

## 혈소판감소증 환자에서 혈소판 항체 검출을 위한 Modified Antigen Capture ELISA 방법의 적용

- Thrombomatch EIA, Flow cytometry 검사방법과의 비교 -

연세대학교 의과대학 임상병리과학교실, 인하대학교 의과대학 임상병리과학교실<sup>1)</sup>,  
순천향대학교 의과대학 임상병리과학교실<sup>2)</sup>

김현옥 · 임환섭 · 김문정 · 조성란 · 이정운 · 남정현<sup>1)</sup> · 김휘준<sup>2)</sup>

= Abstract =

**Detection of Platelet Antibodies in the Thrombocytopenic Patients  
by Modified Antigen Capture ELISA : A Comparative Study with  
Thrombomatch EIA and Flow Cytometry**

Hyun Ok Kim, M.D., Hwan Sup Lim, M.D., Mun Jeong Kim, M.D.  
Sung Ran Cho, M.D., Jung Woon Lee, M.D., Chung Hyun Nahm, M.D.<sup>1)</sup>  
and Hwi Jun Kim, M.D.<sup>2)</sup>

*Department of Clinical Pathology, Yonsei University College of Medicine, Seoul*

*Department of Clinical Pathology, In Ha University College of Medicine, Inchun<sup>1)</sup>*

*Department of Clinical Pathology, Soonchunhyang University College of Medicine, Chunan<sup>2)</sup>, Korea*

**Background :** There have been several recent reports on autoantibodies to glycoprotein(GP) IIb/IIIa and GP Ib/IX, but there are few reports in Korea. In this study, antiplatelet antibodies against anti-GP IIb/IIIa and anti-GP Ib/IX were assayed by using a modified antigen capture ELISA(MACE) in 63 patients with thrombocytopenia.

**Methods :** We studied sera obtained between February, 1994 and July, 1995 from 63 patients with thrombocytopenia. Three methods were performed for the detection of platelet antibodies, ie. MACE, immunofluorescent assay using flow cytometry, and enzyme immunoassay using Thrombomatch EIA test kit(Biotest AG, Germany).

**Results :** Thrombomatch EIA test detected all anti-PI<sup>A1</sup> in the seven sera confirmed by MACE. The detection rate was 32% by MACE, 30% by Thrombomatch EIA, and 14% by flow cytometry in sera collected from the 63 patients with thrombocytopenia. Among 63 thrombocytopenic patients, 5 had anti-GP IIb/IIIa ; 4 had anti-GP Ib/IX ; and 11 had both. The concordance rate was 70% between MACE and thrombomatch EIA.

**Conclusion :** All three methods have their advantages and disadvantages. MACE identified

본 연구는 연세대학교 의과대학 1995년도 일반과제(교수) 연구비(과제번호 95-35)에 의하여 이루어 졌음.

김현옥 : 120-752, 서울특별시 서대문구 신촌동 134번지, 연세대학교 의과대학 임상병리과학교실

Tel : (02)361-5864 Fax : (02)313-0956

the glycoprotein specific antibodies, but the method was too complex to routinely use. Thrombomatch EIA is simple to use, but nonspecific reactions were noted. The detection rate of flow cytometry was the lowest among three methods, but this method appears to more useful for the analysis of platelets than sera. Our results suggest that none of the three methods is sufficient to stand alone and that they should be used together in the analysis of platelet antibodies.

**Key Words :** Modified antigen capture ELISA, Antiplatelet antibodies, Anti-GP IIb/IIIa, Anti-GP Ib/IX

## 서 론

면역성 혈소판감소증은 혈소판 항원항체 반응에 의해 혈소판이 파괴되는 질환으로서, 혈소판 표면의 항원결정기(epitope)에 의해 유도된 항체가 혈소판 표면에 결합함으로써 야기된다. 따라서 이런 질환의 진단을 위해서는 혈소판 항체를 혈청학적으로 규명하는 것이 우선인데 효소면역법, 방사선 면역 측정법 및 면역형광법 등을 이용한 제 3세대 면역 기법이 혈소판 항체검사에 다양하게 적용되어 소개되고 있으나 대상군, 측정방법 및 해석방법에 따라 양성률에 큰 차이를 보인다<sup>1)</sup>. 이렇듯 혈소판 항체 검사가 그 중요성에 비해 통일된 검사방법이 없고 역사적으로 수많은 검사방법이 이용되어 왔다는 것은 혈소판 항체의 다양성으로 인하여 이를 검출해내기가 까다롭다는 것을 단적으로 보여 주고 있다.

