Effects of Pronase Treatment on Flow Cytometric Crossmatching

Nuri Lee, Ji Won In,
Eun Youn Roh, Sue
Shin, and Eun Young
Song

Department of Laboratory
Medicine, Seoul National
University College of
Medicine, Seoul, Korea

Background: Flow cytometric crossmatching (FCXM) is widely used in hospitals performing solid organ transplantation. Pronase treatment of lymphocytes can increase the sensitivity and specificity of B-cell FCXM. However, it can also affect human leukocyte antigen (HLA) expression and results of FCXM. We treated lymphocytes with various concentrations of pronase and analysed the effect of the treatment on the FCXM results.

Methods: The peripheral blood mononuclear cells isolated from 10 renal transplant donors were treated with three different concentrations of pronase (0.5, 1.0, and 2.0 mg/mL). The effects of pronase on median fluorescence intensity (MFI) values of AB serum (Fcγ receptor), HLA class I and II, and on the MFI ratio of HLA class I and II were analysed.

Results: In B-cell FCXM, the MFI values of AB serum (Fcγ receptor) and HLA class I were significantly decreased by the pronase treatment. The MFI ratio of HLA class II was significantly increased upon treatment with 0.5, 1.0, and 2.0 mg/mL pronase ($P<0.05$, $P<0.01$, and $P<0.01$, respectively). In T-cell FCXM, the MFI ratio of HLA class I was significantly decreased by the pronase treatment (all $P<0.01$).

Conclusions: When performing FCXM, it is recommended that B-lymphocytes should be treated with 1.0 or 2.0 mg/mL pronase. In the case of T-lymphocytes, pronase treatment should be adopted with caution.

(J Lab Med Qual Assur 2016;38:159-163)

Key Words: B-lymphocytes, Pronase, Flow cytometry, crossmatching

Corresponding author:

Eun Young Song

Department of Laboratory
Medicine, Seoul National
University Hospital, Seoul
National University College
of Medicine, 101 Daehak-ro,
Jongno-gu, Seoul 03080, Korea
Tel: +82-2-2072-0197
Fax: +82-2-3672-3337
E-mail: eysong1@snu.ac.kr

pISSN: 2384-2458

eISSN: 2288-7261

Received May 6, 2016, Revision received June 30, 2016, Accepted July 5, 2016

서론

림프구 교차적합시험은 장기이식 또는 조혈모세포 이식 전에 환자의 혈액 내에 공여자의 human leukocyte antigen (HLA) 항원에 특이적으로 반응하는 항체(donor-specific HLA antibody)가 존재하는지 여부를 확인하는 검사이다. 그 중 유세포분석기를 이용하는 유세포분석 교차적합시험(flow cytometric crossmatching, FCXM)은 보체의존세포독성법(complement dependent cytotoxicity)을 이용하는 방법보다 예민도가 우수하고, IgG 항체에 대한 반응을 감별할 수 있어

널리 이용되고 있다[1]. 그러나 FCXM은 상품화된 시약을 이용하는 검사가 아니고 검사방법 및 양성판정기준을 각 검사기관마다 결정하여야 한다. 이에 따라 검사실 간, 검사실 내, 검사자 간, 또 각 검사 수행마다 변이가 발생하는 어려움이 있다. 특히 B 림프구의 교차적합시험은 T 림프구 교차시험과 다르게 여러 자가항체와 B 림프구의 Fcγ receptor로 인해 비특이적인 반응이 일어날 수 있다[2,3]. FCXM 시 B세포의 비특이적 반응을 줄이기 위해 단백분해효소인 pronase로 처리하여 민감도 및 특이도를 향상시킬 수 있음이 보고된 바 있다[2,4]. 그러나 pronase 처리 시 HLA 항원도 같이 약화되어 FCXM

