

Luminex 단일항원검사법을 이용해 검출한 제공자 특이항체의 신장이식 후 항체매개성 거부반응 발생에 대한 예측도 분석

연세대학교 의과대학 외과학교실¹, 장기이식센터², 진단검사의학과³

주동진^{1,2} · 허규하^{1,2} · 김유선^{1,2} · 윤석준¹ · 김혜진² · 손승숙² · 김현정² · 김순일^{1,2} · 김현숙³ · 김명수^{1,2}

Predictive Value of Donor Specific Antibody Measured by Luminex Single Antigen Assay for Antibody Mediated Rejection after Kidney Transplantation

Dong Jin Joo, M.D.^{1,2}, Kyu Ha Huh, M.D.^{1,2}, Yu Seun Kim, M.D.^{1,2}, Seok Jun Yoon, M.D.¹, Hae-Jin Kim, B.S.², Seung-sook Sohn, B.S.², Hyun Jung Kim, R.N.², Soon Il Kim, M.D.^{1,2}, Hyon-Suk Kim, M.D.³ and Myoung Soo Kim, M.D.^{1,2}

Department of Surgery¹, Research Institute for Transplantation², Department of Laboratory Medicine³, Yonsei University College of Medicine, Seoul, Korea

Background: Luminex panel reactive antibody (PRA) is a method that is well known for its high sensitivity and specificity. By using a single antigen assay, the presence or absence of donor specific antibody (DSA) can be determined and its strength can be quantified in terms of the mean fluorescence intensity (MFI). In this study, we analyzed the correlation between the pre-transplant PRA and DSA measured by the Luminex method and the post-transplant clinical features after kidney transplantation.

Methods: A total of 123 pre-transplant sera samples from kidney transplanted patients were tested. Luminex-PRA identification tests were performed using a Luminex fluoroanalyzer and a LifeCodes class I, II ID Kits. Single antigen assay by the Luminex method was used for detecting DSA and its MFI.

Results: The positive Luminex-PRA group included more highly-sensitized patients such as women, patients with a previously positive lymphocyte cross match test and patients who were undergoing retransplantation. There was no correlation between the acute rejection rate and positive PRA on the Luminex-PRA. However, pretransplant DSA detected by the single antigen assay was significantly associated with episodes of antibody mediated rejection ($P=0.047$, OR=10.2), and DSA with higher MFI values ($MFI \geq 3,000$) was associated with antibody mediated rejection ($P=0.023$).

Conclusions: Although pre-transplant positive PRA was not correlated with acute rejection episodes, the DSA measured by the Luminex single antigen assay seems to have a predictive value for post-transplant antibody mediated rejection.

Key Words: Histocompatibility antigen, Kidney transplantation, Rejection

중심 단어: 조직적합성 항원, 신장이식, 거부반응

서 론

신장이식 시 면역학적 교차 적합 시험에서 양성인 경

우와 이식신장의 초급성 거부반응과는 매우 밀접한 연관성이 있음이 1969년에 처음 밝혀진 이래로 이식 전에 항인간 백혈구 항원 항체(anti-HLA antibodies)를 밝혀내고자 하는 많은 방법이 연구되어 왔다(1-3). 이식 전 수용자의 면역학적 상태 혹은 감각 정도를 측정하는 방법으로 패널 반응성 항체(panel reactive antibody, PRA)법이 주로 사용되어 왔는데, 이러한 이식 전 수용자의 감각 정도는 이식신장 생존율은 물론 급성거부반응의 발생에 영향을 미친다는 것은 이미 널리 알려진 사실이다(4,5). 그러나, PRA 검사와 급성거부반응의 발생과의 관계를 살펴보면, PRA 검사 음성군에서도 급성거부반응이 나타나는

책임저자 : 김명수, 서울시 서대문구 신촌동 134
연세대학교 의과대학 외과학교실, 120-752
Tel: 02-2228-2123, Fax: 02-313-8289
E-mail: ysms91@yuhs.ac

접수일 : 2011년 5월 20일, 심사일 : 2011년 7월 17일
게재승인일 : 2011년 7월 21일

본 논문은 2008-2009년도 연세대학교 장기이식연구소의 연구비(7-2008-0093, 7-2008-0477) 지원으로 이루어졌음.

경우가 발생하는데 기존의 PRA 검사의 급성거부반응에 대한 민감도는 28.5%, 특이도 80%, 정확도 50% 로 보고 되고 있다(6,7). 이는 기존의 PRA 검사가 측정할 수 있는 항원의 개수가 제한이 있기 때문이다.

