

돼지→개 이소이종심장 이식모델에서 생존에 미치는 항체 역가의 영향 —이종이식시대의 개막—

이정렬* · 김희경** · 김지연** · 최대영** · 이재형** · 위현초** · 강희정*** · 김영태*
강병철** · 김준석**** · 이학모** · 곽재건* · 이동섭** · 안규리**

Effect of Antibody Titer on Xenograft Survival in Pig-To-Dog Heterotopic Cardiac Xenotransplantation —Opening of Xenotransplantation Era—

Jeong Ryul Lee, M.D.*, Hee Kyung Kim, M.S.**, Ji Yeon Kim, M.S.**, Dae Young Choi, B.S.**,
Jae Hyung Lee, M.S.**, Hyun Cho Wi, B.S.**, Hee Jung Kang, M.D.***, Young Tae Kim, M.D.*,
Byoung Chul Kang, M.S.**, Jun Seok Kim, M.D.****, Hak Mo Lee, M.S.**,
Jae Gun Kwak, M.D.*, Dong Sup Lee, M.D.**, Cu Rie Ahn, M.D.**

Background: Xenotransplantation in discordant species results in immediate and irreversible hyperacute rejection due to natural antibodies, IgM. With this, antibody depletion is one option to reduce hyperacute rejection, we investigated the effect of PCPP (postcentrifugal plasmapheresis) on the depletion of natural antibodies and the effect of antibody titer on xenograft survival. **Material and Method:** Outbred swines (n=4) weighing 10~20 kg were used as donors and mongrel dogs (n=4) weighing 25~30 kg were used as recipients. Recipient canines underwent plasmapheresis (COBE TPE Laboratories, Lakewood, CO, USA). Pre-transplantation PCPP was performed on day -2 and day 0. There were three groups (Group 0: no PCPP, Group 1: 1 plasma-volume (PV) at day -2 and 2 PV at day 0, Group 2: 2 PV at day -2 and 2 PV at day 0). A swine heart was heterotopically transplanted into a recipient's abdominal infrarenal aorta and inferior vena cava. Mean percent depletion of total IgM and IgG in plasma of the recipients was calculated. Serum albumin, electrolyte, complement activity and coagulation factors were measured. Histopathologic examination of heart specimens was performed. **Result:** Mean percent depletion of IgM and IgG were 95.7±1.2%, 80.5±2.4% in the group 2 at the end of PCPP. The percent depletion of serum albumin concentration was decreased from 2.8 to 1.4 g/dL in the group 1 and 3.0 to 1.5 g/dL in the group 2. Complement hemolytic activity was decreased in group 1 and 2, but returned to normal level within 24 hours. Complement hemolytic activity was reduced to 10% of pre-PCPP level in group 2. Serum fibrinogen decreased to 20% or less and was recovered within 24 hours in group 2. Antithrombin III decreased but less than fibrinogen. PT and aPTT were sometimes but not always prolonged during plasmapheresis. After plasmapheresis, PT and aPTT were

*서울대학교 의과대학 흉부외과학교실

Department of Thoracic and Cardiovascular Surgery, Seoul National University College of Medicine

**서울대학교병원 바이오이종장기 연구개발센터

Seoul National University Hospital Xenotransplantation Research Center

***한림대성심병원 진단검사의학과

Department of Laboratory Medicine, Hallym University Sacred Heart Hospital

****서울위생병원 흉부외과

Department of Thoracic and Cardiovascular Surgery, Seoul Adventist Hospital

- 본 논문은 대한흉부외과학회 제35차 추계학술대회에서 발표되었음.

= 본 연구는 2003년도 서울대학교병원 임상의학연구소 정책과제 및 바이오이종장기 연구센터 연구비 지원에 의하여 이루어졌음.

논문접수일 : 2004년 2월 19일, 심사통과일 : 2004년 4월 2일

책임저자 : 이동섭 (110-774) 서울특별시 종로구 연건동 28번지, 서울대학교 의과대학 암연구소 삼성암연구동 827

(Tel) 02-3668-7945, (Fax) 02-741-7947, E-mail: dlee5522@snu.ac.kr

본 논문의 저작권 및 전자매체의 지적소유권은 대한흉부외과학회에 있다.

prolonged beyond the measurable level. D-dimer was not found during PCPP, but appeared and maintained from 10 minutes after transplantation. Graft survival time was 5 min in group 0, and it was 90 ± 0 min in the group 2. Histopathologic changes were more typically characterized by edema, hemorrhages, thrombosis in all groups at the end of experiment. **Conclusion:** PCPP effectively removed immuoglobulins and reduced the titer of natural antibodies, as a result, significantly prolonged swine heart xenograft survival.

(Korean J Thorac Cardiovasc Surg 2004;37:391-400)

- Key words:** 1. Xenotransplantation
2. Plasmapheresis
3. Graft rejection
4. Antibodies
5. Animal models

서 론

공여장기의 부족으로 이식대기 말기 장기부전환자의 수가 기하급수적으로 증가하는 현실에서 이종이식이 치료의 대안이 될 수 있음이 강조되고 있다. 돼지의 장기가 인간에게 적합한 장기 대용물이 될 수 있다는 사실은 여러 각도에서 기술되고 있으나 돼지 장기를 인간에게 이식했을 경우 우선 초급성 거부반응이라는 면역학적인 장벽과 부딪힐 수밖에 없다. 초급성 거부반응이란 이식된 조직의 내피 세포 표면의 이종 항원과 수혜자의 혈액 내에 이미 존재하고 있는 자연 항체가 반응하면서 이어서 보체계(complement system)가 활성화되어 혈관 내피 세포의 파괴를 유발하고 궁극적으로는 수분에서 수시간 사이에 이식된 장기가 파괴되는 현상이다[1-3]. 이종장기의 이식에서 생체내 자연적으로 생성되는 자연항체 중 특히 IgM은 초급성 거부반응을 초래하는 가장 중요한 원인 항체이므로 이종심장이식 시 초급성 거부반응을 감소시키기 위해 IgM 항체의 제거가 거부반응 억제의 가능한 수단 중에 하나일 수 있다[4]. 과거 연구에서 많은 연구자들은 이종심장이식 시 자연항체를 제거하기 위한 방법으로 심장이식 전 이종 여과 혈장분리술(Double Filtration Postcentrifugal Plasmapheresis, DFPP)을 실시하여 이식 후의 생존시간 증가를 보고하였다[5-9]. 이에 연구자들은 본 연구를 통하여 혈장 여과 장치(COBE Plasmapheresis device)를 사용하여 원심분리 후 혈장분리술(Post Centrifugal Plasmapheresis, PCPP)을 시행하면서 자연 항체 제거 효율을 검증하고 PCPP에 의한 IgM 제거가 이종심장의 생존시간에 미치는

영향을 관찰하고자 하였다.

