

장기이식분야에서 새로운 HLA 검사법의 중요성

계명대학교 의과대학 임상병리학교실 및 의과학 연구소

전 호진

서 론

HLA 복합체는 4,000 Kb 크기의 고도의 다형성을 보이는 유전자로서 각 대립인자는 class I 과 class II 분자를 coding한다(Begovich and Erlich, 1995). 장기이식에 있어서 donor와 recipient 사이에 조직적 합성의 중요성은 오래 전부터 인지되어 왔다. Recipient와 donor의 HLA 분자가 이질적인 경우 면역학적인 반응에 의해 이식장기가 파괴되는 현상인 거부반응을 보인다. 근자에는 혈청형(microlymphocytotoxicity) 검사와 혼합림프구반응(mixed lymphocyte reaction, MLR) 검사 등의 HLA 분석 기술이 향상되고, 또한 혈소판 수혈, 면역억제제, 효과적인 항생제 등의 장기이식의 보조요법이 개발됨에 따라 장기이식술이 비약적으로 발전되었다(Zmijewski, 1994). 그러나 핵가족현상으로 unrelated donor에 의한 장기이식의 빈도가 증가하면서 혈청형 검사 및 MLR 검사의 문제점이 대두되었다 Unrelated pair 간의 골수이식에 있어서는 graft vs host reaction(GVHD)이 매우 심각한 합병증인데 혈청학적 검사와 MLR은 이를 정확히 예측하지 못한다(Antun and Smith, 1995 ; Mickelson et al, 1993).

최근 분자생물학의 급속한 발전으로 HLA 유전자의 DNA 염기서열과 각 allele의 특성이 밝혀지고 (Marsh and Bodmer, 1992), 중합효소연쇄반응(polymerase chain reaction, PCR) 등의 분자생물학적 기법이 발전함에 따라 HLA 유전형 검사가 가능하게 되었다(Saiki et al, 1989). DNA법에 의한 HLA 형별 검사는 모든 HLA allele을 정확하게 분석할 수 있으며, 신속, 간편하게 개선되어 장기이식분야에 있어서 임상적 활용이 보편화되고 있는 추세이다. PCR에 의한 HLA 유전형 검사는 골수이식에 있어서 GVHD를 예측, 예방할 수 있는 분석법으로 평가되고 있으며(McCullough et al, 1989), 신 이식 분야에서 면역억제제의 효과가 입증된 현 시점에서도

DNA법에 의한 정확한 HLA matching이 중요하다는 보고가 증가하고 있다(Leivestad et al, 1992).

이와 같이 분자생물학적 방법에 의한 새로운 HLA 분석 방법이 장기이식분야에 이용됨에 따라 HLA 와 장기이식의 관련성에 대한 이해의 폭이 넓어지고, 임상적인 활용의 범위가 확대 일로에 있다. 이에 저자는 최근까지 밝혀진 MHC 항원과 유전자의 구조 및 특성을 소개하고, 장기이식분야에서 새로운 HLA 검사기법과 그 임상적 활용에 대하여 설명하고자 한다.

MHC 항원과 유전자의 구조 및 특성

HLA 유전자는 제6번 염색체의 단완에 위치하며, class I과 class II의 두 종류 세포표면 단백분자를 코딩한다. 이들 단백분자는 항원과 결합함으로써 펩타이드 형태로 T세포에 제시한다. 이러한 제시과정은 세포성 면역과 체액성 면역의 개시반응의 필수적인 요소이다.

HLA-A, HLA-B 및 HLA-C 등의 class I 분자는 모든 유핵세포 표면에 존재하는 glycoprotein으로서 virus 혹은 암세포 펩타이드 등의 내인성 단백과 결합함으로서 CD8+ T세포에 제시한다. Class I glycoprotein은 이종이중체(heterodimer)로서 HLA 유전자에 코딩된 α 사슬과 비 MHC 유전자에 의해 코딩된 $\beta 2$ -microglobulin 사슬로 구성되어 있다. $\beta 2$ -microglobulin에는 다형성이 없고 α 사슬 유전자는 고도의 다형성을 보이는데 비교적 변화가 적은 frame work 사이에 집중되어 있으며, 주로 exon 2와 exon 3 부위의 염기서열이 상이하다(Bodmer et al, 1994). 이들 exon은 펩타이드가 결합하는 class I 분자의 세포외부 domain을 코딩하며, X-선으로 HLA class I 분자의 결정구조를 분석한 결과 다형성 부위에 펩타이드가 결합할 수 있도록 cleft를 형성하여 항원 혹은 T-세포 수용체와 직접 반응하는 것으로 밝혀졌다(Bodmer et al, 1994 ; Madden et al, 1992). (Fig.1.)

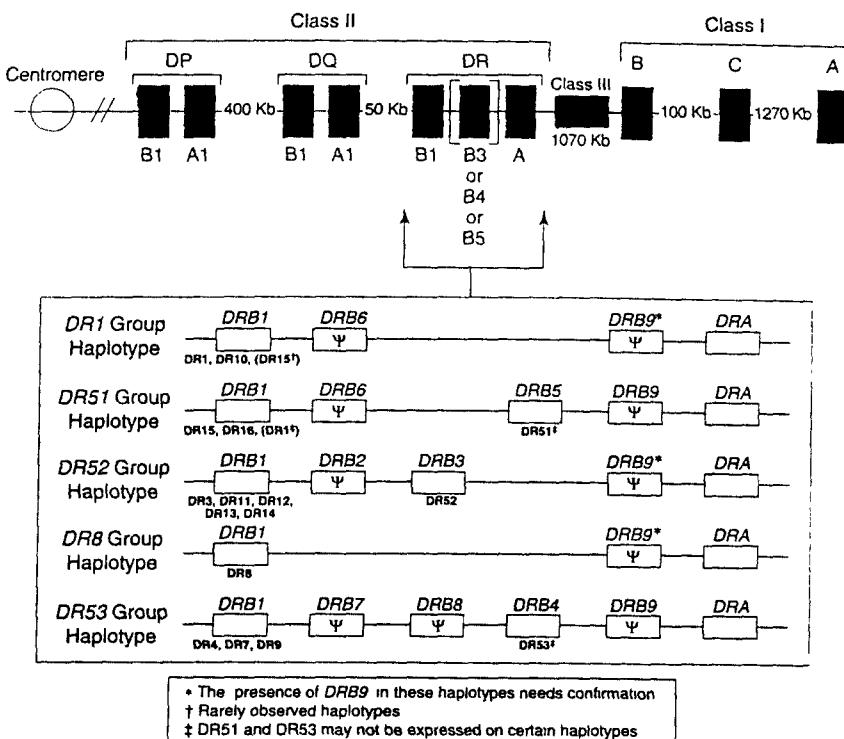


Fig 1 Map of the expressed genes of the HLA class I and Class II regions. The insert below shows the genomic organization of the HLA-DR region. The serologic specificities encoded by a gene appear underneath in boldface type. ψ indicates nonexpressed genes. (Adated from Bodmer JGY, Marsh SGE, Albert ED, et al 'Nomenclature for factors of the HLA system, 1994 Vox Sang 1994 ; 67 : 412-430)

Class II 분자는 HLA-D 유전자에 의해 코딩되며, 이종이중체구조의 세포표면 glycoprotein으로서 α 와 β 사슬로 구성되어 있고 B세포 및 탐식구 등의 항원제시 세포에서만 선택적으로 표현된다. Class I 애시와 같이 class II 분자도 웹타이드 수용체 역할을 담당하는데, 주로 세균 등에서 유래한 세포막 혹은 세포외 단백과 결합하여 CD4+ T세포에 제시한다. HLA-D 부위에는 여러 종류의 class II 유전자가 존재하는데 HLA-DR, HLA-DQ 및 HLA-DP 등이 있으며, HLA-DQ와 HLA-DP 영역에는 각각의 α 와 β 사슬 분자를 coding하는 유전자가 속해 있다(Begovich and Erlich, 1995). DR 분자는 DRA와 DRB 유전자에 의해 코딩되며, DRB1 유전자에는 두 가지의 특징이 있다. 첫 번째 특징으로는 DRB1 유전자에는 높은 빈도의 다형성(polymorphism)이 관찰되는데, 염기서열 분석 결과 현재까지 약 100여개의 DRB1 allele(DRB1*0101 -

DRB1*1001)이 확인되었으며, DR1에서 DR18까지 특이 혈청형이 정의되어 있다(Bodmer et al 1994; Marsh and Bodmer, 1992). DRB1 유전자의 주요 다형성 부위는 두 번째 exon의 9-13, 26-33과 67-74로서 주로 codon 3 영역에 집중되어 있으며, 각 allele간에는 이 다형성 부위의 염기서열이 동일한 경우가 흔히 있다(Bell et al, 1987) 또 다른 특징은 제2의 DRB 유전자(2nd expressed DRB)인 DRB3, DRB4와 DRB5는 DRB1과 서로 멀접한 관련성이 있어서 이 두 유전자는 동시에 발현(coexpression)된다(Bodmer et al, 1994). DR2(DR15와 DR16) 혈청형을 coding하고 있는 DRB1유전자는 DR51 분자를 coding하고 DRB5 유전자와 연결되어 있으며, DR3 (DR17과 DR16), DR5 (DR11과 DR12) 및 DR6(DR13과 DR14) 혈청형을 coding하고 있는 DRB1유전자는 DR53 분자를 coding하고 어떠한 제2의 DRB 유전자와도 연결되어있지 않다 DRB1-DRB3/B4/

B5의 상호관계는 HLA 검사실에서 정확한 DR형 판정을 위한 기준으로 삼고 있다(Olerup et al, 1992) (Fig.1.).

