

유세포검사에 의한 림프구아형검사에서 Gating 시 CD45의 필요성 및 NK세포 측정 시 CD16의 중요성

Flow Cytometric Assays for Lymphocyte Subset Enumeration: CD45 is Inevitable for Lymphocyte Gating and CD16 is Essential for NK Cells

최영현 · 심효은 · 박찬정 · 한상희 · 황금록 · 장성수 · 지현숙

Young-Hyun Choi, M.D., Hyoeun Shim, M.D., Chan-Jeoung Park, M.D., Sang Hee Han, M.T., Keumrock Hwang, M.D., Seongsoo Jang, M.D., Hyun-Sook Chi, M.D.

울산대학교 의과대학 서울아산병원 진단검사의학과

Department of Laboratory Medicine, University of Ulsan College of Medicine and Asan Medical Center, Seoul, Korea

Background: Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) guidelines (H42-A2) recommend the “CD45/SSC” gating method for assays on lymphocyte subset enumeration and CD16 exclusion for assays enumerating NK cells. In contrast, the Flow Cytometry Checklist (06/17/2010) of the College of American Pathology does not recommend a specific lymphocyte gating method, but recommends the correction of lymphocyte subset results for lymphocyte gate purity.

Methods: We compared lymphocyte subset results of EDTA-treated blood from 102 patients with various diseases and 12 normal controls, using 3 lymphocyte gating methods (CD45/SSC, FSC/SSC, and lymphocyte gate purity correction after FSC/SSC gating), and assessed the proportion of CD56-CD16+ NK cells within the total NK cell population.

Results: Lymphocyte gate purity increased as the percentage of lymphocytes increased. However, lymphocyte subsets that consistently showed high lymphocyte gate purity could not be identified. The purity of the T cell population differed significantly depending on the gating method used: CD45/SSC vs. FSC/SSC, $P=0.027$; CD45/SSC vs. gate purity correction after FSC/SSC, $P=0.002$. However, the lymphocyte gate purity correction after FSC/SSC gating did not significantly improve the accuracy of the lymphocyte subset enumeration assay using FSC/SSC gating. The subset of CD56-CD16+ NK cells, constituted an average of 17.1% of total NK cells. Patients had higher proportions of CD56-CD16+ NK cells (13.1-25.5%) than did the normal controls (9.52%).

Conclusions: In flow cytometric assays to evaluate lymphocytic subsets, the CD45 is inevitable for lymphocyte gating, whereas the measurement of CD16 is essential for the evaluation of NK cell proportions.

Key Words: Flow cytometry, Lymphocyte Gating, CD45, NK cells, CD16

서론

유세포검사에서 특정 세포의 gating은 매우 중요하다. 2007년 5월에 발행된 Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) 가

Corresponding author: Chan-Jeoung Park, MD

Department of Laboratory Medicine, Asan Medical Center,
86 Asanbyeongwon-gil, Songpa-gu, Seoul 138-736, Korea
Tel: +82-2-3010-4508, Fax: +82-2-478-0884, E-mail: cjpark@amc.seoul.kr

Received: March 18, 2012

Revision received: August 24, 2012

Accepted: August 27, 2012

This article is available from <http://www.labmedonline.org>

© 2013, Laboratory Medicine Online

© This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

이드라인에 따르면, CD45 강양성 발현과 낮은 side scatter (SSC)으로 림프구 gating을 하는 방법이 더 많은 림프구를 포함시키고, 림프구 순도(purity)도 올릴 수 있으므로, 다른 백혈구들에 의해 오염되는 것을 교정하는 작업이 필요하지 않다고 하였다[1]. 또한 CLSI 가이드라인에서 NK세포 측정 시 CD56과 CD16을 같이 사용하는 것 보다 CD56를 단독으로 사용할 것을 권장하고 있다. 그 이유로, “CD16+CD56+ NK세포 아형의 강도를 증가시키기 위하여 CD16과 CD56을 한 형광으로 동시에 사용하고 있는데, 충분한 signal to noise 비율을 나타내는 CD56 단클론항체를 사용하면 추가로 CD16을 사용할 필요가 없다. 또한 염색 패널에서 CD16을 제외하는 것은, 림프구 gate 내에 들어올 수도 있는 정상 CD16+ 단구/수지상세포 아형을 NK세포로 부정확하게 측정되는 것을 막을 수 있다”고 설명하고 있다.

오랫동안 사용되고 있던 forward scatter (FSC)/SSC gating법은

아직도 CLSI 가이드라인에서 권장하고 있는 CD45/SSC gating법으로 완벽하게 대체되지 않고 있다[24]. College of American Pathologists (CAP)의 가장 최근 유세포검사 조사에 따르면 572개의 기관 가운데 138개 기관(24.1%, 138/572)에서 아직도 CD45/SSC gating법을 사용하지 않고 있다고 하며, 그 중 33개 기관(23.9%, 33/138)에서 CD45/CD14로 림프구 gate 순도를 측정하여 림프구 순도 결과에 따라 림프구아형 측정치를 교정한다고 하였다[5]. 최근 대한진단검사의학회 정도관리위원회에서 시행하고 있는 유세포검사 질관리 평가[6]에 따르면 14개 기관(30.4%, 14/46)에서 CD45/SSC gating법을 사용하지 않고 있고, 그 중 7개 기관(50.0%, 7/14)에서 림프구 순도로 림프구아형 측정값을 교정하여 결과를 보고하고 있었다. 면역체계가 활성화되어 있거나 혹은 저하되어 있는 바이러스감염이나 비전형감염, 면역억제치료를 받은 사람과 같이 백혈구 수가 감소되어 있는 상황에서는 FSC/SSC gating 단독으로는 정확한 림프구아형검사가 불가능하다.

CAP 유세포검사 체크리스트[7]는 림프구아형검사를 위하여 적절한 gating법을 사용할 것을 제안하면서, gating법을 위하여 빛산란과 형광염색방법을 혼합할 것을 권장하고 있다. 특히 림프구 수가 낮거나 상대적으로 단구수와 과립구수가 높은 검체에서는 림프구 gate를 FSC/SSC 또는 CD45-FITC와 CD14-PE 항체를 사용하여 검증하는 것이 좋다고 하며(FLO.30460), 림프구아형검사 결과를 림프구 gate 순도를 이용하여 적절하게 교정할 것을 권유하고 있다(FLO.30470).