PRA 검사는 림프구를 이용하는 cell-based 방법과 추출된 항원을 microplate나 bead에 부착하여 혈청 내 항체를 검출하는 solid phase based 방법이 있다. Cell-based 방법인 보체의존성 림프구독성법(complement-dependent cytotoxicity, CDC)을 이용한 PRA 방법은 림프구 패널을 자가 제조하는 경우 HLA 형별을 알고 있는 다수의 림프구 제공자가 필요하고, 패널의 냉동 및 해동 시 세포의 생존도를 유지해야 하는 어려움이 있다. 또한 림프구에 표현된 non-HLA 항원에 의해 비특이적인 반응을 보일 수 있고 검사시간 검사방법과 판독의 표준화가 어려운 단점이 있다. Solid phase-based 방법은 1) microplate에 HLA 항원을 부착하여 효소면역측정법(ELISA)으로 항 HLA 항체를 확인하는 ELISA-PRA, 2) flowbeads를 이용하여 유세포분석기로 검출하는 Flow-PRA, 그리고 3) luminex micobead 를 이용하여 Luminex 장비로 검출하는 Luminex micobead-based array PRA (Luminex-PRA) 등이 있다(8,9). Solid phase-based PRA 방법은 추출한 HLA 항원을 이용하므로 non-HLA 항체에 의한 위양성을 배제할 수 있고, 림프구를 이용한 PRA 방법에 비해 민감도가 높으며, 상품화된 시약을 이용할 수 있는 장점이 있다(7). 최근 anti-HLA antibody screening 을 위해 새로운 Luminex system 을 이용하여 항체를 검출하는 방법이 도입되었는데, 기존에 사용하던 ELISA kit 보다 많은 수의 패널을 사용하기 때문에 항체 검출력이 향상되고 검사 결과의 모호함은 감소하였으며, 기존의 ELISA-PRA 법보다 민감도와 특이도가 높은 것으로 알려져 있다(10,11).

본 연구는 수용자의 이식 전 면역상태 내지는 감각상태의 지표로서 Luminex-PRA identification (ID) 검사와 단일항원검사법(single antigen assay)을 시행한 후 그 결과를 상호 비교하여 이에 따른 급성거부반응의 발생률 및 감각된 환자에 대한 항체 예측률을 후향적으로 비교 분석하고자 하였다.

대상 및 방법

1) 대상환자 및 검체 채취

2006년 3월 8일부터 2007년 3월 28일까지 본원에서 신장이식을 받은 환자는 130예이었다. 이 중 다른 장기와의 동시 이식, 25세 미만의 수용자 및 추적관찰이 되지

않는 환자 7예를 제외한 123예의 환자를 대상으로 하였다. 연구대상군의 이식 시행 전 혈청을 이용하여 Luminex-PRA ID 검사를 시행하고, Luminex-PRA ID 검사에서 class I 또는 class II에서 10% 이상의 양성을 보인 환자들에 대하여 단일항원 PRA검사를 시행하였다. 대상 환자들의 신장 이식 후의 급성 거부반응 발생 및 이식신장의 기능을 후향적으로 의무기록을 통해 확인하였다.

2) 검사 방법

(1) Luminex-PRA identification 검사: Luminex-PRA 검사는 Luminex instrument 를 이용하여 HLA antibody 를 측정하는 방법으로 Luminex fluoroanalyzer (Gen-Probe Inc., San Diego, CA, U.S.A.)를 통해 측정하였다. 50종의 microbead 로 구성되어 있는 LifeCodes Class I ID와 DR/DQ 30종과 DQ 단독 18종의 microbead로 구성되어 있는 LifeCodes Class II ID kits (Tepnel Lifecodes Co., Stamford, CT, USA)를 이용하여 제조회사의 지침에 따라 검사를 시행하였다. 96 well plate의 각 well 에 세척액 40 μ L씩을 분주한 후, 혈청 12.5 μ L와 beads 5 μ L를 분주하였다. 30분간 암실에서 분당 200회로 회전하면서 반응시켰다. Vacuum manifold로 3회 세척 후, 1 : 10 희석된 R-Phycoerythrin (PE)-conjugated goat anti-human IgG 50 μ L를 각 well에 분주하였고 이전과 동일한 방법으로 30분 더 반응시켰다. 세척 후, LABScan100 flow cytometer (Luminex, Austin, TX, USA) 장비에서 Quick-Type Version 2.4 User's Manual RUO 프로그램을 사용하여 결과 값을 얻었다. 각각의 bead 별로 얻어진 MFI (mean fluorescence intensity) 값을 각각의 negative control bead (CON1, CON2, CON3)의 MFI로 나눈 값에 시약회사에서 제공하는 각 bead의 background adjustment factor (BAF)를 빼어 3개의 보정값을 얻고, 각 beads의 MFI 값을 가장 낮은 MFI에 20을 더한 값 (CalcCON)으로 나눈 후 BAF를 빼어 4번째의 보정값을 얻는다. 얻어진 4개의 보정값 중 2개 이상에서 양성수치를 보이는 경우 양성으로 판독하였다. % PRA 값은 양성 반응이 있는 bead의 수를 시약에 구성된 전체 bead 수로 나눈 후 100을 곱하여 산출하였다.