장기이식과 HLA 적합성 검사

1. 고형 장기이식

장기이식에 있어서 HLA-A, -B, -C matching이 중요하다는 것은 주지의 사실이나 HLA-DR형의 중요성에 대해서는 현재 논란의 여지가 많다. 1980년 이전의 보고(Ting and Morris, 1978)에 의하면 사체 신 이식의 경우 HLA-DR형이 HLA-A, -B, -C형에 비해 이식장기의 생존에 보다 중요한 영향을 미치는 것으로 보고되었다 그러나, 효과적인 면역억제제로 알려진 cyclosporine(CyA)이 임상적으로 사용된 이후인 1983년과 1986년 사이의 보고(Lundgreen et al, 1986)에 의하면 HLA-matching이 이식장기의 장기생존률에는 큰 영향을 미치지 않고, 다만 HLA가 불일치하였을 경우 급성거부반응의 빈도가 다소 증가한다고 하였다. 그러나, 최근의 보고(Leivstad et al, 1992)에 의하면, HLA-DR 형이 일치한 신 이식에서 이식장기의 장기생존률이 85%로서, HLA-DR 형이 불일치한 경우의 78%보다 높아 HLA-DR matching이 이식장기의 장기생존률을 결정하는 중요한 요인으로 새로이 인식되고 있다.

장기이식을 고려할 때 HLA-matching은 중요시하고 ABO matching은 간과하기 쉽다 그러나 거부반응과 관련된 항원 중 ABO 혈액형 항원이 가장 강력하고 심각한 결과를 미신다 ABO 항원은 적혈

구는 물론 중추신경계 세포를 제외한 인간의 모든 조직세포막에 존재한다 ABO 항체는 환경요소의 자극으로 자연면역에 의해 획득되므로 ABO 부적합 장기이식의 경우 이식장기의 혈관 내피세포의 항원과 강력하게 반응하여 초급성거부반응(hyperacute rejection)을 야기한다. 그러므로 장기이식에 있어서 ABO 적합성은 수혈에서와 같은 비중으로 중요시해야된다(Starzl et al, 1964).

가. 신장이식

CyA 등의 면역억제제가 신 이식에 사용됨으로써 이식신의 생존율은 10~15% 연장시키는 효과가 있다고 알려져 있으며, 이에 따라 HLA-matching이 과거보다는 크게 중요시되지 못하고 있다. 그러나 최근에는 또다시 HLA class II matching이 장기이식의 결과에 미치는 영향이 크다는 보고가 늘고 있다(Kobayashi et al, 1993; Leivstad et al, 1992; Leivstad et al, 1994; Poli F et al, 1995) 이와 같은 현상은 최근에 HLA 검사법과 교차시험법 기술적으로 향상되었고, 면역자기(immuno-magnetic)법 등의 B세포 분리 기술의 발전으로 보다 정확한 HLA class II matching이 가능해졌기 때문인 것으로 생각된다(Fig.2). 그러나 혈액투석환자에 있어서는 B세포 분리가 힘들며, 백혈병 환자, 요독증 환자 및 사체 donor에서는 HLA 항원의 발현이 낮거나 비정상적으로 표현되는 항원이 있으며, HLA 혈청형 간에 교차반응의 빈도가 높기 때문에 혈청학적인 방법에 의한 HLA형 검사의 오판율은 아직도 25%에 이르고 있다(Marsh et al, 1990; Papola et al, 1993). (Fig.3, Table 1.) 이에 따라 혈청학적 HLA 검사를

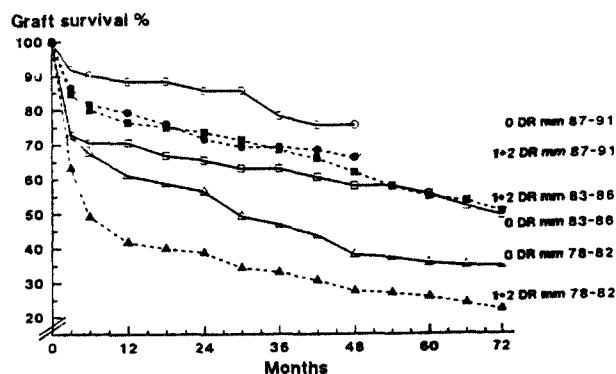


Fig 2 Actuarial survival of DR-matched (unbroken lines) and DR-mismatched (broken lines) first-cadaveric grafts performed in 1978 to 1982(○, n=126; ▲, n=163), 1983 to 1986(□, n=81; ■, n=215), and 1987 to 1991(○, n=111; ●, n=281) (Adapted from Leivstad G, Sodal G, Fratule A et al 'Role of HLA matching in cadaveric renal transplantation-Influence of improved serologic HLA-DR typing Transplant Proc 1993; 25: 220-221)

대신할 수 있는 보다 신뢰성이 높은 검사방법이 요구되고 있다(Poli F et al, 1995)

신 이식에서의 donor의 유형은 living related donor와 사체 donor로 구분할 수 있는데, donor의 유형에 따라 HLA matching의 해석에 주의를 요한다. Living related pair에서는 각 HLA 유전자의 두 allele은 부모로부터 각각 한 개씩을 물려받게 되므로 형제사이에서 HLA가 일치할 수 있는 확률은 1/16 정도이며, 이 경우 두 형세의 allele은 유전형과 혈청형이 완전히 동일하다 그러나 unrelated donor인 사체 donor와 환자의 경우 HLA 혈정이 동일하여도 HLA 유전자형이 반드시 동일하다고는 볼 수 없다 따라서 related pair에서는 혈청형 검사로도 HLA-matching이 가능하지만, unrelated pair에서는 같은 혈청형 내에 여러 종류의 유전형이 존재할 수 있으므로 HLA-matching은 DNA법으로 실시하는 것

이 바람직하다(Table 2).

Living related donor에 의한 신 이식에 있어서 HLA-A-B-DR haplotype의 일치정도에 따라 이식장기(grafts)의 생존율을 보면 백인의 경우 일치정도가 높을수록 이식장기의 생존율이 높다 흑인의 경우 HLA 일치정도에 따른 이식장기의 생존율의 상대적 차이는 백인과 유사한 경향을 보이고 있으나 백인에 비해 전반적인 생존율은 매우 낮은데, 이는 혈청분석에 의한 HLA형별 검사가 흑인의 HLA 항원형을 정확히 구명하지 못했기 때문인 것으로 생각된다 그러나 사체 장기이식에서와 같이 living related donor의 장기이식에서도 백인에 비해 장기생존율이 낮은 현상이 관찰되므로 소위 'center effect', 생리적인 차이 혹은 환자의 유순도(compliance) 등에 의한 영향도 배제할 수 없다(Cicciarelli, 1989a)