한편 1984년 Woods 등<sup>2)</sup>에 의해 만성 특발성 혈소판감소증 환자의 혈청에서 발견되는 자가항체의 표적항원이 혈소판 당단백 중 IIb/IIIa임이 확인된 뒤 혈소판 항체의 규명에 관한 연구는 표적 당단백을 규명하는 방향으로 진행되고 있다<sup>3~8)</sup>. 당단백에 대한 다각적인 연구가 진행되면서 면역성 혈소판감소증에서 혈소판 항체의 생성을 유도하는 항원결정기가 혈소판 당단백 IIb/IIIa와 당단백 Ib/IX에 위치한다는 것에는 논란의 여지가 없으나, 이런 환자에서 발견되는 자가 혈소판 항체의 성상이 당단백 IIb/IIIa이냐 또는 당단백 Ib/IX에 대한 것인가에 따라 예후가 다를 수 있다는 보고에 대해서는 아직

확립된 바가 없다<sup>5, 6, 8)</sup>.

현재 국내에서는 효소면역법<sup>9, 10)</sup>과 유세포 분석기를 이용한 면역형광법<sup>11, 12)</sup> 등이 혈소판 항체검사로 많이 이용되고 있다. 그러나 혈소판 항체 검출 시 당단백 IIb/IIIa와 당단백 Ib/IX에 대한 성상을 구분하여 검출하기 위해서는 특정 혈소판 당단백을 포획하는 검사를 이용하여야 하는데 아직 이에 대한 국내의 보고는 많지 않다<sup>13, 14)</sup>. 이에 저자들은 혈소판감소증을 보이는 환자의 혈청에서 modified antigen capture ELISA(변형항원포획 효소면역법, 이하 MACE로 약함)법으로 혈소판 항체 검출을 시도하여 당단백 IIb/IIIa와 당단백 Ib/IX에 대한 혈소판 항체의 빈도를 조사하고자 본 연구를 시행하였으며, 또한 현재 시판중인 Biotest사(Germany)의 Thrombomatch EIA kit와 유세포 분석기를 이용한 면역형광법을 이용하여 동일한 혈청에 대해 혈소판 항체검사를 시행함으로써 MACE법의 신뢰도를 평가하고자 하였다.

## 대상 및 방법

### 1. 대상

1994년 2월부터 1995년 7월까지 세브란스병원에 내원하여 임상병리과로 혈소판 항체 검사가 의뢰된 63명의 환자로부터 채혈된 혈청 검체를 대상으로 하였다. 환자의 진단명은 Table 1에 요약하였다. 검사를 즉시 시행할 수 없었던 경우에는 혈청을 분리한 후 분주하여 -20°C에 보관하였다. 양성 대조혈청은 Dr. Kickler(Johns Hopkins University,

Table 1. Clinical Diagnosis of 63 Patients with Thrombocytopenia

| Diagnosis               | No. of patients |
|-------------------------|-----------------|
| Acute leukemia/lymphoma | 12              |
| Chronic ITP             | 11              |
| Sepsis                  | 9               |
| Liver cirrhosis         | 8               |
| Solid tumor             | 8               |
| ITP with pregnancy      | 6               |
| End stage renal disease | 2               |
| Others                  | 7               |
| Total                   | 63              |

ITP : idiopathic thrombocytopenic purpura

MD, USA)로부터 얻은 anti-PI<sup>A1</sup>의 존재가 확인된 환자의 혈청과 Thrombomatch EIA kit(Biotest AG, Dreieich, Germany)에 포함된 양성대조혈청을 사용하였다.

## 2. 방법

### 1) Modified antigen capture ELISA(MACE)법

혈소판 당단백 IIb/IIIa와 당단백 Ib/IX에 대한 단클론항체(Immunotech Inc, MA, USA)를 2.5μg/dL가 되도록 0.05M sodium carbonate 완충액으로 희석하여 96well microplate(녹십자, 한국)의 각 well에 50μL씩 분주하여 4°C 냉장고에서 하룻밤 보관하였다. 다음날 0.05% PBS/Tween 세척액으로 2회 세척한 후 blocking solution인 1% 알부민 용액으로 각 well에 200μL씩 채우고 실온에서 1시간 항온하여 단클론항체가 부착된 microplate를 준비하였다.

