

Cyclosporine A로 유도된 면역성 혈소판 감소증: 당단백 Ib/IX 및 Iib/IIIa에 대한 혈소판 특이항체 검출

박광일 · 신혜정 · 김문정 · 박규은 · 김현옥 · 송경순 · 정현주*

연세대학교 의과대학 임상병리학과교실, 해부병리학교실*

A Severe Thrombocytopenia Associated with Cyclosporine-Dependent Antiplatelet Antibody Against Platelet Glycoproteins Ib/IX and Iib/IIIa Complexes

Kwang il Park, M.D., Hea Jung Shin, M.D., Mun Jeong Kim, M.D., Quehn Park, M.D., Hyun Ok Kim, M.D., Kyung Soon Song, M.D., and Hyeon Joo Jeong, M.D.*

Departments of Clinical Pathology and Anatomic Pathology*, Yonsei University College of Medicine, Seoul, Korea

A 51 year-old woman underwent living related renal transplantation under cyclosporine A immunosuppression. After surgery, she did well initially, but the serum creatinine level subsequently rose to 3.6 mg/dL on postoperative day 95, she was admitted at Severance Hospital for further evaluation. On admission day 4, a renal biopsy was performed, and the microscopic findings revealed an interstitial mononuclear cell infiltrate, suggestive of severe allograft rejection. Because of persistently impaired renal function, the patient was began on twice weekly hemodialysis, and the progression of renal deterioration paralleled the onset of a thrombocytopenia. The platelet count dropped to $13 \times 10^9/L$ despite daily platelet transfusion. On admission day 19, antiplatelet antibody against the glycoprotein Ib/IX (GP Ib/IX) and glycoprotein Iib/IIIa (GP Iib/IIIa) complex was detected in the presence of cyclosporine A (CsA) with modified antigen capture ELISA (MACE) assay, thereby implicating the drug. CsA was stopped immediately and immunosuppression drug was changed to FK506. After CsA was discontinued 7 day later, her platelet count returned to normal, up to $170 \times 10^9/L$ without requirement of any platelet concentrates. This paper presents the first case of CsA induced thrombocytopenia in Korea which was confirmed by in vitro CsA dependent antiplatelet antibody detection test. (*Korean J Clin Pathol* 1998; 18: 464-8)

Key words : Cyclosporine A, Thrombocytopenia, Antiplatelet antibody

서 론

Cyclosporine A(CsA, Fungal endecapeptide)는 진균의 추출물로서 T 림프구에 관련된 면역반응만을 선택적으로 억제하고 생체 내에서는 B 림프구, 다핵백혈구, 대식세포, 자연살세포 등에는 거의 영향을 미치지 않으므로써 선택적인 면역억제효과를 보인다. 그러나 CsA의 선택적이고 강력한 면역억제작용으로 장기이식의

성공률이 많이 향상되었음에도 불구하고 골수억제나 다른 장기의 독성은 없다[1]는 초기 보고와는 달리 심한 신독성이 중요한 부작용으로 문제시되고 있으며 미세혈관병성 용혈성 빈혈, 혈소판 감소증과 신부전을 특징으로 하는 신발생(de novo) 용혈성 요독증후군[2-4]도 드물지 않게 보고되고 있다. 그 외의 부작용으로 다모증, 치은비대증, 진전(tremor), 간독성 등이 보고되고 있어, 이 약제사용에 제한이 되고 있다[4].

CsA에 의한 용혈성 요독증후군은 CsA에 의한 혈관내피세포의 직접적인 손상이 중요한 원인으로 작용하고 또한 CsA에 의한 혈소판 응집의 증가도 혈전성 미세혈관병증으로 생기는 용혈성 요독증후군의 요인으로 생각되어[5] 혈소판 감소증이 대부분 동반되지만 용혈성 요독증후군의 증상이 없이 CsA 사용 후 혈소판 감소

접 수 : 1997년 9월 12일 접수번호 : KJCP1071
수정본접수 : 1998년 6월 20일
교신저자 : 박광일
우 120-752 서울시 서대문구 신촌동 134
신촌세브란스병원 임상병리과
전화 : 02-361-6495, 팩스 : 02-313-0956

증이 단독으로 관찰된 예는 무척 드물어 전 세계적으로 2예가 보고[6, 7]되었을 뿐이며 그 정확한 기전에 대해서는 아직 알려져 있지 않다.