대한진단검사의학회에서 발간한 검사실 심사점검표(2011/01) 유세포검사(60) 문항에 의하면 “림프구아형검사 시에 원하는 세포만을 선택하기 위해 적절한 gating방법이 사용되는가?”(60.602.606)라고 되어 있고, 이하 설명으로 “림프구 선택 시 단구와 과립구의 혼입이 많을 경우에는 ‘forward light scatter와 side light scatter’ 화면에서 gating을 시행하는 것보다 side light scatter와 형광(예, CD45) 염색화면에서 gating을 시행할 경우에 더 도움이 되는 경우가 있다.”라고 제시하고 있다. 또한 다음 문항(60.602.607)에서 “림프구아형 분석결과는 gate purity에 맞추어 적절히 교정되는가?”라고 되어 있고, 이하 설명으로 “비림프구가 5% 이상 gate에 혼입되어 있다면 림프구아형검사 결과를 교정하여야 한다. 교정방법으로는 림프구 인지 시 low side light scatter와 bright CD45 부위를 이용한다. 다른 교정 방법을 이용할 수 있는데 이러한 경우 반드시 기록해 두어야 한다”라고 제시하고 있다.

Bjorkstrom 등[8]은 NK세포를 CD56+CD16-, CD56dimCD16+과 CD56-CD16+의 세 가지 아형으로 나누고, CD56- NK세포가 건강한 사람에서는 낮지만, 만성적으로 제1형 사람면역결핍바이러스와 C형 간염바이러스에 감염된 사람에서는 그 수치가 상승한다고 하였다. 또한 CD56- NK세포가 제1형 사람면역결핍바이러스의 복

제를 억제하는데, 이는 CD56- NK세포가 탐식구 염증 단백질(macrophage inflammatory protein, MIP)-1 α , MIP-1 β 와 RANTES 등의 케모카인(chemokine)을 생산하여 이들이 CC-케모카인 수용체5와 결합하여 제1형 사람면역결핍바이러스가 CD4+T림프구로 침투하는 것을 억제한다고 하였다. CD56- NK세포의 케모카인 생산과 병적상태에서 그 수가 증가하는 것을 고려할 때, NK세포 측정 시 CD56만 사용할 것을 권고하는 CLSI 가이드라인에 의문을 갖게 되었다.

본 연구는 정확한 림프구아형검사를 위한 gating법을 확정하고, NK세포 측정 시 CD16의 필요성을 평가하기 위하여, 세 가지 gating법(CD45/SSC gating, FSC/SSC gating과 FSC/SSC gating 후 림프구 gate 순도로 교정)으로 얻은 림프구아형검사 결과를 비교하였고, 정상 및 환자군에서 총 NK세포에서의 CD56-CD16+ NK세포 아형의 비율을 분석하였다.

대상 및 방법

1. 검체

102명의 환자(바이러스감염 환자 25명, 급성골수성백혈병 환자로 항암화학치료 후 추적관찰 중인 환자 14명, 급성림프모구백혈병 환자로 항암화학치료 후 추적관찰 중인 환자 10명, 재생불량빈혈 환자 12명, 암환자 12명, 간경화 환자 11명, 골수형성이상증후군 환자 10명)의 EDTA 혈액(혈구검사 후 잔여검체)과 12명의 정상인(20대, 30대, 40대, 50대, 60대, 70대 이상 각 연령군의 남녀 각 1명씩, 22-81세)으로부터 채취한 EDTA 혈액을 검체로 유세포검시기(flow cytometer, FACSCanto[®] instrument, FACS Diva[®] software, Becton-Dickinson Inc., San Jose, CA, USA)를 사용하여 림프구아형검사(T세포, 보조 T세포[Th], 억제 T세포[Tc], B세포, NK세포), 림프구 gate 순도 측정 및 NK세포아형검사를 실시하였다.

2. 유세포검사

림프구아형검사를 위하여 CD3-FITC/CD56+CD16-PE/CD45-PerCP-Cy5.5/CD4-PE-Cy7/CD19-APC/CD8-APC-Cy7 패널(BD Multitest 6-color TBNK Reagent[®], Becton-Dickinson Inc.)을 사용하였고, 림프구 gate 순도 분석을 위하여 CD45-FITC/CD14-PE 패널을 사용하였다(Fig. 1). NK세포아형 측정을 위하여 CD56-FITC/CD16-PE/CD3-PerCP/CD45-APC 패널을 사용하였다(Fig. 2). 모든 단클론항체들은 Becton-Dickinson사로부터 구입하였다.

50 μ L의 EDTA 혈액과 20 μ L의 형광을 결합한 단클론항체를 혼합하여 상온의 어두운 곳에서 15분간 보온한 다음, 450 μ L의 FACS Lysing Solution (Becton-Dickinson Inc.)과 혼합하고, 다시 상온의 어두운 곳에서 15분간 보온하였다. 이 후 바로 유세포검시기로 튜

