

장기이식 시 유세포분석법에 의한 HLA 교차시험의 양성례 분석

Analysis of Positive Flow Cytometric Crossmatch in Organ Transplantation

이윤수 · 원동일

Yun Soo Lee, Dong Il Won

경북대학교 의학전문대학원 임상병리학교실

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

Background: Pretransplant HLA crossmatch is one of the most important parts in solid organ transplantation. Flow cytometric crossmatch (FCXM) is more sensitive than anti-human globulin enhanced complement dependent lymphocytotoxicity (AHG-CDC) in detecting anti-HLA antibodies. We compared the results of the two methods and analyzed the FCXM-positive cases in various aspects.

Methods: Sera from 212 patients were tested for the detection of anti-HLA antibodies by FCXM and 188 of them were also tested by AHG-CDC assay. The results were analyzed in relation to their histories of pregnancy, transfusion or organ transplantation and also according to the donor-patient relationships. We compared the FCXM results obtained before and after desensitization therapy (using plasmapheresis and anti-CD20 antibody) in 5 sensitized patients.

Results: Concordance of the results between the two methods was 88.8% (167/188). FCXM results correlated with history of pregnancy, but not with that of transfusion. When the patients were divided into 4 groups according to donor-patient relationships, the T cell FCXM mean fluorescence intensity (MFI) ratio (sample/control) was significantly higher in the husband-to-multiparous wife group compared to the other 3 groups (children-to-mother, unrelated donor-to-multipara, and the rests). After desensitization therapy, MFI ratios of T cell FCXM decreased and those of B cell FCXM increased, probably due to rituximab effect, in all 5 patients.

Conclusions: FCXM using a MFI ratio, has a higher sensitivity than AHG-CDC in detection of donor specific antibodies. Also it can be useful in monitoring antibody levels during desensitization therapy.

Key Words: Flow cytometric crossmatch, Anti-HLA antibodies, Organ transplantation

서론

항HLA 항체(anti-HLA antibody)는 수혈, 임신 및 이식 등의 비자가 HLA 항원에 대한 노출에 의해 생성되며, 장기이식 시에 이식 거

Corresponding author: Yun Soo Lee

Department of Clinical Pathology, Kyungpook National University School of Medicine, 200 Dongdeong-ro, Jung-gu, Daegu 700-721, Korea

Tel: +82-53-420-5278, Fax: +82-53-426-3367

E-mail : wormie@lycos.co.kr

Received: June 4, 2010

Revision received: October 4, 2010

Accepted: October 5, 2010

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

© 2011, 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.

부나 실패를 유발할 수 있다[1]. 따라서 수혜자의 혈액 내에 공여자 특이성 항HLA 항체의 존재를 확인하는 HLA 교차시험은 고형장기이식 분야에서 매우 중요한 부분이다[2]. 과거 수십 년 동안 HLA 교차시험에서 보체의존성 림프구독성(complement dependent (lympho)cytotoxicity, CDC) 방법이 사용되었으나, 이는 민감도가 낮은 단점이 있다. 이러한 단점을 보완하기 위해 American Society for Histocompatibility and Immunogenetics (ASHI) 기준에서는 기본적인 CDC 방법에서 항온시간을 연장하거나 항인글로불린을 추가하는 방법(anti-human immunoglobulin-CDC, AHG-CDC) 등의 변형된 CDC 방법이나 유세포분석법(flow cytometric crossmatch, FCXM) 등의 민감도가 높은 방법으로 HLA 교차시험을 시행하도록 권장하고 있다[3].

1983년 Garovoy 등[4]에 의해 처음 소개된 유세포분석법을 이용한 HLA 교차시험은 기존의 CDC 방법보다 최대 50배 민감하여[5] CDC 방법으로 검출하지 못하는 낮은 농도의 항HLA 항체를 검출

할 수 있을 뿐 아니라 별도의 처리없이 급성 및 가속성 거부 반응에 관여하는 IgG isotype의 항HLA 항체만을 검출할 수도 있다. 표지자를 이용하여 T세포와 B세포를 구별하기 때문에 물리적으로 T세포와 B세포를 분리할 필요가 없는 장점이 있으나 유세포분석법을 이용한 B세포의 HLA 교차시험은 종종 위양성을 보이므로 열불활성화(heat inactivation) 혹은 pronase 처리 등의 추가적 처리가 필요한 경우도 있다. 결과 판정 시 평균형광강도(mean fluorescence intensity, MFI) 값을 이용하면 객관적인 판정이 가능하여 유세포분석법을 이용한 HLA 교차시험이 양성인 환자의 이식 전 후에 항HLA 항체의 양을 감시하는 데 도움을 주기도 하며 비교적 빠른 시간 내에 검사가 이루어지므로 신속한 결과를 요하는 뇌사자 장기이식에 도움이 된다[5, 6].

여러 장점들 때문에 국내에서도 점차 유세포분석법을 이용한 HLA 교차시험을 도입하는 검사실이 증가하고 있지만 최근 한 연구[7]를 제외하면 CDC 방법과 유세포분석법 간의 결과에 대한 비교 연구가 보고된 바 없다. 이에 저자는 단일 대학병원 검사실에 의뢰된 HLA 교차시험을 유세포분석법을 이용한 HLA 교차시험과 AHG-CDC 방법 둘 다 시행한 결과 비교와 또한 HLA 항원에 노출된 과거력 유무 및 공여자와 수혜자(환자)의 관계 등의 다양한 임상적 상황에 따른 양성률을 각각 비교 분석하였다. 또한 항HLA 항체 양성 환자에서 혈장교환술, B세포 표면에 존재하는 CD20에 대한 단클론 항체(chimeric murine/human anti-CD20 antibody)인 rituximab 정맥주사 등의 탈감작치료 후 효과 판정에 대한 유세포 분석법을 이용한 HLA 교차시험법의 유용성을 평가하였다.