저자들은 연세대학교 의과대학 부속 세브란스병원에서 신장이식 후 급성거부반응을 주소로 입원한 환자에서 급성 거부반응 치료의 목적으로 경구용 CsA에서 정맥주사용 CsA로 교체하여 사용한 후 약 2주 동안 발생한 혈소판 감소증이 약물투여 중단 후 혈소판 농축액 수혈 없이도 정상적인 혈소판 수치로 회복되었고, 혈소판 감소증을 보인 기간 중에 채혈된 환자의 혈청에서 CsA 의존성 항혈소판 항체를 변형항원포획효소면역검사법(Modified antigen capture ELISA, 이하 MACE로 약함)으로 검출하여, 실험적으로 CsA가 혈소판 감소증의 원인이 된 약물이라는 것을 생체외에서 증명된 국내 첫 증례로 보고하는 바이다.

증 례

환자: 51세 여자

주소: 혈청 creatinine치 상승

현병력: 고혈압성 만성신부전으로 내원 3개월 전(1997년 4월) 본원에서 혈연관계의 공여자로부터 신장이식을 받고 외래 추적 관찰 중 입원 2일전 시행한 검사에서 creatinine치가 상승하여 이식외과 외래를 통해 입원하였다.

과거력: 5년 전 고혈압으로 진단받고 치료 중이며, 같은 해 당뇨병으로 진단받고 치료 중임.

가족력: 특이사항 없음.

이학적 소견: 외견상 전신부종 외 특이소견은 없음.

검사소견: 입원 당시 말초혈액검사에서 백혈구수 5,640/ μ L, 혈색소 9.2 g/dL, 헤마토크리트 28.7%, 혈소판수 210,000/ μ L이었고, prothrombin time 12.6초, activated partial thromboplastin time 30.9초, BUN 84.0 mg/dL, creatinine 3.6 mg/dL, total bilirubin 0.3 mg/dL, AST 5 IU/L, ALT 8 IU/L였으며 입원 4일째 시행한 경피신침생검소견상 급성신부전(moderate, IIB according to Banff classification) 소견 보여 급성거부반응으로 추정하였다(Fig. 1).

치료 및 경과: 신이식 후 입원까지 경구용 CsA, 스테로이드 등으로 면역억제요법 시행하였으나, BUN 및 creatinine치 상승으로 입원 5일부터 혈액투석요법을 시행하였다. 급성 거부반응의 신생검 소견에 따라 입원 6일째 정맥주사용 CsA, prednisolone 등으로 치료약물을 바꾸었으며, 이 때 시행한 말초혈액검사는 백혈구수 9,860/ μ L, 혈색소 10.0 g/dL, 헤마토크리트 29.8%, 혈소판수 70,000/ μ L로 혈소판감소증을 보이기 시작하였다. 혈소판수는 입원 7일째 38,000/ μ L, 입원 8일째 39,000/ μ L, 입원 9일째 30,000/ μ L, 입원 10일째 14,000/ μ L, 입원 11일째 13,000/ μ L, 입원 12일째 21,000/ μ L, 입원 13일째 24,000/ μ L, 입원 14일째 26,000/ μ L, 입원 18일째 46,000/ μ L로 계속 감소하였으며, 입원 7일째부터 혈소판 농축액 10단위를 매일 수혈하였으나, 혈소판수는 증가하지 않았다.