신선한 O형 혈소판 농축액 10단위를 혼합한 후 일부를 채취하여 0.33% EDTA/PBS 용액으로 3회 세척한 후  $1 \times 10^6/\mu\text{L}$ 로 혈소판수를 조절하였다. 혈소판 부유액 100μL와 대조혈청 또는 환자의 혈청 100~500μL를 37°C에서 30분간 반응시켰다. PBS/Tween 완충액으로 3회 세척후 1% Triton X-100 용액 100μL를 첨가하여 냉장고에 30분간 두어 혈소판 용해질을 만들었다. 12,000rpm에서 5분간 고

속침전후 상층 혈소판 용해질 용액을 anti-GP IIb/IIIa와 anti-GP Ib/IX이 부착된 microplate well에 각각 분주한 후 37°C에서 30분간 반응시켰다. 세척액으로 3회 세척한 뒤 biotin이 부착된 anti-human IgG(Vector Lab Inc, CA, USA)를 50μL씩 첨가하고 37°C에서 30분간 반응시킨 후 역시 3회 세척하였다. Avidin-biotin-alkaline phosphatase complex(Vector Lab Inc, CA, USA)용액을 50μL씩 첨가하여 실온에서 15분간 방치시켰다. PBS/Tween 완충액으로 5회 세척한 후 기질용액(p-nitrophenyl phosphate)을 100μL씩 첨가하여 발색 시킨 후 492nm에서 흡광도를 측정하였다. 매 검사 시마다 음성대조 혈청을 3개씩 동시에 측정하여 흡광도의 평균값에 표준편차의 3배를 더한 값(mean +3SD) 이상을 보이는 검체를 양성으로 판정하였다. 검사시마다 anti-PI<sup>A1</sup>이 확인된 양성대조혈청을 포함시켰다<sup>13, 15)</sup>.

### 2) Thrombomatch EIA법

상품화된 Thrombomatch EIA kit를 이용하였다. 검사방법을 요약하면 CPDA-1에 채혈된 O형 혈소판 10단위 혼합 농축액으로부터 일부를 채취하여 0.33% EDTA/ PBS 용액으로 3회 세척한 후 혈소판수를 측정하였다. 혈소판수를 10~50μL내에서  $5 \times 10^6$ 개의 숫자로 맞춘 후 kit에서 공급한 microplate에 분주하고 각 well에 환자의 혈청 50μL를 첨가한 후 37°C에서 30분간 반응시켰다. 세척액으로 3회 세척하되 microplate 2줄(16 well)씩 고속원침이 가능하도록 고안된 원심분리기(Hettich centrifuge EBA, Biotest, Germany)를 이용하여 10,000g에서 1분간 원침하여 수기법으로 세척하였다. HRP-labelled conjugate 100μL를 첨가하여 37°C에서 30분간 반응시킨 후, 위와 동일한 방법으로 3회 세척하고, Ortho- phenylen diamin hydrochloride 기질액을 100μL씩 첨가하여 실온에서 10분간 반응시킨 후 0.5N sulphuric acid를 100μL씩 첨가하여 반응을 정지시키고 492nm에서 2시간 이내에 흡광도를 측정하였다<sup>16)</sup>.

### 3) 유세포 분석기를 이용한 면역형광법

O형 혈소판 혼합 농축액으로부터 얻은 혈소판을

1% paraformaldehyde로 고정한 후 PBS/BSA/EDTA 용액으로 3회 세척후 혈소판수를  $2 \times 10^7/\mu\text{L}$ 로 조절하였다. 혈소판 부유액 100 $\mu\text{L}$ 와 환자 혈청 100 $\mu\text{L}$ 를 잘 혼합한 후 37°C에서 1시간 항온하였다. 3회 세척후 1:100으로 회색한 FITC-F(ab')<sub>2</sub> goat anti-human IgG(Jackson Immuno Research Lab Inc, USA)를 시험관에 100 $\mu\text{L}$ 씩 넣고 실온에서 30분간 방치한 후 세척하여 혈소판 부유액 50 $\mu\text{L}$ 를 PBS 500 $\mu\text{L}$ 에 재부유시켜 FACScan(Becton-Dickinson, USA)을 사용하여 10,000개의 혈소판을 분석하였다. 참고치의 상한값은 대조군의 mean channel value의 평균치+2SD로 정하였다<sup>17)</sup>.

## 결 과

### 1. Anti-PI<sup>A1</sup> 양성대조혈청에 대한 Thrombomatch EIA 결과

Dr. Kickler로부터 공급받은 MACE법으로 확인된 anti-PI<sup>A1</sup> 양성혈청 7검체에 대해 Thrombomatch EIA 시약을 이용하여 혈소판 항체 검사를 시행한 결과 모든 검체에서 양성 반응을 얻었으며 2개 검체는 흡광도 2.5 이상의 강한 반응을 보였다. 음성 대조군으로 사용한 3개의 검체는 모두 음성으로 판찰되었다(Fig. 1).