대상 및 방법

1. 대상

2006년 1월부터 2008년 12월까지 경북대학교병원에서 신장 및 간이식을 위해 HLA 교차시험이 의뢰되었던 환자 169명의 총 212쌍의 공여자-환자 관계를 대상으로 하였고, 반복 검사를 포함해 총 377건의 혈청에 대해 유세포분석법을 이용한 HLA 교차시험을 시행하였다. 그중 352건은 AHG-CDC 방법을 동시에 시행하였다. 결과 분석 시에는 212쌍의 공여자-환자 관계를 대상으로 하여 2회 이상 검사한 경우에는 그중 가장 높은 값을 선택하였다. 대상군은 남자 104명, 여자 108명이었으며, 전체환자의 평균연령(평균±표준편차)은 40.1 ± 12.7 세였고, 남자의 평균연령은 39.1 ± 14.0 세, 여자의 평균연령은 41.1 ± 11.2 세였다. 신장이식을 위해 검사가 의뢰된 경우가 204건, 간이식을 위한 경우가 8건이었고, 이들 중 실제로 이식이 이루어진 경우는 신장이식은 93건, 간이식은 5건이었다. 모든 환자의 의무기록을 조사하여 HLA 항원에 노출 가능한 원인으로 생각되는 수혈, 임신 및 이전 장기이식 여부를 확인하였고 공

여자와 환자의 관계도 검토하였다.

공여자-환자의 관계는 혈연관계가 총 132건으로 그중 형제, 자매간이 47건으로 가장 많았으며, 자녀-모, 모-자녀, 부-자녀, 자녀-부, 3촌 이상의 친족 간의 순으로 각각 31건, 23건, 13건, 10건, 8건이었다. 비혈연 관계는 총 60건이었는데, 그 중 사체이식을 위한 경우가 28건이었다. 20건에서는 환자의 의무기록이 누락되어 관계를 알 수 없었다(Table 1).

2. HLA 교차시험 방법

공여자와 환자의 말초혈액을 헤파린 시험관과 단순 시험관에 각각 채혈하여 각각의 단핵구와 혈청을 얻어 모두 당일에 검사를 끝냈다. 각 검사마다 음성 대조시험관으로 사용할 혈청은 AB형 혈액형을 가지고 있으면서 수혈 경력이 없는 건강한 남성들로부터 얻어 각각 -20°C 에서 냉동 보관해 사용하였다. 양성 대조혈청은 이전에 고농도의 항HLA 항체가 확인된 혈청은 -70°C 에서 보관하다가 중등도 양성 반응이 되도록 희석해서 사용하였다.

1) AHG-CDC 방법

공여자와 환자의 전혈에서 Histopaque-1077 (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA)을 이용하여 단핵구를 분리한 다음 5% HIFCS-RPMI (heat inactivated fetal calf serum-RPMI)로 부유액의 농도가 $2,400-2,500/\mu\text{L}$ 이 되도록 맞추었다. 환자의 혈청을 분리하여 5% HIFCS-RPMI를 사용하여 연속 배수 희석하여 1:1, 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32 희석액을 만들어 Terasaki plate에 각각 $1\mu\text{L}$ 씩 분주하였다. 공여자의 단핵구 부유액을 각각의 well에 $1\mu\text{L}$ 씩 분주하고 60분간 실온에서 항온한 후 5% HIFCS-RPMI로 3회 세척하였다. 1:100으로 희석한 항인글로불린(anti-human kappa chain, Helena Laboratories, Beaumont, USA) $1\mu\text{L}$ 를 넣고 실온에서 2분간 반응시킨 후 $5\mu\text{L}$ 의 토끼 보체(Class I rabbit complement, One Lambda, Canoga Park, USA)를 넣고 실온에서 60분간 반응시켰다. 5% eosin Y를 $2\mu\text{L}$ 넣고 5분간 염색한 후 37% formalin $7\mu\text{L}$ 를 넣어 고정하고 커버

Table 1. Relationships of donor and patient

Relationship (Donor-patient)		N	%
Related	Siblings	47	22.2
	Children-to-mother	31	14.6
	Mother-to-children	23	10.9
	Father-to-children	13	6.1
	Children-to-father	10	4.7
	Others	8	3.8
Unrelated	Living unrelated donors	32	15.1
	Cadaveric donor	28	13.2
Unknown		20	9.4
Total		212	100.0

글라스를 덮은 후 위상차 현미경으로 관찰하였다. 반응의 결과 (score)를 위상차 현미경 하에서 ASHI 기준에 따라 1점(0-10% 세포 독성), 2점(11-20% 세포독성), 4점(21-50% 세포독성), 6점(51-80% 세포독성), 8점(81-100% 세포독성)으로 판정하여 4점 이상을 보인 경우를 양성으로 판정하였다.