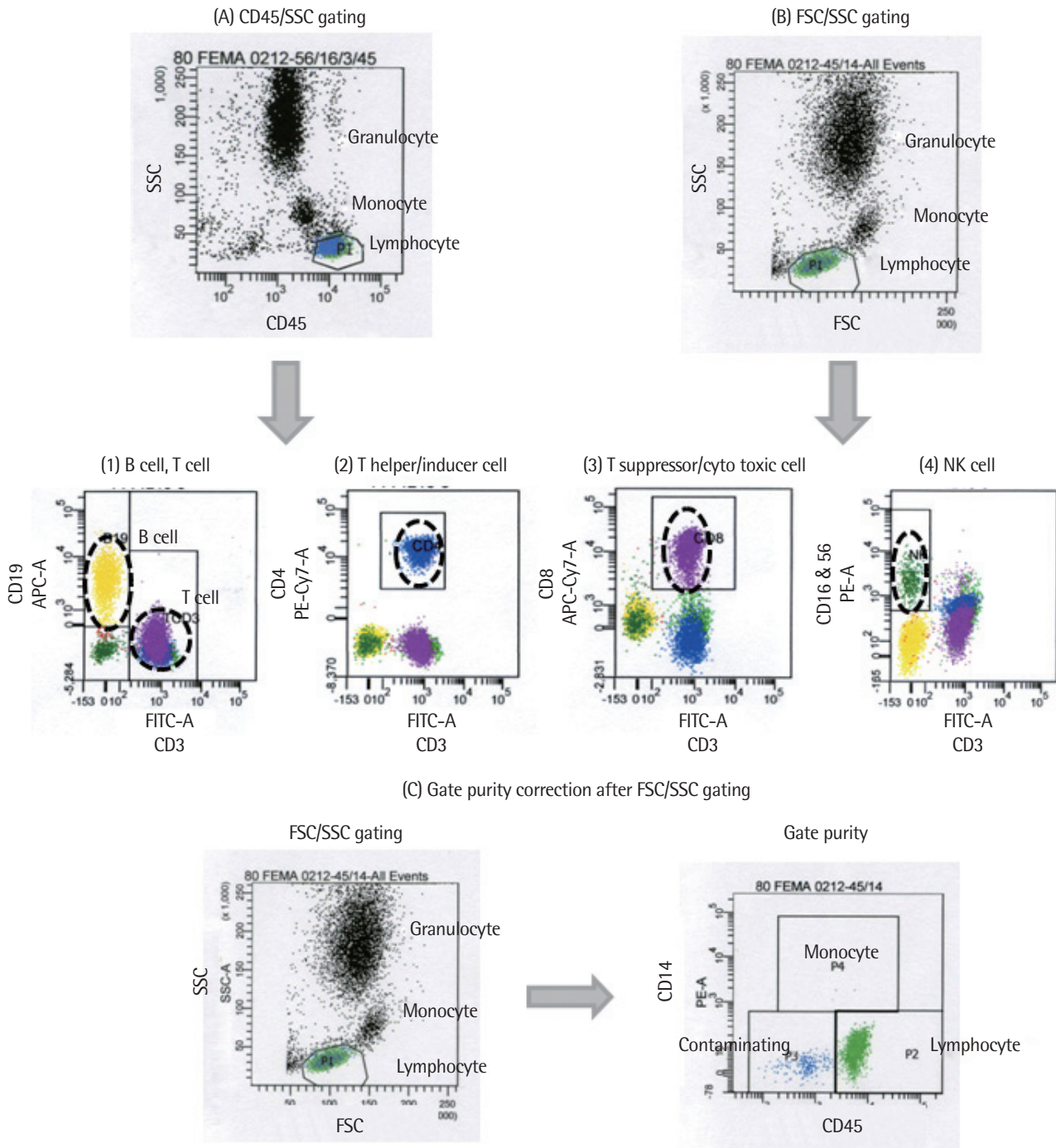


Fig. 1. Assay for enumerating the lymphocyte subset using 3 different gating methods. (A) CD45/SSC gating. (B) FSC/SSC gating. (C) Gate purity correction after FSC/SSC gating. The corrected lymphocyte subset (%) was calculated using the following formulae: *Gate purity (%) = CD45(+) bright/CD14(-) mononuclear cells (%) among lymphocytes by using FSC/SSC gating.

*Corrected lymphocyte subset result (%) = $\frac{\text{Lymphocyte subset result from FSC/SSC gating (\%)}}{\text{Gate purity (\%)}} \times 100$

브당 20,000개의 세포를 획득하여 분석하였다.

림프구 gate 순도(purity)[9]는, CD45/SSC gating법의 경우 CD45/SSC gating한 다음 CD45+CD14- 영역에 들어오는 세포의 비율로 정의하였고, FSC/SSC gating법의 경우 FSC/SSC gating한 다음

CD45+CD14- 영역에 들어오는 세포의 비율로 정의하였다. Gate 순도 교정을 위하여, FSC/SSC gating법의 결과를 림프구 gate 순도로 나누어 구하였다. 세 가지 gating법(CD45/SSC gating법[기준법], FSC/SSC gating법, FSC/SSC gating 후 림프구 gate 순도로 교정)에

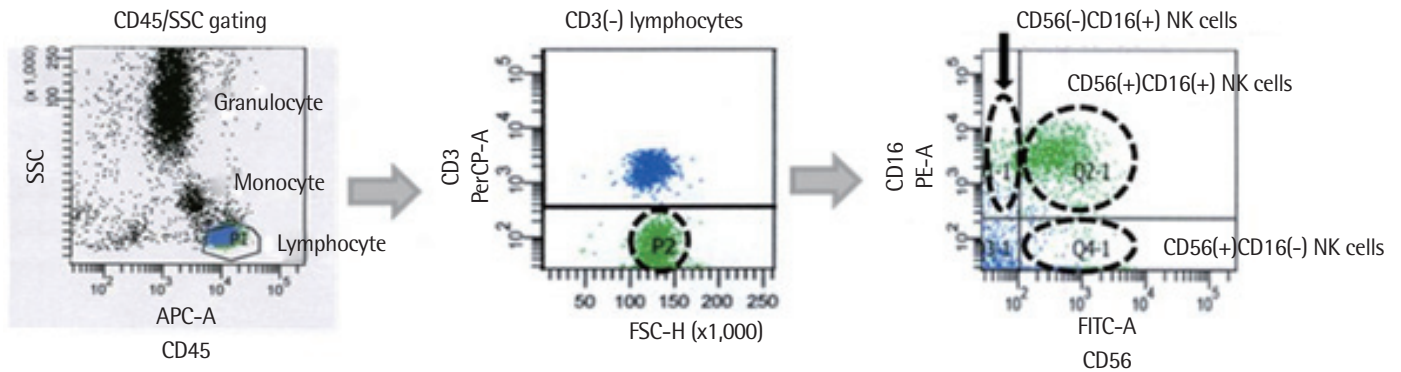


Fig. 2. Evaluation of NK cell subset by using CD16 and/or CD56 expression.