### 2. 세 검사방법 간의 양성을

63검체의 혈청에서 측정한 혈소판 항체 검사에서 MACE법으로는 32%, 효소면역법은 30%, 유세포 분석기를 이용한 면역형광법으로는 14%의 양성을 보았다(Table 2).

### 3. MACE 검사결과

총 63개의 검체중 20검체가 양성으로 판독되어 32%의 양성을 보였다. 이를 중 5검체는 당단백 IIb/IIIa에, 4검체는 당단백 Ib/IX에, 그리고 나머지 11검체는 양쪽 당단백 모두에 반응을 보여 각각 25%, 20%, 55%의 비율로 검출되었다. 질환별로는 특발성 혈소판감소증 자반증 환자에서는 36%의 양성을 보였으며, 임신을 동반한 혈소판감소증 자반증 환자의 경우 33%의 양성을 보였다. 비면역성 혈소판감소증으로 분류되는 패혈증에서는 25%의 양성을 보였고, 수술후 대량수혈로 인한 혈소판감소증(dilutional thrombocytopenia)로 추측되는 개심술 환자 등이 포함된 기타 질환군에서도 14%의 양성을 보였다(Table 3).

### 4. Thrombomatch EIA 검사결과

63개의 검체 중 19검체가 양성으로 판독되어

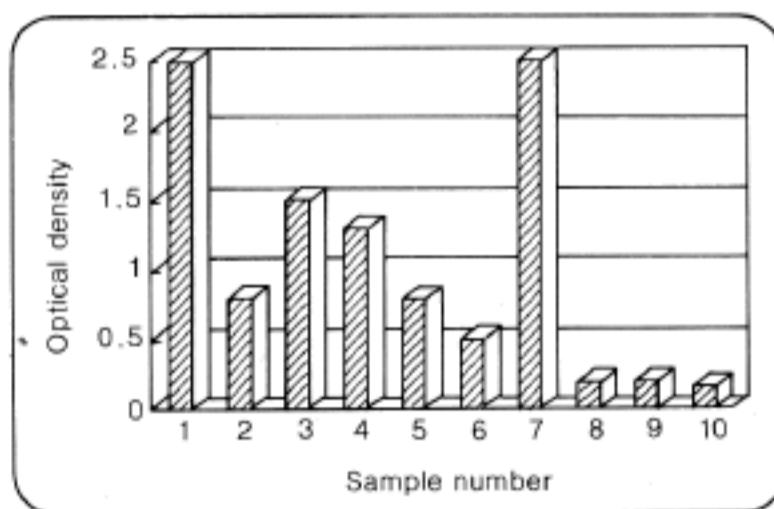


Fig. 1. The detection of antiplatelet antibodies using Thrombomatch EIA in the sera containing anti-PI<sup>A1</sup>. Anti-PI<sup>A1</sup> positive sample (1~7), negative control(8~10).

Table 2. Comparison of the Three Assays for the Detection of Platelet Antibodies in Sera (n=63)

|                  | MACE | Thrombomatch EIA | Flow cytometry |
|------------------|------|------------------|----------------|
| Positive         | 20   | 19               | 9              |
| Negative         | 43   | 44               | 54             |
| Positive rate(%) | 32   | 30               | 14             |

혈소판감소증 환자에서 혈소판 항체 검출을 위한 Modified Antigen Capture ELISA 방법의 적용

Table 3. The Detection of Antiplatelet Antibodies using the MACE

| Diagnosis               | No. of sera<br>tested | No. of positive sera against anti- |          |      |          |
|-------------------------|-----------------------|------------------------------------|----------|------|----------|
|                         |                       | GP IIb/IIIa                        | GP Ib/IX | Both | Total(%) |
| Chronic ITP             | 11                    | 2                                  | 1        | 1    | 4(36)    |
| ITP with pregnancy      | 6                     | 1                                  | —        | 1    | 2(33)    |
| Solid tumor             | 8                     | 1                                  | —        | 2    | 3(38)    |
| Acute leukemia/lymphoma | 12                    | —                                  | —        | 3    | 3(25)    |
| Sepsis                  | 8                     | 1                                  | 1        | —    | 2(25)    |
| Liver cirrhosis         | 8                     | —                                  | 1        | 3    | 4(50)    |
| End stage renal disease | 2                     | —                                  | —        | 1    | 1(50)    |
| Others                  | 7                     | —                                  | 1        | —    | 1(14)    |
| Total                   | 63                    | 5                                  | 4        | 11   | 20(32)   |