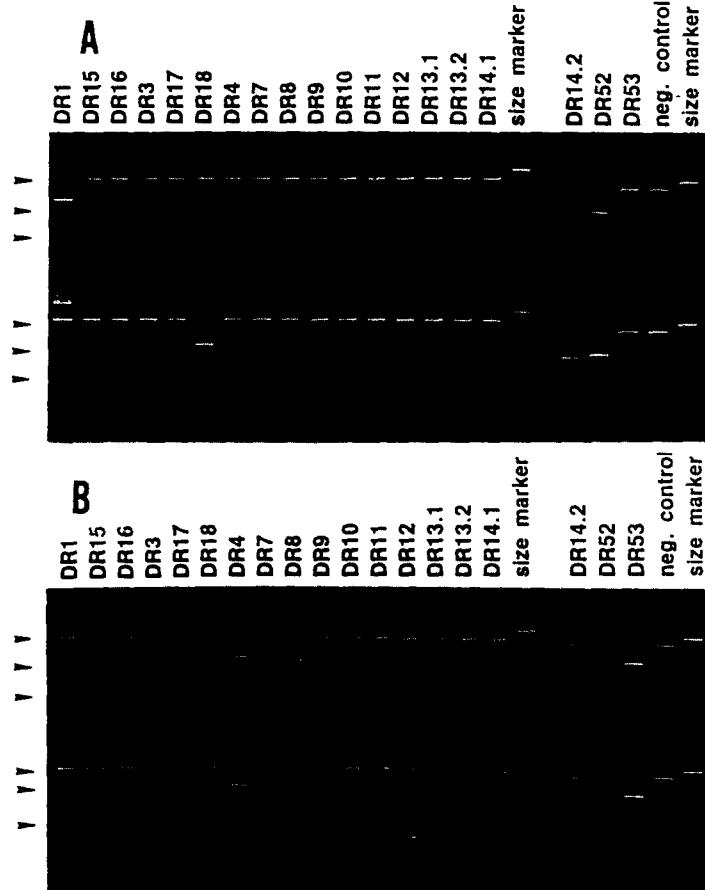


Fig 3 Illustration of the HLA-DR "low resolution" PCR-SSP typing using peripheral blood of kidney transplant donors or recipients, of which HLA-DR superspecificity was typed as (A) DR52 group, (B) DR53 group

사체 신 이식의 경우 HLA-A, -B 일치정도가 이식장기의 장기생존율에 영향을 미치는 것으로 알려져 있으며, HLA-DR은 급성거부반응과 주로 관련이 있으나 HLA-A, -B에 의한 장기생존률에 대해 가중 적인 영향을 미친다는 보고도 있다(Cho and Terasaki, 1989). HLA matching은 신 이식에 실

쾌한 경험이 있는 환자에서 특히 중요시되는데, HLA가 부적합한 경우 과거에 생성된 소위 '전구형성항체(preformed antibody)'에 의해 심한 거부반응을 초래하게 된다(high responder)

HLA-A, -B, -DR 항원간에는 거부반응을 야기하는 면역능의 상대적인 차이가 있을 수 있다 임

Table 1 Discrepancy in HLA-DR type between serology and PCR-SSP
(Total Number of tested=100)

| Serology | PCR-SSP | No of cases | Total(N=29) |
|---------------------------------------|--|-------------------|-------------|
| Initial PCR failure | | | 0 |
| Serology failure | | | 4 |
| DR/DR ? | DR14/DR15 DR4/DR12 DR4/- DR1/DR14 | 1 1 1 1 | |
| Allele missed by serology | | | 18 |
| DRx/- | DRx/DR8 DRx/DR13 DRx/DR4 DRx/DR11 | 10 5 2 1 | |
| Allele wrongly assigned by serology | | | 4 |
| DR4/- DR13 | DR4/- | 1 | |
| DR1/DR13 | DR1/DR14 | 1 | |
| DR4/DR13 | DR4/DR8 | 1 | |
| DR13/- | DR4/18 | 1 | |
| Allele split not assigned by serology | | | 3 |
| DR4/DR6 | DR4/DR13 | 1 | |
| DR7/DR6 | DR7/DR13 | 1 | |
| DR11/DR2 | DR11/DR15 | 1 | |

Table 2 Nomenclature of DR4 alleles

| HLA Allele(SSOP) | HLA-DR type(Serologic) | HLA-D-Associated specificity (T-Cell Defined) |
|------------------|------------------------|--|
| DRB1 * 0401 | DR4 | DW4 |
| DRB1 * 0402 | DR4 | DW10 |
| DRB1 * 0403 | DR4 | DW13 |
| DRB1 * 0404 | DR4 | DW14 |
| DRB1 * 0405 | DR4 | DW15 |
| DRB1 * 0406 | DR4 | DW'KT2' |
| DRB1 * 0407 | DR4 | DW13 |
| DRB1 * 0408 | DR4 | DW14 |
| DRB1 * 0409 | DR4 | |
| DRB1 * 04010 | DR4 | |
| DRB1 * 04011 | DR4 | |

(Adapted from Bodmer JG, Marsh SGE, Albert ED, et al 'Nomenclature for factors of the HLA system, 1994 Vox Sang 1994 ; 67 . 412 – 430)

신한 경력이 있는 5만여 명의 여성에 대해 HLA 혈청항원을 조사한 결과, epitope를 공유하고 있는 항원사이에 교차반응이 일어나는데, 특성에 따라 항원을 공공특이성(public specificities)과 개별특이성(private specificities)으로 각각 분류할 수 있다(Ciacciarelli, 1989b; Cook, 1988). 각 특이성에 따라서는 상대적인 면역성의 강도가 10배 이상의 차이가 있는 경우도 있는데, 이러한 상대적인 차이에 따라 donor-recipient matching을 고려하는 것이 필요하다. 이는 수혈시 혈액항원의 면역능의 차이를 고려하여 적절한 혈액을 선택하는 것과 동일한 방법으로서, 장기이식의 경우에도 수용 가능한 HLA 불일치 유형을 정의하면 상황에 따라 적절한 이식장기를 선택할 수 있을 것이다. Takemoto와 Terasaki(1991)는 peptide 수준에서 HLA 특이도를 정의하고 컴퓨터를 이용한 HLA-matching 시스템을 제안한 바 있는데 재래적인 방법에 비해 donor-recipient matching이 매우 효과적인 것으로 보고하였다. 이 방법은 매우 복잡하여 아직 연구단계에 있으나 HLA-matching에 있어서 새로운 가능성을 세시하고 있다.

장기이식에 있어서 HLA-A-B-DR의 '6항원'을 모두 일치시키는 것이 이상적으로 생각된다. 특정집단에서 출현빈도가 높은 haplotype을 보유한 환자에 대해서는 이것이 실현될 가능성이 높으나, 일반적인 경우에는 '6항원'을 완전히 일치시킬 수 있는 가능성은 희박하며 특히 시간적인 여유가 없는 말기 신부전환자의 경우에는 불가능에 가깝다. 이러한 이유 때문에 각 환자에 대해 이론적인 측면과 임상적인 측면을 고려하여 개별적으로 HLA-matching을 실시하여야 한다. HLA-A, -B, -DR은 면역성의 강도에 따라 matching의 우선 순위를 정할 수 있는데, A, B, DR > B, DR > A, DR > DR > B > A의 순이며, HLA-A, B, DR이 모두 불일치한 경우 거부반응의 가능성이 가장 높고 HLA-A만 불일치한 경우 거부반응의 가능성이 가장 낮다(Zmijewski, 1994). United network for organ sharing(UNOS)에서는 이러한 점을 고려하여 matching의 정도를 점수제로 표현하였으며, 전구형성 항체와 환자의 이식 대기일수도 함께 고려하였다(Zmijewski, 1994).

나 기타 고형장기

장기이식으로 구성된 신 이식에서와는 달리, 심장, 간 등의 장기이식은 자체 donor에서만 장기를 제공받을 수 있다. 따라서 이를 장기이식의 경우에

는 환자의 임상적인 면이 이식의 성패를 결정하는 가장 중요한 요소인데, 투석으로 생명연장이 가능한 신질환자는 달리 말기 관상동맥질환이나 간질환자는 장기간의 생명의 연장이 불가능하기 때문이다. 따라서 이를 장기이식에서는 ABO 혈액형 적합성과 이식장기의 크기가 가장 중요한 요소이며, 장기이식에 소요되는 수술시간과 장기보존방법도 아울러 중요하다. 이러한 이유 때문에 신을 제외한 고형장기 이식에는 HLA-matching의 중요성이 차지하는 비중이 낮고, 이에 대한 연구도 미미한 실정이다(Baan et al, 1991; Chen et al, 1994; Hopf et al, 1992; Scalamogna et al, 1992; Scalamogna, 1995; Suberbielle et al, 1994).