2) 유세포분석법을 이용한 T 세포의 HLA 교차시험

Histopaque-1077을 이용해 단핵구를 분리한 다음 부유액의 농도가 3,000/μL가 되도록 RPMI로 희석하였다. 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 글리세롤과 혼합하여 -20℃에서 냉동보관하여 사용하였고 working solution은 글리세롤 혼합 원액과 인산염완충액을 1:20으로 희석하여 사용하였다. T 세포 표지자로는 CD3-PE (DiNona, Seoul, Korea)를 사용하였다. 매 검사 시 음성 대조 혈청과 자가 대조 혈청 및 양성 대조 혈청을 각각 1개씩 사용하였다. 각 시험관에 혈청 100 μL와 단핵구 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. 인산염완충액 2 mL로 1회 세척한 후 인산염완충액 130 μL를 첨가하고 재부유시켜, FACSCalibur (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA)로 측정하여 Cellquest 프로그램으로 수집(acquisition) 및 분석하였다. 결과의 판정은 T 세포를 gating한 다음 anti-IgG FITC 히스토그램에서 검체/대조 평균형광강도 비(sample/control MFI ratio)를 구하여 2.0보다 큰 경우를 양성으로 판정하였다. 대조 평균형광강도는 두 음성 대조 중 큰 수치의 것으로 하였다[8, 9].

3) 유세포분석법을 이용한 B 세포의 HLA 교차시험(열불활성화 방법)

혈청을 반응시키기 전에 56℃에서 30분간 열처리한 다음의 과정은 단핵구 부유액을 40 μL (120,000/tube)씩 분주하는 것과 CD3-PE 대신 B 세포 표지자인 CD19-PE (Becton Dickinson, San Jose,

CA, USA)와 anti-IgG-FITC 희석액을 혼합하는 것을 제외하고는 유세포분석법을 이용한 T 세포의 HLA 교차시험법과 동일하게 하였고, 평균형광강도 비가 3.0보다 큰 경우를 양성으로 판정하였다[8, 9].

3. 탈감작치료 프로토콜

5명의 T 세포 FCXM 양성 환자에서는 성공적인 이식을 위해 탈감작치료 프로토콜(Fig. 1)에 따라 혈장교환술과 rituximab 정맥주사를 병행하면서 HLA 교차시험을 시행하였다. 2명의 환자에게는 5회의 혈장교환술과 1회의 rituximab 정맥주사를 하였고, 3명에게는 5회의 혈장교환술과 2회의 rituximab 정맥주사를 시행하였다. 혈장교환술은 5% 알부민을 치환액으로 하여 회당 1혈장량의 용량으로 시행하였고, rituximab은 회당 375 mg/m²의 용량으로 정맥주사하였다. HLA 교차시험은 AHG-CDC 방법과 유세포분석법을 이용한 HLA 교차시험으로 각각 실시하였다.

4. 통계 분석

통계 프로그램은 SPSS 12.0K for windows (SPSS Inc., Chicago, IL, USA)를 이용하였다. 임신, 수혈 및 성별에 따른 유세포분석법을 이용한 HLA 교차시험 결과 분석은 chi-square test를 사용하였고, 공여자-환자의 관계에 따른 평균형광강도 비의 비교는 ANOVA 분석을 실행한 후 Least significant difference (LSD) 검정으로 사후분석을 실행하였다. $P < 0.05$ 이면 유의한 것으로 판정하였다.

결 과

1. T 세포, B 세포의 유세포분석법을 이용한 HLA 교차시험과 AHG-CDC HLA 교차시험 결과 비교

전체 212건 중에서 유세포분석법을 이용한 T 세포의 HLA 교차시험의 양성 40건이었으며 유세포분석법을 이용한 B 세포의 HLA 교차시험의 양성 26건이었다. 23건에서 T 세포와 B 세포 교차시험 모두 양성이었으며 T 세포 교차시험만 양성인 것이 17건, B 세포 교차시험만 양성인 경우는 3건으로 T 세포 교차시험 단독 양성의 경우가 B 세포 교차시험 단독 양성의 경우보다 많았다. 유

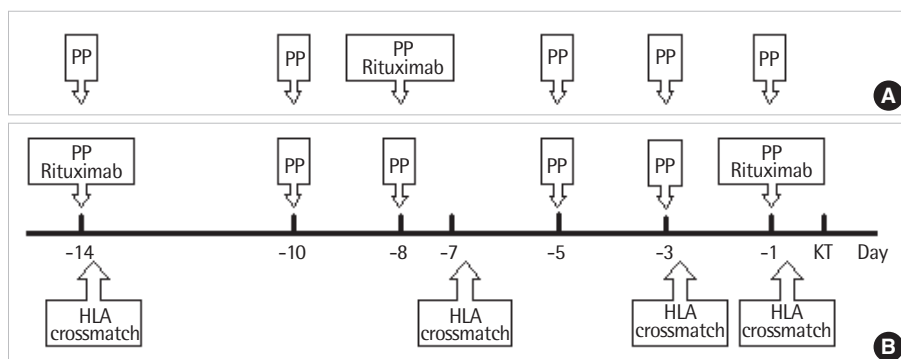


Fig. 1. Desensitization therapy protocols. (A) In patients 1 and 2 of Table 7. (B) In patients 3, 4 and 5 of Table 7. Abbreviations: PP, plasmapheresis; KT, kidney transplantation.

