대한진단검사의학회지 제26권 제1호 2006
Korean J Lab Med 2006;26:45-51

신장 이식을 위한 HLA 교차시험에서 전혈 유세포분석법의 실험적 적용

원동일

경북대학교 의과대학 임상병리학교실

Experimental Application of Whole Blood Flow Cytometry to HLA Crossmatch for Renal Transplantation

Dong Il Won, M.D.

Department of Clinical Pathology, Kyungpook National University School of Medicine, Daegu, Korea

Background : The lymphocytes separated from whole blood are used in HLA flow cytometry crossmatch (FCXM) for renal transplantation. In this study, the methodology of whole blood flow cytometry was applied to FCXM, omitting lymphocyte separation step.

Methods : In the 20 cases (including positive 5 cases) of T cell FCXM for renal transplantation, the standard assay using the separated mononuclear cells (MNC) was compared with the two variant assays using whole blood. In the latter assay, the donor whole blood was incubated with the excessive recipient serum. The red cells were lysed (lysed whole blood, LWB). Otherwise, instead of red cell lysis, the signals of T cells among whole blood (WB) were acquired using fluorescence triggering. The sample/negative control mean fluorescence intensity (MFI) ratio was calculated for the interpretation.

Results : The MFI ratio of the 20 cases by MNC, LWB and WB assay were 4.9±8.1, 5.4±9.7 and 4.8±7.8, respectively. Both LWB and WB assay were not significantly different from MNC assay (P= 0.313, 0.831, respectively, paired t-test). The qualitative determinations were concordant in all cases, except for one case which was weakly positive with MFI ratio 2.2 by LWB assay.

Conclusions : The assays using whole blood were comparable to the standard assay in FCXM for renal transplantation. This study indirectly supports that the variant methods can be used reliably in the case of the MNC preparation erroneously mixed with other blood cells. *(Korean J Lab Med 2006; 26:45-51)*

Key Words : *HLA crossmatch, Flow cytometry, Whole blood*

서 론

최근 조사에 의하면 국내 8개의 조직적합성 검사실이 HLA 교차시험에서 유세포분석법(flow cytometry crossmatch, FCXM)을 사용하고 있다[1]. HLA 교차시험에서 FCXM 방법은 보체의 존성 림프구 독성(complement dependent lymphocytotoxicity, CDC) 방법에 비하여 다음과 같은 여러 가지 장점이 있다: 1) 민감도가 매우 높아서 CDC 방법으로 검출하지 못하는 낮은 농도의 항HLA항체(anti-HLA antibody)도 검출이 가능한데, CDC 방법에 비하여 최대 약 50배 민감하다고 한다[2]. 2) 급성 및 가속성(accelerated) 거부 반응에 관계하는 IgG isotype의 항HLA항체만을 검출할 수 있으므로, 수여자 혈청중 림프구와 반응하는 IgM 항체를 불활성화하기 위한 dithiothreitol 처리가 필요 없다. 3) 표지자 항체를 사용하여 T 세포와 B 세포 구별하므로 각 세포를 물리적으로 분리할 필요가 없다. 4) 결과 판정에 있어서 mean fluorescence intensity (MFI)로 판정하므로 더 객관적이고 정량

접 수 : 2005년 8월 10일 접수번호 : KJLM1874
수정본접수 : 2005년 11월 4일
게재승인일 : 2005년 11월 7일
교 신 저 자 : 원 동 일
우 700-721 대구광역시 중구 삼덕동2가 50
경북대학교병원 진단검사의학과
전화 : 053-420-5291, Fax : 053-426-3367
E-mail : wondi@knu.ac.kr

적인 판정이 가능하다. 5) 검사 시간이 단축되어 뇌사자 장기에 대한 수여자를 신속히 선정하는데 도움을 준다. 6) 광산란 특성(light scatter characteristics)으로 죽은 세포를 제외할 수 있으므로 세포의 생존도가 50% 이하에서도 분석이 가능하다[3]. 이런 여러 가지 장점들 때문에 국내에서도 HLA 교차시험에 FCXM 방법을 도입하는 검사실이 점차 늘고 있다.

임상 검사실에서 시행되는 검사 중 수기로 시행되는 검사들의 술기를 살펴보면, 관행으로 굳어진, 필요없는 단계가 포함된 경우를 드물지 않게 볼 수 있다. 대표적인 예를 들면, 유세포분석을 이용한 항혈소판항체 검사에서 비특이 형광을 없애거나[4, 5] 혈소판내 알파 과립의 IgG 분비를 막기 위해 혈소판을 paraformaldehyde로 고정하는 단계이다. 그러나 이 단계는 반드시 필요한 단계가 아니고, 오히려 혈소판 응집을 일으키거나 혈소판 막의 주름에 IgG가 갇히게 되어 그 검출이 방해된다고 하므로[6], 최근의 국제적인 합의 술식(consensus protocol)[7]을 보면 이 과정이 생략되어 있음을 알 수 있다. FCXM 방법은 아직 표준화된 술식이 국제적으로 합의되지는 않았고, 여러 문헌상 제시된 술식의 과정중에는 생략하여도 결과에 큰 영향을 미치지 않는 단계가 있을 수 있다.