(2) Luminex-PRA 양성 정의: Luminex-PRA ID 검사법에서 양성으로 나타난 bead의 개수를 총 bead의 종류 수로 나눈 후 100을 곱한 값이 10% 이상인 군을 양성으로 정의하고, class I이나 class II 중 어느 한 가지라도 10% 이상의 값을 보이는 경우를 luminex-PRA 양성으로 정의하였고, class I, II 모두 10% 미만인 경우를 음성으로 정의하여 분석을 시행하였다. Luminex-PRA ID 10%

이상인 양성군에 대하여 단일항원검사법을 시행하였다.

(3) 단일항원검사법(single antigen assay, SA-PRA): 단일항원검사법은 상기의 Luminex-PRA ID 방법과 거의 동일하나 96 well plate의 각 well에 beads 40 μ L씩을 분주한 후, 혈청 10 μ L를 분주하는 방법이 추가된 후 30분간 암실에서 분당 200회로 회전하면서 반응시켰다. 이후 결과값을 얻는 방법도 동일하나, 얻어진 결과값으로 제조회사에서 제공하는 판독 프로그램에 의하여 3개의 보정된 값이 구해지는데, 각 bead에서 얻어진 보정값이 시약 제조회사에서 제공하는 양성과 음성을 결정하는 기준이 되는 "Suggested Cutoff" 보다 높은 경우가 보정값 3개 중 2개 이상인 경우 양성으로 판독하였다.

3) 통계

모든 측정치는 평균 \pm 표준편차로 표시하였다. 비교군간의 평균값은 Student's t-test로 차이를 검증하였다. 명목변수의 발생빈도는 Chi-square test 및 Fisher's exact test로 비교 검증하였다. 생존율 분석은 Kaplan Meier 방법을 이용하였다. 모든 통계처리는 SPSS 14.0을 이용하며, 유의수준이 0.05 이하인 경우에 통계학적으로 유의한 것으로 판정하였다.

결 과

1) 이식 전 임상적 특성

대상 환자 123예 중 남자는 81예(65.9%), 여자는 42예(34.1%)였으며, 평균 연령은 41.0 \pm 11.7세였다. 연구 대상군의 제공자는 남자 66예(53.7%), 여자 57예(46.3%)였으며, 제공자의 평균 연령은 40.7 \pm 12.8세였다. 제공-수용자와의 관계에 있어서 생체혈연간 이식이 77예, 생체 비혈연간 이식이 30예, 뇌사자 이식이 16예였다.

수술 전 투석 상태를 보면, 투석 없이 이식을 한 환자는 25예(20.3%), 혈액투석을 받았던 환자는 81예(65.9%)였으며 지속성 복막투석을 받았던 환자들은 17예(13.8%)였다. 재이식은 14예로 11.4%였다. 말기신부전을 유발한 원인 질환 별로 보았을 때, 사구체신염이 24예(19.5%), 당뇨병성 신병증 12예(9.8%), 다낭신 1예(0.8%), 루프스 신염이 1예(0.8%), 조직검사를 시행하지 않은 환자가 83예(67.5%)였으며 기타질환이 2예(1.6%)였다. 이식 전 당뇨가 있었던 환자는 15예(12.2%)였고, 수술 전 B형 간염 항원 양성을 보인 환자는 3예(2.4%)였다.

면역학적 요인을 보았을 때, 혈연간 이식 가운데 HLA A, B, DR이 모두 일치했던 완전일치(identical)가 7예(5.7%), 절반일치(one-haplomatch)가 70예(56.9%)였으

며, 비혈연간 및 뇌사자 신장이식은 46예(37.4%)였다. 혈액형 별로는 ABO 일치(identical)가 95예(77.2%), ABO 적합(compatible)이 28예(22.8%)였다. 이전에 림프구교차반응(lymphocyte cross matching, LCM)에서 양성을 보였던 경우는 14예로 11.4%였다.