대상 및 방법

10~20 kg 체중의 Landrace pig를 공여돈(n=4)으로 사용하였고, 25~30 kg 체중의 잡종견을 수혜견(n=4)으로 하였다. COBE 혈장여과장치(COBE spectra, Lakewood, USA)를 이용하여 이종이식 2일 전과 당일에 IgM과 IgG의 동시 제거를 실시하였으며 이때 여과기로 Evalflux 2A (Kawasumi laboratories, Tokyo, Japan) membrane을 사용하였다. 본 연구에서는 면역억제제는 전혀 사용하지 않았다. PCPP를 시행하지 않은 군을 그룹 0으로 하였으며(n=1) 그룹 1에서는(n=1) PCPP를 1 plasma volume (PV, 혈장용적)을 이식 2일 전에, 이식 직전에 2 PV 용량으로 실시하였고, 그룹 2(n=4)는 이종심장이식 동일한 날짜 간격으로 2 PV, 2 PV를 실시한 후 이종심장이식 수술을 시행하였다. 공여돈의 심장은 이소심장이식법으로 후복막을 열어 신동맥 직하부의 복부대동맥과 하대정맥을 박리하고 종결개를 가한 후에 공여돈의 대동맥과 수혜견의 대동맥을 단측문합하고 공여돈의 주폐동맥과 수혜견의 하대정맥을 같은 방법으로 단측문합하였다. 혈액투석 전과 후, 그리고 이종심장이식 직전과 직후 5분, 10분, 20분, 30분, 60분, 90분까지 시간대별로 수혜견의 혈액을 채취하여 IgM과 IgG, 보체 활성도 그리고 응고 시스템의 변화를 관찰하였다. 총 IgM과 IgG는 효소결합 면역흡착법(Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, ELISA)으로 측정하였는데 실험에는 건 IgM ELISA 정량 kit (Bethyl, TX, USA)와 건 IgG ELISA 정량

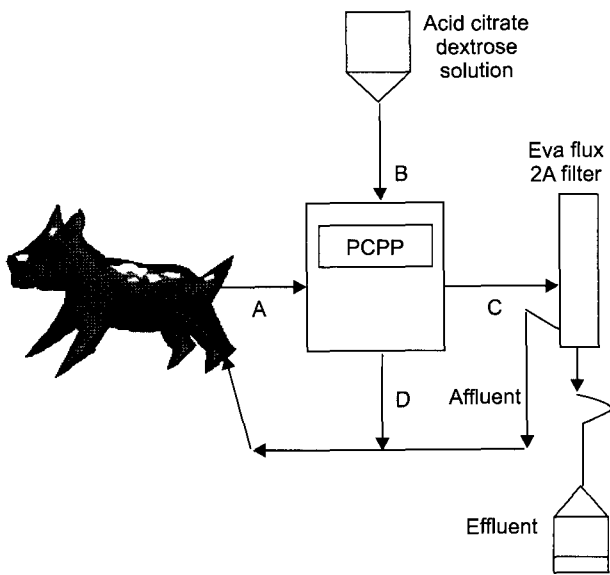


Fig. 1. Schematic drawing of the PCPP(PostCentrifugal PlasmaPheresis). PCPP is designed to selectively remove large molecules in the plasma, A=Whole blood from dog, B=ACD (Acid citrate dextrose) solution + saline, C=Plasma, D=Blood without plasma.

kit (Bethyl, TX, USA)를 사용하였고 450 nm의 흡광도에서 측정하였다. 총 IgM과 IgG의 측정은 96 well plate에 0.05 M sodium carbonate (pH 9.6)로 만든 coating buffer에 1:100으로 처리한 goat anti-dog IgM antibody를 100 μ L 넣은 후 4°C에서 하루 밤 두었다가 coating하고 3회 wash solution (50 mM Tris, 0.14 M NaCl, 0.05% Tween 20, pH 8.0)을 이용하여 세척하였다. Blocking solution (50 mM Tris, 0.14 M NaCl, 1% BSA, pH 8.0)을 각 well당 200 μ L씩 넣고 상온에서 1시간 항온한 후 계단 희석한 수혜견의 혈청과 표준 혈청을 100 μ L씩 넣고 상온에서 1시간 두었다. goat anti-dog IgM-HRP conjugate antibody와 sheep anti-dog IgG-HRP conjugate antibody를 각각 1:30,000과 1:80,000으로 희석하여 100 μ L씩 넣고 상온에서 1시간 두었다. 1시간 후 wash solution을 이용하여 200 μ L씩 넣고 5회 세척한 후 TMB solution을 100 μ L씩 넣고 암실에서 10분간 반응시킨 후 2 M H₂SO₄를 100 μ L씩 넣고 반응을 정지시켰다. ELISA reader를 이용하여 450 nm의 흡광도에서 분석하였다. 보체활성도를 평가하기 위하여 Walpen 등의 방법을 변형하여 토끼 혈구에 대한 용혈능 검사(Rabbit Erythrocyte CH50, RECH50)를 시행하였다[10]. 포도당을 함유하는 veronal buffer, DGVB⁺⁺ (57 mM NaCl, 5 mM sodium

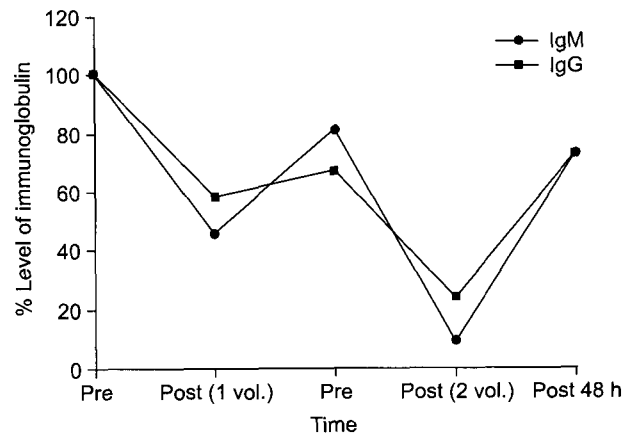


Fig. 2. Changes of IgM and IgG antibody levels in Group 1. 1 plasma-volume plasmapheresis followed by 2 plasma-volume plasmapheresis prior to transplantation at day -2 and day 0.

diethyl barbiturate, 3% dextrose, 0.1% gelatin, 0.06 mM CaCl₂, 0.4 mM MgCl₂)에 10⁹ cell/mL로 맞추어진 토끼 혈구 0.1 mL와 DGVB⁺⁺에 계단 희석한 수혜견의 혈청을 동량 섞어 37°C 수조에 1시간 두었다. 2 mL의 냉각 식염수를 넣고 원침한 후 상층액의 흡광도를 파장 412 nm에서 측정하였다. 토끼 혈구에 완충액을 넣은 영점 시험관과 증류수로 완전 용혈시킨 100% 용혈 시험관의 용혈도를 기준으로 50% 용혈을 보이는 혈청의 희석배수를 구하여 RECH50 값으로 산정하였다.

혈액응고 분석을 위하여 STA Compact analyzer (Diagnostica Stago, France)에서 STA neoplastine CI plus, STA-PTT, STA fibrinogen, STA Stachrom ATIII, STA-LIATEST D-DI 시약을 이용하여 aPTT, PT, fibrinogen, antithrombin III (ATIII), 그리고 D-dimer치를 측정하였다. 사용한 응고 검사 시약은 인체 응고 분석을 위한 전용시약이나 D-dimer 검사 외에 다른 검사들은 응고 시간 측정을 기준으로 하는 기능 검사로 수혜견에서의 응고 기능을 상대적으로 평가하는 데에는 별 문제가 없었다. D-dimer 검사는 anti-human D-dimer monoclonal antibody를 이용하는데 수혜견의 D-dimer에 대한 교차반응을 확인하고 사용하였다. D-dimer치가 0.22 g/mL 이상이면 양성으로 판정하였다.