대부분의 검사실에서 FCXM에서 공여자 세포로 말초혈액에서 분리한 림프구가 사용된다. 그러나, 최근 HLA 형별검사 방법이 림프구 분리가 필요 없는 DNA 법으로 교체되고 있고, 신장 이식에서 공여자와 수여자간 ABO 혈구형에 관한 주 불일치인 예가 없어서 수여자 혈청에 의한 공여자 적혈구의 응집이 일어나지 않으며, 유세포분석법은 기본적으로 전혈중 림프구 식별이 가능하다. 따라서, 신장 이식을 위한 FCXM에서 번거로운 림프구 분리 과정을 생략하고 전혈을 그대로 이용하여 신속히 교차시험을 수행하는 것이 가능할 것으로 생각된다.

유세포분석시 전혈에서 다른 세포를 분리하지 않고 fluorescence signal triggering 기법을 이용하여 관심 대상 세포의 신호만을 분석하는 방법은 다른 많은 술식들에서 이미 사용되고 있다. 예를 들면, 전혈에서 혈소판 표지자와 thiazole orange로 염색하여 망상혈소판(reticulated platelets)을 측정[8]이나, 전혈에서 세포자멸사 세포 측정[9], 조혈모세포 측정[10], 혈소판-백혈구 응집체 측정[11] 방법 등이 보고된 바 있다.

장기를 기증할 뇌사자가 발생하면 이식 대기 중인 환자들 중에서 신속하게 수여자가 선정되어야 하나, HLA 교차시험을 위한 림프구를 순수 분리하는데 시간과 수고가 필요하다. 또한 뇌사자로부터 채취한 전혈이 충분하지 않은 상황에서 림프구 분리 과정에서 일부 림프구가 유실되기도 한다. 혹은 림프구 분리 과정에서 실수로 다른 세포들이 과다하게 혼입되는 경우에도 그대로 교차시험을 진행할 수 밖에 없는 경우도 있다.

본 연구에서는 신장 이식을 위한 T 세포 FCXM에서 검사 과정 단축을 위해 림프구 분리 없이 전혈을 이용하는 방법을 시도하여 보고, 또한 전혈은 분리된 림프구의 순도가 아주 낮은 극한 상황으로 볼 수 있으므로, 전혈을 이용하는 경우가 림프구를 순수 분리한 경우와 결과에 차이를 보이는지 조사하였다.

대상 및 방법

1. 대상

신장 이식을 위한 T 세포 FCXM 20예(통상적인 방법으로 음성 15예와 양성 5예)를 대상으로 하였다. 단핵구(mononuclear cells, MNC)와 혈청을 얻기 위하여 각각 말초혈액을 헤파린과 단순(plain) 시험관에 채혈하여 당일 검사하였다. 음성 대조 혈청은 혈액형이 AB이고 수혈 경력이 없는 건강한 남자들로부터 얻어 섞지 않고 개별적으로 -20℃에서 냉동 보관하다가 각각 매 검사시 한 건의 음성 대조 시험관에 사용되었다.

2. 방법

림프구를 분리하여 검사하는 통상적인 FCXM 방법인 '표준법'을 기준으로 전혈을 이용하는 두가지 변법 즉, 공여자 전혈과 과량의 수여자 혈청을 항온후 적혈구를 용혈시키거나('전혈용혈법'), 용혈 과정 없이 fluorescence signal triggering을 이용하여 림프구를 식별하는 '전혈법'에 대하여 정량 결과(MFI 비), 정성 판정 및 검사 소요 시간을 비교하였다. 또한 30예에서 단핵구 분리 효율을 조사하였다.

1) 통상적인 FCXM 방법(표준법)

(1) 단핵구 분리

밀도구배원심분리(density gradient centrifugation) 방법으로 분리하였다. 시험관에 5 mL Histopaque-1077 (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA)을 넣고 그 위에 전혈 5 mL를 중첩시킨 후 실온 700 g로 30분간 원심분리하였다. MNC 층을 분리하여 phosphate buffered saline (PBS) 10 mL로 2회 세척하였다. PBS 1 mL를 넣어 MNC를 재부유시킨 후 새 시험관으로 옮기고, 혈소판을 제거하기 위하여 100 μL thrombin (100 U/mL)을 가하고 1,000 g로 3초간 원심분리하여 상층의 MNC를 취하였다. 이를 RPMI로 3회 세척하고 RPMI 700 μL를 넣어 재부유시킨 후 자동혈기계산기 Advia 120 (Bayer, Tarrytown, NY, USA)로 측정하여 부유액의 림프구 농도가 3,000/μL가 되도록 RPMI로 희석하였다.