2. 골수이식

임상적인 골수이식이 최초로 실시된 시기는 1960년 중반이었으며, 현재는 혈액종양을 포함한 각종 악성질환, 유전성 혈액질환, 면역결핍증후군 및 몇몇 대사성 질환에 대한 치료법으로 발전, 확산되고 있다(Chft and Storb, 1987; Forman et al, 1994; Sullivan et al, 1989). 골수이식의 이론적인 치료근거는 1) 악성 혹은 유전적 요인에 의해 기능적 결함을 가진 조혈간세포를 정상 기능의 건강한 간세포로 치환하는 작용, 2) 악성세포를 파괴시키기 위해 고용량의 방사선 혹은 화학요법을 실시 받은 암환자의 생명 유지 기능, 3) 이식골수에 존재하는 면역세포(immunocompetent cell)가 잔여 암세포를 파괴하는데(몇몇 종류의 악성 암에서 이러한 현상이 관찰됨) 있다. 골수이식의 방법을 요약하면, 1) 방사선 혹은 항암제로 환자의 병든 골수를 파괴시킨 다음, 2) 건강한 골수를 주입하면, 3) 이식골수에 포함된 간세포는 텅 빈 환자의 골수에 자리잡아 성장, 분화하여 조혈세포를 생산하게 된다. 대개는 이종 골수이식(타인의 건강한 골수이식)이며, 골수전이가 없는 유방암 등의 고형암 환자의 경우에는 자가이식(방사선 혹은 항암제 치료이전에 수확하여 두었던 환자 자신의 건강한 골수이식)을 실시하기도 한다. 골수이식 환자의 예후는 이식골수의 착상과 면역기능의 재활성 여부에 따라 결정되며, 골수이식 후에 감염과 잔여 암세포의 재성장도 환자의 생존에 큰 영향을 미친다.

골수이식에서 특기할 만한 합병증은 GVHD이며(Sullivan et al, 1989), 거부반응의 발생빈도는 다른 장기이식에 비해 낮은 편이다. GVHD는 수혈 donor의 골수에 포함된 T림프구가 면역기능이 없는 환자의

세포를 이종항원으로 인식하여 공격, 파괴하는 현상으로서, 끝내는 환자의 생명을 위협할 수도 있다. GVHD는 생쥐의 골수이식 실험에서 최초로 관찰되었는데, 방사선 조사를 받은 생쥐의 생존율을 조사한 결과 동종골수 이식을 받은 강우가 이종 골수이식을 받은 생쥐에 비해서 생존율이 높았으며(Barnes and Loutit, 1955), 후에 Uphoff(1957)가 이 원인이 장기 제공자와 수용자간의 MHC 차이에 의한 GVHD였음을 입증하였다. GVHD는 다양한 유전적 요인에 의해 발생된다고 생각되는데(Wettstein, 1989), HLA 형이 일치하는 형제간에서는 minor histocompatibility antigen의 차이로 인해, unrelated pair간에서는 GVHD는 검사적 요인 즉, 부정확한 혈청학적 HLA 검사가 그 원인인 것으로 사료된다.

전술한 바와 같이, HLA 혈청형 검사와 MLR 검사가 기술적으로 향상되고, 골수이식의 보조요법이 점차 향상됨에 따라 GVHD를 효과적으로 감소시킬 수 있게 되었다. 그럼에도 불구하고 donor와 환자의 유전적 관련성에 따라 이식성공률에는 명백한 차이가 있다. Beaty 등(1995)은 donor-recipient 간에 HLA가 서로 일치하는 경우의 이식성공률은 일란성 쌍생아간에서 가장 높았고, 그 다음이 형제간이었으며 unrelated pair간에서는 가장 낮았다고 보고하였다. 이는 앞서 언급하였던 바와 같이 related pairs 간에 HLA 혈청형이 일치하면 유전형도 동일하지만, unrelated pairs간에는 혈청형과 유전형이 반드시 일치하지 않기 때문이다. 혈청형 검사로는 모든 유전형을 동정할 수 없으므로, 동일한 HLA 혈청형에 속하지만 유전형이 서로 다른 경우에는 이질적으로 인식되어 GVHD를 야기할 수도 있다. 또한 혈청형 검사는 DNA 검사법에 비해 부정확하기 때문에 HLA 항원형 자체가 잘못 판정되었을 가능성도 배제할 수 없다.

따라서, 혈청학적 HLA형 검사가 이와 같은 단점이 있음에도 불구하고 related pair간의 HLA-matching을 검사하는데는 유용성이 있다. 그러나 근자에는 핵가족 현상으로 related donor를 이용한 장기 이식은 점차 그 수가 줄어들고 있다. 최근의 분석에 따르면 골수이식을 원하는 환자의 60~70%는 형제 중에서 HLA 형이 일치하는 donor를 구할 수 없으며(Beaty et al, 1993), 이에 따라 unrelated pair 간의 골수이식이 증가하고 있는 실정이다. Unrelated pair간의 장기이식에 있어서 임상적인 문제는 역시 급성 GVHD인데, 비교적 정도가 심한 GVHD인 grade II~III의 발생빈도는 related pair에서는

33%인데 비해, HLA-A, -B, -D 혈청 항원형이 모두 일치하는 unrelated pair에서는 78%이고, HLA -A, -B, -D 혈청 항원형이 일치하지 않는 unrelated pair에서는 무려 94%에 이른다(Storb et al, 1986). 따라서 unrelated pair 간의 골수이식을 위한 HLA matching을 위해서는 반드시 유전형검사가 실시되어야 하며, 향후 보다 효과적이고 강력한 분자생물학적인 방법으로 HLA 유전자와 GVHD와의 관계를 규명하여야 될 것으로 생각한다.

장기이식을 위한 HLA 검사

가. 고식적인 HLA 검사법

1. 혈청학적인 방법에 의한 HLA 형별 분석

종래의 HLA-matching은 microlymphocytotoxicity와 MLR 등의 표현형 검사법으로 실시되었다(Amos et al, 1969; Dupont, 1980; Terasaki et al, 1964). Microlymphocytotoxicity법은 class I과 class II 항원을 모두 분석할 수 있는데, 그 분석방법을 요약하면 1) 항혈청 시약과 살아있는 림프구를 혼합하여 HLA 항체-항원 특이 반응을 유발시킨 다음 2) 보체를 첨가하여 세포용해를 시켜, 3) 용해된 세포에 염색액을 흡수하게 하여 위상차 현미경으로 판독한다. 혈청학적인 방법에 의한 HLA DR형 검사는 신뢰성, 재현성이 우수하고 복잡한 기구 및 장비가 없어도, 수 시간 내에 검사가 가능하여 과거 수십년 동안 임상에서 유용하게 이용되어 왔으나, 몇 가지 단점이 지적되고 있다(Begovich and Erlich, 1995). 1) 세포 표면 항원을 조사하기 위해서는 살아있는 림프구가 요구되는데, 환자가 화학, 방사선요법으로 치료받고 있는 경우에는 살아 있는 림프구 분리가 어려우며, 특히 class II 항원 검사를 위한 B세포 분리가 힘들다. 2) 항혈청 시약은 HLA항원에 감작된 사람(임신한 기상력이 많은 산모 혹은 수혈 경험이 있는 사람)으로부터 분리하여 제조하므로 일시에 많은 양을 구하기 어렵고 표준화하기도 용이하지 않다. 3) DNA 염기서열 분석으로 현재까지 밝혀진 DRB 1대립유전자는 100여종에 이르고 있으나 혈청학적으로는 15종이 분석 가능하다(Bodmer et al, 1994). 좋은 예로 DR4항원형을 들 수 있는데, DNA 분석법으로는 19종의 상이한 DRB1대립유전자가 존재하는 것으로 밝혀졌다(Bodmer et al, 1994)(Table 3). 단클론 항체를 사용하면 이러한 문제가 해결될 수 있겠으나, 제조가 힘들고, 표준화, 특이도 등의 특성을 정의하기 어렵다.

나 혼합 림프구 반응 혹은 배양(Mixed Lymphocyte Reaction)

MLR은 서로 다른 개체에서 분리된 림프구를 혼합 배양하면 상호 자극하여 세포의 증식이 일어나는 현상(Amos et al, 1969)으로서 class II 항원성 즉 HLA-D 항원성의 차이로 인해 야기된다. 혈청학적인 방법으로는 이러한 HLA-D 부위의 차이를 규명하기 힘들기 때문에, 골수이식에 있어서는 MLR 검사가 HLA-D 부위의 적합성을 검사하는 상용검사로 이용되어왔다. MLR검사의 문제점은 1) 건강한 생존 림프구가 필요하므로 항암화학요법을 받고 있는 환자는 검사가 어렵고, 2) 배양조건에 따라 검사결과가 민감한 영향을 받고, 증식반응을 정확하게 판정하는 것이 어렵고, 3) MLR로는 골수이식에 있어서 GVHD를 100% 예측하기 힘들다(MLR 적합성과 DNA 수준에서 HLA class II 형이 반드시 일치하지 않음) (Mickelson et al, 1993).