Table 4. The Detection of Antiplatelet Antibodies using the Thrombomatch EIA

| Diagnosis               | No. of sera tested | No. of positive sera(%) |
|-------------------------|--------------------|-------------------------|
| Chronic ITP             | 11                 | 3 (27)                  |
| ITP with pregnancy      | 6                  | 3 (50)                  |
| Solid tumor             | 8                  | 1 (13)                  |
| Acute leukemia/lymphoma | 12                 | 2 (17)                  |
| Sepsis                  | 8                  | 2 (25)                  |
| Liver cirrhosis         | 8                  | 4 (50)                  |
| End stage renal disease | 2                  | 1 (50)                  |
| Others                  | 7                  | 3 (43)                  |
| Total                   | 63                 | 19 (30)                 |

Table 5. The Antiplatelet Antibody Tests by Flow Cytometry in Positive Samples by MACE and Thrombomatch EIA

| Sample<br>No. | Clinical diagnosis              | Flow cytometry |          |
|---------------|---------------------------------|----------------|----------|
|               |                                 | Direct         | Indirect |
| 1             | Chronic ITP                     | —              | —        |
| 2             | Chronic ITP                     | +              | —        |
| 3             | ITP with pregnancy              | +              | —        |
| 4             | Acute myelogenous leukemia      | +              | —        |
| 5             | Brain tumor                     | —              | —        |
| 6             | Liver cirrhosis                 | +              | +        |
| 7             | Hepatocellular carcinoma        | —              | +        |
| 8             | End stage renal disease         | —              | —        |
| 9             | Unknown origin thrombocytopenia | +              | —        |

30%의 양성을 보였고 각종 질환에 대한 양성을 Table 4에 요약하였다.

### 5. MACE와 Thrombomatch EIA 검사와의 일치율

두가지 검사법으로 모두 양성이거나 음성으로 판독된 검체수는 각각 9개와 35개로 두 검사 간의 일치율은 70%이었다. MACE법에서는 양성이면서 Thrombomatch EIA법에서 음성으로 판독된 검체가 9검체였고, MACE법에서는 음성이었으나 Thrombomatch EIA법에서 양성인 검체는 11검체였다.

### 6. MACE법과 Thrombomatch EIA법에서 양성으로 판독된 9검체에 대한 유세포 분석기를 이용한 면역형광법 결과

유세포 분석기를 이용한 혈청내 혈소판 항체 검사 결과 9검체 중 2검체만이 양성이었고, 혈소판 결합항체(platelet associated IgG) 측정 결과 6검체에서 양성이었다(Table 5).

## 고 찰

특별성 혈소판감소증 환자에서 혈소판 항체의 검출률은 급성과 만성, 질환의 진행정도, 면역억제제의 투여여부, 비장절제술 시행여부 등에 따라 10~76%까지 다양하게 보고되고 있다<sup>6, 7)</sup>. 특히 혈청 내에서 검출되는 자가항체는 혈소판과 먼저 결합하고 남은 여분이 혈청에서 검출되는 것으로 혈소판결합항체를 측정하는 것보다 혈청을 대상으로 검사하는 경우 그 양성을 낮아진다. 그러나 혈소판 보다 혈청이 보존과 처리가 용이하므로 혈소판 항체 검사의 검체로 혈청이 많이 이용되고 있다.

본 연구에서는 혈소판수가  $100 \times 10^9/L$  이하의 63명의 혈소판감소증 환자로부터 임상병리과에 혈소판 항체가 의뢰된 혈청에서 혈소판 항체를 검출한 결과, MACE법으로 32%, Thrombomatch EIA 법으로 30%, 유세포 분석기를 이용한 면역형광법으로 14%의 양성을 얻었다. 이중 유세포 분석기에 의한 면역형광법의 양성을 14%로 그 민감도

가 MACE법과 상품화된 효소면역법보다 낮았는데 이는 국내와 외국에서 유세포 분석기를 이용하여 혈청에서 혈소판 항체를 측정하여 보고한 양성을 유사한 수치였다<sup>6, 7, 12, 18)</sup>. MACE법과 Thrombomatch EIA법 모두에서 양성을 보인 9검체에 대하여 유세포 분석기를 이용하여 혈소판 항체를 검사하였을 때 2검체에서만 혈청에서 혈소판 항체가 검출되었지만 혈소판결합항체 검사에서는 6검체에서 양성을 보여 혈청으로 시행하는 검사방법 자체의 민감도가 낮음을 확인할 수 있었다.