면역억제제의 사용을 보면, 76예(61.8%)의 환자에서 유도요법으로 인터루킨-2 수용체 차단제(IL-2 receptor blocker)인 바실릭시맵(basiliximab)을 사용하였다. 주면역억제제는 싸이크로스포린 A 사용이 44예(35.8%), 타크로리무스가 79예(64.2%)이었다. 항증식제를 사용하지 않는 환자는 17예(13.8%)이었고, 마이코페놀리레이트모페틸(mycophenolate mofetil, MMF)을 사용한 환자가 95예(77.2%), 미조리빈(mizoribine)을 사용한 환자는 11예(8.9%)였으며 mTOR (mammalian target of rapamycin) 차단제를 사용한 환자는 12예(9.8%)였다.

2) 이식 후 결과

123예의 연구대상군의 평균 추적기간은 46.8 \pm 8.8개월이었다. 이 중 지연성 신기능회복(delayed graft function, DGF)이 6예(4.9%)에서 발생하였으나 모두 회복하였다. 이식 후 1년 이내 급성거부반응의 발생은 25예(20.3%)의 환자에서 발생하였는데, 임상적으로만 진단된 경우가 9예, 조직검사를 통해 진단된 경우가 16예이었다. 즉, 123예의 환자 중 임상적 거부반응이 7.3%에서, 세포매개성 거부반응이 8.9%, 항체매개성 거부반응이 4.1%로 나타났다. 치료에 있어서는 스테로이드 강타요법만으로 회복된 경우가 20예(80%)였고, 스테로이드 저항성 거부반응으로 추가적인 치료를 한 경우는 5예(20%)였다.

추적기간 중 8예(6.5%)의 이식신장 소실이 발생하였고, 4예(3.3%)의 환자가 사망하였다. 이식신장 소실의 원인을 보면, 급성거부반응이 1예, 비노기 합병증이 1예, 사구체신염의 재발이 1예였으며, 환자의 비순응이 1예, 환자 사망이 4예였다. 사망 환자의 원인을 보면, 감염으로 인한 사망이 1예, 심혈관질환이 2예, 기타 질환으로 인한 사망이 1예였다. 연구 대상군의 이식신장 생존율은 1년 97.6%, 3년 93.5%였으며, 환자 생존율은 1년 98.4%, 3년 96.7%였다.

3) PRA 검사 결과에 따른 이식신장 생존율 및 이식신장 기능의 차이

이식신장의 생존율에 있어서, Luminex-PRA ID 검사결과 양성인 군과 음성인 군에 있어서의 차이는 없었으며, 제공자 특이항체의 유무에 따라서도 유의한 차이를 보이지 않았다(Fig. 1). 시간의 경과에 따른 이식신장의 기능

을 사구체여과율(estimated glomerular filtration rate by MDRD formula, eGFR)로 보았을 때, 이식 후 3개월 이후부터는 조금씩 신장기능이 향상되는 양상을 보였다. 제공자 특이항체가 있었던 군과 제공자 특이항체가 없었던 군의 사구체여과율을 비교하였을 때, PRA 양성을 보였더라도 제공자 특이항체가 없는 군에서는 PRA 음성인 군과 사구체여과율의 차이를 보이지 않았으나 제공자 특이항체 양성이었던 군에서는 이식 후 1주일 경과 시점에서만 사구체 여과율이 유의하게 저하되었다(Fig. 2).

4) PRA 검사 결과에 따른 급성거부반응의 발생빈도

Luminex microbead-based array에 의한 PRA ID 검사

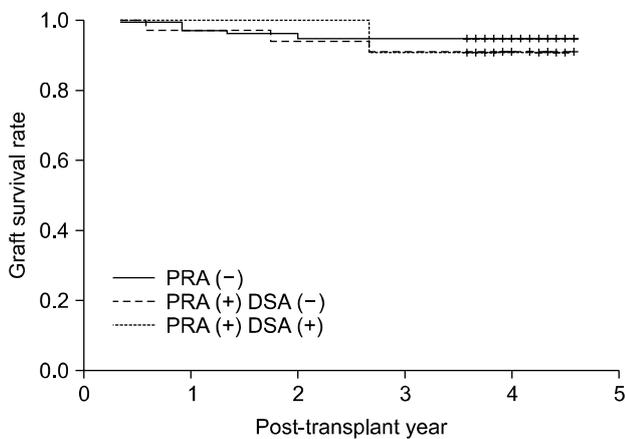


Fig. 1. Graft survival rate according to pre-transplant panel reactive antibody (PRA) and donor specific antibody (DSA). Abbreviations: PRA, panel reactive antibody measured by Luminex-PRA test; DSA, donor specific antibody measured by Luminex-Single antigen PRA test.

결과의 평균값은 class I에서 11.76±23.71% (0-100%), class II에서 11.90±26.16% (0-100%)였다. Class I 에서 양성을 보인 경우는 32예(26.0%)였고, class II 에서는 31 예(25.2%)이었으며 class I 과 II 에서 모두 양성을 보인 경우가 18예(14.6%)였다.