다 HLA 교차시험

이식장기에 대한 HLA 특이항체가 장기이식 전에 환자의 혈청 속에 존재하면 예후가 매우 나쁘다. 이 항체는 이식 후에 혈액 순환이 재개되면 즉시 반응을 일으켜 hyperacute 혹은 accelerate 양상의 거부반응을 야기하므로 이식 전에 HLA 교차시험으로 검사하여야 한다. HLA 교차시험은 환자의 혈청과 donor 림프구로써 microlymphocytotoxicity법으로 검사하며 HLA 교차반응이 음성인 경우에 한하여 장기이식을 실시하는 것이 좋다 (Zmijewski,

1994)

환자의 혈액은 이식직전에 채취하는 것이 가장 좋다. 그러나, 장기 수용자인 환자의 혈액 채취가 즉각 이루어지지 않으면 허혈시간이 연장되어 이식 장기가 영구손상 받을 수도 있으며, 여러 환자에 대해서 실시한 교차시험 결과가 모두 양성인 경우 짧은 시간 내에 적절한 donor를 색출 해내지 못할 가능성도 있다 따라서 수술직전에 교차반응을 실시하는 것이 반드시 좋은 것은 아니다 일반적으로 환자의 혈청을 1달(혹은 그 이하) 간격으로 미리 채취하여 적절한 조건에서 냉동보관 해두는 것이 바람직하며, 특히 수혈을 실시하는 경우에는 반드시 채혈하여야 한다.

비록 혈청 중에 미량으로 존재하는 항체라 할지라도 항원에 재차 노출되면 2차 면역반응에 의해 혈중 역가가 급속도로 높아진다 이 경우 시간이 지나면 역과가 낮아져 검출이 불가능할 경우도 있으므로 과거에 특정 항체의 역과가 높았던 혈청 검체에 대해서는 따로 교차시험을 실시하는 것이 바람직하다 최근의 연구결과에 의하면 처음으로 장기이식을 받는 환자에서는 이 항체가 임상으로는 큰 의미가 없다고 보고되었는데(Sanfilippo et al, 1984), 이 경우에는 주로 수혈에 의해 생성된 항체 이어서 면역계에 장기간 기억되지 않기 때문인 것으로 생각된다 그러나 한번 이상 장기이식을 경험하였던 환자에서는 이 전구형성 항체가 이식장기의 HLA 항원에 대한 항체이므로, 일단 항원에 재차 노

Table 3 The effect of HLA-DRB1 matching at the DNA Level on the incidence of acute rejection compared with DR matching at the serological level in living-related and in cadaveric renal transplantation

| | No of DR Mismatches (Serology) | Incidence of Acute Rejection (%) | No of DRB1 Mismatches (DNA) | Incidence of Acute Rejection* (%) |
|---------|-----------------------------------|----------------------------------|--------------------------------|-----------------------------------|
| Living | 0 | 16/51 (31) | 0 | 3/31 (10) |
| | | | 1 | 11/16 (69) |
| | 1 | 48/98 (49) | | |
| Cadaver | 0 | 21/64 (33) | 0 | 3/20 (15) |
| | | | 1~2 | 10/21 (48) |
| | 1 | 15/36 (42) | | |

* In patients with serological DR 0 mismatch in living-related transplants, 3 with discrepancy and 1 without testin were excluded. In patients with serological DR 0 mismatch in cadaveric transplants, 9 with discrepancy and 14 without testin were excluded.

Living-related transplantation : 0 vs 1 mismatch by either method P< .01. Cadaveric transplantation : 0 vs 1 mismatch by either method P< .05

(Adapted from Kobayashi H, Kamura H, Kohara S et al. Significance of HLA-DR matching at DNA level in clinical renal transplantation Transplant Proc 1994 ; 25 : 222-223)

출되면 매우 심각한 거부반응이 야기되므로 주의하여야 한다(Okuno and Kondelis, 1978).

사체 donor에서는 림프구를 얻기 위해서는 조직으로는 혈액보다는 림프절이나 비장을 선택하는 것이 좋은데 특히 donor가 생명보존 시스템을 사용한 경우 스테로이드가 투여되어 말초혈액의 림프구는 좋지 않다. 림프절은 이식할 장기를 정제하는 시점에 채취하여 생리식염수가 젖어있는 거즈로 싸서 마르지 않게 한 다음 실험실로 운반하여야 한다.

class I 항체에 대한 교차시험은 T세포를 순수 분리하여 표적세포로 하는 것이 가장 좋다(Noreen, 1990). HLA class I 항체가 거부반응을 가장 흔히 유발하는 항체이며, 임상적으로도 심각한 거부반응을 일으킨다. SLE나 당뇨병 환자에서는 비특이적인 자가면역성 반응이 흔히 관찰되는데 이는 주로 B세포에 대한 비특이성 반응으로서 임상적인 중요성은 거의 없고, class I 항체에 대한 교차시험에 T세포와 B세포가 혼합되어 있으면 위양성 반응을 나타내는 요인이 되므로 주의해야 한다. 그러나 비특이적인 B세포 항체가 아닌 HLA class II 항원에 대한 항체는 임상적으로 명백히 중요하다. 따라서 교차시험에는 반드시 B세포를 이용한 검사를 포함시켜야 하며, 이때는 순수하게 분리한 B세포를 표적세포로 이용하여야 한다.

새로운 HLA 검사기법

가. DNA 분석법

초기의 DNA법에 의한 HLA형별 분석은 제한효소 절편길이 다양성(restriction fragment length polymorphism, RFLP)분석법에 의해 실시되었다(Erlich et al, 1986). RFLP는 1) 지놈성 DNA를 제한효소로 처리한 다음, 2) agarose 젤에서 DNA 절편을 크기에 따라 분리하여, 3) 투과성 막에 전이시킨 다음, 4) 방사선 동위원소가 표지된 DNA probe로 교잡하여 각 allele을 band의 양상에 따라 동정하는 방법이다. RFLP 법은 세포표면에 HLA 항원이 표현되지 않아도 무방하며, 죽은 세포로도 분석이 가능하다. 또한 다양한 제한효소를 적절하게 사용함으로써 각종 class I과 class II 유전형을 분석할 수 있었다. 그러나 RFLP분석법은 검사법이 복잡하고, 검사시간이 길어서 임상적으로 이용하기에는 불편하였으며, class I 분석 시에는 DNA 절편의 길이가 서로 유사한 allele이 많아 감별정의 어려운 경우가 많았다.

1980년대 중반에 중합효소연쇄반응(polymerase

chain reaction, PCR)이 개발됨에 따라 HLA class I과 class II도 유전형분석이 급진적으로 향상되었다(Mullis et al, 1987; Saiki et al, 1988). PCR은 소수의 표적 DNA를 단시간 내에 수백만 배 증폭시키는 방법으로서, 동위원소 probe를 사용하지 않아도 되는 장점이 있다. PCR법에 의한 HLA 유전형 분석은 class II 유전자가 먼저 실시되었는데, class II 유전자가 class I 유전자에 비해 비교적 덜 복잡한 다양성을 보이고, 다형성 부위가 하나의 exon에 국한되어 기술적으로 분석이 용이하였기 때문이었다. 또한 microlymphocytotoxicity 법에 의한 class II 혈청형 분석의 특이도가 낮고 오판율이 높아서 장기이식분야의 임상적 요구가 높았기 때문이다. class II 대립인자에 대한 유전적 염기서열 다형성의 데이터베이스가 구축되고 PCR 분석기술이 향상됨에 따라 보다 신속, 간편하여 임상적으로 유용성이 높은 HLA class II PCR 형별 분석법이 개발되게 되었다. 그 첫 번째 방법은 PCR로 증폭표적 amplicon을 나일론이나 nitrocellulose막에 전이, 고정시킨 다음 표지된 염기서열 특이 oligonucleotide(sequence-specific oligonucleotide-SSO) probe로 교잡시키는 소위 “dot blot”법이었다. 교잡반응, 세척 조건이 적절하면 SSO는 염기서열이 반드시 일치하는 DNA와만 반응한다. 따라서 PCR-SSO법은 단 하나의 염기서열 차이가 있는 allele의 구별도 가능하며, 또한 다양한 primer와 probe가 구비된 HLA 유전자의 모든 대립인자를 규명할 수 있다. 이 방법은 모든 class II 계열에 속하는 HLA 유전자(DR, DP, DQ) 분석에도 적용이 가능하며, 최근에는 class I 유전자의 분석에도 적용할 수 있는 것으로 알려졌다. PCR-SSO법은 매우 유용한 방법이지만, PCR산물을 분리한 다음 각각의 probe로써 교잡반응을 실시해야되기 때문에, 검사가 복잡하고, 검사시간이 길어, 분석해야 될 가검물이 소수인 경우에는 용이한 방법이 아니다(Bugawan et al, 1990; Saiki et al, 1986; Schorf et al, 1991).