자가면역성 혈소판감소증 환자에서 혈소판막의 당단백과 혈소판 항체의 결정기 항원의 연관성이 밝혀진지 10년이 넘었다<sup>2, 3)</sup>. 이런 당단백의 특이성에 대한 혈소판 항체 검출방법은 각 당단백에 대한 단클론 항체를 이용한 immunobead법<sup>15)</sup>, monoclonal antibody immobilization of platelet antigens (MAIPA)<sup>18)</sup>법 외에도 최근에는 MACE법<sup>14, 19)</sup>이 가장 민감한 방법으로 받아 들여지고 있다. 국내에서는 엄태현 등<sup>14)</sup>이 MACE법을 처음 보고한 바 있으나, 본 연구에서는 2차 항체로 biotin이 부착된 anti-human IgG와 avidin complex로 항원항체 반응을 증폭시킴으로써 엄태현 등<sup>14)</sup>의 방법에 비해 그 민감도를 높인 것이 특징이라 하겠다. 그외 rifampin에 의한 면역성 혈소판감소증 환자에서 MACE법을 이용하여 당단백 IIb/IIIa와 당단백 Ib/IX에 대한 혈소판 항체를 증명한 중례 1례가 보고된 바 있다<sup>20)</sup>.

MACE법은 63검체중 20개의 혈청에서 양성을 보여 32%의 양성을 얻었다. 특발성 혈소판감소증 자반증 환자에서는 35%의 양성을 얻었는데 이는 외국에서 보고되고 있는 양성을 유사한 소견이었다<sup>4, 6, 7)</sup>. 그러나 보고자마다 조금씩 의견의 차이는 있으나 당단백 IIb/III에 대한 항체빈도가 당단백 Ib/IX에 대한 빈도보다 약간 높다고 보고<sup>5)</sup> 되는데 반하여 본 연구에서는 동시에 두 당단백에 대한 항체가 검출되는 빈도(55%)가 더 높게 관찰되었다. 하지만 당단백에 대한 혈소판 항체의 성상이 갖는 임상적 또는 병리학적인 의의가 아직 확실히 정립되지 않아<sup>2, 3, 5~7)</sup> 이에 대한 추가적인 연구

가 국내에서도 계속되어야 할 것으로 생각되었다.

본 연구에서는 특발성 혈소판감소성 자반증 외에도 소모성 혈소판감소증으로 분류되는 감염증이나 간질환이 동반된 환자의 혈청에서도 혈소판 항체가 양성인 경우가 관찰되어(25%) 이에 대한 위양성 여부의 판단이 필요하였다. 그러나 이들 환자의 대부분에서 혈소판수가  $100 \times 10^9/L$  이하였고, 환자의 병력 조사상 다회의 혈소판 수혈을 받은 과거력이 있었으므로 1회의 혈소판 항체 검사만으로 MACE검사의 위양성 여부를 항체의 성상 및 임상증상과 연관지어 해석하기에는 한계가 있었다. Thrombomatch EIA검사에서도 동일한 결과를 얻었는데 이는 일반적으로 고면역글로불린증의 환자에서 혈소판 항체가 비특이적으로 검출될 수 있는 것과 같이 일반적인 효소면역법이 갖는 위양성률을 감안하여 해석해야 할 것으로 여겨진다.

한편 Thrombomatch EIA법과 MACE법 간의 불일치율(30%)도 높았는데, 혈소판 항체 검사의 표준방법이 없는 현재로서는 이 불일치를 확인할 방법이 없었다. MACE법은 biotin-avidin 증폭을 이용하므로 통상적인 효소면역법보다 민감도가 높을 것으로 예상되지만 혈소판 당단백에 대한 특이항체만을 검출하고, Thrombomatch EIA법으로는 혈소판 특이항체외에도 항-HLA 항체까지도 검출된다. 따라서 MACE법에서 양성이고 Thrombomatch EIA법에서 음성인 경우는 예민도 차이이고, MACE법에서 음성으면서 Thrombomatch EIA법에서 양성인 경우에는 항-HLA 항체가 검출된 것으로 해석할 수 있겠으나 이는 림프구 세포독성검사(lymphocytotoxicity)를 시행하거나 Western blot법으로 혈청내의 혈소판 항체의 존재 유무를 확인하여야만 해석이 가능할 것이다. 본 연구에서도 두 검사 간에 불일치를 보이는 일부 검체에 대해 Western blot검사를 시행하였으나 도움을 줄 만한 결과를 얻지 못하였는데 Western blot법이 특이도는 높지만 민감도가 떨어지는 특성 때문으로 사료된다(data not shown).