수혜견의 상태 파악을 위해 수술 시작부터 끝까지 CBC와 electrolyte, albumin, ESR, CRP, vital (ABGA, SpO₂, BP)을 관찰하였다. 이식 후 장기의 생존 기간은 심실의 수축 기능이 없어지고 심실성 빈맥이 교정되지 않는 시점까지로 정의하였다.

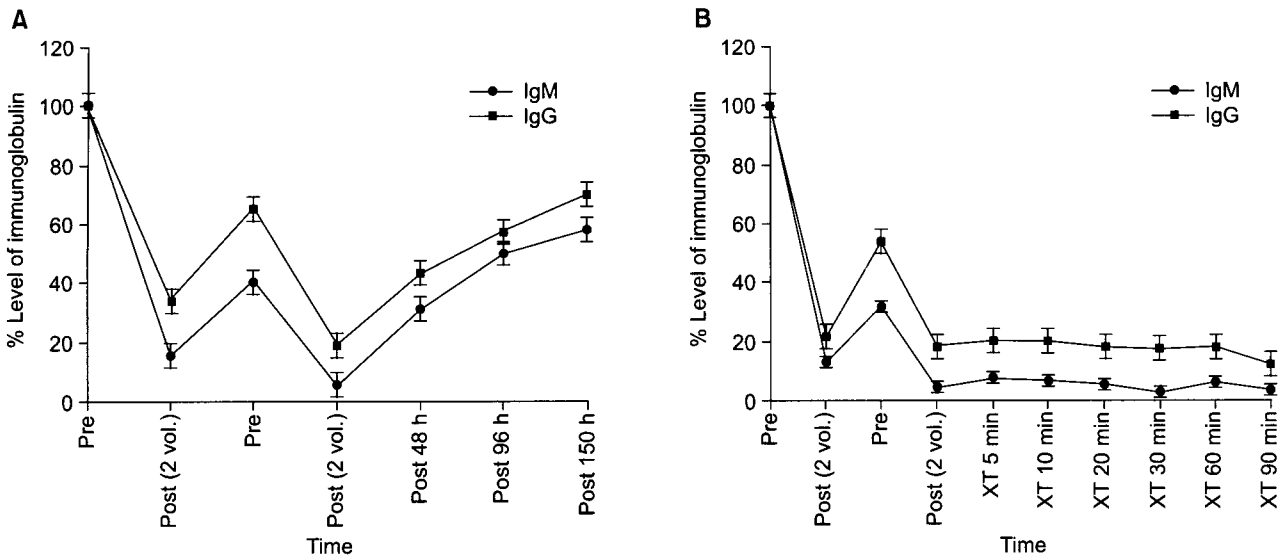


Fig. 3. Changes of IgM and IgG antibody levels in Group 2. Mean% level of serum IgM and IgG of dogs after PCPP (A) and of dogs after PCPP and heart xenotransplantation (B) in Group 2.

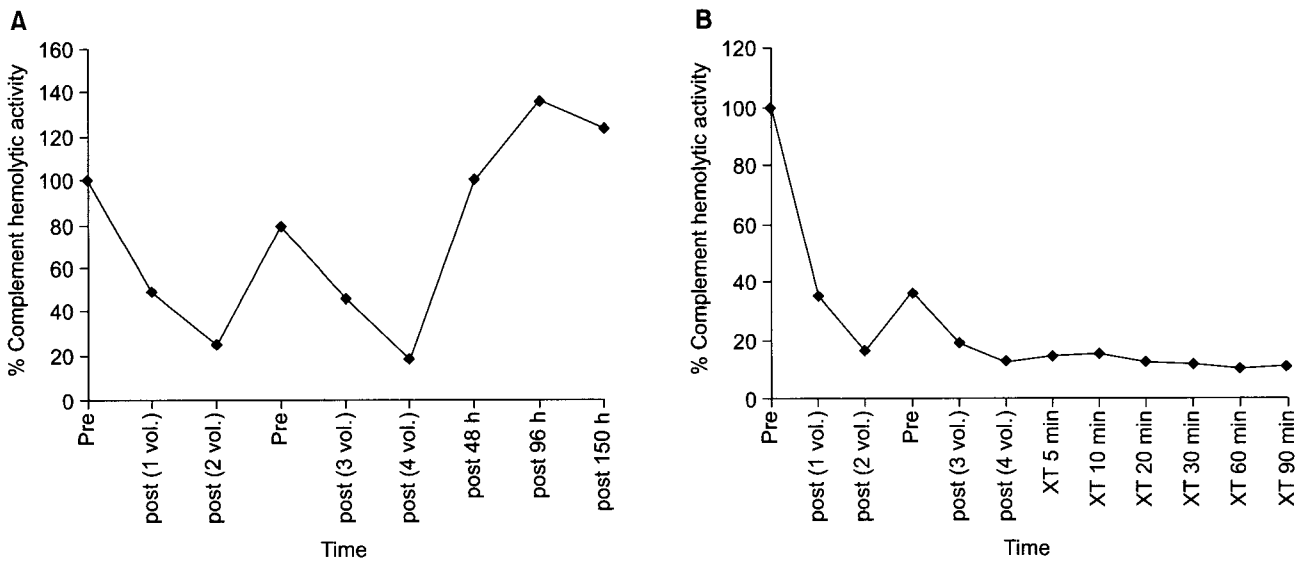


Fig. 4. (A) Percent of complement hemolytic activity before and after PCPP in Group 2. (B) Percent of complement hemolytic activity before and after PCPP and heart xenotransplantation in Group 2.

결 과

Fig. 1은 혈청에서 분자가 큰 자연항체를 제거하기 위해 고안된 PCPP의 모식도이다. PCPP의 원리는 혈액을 원심 분리 후 혈장만 membrane을 통과하고 effluent만을 제거하고 되돌려주는 방식으로 고안된 장치이다. PCPP에 사용된

membrane은 Ethylene vinyl alcohol로 만들어진 Evalflux 2A (Kawasumi laboratories, Tokyo, Japan) membrane으로 분자량이 900 kD인 IgM과 150 kD인 IgG를 동시에 제거할 수 있었다. 항체 제거율은 그룹 1의 경우 심장이식 2일 전 PCPP를 1 PV 용량으로 실시하였을 때 각각 IgM과 IgG가 54.3%, 41.7%의 제거율로 관찰된 반면 이식 당일 PCPP를 2 PV로 시행하였을 때 IgM과 IgG 각각 91.1%와 76.7%의