(2) Flow cytometry crossmatch (FCXM)

Anti-human IgG FITC, Fcγ specific, $F(ab')_2$ fragments, catalog No. 109-096-098 (Jackson Immunoresearch, West Grove, PA, USA)를 증류수 700 μL로 재구성한 후 동량의 glycerol과 혼합하여 -20℃에서 냉동 보관하며 사용하였다. 이전 실험에서 최적 working dilution을 구하기 위하여 chessboard titration을 응용하여 음성과 양성 대조의 분별력이 최대가 되는, 즉 양성 대조의 MFI 비가 최대인 희석 배수를 구하였는데, glycerol 혼합 원액 1.0 μL를 PBS 20 μL로 희석한 약 1:40희석으로 결정되었다.

T 세포 표지자로는 CD3-PE (DiNona, Seoul, Korea)를 사용하였다. 매 검사시 음성 대조 혈청 2개와 양성 대조 혈청 1개를 사용하였다. 양성 대조 혈청은 이전에 항HLA항체가 고농도인 것으로 확인된 혈청을 -70℃에서 보관하다가 중등도 양성 반응이 되도록 희석해서 사용하였다.

각 시험관에 혈청 100 μL와 MNC 부유액 20 μL를 분주하고 37℃에서 30분간 반응시켰다. PBS 2 mL로 4회 세척한 후 CD3-PE 3 μL와 anti-IgG-FITC 희석액 20 μL를 가하고 4℃ 암실에서 30분간 반응시켰다. PBS 2 mL로 1회 세척한 후 PBS 130 μL를 첨가하고 재부유시켜, 유세포분석기로 분석하였다.

유세포분석기는 FACSCalibur (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA)를 사용하였고 Cellquest 프로그램으로 수집(acquisition) 및 분석하였다. 검사전 Calibrite bead와 Facscomp 프로그램으로 장비를 조정하였다(모두 Becton Dickinson). 전방 및 측방 광산란 gate로 림프구 gate를 정하여, 시험관당 림프구 5,000개의 신호를 수집하였다. 광산란 및 형광 신호는 각각 선형(linear) 및 대수형(logarithmic) 증폭하여 수집하였다. 결과 판정에서, gating한 T 세포의 anti-IgG FITC 히스토그램에서 peak의 평가를 위하여 검체/대조 MFI 비(sample/control MFI ratio)를 구한 후 이 값이 이미 정해진 cutoff 2.0보다 큰 경우 양성으로 판정하였다. 대조 MFI는 두 음성 대조의 평균으로 하였다(Fig. 1).

2) 전혈을 이용하는 방법

(1) 전혈용혈법

공여자 전혈 20 μL와 수여자 혈청 100 μL를 반응시킨 후 표준법과 같은 과정을 거친 후 단클론 항체 염색 직후 FACS Lysing Solution (Becton Dickinson) 1 mL를 가하여 실온에서 10분간 반응시켜 적혈구를 용혈시킨 후 원심분리하여 용혈액을 제거하고 PBS 2 mL로 1회 더 세척한 후 PBS 130 μL를 첨가하고 재부유시켜, 유세포분석기로 분석하였다.

(2) 전혈법

공여자 전혈 20 μL와 수여자 혈청 100 μL를 반응시킨 후 표준법과 같은 과정을 거쳐 단클론 항체 염색후 용혈 과정 없이 1회 세척 후 PBS 1 mL에 재부유시켜 유세포분석기로 분석하였다. 수집시 fluorescence signal triggering 기법으로 CD3-PE가 부착된 세포의 신호만 수집하였다. 즉, 적혈구의 FL2 형광 이상의 FL2 수준으로 acquisition threshold로 설정하여 T 세포의 신호만을 효과적으로 수집하였다(Fig. 2).

3) 통계

두 군간 비교에서 paired *t*-test와 상관분석을 사용하였다. 통계 프로그램은 Excel (Microsoft, Redmond, WA, USA)을 사용하였다. 자료는 평균±표준편차로 나타내었다. $P<0.05$이면 유의한 것으로 판정하였다.

결 과

1. 단핵구 분리 효율

30예에서 최종 MNC 부유액 700 μL의 백혈구수는 5.88±3.13×10^3/μL이고 혈소판수는 3.50±3.44×10^3/μL이었다. 백혈구 분별

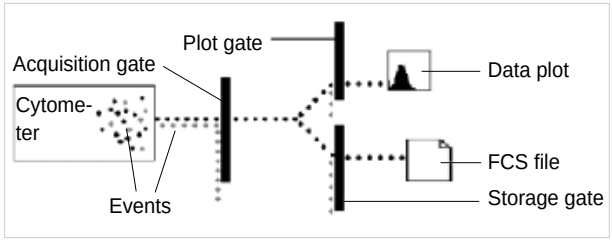

Fig. 2. Event flow through gates during acquisition. By a technique of fluorescence signal triggering, only events with parameter values above a trigger signal are acquired and unwanted events eliminated. This increases the efficiency of the flow cytometric analysis when the number of unwanted cells overwhelms that of cells of interest likewise whole blood flow cytometry.