세포분석법을 이용한 B 세포의 HLA 교차시험의 경우는 열처리 여부에 따라 결과의 차이를 보였는데, 열불활성화 방법으로 검사하였을 때 양성 건수가 12건 감소하였다. 188건의 AHG-CDC 교차시험에서 15건이 양성이었다. 그중 14건은 유세포분석법을 이용한 T 세포의 HLA 교차시험이 양성이고 12건은 유세포분석법을 이용한 B 세포의 HLA 교차시험이 양성이었다. AHG-CDC 양성 중 T 세포 FCXM 1건과 B 세포 FCXM 3건이 음성이었었는데 이들은 각각 유세포분석법을 이용한 B, T 세포의 HLA 교차시험이 양성이었다. 유세포분석법을 이용한 교차시험이 양성이나 AHG-CDC이 음성인 경우는 T 세포가 19건, B 세포가 8건이었다(Table 2). AHG-CDC에서는 전체 림프구를 사용하였으므로, 유세포분석법을 이용한 HLA 교차시험에서 T 세포나 B 세포 중 어느 하나만 양성이라도 교차시험 양성으로 보면, 두 방법 간의 일치율은 88.8% (167/188)이었다. 두 방법 간 불일치 결과를 보인 21건은 모두 AHG-CDC는 음성, 유세포분석법을 이용한 HLA 교차시험은 양성이었다.

2. 임신, 수혈 및 장기이식 과거력에 따른 유세포분석법을 이용한 HLA 교차시험 결과 비교

수혈력이 있는 여자 환자군과 수혈력이 없는 여자 환자군에서 임신력은 B 세포 유세포분석법을 이용한 HLA 교차시험 결과와 상관관계가 없는 것으로 나타났으나, T 세포 유세포분석법을 이용한 HLA 교차시험 결과와는 상관관계를 보였다. 모든 여자 환자군에서는 수혈력이 T 세포 및 B 세포 유세포분석법을 이용한 HLA 교

Table 2. Comparison of results between T cell/B cell FCXM and AHG-CDC

FCXM	AHG-CDC			Total
	Positive	Negative	Not tested	
Positive	14/12	19/8	7/6	40/26
Negative	1*/3 [†]	154/165	17/18	172/186
Total	15/15	173/173	24/24	212/212

*positive B cell FCXM; [†] positive T cell FCXM.

Abbreviations: FCXM, flow cytometric crossmatch; AHG-CDC, anti-human immunoglobulin- complement dependent (lympho)cytotoxicity.

Table 3. FCXM results in female patients in relation to pregnancy history: transfusion history (-)/transfusion history (+)/all patients

FCXM		Pregnancy		Total*	P value [†]
		+	-		
T cell	Positive	15/16/31	1/0/1	16/16/32	0.040/0.016/0.002
	Negative	20/19/39	10/8/18	30/27/57	
	Total	35/35/70	11/8/19	46/43/89	
B cell	Positive	9/11/20	0/0/0	9/11/20	0.061/0.066/0.008
	Negative	26/24/50	11/8/19	37/32/69	
	Total	35/35/70	11/8/19	46/43/89	

*excluded 19 cases with pregnancy information missing; [†]Chi-square test.

Abbreviations: See Table 2.

차시험 결과와 상관관계를 나타냈다(Table 3).

수혈력은 임신력 있는 여자 환자군, 임신력 없는 여자 환자군, 모든 여자 환자군 및 남자 환자군에서도 T 세포 및 B 세포 유세포분석법을 이용한 HLA 교차시험 결과와 상관관계가 없는 것으로 나타났다(Tables 4, 5).

이전 이식력이 있었던 경우는 총 8건이었으며, 이 중 T 세포 및 B 세포 유세포분석법을 이용한 HLA 교차시험 양성은 각각 5건, 6건이었다. 이들의 임신력 및 수혈력은 다양하였다(Table 6).

임신, 수혈 및 이식의 기왕력이 없었던 경우 중 T 세포 유세포분석

Table 4. FCXM results in female patients in relation to transfusion history: pregnancy history (-)/pregnancy history (+)/all patients

FCXM		Transfusion		Totala*	P value [†]
		+	-		
T cell	Positive	0/16/16	1/15/16	1/31/32	0.381/0.810/0.812
	Negative	8/19/27	10/20/30	18/39/57	
	Total	8/35/43	11/35/46	19/70/89	
B cell	Positive	0/11/11	0/9/9	0/20/20	-/0.597/0.497
	Negative	8/24/32	11/26/37	19/50/69	
	Total	8/35/43	11/35/46	19/70/89	

*excluded 19 cases with pregnancy information missing; [†]Chi-square test.

Abbreviations: See Table 2.

Table 5. FCXM results in male patients in relation to transfusion history

FCXM		Transfusion		Total	P value*
		+	-		
T cell	Positive	1	2	3	0.563
	Negative	42	59	101	
	Total	43	61	104	
B cell	Positive	1	1	2	0.476
	Negative	42	60	102	
	Total	43	61	104	

*Chi-square test.

Abbreviations: See Table 2.

Table 6. Characteristics of patients who had a history of organ transplantation

Case No.	Transfusion	Pregnancy	Relationship	T cell FCXM	B cell FCXM
1	+	+	Daughter-to-mother	+	+
2	+	Missing	Cadaveric donor	+	+
3	+	Male	Cadaveric donor	+	+
4	-	Missing	Cadaveric donor	+	+
5	-	Male	Mother-to-son	+	+
6	+	+	Sister	-	+
7	+	+	Cadaveric donor	-	-
8	+	Male	Unrelated living donor	-	-
9	-	Male	Brother	-	-

Abbreviations: See Table 2.