결론적으로 아직까지 혈청 혈소판 항체검사법 중 가장 좋은 방법이라고 제시할 수 있는 방법은 없다. 그러나 MACE법은 단클론 항체를 보유하여

야 하고 시간과 노력이 많이 드는 검사법이므로 통상적인 혈소판 항체검사로서 이용되기보다는 혈소판 항체의 당단백 특이성을 밝혀야 하는 신생아 면역성 혈소판감소증, 자가면역성 혈소판감소증 등과 같은 질환에서 의의가 있는 검사로 생각되었다. Thrombomatch EIA는 그 방법이 일반적인 효소면역법과 유사하고 항-HLA 항체도 검출할 뿐 아니라 재현성도 좋아 일반 검사실에서 혈소판 항체 선별용 검사로 사용할 수 있을 것으로 생각되었다. 또한 유세포 분석기를 이용한 면역형광법은 유세포 분석기만 갖추면 쉽게 시행할 수 있지만 혈청에서의 항체 검출률이 너무 낮으므로 혈소판결합항체에 대한 검사에 사용하도록 권장하고 싶다. 따라서 혈소판 항체를 규명하기 위해서는 민감도와 특이도가 우수한 방법이 개발될 때까지 위의 세가지 검사방법을 모두 이용하여 연구와 해석을 진행하여야만 비교적 좋은 결과를 얻을 수 있을 것으로 사료되었다.

## 요 약

**연구배경 :** 최근 예민도와 특이도가 높은 방법으로 외국에서 가장 각광을 받고 있는 혈소판 항체 검사방법은 modified antigen capture ELISA (MACE)법으로 이를 이용하여 혈소판감소증 환자의 혈청에서 혈소판 항체를 측정하였다. 또한 MACE 검사방법의 신뢰도를 평가하기 위하여 상품화되어 유럽에서 새로 소개된 Thrombomatch EIA법과 유세포 분석기를 이용한 면역형광법으로 동일한 검체에 대하여 혈소판 항체를 측정하였다.

**방 법 :** 연세의대 신촌세브란스병원 임상병리과로 혈소판 항체 검사가 의뢰된 혈청 63검체에 대해 혈소판 항체 검사를 시행하였다. MACE법 : 단클론항체로 anti-glycoprotein IIb/IIIa와 anti-glycoprotein Ib/IX을 사용하였고 conjugate로는 biotin이 부착된 anti-human IgG를 사용하였다. 반응의 증폭을 위해 avidin-biotin-alkaline phosphatase substrate를 사용하였다. Thrombomatch EIA법 : 환자의 혈청(혈장)을 kit에서 공급된 microplate에 50 $\mu$ L

썩 분주하고 O형 혈소판과 반응시킨 후 peroxidase anti-human IgG conjugate와 기질용액을 첨가하여 492nm에서 흡광도를 측정하였다. Flow cytometry 를 이용한 면역형광법 : 혈소판을 1% paraform-aldehyde로 고정한 후  $2 \times 10^7$ 개의 혈소판과 환자의 혈청을 반응시킨 후 FITC-F(ab')<sub>2</sub> goat anti-human IgG를 반응시키고 FACScan을 사용하여 판독하였다.

**결과 :** MACE법으로 anti-PI<sup>A1</sup>이 확인된 7개의 양성대조혈청을 Thrombomatch EIA법으로 검사한 결과 모두 양성을 보여 100% 일치율을 보였다. 각종 혈소판감소증 63명의 환자 혈청으로 시행한 혈소판 항체 검사의 양성률은 MACE법으로는 32%, Thrombomatch EIA법으로는 30%, flow cytometry 법으로는 14%였다. MACE법에서 양성으로 판독된 20검체 중 5검체는 당단백 IIb/IIIa에 대하여, 4검체는 당단백 Ib/IX에 대하여, 나머지 11검체는 양쪽 당단백 모두에 대하여 양성을 보였다. 질환별로는 특발성 혈소판감소성 자반증 환자에서 36%의 양성률을 보였고 비면역성 혈소판감소증으로 분류되는 패혈증에서는 25%의 양성률을 보였으며 수술 후 대량수혈로 인한 혈소판감소증으로 추측되는 개심술 환자가 포함된 기타 질환군에서는 14%의 양성률을 보였다.

**결론 :** 결론적으로 세 방법 중 혈청 혈소판 항체 검사법으로 가장 좋은 방법이라고 제시하기에는 각각의 장단점을 갖고 있었다. 따라서 혈소판 항체를 규명하기 위해서는 민감도와 특이도가 우수한 방법이 개발될 때까지 위의 세 가지 검사법을 모두 이용하여 연구와 해석을 진행하여야만 비교적 좋은 결과를 얻을 수 있을 것으로 사료되었다.