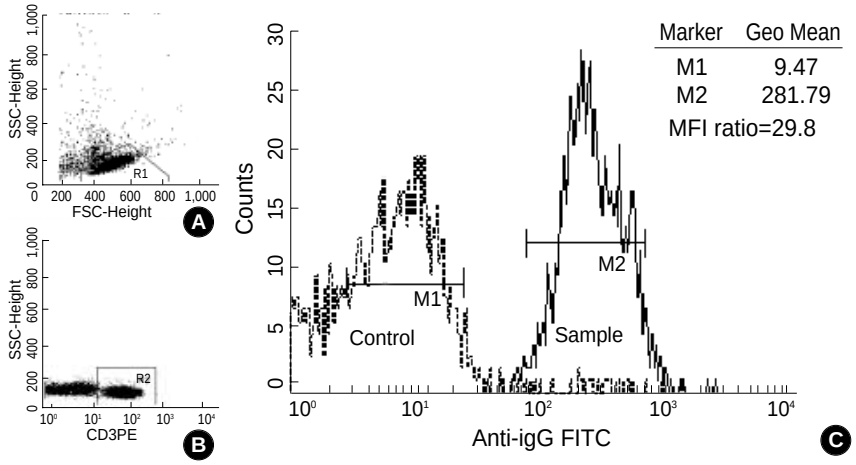

Fig. 1. Analysis of T cell flow cytometry crossmatch. (A) Lymphocyte scatter gate (R1) in FSC/SSC plot. (B) T cell gate (R2) in CD 3PE/ SSC plot of gated lymphocytes. (C) Anti-IgG FITC histogram of gated T cells. This overlay histogram shows a representative example of the calculation of MFI ratio.
Abbreviations: FSC, forward scatter characteristics; SSC, side scatter characteristics; MFI, mean fluorescence intensity.

계산은 호중구 5.0±5.9%, 림프구 87.6±10.6%, 단구 2.9±3.9%, 호산구 1.4±2.5%, 호염구 0.1±0.1%, LUC 2.8±2.9%이었다. 원래 5 mL 전혈에 존재하던 총 림프구수는 $9.55\pm3.50\times10^6$개이었고, 이 중 $3.74\pm2.14\times10^6$개가 분리되었으므로 림프구 회수율은 37±11%이었다.

2. 검사 방법간 비교

1) 정량 결과(검체/대조 MFI 비) 비교

20예의 세 방법간 MFI 비를 비교하면, 표준법 x대 전혈용혈법 y의 비교에서 y=1.162x-0.277, r=0.985, ($P=2.56\times10^{-15}$), 표준법 x대 전혈법 y의 비교에서 y=0.937x+0.193, r=0.962, ($P=1.33\times10^{-11}$)으로 상관성이 우수하였다. 두 방법간 MFI 비의 비교에서, 표준법, 전혈용혈법 및 전혈법의 평균형광강도비는 각각 4.9±8.1, 5.4±9.7 및 4.8±7.8로, 전혈용혈법과 전혈법 둘 다 표준법과 비교하여 유의한 차이가 없었다(각각 $P=0.313$, 0.831, paired *t*-test). 양성 5예만의 통계는 각각 15.6±10.6, 17.4±13.4 및 15.6±9.6이었다(Fig. 3).

2) 정성 판정 비교

Cutoff MFI 비를 2.0으로 한 정상 판정의 비교에서 한 예를 제외한 나머지 14 음성 예와 5 양성 예에서 세 방법 모두 일치하였다. 불일치한 1예에서 MFI 비는 표준법 1.5, 전혈법 1.2로 음성이었지만 전혈용혈법은 2.2로 약양성이었다.

본 20예에서의 정량 결과 및 정성 판정 비교를 종합하면, 전혈을 이용하는 방법도 표준법과 비교하여 대등한 결과를 보였다.

3) 방법간 검사 소요 시간 비교

표준법은 MNC 분리에 1시간, MNC와 혈청 반응 시간 30분, 세척 4회 30분, 염색 30분, 세척 후 분석에 30분, 총 3시간이 소요되었다. 표준법에 비하여 전혈용혈법은 약 30분이, 전혈법도 약 30분이 단축되었다.