석법을 이용한 HLA 교차시험 결과가 양성인 경우가 2건으로, 각각 평균형광강도 비가 2.1, 13.5이었다.

3. 공여자-환자 관계에 따른 유세포분석법을 이용한 HLA 교차시험 평균형광강도 비

임신력이 유세포분석법을 이용한 HLA 교차시험 결과와 상관관계가 있다는 사실을 바탕으로 공여자-환자의 관계를 남편-임신력 있는 부인, 자녀-모, 비혈연-임신력 있는 여자, 기타로 나누었다. 각 군의 T 세포 평균형광강도 비의 평균 \pm 표준편차는 32.9 ± 63.2 , 9.3 ± 14.1 , 3.5 ± 4.0 , 2.4 ± 9.1 이었고, B 세포 평균형광강도 비는 3.9 ± 4.4 , 3.7 ± 3.3 , 1.1 ± 0.6 , 1.4 ± 3.3 이었다. 남편-임신력 있는 부인군의 T 세포평균형광강도 비의 평균은 다른 군과 통계학적으로 유의한 차이가 있었다(Fig. 2).

4. 탈감작치료에 따른 유세포분석법을 이용한 HLA 교차시험 결과 비교

탈감작치료를 시행하였던 5명의 환자 모두에서 치료 후 T 세포

검체/대조 평균형광강도 비가 감소하였으나, B 세포 평균형광강도 비는 모두 증가하였다. 치료 전 AHG-CDC 양성이었던 경우에는 치료 후 음성으로 전환되었다(Table 7).

고 찰

유세포분석법을 이용한 HLA 교차시험 방법은 환자 혈청과 공여자 림프구를 반응시킨 후 측정된 면역글로불린의 형광 수준을 대조 혈청과 공여자 림프구를 반응시켜 측정된 대조 형광 수준과 비교하여 양성 유무를 판정한다. 음성 대조군과 환자의 median channel fluorescence의 차를 구해 결과를 판정하는 channel shift 방법은 검사 시마다 대조 혈청의 background reactivity와 림프구의 항원 표현 정도 및 유세포분석기의 calibration이나 color compensation에 영향을 받기 때문에 값의 차이를 보일 수 있다는 단점이 있다[10]. 본 연구에서는 검체/대조 평균형광강도 비로 결과 판정을 하였는데, 이는 항HLA 항체의 양을 더 잘 반영한다고 한다[8, 9, 11]. 또한, 이식 후 이식 장기의 생존율과도 높은 상관관계를 보

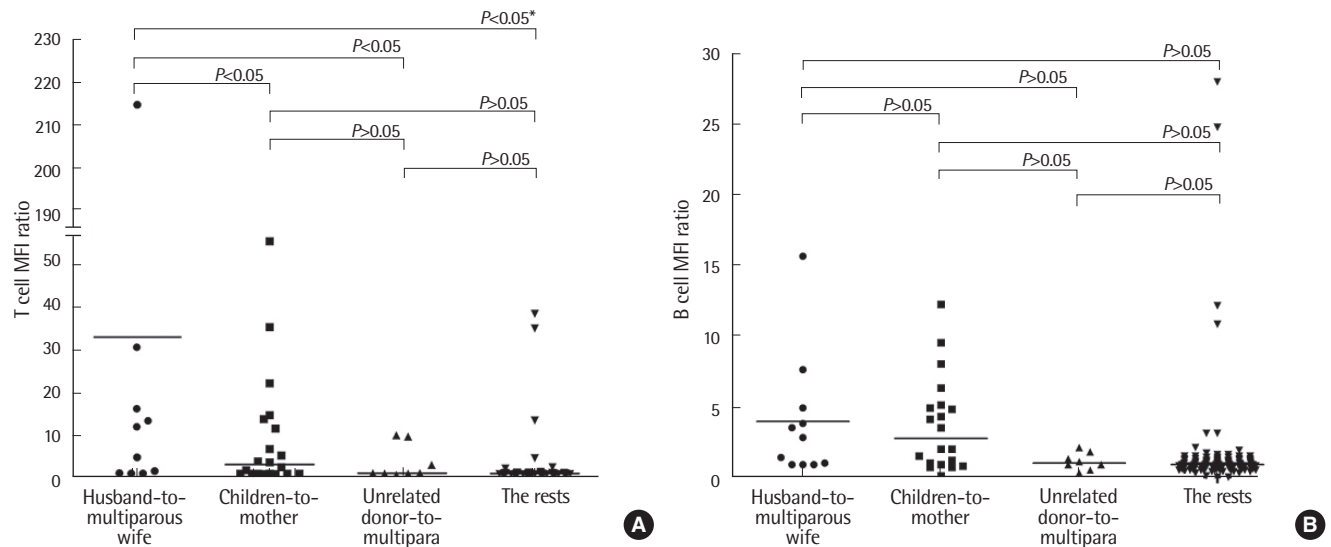


Fig. 2. Distribution of the mean fluorescence intensity (MFI) ratios in each relationship of donor and patient. (A) T cell MFI ratios. (B) B cell MFI ratios. The mean is indicated.

*the ANOVA with a subsequent LSD post hoc test.