PRA값과 임상적으로 항체 생성의 기회가 많아서 PRA 수치를 높일 수 있는 고감작(highly sensitized) 환자들 즉, 여성환자, 이전에 림프구교차반응에서 양성을 보였던 경우, 과거 이식 병력이 있는 경우에서 그렇지 않았던 군 보다 PRA ID class I 또는 II의 비율이 더 높게 나타났다

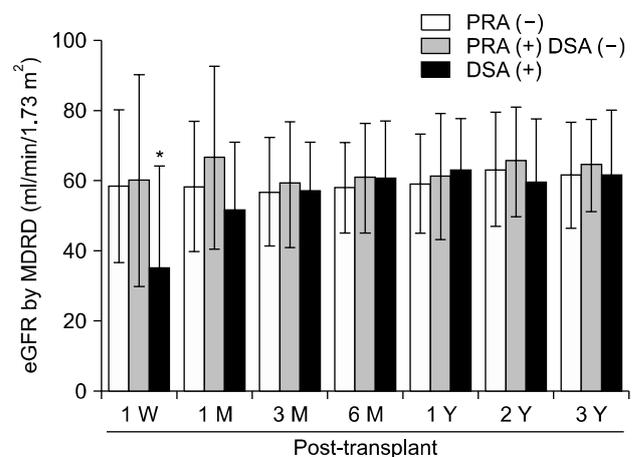


Fig. 2. Post-transplant change of graft function measured by estimated glomerular filtration rate (eGFR, by MDRD formula) according to the pre-transplant panel reactive antibody (PRA) and donor specific antibody (DSA) status. Abbreviations: PRA, panel reactive antibody measured by Luminex-PRA test; DSA, donor specific antibody measured by Luminex-Single antigen PRA test. *P<0.05.

Table 1. Association between clinical factors related with HLA alloimmunization and panel reactive antibody (PRA) results by Luminex method

Clinical factors	Luminex-PRA ID			Pvalue
	I (-) and II (-) (n=78)	I or II (+) (n=27)	I (+) and II (+) (n=18)	
Sex				<0,0001
Female recipients (n=42)	18 (42.9%)	11 (26.2%)	13 (31.0%)	
Male recipients (n=81)	60 (74.1%)	16 (19.8%)	5 (6.2%)	
Previous LCM results				<0,0001
Positive history (n=14)	5 (35.7%)	1 (7.1%)	8 (57.1%)	
Negative (n=109)	73 (67.0%)	26 (23.9%)	10 (9.2%)	
Previous transplantation history				0.034
Positive (n=14)	8 (57.1%)	1 (7.1%)	5 (35.7%)	
Negative (n=109)	70 (64.2%)	26 (23.9%)	13 (11.9%)	

Abbreviations: I, class I; II, class II; LCM, lymphocyte cross match, (-) PRA ID <10%, (+) PRA ID ≥10%.

Table 2. Association between acute rejection episodes and panel reactive antibody (PRA) results by Luminex method

Clinical factors	Luminex-PRA ID			P-value*
	I (-) and II (-) (n=78)	I or II (+) (n=27)	I (+) and II (+) (n=18)	
Rejection-free (n=98)	64 (65.3%)	21 (21.4%)	13 (13.3%)	
Clinical rejection [†] (n=9)	4 (44.4%)	2 (22.2%)	3 (33.3%)	0.201
Pathologic rejection, cell-mediated (n=11)	7 (63.6%)	4 (36.4%)	0 (-)	0.340
Pathologic rejection, antibody-mediated (n=5)	3 (60.0%)	0 (-)	2 (40.0%)	0.237

Abbreviations: I, class I; II, class II.

*P-value compared with non-rejection group; [†]Clinical rejection: clinically diagnosed (not biopsy-proven).

(-) PRA ID <10%, (+) PRA ID ≥10%

Table 3. Association between acute rejection episodes and pre-transplant donor specific antibody (DSA) status

Clinical factors	DSA (-) (n=112)	DSA (+) (n=11)	P-value*
Rejection-free (n=98)	92 (93.9%)	6 (6.1%)	
Clinical rejection [†] (n=9)	7 (77.8%)	2 (22.2%)	0.135
Pathologic rejection, cell-mediated (n=11)	10 (90.9%)	1 (9.1%)	0.536
Pathologic rejection, antibody-mediated (n=5)	3 (60.0%)	2 (40.0%)	0.047 [†]

Abbreviation: DSA, donor specific antibody measured by Luminex-single antigen assay.