고 찰

밀도구배원심분리 방법으로 림프구 분리시 회수율은 Histopaque 제조원 설명서에 약 68%라고 되어 있으나[12] 본 연구에서는 실제로 이에 미치지 못하는 37%이었다. 이 37%를 기준으로 공여자 말초혈액이 백혈구수 7,800/μL, 림프구 백분율 33.5%일 경우 필요한 전혈의 양을 계산하여 보면, CDC 방법에서 Terasaki plate 한 well에 3,000개의 림프구를 준비하기 위해서 전혈 3.1 μL, 신장 이식 대기자 10명에서 각각 6개의 well을 사용한다면 186 μL가 필요하다. FCXM에서는 시험관당 3,000/μL×20 μL=60,000개의 MNC를 넣으므로 이식 대기자 1명당 62 μL, 10명이면 620 μL가 필요하다. 이 외에도 림프구 농도를 조정하기 위하여 자동혈구계산기 측정에 필요한 양, 혹은 HLA 형별검사에 소모되는 양도 있다. 따라서 뇌사자 공여자로 얻은 말초혈액의 양이 제한된 경우 MNC를 분리하는 것이 부적절할 수도 있다. 또한 Histopaque-1077로 분리한 MNC가 응집하는 경향이 있을 수 있어서, 부유액의 림프구 농도를 정확히 조정하기가 어렵고, 시험관마다 균등한 분배가 이루어지지 않을 수 있다. 이에 비하여, 전혈을 이용하면, MNC 분리에 드는 노력과 시간을 절약할 수 있고, 림프구가 혈액에 응집이 없이 균등하게 분포하고, 림프구 농도가 건강한 공여자

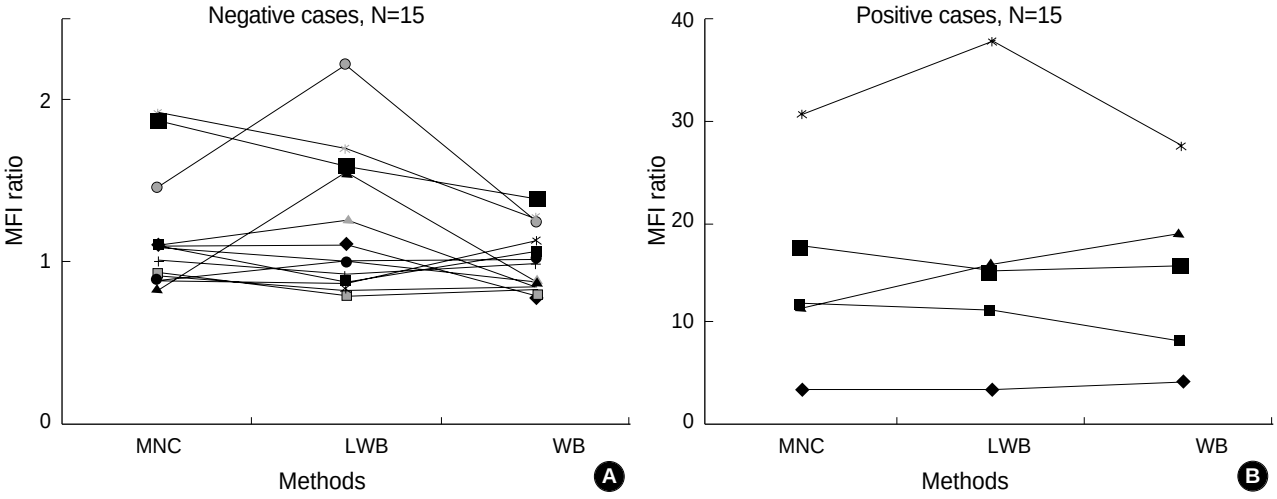

Fig. 3. The correlations of sample/control MFI ratio among the three assays: MNC, LWB and WB. Panel A shows 15 negative cases and panel B 5 positive cases. The MNC assay was a standard assay using separated mononuclear cells. The LWB and WB assay were variant assays using whole blood. Red cells were lysed in the LWB assay. In the WB assay, the signals of T cells among whole blood cells were acquired using fluorescence triggering instead of red cell lysis. The resutss were concordant in all cases, except for one case which was weakly positive with MFI ratio 2.2 by LWB assay.
Abbreviations: MNC, mononuclear cells; LWB, lysed whole blood; WB, whole blood.

간 큰 차이없이 그대로 사용하기에 적절하여 농도를 조정할 필요가 거의 없고, 검사 과정에서 세포 부유액이 눈에 보이므로 검사가 수월해지는 등 여러 장점이 있었다.