Table 7. Changes in MFI ratio in patients who received desensitization therapy

Case No.*	T cell MFI ratio				B cell MFI ratio				AHG-CDC			
	-14D [†]	-7D	-3D	-1D	-14D	-7D	-3D	-1D	-14D	-7D	-3D	-1D
1	3.0	2.6	2.2	2.1	0.9	22.0	26.0	15.0	-	-	-	-
2	6.8	2.4	2.0	1.9	2.0	2.0	14.1	14.0	-	-	-	-
3	9.7	6.5	4.8	5.4	2.1	21.7	5.0	5.5	-	1:1	-	-
4	13.0	2.1	1.6	1.1	7.6	4.4	7.4	15.0	-	-	-	-
5	14.0	4.4	3.8	3.5	1.6	17.0	30.0	21.0	1:2	-	-	-

*protocol (A) of Fig. 1. in patient 1 and 2, (B) in 3, 4 and 5; [†] day before transplantation.

Abbreviations: MFI, mean fluorescence intensity; See Table 2.

인다는 보고도 있다[12].

B세포 교차시험 양성인 경우에는 보고에 따라 다양한 이식 성적을 보이고 있어 아직까지 논란의 대상이 되고 있다[13, 14]. 또한 비특이적인 반응이 많아 열불활성화[9, 15]나 pronase 처리[16, 17, 18] 등의 방법으로 위양성률을 줄일 수 있다는 연구가 많이 보고되고 있다. 본 연구에서도 검사 전 혈청을 56°C에서 30초간 가열하여 혈청 내의 면역복합체를 제거해 B 세포의 Fc 수용체와의 비특이적 결합을 방지하는 열불활성화 방법을 이용하였다. 또한 환자의 자가대조를 이용하여 자가항체로 인해 생길 수 있는 위양성도 줄이고자 하였다. 실제로 본 연구에서 열불활성화 방법을 사용한 결과에서 B 세포 유세포분석법을 이용한 HLA 교차시험 양성 건수가 열처리를 하지 않았을 때보다 12건이 감소하였다. 열처리 여부에 따라 결과가 서로 다른 검체로 효소면역법에 의한 PRA (panel reactive antibody) 동정 검사를 시행한 결과에서 모든 경우에서 공여자 특이성 항HLA 항체가 확인되지 않았다. 따라서, 열처리 후 위양성이 감소한 것으로 사료된다. 그러나, rituximab 정맥주사를 한 환자에서는 오히려 위양성이 증가하였는데, 이는 B세포 표면에 결합된 rituximab의 human Fc portion이 유세포분석기에 의해 측정될 수 있기 때문으로 알려져 있다[19]. 이와 달리 pronase는 Fc 수용체를 제거하는 비특이적인 단백질 분해효소로 작용을 하며, 유사한 구조의 CD20 항원도 같이 제거하므로 pronase 처리를 한 후 B세포 유세포분석법을 이용한 HLA 교차시험을 시행하면 비특이 면역복합체에 의한 위양성뿐 아니라 rituximab에 의한 위양성을 줄일 수 있다는 보고[18]가 있다. 최근, 본 검사실에서도 B세포 유세포분석법을 이용한 HLA 교차시험에서 pronase 처리법을 사용한 결과, 공여자 특이성 항체를 좀더 민감하게 검출하고 rituximab의 영향을 받지 않음을 알 수 있었다.

본 연구의 유세포분석법을 이용한 HLA 교차시험 결과를 분석해 본 결과, 수혈력은 유세포분석법을 이용한 HLA 교차시험 결과에 영향을 미치지 않았으나, 임신력은 수혈력 여부를 구분한 여자 환자군의 B 세포 유세포분석법을 이용한 HLA 교차시험 결과를 제외한 모든 유세포분석법을 이용한 HLA 교차시험 결과에 영향을 주는 것으로 나타났다. 전체 35건의 T 세포 유세포분석법을 이용한 HLA 교차시험 양성 중 32건이 여자 환자에서, 그중 31건이 임신력이 있는 여자환자에서 양성이었다. 22건의 B 세포 유세포분석법을 이용한 HLA 교차시험 양성 중 20건이 여자 환자였으며 모두 임신력이 있었다. 임신 유무를 확인할 수 없었던 19명을 제외한 총 89명의 여자 환자 중 70명이 임신력이 있어 임신 여성의 비율이 높았다. 하지만 대부분의 양성 결과가 임신 여성에서 나타나 임신과 항HLA 항체 형성이 관계가 있을 것으로 생각되며, Triulzi 등도 수혈력보다는 임신의 횟수가 항HLA 항체 형성과 연관이 있을 것이라 보고하였다[20].

공여자-환자 관계 분석 결과에서 남편-임신력 있는 부인, 자녀-모, 비혈연-임신력 있는 여자, 기타 순으로 평균형광강도 비의 평균이 감소하였다. 특히 남편-임신력 있는 부인군에서의 T 세포 유세포분석법을 이용한 HLA 교차시험 평균형광강도 비 평균은 다른 군과 통계적으로 유의한 차이를 보였다. 이는 임신으로 인해 생성되는 항HLA 항체는 태아의 HLA 항원에 대한 특이 항체이므로 공여자가 남편 및 자녀일 경우에 문제가 될 수 있다. 자녀인 경우에는 한 일배체형만 반응하는 반면, 남편이 공여자일 경우에는 남편 HLA 항원의 두 일배체형에 모두 반응하기 때문에 T 세포 유세포분석법을 이용한 HLA 교차시험의 평균형광강도 비가 더 높은 것으로 생각된다. 부부간의 이식에서 남편이 공여자가 되는 경우의 이식 성공률은 부인의 임신력과 관련이 있는 것으로 알려져 있다[21]. Mahanty 등[22]은 자식-부, 자식-모 및 비혈연-임신력 있는 여자 사이의 이식 성공률은 큰 차이를 보이지 않는 것으로 보고하였다. 하지만 모두 공여자가 자식이든 비혈연이든 간에 환자의 임신력이 많은 경우에 이식 성공률이 좋지 않았다. 실제 이식 전 HLA 교차시험 결과가 음성인 경우에도 자식-모, 남편-임신력 있는 부인간의 이식에서 초급성거부반응이 나타난 사례가 보고[23]된 바 있으며, 남편의 HLA class I 항원을 공유한 뇌사자의 신장을 이식받은 후 초급성거부반응이 나타난 사례[24]도 있어, 임신력이 있는 환자의 경우에는 HLA 교차시험 결과 해석에 유의해야 한다.