*P-value compared with rejection-free group; [†]Clinical rejection: clinically diagnosed (not biopsy-proven); [†]OR: 10.2, 95% CI: 1.4-73.3.

(Table 1).

이식 후 발생하는 급성 거부반응과의 상관관계를 보았을 때, 조직검사를 시행하지 않고 임상적으로 진단된 거부반응, 조직학적 세포매개성 거부반응, 조직학적 항체매개성 거부반응 군은 거부반응이 없었던 군과 비교하여, class I 및 class II 에서 양성을 보인 환자의 비율에 있어서 통계적으로 유의한 차이를 보이지 않았다(Table 2). 즉, PRA ID 양성과 급성거부반응의 발생간에는 통계적 연관성을 보이지 않았다.

그러나, 단일항원검사법을 통해 밝혀낸 제공자 특이항체와 급성거부반응의 발생과의 연관성을 보았을 때, 제공자 특이항체가 없는 군에 비하여 제공자 특이항체가 있었던 군에서 임상적으로 진단된 급성거부반응 및 조직학적 세포매개성 거부반응의 발생 빈도에는 차이가 없었으나, 조직학적 항체매개성 거부반응의 발생빈도는 유의하게 높게 나타났다($P=0.047$; OR=10.2, 95% CI: 1.4~73.3; Table 3). 단일항원검사법을 통해 측정한 제공자 특이항체에 대한 MFI 값을 3,000을 기준으로 나누어 보

았을 때, 거부반응이 없었던 군에 비하여 조직학적 항체매개성 거부반응이 발생하였던 군에서 MFI 3,000 이상인 환자의 비율이 더 높게 나타났다($P=0.023$; Table 4). 임상적으로 진단된 급성거부반응 군과 조직학적 세포매개성 거부반응 군에서는 거부반응이 없었던 군과 비교하여 유의하게 MFI 3,000 이상인 환자의 비율이 높게 나타나지는 않았다.

고 찰

항 HLA 항체에 의한 항체매개성 거부반응의 예방과 조기검출은 이식의 성공을 위해 매우 중요하며, 신장이식 전후 항 HLA 항체의 선별과 동정검사는 초급성 거부반응을 예방하고 특히 항체매개성 거부반응의 조기검출을 위해 반드시 필요한 검사이다(12). 국내에서는 제공자 특이항체 검출을 위해 제공자의 림프구를 이용한 CDC 교차반응과 유세포(flow-cytometry) 교차반응 방법 등이 시행되고 있으며, HLA 항체 검출을 위한 PRA 검사방법으로는 ELISA 방법이 보편적으로 사용되었으나 최근에는 Luminex microbead-based array 방법이 많이 사용되고 있다.

최근 luminex-beads에 HLA 항원을 부착시켜 혈청 내 HLA 항체를 luminex 장비로 검출하는 Luminex-PRA 검사법이 소개되었으며, Luminex-PRA를 HLA 항체 검출을 위한 검사 방법 중 가장 일차적인 방법으로 사용할 것을 제안한 보고도 있다(11). Luminex-PRA 검사법의 원리는 검사에 사용되는 개개 bead의 형광강도수준(fluorescence intensity level)이 달라 각기 다른 bead를 구분할 수 있다. 또한 각각의 bead 표면에는 분석하고자 하는 HLA 항원이 부착되어 있어, 여기에 반응할 수 있는 HLA 항체를 항원항체반응을 통해 검출이 가능하다.

기존 연구에 의하면 Luminex-PRA는 Flow PRA와 비

Table 4. Association between acute rejection episodes and strength (MFI values) of donor specific antibody which was measured by single antigen assay

Clinical factors	DSA(-) by SA-PRA	DSA (+) by SA-PRA		P-value*
		MFI < 3000	MFI ≥ 3,000	
Total number	112	6	5	
Rejection-free (n=98)	92 (93.9%)	3 (3.1%)	3 (3.1%)	
Clinical rejection [†] (n=9)	7 (77.8%)	2 (22.2%)	0 (-)	0.073
Pathologic rejection, cell-mediated (n=11)	10 (90.9%)	1 (9.1%)	0 (-)	0.536
Pathologic rejection, antibody-mediated (n=5)	3 (60.0%)	0 (-)	2 (40.0%)	0.023

Abbreviation: MFI, mean fluorescence intensity.

*P-value compared with rejection-free group; [†]Clinical rejection: clinically diagnosed (not biopsy-proven).