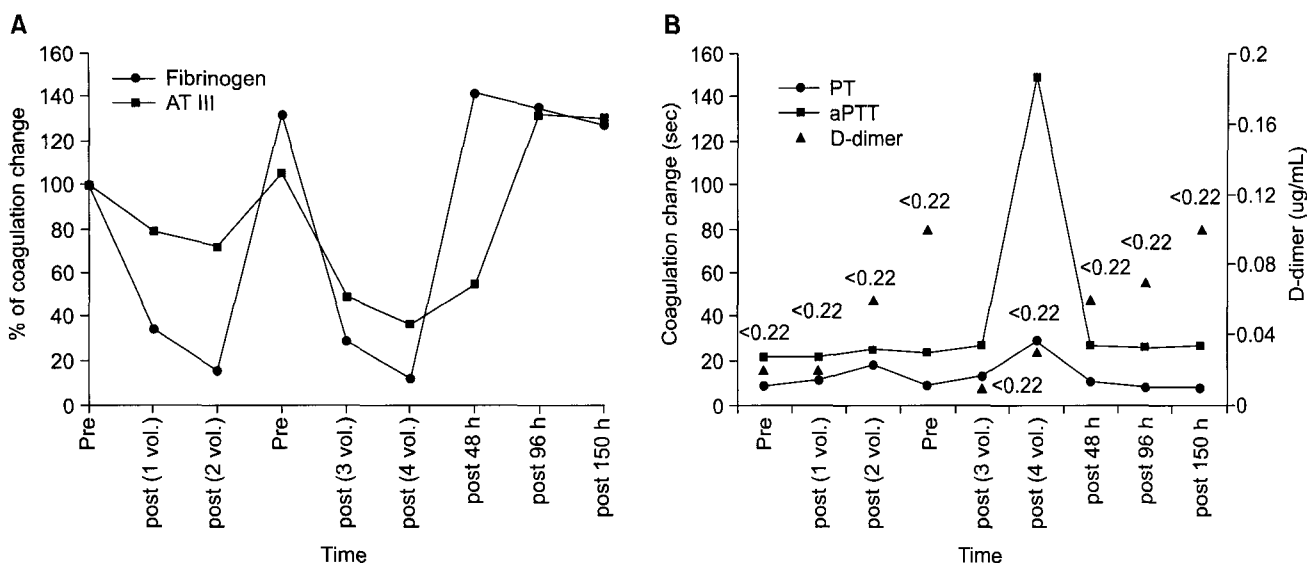


Fig. 5. (A) Change of D-dimer and percent changes of fibrinogen and antithrombin III before and after PCPP in Group 2. (B) Change of PT and aPTT before and after PCPP in Group 2. PT=Prothrombin Time; aPTT=activated partial thromboplastin time; AT III=Antithrombin III.

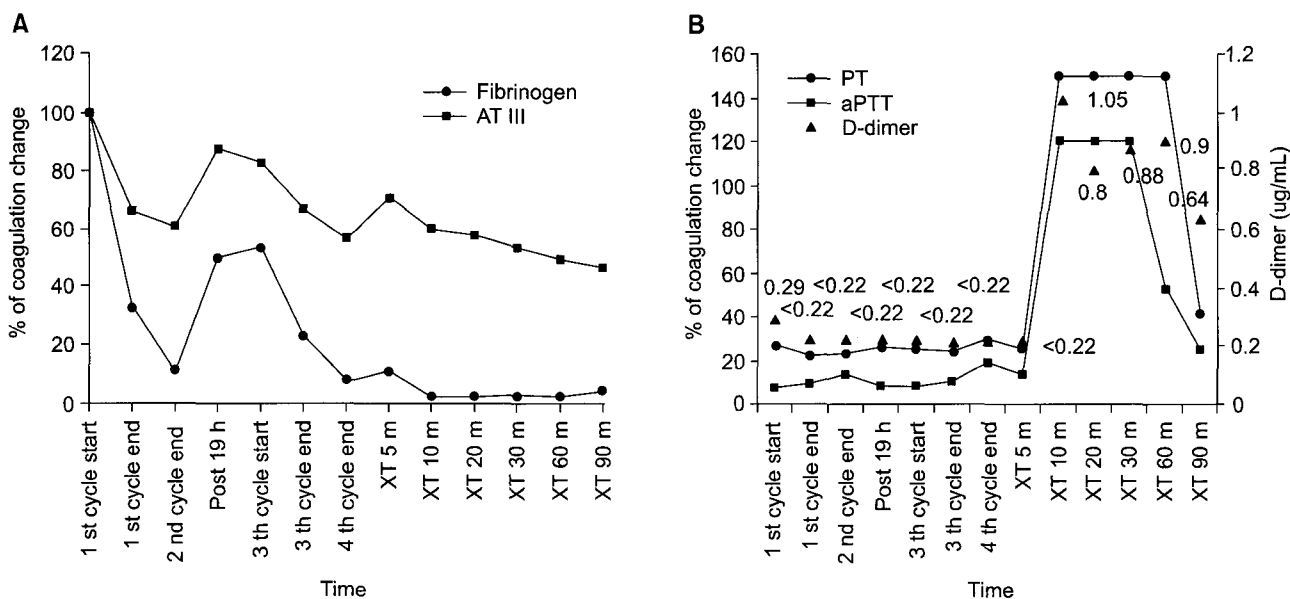


Fig. 6. (A) Change of D-dimer level and percent changes of fibrinogen and antithrombin III before and after heart xenotransplantation. (B) Change of PT and aPTT before and after heart xenotransplantation. PT=Prothrombin time; aPTT=activated partial thromboplastin time; AT III=Autithrombin III.

높은 제거율을 나타냈다(Fig. 2). 혈청 내 IgG 농도는 PCPP 시행 후 다시 증가하나 적어도 4일 후까지는 PCPP 시행 전의 50% 이하 수준을 보였다. 2 PV의 PCPP를 이식 2일 전과 이식 당일 각각 시행한 그룹 2에서의 제거율은 이식 2일 전 시행하였을 때 IgM $86.7 \pm 3.3\%$, IgG $45.8 \pm$

7.7%였으며 이식 당일 2 PV 직후에는 $95.7 \pm 1.2\%$, $80.5 \pm 2.4\%$ 로 증가되었다(Fig. 3A). PCPP를 시행하지 않고 이소심장 이식을 했던 그룹 0의 경우 이식 장기가 5분 생존한 반면 2 PV로 2회 PCPP를 시행한 경우 이식장기의 생존시간이 평균 90분으로 그룹 0에 비해 의미 있는 증가를 보