임신, 수혈 및 이식의 기왕력이 없이 유세포분석법을 이용한 HLA 교차시험 양성 결과를 보인 2건 중 하나는 T 세포 평균형광강도 비가 2.1로 약양성이었고, 다른 하나는 13.5로 높은 수치를 보였다. 항HLA 항체는 HLA 항원에 대한 감각 외의 감염 등에 의해서도 생성될 수 있다는 보고[25]가 있어, 이 2건의 경우 임신, 수혈 및 이식을 제외한 또 다른 감각 원인이 있었을 것으로 생각된다.

HLA 교차시험 양성은 신장이식의 금기로 여겨져 왔으나, 최근에는 공여자 특이성 항체가 존재하는 경우에도 정맥 내 면역글로불린주사와 혈장교환술 및 anti-CD20 antibody (rituximab) 투여 등의 다양한 탈감작치료로 성공적인 신장이식이 이루어지는 경우가 많다[26]. 이러한 탈감작치료의 효과를 판정하기 위해서는 환자의 혈청 내에 존재하는 공여자 특이성 항체의 수준을 정확히 측정하는 것이 중요하다. 본 연구에서 5명의 환자를 대상으로 탈감작치료 후 FCXM을 시행한 결과, 혈장교환술을 시행할 때마다 T 세포 유세포분석법을 이용한 HLA 교차시험의 평균형광강도 비가 감소하였다. B 세포 유세포분석법을 이용한 HLA 교차시험의 평균형광강도 비는 오히려 증가하였는데, 이는 rituximab으로 인한 위양성으로 생각된다. AHG-CDC 방법으로는 탈감작치료에 따른 항HLA 항체의 수준을 평가하기 힘들었으나, T 세포 유세포분석법을 이용한 HLA 교차시험 방법은 치료 시마다 평균형광강도 비가 점차적으로 감소하여 혈중 항체의 역가를 잘 반영함을 알 수 있었다. 따

라서, 유세포분석법을 이용한 HLA 교차시험은 탈감작치료의 효과 판정을 위한 추적 관찰뿐 아니라 이식 후 급성 거부 반응의 예측에도 유용할 것으로 생각된다.

요 약

배경: 장기이식 분야에서 이식 전 HLA 교차시험은 중요한 과정 중 하나이다. 항HLA 항체를 검출하는 방법 중 유세포분석법을 이용한 교차시험(flow cytometric crossmatch, FCXM)은 항인글로불린을 첨가한 보체의존성림프구독성법(anti-human globulin enhanced complement dependent lymphocytotoxicity, AHG-CDC) 보다 더 민감하다고 알려져 있다. 이 연구에서는 이 두 방법의 결과를 비교 검토하고, 유세포분석법을 이용한 교차시험 양성 예를 여러 측면에서 분석해 보고자 하였다.

방법: 212개의 혈청에 대해 AHG-CDC 방법(188건)과 유세포분석법(212건)을 이용한 교차시험 방법을 시행하였다. 각 환자의 임신력, 수혈력 및 이전 이식력뿐 아니라 공여자-환자의 관계도 조사하였다. 감작된 환자 중 5명의 환자에서 혈장교환술과 CD20에 대한 단클론항체를 이용한 탈감작치료 전, 후의 유세포분석법을 이용한 교차시험 결과를 비교하였다.

결과: 두 방법 간의 일치율은 88.8% (167/188)이었다. 임신력은 유세포분석법을 이용한 교차시험 결과와 상관관계가 있었지만, 수혈력은 상관관계가 없었다. 공여자-환자의 관계에 따라 남편-임신력 있는 부인, 자녀-모, 비혈연-임신력 있는 여자, 기타의 4군으로 나누었을 때, 남편-임신력 있는 부인군과 다른 군들간의 T 세포 유세포 분석법을 이용한 교차시험의 검체/대조 평균형광강도 비(mean fluorescence intensity [MFI] ratio)가 통계적으로 유의한 차이를 보였다. 탈감작치료 후 5명의 환자 모두에서 T 세포 평균형광강도 비는 감소하였으나, B 세포 평균형광강도 비는 오히려 증가하였다.

결론: 유세포분석법을 이용한 교차시험은 AHG-CDC 방법보다 예민하게 공여자특이항체(donor specific antibody)를 검출할 수 있고 평균형광강도 비는 HLA 항체의 수준을 잘 반영하므로 탈감작치료 효과판정을 위한 추적 관찰에도 유용하게 사용될 수 있을 것으로 생각된다.