교할 만한 민감도를 가지고 있고 검사자가 사용하기에 편리하며 Flow PRA에 비해 검사비용이 저렴하고 데이터 분석 시 좀 더 친숙하게 접근할 수 있는 장점이 있다고 보고하고 있다(11). 또한 Luminex-PRA는 12.5-20 μL 정도의 소량의 시료로도 항체동정검사가 가능한 장점이 있으며, CDC-PRA, ELISA-PRA, Flow-PRA와의 비교 검사에서 민감도가 가장 우수한 방법으로 보고되었다(13). 즉, Luminex-PRA는 민감도가 높아 임상적으로 급성거부반응 발생을 예측하고 조기진단 하는 데 매우 유용하다(13). 실제로 본 연구에서 또한 고감작 위험요소가 있는 환자 들의 분포가 Luminex-PRA class I과 class II 모두에서 양성 을 보인 군에서 더 높게 나타났다. 이는 여성의 경우 임신으로 인한 감작의 가능성, 재이식의 경우 이전 이식 으로 인한 감작의 위험성으로 인해 PRA가 더 높게 나타 날 것으로 예측할 수 있으며 이러한 예측에 잘 부합하는 결과를 보여주었다.

그러나 Luminex-PRA는 ELISA-PRA에 비해 민감도가 높으므로 임상적으로 거부반응을 유발하지 않는 강도가 매우 약한 항체를 위양성으로 보고할 가능성이 있다. 또 한 림프구교차시험 음성인 환자에서 PRA 양성으로 보고 하는 빈도가 증가하여, PRA 양성결과로 인해 고위험군으 로 간주되어 불필요한 치료와 검사를 동반하게 되는 단 점도 예상된다. 국내의 타기관에서 시행한 연구에서 48 예의 신장이식 환자를 대상으로 분석한 Luminex-PRA 검 사 결과는 ELISA-PRA에 비해 민감도가 높은 대신 제공자 비특이 항체도 검출하므로 특이도가 7.7-38.5%로 매우 낮다고 보고하였다(7). 또한 급성거부반응이 있었던 환자 와 없었던 환자에서 PRA 양성률에 유의한 차이가 없어, 선별검사 단독으로는 이식 후 급성거부반응 발생을 예측 할 표지자로서의 임상적 유용성은 낮다고 하겠다. 본 연 구에서도 급성거부반응의 발생과 PRA 양성과의 통계적 유의성은 나타나지 않았다. 따라서 항체 선별검사 후 정

확한 항체동정이 반드시 동반되어야 하겠고, 제공자 특이 항체 양성인 환자의 50% 정도만 급성거부반응과 관련이 있다는 보고가 있으므로(6), 급성거부반응 발생을 유발하 는 제공자 특이항체의 정상과 발생기전에 관한 연구가 지속되어야 할 것이다. 본 연구에서 PRA 양성과 급성거 부반응의 빈도 사이에 유의한 상관관계가 없게 나타난 것은 PRA 양성을 10% 이상으로 낮은 기준을 적용한 것 과도 관련 있을 것으로 생각된다. 본 연구에서 PRA 양성 을 10%로 정의한 것은 대부분의 환자에서 PRA가 30% 미만으로 고감작 환자의 숫자가 적었기 때문이며, 이는 사전에 CDC 방법을 통한 림프구교차반응 검사를 통해 선별이 된 환자를 대상으로 하였기 때문인 것으로 생각 된다. 기본적으로 PRA가 낮은 환자를 대상으로 하였기 때문에, PRA 양성 결과와 급성 거부반응 발생과의 연관 성이 없게 나타났을 것으로 생각해 볼 수 있겠다.

본 연구에서는 단독 항원 검사법을 사용하여 제공자 특이항체의 유무를 확인하였다. 최근 Riethmuller 등(14) 은 이식 수술 전 PRA class I에서 제공자 특이항체를 보 인 경우, 항체매개성 거부반응의 발생빈도가 증가하였고, MFI 900 이상에서는 항체매개성 거부반응 예측에 대한 민감도 75%, 특이도 90%, MFI 5,200 이상에서는 민감도 50%, 특이도 100%라고 보고하였다. 본 연구에서도 제공 자 특이항체가 있는 경우 항체매개성 거부반응의 발생 빈도가 증가하였고, MFI가 3,000 이상인 경우에 그 발생 률이 더 높았다.

본 연구결과 Luminex-PRA 방법은 수용자의 감작정도 를 나타내는 유용한 술전 검사법이나 단독으로는 급성거 부반응의 빈도를 예측할 수 없었다. 그러나 Luminex-PRA 검사와 더불어 단독 항원 PRA 검사법을 동시에 시 행하는 경우에는 급성거부반응 특히 항체매개성 거부반 응과의 상관성을 보여 이식 전 검사법으로서 유용하게 사용할 수 있으리라 생각한다.