결과에 영향을 미칠 수 있음이 최근 보고되었다[5]. 본 연구에서는 pronase 처리 시 농도에 따라 비특이적인 반응, HLA 항원 발현 및 FCXM 결과에 미치는 영향을 평가하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 대상 및 Pronase 처리

2015년 8월부터 2015년 9월까지 서울대학교병원 진단검사의학과에 신장이식을 위해 FCXM이 의뢰된 환자-공여자 쌍 중 무작위로 10예를 선정하였다. 공여자의 말초혈액에서 Ficoll-Hypaque density gradient 법을 이용하여 단핵세포층을 분리하였다. 공여자 림프구 부유액 1 mL(세포수 3×10^6 개)를 세 가지 최종 농도(0.5, 1.0, 2.0 mg/mL)의 pronase (type XIV; Sigma Chemical, St. Louis, MO, USA)로 37도에서 20분간 처리한 후 0.1% NaN_3 -phosphate-buffered saline으로 2회 세척하였다. 대조군으로는 pronase 처리를 하지 않은 림프구를 사용하였다.

2. 유세포분석

삼색상(three-color) FCXM은 이전에 보고된 방법[2]에 따라 아래와 같이 시행하였다. 세 가지 최종 농도(0.5, 1.0, 2.0 mg/mL)의 pronase로 처리한 림프구 부유액 100 μL (3×10^5 개)에 음성대조(AB형 정상인 혈청, 이하 AB형 혈청; Lorne Laboratories, Twyford, UK)와 환자 혈청을 각각 25 μL 씩 넣고 실온, 암소에서 30분간 반응 후, 3번 세척하였다. Fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated F(ab')₂ anti-human IgG (H+L) (Cat. No. 109-096-003; Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA, USA)와 peridinin-chlorophyll-protein complex (PerCP)-conjugated anti-human CD3 (BD biosciences, San Jose, CA, USA), 그리고 phycoerythrin (PE)-conjugated anti-human CD19 (BD biosciences)를 혼합하고 실온, 암소에서 20분간 반응 후, 3회 세척 후 FACS Canto II Flow Cytometer (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA)로 분석하였다. Pronase 처리에 따른 HLA class I과 class II 항원 발현의 감소를 평가하기 위해 세 가지 최종 농도(0.5, 1.0, 2.0 mg/mL)의 pronase 처리를 마친 림프구 부유액 100 μL (3×10^5 개)에 PerCP-anti-human CD3, PE-anti-human CD19 (BD biosciences), FITC-anti-HLA class I 또는 FITC-anti-HLA class II (BD biosciences)를 2 μL 가하고 실온, 암소에서 20분간 반응 후 분석하였다.

Pronase 처리 농도 차이에 따른 AB형 혈청(Fc γ receptor),

HLA class I, class II 항원 발현의 median fluorescence intensity (MFI) 값을 B 림프구와 T 림프구에서 각각 분석하였다. HLA class I과 class II의 MFI 값을 AB형 혈청의 MFI 값으로 나누어 MFI ratio를 구하였다.

3. 통계분석

각각 다른 pronase 농도로 처리된 림프구의 AB형 혈청(Fc γ receptor), HLA class I, 그리고 HLA class II의 MFI 값, 그리고 HLA class I과 class II 항원 발현의 MFI ratio는 Wilcoxon signed-rank test를 이용하여 분석하였고 $P < 0.05$ 를 통계학적으로 유의한 차이가 있는 것으로 간주하였다. 통계분석은 SPSS ver.12.0 for Windows (SPSS Inc., Chicago, IL, USA)를 이용하였다.