참고문헌

1. Tinckam KJ and Chandraker A. Mechanisms and role of HLA and non-HLA alloantibodies. Clin J Am Soc Nephrol 2006;1:404-14.
2. Han KS, Park MH, et al. eds. Transfusion medicine. 3rd ed. Seoul : Korea Medical Book Publisher, 2006:245-8.
3. Roback JD, Combs MR, et al. eds. Technical manual. 16th ed. Bethesda, Maryland: American Association of Blood Banks, 2008:562-6.
4. Garovoy MR, Rheinschmidt MA, Bigos M, Perkins H, Colombe B, Feduska N, et al. Flow cytometry analysis: a high technology crossmatch technique facilitating transplantation. Transplant Proc 1983;15:1939-44.
5. Hoy T, Garner S, et al. Further clinical applications. In: Ormerod MG, ed. Flow cytometry. 3rd ed. New York: Oxford University Press, 2000: 99-124.
6. 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.
7. Oh EJ, Lee JH, Yang CW, Moon IS, Park YJ, Han KJ. Comparison of anti-HLA detecting methods: cytotoxicity, flow cytometric crossmatch, multiple antigen-ELISA, and single antigen-ELISA. J Korean Soc Transplant 2008;22:85-91.
8. Won DI. Experimental application of whole blood flow cytometry to HLA crossmatch for renal transplantation. Korean J Lab Med 2006;26: 45-51.
9. Ta M and Scornik JC. Improved flow cytometric detection of donor-specific HLA class II antibodies by heat inactivation. Transplantation 2002;73:1611-4.
10. Zachary AA and Leffell MS. Detecting and monitoring human leukocyte antigen-specific antibodies. Hum Immunol 2008;69:591-604.
11. 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.
12. Christiaans MH, Overhof-de Roos F, Nieman F, van Hooff JP, van den Berg-Loonen EM. Donor-specific antibodies after transplantation by flow cytometry: relative change in fluorescence ratio most sensitive risk factor for graft survival. Transplantation 1998;65:427-33.
13. Le Bas-Bernardet S, Hourmant M, Valentin N, Paitier C, Giral-Classe M, Curry S, et al. Identification of the antibodies involved in B-cell crossmatch positivity in renal transplantation. Transplantation 2003;75:477-82.
14. Kotb M, Russell WC, Hathaway DK, Gaber LW, Gaber AO. The use of positive B cell flow cytometry crossmatch in predicting rejection among renal transplant recipients. Clin Transplant 1999;13:83-9.
15. Al-Muzairi IA, Mansour M, Almajed L, Alkanderi N, Alshatti N, Samhan M. Heat inactivation can differentiate between IgG and IgM antibodies in the pretransplant cross match. Transplant Proc 2008;40:2198-9.
16. Vaidya S, Cooper TY, Avandsalehi J, Barnes T, Brooks K, Hymel P, et

- al. Improved flow cytometric detection of HLA alloantibodies using pronase: potential implications in renal transplantation. *Transplantation* 2001;71:422-8.
17. Lobo PI, Isaacs RB, Spencer CE, Pruett TL, Sanfey HA, Sawyer RG, et al. Improved specificity and sensitivity when using pronase-digested lymphocytes to perform flow-cytometric crossmatch prior to renal transplantation. *Transpl Int* 2002;15:563-9.
18. Bearden CM, Agarwal A, Book BK, Sidner RA, Gebel HM, Bray RA, et al. Pronase treatment facilitates alloantibody flow cytometric and cytotoxic crossmatching in the presence of rituximab. *Hum Immunol* 2004; 65:803-9.
19. Book BK, Agarwal A, Milgrom AB, Bearden CM, Sidner RA, Higgins NG, et al. New crossmatch technique eliminates interference by humanized and chimeric monoclonal antibodies. *Transplant Proc* 2005;37: 640-2.
20. Triulzi DJ, Kleinman S, Kakaiya RM, Busch MP, Norris PJ, Steele WR, et al. The effect of previous pregnancy and transfusion on HLA alloimmunization in blood donors: implications for a transfusion-related acute lung injury risk reduction strategy. *Transfusion* 2009;49:1825-35.
21. Bohmig GA, Regele H, Saemann MD, Exner M, Druml W, Kovarik J, et al. Role of humoral immune reactions as target for antirejection therapy in recipients of a spousal-donor kidney graft. *Am J Kidney Dis* 2000;35: 667-73.
22. Mahanty HD, Cherikh WS, Chang GJ, Baxter-Lowe LA, Robert JP. Influence of pretransplant pregnancy on survival of renal allografts from living donors. *Transplantation* 2001;72:228-32.
23. Rosenberg JC, Jones B, Oh H. Accelerated rejection following offspring-to-mother and husband-to-wife transplants. *Clin Transplant* 2004;18: 729-33.
24. Pollack MS, Trimarchi HM, Riley DJ, Casperson PR, Manyari LE, Suki WN. Shared cadaver donor-husband HLA class I mismatches as a risk factor for renal graft rejection in previously pregnant women. *Hum Immunol* 1999;60:1150-5.
25. Vaidya S, Partlow D, Susskind B, Noor M, Barnes T, Gugliuzza K. Prediction of crossmatch outcome of highly sensitized patients by single and/or multiple antigen bead luminex assay. *Transplantation* 2006;82: 1524-8.
26. Magee CC, Mah H, Tinckam K, Wood I, Ji F, Powelson J. Successful living donor kidney transplantation across HLA and ABO incompatibilities. *Nephrol Dial Transplant* 2007;22:602-4.