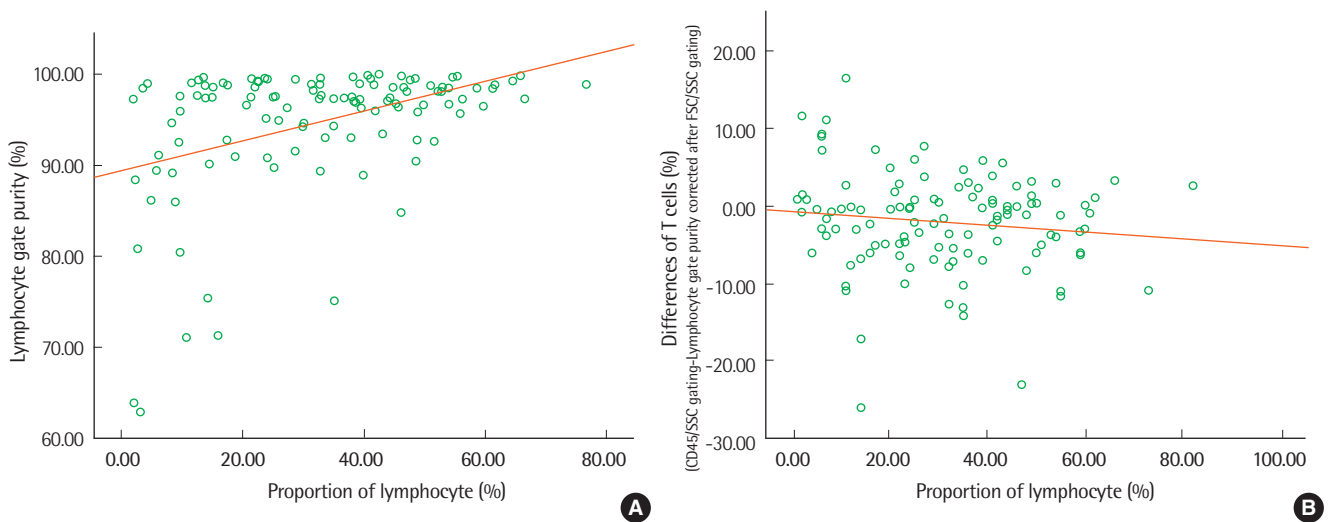


Fig. 3. (A) Correlation between the proportion of lymphocytes and lymphocyte gate purities ($r=0.400$, $P<0.001$). (B) Correlation between the proportion of lymphocytes and the differences in T cell values analyzed using CD45/SSC gating and lymphocyte gate purity correction after FSC/SSC gating ($r=-0.133$, $P=0.115$).

의한 림프구아형검사 결과를 비교하였다(Fig. 1).

총 NK세포 가운데 CD56-CD16+ NK세포아형의 비율은 CD45/SSC gating법을 사용한 다음, CD3- 림프구로 다시 gating을 하여 CD56과 CD16 scattergram을 이용하여 분석하였다(Fig. 2).

백혈구수와 백혈구감별계산은 자동혈구측정기(automatic hematology analyzer, XE-2100®, Sysmex Inc., Kobe, Japan)로 측정하였다.

3. 통계분석

모든 통계분석은 SPSS 18.0 소프트웨어(SPSS, Chicago, IL, USA)를 사용하였다. 림프구 gate 순도와 림프구백분율 또는 림프구 gate 순도와 림프구수 사이의 상관관계, 세 가지 gating법에 따른 림프구아형검사의 결과 간 상관관계는 Pearson's test로 평가하였고, 세 가지 gating법에 따른 림프구아형검사 결과의 각 gating법 간 차이는 Student *t*-test로 평가하였으며, NK세포아형의 분포에

있어서 정상 대조군과 질환군의 통계분석은 Mann-Whitney test로 평가하였다. *P*값이 0.05보다 작을 때 통계적으로 유의한 것으로 간주하였다.

결 과

1. 림프구 gate 순도와 림프구백분율 또는 림프구수와의 상관관계

CD45/SSC와 FSC/SSC gating법에 의한 림프구 gate 순도의 평균은 각각 99.1% (표준편차, 2.1%; 중앙값, 99.7%; 범위, 92.3-100%), 94.6% (표준편차, 7.2%; 중앙값, 97.3%; 범위, 71.1-99.5%)였다.

FSC/SSC gating 후 림프구 gate 순도와 림프구백분율, 림프구 gate 순도와 림프구수와의 상관관계는 각각 $r=0.400$ ($P<0.001$), $r=0.229$ ($P=0.014$)였다. 림프구 gate 순도는 림프구백분율 또는 림프구수가 증가할수록 높아졌다(Fig. 3A).

Table 1. Percentages of lymphocytic subsets calculated using 3 different lymphocyte gating methods (N=114)

Lymphocyte subsets	Correlations (r)*		Differences	
	A versus B	A versus C	A - B	A - C
			Mean \pm SD Median (range) P value	Mean \pm SD Median (range) P value
T cells	0.938	0.981	4.84 \pm 5.88 3.35 (-17.0-26.0) 0.027	2.09 \pm 6.35 1.18 (-11.6-26.0) 0.002
T helper/ inducer cells	0.976	0.995	1.91 \pm 3.71 0.80 (-13.3-19.6) 0.377	0.56 \pm 4.09, 0.15 (-18.1-17.2) 0.158
T suppressor/ cytotoxic cells	0.971	0.993	2.19 \pm 4.33 1.45 (-9.0-16.9) 0.351	0.61 \pm 4.82, 0.08 (-16.1-26.4) 0.270
B cells	0.893	0.897	-0.25 \pm 3.05 0.00 (-8.3-15.8) 0.850	-0.58 \pm 3.04 -0.04 (-15.1-13.9) 0.411
NK cells	0.825	0.821	0.29 \pm 3.14 0.10 (-5.8--19.3) 0.907	0.80 \pm 4.04 0.43 (-15.8-19.3) 0.889

*All, $P < 0.001$.