환자는 혈액투석요법에도 불구하고 BUN 및 creatinine치는 각각 입원 9일째 34 mg/dL, 4.8 mg/dL, 입원 10일째 58 mg/dL, 7.8 mg/dL, 입원 14일째 59 mg/dL, 7.2 mg/dL로 호전되지 않았다. 입원 18일째 시행한 haptoglobin치는 12 mg/dL이하로 감소되었고, total LDH는 577 IU/L로 증가된 소견을 보였다. 직접 항글로불린 검사는 약양성이었으나 ATG사용으로 인한 위양성으로 해석하였으며, 입원 20일째 시행한 total bilirubin치는 0.9 mg/dL, AST 12 IU/L, ALT 7 IU/L로 정상범위였다(Fig. 2).

입원 19일째 CsA 의존성 혈소판 항체가 검출됨에 따라 CsA의 투여를 중단하고 FK-506으로 교체하였으며, 그 후 혈소판 농축액의 수혈없이 혈소판수는 점차적으로 증가하여 CsA투여 중단 7일 후 혈소판수는 170,000/ μ L로 정상화되었다. 그러나, BUN 및 creatinine 수치는 계속 상승하여 이식신 기능 소실로 입원 42일째 이식신의 신장절제술을 시행하였다.

CsA 의존성 혈소판 항체 검출방법

혈소판 수혈불응증을 보였던 입원 18일째에 채혈한 혈청으로 검사를 시행하였다.

변형항원포획효소면역검사법(MACE)[8]

96 well microplate (Green Cross, Korea)에 혈소판 당단백 IIb/IIIa와 당단백 Ib/IX에 대한 단클론항체(Immunotech Inc, MA, USA)를 2.5 μ g/dL가 되도록 0.05 M sodium carbonate 완충액으로 희석하여 50 μ L씩 분주한 후 4°C 냉장고에서 하룻밤 보관하였다. 다음날 0.05% PBS/Tween 세척액으로 microplate를 2회 세척한 후 각 well에 blocking solution인 1% 알부민 용액으로 200

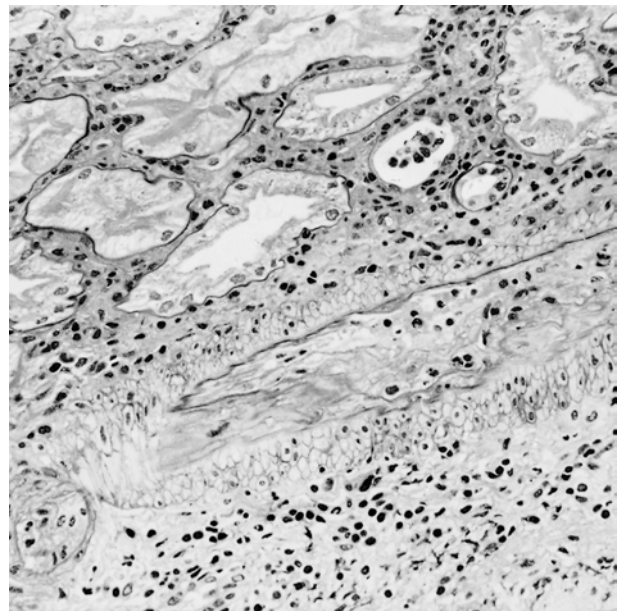


Fig. 1. This microphotograph depicts acute vascular rejection of a medium sized artery with interstitial mononuclear cell infiltration and minimal tubulitis (PAS, \times 200).