결과

음성대조(AB형 혈청), HLA class I 및 HLA class II의 MFI 값, MFI ratio를 pronase를 처리하지 않은 군과 농도별(0.5 mg/mL, 1.0 mg/mL, 그리고 2.0 mg/mL)로 pronase를 처리한 군을 B 세포 및 T 세포 FCXM에서 각각 비교하였

Fig. 1. Effects of pronase concentration on MFI value of AB serum (ABS, Fc γ receptor), human leukocyte antigen class I, and class II in B-cell flowcytometric crossmatch (n=10). MFI value of AB serum (Fc γ receptor) was significantly decreased after pronase (0.5, 1.0, and 2.0 mg/mL) treatment ($P < 0.05$, $P < 0.001$, $P < 0.001$, respectively). Abbreviation: MFI, median fluorescence intensity.

다. B 세포 FCXM의 경우 AB형 혈청의 MFI 값은 농도별로 pronase를 처리한 경우 처리하지 않은 군에 비해 유의하게 감소하였다(0.5 mg/mL, $P<0.05$; 1.0 mg/mL, $P<0.001$; 2.0 mg/mL, $P<0.001$) (Fig. 1). HLA class I 항원의 발현도 농도별로 pronase를 처리한 경우 처리하지 않은 군에 비해 유의하게 감소하였다(0.5 mg/mL, $P<0.05$; 1.0 mg/mL, $P<0.001$; 2.0 mg/mL, $P<0.001$) (Fig. 1). HLA class II 항원의 발현은 pronase 농도를 다르게 처리한 네 군 간에 유의한 차이를 보이지 않았다(Fig. 1). MFI ratio는 class I의 경우 2.0 mg/mL를 처리한 경우 1.0 mg/mL를 처리한 것에 비해 유의한 증가를 보였다($P<0.05$). Class II의 경우 pronase 0.5, 1.0, 그리고 2.0 mg/mL를 처리한 경우 각각 처리하지 않은 군에 비해 유의한 증가를 보였다(각각 $P<0.05$, $P<0.01$, $P<0.01$, respectively). 또한 pronase 2.0 mg/mL를 처리한 경우에 0.5 mg/mL를 처리한 것에 비해 유의한 증가를 보였다($P<0.01$) (Fig. 2).

T세포 FCXM의 경우 AB형 혈청의 MFI 값은 0.5, 1.0, 그

Fig. 2. Effects of pronase concentration on MFI ratio of HLA class I and class II in B-cell flowcytometric crossmatch (n=10). *P-value for MFI ratio of HLA class I is shown. †P-values for MFI ratio of HLA class II are shown. MFI ratio of HLA class I was significantly increased after 2.0 mg/mL concentration of pronase treatment than 1.0 mg/mL concentration pronase treatment ($P<0.05$). MFI ratio of HLA class II was significantly increased after pronase (0.5, 1.0, and 2.0 mg/mL) treatment ($P<0.05$, $P<0.01$, $P<0.01$, respectively). Abbreviations: MFI, median fluorescence intensity; HLA, human leukocyte antigen.

리고 2.0 mg/mL를 처리한 경우 처리하지 않은 군에 비해 유의한 증가를 보였다(all $P<0.01$) (Fig. 3). HLA class I 항원

Fig. 3. Effects of pronase concentration on MFI value of AB serum (ABS, Fcγ receptor), HLA class I in T-cell flowcytometric crossmatch (n=10). MFI value of human leukocyte antigen class I was significantly decreased after pronase (0.5, 1.0, and 2.0 mg/mL) treatment (all $P<0.01$). Abbreviation: MFI, median fluorescence intensity.

Fig. 4. Effects of pronase concentration on MFI ratio of HLA class I in T-cell flowcytometric crossmatch (n=10). MFI ratio of HLA class I was significantly decreased after pronase (0.5, 1.0, and 2.0 mg/mL) treatment (all $P<0.01$). Abbreviations: MFI, median fluorescence intensity; HLA, human leukocyte antigen.

의 발현은 1.0 그리고 2.0 mg/mL을 처리한 경우 처리하지 않은 군에 비해 유의한 감소를 보였다(all $P < 0.01$) (Fig. 3). MFI ratio는 HLA class I의 경우 pronase 0.5, 1.0, 그리고 2.0 mg/mL을 처리한 경우 각각 처리하지 않은 군에 비해 모두 유의한 감소를 보였다(all $P < 0.01$) (Fig. 4).