A, CD45/SSC gating; B, FSC/SSC gating; C, Lymphocyte gate purity correction after FSC/SSC gating

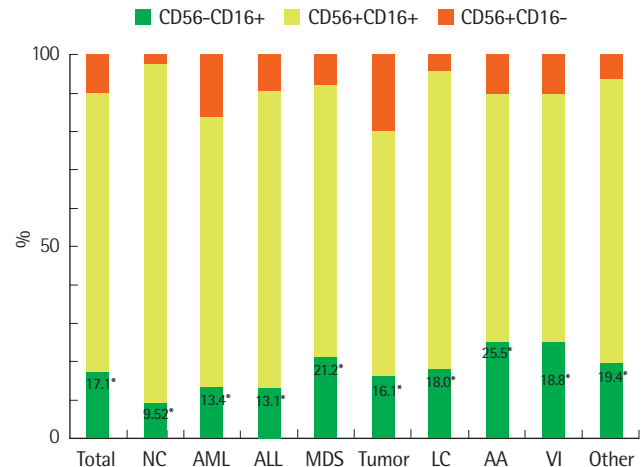
2. 세 가지 gating법에 따른 림프구아형검사 결과의 비교

CD45/SSC gating법과 FSC/SSC gating법의 림프구아형검사 결과 간의 상관관계, CD45/SSC gating법과 FSC/SSC gating 후 gate 순도 교정법의 림프구아형검사 결과 간의 상관관계는, 모두 T세포와 T세포아형에서 높게 나타났고, B세포와 NK세포에서는 상대적으로 낮았으며, 각 gating 간 차이 역시 T세포에서 통계적으로 유의하였고(각각 $P = 0.027$, 0.002), 다른 림프구아형에서는 유의하지 않았다(Table 1).

림프구백분율과, CD45/SSC gating법과 FSC/SSC gating 후 gate 순도로 교정하여 얻은 림프구아형의 결과 차이 간의 상관관계는 유의하지는 않았지만, 림프구백분율이 증가할수록 감소하는 경향을 보였다(T세포 $r = -0.133$ [$P = 0.155$], 보조 T세포 $r = -0.027$ [$P = 0.780$], 억제 T세포 $r = -0.085$ [$P = 0.375$], B세포 $r = -0.157$ [$P = 0.145$], NK세포 $r = -0.070$ [$P = 0.517$])(Fig. 3B). 림프구아형검사 결과값의 분포 역시 림프구백분율이 증가할수록 좁아졌다.

3. 환자 및 정상인에서 CD16 발현에 따른 NK세포아형의 분포

114개의 혈액검체에서 총 NK세포, CD56-CD16+ NK세포아형, CD56+CD16+ NK세포아형, CD56+CD16- NK세포아형의 평균 백분율은 각각 18.1%, 3.2% (NK세포의 17.1%), 13.6% (NK세포의 72.7%), 1.9% (NK세포의 10.2%)였다(Table 2). 정상 대조군과 환자군의 NK세포아형을 비교한 바, CD56-CD16+ NK세포아형이 급성

**Fig. 4.** Distribution of NK cell subsets in patients with various diseases.

*Proportion of NK cells that are CD56-CD16+ NK cells.

Abbreviations: NC, normal control; AML, follow-up of patients with acute myeloid leukemia after chemotherapy; ALL, follow-up of patients with acute lymphoblastic leukemia after chemotherapy; MDS, myelodysplastic syndrome; LC, liver cirrhosis; AA, aplastic anemia; VI, viral infection.

골수성백혈병, 급성림프모구백혈병, 간경변, 재생불량빈혈과 바이러스감염 환자군에서 유의하게 높았다(Table 2). 환자군(13.1-25.5%)은 정상대조군(9.5%)에 비해서 더 높은 비율의 CD56-CD16+ NK세포를 가지고 있었다(Fig. 4). 특히 재생불량빈혈 환자, 골수형성이상증후군 환자, 바이러스감염 환자, 간경변 환자들은 총 NK세포 가운데 CD56-CD16+ NK세포아형이 18.0% 이상을 나타내고 있었다(Fig. 4).

고찰

본 연구에서 CD45/SSC gating법의 림프구 gate 순도 평균이 99.1%여서 CD45/SSC gating법에서는 림프구 gate의 순도 확인이 필요하지 않다고 생각한다. 이점은, CD45/SSC gating법에서 다른 백혈구들에 의한 오염을 막기위하여 림프구아형검사값을 교정하는 것이 필요하지 않다는 CLSI 가이드라인 권고와 일치하였다[1]. 그러나 FSC/SSC gating법을 사용했을 경우, 림프구 gate 순도의 평균이 94.6%였으며 표준편차가 높았고(7.2%) 범위 또한 넓었다(71.1-99.5%). 또한 이 방법을 사용할 경우, 림프구 순도가 림프구 백분율이 높아질수록 높아지는 것을 알 수 있었으나 림프구백분율이 어느 정도일 때 지속적으로 높은 림프구 순도를 나타내는지는 찾을 수 없었다(Fig. 3A).

CD45/SSC gating법과 FSC/SSC gating 후 림프구 gate 순도 교정을 한 방법을 사용한 림프구아형검사 결과 간의 차이와 림프구백분율은 유의한 상관관계를 보이지 않았지만 두 가지 방법을 사용