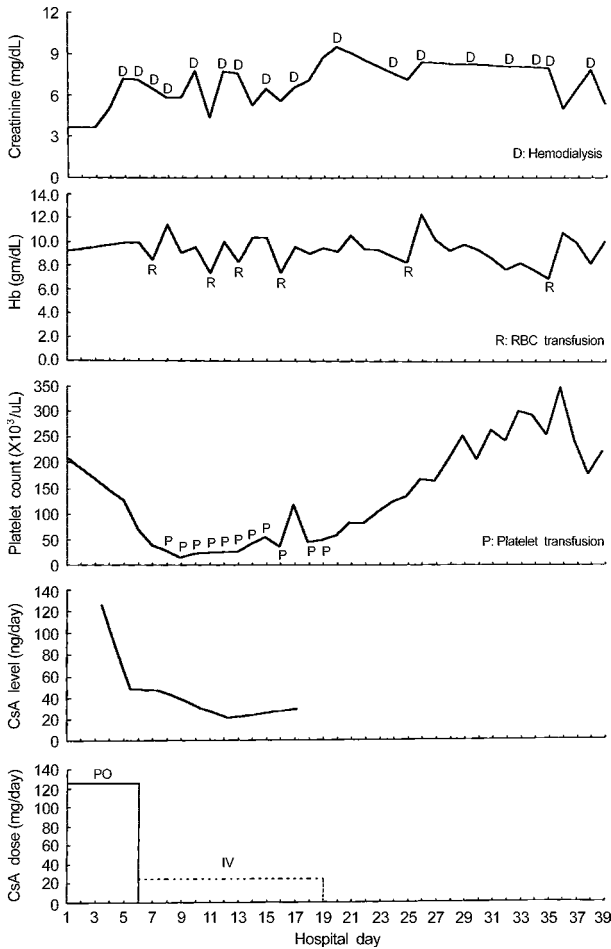


Fig. 2. The patient's clinical course.

μL씩 채우고 실온에서 1시간 항온하여 anti-GP IIb/IIIa와 anti-GP Ib/IX이 부착된 microplate를 준비하였다.

신선한 O형 혈소판 농축액 10단위를 혼합한 후 0.33% EDTA/PBS 용액으로 3회 세척한 후 $1 \times 10^6 / \mu\text{L}$ 로 혈소판수를 조절하였다. 환자의 혈청 또는 대조혈청에 CsA를 최종농도가 1 mg/dL이 되도록 혼합하고, 대조군에는 동량의 PBS를 혼합하였다. 혈소판 부유액 100 μL과 대조혈청 또는 환자의 혈청 100~500 μL을 37°C에서 30분간 반응시켰다. PBS/Tween 완충액으로 3회 세척 후 1% Triton X-100용액 200 μL을 첨가하여 냉장고에 30분간 보관한 후 30초간 Vibracell (Sonics & Materials Inc, Danbury, CT, USA)으로 초음파 처리를 하여, 12,000 rpm에서 5분간 원심분리하였다. 상층 혈소판 용해될 용액을 단클론항체가 부착된 microplate well에 50 μL씩 각각 분주한 후 37°C에서 30분간 반응시켰다. 세척액으로 3회 세척한 뒤 biotin이 부착된 anti-human IgG (Vector Lab Inc, CA, USA)를 50 μL씩 첨가하고 37°C에서 30분간 반응시킨 후 역시 3회 세척하였다. Avidin-biotin-alkaline phosphatase complex (Vector Lab Inc, CA, USA)용액을 50 μL씩 첨가하여 실온에서 15분간 반응시켰다. PBS/Tween 완충액으로 5회 세척한 후 기질용액(p-nitrophenyl phosphate)을 100 μL씩 첨가하여 발색시키고 20~

Table 1. Reactions of the patient's sera with CsA against anti-GP IIb/IIIa and GP Ib/IX tested in MACE assay

Immune complex formation	Control cell	Monoclonal antibody	
		anti-GP IIb/IIIa	anti-GP Ib/IX
patient's serum + drug*	+ O platelet	0.377†	0.454
patient's serum + PBS	+ O platelet	0.176	0.218
normal serum† + drug	+ O platelet	0.275	0.152
normal serum + PBS	+ O platelet	0.268	0.210

* CsA concentration: 1 mg/dL.
 † duplicated mean value, expressed as optical density.
 ‡ collected from AB male healthy donor.