또 다른 PCR 변법으로는 primer의 특이도를 이용한 것으로(Olerup and Zetterguit, 1992) allele-specific amplification(ASA), sequence-specific primer (SSP), amplification refractory mutation system (ARMS)(Newton et al, 1989)법 등이 있다. 이들 방법들은 primer와 표적 DNA의 염기서열이 동일한 경우에만 DNA 증폭이 일어나는 특성을 이용한 것으로 전기영동에서 특이 band를 관찰하게 되면 특정 대립인자가 존재하는 것으로 판정한다. 그러나 검체

내에 PCR 방해물질이 있으면 위음성 반응이 야기될 수 있으므로 반드시 분석할 HLA 대립인자와 관계 없으며 다형성이 없는 부위의 primer를 선택하여 내부양성대조로 증폭하여야 한다.

이밖에 PCR을 이용한 HLA형별 분석법으로는 PCR-RFLP(Maeda et al, 1989), PCR-SSCP(single strand conformation polymorphism) (Carrington et al, 1992)과 PCR-DHA(directed heteroduplex analysis) (Zimmerman et al, 1993)등이 있으나, 임상적으로 이용되기에에는 신속, 간편성이 부족하여 연구 목적의 실험실에서 주로 이용되고 있다.

최근에 개발된 PCR의 새로운 변법은 "reverse blot"법으로서, 이는 일반적인 dot blot에서 PCR증폭산물을 나일론 막에 고정시키는 방법과는 달리 probe를 나일론 막에 전이, 고정시킨 다음 biotin이 표지된 primer로 증폭된 PCR산물과 교접시켜 streptavidin-HRP(horse radish peroxidase)효소기질반응을 유발하여 발색반응을 관찰하는 방법이다(Saitki et al, 1989)

이 방법은 여러 종류의 SSO probe를 판넬로 하여 한 번의 PCR과 한 번의 교접반응으로써 분석하기 때문에 분석방법이 간편 신속하여 전산을 이용한 데이터의 해석이 용이하다. 이에 따라 많은 검사실에서 reverse blot을 임상적으로 이용하게 되었으며 probe의 종류와 효소, 기질반응을 변화시킨 다수의 변법이 소개되었으며 기존의 ELISA에 사용되었던 기구 등을 이용하여 분석방법을 보다 간편화시켰다(Kawai et al, 1994). 그러나 이 방법은 고정도 HLA형별 분석에는 불편한 점이 지적되었다. 왜냐하면 각 대립인자에 따라 PCR 반응조건이 상이할 수 있고, probe와 표적 DNA의 교접반응이 probe의 종류에 따라서 상이할 수 있으므로, 다수의 primer와 probe를 사용해야 하는 고정도 분석에는 여러 번 PCR을 시행해야하고 교접반응이 서로 유사한 probe끼리 조합하여 여러 종류의 microtiter well을 제작하여야만 된다. 결과적으로 많은 연구 group들은 probe를 고정시키기 위한 지지 체로써 microtiter well보다는 나일론 혹은 nitrocellulose막을 여전히 사용하고 있다(Buyse et al, 1993; Zrlich et al, 1991).

나 유세포 분석에 의한 HLA 항원 검사 및 HLA 교차시험

유세포 분석은 교차시험을 위한 새로운 검사법으로 평가되고 있는데 이 방법은 매우 민감한 검

사법일뿐 아니라 환자의 혈청 내에 존재하는 항체 아형(Ig G 혹은 Ig M)과 혹은 림프구 아형(T와 B세포)을 구별하여 분석할 수 있다. 따라서 이 방법은 교차 반응의 성적을 보다 면밀히 분석할 수 있게 하여 장기이식에 활용할 수 있게 한다. 또한 보체반응을 일으키지 않는 항체의 조사도 가능하며, 보체반응에 따른 단점(교차반응)을 보완할 수 있다. 그러나 이 방법은 검사시간이 길고, 고가의 장비와 고도의 기술을 요하기 때문에 전문가에 의해서만 결과의 해석이 가능하다는 단점도 있다(Thistlewaite et al, 1987)

새로운 HLA 검사법의 중요성

HLA 분석을 위한 문자생물학적 방법 중 PCR이 임상적인 유용성이 높다는 것은 전술한 바와 같다. PCR법 중에는 PCR-SSO법을 응용한 dot blot과 reverse blot법과 PCR-SSP법이 가장 널리 사용되고 있는 방법이다. PCR-SSP법은 소수의 검체를 빠른 시간 내에 분석할 수 있으므로 검사건수가 적은 소규모 검사실에 이용하기 적합한 검사법으로 특히 다음과 같은 경우에 그 임상적인 유용성이 높을 것으로 생각된다. (1) 혈청학적 검사로는 DR형의 판독이 곤란한 혈청학적 검사 결과의 확인, (2) 신이식술에 실패한 경험이 있는 환자 즉 recipient의 DR형 항원에 매우 민감하게 반응하는 소위 'high responder'의 DR형 형별검사, (3) B세포의 분리가 어려운 사체 donor의 DR형 형별 검사, (4) 장기은행에 제공될 donor의 DR형 형별 검사, (5) 골수이식을 위한 제대혈의 DR형 형별검사등에 유용할 것으로 사료된다. 또한 HLA-DR형 검사에 있어 rapid PCR-SSP법에 의한 키트를 이용한다면 2시간 이내에 결과를 판정할 수 있을 뿐만 아니라 비용도 절감되어 사체 장기를 이용한 뇌사자 장기이식술에 있어 신속한 HLA-DR 검사법으로 가치가 높을 것으로 생각된다.

근자에 와서 related donor를 이용한 골수이식이 난관에 봉착하자, unrelated donor를 이용한 골수이식을 위해 국가적 혹은 국제적으로 donor program에 대한 정책이 급진적으로 개발되고 있다. 미국에서는 1986년에 NMDP가 발족되었는데 현재까지 140만 명 이상의 골수제공자로 등록되어 2,915명의 환자가 unrelated donor로부터 골수를 제공받았다. 환자가 비교적 혼한 유전형을 보유한 경우에는 HLA 형이 일치하는 donor를 구할 수 있는 확률이 높지만, HLA class I과 class II 대립인자가 고도의 다

형성을 보이기 때문에 골수이식에 있어서 donor-recipient의 HLA형을 완전히 일치시킨다는 것은 용이한 일이 아니다.

임상적인 목적에 의해 HLA 분석정도(resolution of analysis)를 저, 중, 고로 분류하는데, HLA-DR 유전형 분석에 있어서 저 정도 분석은 DNA DR형을 혈청형 분석 정도와 같이 15종, 고정도 분석은 100여종, 중정도 분석은 20여종의 DNA-DR형을 구분하는 것이다 장기이식을 위한 HLA-matching에서는 각 DNA 검사법을 분석정도에 따라 효과적으로 조합하여 단계적으로 실시하는 것이 바람직하다 (McCullough et al, 1989). 저정도 혹은 중정도 분석을 위해서는 PCR-SSO에 의한 reverse dot법과 PCR-SSP법이 적절한 검사법이다. 골수이식을 위한 HLA-matching을 고정도 분석법으로 실시하면 정확한 donor-recipient의 HLA matching이 가능하겠지만 검사가 복잡하고 시간이 오래 걸린다는 단점이 있다. 적절한 primer와 probe를 선택할 수 있는 검사 전 정보가 있으면 고정도 분석을 보다 간편화하고 불필요한 검사비용을 절감할 수 있으므로, 저정도 혹은 중정도 분석법으로 선별검사를 선행하는 것이 좋다. 또한 이미 골수 donor로 등록된 환자도 저, 중정도 DNA법으로 재검사를 실시하여야 하는데, 그 이유는 골수 donor로 등록된 사람 중에 HLA 형이 분석되지 않은 경우가 많고(미국의 경우 NMDP에 등록된 140만 명의 골수 donor중 HLA 검사를 실시한 경우는 40만 명에 불과함), HLA-DR형이 분석되었다해도 그 결과가 대부분 혈청학적 검사에 의한 것이므로 판정이 잘못되었을 가능성이 높다(특히 DR11, DR12, DR13, DR14가 오판 가능성성이 높음)

NMDP는 1991년에 HLA-DRB 저정도 검사법인 PCR-SSO법을 이용하여 7개월간 7개 검사실을 선택하여 검토한 결과 이 방법이 정밀성, 특이성, 신뢰성이 우수한 것으로 평가하고 골수이식에 있어서 HLA 검사의 정책을 다음과 같이 변경하였다. 1) 골수이식 donor의 선별검사로써 저정도 검사법으로는 DNA분석법을 채택하였으며, 2) MLR이 HLA-D 적합성 여부 판정과 GVHD를 예측하기 위한 검사법으로 적절하지 않다는 Mickelson 등(1993)의 연구를 받아들여, 선별된 donor에 대해 골수이식을 위한 최종검사로써 MLR 검사대신 고정도 DNA 검사법을 판정기준으로 채택하였다

HLA형의 일치도가 높은 팔수를 제공받을 수 있는 요인은 환자와 환자가 속한 집단의 HLA형의 출

현빈도와 밀접한 관계가 있으며, 일반적으로 특정 HLA 대립인자의 출현빈도는 인종, 민족에 따라 상이하다. 또한 각 유전자 부위의 특정 대립인자가 서로 붙어 다니는 현상(연쇄불평형, linkage disequilibrium)에 의해 인구집단에 따라 HLA-A-B-DR haplotype의 양상 및 빈도 차이가 있을 수 있다 따라서 아시아와 같이 지역 내 인구집단의 인종, 민족성이 서로 유사한 경우에는 여러 국가가 동시에 donor program에 참가하는 것이 바람직하다(Tsuji et al, 1992).