Table 2. Distribution of NK cell subsets according to disease entity

Age Mean \pm SD Median (range)	No.	NK cell (%) Mean \pm SD Median (range)	CD56-CD16+ (%) Mean \pm SD Median (range)	CD56+CD16+ (%) Mean \pm SD Median (range)	CD56+CD16- (%) Mean \pm SD Median (range)
Total					
40 \pm 19	114	18.1 \pm 16.8	3.2 \pm 3.2	13.6 \pm 13.3	1.9 \pm 4.3
42 (1-81)		13.0 (2.8-98.2)	2.1 (0.0-17.4)	9.3 (0.1-79.2)	0.7 (0.0-35.1)
NC					
52 \pm 19	12	12.6 \pm 7.3	1.2 \pm 1.0	11.1 \pm 6.9	0.3 \pm 0.2
50 (25-81)		11.4 (3.9-26.0)	0.7 (0.3-3.4)	9.6 (3.4-25.4)	0.3 (0.0-0.8)
AML					
45 \pm 13	14	21.6 \pm 22.5	2.9 \pm 2.3*	15.2 \pm 13.4	3.5 \pm 9.2
47 (8-63)		12.2 (3.0-83.7)	2.4 (0.0-7.9)	9.0 (1.4-41.2)	0.6 (0.0-35.1)
ALL					
19 \pm 17	10	29.8 \pm 28.5	3.9 \pm 2.8*	23.1 \pm 23.2	2.8 \pm 3.7*
19 (1-59)		18.9 (4.8-98.2)	2.5 (1.2-8.9)	14.5 (2.2-79.2)	0.9 (0.2-11.2)
MDS					
44 \pm 15	10	11.2 \pm 9.6	2.4 \pm 3.2	8.0 \pm 9.5	0.9 \pm 0.7*
43 (12-63)		7.3 (4.7-35.5)	1.6 (0.4-11.1)	4.1 (0.1-32.3)	0.9 (0.1-2.4)
Tumor					
36 \pm 20	12	14.3 \pm 9.1	2.3 \pm 2.2	9.1 \pm 8.4	2.9 \pm 4.5
38 (5-60)		11.7 (3.6-38.5)	1.7 (0.0-7.9)	6.7 (2.8-33.9)	0.9 (0.0-12.7)
LC					
50 \pm 8	11	20.0 \pm 11.5	3.6 \pm 3.3*	15.5 \pm 11.9	0.9 \pm 0.4*
50 (39-65)		16.3 (7.8-48.4)	2.4 (1.0-11.7)	11.8 (4.2-45.8)	0.8 (0.2-1.4)
AA					
22 \pm 12	12	22.5 \pm 21.1	6.9 \pm 5.1*	17.4 \pm 16.7	2.8 \pm 3.0*
20 (7-49)		14.0 (2.8-66.1)	7.9 (0.6-17.4)	15.6 (1.7-48.1)	2.0 (0.4-10.6)
VI					
48 \pm 14	25	15.4 \pm 6.0	2.9 \pm 1.8*	10.9 \pm 7.5	1.6 \pm 2.8
46 (18-71)		13.1 (11.2-24.2)	3.2 (0.6-4.4)	11.6 (1.1-19.5)	0.3 (0.0-5.8)
Others					
31 \pm 28	8	12.9 \pm 8.6	2.5 \pm 2.0	9.6 \pm 7.4	0.8 \pm 1.1
32 (1-63)		10.1 (5.2-30.9)	1.9 (0.3-5.7)	8.5 (2.3-26.8)	0.5 (0.2-3.5)

* $P < 0.05$, when data of the NK subset from patient groups were compared with those of the normal controls by using the Mann-Whitney test.

Abbreviations: NC, normal control; VI, viral infection; AML, follow-up of patients with acute myeloid leukemia after chemotherapy; ALL, follow-up of acute lymphoblastic leukemia after chemotherapy; MDS, myelodysplastic syndrome; LC, liver cirrhosis; AA, aplastic anemia.

한 림프구아형검사 결과 간의 차이가 림프구백분율이 증가할수록 작아지는 역상관관계를 보였고, 림프구백분율이 증가할수록 림프구아형검사 결과 간 차이의 분포가 좁아지는 경향을 나타내었다 (Fig. 3B). 그러나 림프구백분율이 어느 정도 일 때 지속적으로 두 가지 gating 방법의 림프구아형검사의 결과 간 차이가 낮게 나타나지는 알 수 없었다.

세 가지 다른 gating 방법을 사용한 림프구아형검사 결과 간 상관관계는 T세포에서 높았고, B세포와 NK세포에서는 상대적으로 낮았다 (Table 1). 세 방법을 사용하여 구한 림프구아형검사 결과 간 차이도 T세포에서 통계적으로 유의하였으나, 다른 림프구아형에서는 유의하지 않았다 (Table 2). 이러한 결과는 아마도 T세포와 T세포아형들이 B세포와 NK세포 보다 높은 비율을 차지하고 있었기 때문일 것이다.

NK세포에서의 결과를 제외하고 림프구아형검사 결과 간 상관관계는 CD45/SSC gating법과 FSC/SSC gating 후 gate 순도 교정을 한 방법간의 상관관계가, CD45/SSC gating법과 FSC/SSC gating법 간의 상관관계 보다 조금 더 높았고 (Table 1), 림프구아형검사 결과 간 차이의 P 값은 CD45/SSC gating법과 FSC/SSC gating 후 림프구 gate 순도 교정을 한 방법 간의 차이가 CD45/SSC gating과 FSC/SSC gating법 간의 차이 보다 조금 더 낮았다. 그러나 차이의 평균 값은, B 세포와 NK 세포의 경우 CD45/SSC gating법과 FSC/SSC gating 후 gate 순도 교정을 한 방법 간의 차이가 CD45/SSC gating법과 FSC/SSC gating법 간의 차이 보다 더 컸다. 이와 같은 점을 고려할 때, FSC/SSC gating 후 림프구 gate 순도 교정이 FSC/SSC gating만을 사용하는 경우 보다 림프구아형검사의 정확도를 개선시키지 못한다는 것을 알 수 있었다.

Calvelli 등[9]이 제시한 유세포검사 면역표현형검사 가이드라인은, 림프구 gate 순도 교정은 FSC/SSC gating 후 CD45+CD14- 영역의 세포 백분율(림프구 순도)이 85%를 넘을 때에만 이루어져야 하고, 만약 FSC/SSC gating 후 CD45+CD14- 영역의 세포 백분율이 85%를 넘지 않을 때에는, FSC/SSC gating을 변경하여야 하며, FSC/SSC gating을 변경하여도 CD45+CD14- 영역의 세포 백분율이 85%를 넘지 않을 때에는 동일한 검체를 가지고 다시 검사를 하도록 권장하고 있고, 다시 검사한 경우에도 CD45+CD14- 영역의 세포 백분율이 85%를 넘지 않으면, 검사 결과 산출을 할 수 없다고 하였다.