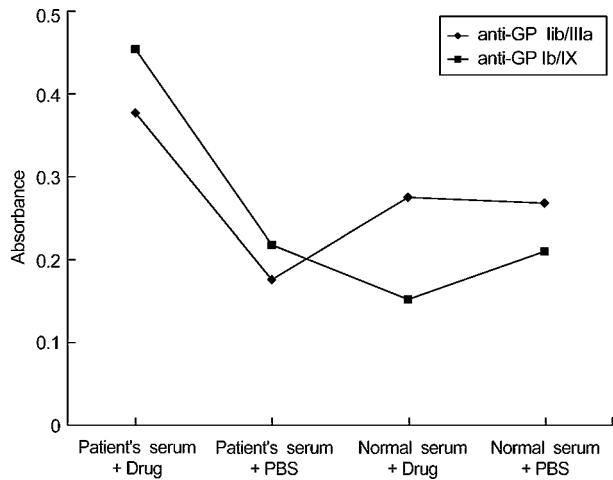


Fig. 3. Reactivity of the patient's sera with Cyclosporine A in modified antigen capture ELISA (MACE) assay.

30분 경과한 후 405 nm (reference wave length: 492 nm)에서 흡광도를 측정하였다. 검사시 모든 검사는 중복검사(duplicate)로 흡광도의 평균값을 얻었고, 매 검사시마다 음성대조 혈청 3개와 anti-PI^{A1} (kindly gifted by Dr. Kickler)이 확인된 양성대조혈청을 포함시켰으며 음성대조 혈청 흡광도의 평균값에 1.5배 이상의 흡광도를 보이는 검체를 양성으로 판정하였다.

결 과

환자의 혈청으로 CsA 약물 항혈소판 항체를 변형항원포획효소면역검사법(MACE)으로 시행한 결과는 Table 1에 요약하였으며 CsA의 존재 유무에 따른 혈소판 glycoprotein Ib/IX 및 IIb/IIIa에 대한 특이 항체를 확인할 수 있었다(Fig. 3).

고 찰

약물 혈소판 항체에 의한 혈소판 감소증은 비교적 잘 알려진 질

환이며 면역복합체나 약물 흡착 등으로 발생하나 주로 면역복합체에 의해 많이 유발되는 것으로 보고되고 있다[9]. 따라서, 어떠한 약물이 면역성 혈소판 감소증의 원인으로 의심될 때, 이를 증명하기 위해서는 약물의 농도를 1 mg/mL가 되도록 PBS에 녹인 후 면역복합체의 기전으로 시험하여 원인이 되는 약물을 찾아 낼 수 있다[10].

저자들이 보고한 증례는 신장 이식후 3개월 뒤에 발생한 급성 혈관성 거부반응(acute vascular rejection)을 특징적으로 보인 환자로서 임상증상으로 동반된 혈소판 감소증이 거부 반응과 동반된 소견인지, CsA에 의한 신발생 용혈성 요독증후군과 동반된 소견인지, 또는 약물 의존성 혈소판 항체에 의한 면역학적 혈소판 감소증인지의 감별진단이 필요하였다.

본 증례는 혈소판 감소증이 CsA를 사용한 지 3개월 뒤에 발생하여 CsA의 혈중 농도가 높은 이식 후 첫 주주일동안에 CsA에 의한 신발생 용혈성 요독증후군은 주로 발생한다는 보고[11]보다 늦게 발생하였고 총 빌리루빈치, ALT, AST 수치가 입원기간 중 계속 정상 범위였으며 이식신 기능의 소실로 계속되는 혈액투석 및 수혈로 혈액색소의 변화가 심하여 신조직 생검을 실시하기까지 용혈성 요독증후군과 급성거부반응을 임상적으로 감별하기가 쉽지 않았다. 그러나 혈청 haptoglobin치의 감소, 혈청 LDH의 증가 소견이 관찰되어 완전히 용혈성 요독증후군의 가능성을 배제하지 못하였으나, 신생검 소견에서 급성 혈관성 거부반응에서 특징적으로 볼 수 있는 이식신의 거의 모든 혈관에서 심한 맥관염의 전형적인 소견을 보여 용혈성 요독증후군이 동반되었다 하더라도 경증으로 동반되었을 것으로 추정된 경우였다.