고찰

FCXM은 이식 전 공여자특이항체 유무를 평가하기 위해 널리 쓰이고 있으나, 검사방법 및 해석에 있어 표준화가 부족하다[2]. 특히 B 세포 FCXM은 Fcγ receptor로 인한 비특이적인 반응이 문제가 되며 이를 줄이기 위해 pronase 처리를 시행하는 것이 민감도와 특이도를 높이는 것으로 보고된 바 있다[2,6,7]. Vaidya 등[2]의 연구에서 삼색상 FCXM 시행 시 0.5 mg/mL의 pronase 처리를 한 경우 처리하지 않은 경우에 비해 MFI 값이 유의하게 낮아졌고 B 림프구 교차시험의 특이도가 상승하는 것을 보고하였다. 이어 2002년의 Lobo 등[4]의 연구에서도 이색상(two-color) FCXM 시 pronase로 처리한 B 림프구를 사용하면 그렇지 않은 경우보다 높은 민감도와 특이도를 보이며 B 림프구에 특이적인 약한 IgG HLA 항체도 검출이 가능하다고 보고하였다. 하지만 이러한 pronase 처리된 림프구는 HLA 항원도 같이 약화시킬 수 있으며, T 세포 FCXM에서는 오히려 위양성 반응을 보일 수 있다는 문제점이 함께 보고되고 있다[3,5]. 따라서 B 림프구에 대한 비특이반응을 줄이는 효과와 HLA 항원 발현량을 감소시키는 효과를 종합하여 판단하는 것이 중요하다. 본 연구에서 B 세포 FCXM에서 pronase를 사용하는 경우 음성대조(AB형 혈청)에서 MFI 값이 유의한 감소를 보여 비특이반응이 감소하는 것을 확인할 수 있었다. 반면 HLA class I 분자의 발현 MFI 값도 유의하게 감소하여 최종 HLA class I의 MFI ratio는 pronase 사용하는 경우 증가하는 경향을 보였고, pronase 2.0 mg/mL 농도로 처리한 경우 1.0 mg/mL로 처리한 경우보다 통계적으로 유의하게 증가하였다. HLA class II 항원의 경우는 pronase를 사용하여도 항원 발현의 감소가 유의하지 않았고, 이에 따라 MFI ratio는 pronase 사용한 경우 유의한 증가를 보였으며, 0.5 mg/mL을 사용하는 경우보다 1.0 또는 2.0 mg/mL을 사용한 경우 더 유의한 증가를 보였다. 한편 T 세포 FCXM에서는 음성대조(AB형 혈청)의 MFI 값은 오히려 유의한 증가를 보여 비특이반응을 제거하는 효과가 없었고, class I 항원 발현은 pronase를 처리 시 감소하였다. Class I MFI ratio에 대한 효과는 pronase를 처리 시 유의한 감소를 보였다.

종합하면 B 세포 FCXM은 pronase를 처리하는 것이 검사의 민감도를 높이는 것으로 판단되었고, pronase를 1.0 또는

2.0 mg/mL을 사용하는 것이 바람직할 것으로 생각되었다. 반면 T 세포 FCXM은 pronase를 처리하는 것이 검사의 민감도를 낮출 수 있으므로 주의할 필요가 있겠다.

본 연구에서는 사용한 FITC-conjugated F(ab')₂ anti-human IgG는 Fc gamma-specific antibody가 아니고 heavy chain과 light chain에 모두 결합하는 항체이므로 Fc gamma-specific antibody에 비해 MFI 값의 변이를 보는 데 있어 민감도가 다소 낮을 수 있고, pronase를 처리 후 림프구수 감소로 인한 serum/cell ratio의 차이에 대한 평가는 시행하지 못한 한계점이 있다. 향후 이에 대한 추가적인 연구가 시행되어야 할 것으로 생각한다.