본 연구는 대한진단검사의학회에서 발간한 검사실 심사점검표(2011/01) 유세포검사 문항(60.602.607) “림프구아형 분석결과는 gate purity에 맞추어 적절히 교정되는가?”에 림프구 순도 교정 시 기준이 없고, 교정하는가에 대한 지침만이 있어서 림프구 순도 85% 이하도 포함하여 분석하였는데, FSC/SSC gating법을 사용한 경우 림프구 순도가 85% 이하(62.9-80.4%)인 경우가 114검체 가운데 7검체(간경변 2예, 급성골수성백혈병, 골수형이상증후군, 급성림프아구백혈병, 재생불량빈혈, 폐암 각 1명씩)에서 관찰되었다. 림프구 순도가 85% 이하인 7검체의 경우, 재 FSC/SSC gating을 하여도 림프구 순도가 85%를 넘지 못하고 유사한 결과를 보였으며, CD45/SSC gating 시에는 모두 85% 이상(85.0-99.7%)의 림프구 순도를 나타내었다. 따라서 림프구 순도가 85% 이하인 경우는 림프구 gating 시 CD45를 사용하지 않으면 검사 결과를 산출할 수 없을 것으로 여겨진다.

크로아티아의 면역감시프로그램을 위한 외부정도관리에서도 림프구 gating을 위하여 사용하던 FSC/SSC gating이 허용 불가능(unacceptable)한 결과를 보였기 때문에, 림프구 gating에 CD45/SSC gating을 채택하였다고 보고하고 있다[3]. 본 연구 결과에서도 FSC/SSC gating법이나 FSC/SSC gating 후 림프구 gate 순도 교정은 더 이상 사용할 수 없으며, CD45가 림프구 gating 시 반드시 필요함을 알 수 있었다. 따라서 CAP 유세포검사 체크리스트와 대한진단검사의학회에서 발간한 검사실 유세포검사 심사점검표 문항(60.602.606)을 아래와 같이 개정되어야 한다고 생각한다. 즉 “림프구아형검사 시 원하고자 하는 세포만을 선택하기 위해 적절한 gating기법이 사용되는가? (림프구 선택 시 단구와 과립구의 혼입이 많을 경우에는 ‘forward light scatter와 side light scatter’ 화면에서 gating을 시행하는 것 보다 side light scatter와 형광예, CD45 염색화면에서 gating을 시행할 경우에 더 도움이 되는 경우가 있다.”를 “림프구아형검사 시 림프구를 선택하기 위하여 side light scatter와 CD45형광염색으로 gating을 시행하는가?”로 바꿀 것을 제안한다. 또한 다음 문항(60.602.607)인 “림프구아형 분석결과는 gating purity에 맞추어 적절히 교정되는가? (비림프구가 5% 이상

gate에 혼입되어 있다면 림프구 아형검사 결과를 교정하여야 한다. 교정방법으로는 림프구 인지 시 ‘low side light scatter와 bright CD45 부위’를 이용한다. 다른 방법을 이용할 수 있는데 이런 경우 반드시 기록해 두어야 한다.”를 삭제하는 것이 바람직하다고 생각한다. 반드시 CD45/SSC gating을 사용하여야 하고 CD45/SSC gating을 사용하면 림프구 gate의 순도가 95% 이상 100%에 가까우므로 gating 순도 교정이 필요 없기 때문이다.

NK세포는 바이러스감염이나 세포의 악성화와 같은 병변에 대하여 초기 방어를 담당하므로 매우 중요한 면역세포이다. NK세포를 세 아형으로 나누는데 세포 용해 기능을 갖고 있는 CD56^{dim}CD16+ NK세포, 사이토카인을 생산하는 CD56+CD16+/- NK세포와 아직까지 정확한 기능이 밝혀지지 않은 CD56-CD16+ NK세포가 있다[8, 10-12]. NK세포아형은 조직의 위치, 비호지킨 B세포 림프종의 종류와 광범위큰B세포 림프종과 난포성 림프종의 임상 단계 등에 따라서 다양하게 존재한다[11]. 또한 NK세포아형은 인종에 따라 서로 달라져서 중국 한족과 코카서스 사람이 흑인에 비하여 세포독성 아형(CD56^{dim}CD16+ NK세포)을 더 높은 비율로 나타내고, 코카서스 사람과 흑인은 사이토카인 생산 아형(CD56+CD16+/- NK세포)을 더 높은 비율로 나타내며, 흑인의 경우 기능이 아직 밝혀지지 않은 아형(CD56-CD16+ NK세포)이 높게 나타난다고 하였다[12].

최근, 만성적으로 제1형 사람면역결핍바이러스 또는 C형 간염바이러스에 감염된 사람의 말초혈액에서 CD56- NK세포가 높게 나타난다고 보고되었으며, 기능평가 결과 CD56- NK세포가 케모카인을 생산함이 밝혀졌는데 이는 직접적으로 항바이러스 기능과 적응(adaptive) 면역반응을 나타냄을 시사하고 있다[8]. 사람면역결핍바이러스감염 환자, 염증성장질환 환자와 건강한 사람들에서 CD56-CD16+ NK세포아형을 포함한 NK세포아형들의 백분율, 절대치와 기능의 차이가 있음이 계속 보고되고 있다[13-16].

본 연구에서 CD56-CD16+ NK세포가 총 NK세포의 평균 17.1%를 차지하였으며, 정상대조군 보다 환자군에서 더 높은 비율을 나타내는 것을 알 수 있었다(Table 2, Fig. 4). 재생불량빈혈환자(25.5%), 골수형이상증후군(21.2%), 바이러스감염 환자(18.8%), 간경화 환자(18.0%)에서 CD56-CD16+ NK세포아형의 백분율이 높게 나타났다. 따라서 CD56-CD16+ NK세포아형의 측정을 환자군에서 간과할 수 없으므로 NK세포 측정 시 CD16이 필요하다고 여겨진다.

CLSI 가이드라인에서 NK세포 측정 시, 림프구 gate 내에 들어올 수도 있는 정상 CD16+ 단구/수지상세포 아형을 NK세포로 부정확하게 측정되는 것을 막기 위하여 CD56과 CD16을 같이 사용하는 것 보다 CD56를 단독으로 사용할 것을 권장하고 있는데, CD45와 SSC 화면에서 림프구를 gate하는 경우에는 단구/수지상세포가 림프구 gate에 들어 오지 않는다고 생각한다. 단구/수지상세포가 림

프구보다 CD45가 약하고 SSC가 높으므로 두 세포군이 구별되기 때문이다. 그러나 본 연구에서 염색 패널에 CD14를 사용하여 CD14 양성 단구/수지상세포가 림프구 gate 안에 들어오지 않았음을 증명하였더라면 좀 더 명확하게 CLSI 가이드라인의 우려를 없앨 수 있었을 것으로 여겨진다.