본 증례에서는 신생검에서 급성 거부반응의 소견을 보여 입원 6일째 CsA를 정주용으로 교체한 후 혈소판수가 급격히 감소하였고 이에 약물에 의한 혈소판 감소증을 감별하기 위하여 CsA와 혈액투석시 투여된 heparin에 대하여 MACE를 시행하여 heparin에 대해서는 음성반응을 얻었지만 CsA에 대해 양성반응을 얻어 혈소판 glycoprotein IIb/IX 및 IIb/IIIa에 특이 항체를 보인 CsA에 의한 혈소판 감소증을 진단할 수 있었다. 환자는 그 다음날 CsA 투여를 중단하였으며 CsA 투여 중단 후 추가적인 혈소판 농축액의 수혈없이도 혈소판수가 증가하여 약물 투여기간과 혈소판 감소 및 호전의 추이 역시 CsA에 의한 혈소판 감소증 진단에 합당하였다. 또한 CsA 중단후 이식신의 기능은 호전이 없었지만 혈소판수는 정상으로 회복되었기 때문에 급성거부반응으로 인해 발생될 수 있는 혈소판 감소증은 배제할 수 있었다.

MACE는 1987년에 처음 소개된 혈소판 항체 검출방법[12]으로 혈소판 특이항체를 단클론항체를 이용하여 검출하는 효소면역방법이다. 이 방법은 단클론항체에 의한 항원의 포획으로 검사의 특이도가 높을 뿐 아니라 biotin-avidin complex를 이용하여 검출력을 증폭시켜 기존의 발표된 다른 혈소판 항체 검사방법에 비해 그 예민도가 가장 높은 검사방법으로 평가받고 있다[13]. MACE는 자가면역성 혈소판 감소증 환자에서 혈소판 당단백 IIb/IIIa와 Ib/IX에 대한 항체를 규명하는데 많이 이용되는 검사방법이며 특히 혈소판 특이 항원에 대한 항체를 검출하는데 많이 기여를 하고 있는 검

사이다. 그러나, 약물항체에 대한 MACE를 이용한 검출시도는 최근에 이루어지고 있으며 MACE를 이용한 보고는 quinidine에 대해 비교적 자세하게 규명[14-15]되어 있을 뿐 그 외의 약물에 대한 보고는 거의 없다. 본 증례에서 CsA에 대한 혈소판 항체가 혈소판 당단백과 반응하는 항체임을 검출하였는데 현재까지 CsA와 관련된 혈소판 감소증은 전세계적으로 2예가 보고되었으나 본 증례에 서처럼 CsA 의존성 항혈소판 항체를 입증한 예는 없었다.

이상의 결과로 CsA의 투여와 관련하여 혈소판 감소증이 발생한 경우 급성 거부반응이나 용혈성 요독증후군과 동반되는 혈소판 감소증을 그 수반된 증상의 일부로 지나쳐 버리기보다는 MACE방법을 이용한 적극적인 항체 규명을 시도한다면 CsA에 의한 약물 항체를 검출하는 빈도가 증가될 수 있을 것으로 기대되며 CsA를 사용할 때 발생한 혈소판 감소증을 면역기전의 측면에서 규명할 수 있다면 일부 용혈성 요독증후군 치료시 혈장교환요법의 효과를 기대할 수 있는 이론적 근거를 제시할 수 있을 것으로 생각된다.

