분리 성적에 미치는 요인으로는 냉허혈 시간[10~12], 공여자 연령[13], 공여자의 혈중 포도당 농도[14], 사망원인[15], 비만[16], 혈액학적 불안정[10] 등이 보고된다. 본 연구에서 췌도 세포의 성공적인 분리에 가장 중요한 영향을 미치는 것은 공여자의 성별, 수거된 췌장의 상태와 collagenase의 작용시간이었다.

전체적으로 다른 보고와 비교할 때 수거된 췌장의 상태에 따라 분리 성적에 차이가 있음은 다른 보고와 일치한다. Zeng 등[15]은 지방의 침윤이 심한 췌장은 매우 비만한 뇌사 공여자에서 흔히 발견되었고 이때 분리 성적이 매우 좋지 않았음을 보고하였다. 지방의 침윤이 심한 췌장에서는 collagenase에 의한 소화 시간이 길게 되어 온 허혈 시간이 길어지고 이는 도세포의 손상과 직결되며 후에 이루어지는 췌도 세포의 순수 분리에도 악영향을 미쳐 좋지 않은 분리 결과를 가져오게 된다고 추측할 수 있다.

기증자의 성별에 대하여는 Benhamou 등[17]이 같은 보고를 한 것 이외에는 없어 그 의미를 알기는 어렵다고 사료된다. 다만 남자 기증자에서 췌장의 상태가 좋았던 것이 많아 이에 영향을 받았던 것 같다. 이에 대하여는 좀 더 많은 예에서의 분석이 필요하리라 생각된다.

췌도 세포 분리 시 사용되는 collagenase의 종류가 췌도 세포의 분리성적에 관여한다는 보고는 많다. Benhamou 등[17]은 collagenase의 생산 번호에 따라 분리 성적이 4배 가까이 다를 가능성을 보고하고 있다. 최근 기존의 불안정하고 순수도가 떨어

어지는 것으로 알려져 있는 collagenase의 불안정성을 해결하기 위해 liberase를 분리에 사용하게 되었다. 본 연구도 초기에는 collagenase를 사용하였고, 후반부에는 liberase를 사용하였으나 두 군 간의 차이는 보이지 않았다.

본 연구에서는 다른 보고에서 시도하지 않았던 collagenase의 작용시간을 20분 전 후의 군으로 나누어 비교하여 보았을 때 20분 이상 군은 유의하게 췌도 세포 분리 성적이 나빴다. 이는 췌장이 collagenase에 장시간 노출되는 경우 과소화가 일어나는 것으로 추정되며, 실제 분리 후 추출되는 췌도 세포의 크기가 장기간 collagenase에 노출 되었을 경우에는 50 μm 이하가 대부분이었다 (data not shown).

본 연구에서는 타 연구와는 달리 연령, 체질량지수, 냉허혈 시간, 뇌사의 원인 등은 췌도 세포 분리에 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다. 공여자의 연령은 성공적인 췌도 세포 분리에 매우 중요한 요인으로 알려져 있다. Lakey 등[9]은 18세 이하의 연령에서 13%, 50세 이상의 연령에서 85%의 성공적인 분리를 하였으며 기능적인 면에서도 다른 연령층과 비교하여 떨어지지 않음을 보고하였다. 일반적으로 젊은 연령에서의 췌도 세포 분리에 대하여는 Zeng 등[15]의 보고와 같이 성공률이 매우 낮은 것으로 알려져 있다. Zeng 등[15]은 2-15세와 56-69세 사이의 공여자에서는 분리 성적이 만족스럽지 않았으며, 18-55세 사이에서 췌도 세포의 수거율이 좋은 것으로 보고하고 있다. 이는 본 연구에서도 15세 미만의 기증자(n = 5)에서는 성공예가 없었던 것과 일치하는데, 이러한 소아 연령에서 췌도 세포 분리 시 대부분 췌장 외분비세포와의 순수 분리가 어려워 매우 낮은 순도를 나타내게 되는 것이 가장 큰 이유로 여겨진다. 이는 발생학적으로 유년기에는 췌장에 존재하는 콜라겐의 함유정도가 차이가 있기 때문일 것으로 추측된다. 본 연구에서는 통계학적으로 연령별 차이를 보이지는 않았는데 이는 연구 대상에서 유년층이나 고령의 공여자 수가 적은 것이 원인으로 생각된다.

공여자의 체질량지수에 대하여는 Lakey 등[9]은 공여자의 체질량지수가 높을수록 췌도 세포의 수거율이 높은 것으로 보고하였으며, Wrenshall 등[16]과 Brandhorst 등[13]은 공여자 체질량지수가 높을수록 췌도 세포가 갖는 인슐린의 함량이 많다고 보고하였다. 본 연구에서의 차이점은 서양에서의 공여자들은 30 kg/m^2 이상의 높은 체질량지수를 갖는 기증자가 많이 있었으나, 우리나라의 기증자들은 체형상 대개 20~25 kg/m^2 사이의 체질량지수를 지녀 이러한 차이를 나타내지는 않았다.