검사의 글

본 연구는 Korean Association of Quality Assurance for Clinical Laboratories 연구비 지원(2015-6)에 의해 이루어진 것이다.

REFERENCES

1. Ogura K, Terasaki PI, Johnson C, Mendez R, Rosenthal JT, Ettenger R, et al. The significance of a positive flow cytometry crossmatch test in primary kidney transplantation. *Transplantation* 1993;56:294-8.
2. 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.
3. Park H, Lim YM, Han BY, Hyun J, Song EY, Park MH. Frequent false-positive reactions in pronase-treated T-cell flow cytometric cross-match tests. *Transplant Proc* 2012;44:87-90.
4. 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.
5. Hetrick SJ, Schillinger KP, Zachary AA, Jackson AM. Impact of pronase on flow cytometric crossmatch outcome. *Hum Immunol* 2011;72:330-6.
6. Vaidya S, Cooper TY, Stewart D, Gugliuzza K, Daller J, Bray RA. Pronase improves detection of HLA antibodies in flow crossmatches. *Transplant Proc* 2001;33:473-4.

7. Lobo PI, Spencer CE, Isaacs RB, McCullough C. Hyperacute renal allograft rejection from anti-HLA class I antibody to B cells--antibody detection by two color FCXM

was possible only after using pronase-digested donor lymphocytes. Transpl Int 1997;10:69-73.

Pronase 처리가 유세포분석 교차적합시험에 미치는 영향

이누리 • 인지원 • 노은연 • 신 수 • 송은영

서울대학교 의과대학 검사의학교실

배경: 유세포분석 교차적합시험(flow cytometric crossmatching, FCXM)은 고형장기이식을 수행하는 병원에서 널리 이용되는 검사이다. 림프구를 pronase 처리를 시행하여 B 세포 FCXM의 민감도 및 특이도를 향상시킬 수 있음이 보고된 바 있다. 그러나 이는 또한 human leukocyte antigen (HLA) 항원 발현에도 영향을 미쳐 교차시험 결과에 영향을 줄 수 있다. 이에 본 연구에서는 다양한 농도의 pronase 처리가 FCXM 결과에 미치는 영향을 분석하고자 하였다.

방법: 신장이식 예정인 10명의 공여자로부터 분리한 말초혈액 단핵구를 세 가지 다른 농도(0.5, 1.0, 그리고 2.0 mg/mL)의 pronase로 처리하였다. Pronase가 AB형 혈청($F_c\gamma$ receptor), HLA class I, class II의 median fluorescence intensity (MFI) 값에 미치는 영향과 HLA class I과 class II 항원의 MFI ratio 값에 미치는 영향을 분석하였다.

결과: B 세포 FCXM에서 AB형 혈청($F_c\gamma$ receptor), 그리고 HLA class I의 MFI 값은 pronase 처리 시 유의한 감소를 보였다. HLA class II 항원의 MFI ratio 값은 0.5, 1.0, 그리고 2.0 mg/mL 농도의 pronase 처리 시 유의한 증가를 보였다(각각 $P<0.05$, $P<0.01$, $P<0.01$, respectively). T 세포 FCXM에서는 HLA class I 항원의 MFI ratio 값이 pronase 처리 시 유의한 감소를 보였다(all $P<0.01$).

결론: FCXM 시행 시 B 림프구는 1.0 또는 2.0 mg/mL 농도의 pronase 처리가 권장되며, T 림프구는 pronase 처리 시 주의가 필요할 것으로 생각된다.

(J Lab Med Qual Assur 2016;38:159-163)

교신저자: 송은영

우)03080 서울시 종로구 대학로 101, 서울대학교 의과대학 서울대학교병원 진단검사의학과
Tel: 02)2072-0197, Fax: 02)3672-3337, E-mail: eysong1@snu.ac.kr