요약

저자들은 급성 이식거부반응으로 입원한 51세 여자 환자에서 신 이식 후 입원까지 경구용 CsA, 스테로이드 등으로 면역억제요법 시행하였으나, 증상의 악화 및 급성 신부전의 신생검 소견에 따라 입원 6일째 정맥주사용 CsA, prednisolone 등으로 치료약물을 바꾸었으며, 이 때 발생한 혈소판 감소증이 CsA의 투여를 중단한 후 정상적인 혈소판수로 회복되고, MACE방법에 의해 CsA에 의한 약물 항체를 입증한 증례를 경험하였기에 문헌고찰과 함께 보고하는 바이다.

참고문헌

1. Borel JF. Comparative study of in vivo drug effects on cell mediated cytotoxicity. *Immunology* 1976; 31: 631-41.
2. Rabinowe SN, Soiffer RJ, Tarbell NJ, Neuberger D, Freedman AS, Seiffer J, et al. Hemolytic-uremic syndrome following bone marrow transplantation in adults for hematologic malignancies. *Blood* 1991; 77: 1837-44.
3. Yoshimura N, Oka T, Ohmori Y, Aikawa I, Yasumura T, Matsui S, et al. Cyclosporine-associated microangiopathic hemolytic anemia in a renal transplant recipient. *Jpn J Surg* 1989; 19: 223-8.
4. Van Buren D, Van Buren CT, Flechner SM, Maddox AM, Verani R, Kahan BD. De novo hemolytic uremic syndrome in renal transplant recipients immunosuppressed with cyclosporine. *Surgery* 1985; 98: 54-62.
5. 김용림, 권태환, 조동규, 락정식. 신장 재이식환자에서 발생한 Cyclosporine A에 의한 신발생 용혈성 요독증후군 1예. *대한이식학회지* 1996; 10: 145-50.
6. Morgan M, Savdie E, Dodds A. Thrombocytopenia as a complication of cyclosporine A therapy. *Aust N Z J Med* 1990; 20: 749.
7. DeJong DJ and Sayler DJ. Possible cyclosporine-associated thrombocytopenia. *Drug Intell Clin Pharmacol* 1990; 24: 1007.

8. Kim HO, Kennedy SD, Kickler TS. *Studies using immobilized platelet glycoproteins for detection of platelet alloantibodies*. *Am J Clin Pathol* 1995; 104: 258-63.
9. Beutler E, Lichtman MA, Coller BS, Kipps TJ. *Williams Hematology, 5th ed*, McGraw-Hill Inc, USA, 1994: 1331-8.
10. American Association of Blood Banks. *Technical Manual, 12th ed*, American Association of Blood Banks, USA, 1996: 670-1.
11. Agarwal A, Mauer SM, Matas AJ, Nath KA. *Recurrent hemolytic uremic syndrome in an adult renal allograft recipient: current concepts and management*. *J Am Soc Nephrol* 1995; 6: 1160-9.
12. Furihata K, Nugent DJ, Bissonette A, Aster RH, Kunicki J. *On the association of the platelet-specific alloantigen Per^a, with glycoprotein IIIa evidence for heterogeneity of glyco-protein IIIa*. *J Clin Invest* 1987; 80: 1624-30.
13. 김현욱, 임환섭, 김문정, 조성란, 이정운, 남정현 등. *혈소판감소증 환자에서 혈소판 항체 검출을 위한 Modified Antigen Capture ELISA 방법의 적용*. *대한혈액학회지* 1996; 31: 373-81.
14. Chong BH, Xiaoping Du, Berndt MC, Horn S, Chesterman CN. *Characterization of the binding domains on platelet glycoproteins Ib-IX and IIb/IIIa complexes for the quinine/quinidine-dependent antibodies*. *Blood* 1991; 77: 2190-9.
15. Visentin GP, Newman PJ, Aster RH. *Characteristics of quinine- and quinidine-induced antibodies specific for platelet glycoproteins IIb and IIIa*. *Blood* 1991; 77: 2668-76.