본 연구에서는 검체/대조 MFI 비를 구하여 결과를 판정하였는데, 이 값은 선형 증폭으로 회수하여 구하는 sample-control channel displacement 값보다 항HLA항체의 수준을 더 잘 반영한다고 한다[13]. 실제로 본 검사실에서 신장 이식을 위한 FCXM 2회에서 MFI 비 3.2 및 2.9로 양성이었던 환자를 1 혈장량을 5% 알부민으로 대체하는 혈장교환술을 하였는데, 1회 시행 후 MFI 비 1.9로 감소하였고 이후 추가 혈장교환술 시행으로 1.2로 음전되었으므로[14] MFI 비는 혈중 항HLA항체의 역가를 잘 반영하는 것을 알 수 있었다. 본 연구에서도 3가지 다른 방법에 의한 측정에서도 서로 잘 일치하였으므로 이 값이 방법에 따른 차이에도 불구하고 항HLA항체의 수준을 일관되게 반영하는 값임을 시사하였다. 뿐만 아니라, 신장 이식 후 환자의 혈청과 공여자의 림프구와 반응시켜 얻은 MFI 비 값을 추적 관찰하면 급성 거부 반응 진단에 도움이 될 것으로 추측된다. 신장 이식 후 공여자 특이 HLA 항원에 대한 항HLA항체(donor specific antibody, DSA)가 발생하는 것은 급성 거부반응과 관계가 있으므로[15], 이의 진단을 위하여 ELISA 법으로 DSA를 감시할 수 있는 상용 키트[16]가 판매되고 있는데, 해당 공여자의 림프구를 사용한 FCXM의 MFI 비도 같은 원리로 공여자 항원에 특이한 항HLA항체의 출현 유무 및 그 수준을 반영할 것으로 생각된다.

MFI 비 계산에 사용되는 음성 대조의 MFI의 평균치는 표준법, 전혈용혈법 및 전혈법 각각 11.9, 10.4 및 8.4로 전혈용혈법이 표준법에 비하여 높지 않았으나, 양성 5예의 MFI 비 평균치는 각각 15.6, 17.4 및 15.6으로 전혈용혈법이 가장 높았다. 이는 전혈용혈법의 음성과 양성 분별력이 가장 우수함을 시사하는 소견이다. 전혈용혈법에서만 양성이었던 불일치 1예가 있었는데, 수여자는 임신 및 수혈 경력이 없는 20세 Alport 증후군 및 말기신부전 여자 환자이었고 수여자는 친모이었으며 3 HLA-ABDR 불일치이었으나 AHG-CDC 방법 교차시험은 음성이었고 이식 후 면역억제제 투여받으며 거부 반응의 소견은 보이지 않고 있다. 본 예의 불일치 원인은 전혈용혈법의 위양성 경향 때문이라기보다 수기법에 의한 검사 과정상 있을 수 있을 수 있는 무작위 실수 때문인 것으로 생각되었다. 참고로, AHG-CDC 방법 음성이고 FCXM 방법 양성인 경우: 1) 항HLA항체가 저농도(sublytic concentration)이거나, 2) 항HLA항체가 보체비고정 항체(noncomplement-fixing antibody)이거나, 3) 수여자 혈청내 응집 혹은 복합 형태의 면역글로불린에 의한 위양성 반응 등으로 해석할 수 있다[17].

본 연구에서 cutoff MFI 비는 이전 실험에서 임신이나 수혈 경력이 없는 건강인 혈청 20개에서 각각 측정한 검체/대조 MFI 비들의 평균+3×표준편차로 구하였다. 그 값은 실제로 1.4이었으나 편의상 2.0으로 정하였다. MFI 비의 cutoff는 매 일괄(batch) 검사마다 충분한 수의 음성 대조를 병행하여 이의 통계로써 매번 새로 정하는 것이 이상적이다. 그러나 MFI 비가 해당 일괄의 음성 대조 값으로 나눈 값이어서 그 자체로써 해당 일괄에서 발생한 변이가 일부 보상될 것이므로, 본 연구에서와 같이 고정 cutoff를 사용하더라도 신뢰성있는 결과 판정을 할 수 있고 검사 편이성 면에서도 더 좋을 것 같다. 실제로 외국의 한 보고[18]를 보면, cutoff MFI 비는 T 세포 FCXM에서 2.0, B 세포 FCXM에서 3.0으로 고정 cutoff를 사용하고 있었다.

교차시험에서 전혈을 이용한다면 문제가 될 것으로 추정되는 것 중 하나는 림프구이외의 세포에 의한 위음성 현상이다. 백혈구와 혈소판은 HLA class I 항원을 표현하므로 항HLA항체에 대하여 림프구와 경쟁하여 위음성 결과를 초래할 수 있다. 이런 현상은 본 연구에서와 같이 반응시킬 혈청을 과량(100 μL)으로 사용함으로써 방지할 수 있을 것으로 생각된다. 교차시험에서 혈청량/세포수 비가 검사의 민감도에 큰 영향을 미치는데, 반응시킬 혈청량을 높이거나 림프구수를 낮추면 검사의 민감도가 높아진다[13]. 방법별로 반응하는 혈청량(μL)/림프구수를 보면, CDC 방법은 1/2,000이고, FCXM에서는 50/50,000[2], 50/250,000[13], 20/100,000[3]으로 문헌 마다 다양하였고, 본 연구에서 약 100/40,000으로 과량의 혈청을 사용함으로써 HLA 항원을 표현하는 다른 세포 혼입에 의한 위음성이나 MFI 비의 감소를 방지할 수 있었던 것으로 해석된다.