반면에 인구집단내의 인종, 민족성이 다양한 미국과 같은 나라에서는 HLA형의 일치율이 높은 장기제공자를 색출하는 것이 매우 힘들다 HLA형이 일치하는 donor를 구할 수 없을 경우에는 class I과 class II에 속하는 여러 대립인자의 상대적인 중요성을 고려하여 장기를 제공받을 수 있게 하는 데 이터베이스가 구축되어야 한다 (McCullough et al, 1989).

마지막으로 언급하여 둘 것은, 최근에는 class II 유전자에 대한 DNA 검사법의 발전과 더불어 HLA-A-B 검사를 위한 DNA법도 개발되었으며, 종래의 혈청학적 검사로 검출하지 못했던 다양한 HLA-B 대립인자가 밝혀지고 있다(Bugawan et al, 1994a ; Bugawan et al, 1994b ; Shintaku et al, 1995) 또한 HLA-DQB1, HLA-DBP1 유전자를 분자생물학적인 방법으로 분석함으로서 장기이식에 있어서 그 임상적 중요성이 점차 밝혀지고 있다(Petersdorf et al, 1994 ; Hoshino et al, 1993).

맺 음 말

최근 분자생물학 분야의 발달과 더불어 DNA 분석과 유세포 분석 등에 의한 새로운 검사법이 장기이식분야에서 그 임상적 활용이 보편화되고 있는 추세이다 이와 같은 새로운 검사법은 종래의 장기이식분야에 이용되었던 재래적인 검사법에 비해 정확성이 높아 이식환자의 생존율을 높이는데 기여하는 바가 크다 또한, 장기이식과 관련된 HLA system에 대한 활발한 연구가 진행되면서 거부반응, GVHD 등의 면역학적인 기전이 정확히 규명되고 있다 새로운 검사법이 보다 신속, 간편화되어 임상에 도입되면서, 이러한 면역학적인 현상이 장기이식에 미치는 임상적인 영향에 대해서 과거와는 다른 각도에서 분석할 수 있게 되었다 신, 골수이식은 물론 폐, 간, 심장, 헤장 등 거의 모든 장기이식이 시도되고

있으며, 이에 대한 사회적인 요구가 높아지고 있는 현실에 비추어 볼 때, 장기이식 분야의 새로운 검사법의 원리를 이해하고 이를 임상적으로 적극 활용해야 될 필요성이 있다고 생각된다

참고문헌

- Antin JH, Smith BR . Bone marrow transplantation, in Handin RI, Lux SE, Stossel TP(eds) . *Blood : Principles and Practice of Hematology*, Philadelphia, Lippincott Company, 1995, pp 2055 – 2103
- Amos DB, Bashir H, Boyle W, et al . A simple microcytotoxicity test. *Transplantation* 1969 ; 7 . 22 0 – 223
- Bann CC, OuWehand AJ, Vaessen LMB, et al . The clinical relevance of HLA matching in heart transplantation Impact on rejection and donor-directed cytotoxicity of graft infiltratin lymphocytes. *Transplant Proc* 1991 ; 23 . 2670 – 2671
- Barnes DWH, Loutit JF . Spleen protection : The cellular hypothesis, in Bacq ZM, Alexander P(eds) . *Radiology Symposium* 1954, London, Butterworths, 1995, pp 134 – 140
- Begovich AB, Erlich HA . HLA typing for bone marrow transplantation : New polymerase chain reaction – baed methods *JAMA* 1995 ; 273 . 586 – 591
- Beatty PG, Anasetti C, Hansen JA, et al . Marrow transplantation from unrelated donors for treatment of hematologic malignancies : Efect of mismatching for one HLA locus. *Blood* 1993 ; 81 . 249 – 253
- Bell JI, Todd JA, McDevitt HO . Molecular structure of human class II antigens, in Dupont B(ed) . *Immunobiology of HLA Histocompatibility testing* 1987(volume II), led, New York, Springer – Verlag, 1989, pp 40 – 49
- Bodmer JG, Marsh SGE, Albert ED, et al . Nomenclature for factors of the HLA system, 1994. *Vox Sang* 1994 ; 67 . 412 – 430
- Bugawan TL, Begovich AB, Erlich HA . Rapid HLA – DPB typing using enzymatically amplified DNA and nonradioactive sequence specific oligonucleotide probes *Immunogenetics* 1990 ; 32 . 231 – 241
- Bugawan TL, Apple R, Erlich HA . A method for typing polymorphism at the HLA – A locus using PCR amplification and immobilized oligonucleotide probes *Tissue Antigens* 1994 ; 44 . 137 – 147.
- Bugawan TL, Apple T, Erlich HA . Population screening with a PCR/immobilized SSO probe HLA – A test reveals new HLA – A alleles. *Hum Immunol* 1994 ; 40 . (suppl 1) : 67 Abstract
- Busson M, Raffoux C, Bouteiller AM, et al . Influence of HLA – A, B and DR matching on the outcome of kidney transplant survival in preimmunized patients *Transplantation* 1984 ; 38 . 227 – 230
- Buyse I, Decorte R, Baens M, et al . Rapid DNA typing of class II HLA antigens using the polymerase chain reaction and reverse dot blot hybridization *Tissue Antigens* 1993 ; 42 . 473 – 479
- Carrington M, Miller T, White M, et al . Typing of HLA – DQA1 and DQB1 using DNA single – strand conformation polymorphism *Hum Immunol* 1992 , 33 . 208 – 212.
- Cicciarelli J : Living donor kidney transplants, in Terasaki PI(ed) . *Clinical transplants* 1988, Los Angeles, UCLA Tissue Typing laboratory, 1989a, pp 293 – 299
- Cicciarelli J, Corcoran S . An update on HLA matching, including HLA “epitope” matching . a new approach, in Terasaki PI(ed) . *Clinical transplants* 1988, Los Angeles, UCLA Tissue Typing Laboratory, 1989b, pp 329 – 337
- Chen M, Wade J, Levy GA, et al . Effect of HLA matching and T – and B – Cell crossmatch on acute rejection and graft survival following liver transplantation *Transplant Proc* 1994 ; 26 . 2695 – 2696
- Cho YW, Terasaki PI . Long – term survival, in Terasaki PI(ed) . *Clinical transplants* 1988, Los Angeles, UCLA Tissue Typing Laboratory, 1989, pp 277 – 282
- Clift RA, Storb R . Histoimcompatible bone marrow transplants in humans *Annu Rev Immunol* 1987 ; 5 . 43 – 64
- Cook D . HLA – A, B, DR Mismatches 1981 – 85, in Terasaki PI(ed) . *Visuals of the clinical histocompatibility workshop – Palm Springs Invitational* 1988, Los Angeles, One Lambda, 1988, pp 14