결론

Luminex-PRA 검사는 민감도가 높아 HLA 항체에 대한 높은 양성율을 보이거나, 급성 거부반응과 PRA 양성과의 직접적 연관성은 보이지 않는다. 그러나, 단일항원검사법을 통해 검출된 제공자 특이항체는 이식 후 항체매개성 거부반응을 예측할 수 있는 인자가 될 수 있을 것이다.

REFERENCES

- 1) Patel R, Terasaki PI. Significance of the positive cross-match test in kidney transplantation. *N Engl J Med* 1969;280:735-9.
- 2) Tanaka N, Takasugi M, Terasaki PI. Presensitization to transplants detected by cellular immunity tests. *Transplantation* 1971;12:514-8.
- 3) Terasaki PI, Kreisler M, Mickey RM. Presensitization and kidney transplant failures. *Postgrad Med J* 1971; 47:89-100.
- 4) Worthington JE, Thomas AA, Dyer PA, Martin S. Detection of HLA-specific antibodies by PRA-STAT and their association with transplant outcome. *Transplantation* 1998;65:121-5.
- 5) Schonemann C, Groth J, Leverenz S, May G. HLA class I and class II antibodies: monitoring before and after kidney transplantation and their clinical relevance. *Transplantation* 1998;65:1519-23.
- 6) Amico P, Honger G, Mayr M, Steiger J, Hopfer H, Schaub S. Clinical relevance of pretransplant donor-specific HLA antibodies detected by single-antigen flow-beads. *Transplantation* 2009;87:1681-8.
- 7) Jung S, Oh EJ, Yang CW, Ahn WS, Kim Y, Park YJ, et al. Comparative evaluation of ELISA and Luminex panel reactive antibody assays for HLA alloantibody screening. *Korean J Lab Med* 2009;29:473-80. (정선경, 오은지, 양철우, 안웅식, 김용구, 박연준, 등. HLA 동종항체 선별을 위한 ELISA 및 Luminex Panel Reactive Antibody 검사의 비교 평가. 대한진단검사의학회지 2009;29:473-80.)
- 8) Ki CS, Yang YS, Kim DW. Comparison of complement-dependent cytotoxicity, enzyme-linked immunosorbent assay and flow cytometric assay for the detection of HLA class I alloantibodies. *Korean J Clin Pathol* 1998;18:624-9. (기창석, 양윤선, 김대원. HLA Class I 동종항체 선별을 위한 보체의존림프구독성법, 효소면역측정법 및 유세포분석법에 의한 Panel Reactive Antibody 검사법의 비교. 대한임상병리학회지 1998;18:624-9.)
- 9) Oh EJ, Lee J, Yang CW, Moon IS, Park YJ, Han K. Comparison of anti-HLA detecting methods; cytotoxicity, flow cytometric crossmatch, multiple antigen-ELISA, single antigen-ELISA. *J Korean Soc Transplant* 2008;22: 5-91. (오은지, 이제훈, 양철우, 문인성, 박연준, 한경자. 항-HLA 항체 검출을 위한 검사방법의 비교: Cytotoxicity, Flow Cytometric Crossmatch, Multiple Antigen-ELISA, and Single Antigen-ELISA. 대한이식학회지 2008;22:5-91.)
- 10) El-Awar N, Lee J, Terasaki PI. HLA antibody identification with single antigen beads compared to conventional methods. *Hum Immunol* 2005;66:989-97.
- 11) Colombo MB, Haworth SE, Poli F, Nocco A, Puglisi G, Innocente A, et al. Luminex technology for anti-HLA antibody screening: evaluation of performance and of impact on laboratory routine. *Cytometry B Clin Cytom* 2007;72:465-71.
- 12) Oh EJ, Park YJ, Kim JY, Yang CW, Kim DG, Moon IS. Detection of donor specific anti-HLA antibodies using antibody monitoring system. *J Korean Soc Transplant* 2006;20:63-8. (오은지, 박연준, 김진영, 양철우, 김동구, 문인성. Antibody Monitoring System을 이용한 공여자 특이 HLA 항체 검출. 대한이식학회지 2006;20:63-8.)
- 13) Muro M, Llorente S, Marin L, Moya-Quiles MR, Gonzalez-Soriano MJ, Prieto A, et al. Acute vascular rejection mediated by HLA antibodies in a cadaveric kidney recipient: discrepancies between FlowPRA, ELISA and CDC vs luminex screening. *Nephrol Dial Transplant* 2005;20:223-6.
- 14) Riethmuller S, Ferrari-Lacraz S, Muller MK, Raptis DA, Hadaya K, Rusi B, et al. Donor-specific antibody levels and three generations of crossmatches to predict antibody-mediated rejection in kidney transplantation. *Transplantation* 2010;90:160-7.