결론적으로 유세포검사에 의한 림프구아형 측정에서 CD45는 gating 시 반드시 사용되어야 하고, NK세포 측정 시 CD16 사용이 필수적이다.

요 약

배경: Clinical and Laboratory Standards Institute 가이드라인 (H42-A2)에서는 림프구아형분석을 위하여 'CD45/SSC' gating법을 사용하고 NK세포아형 측정 시 CD16를 사용하지 않고 CD56만을 사용할 것을 권장하고 있다. 또한 CAP의 유세포검사 체크리스트에서는 림프구아형검사 시 gating을 위하여 특정한 gating방법의 사용을 권장하지 않고, 단지 gate 순도에 따라 림프구아형검사의 결과를 교정할 것을 권장하고 있다.

방법: 102명의 환자군과 12명의 정상 대조군으로부터 EDTA 혈액을 채취하여 세 가지의 gating법(CD45/SSC, FSC/SSC, FSC/SSC gating 후 gate 순도를 이용한 교정)으로 림프구아형검사를 실시하여 그 결과를 각각 비교하였고, NK세포 가운데 CD56-/CD16+ NK세포아형의 백분율을 평가하였다.

결과: 림프구백분율이 증가할수록 림프구 gate의 순도가 증가하는 것을 알 수 있었으나 높은 림프구 순도를 나타내는 특정한 림프구백분율은 알 수 없었다. T세포의 경우 gating법에 따라 결과가 달라졌는데(CD45/SSC와 FSC/SSC 비교 시 결과값의 차이 $P=0.027$, CD45/SSC와 FSC/SSC gating 후 림프구순도로 교정 비교 시 결과값의 차이 $P=0.002$), FSC/SSC gating 후 림프구순도로 교정하는 방법이 FSC/SSC gating법에 비해 정확도가 증가되지 않았다. CD56-CD16+ NK세포아형은 총 NK세포의 17.1% (평균)를 차지하였으며 환자군(13.1-25.5%)에서 대조군(9.5%) 보다 더 높은 비율을 차지하였다.

결론: 유세포검사에 의한 림프구아형 측정에서 CD45는 gating 시 반드시 사용되어야 하고, NK세포 측정 시 CD16 사용이 필수적이다.

감사의 글

본 연구는 대한진단검사의학회 신임위원회 질향상 연구사업 과제(2010년)로 대한진단검사의학회의 지원을 받은 것임.

참고문헌

1. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Enumeration of Immunologically Defined Cell Populations by Flow Cytometry, Approved Guideline-Second Edition. CLSI document H42-A2, Wayne, NJ, USA: CLSI; 2007, p18, p21-22.
2. Autissier P, Soulas C, Burdo TH, Williams KC. Evaluation of a 12-Color Flow Cytometry Panel to Study Lymphocyte, Monocyte, and Dendritic Cell Subset in Humans. *Cytometry A* 2010;77:410-9.
3. Sifart Z, Paro MM, Sokolić I, Nazor A, Mestrić ZF. External Quality Assessment in Clinical Cell Analysis by Flow Cytometry. Why is It so Important? *Coll Antropol* 2010;34:207-17.
4. Levering WH, van Wieringen WN, Kraan J, Sintnicolaas K, van Rhenen DJ, Gratama JW. Flow Cytometric Lymphocyte Subset Enumeration: 10 Years of External Quality Assessment in the Benelux Countries. *Cytometry B* 2008;74:79-90.
5. 2011 College of American Pathologists. 2011 FL-B Flow Cytometry, Participant Summary of SURVEYS 2011.
6. Flow Cytometry Quality Assurance Program supplied by the Korean Society for Laboratory Medicine. 2011-1 Participant Summary of Flow Cytometry Quality Assurance.
7. CAP (College of American Pathologists). Flow Cytometry Checklist (06/17/2010) FLO.30460, FLO.30470.
8. Björkstén NK, Ljunggren HS, Sandberg JK. CD56 negative NK cells: origin, function, and role in chronic viral disease. *Trends in Immunology* 2011;31(11):401-6.
9. Calvelli T, Denny TN, Paxton H, Gelman R, Kagan J. Guideline for Flow Cytometric Immunophenotyping: a report from the national institute of allergy and infectious diseases, division of AIDS. *Cytometry* 1993;14:702-14.
10. Maria A, Bozzano F, Cantoni C, Moretta L. Revisiting human natural killer cell subset function revealed cytolytic CD56dimCD16+ NK cells as rapid producers of abundant IFN- γ on activation. *PNAS* 2011;108(2):728-32.
11. Gibson SE, Swerdlow SH, Felgar RE. Natural killer cell subsets and natural killer-like T-cell populations in benign and neoplastic B-cell proliferations vary based on clinicopathological features. *Human Pathology* 2011;42:679-87.
12. Feng Y, Zhang R, Zhu H, Peng H, Zhou X, Hong K, Liu J, Chen J, Shao Y. Comparison of the quantities and subset distributions of natural killer cells among different races. *Chin Med J* 2010;123(22):3272-76.
13. Vieillard V, Fausther-Bovendo H, Samri A, Debré P, et al. Specific Phe-

- notypic and Functional Features of Natural Killer Cells From HIV-Infected Long-Term Nonprogressors and HIV Controllers. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2010;53:564-73.
14. Hong HS, Eberhard JM, Keudel P, Bollmann BA, Ahmad F, Ballmaier M, et al. Phenotypically and functionally distinct subsets contribute to the expansion of CD56-/CD16+ natural killer cells in HIV infection. *AIDS* 2010;24:1823-34.
 15. Steel AW, Mela CM, Lindsay JO, Gazzard BG, Goodier MR. Increased proportion of CD16+ NK cells in the colonic lamina propria of inflammatory bowel disease patients, but not after azathioprine treatment. *Aliment Pharmacol Ther* 2011;33:115-26.
 16. Konjević G, Mirjacić Martinović K, Vuletić A, Jurisić V, Spuzić I. Distribution of several activating and inhibitory receptors on CD3-CD16+ NK cells and their correlation with NK cell function in healthy individuals. *J Membr Biol* 2009;230:113-23.