뇌사자에서 장기 관류 후 실험실에서 collagenase를 주입하기까지의 시간인 냉허혈 시간의 중요성은 Islet Transplant Registry의 분석[8]에서도 8시간 이내와 이상에서 차이를 보임을 보고하고 있으며, Lakey 등[9]은 16시간 이상의 냉허혈 시간을 가질 경우 좋지 않은 결과임을 보고하였다. Benhamou 등[17]은 17시간 이상의 냉허혈 시간을 가질 경우 췌도 세포의 기능이 매우 나빠지며 분리 결과 역시 좋지 않음을 보고하였다. 본 연구에서는 평균 냉허혈 시간이 6~7시간으로 우리나라의 지역

여건상 긴 냉허혈 시간을 가진 경우가 적어 이에 따른 차이는 볼 수 없었다. 최근 냉허혈시간에 의한 췌도 세포의 손상을 막기 위해 perfluorochemical (PFC) 및 UW를 이용하여 장기를 보관하는 소위 “two layer method”에 의해 췌도 세포의 수거율 및 이식 성적이 향상됨이 보고 되어 보편화되고 있다[18,19].

뇌사의 원인이 미치는 영향에 대하여는 교통사고 등 사고에 의한 뇌사의 많은 부분은 젊은 연령층이 많고 뇌졸중 등의 원인은 고령의 층이 많기 때문에, 연령과 전신상태에 따른 차이를 반영한다고 볼 수 있다. 좀 더 많은 예의 분석에서는 단일 요인은 아닐 가능성도 있을 것이다.

결론적으로 본 연구에서는 췌도 세포 이식의 임상적인 적용을 위한 시설 및 분리 작업에 대한 표준화 작업을 하였으며 분리된 췌도 세포에 대한 해부학적 및 생화학적 평가를 통해 이를 규정하였다. 또한 본 연구는 췌도 세포 분리가 진행된 예 중 분석 자료가 가능하였던 69예를 대상으로 분리 성적이 미치는 영향을 분석한 결과 기증자의 성별, 구득된 췌장의 상태와 소화시간이 중요한 요인임을 알 수 있었다. 따라서 성공적인 췌도 세포 분리를 위해서는 엄격한 뇌사자관리를 통하여 좋은 장기를 얻도록 하여야 하며 장기 수거시 세밀한 조작 등을 통하여 췌장의 손상을 최소화 하고 분리 과정 중 췌장의 과소화 (over digestion)를 막는 것이 매우 중요하다고 하겠다.

요 약

연구 배경: 사람에서 당뇨병의 근본적 치료를 위해 성공적인 췌도 이식이 이루어지기 위해서는 표준화된 분리 방법 및 분리된 췌도 세포의 품질 관리가 필수적이다. 또한 뇌사 기증자 및 분리 과정에 관여되는 여러 가지 요인에 의해 분리 성적이 좌우되기 때문에 이들의 요인 분석 역시 성공적인 췌도 세포 분리를 위해 매우 중요하다.

방법: 69예의 뇌사 기증자로부터의 췌도 세포 분리가 표준적인 분리 방법의 확립과 함께 이루어졌다. 성공적인 분리를 100,000 (IEQ) 이상으로 정의하여 기증자 나이, 성별, 체질량지수, 사망 원인, 냉허혈 시간, 췌장 상태, collagenase 주입 시 췌장의 팽창 정도, 주입 시간, 소화 작용시간 등이 요인으로 분석되었다.

결과: 분리 후의 평균 췌도 세포의 수는 순수 분리 전 $216.0 \times 10^3 \pm 173.7 \times 10^3$ (IEQ), 순수 분리 후 $130.6 \times 10^3 \pm 140.2 \times 10^3$ (IEQ)이었다. 평균 순도는 $54 \pm 31\%$ 였다. 분리된 췌도 세포에 대한 viability 는 $95 \pm 4\%$ 였으며 포도당 자극에 의한 자극지수는 4.67로 좋은 기능을 보였다. 공여자의 평균 연령은 31.2 ± 13.2 세였으며 평균 냉허혈 시간은 6.9 ± 6.2 시간이었다. 군 동정 검사에서 유의한 군 검출은 나오지 않았다. 성공적인 췌도 세포 분리에 관여되는 인자에 대한 단변량 분석에서 췌장의 상태가 가장 중요한 요인이었으며 그 외 성별, collagenase 주입 시간과 소화 작용시간이 중요 인자였다. 다변량 분석에서

는 기증자의 성별, 췌장의 상태, 소화 작용 시간이 유의한 인자였다.