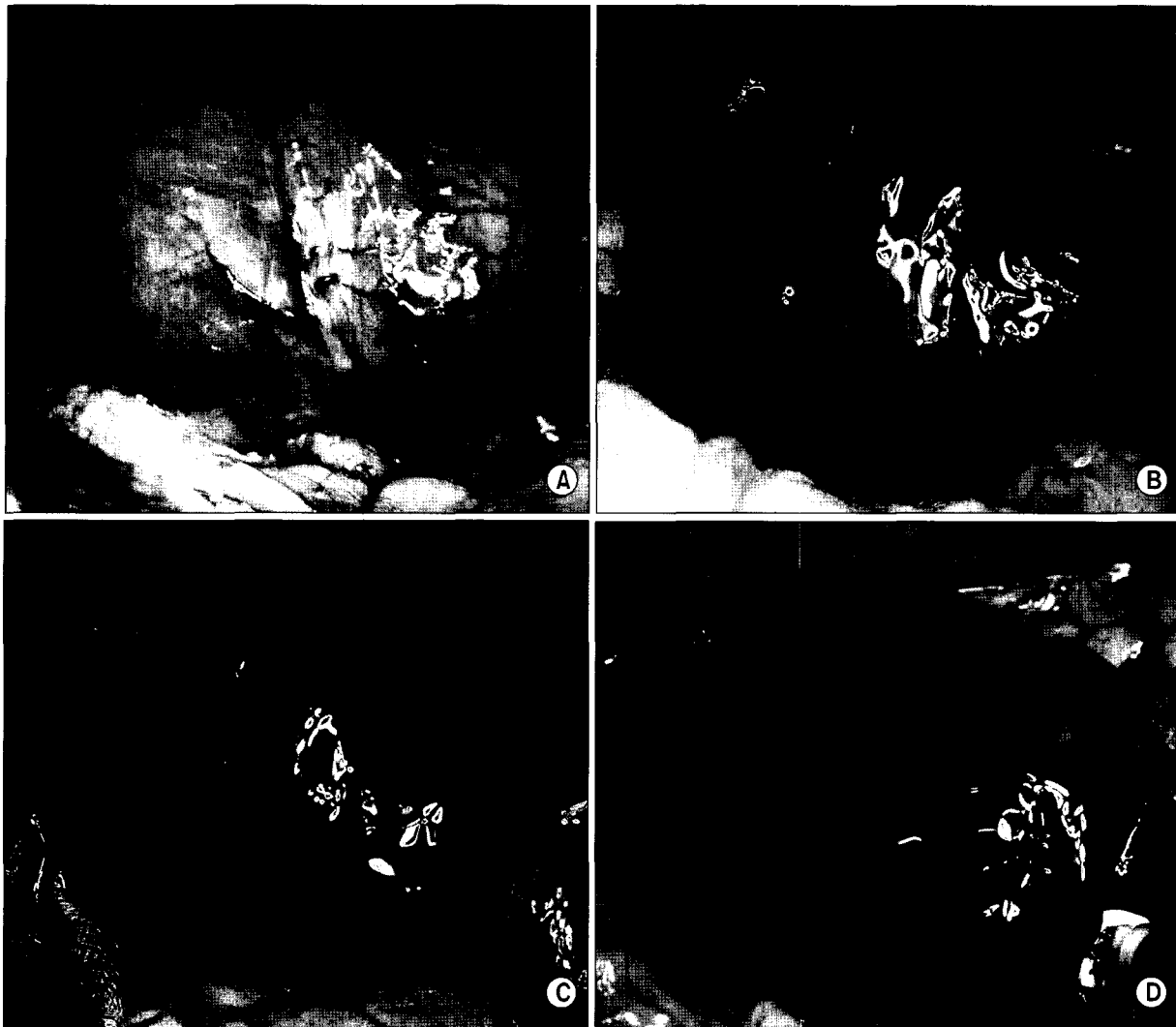
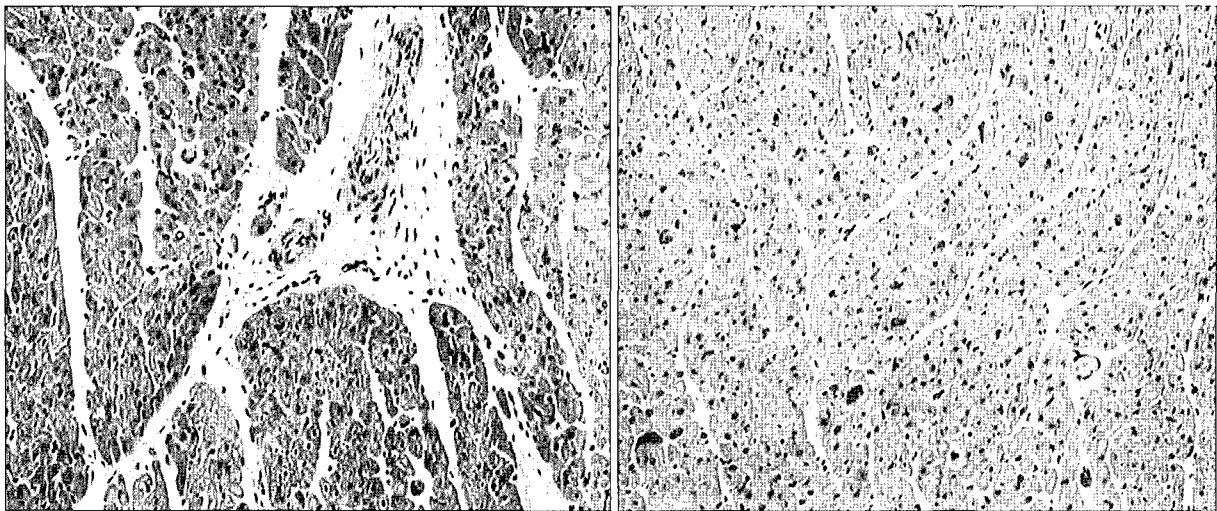


Fig. 7. Gross changes of transplanted heart at 5 min (A), 30 min (B), 60 min (C) and 90 min (D) after reperfusion.

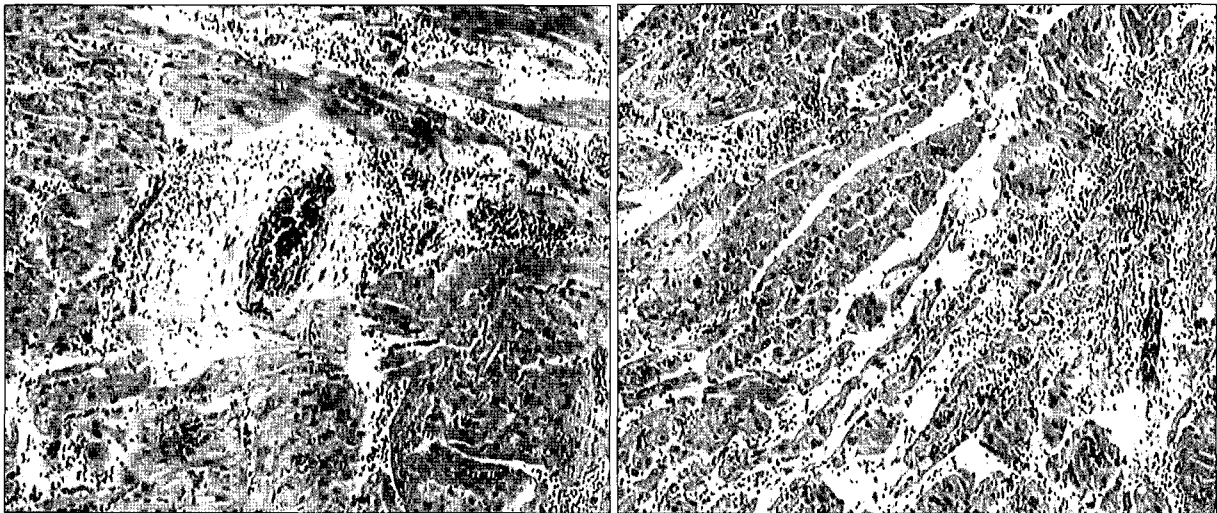
였다(Fig. 3B).