전혈을 이용할 경우 다른 혈구의 HLA 항원이외 위음성의 다른 원인으로, 공여자 적혈구와 반응하는 적혈구 비예기 동종항체이다. 이 항체가 적혈구에 부착되면 anti-IgG FITC를 소모시켜 위음성을 초래할 것으로 생각된다. 이 문제는 단클론 항체 염색전에 먼저 적혈구용혈액을 사용하여 적혈구를 용혈시켜 제거하면 해결될 것으로 생각된다. 이때 적혈구 용혈액에는 고정액이 포함되지 않아야 염색전에 림프구가 고정되지 않는다. 특이도가 높은 매우 정제된 anti-IgG FITC를 과량 사용하여 적혈구에 부착된 IgG에 소모되어도 림프구에 부착된 IgG 검출에 영향을 받지 않도록 하는 방법을 생각할 수도 있으나, anti-IgG FITC는 음성과 양성 대조의 분별력, 즉 양성 대조의 MFI 비가 최대가 되도록 희석 비율을 이전에 결정해서 사용해야 하므로 적절하지 않을 것이다.

수집시 적혈구가 그대로 있는 전혈법에서 gating 적용 방법에 따라 분석 효율에 영향이 크다. 평상시대로 forward scatter characteristics (FSC) threshold로 설정하여 모든 세포의 신호를 수집한다면 T 세포 신호 수집 효율이 떨어지고 컴퓨터에 저장된 파일의 크기가 상당히 커지게 된다. 본 연구에서와 같이 FL2 threshold로써 fluorescence signal triggering 기법을 이용하면 적혈구의 신호를 수집에서 제외할 수 있어서 T 세포 신호의 수집 효율이 높아지고 저장되는 파일의 크기도 작아진다. 이 기법은 검체 조작을 최소화하면서 light scatter triggering보다 수집 효율을 약 5배 높인다고 한다[11].

검사 소요 시간면에서 전혈법의 소요 시간이 크게 단축될 것으로 기대되었으나, 실제로는 적혈구수에 비하여 극소수인 T 세포를 감별하기 위해 최종 pellet을 PBS 1 mL로 재부유시켜 측정하였는데, 충분한 수(적어도 3,000개)의 T 세포 신호를 모으기 위해

수집 시간이 한 시험관당 약 5분으로 길어지게 되어 전체 검사 소요 시간을 크게 단축시키지는 않았다.

신장 이식을 위한 FCXM에서 림프구 분리 없이 전혈을 이용한 방법도 표준법과 비교하여 만족할 만한 결과를 보였다. 전혈 이용으로 인한 위음성 가능성에 대한 해결 방법이 추가된다면 이 간편 방법도 검사실에서 실제 사용될 수 있을 것으로 생각된다. 전혈을 이용하는 방법이 표준법을 대체하지는 못하더라도, 최소한 불가피하게 림프구외 다른 혈구가 혼입된 경우 차선책으로 적혈구를 용혈시킨다거나, FL2 threshold를 설정하여 fluorescence signal triggering 기법으로 측정하더라도 다른 혈구에 대한 자가항체가 없다는 전제하에 올바른 결과를 얻을 수 있다는 것에 대한 근거 자료가 될 수 있을 것으로 생각된다.

결론적으로, 신장 이식을 위한 FCXM에서 림프구 분리 없이 전혈을 이용한 방법도 표준법과 비교하여 만족할 만한 결과를 보였다. 이 연구는 또한 불가피하게 림프구외 다른 혈구가 혼입된 경우, 본 연구의 변형된 방법으로 측정이 가능하다는 것에 대한 근거가 될 수 있을 것으로 생각된다.

요 약

서론 : 신장 이식을 위한 유세포분석법에 의한 HLA 교차시험(flow cytometry crossmatch, FCXM)에서 공여자 말초혈액에서 분리한 림프구가 사용된다. 본 연구에서는 FCXM에서 림프구 분리 과정 없이 전혈을 이용하는 방법을 시도하여 보았다.

방법 : 신장이식을 위한 T 세포 FCXM에서 20예(양성 5예 포함)를 대상으로, 단핵구를 분리하여 검사하는 방법(표준법)을 기준으로 전혈을 이용한 두 가지 변법을 비교하였다. 전혈을 이용하는 경우, 공여자 전혈과 과량의 수여자 혈청을 반응시킨 후 적혈구를 용혈(전혈용혈법)시키거나, 용혈시키지 않고 fluorescence signal triggering 기법으로 T 세포의 신호를 수집(전혈법)하였다. 결과 판정을 위하여 시험 혈청의 측정치를 음성 대조로 나눈 값, 즉 평균형광강도비(MFI ratio)를 구하였다.