## 참 고 문 헌

- Mueller-Eckhardt C, Kiefel V: *Laboratory methods for the detection of platelet antibodies and identification of antigens*. In Kunicki T, George J, eds. *Platelet immunology. Molecular and clinical aspect*. Philadelphia, JB Lippincott Co, 1989, pp436-453
- Woods VL, Oh EH, Mason D, McMillan R: *Autoantibodies against the platelet glycoprotein IIb/IIIa complex in patients with chronic ITP*. *Blood* 63:368-375, 1984
- van Leeuwen EF, van der Ven JTH, Engelfriet CP, von dem Borne AEGK: *Specificity of autoantibodies in autoimmune thrombocytopenia*. *Blood* 59:23-26, 1982
- Kiefel V, Santoso S, Mueller-Eckhardt C: *Serologic, biochemical, and molecular aspects of platelet autoantigens*. *Semi Haematol* 29:26-33, 1992
- Kiefel V, Santoso S, Kaufmann E, Mueller-Eckhardt C: *Autoantibodies against platelet glycoprotein Ib/IX: a frequent finding in autoimmune thrombocytopenic purpura*. *Br J Haematol* 79:256-262, 1991
- Nomura S, Yanabu M, Soga T, Kido H, Fukuroi T, Yamaguchi K, Nagata H, Kokawa T, Yasunaga K: *Analysis of idiopathic thrombocytopenic purpura patients with antiglycoprotein IIb/IIIa or Ib/IX autoantibodies*. *Acta Haematol* 86:25-30, 1991
- Hou M, Stockelberg D, Kutti J, Wadenvik H: *Antibodies against platelet GP Ib/IX, GP IIb/IIIa, and other platelet antigens in chronic idiopathic thrombocytopenic purpura*. *Eur J Haematol* 55:307-314, 1995
- Hewitt J, Burton IE: *Incidence of autoantibodies to GP IIb/IIIa in chronic autoimmune thrombocytopenic purpura may be overestimated by the MAIPA*. *Br J Haematol* 86:418-420, 1994
- 김현옥, 김진주, 김현숙, 권오현, 이삼열: 혈소판 항체 검출을 위한 세 가지 검사결과의 검토. 대한수혈학회지 2:11-18, 1991
- 한규섭, 박명희, 김현옥: 혈소판 항체 검출법의 비교 -면역형광법, 혈구응집법 및 효소면역 검사법-. 대한수혈학회지 2:1-9, 1991
- 지현숙: *Flow cytometry*를 이용한 antiplatelet

혈소판감소증 환자에서 혈소판 항체 검출을 위한 Modified Antigen Capture ELISA 방법의 적용

- antibody 측정법. 대한임상병리학회지 11:233-236, 1991
- 12) 위재호, 김경희, 김아성, 정기철, 한진영, 김정만: 유세포 분석기를 이용한 혈소판 항체에 관한 연구. 대한임상병리학회지 15:317-326, 1995
- 13) Kim HO, Kennedy SD, Kickler TS: Studies using immobilized platelet glycoproteins for detection of platelet alloantibodies. Am J Clin Pathol 104:258-263, 1995
- 14) 염태현, 한규섭, 김대칠, 황유성, 김두성, 김상인: 변형항원포획 효소면역검사법(MACE)을 이용한 혈소판 특이항체의 검출. 대한수혈학회지 6:123-129, 1995
- 15) Menitove JE, Pereira J, Hoffman R, Anderson T, Fried W, Aster RH: Cyclic thrombocytopenia of apparent autoimmune etiology. Blood 73:1561-1569, 1989
- 16) Uthemann H, Goy C, Lenhhaar V: Thrombomatch-enzyme immunoassay for the detection of antibodies to platelets. In manual of Biostest AG, 1994
- 17) Ault KA: Flow cytometric analysis of platelet. In Kenneth DB, Ricardo ED, T.Vincent S eds, Clinical flow cytometry. 1st ed, Baltimore, Williams & Wilkins 1993, pp97-126
- 18) Kiefel V, Santoso S, Weisheit M, Mueller-Eckhardt C: Monoclonal antibody specific immobilization of platelet antigens (MAIPA): A new tool for the identification of platelet reactive antibodies. Blood 70:1722-1726, 1987
- 19) Furihata K, Nugent DJ, Bissonette A, Aster RH, Kunicki TJ: On the association of the platelet specific alloantigen, Pen<sup>a</sup>, with glycoprotein IIIa. Evidence for heterogeneity of glycoprotein IIIa. J Clin Invest 80:1624-1630, 1987
- 20) 강명서, 오도현, 김현옥: 혈소판 glycoprotein Ib/IX 및 IIb/IIIa에 특이한 항체를 보인 Rifampin에 의한 혈소판 감소증 1례. 대한혈액학회 춘계학술대회 초록 204, 1996