보체의 활성도는 토끼의 적혈구에 혈청 내 자연항체가 결합하고 이어 보체 활성 경로를 거쳐 용혈을 일으키는 능력을 정한 것으로 50% 용혈을 나타내는 혈청의 희석배수인 RECH50으로 나타냈다. PCPP 시행 후와 이종이식에 따른 RECH50 변화를 PCPP 시행 전 값에 비하여 %로 표시하였다(Fig. 4). 보체 용혈도는 PCPP를 시행하면 감소하였다가 PCPP 시행 후 약 24시간 후면 정상으로 회복되었는데 PCPP를 더 시행하지 않고 관찰하면 PCPP 시행 전보다도 더 증가하였다가 다시 PCPP 시행 전 수준으로 환원되는 것을 관찰할 수 있었다(Fig. 4A). 4 PV의 PCPP로 보체 용혈도를 시행 전의 10% 수준까지 감소시킬 수 있었다(Fig. 4B).

PCPP가 혈액응고인자에 미치는 영향을 보면 2 PV의 PCPP 시행으로 fibrinogen의 농도가 시행 전의 20% 수준 이하로 떨어졌으나 이 효과는 24시간 이내에 회복되었다(Fig. 5A). AT III도 비슷한 양상을 보였으나 fibrinogen보다 소폭의 감소를 보였고(Fig. 5A) 이식 후에는 50% 수준을 유지하였다(Fig. 6A). PT, aPTT는 혈액투석 도중에 간혹 연장되는 경우가 있었으나 늘 일정한 결과는 아니었으며(Fig. 5B) 이식 후에 측정 가능 범위 이상으로 연장되었다(Fig. 6B). D-dimer의 경우 PCPP 시행 동안에는 검출되지 않았으나 이식 후 10분부터 검출되어 지속하였다(Fig. 6B). Fig. 7은 이식 2일 전과 이식 당일 각각 2 PV의 PCPP로 IgM과 IgG를 제거한 후 이소심장이식을 수행하였을 때 심장의 변화를 나타낸 것이다. 재관류 후 5분(Fig. 7A)이



A. Reperfusion 13 min



B. Reperfusion 90 min.

Fig. 8. Representative histologic findings of heart specimen at 13 min and 90 min after reperfusion. (Hematoxylin and Eosin stain, $\times 100$)

경과된 심장은 선홍색을 띠었고 시간이 30분(Fig. 7B), 60분(Fig. 7C), 90분(Fig. 7D)으로 경과될수록 심장 조직의 색은 점차 검은 보라색을 띠며 경직된 심장의 모습을 보였다. H&E로 염색한 심장의 조직학적 소견은 관류 후 13분에서는 비교적 경미한 혈전을 관찰하였고 조직의 상태 역시 양호하였으나, 관류 후 90분에서는 심한 혈전을 비롯하여 확연한 조직의 괴사를 확인할 수 있었다(Fig. 8).

고 찰

말기 장기 부전환자의 가장 이상적인 치료 방법인 장기

이식은 공여 장기의 부족으로 그 한계를 보이고 있으나 이러한 제약을 어느 정도 해소할 수 있다는 점에서 이종이식 분야가 관심의 대상이 되고 있다[1]. 그러나 이종 간의 장기이식은 초급성 거부반응부터 시작되는 일련의 불가역적인 거부반응으로 임상적용이 현 단계에서는 불가능하다. 초급성 거부반응은 자연 항체에 의해 시작되며, 주로 IgM이 그 원인이라고 알려졌다[1-3]. 그러므로 초급성 거부반응을 극복하는 한 가지 방법으로 Suga 등[7]은 DFPP 방법을 이용하여 항체를 제거하고 이종심장이식을 한 후 생존시간의 증가를 관찰하였다. 그들의 연구에서 IgM과 IgG가 $95.9 \pm 2.8\%$, $80.2 \pm 9.1\%$ 가 각각 제거되었고,

심장의 생존시간 역시 DFPP를 실시하지 않은 대조군에서는 9 ± 5 분이었으나 혈장을 500 mL씩 2회 시행한 군에서는 107 ± 47 분으로 심장의 생존시간이 증가하였다. 또한 DFPP를 응용한 연구도 많이 보고 되었는데 이중 하나로 DFPP와 ex-vivo immunoadsorption을 동시에 사용하여 자연 항체를 제거한 연구에서는 IgM과 IgG가 각각 93.3%, 85.5%가 제거되었고, 제거 후 심장이식을 했을 때 심장의 생존시간 역시 대조군에서는 3분이었지만, DFPP와 splenic adsorption을 동시에 수행한 실험군에서는 평균 240 ± 141 분으로 심장의 생존 시간이 증가하였다[2]. 또한 이식 전 항체 제거 후 심장이식을 했을 때의 대조군과 실험군 사이의 조직학적 검사 소견을 비교했더니 항체가 제거된 수혜견에서는 혈전증이 보이지 않았지만 대조군에서는 심한 혈전을 보였다[11]. 이중간 이식의 생존시간을 늘리기 위해서 DFPP와 platelet-activating factor antagonist를 사용한 연구도 발표되었는데 대조군에서는 평균 17 ± 2 분의 생존 시간을, DFPP만을 시행한 실험군에서는 평균 215.2 ± 22.6 분의 생존시간을 나타냈고 platelet-activating factor antagonist만을 단독으로 처리한 실험군에서는 18.3 ± 2.1 분, 그리고 DFPP를 시행하고 platelet-activating factor antagonist를 함께 처리한 실험군에서는 평균 317 ± 26.5 분으로 DFPP만을 시행하거나 platelet-activating factor antagonist를 단독으로 처리했을 때에 비해 향상된 생존시간의 증가를 나타냈다[5]. 본 연구에서는 IgM과 IgG를 제거하기 위해 만들어진 Evalflux 2A membrane으로 IgM과 IgG를 동시에 제거할 수 있었고, 심장 이식 2일 전 PCPP를 1 PV로 실시하여 항체를 제거한 그룹 1의 경우 각각 IgM과 IgG가 54.3%, 41.7%로 제거되었으며 이식 당일 PCPP를 2 PV로 시행하였을 때 IgM과 IgG는 각각 91.1%와 76.7%로 제거되었다. 그러나 IgM의 제거가 100% 가능하지 않고 일시적이라는 사실 때문에 PCPP만으로 초급성 거부반응의 극복이 완벽할 수 없으므로 항원 주원인인 anti-galactose- α 1, 3-galactose (Gal)의 조절 방법 강구가 필요하다. 이 점에서 α -Gal을 knock-out (KO)시킨 동물의 장기를 이용하는 것이 가장 이상적인 방법의 하나라 할 수 있다. 실제로 α -Gal을 KO시킨 생쥐와 돼지는 세계적으로 개발되어 있는 상태이고 국내 연구진도 개발을 진행하고 있어 이는 매우 고무적인 일이라 할 수 있다. 그러나 이러한 KO 동물 생산이 상용화되기 위해서는 후속연구가 필요하며 이식거부 반응의 극복 방법에 대한 다방면에서의 연구도 계속 진행되어야 한다.