결과 : 표준법, 전혈용혈법, 전혈법에 의한 20예의 MFI 비는 각각 4.9±8.1, 5.4±9.7, 4.8±7.8로, 전혈용혈법과 전혈법 둘 다 표준법과 비교하여 유의한 차이가 없었다(각각 P=0.313, 0.831, paired t-test). 정성 판정은 1예를 제외한 모든 예에서 일치하였다. 불일치한 1예는 전혈용혈법에서만 MFI 비 2.2의 약양성이었다.

결론 : 신장 이식을 위한 FCXM에서 전혈을 이용한 방법은 표준법과 비교하여 만족할 만한 결과를 보였다. 이 연구는 또한 불가피하게 림프구외 다른 혈구가 혼입된 경우, 본 연구의 변형된 방법으로 측정이 가능하다는 것에 대한 근거가 될 수 있을 것으로 생각된다.

참고문헌

1. 대한진단검사의학회(정도관리분과위원회). 제13차 HLA 검사 신빙도 조사분석결과 2004.
2. Hoy T, Garner S, Shenton BK, Bell AE, Lowdell MW, Farrant J, North M, Sewell C. Further clinical applications. In: Ormerod MG, editor. Flow cytometry Third Edition. New York: Oxford University Press, 2000:99-124.
3. Robert AB. Flow Cytometry Crossmatching for solid organ transplantation. In: Darzynkiewicz Z, Robinson JP, et al. eds. Method in cell biology: volume 41 flow cytometry part A. 2nd ed. San Diego: Academic Press, 1994:437-47.
4. von dem Borne AE, Verheugt FW, Oosterhof F, von Riesz E, de la Riviere AB, Engelfriet CP. A simple immunofluorescence test for the detection of platelet antibodies. Br J Haematol 1978;39:195-207.
5. Oh WI, Park MH, Han KS. Detection of serum platelet antibodies using microplate platelet suspension immunofluorescence test. Korean J Clin Pathol 1990;10:403-10. (오원일, 박명희, 한규섭. Microplate를 이용한 면역형광법에 의한 혈청내 혈소판항체 검색. 대한임상병리학회지 1990;10:403-10.)
6. De Caterina M, Grimaldi E, Ungaro B, Fratellanza G, Varriale V, Ciarnelli M, et al. Effect of paraformaldehyde on platelet size and on measurement of surface IgG. Platelets 2002;13:207-12.
7. National Institute for Biological Standards and Control. Platelet immunofluorescence test. http://www.nibsc.ac.uk/aboutus/platelets.asp?id=28
8. Robinson MS, MacKie IJ, Machin SJ, Harrison P. Two colour analysis of reticulated platelets. Clin Lab Haematol 2000;22:211-3.
9. Tait JF, Smith C, Wood BL. Measurement of phosphatidylserine exposure in leukocytes and platelets by whole-blood flow cytometry with annexin V. Blood Cells Mol Dis 1999;25:271-8.
10. Alvarez-Larran A, Jover L, Marin P, Petriz J. A multicolor, no-lyse no-wash assay for the absolute counting of CD34+ cells by flow cytometry. Cytometry 2002;50:249-53.
11. Li N, Goodall AH, Hjemdahl P. Efficient flow cytometric assay for platelet-leukocyte aggregates in whole blood using fluorescence signal triggering. Cytometry 1999;35:154-61.
12. Sigma-Aldrich, Inc. Histopaque-1077 package insert. St. Louis: Sigma-Aldrich Inc.;2003.
13. Robert AB and Howard MG. Clinical utility of flow cytometry in allogeneic transplantation. In: Keren FD, McCoy JP Jr, et al. eds. Flow cytometry in clinical diagnosis. 3rd ed. Chicago: ASCP Press, 2001: 507-41.
14. 김유경, 허운보, 원동일, 서장수. 유세포분석 교차시험에서 양성을 보인 신장이식 예정 환자에서 혈장교환술을 시행한 1예. 대한진단검사의학회지 2004;24(S2):S422.

15. Zhang Q, Liang LW, Gjertson DW, Lassman C, Wilkinson AH, Kendrick E, et al. Development of posttransplant antidonor HLA antibodies is associated with acute humoral rejection and early graft dysfunction. Transplantation 2005;79:591-8.
16. GTI, Inc. Antibody Monitoring System (AMS): HLA Class I/II package insert. Waukesha: GTI, Inc.;2004.
17. Wahrmann M, Exner M, Regele H, Derfler K, Kormoczi GF, Lhotta K, et al. Flow cytometry based detection of HLA alloantibody mediated classical complement activation. J Immunol Methods 2003;275:149-60.
18. Ta M and Scornik JC. Improved flow cytometric detection of donor-specific HLA class II antibodies by heat inactivation. Transplantation 2002;73:1611-4.