- Dupont B : HLA factors and bone marrow grafting, in Burchenal JH, Oettgen HF(eds) : Cancer Achievements, Challenges and Prospects for the 1980s, New York, Grune & Stratton, 1980, pp 6 83-693
- Erlich HA, Sheldon EL, Horn G : HLA typing using DNA probes. *Biotechnology* 1986 ; 4 : 975-981.
- Erlich H, Bugawan T, Begovich AB, et al : HLA-DR, DQ and DP typing using PCR amplification and immobilized probes. *Eur J Immunogen* 1991 ; 18 : 33-55.
- Forman SJ, Blume KG, Tomas ED(eds) : Bone marrow transplantation Boston, Blackwell Scientific Publications Inc, 1994, pp 1-100
- Hopt UT, Busing M, Schareck W, et al : Is HLA matching worthwhile in pancreatic Transplantation. *Transplant Proc* 1992 ; 24 : 909-910.
- Hoshino S, Kimura A, Fukuda Y, et al : A simple and practical test of HLA-DRB and DQB matching in transplantation. *Transplant Proc* 1993 ; 25 : 19 1-193.
- Kobayashi T, Kamura H, Kohara S, et al : Significance of HLA-DR matching at the DNA level in clinical renal transplantation. *Transplant Proc* 1993 ; 25 : 222-223.
- Kwai S, Maekawajiri S, Tokunaga K, et al : A simple method of HLA-DRB typing using enzymatically amplified DNA and immobilized probes on microrotiter plate. *Hum Immunol* 1994 ; 41 : 121-126.
- Leivestad T, Berger L, Thorsby E : Beneficial effect of DR matching on cadaveric renal graft survival in Scandiatransplant. *Transplant Proc* 1992 ; 24 : 2447-2448
- Leivestad T, Sodal G, Bratlie A, et al : Role of HLA matching in cadaveric renal transplantation-influence of improved serologic HLA-DR typing. *Transplant Proc* 1993 ; 25 : 220-221
- Lundgreen G, Groth CG, Albrechtsen D, et al : HLA matching and pretransplant blood transfusions in cadaveric renal transplantation-A changing picture with cyclosporin. *Lancet* 1986 ; 2 : 66-69.
- Madden DR, Gorga JC, Strominger JL, et al : The three-dimensional structure of HLA-B27 at 2.1 : A resolution suggests a general mechanism for tight peptide binding to MHC. *Cell* 1992 ; 7 0 : 1035-1048
- Maeda M, Murayama N, Ishii H, et al : A simple and rapid method for HLA-DQA1 genotyping by digestion of PCR-amplified DNA with allele specific restriction endonucleases. *Tissue Antigens* 1989 ; 34 : 290-298.
- Marsh SGE, Bodmer JG : HLA class II nucleotide sequences, 1992. *Tissue Antigens* 1992 ; 40 : 229-243
- McCullough J, Hansen JA, Perkins H, et al : Establishment of the national bone marrow donor registry, in Gale RP, Champlin RE(eds) : Bone marrow transplantation, Current Controversies, New York, Alan R Liss Inc, 1989, pp 641-658.
- Mickelson EM, Barsch GE, Hansen JA, et al : The MLC assay as a test for HLA-D region compatibility between patients and unrelated donors : Results of a national marrow donor program involving multiple centers. *Tissue Antigens* 1993 ; 42 : 465-472.
- Mullis KB, Faloona F : Specific synthesis of DNA in vitro via polymerase catalyzed chain reaction Methods Enzymol 1987 ; 155 : 335-350.
- Newton CR, Graham A, Heptinstall LE, et al : Analysis of any point mutation in DNA : The amplification refractory mutation system(ARMS) Nucleic Acids Res 1989 ; 17 : 2503-2516
- Noreen HJ : Crossmatch tests, in Zachary AA, Teresi GA(eds) : ASHI laboratory manual, ed 2. Lenexa, American Society for Histocompatibility and Immunogenetics, 1990, pp 307-320
- Okuno T, Kondelis N : Evaluation of dithiothreitol (DTT) for inactivation of IgM antibodies. *J Clin Pathol* 1978 ; 31 : 1152-1155
- Olerup O, Zetterquist H : HLA-DR typing by PCR amplification with sequence-specific primers (PCR-SSP) in 2 hours : An alternative to serological DR typing in clinical practice including donor-recipient matching in cadaveric transplantation. *Tissue Antigens* 1992 ; 39 : 225-235.
- Papola F, Valeri M, Torlone N, et al : Comparison between HLA-DR serologic typing and oligotyping in kidney transplant : A single center experience. *Transplant Proc* 1993 ; 25 : 2239-2240.
- Petersdorf EW, Anasetti C, Martin PJ, et al : Effect

- of HLA-DRB1 and DQB1 allele disparity on the development of acute graft versus host disease following unrelated donor marrow transplantation *Human Immunol* 1994; 40(suppl 1) : 3 Abstract.
- Poli F, Scalamogna M, Pappalettera M, et al : HLA-DR matching defined by SSO-typing in heart transplantation *Transplant Proc* 1992; 24 : 2436-2437.
- Poli F, Scalamogna M, Mascaretti L, et al : Genomic HLA-DR compatibility in solid organ transplantation : A retrospective analysis of 1209 cases. *Transplant Proc* 1995; 27 : 647-650
- Saiki PK, Gelfand DH, Stoffel S, et al : Primer directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase *Science* 1988; 239 : 487-491
- Saiki PK, Walsh PS, Levenson CH, et al : Genetic analysis of amplified DNA with immobilized sequence-specific oligonucleotide probes *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86 : 6230-6234.
- Saiki PK, Bugawan TL, Horn GT, et al : Analysis of enzymatically amplified g-globin and HLA-DQ β DNA with allele-specific oligonucleotide probes *Nature* 1986; 324 : 163-166
- Sanfilippo F, Vaughn WK, Spees EK, et al : Cadaver renal transplantation ignoring peak-reactive aera in patients with markedly decreased protransplant sensitization *Transplantation* 1984; 38 : 119-124
- Scharf SJ, Griffith RL, Erlich HA : Rapid typing of DNA sequence polymorphism at the HLA-DRB1 locus using the polymerase chain reaction and nonradioactive oligonucleotide probes *Hum Immunol* 1991; 30 : 190-201
- Shintaku S, Kimura A, Fukuda Y, et al : Polymerase chain reaction-based HLA-A genotyping and its application to matching in kidney transplantation *Transplant Proc* 1995; 27 : 689-692
- Suberbielle C, Dorent R, Vaissier E, et al : Influence of HLA matching on graft survival and incidence and severity of graft rejection in cardiac transplantation *Transplant Proc* 1994; 26 : 245-246.
- Starzl T, Marchioro TL, Holmes JH, et al : Renal homografts in patients with major donor-recipient blood group incompatibilities *Surgery* 1964; 55 : 195-200.
- Storb R, Deeg HJ, Whitehead J, et al : Methotrexate and cyclosporine compared with cyclosporine alone for prophylaxis of acute graft versus host disease after marrow transplantation for leukemia. *N Engl J Med* 1986; 314 : 729-735.
- Sullivan KM, Weiden PL, Storb R, et al : Influence of acute and chronic graft versus host disease on relapse and survival after bone marrow transplantation from HLA-identical siblings as treatment of acute and chronic leukemia. *Blood* 1989; 73 : 1720-1728
- Takemoto S, Terasaki P : HLA peptide matching, in Terasaki PI(ed) *Clinical Transplants* 1990, Los Angeles, UCLA Tissue Typing Laboratory, 1991, pp 497-513
- Terasaki PI, Mandell M, van de Water J, et al : Human blood lymphocyte cytotoxicity reactions with allogeneic antisera *Ann N Y Acad Sci* 1964, 120 : 322-334
- Thistlewaite JR, Buckingham MM, Stuart JK, et al : T cell immunofluorescence flow cytometry cross-match results in cadaver donor renal transplantation *Transplant Proc* 1987; 19 : 722-724.
- Ting A, Morris PJ : HLA matching and crossmatching in renal transplantation. *Lancet* 1978; 1(8064) : 575-582.
- Todd JA, Bell JI, McDevitt HO : HLA DQ β gene contributes to susceptibility and resistance to insulin dependent diabetes mellitus. *Nature* 1987; 329 : 599-604
- Tsuji K, Nomura N, Sujirachato K, et al : Tissue typing and organ transplantation : Proposal for establishment of an HLA network system for bone marrow transplantation in Asia *Transplant Proc* 1992; 24 : 1269-1270
- Uphoff DE : Genetic factors influencing irradiation protection by bone marrow, I : Te F1 hybrid effect *J Natl Cancer Inst.* 1957; 19 : 123-130
- Wettstein PJ : Minor histocompatibility loci, in Litwin SD(ed) *Human Immunogenetics*, New York, Marcel Dekker Inc, 1989, pp 339-357
- Zmijewski CM : The major histocompatibility complexes. Methodologies, in McClatchey KD(ed) : *Clinical laboratory medicine*, ed 1 Maryland, Wi-

lliams & Wilkins, 1994, pp 771-799.
Zimmerman PA, Carrington MN, Nutman TB : Ex-
ploiting structural differences among heteroduplex

molecules to simplify genotyping the DQA1 and
DQB1 alleles in human lymphocyte typing. *Nucleic
Acids Res* 1993 ; 21 : 4541-4547.