공여자의 유전인자를 조절한 GT-KO와는 달리 α -Gal과 경쟁적 차단을 목표로 생쥐 대신으로 제안된 human α 1,

2-fucosyltransferase (H-transferase, HT)를 발현시킨 HT-transgenic 생쥐와 GT-KO 생쥐의 심장에 사람의 혈장으로 관류한 ex-vivo의 실험에서는 대조군 생쥐에 비해 HT-transgenic 생쥐와 GT-KO 생쥐 두 마리에서 모두 긴 생존시간을 보였다[12]. 항체 생산의 기원인 B세포가 활성화되기 위해서는 helper T세포와 결합이 필요하고 그 결과 T세포 막단백질인 CD40L이 상향조정되어 B세포에 붙어 있는 T-cell이 활성화되기 위해서는 항원 단백질과 TCR-CD3 복합체의 상호작용에 이은 T-cell 표면의 CD28과 항원표시 세포인 B-7 간의 상호작용이 필요하다. CTLA-4 Ig란 이러한 B-7의 ligand이다. 따라서 이러한 물질들에 대한 antagonist가 면역세포수준에서 B-cell 활성화를 차단하여 항체 생산을 억제할 수 있다는 가정이 초급성 거부반응 극복을 위한 또 다른 접근 방법이다[13,14].

사람과 가까운 동물인 바분 원숭이로 실험한 신장 또는 심장의 이종이식에서는 Gal뿐만 아니라 non-Gal이 초급성 거부 반응에 관여한다고 보고되었고[15], 폐장의 이종이식에서는 초급성 거부반응이 anti-Gal이 아닌 non-Gal에 기인한다고 보고되었다[16]. 본 연구에서는 이러한 연구의 전 단계로 IgM 제거의 효과를 관찰하기 위해서 ethylene vinyl alcohol membrane으로 만들어진 Evalflux 2A membrane을 이용하여 PCPP를 시행하였는데 이는 IgM과 IgG 같이 900 kD, 150 kD로 분자량이 큰 물질을 거른 후에 다시 수혜견에 걸러진 혈장을 돌려주는 장치이다. 이러한 기법은 혈장을 신선 동결혈장이나 알부민액으로 완전히 치환하는 종래의 PCPP보다 수혜자의 혈장을 걸러서 다시 주기 때문에 크기가 상대적으로 작은 생체내 물질들을 유지할 수 있는 장점이 있다. PCPP로 IgM, IgG 제거와 함께 보체활성도도 함께 떨어졌는데 이것은 C3, C4 등 보체 단백질들이 같이 제거되었거나 혹은 PCPP 시행 자체가 보체 활성화를 유발하여 보체 단백질이 소모되었다고 설명할 수 있다. 낮아졌던 보체활성도는 PCPP 후의 24시간 내 정상화 혹은 그 이상으로 상승하였는데 이는 C3, C4 등 보체 단백질 급성기 반응 단백질로 생체내 염증반응과 같은 자극에 합성이 증가되어 수시간 내에 혈중 농도가 증가하므로 IgM이나 IgG보다 빠른 시간 내에 정상으로 돌아왔을 것으로 판단된다. Fibrinogen도 비슷한 맥락에서 해석할 수 있다. AT III의 경우 분자량이 58 kD로 membrane에서 제거되었다기보다는 체외순환 도중에 발생한 혈액응고 활성화로 인하여 소모되어 감소되었을 것으로 생각된다. 보체 활성도나 fibrinogen 농도에 비하여 감소 폭이 작은 것도 이러한 추측을 뒷받침한다.

IgM, IgG는 PCPP로 80~90% 정도 감소되었다가 150시간때에 처음 제거율의 반 정도로 회복되었다. IgM, IgG의 생체 내 반감기를 고려하면 IgM, IgG의 생성 증가보다는 생체 내 재분포로 농도가 증가한 것으로 여겨진다. 따라서 PCPP를 계속 하면 혈중 농도는 충분히 감소되지 않으나 하여도 생체 조직 내 분포하는 총 IgM, IgG의 양을 감소시키는 효과를 기대할 수 있다고 생각된다. 하지만 장기간에 걸친 PCPP의 시행은 생체 내 IgM, IgG 합성 증가를 초래하므로 면역억제의 사용 등 추가적인 거부반응 억제 수단이 병행되어야 할 것이다.

본 연구에서는 PCPP를 시행하지 않았던 그룹 0에 비하여 PCPP를 시행하였던 그룹 2에서 현저히 이식 생존 시간이 증가하여 PCPP를 이용한 IgM, IgG 제거가 초급성 거부반응 억제에 효과가 있음을 보여주었다. 하지만 PCPP 후 이식을 시행하였을 때 PCPP 동안 검출되지 않았던 D-dimer가 증가되었고 보체활성도도 지속적으로 감소되는 것으로 보아 본 연구의 PCPP가 초급성 거부반응을 지연 혹은 경감시켰지만 완전히 억제할 수 없었음을 시사하였다. 아마도 일부 남아 있는 항체가 이러한 거부반응을 유도할 수 있을 것으로도 생각되지만 항체 제거 후에 non-Gal에 의한 거부 반응, macrophage, NK cell에 의한 급성 혈관 매개성 거부반응을 극복하는 방법도 강구되어야 할 것이다. 하지만 100% IgM, IgG 항체 제거는 현실적으로 불가능하며 면역학적으로도 큰 장애를 가져오기 때문에 이종이식에서 초급성 거부반응의 극복에는 alpha-Gal epitope에 특이적인 IgM, IgG의 선택적 제거 방법이나 보체 활성화 억제 물질의 사용 등 여러 기전의 억제요법은 물론 보체조절, Gal KO 동물생산 등 이식 장기자체를 유전자 변형하는 다면적 접근이 필요하다 하겠다.

결 론

본 연구를 통해 이종 심장이식 시 초급성 거부반응의 문제가 되는 자연항체인 IgM과 IgG를 PCPP방법으로 제거한 후 이종 심장이식 수술한 결과, 대조군에 비해 수혜견의 생존시간이 증가된 것을 관찰할 수 있었다.

그러나 PCPP 방법만으로는 일시적인 효과와 제한된 생존시간의 연장만이 가능하다는 사실을 확인하였으며 이종이식의 임상적용 실현을 위해서는 향후 다방면의 거부반응 억제 방안이 강구되어야 한다. 급성 혈관매개성 거부반응, 세포매개성 거부반응의 극복 등 면역학적, 혈액학적 접근은 물론, 공여 동물의 유전자 변형 등의 다면적

접근이 요구된다.