결론: 본 연구를 통해 뇌사 공여자 및 분리 과정에 관여하는 인자들이 성공적인 췌도 세포 분리에 관여함을 알 수 있었다. 췌장에 손상을 주지 않는 뇌사 공여자 관리 및 수술 중 조작 등이 필요하며 많은 분리 경험을 통해 계속적으로 이에 관여하는 요인에 대한 분석이 성공적인 췌도 세포 분리 및 췌도 이식에 필수적이다.

참 고 문 헌

1. Nathan DM: Long term complications of diabetes mellitus. *N Eng J Med* 308:1676-1684, 1993
2. The Diabetes Control and Complication Trial Group: The effects of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long term complications in insulin dependent diabetes mellitus. *N Eng J Med* 329:977-986, 1993
3. Surtherland DER, Grussner RWG: Current status of pancreas transplantation for the treatment of type I diabetes. *Clinical Diabetes* 2:152-156, 1997
4. Davalli AM, Scaglia L, Zangen DM, Hollister J, Bonner-Weir S, Weir GC: Vulnerability of islets in the immediate posttransplantation period: dynamic changes in structure and function. *Diabetes* 45:1161-1167, 1996
5. Bartlett ST, Schweitzer EJ, Kuo PC, Johnson LB, Delatorre A, Hadley GA: Prevention of autoimmune islet allograft destruction by engraftment of donor T cells. *Transplantation* 63:299-303, 1997
6. Ricordi C, Lacy PE, Fink EH, Olack BJ, Scharp DW: An automated method for the isolation of human pancreatic islets. *Diabetes* 37:2744-2749, 1988
7. Shapiro AM, Lakey JR, Ryan EA, Korbutt GS, Toth E, Warnoc GL, Kneteman NM, Rajotte RV: Islet transplantation in seven patients with type I diabetes mellitus using a glucocorticoid-free immunosuppressive regimen. *N Eng J Med* 343 :230-238, 2000
8. Brendel MD, Hering BJ, Schultz AO, Bretzel RG: *International Islet Transplant Registry. Newsletter No. 9, Vol. 8, No. 1, June 2001*
9. Lakey JRT, Warnock GL, Rajotte RV, Suarez-Alamazor ME, Ao Z, Shapiro AM, Kneteman NM: Variables in organ donors that affect the recovery of human islets of Langerhans. *Transplantation* 61: 1047-1053, 1996

10. Matsumoto S, Zhang G, Qualley S, Clever J, Tombrello Y, Strong DM, Reems JA: *Analysis of donor factors affecting human islet isolation with current isolation protocol. Transplant Proc* 36:1034-1036, 2004
11. Hering BJ, Browatzki CC, Schultz A, Bretzel RB, Federlin KF: *Clinical islet transplantation--registry, report, accomplishment in the past and future research needs. Cell Transplant* 2:269-282, 1993
12. Kneteman NM, Warnock GL, Evans MG: *Islet isolation from human pancreas stored in UW solution for 6 to 26 hours. Transplant Proc* 22:763-764, 1990
13. Brandhorst D, Hering BJ, Brandhorst H, Fedelin K, Bretzel RG: *Influence of donor data and organ procurement on human islet isolation. Transplant Proc* 26:592-593, 1994
14. Gores PF, Gillingham KJ, Dunn DL: *Donor hyperglycemia as a minor risk factor and immunologic variables as major risk factors for pancreas allograft loss in a multivariate analysis of a single institution's experience. Ann Surg* 215:217-222, 1992
15. Zeng Y, Torre Ma, Karrison T, Thistlethwaite JR: *The correlation between donor characteristics and the success of human islet isolation. Transplantation* 57:954-961, 1994
16. Wrenshall GA, Bogock A, Ritchie RE: *Extractable insulin of pancreas. Diabetes* 1:87-93, 1952
17. Benhamou PY, Watt PC, Mullen Y, Ingels S, Watanabe Y, Nomura Y, Hober C, Miyamoto M, Kenmochi T, Passarp EP, Zinner MJ, Brunicardi FC: *Human islet isolation in 104 consecutive cases. Transplantation* 57:1804-1809, 1994
18. Tsujimura T, Kuroda Y, Avila JG, Kin T, Oberholzer J, Shapiro AM, Lakey JR: *Influence of pancreas preservation on human islet isolation outcomes: impact of two-layer method. Transplantation* 78:96-100, 2004
19. Hering BJ, Matsumoto I, Sawada T, Nakano M, Sakai T, Kandaswamy R, Surtherland DE: *Impact of two-layer pancreas preservation on islet isolation and transplantation. Transplantation* 74:1813-1816, 2002