참 고 문 헌

1. Kobayashi T, Yokoyama I, Morozumi K, et al. *Comparative study of the efficacy of removal of anti-ABO and anti-gal antibodies by double filtration plasmapheresis*. *Xenotransplantation* 2000;7(2):101-8.
2. Sato Y, Kimikawa M, Suga H, et al. *Prolongation of cardiac xenograft survival by double filtration plasmapheresis and ex vivo immunoadsorption*. *ASAIO J* 1992;38(3):673-5.
3. Nara M, Hakamada K, Totsuka E, et al. *Efficacy of double filtration plasmapheretic cross-circulation using a high permeability membrane between totally hepatectomized dogs and donor pigs*. *Transplantation* 2001;72(11):1736-42.
4. Kimikawa M, Agishi T, Teraoka S, et al. *Prolongation of cardiac xenograft survival by double filtration plasmapheresis and ex vivo xenoantibody adsorption*. *Transplant Proc* 1992;24(2):447.
5. Taniguchi S, Kitamura S, Kawachi K, et al. *Effects of double filtration plasmapheresis and a platelet-activating factor antagonist on the prolongation of xenograft survival*. *J Heart Lung Transplant* 1992;11(6):1200-8.
6. Mitchell L, Henry MD, Han LK, et al. *Antibody depletion prolongs xenograft survival*. *Surgery* 1994;115(3):355-61.
7. Suga H, Ishida H, Kimikawa M, et al. *Prolongation of cardiac xenograft function after reduction of natural antibodies using double filtration plasmapheresis*. *ASAIO Trans* 1991;37(3):M433-4.
8. Abouna GM, Al-Abdullah IH, Ilija H, et al. *Comparison of the effect of plasmapheresis using human albumin or dextran 40 on the survival of pig-to-dog renal xenografts*. *Transplant Proc* 1996;28(1):212-4.
9. Taniguchi S, Kitamura S, Kawachi K, et al. *Effects of a platelet-activating factor antagonist at different doses given simultaneously with double-filtration plasmapheresis on cardiac xenograft survival*. *Transplant Proc* 1994;26(2):969-71.
10. Walpen AJ, Mohacsi P, Frey C, et al. *Activation of complement pathways in xenotransplantation: an in vitro study*. *Transpl Immunol* 2002;9(2-4):271-80.
11. Henry ML, Han LK, Orosz CG, et al. *Modification of xenograft hyperacute rejection via xenoantibody depletion*. *Transplant Proc* 1990;22(3):1081-2.
12. Chen CG, Salvaris EJ, Romanella M, et al. *Transgenic expression of human alpha 1, 2-fucosyl transferase (H-transferase) prolongs mouse heart survival in an ex vivo model of xenograft rejection*. *Transplantation* 1998;27(6):832-7.
13. Yin DP, Sankary HN, Ma LL, et al. *Lewis rat pancreas, but not cardiac xenografts, are resistant to anti-gal antibody mediated hyperacute rejection*. *Transplantation* 2000;71(10):1385-9.
14. Yin D, Ma L, Shen J, et al. *CTLA-4lg in combination with*

anti-CD40L prolongs xenograft survival and inhibits anti-gal ab production in GT-Ko mice. Am J Transplant 2002;2(1):41-7.

15. Buhler L, Xu Y, Li W, et al. *An investigation of the specificity of induced anti-pig antibodies in baboons.* Xenotransplantation 2003;10(1):88-93.

16. Gonzalez-Stawinski GV, Daggett CW, Lau CL, et al. *Non-anti-Gal alpha1-3Gal anti body mechanisms are sufficient to cause hyperacute lung dysfunction in pulmonary xenotransplantation.* J Am Coll Surg 2002;194(6):765-73.

=국문 초록=

배경: 이종간 장기이식은 즉각적이고 비가역적 초급성 거부 반응을 초래하는데 자연항체인 IgM이 주 원인으로 알려져 있다. 따라서 항체를 제거하는 것이 초급성 거부반응을 감소시키는 하나의 방법이 될 수 있다. 이에 연구자들은 돼지 → 개 이소 심장이식 모델에서 자연항체를 제거하기 위해 원심분리 후 혈장분리술(postcentrifugal plasmapheresis-PCPP)을 사용하고 수혜견의 항체 변화와 이종 심장이식 시 생존시간을 관찰하였다. 대상 및 방법: 10~20 kg의 이계 교배시킨 돼지를 공여돈으로, 25~30 kg의 잡종개를 수혜견으로 사용하였다. 실험군에 해당하는 수혜견은 COBE TPE plasmapheresis device (COBE Laboratories, Lakewood, CO)로 PCPP를 시행하였다. 심장이식 2일 전과 이식 당일 PCPP를 진행하였다. 대조군은 PCPP를 수행하지 않았다. 그룹 1에서는 PCPP를 1 plasma-volume(PV)을 시행하고, 2일 후 2 PV를 실시하였다. 그룹 2는 2 PV를 시행하고 2일 후 2 PV로 PCPP를 실시하였다. 돼지의 심장은 이소심장 이식법으로 수혜견의 복강내 신하(infrarenal) 대동맥과 하대정맥에 이식하였다. 수혜견 혈장내의 총 IgM과 IgG의 분석은 ELISA 방법을 이용하였다. 실험에서 얻은 시료로 혈청 albumin, 전해질, 보체 활성도와 응고 인자의 변화를 관찰하였다. 또한 이식된 심장의 초급성 거부 반응을 확인하기 위해 이식 거부반응을 경험한 심장 절편을 조직 병리학적으로 관찰하였다. 결과: PCPP 방법으로 처리한 그룹 2에서의 혈장내의 총 IgM과 IgG의 제거율은 각각 $95.7 \pm 1.2\%$, $80.5 \pm 2.4\%$ 를 나타냈다. 또한 각 그룹에서 혈청 albumin 농도가 감소하는 것을 관찰하였는데 그룹 1에서는 2.8에서 1.4 g/dL, 그룹 2에서는 3.0에서 1.5 g/dL의 감소를 보였다. 보체 활성도는 PCPP를 시행하면 감소하였다가 PCPP 시행 후 약 24시간 후면 정상으로 회복되었다. 2 PV로 2회 시행한 PCPP에서의 보체 활성도는 시행 전의 10% 수준까지 감소되었다. PCPP가 혈액응고인자에 미치는 영향을 보면 2 PV의 PCPP 시행으로 fibrinogen의 농도가 시행 전의 20% 수준 이하로 떨어졌으나 이 효과는 24시간 이내에 회복되었고 antithrombin III도 비슷한 양상을 보였으나 fibrinogen보다 소폭의 감소를 보였다. PT, aPTT는 PCPP 도중에 간혹 연장되는 경우가 있었으나 늘 일정한 결과는 아니었으며 이식 후에 측정 가능 범위 이상으로 연장되었다. D-dimer의 경우 PCPP 시행 동안에는 검출되지 않았으나 이식 후 10분부터 검출되어 지속되었다. PCPP를 수행하지 않은 그룹 0 수혜견에 이식한 심장의 생존시간은 5분이었으나 PCPP에 의해 자연항체를 제거 후 이식된 심장의 생존시간은 90분으로 현저한 증가를 보였다. 또한 조직 병리학적으로도 이식 거부에 대한 특징이 그룹 0에 비해 그룹 2에서 지연됨을 확인하였다. 결론: PCPP는 수혜견의 자연항체를 효과적으로 제거하여 초급성 거부반응을 감소시킴으로써 결국 돼지의 이종 이식 전 심장의 생존시간을 증가시켰다.

- 중심 단어 : 1. 이종 이식
2. 혈장분리
3. 이식 거부 반응
4. 항체
5. 동물 모델