

골수이식 후 미성숙 망상적혈구의 유용성 평가

울산의대 서울아산병원 진단검사의학과

서숙원 · 김천희 · 지현숙

Clinical Significance of Immature Reticulocyte as an Early Recovery Indicator after Bone Marrow Transplantation

Seo, Suk Won., Kim, Chun Hee., Chi, Hyun Sook

*Department of Laboratory Medicine, College of Medicine,
University of Ulsan and Asan Medical Center, Seoul, Korea*

Bone marrow transplantation(BMT) is widely used as curative means of various malignant and nonmalignant hematologic disorders, and early and accurate determination of engraftment is very important for critical management decisions. Reticulocyte counts performed by automated flow cytometric methods is a good indicator of erythropoietic activity and its evaluation has been proposed as an early predictor of bone marrow regeneration. Some reports highlighted the usefulness of the percentage of highly fluorescent reticulocytes and the sum of highly and medium fluorescent reticulocytes(immature reticulocyte fraction, IRF). In Asan Medical Center, the criteria for engraftment following BMT or PBSCT was defined as the first day of a 3-day trend of absolute neutrophil count(ANC) $\geq 500/\mu\text{L}$ and platelet count $\geq 30 \times 10^3/\mu\text{L}$. In 1999, Grotto et al proposed an indicator of bone marrow recovery as the first day on which the IRF was twice the minimum value after bone marrow transplantation. To compare the both criterias, we got consecutive datas of immature reticulocyte fraction, absolute neutrophil count(ANC), WBC count, platelet count and reticulocyte count by XE-2100 automated hematology analyzer(Sysmex Co. Japan) from 33 patients daily after BMT. When compared to standard neutrophil engraftment(10-30 days, 16.2 ± 4.6 days), IRF engraftment (5-21 days, 11.0 ± 3.9 days) occurred significantly earlier in 87.9% of patients($P < 0.05$). The mean engraftment day for WBC count(11-29 days, 16.4 ± 4.3 days) was similar to ANC, but platelet count and reticulocyte count revealed more delayed data (10-49 days, 19.1 ± 7.4 days vs 17-64 days, 31.4 ± 14.4 days). In conclusion, our results confirm that an increase in the immature reticulocyte population is the earliest sign of the hematopoietic recovery after BMT and that automated reticulocyte quantification including immature fraction may be integrated into clinical protocols to evaluate bone marrow reconstitution.

Key Words: Immature reticulocyte fraction(IRF), Absolute neutrophil count(ANC), Bone marrow transplantation (BMT)

I. 서 론

골수이식은 악성림프종이나, 백혈병, 재생불량성 빈혈 등 각종 혈액 질환의 치료법으로 널리 사용되며(O'Reilly, 1983) 이때 골수의 생착시기를 판별하는 것이 매우 중요하다.

골수 생착의 판단기준으로 각 병원마다 골수검사, 말초 혈액의 절대호중구수(ANC, Absolute Neutrophil Count), 백혈구, 혈소판, 망상적혈구 등 여러 가지 지표들을 사용하고 있으며 본원에서는 현재 말초혈액상 절대호중구수가 500/uL 이상이 3일 지속되는 날의 첫째 날로 그 기준을 잡고 있다. 그러나 이들 지표들은 수혈, 감염, 투여약물 등에 영향을 받는 등의 단점을 가지고 있어 새로운 지표가 필요한 실정이다(Davis 등, 1989).

최근에는 검사장비의 발달로 미성숙망상적혈구수의 측정이 가능해져 이 검사를 생착 시기판정 검사로 이용하고자 하는 시도들이 논의되고 있다. 미성숙망상적혈구는 성숙망상적혈구의 전구단계세포로서, 망상적혈구가 분화되면서 RNA양이 감소하는 현상을 이용하여 망상적혈구의 RNA양을 측정 후 저염색강도, 중등염색강도, 고염색강도로 분류하고 중등염색강도와 고염색강도를 합친 분획을 미성숙망상적혈구라 말한다(Remacha 등, 1996).

이에 본연구는 서울아산병원에서 골수이식을 시행한 환자들을 대상으로 미성숙망상적혈구와 절대호중구수, 혈소판, 백혈구, 망상적혈구수의 생착시기 판정에 대해 비교하여 미성숙망상적혈구의 유용성을 알아보하고자 하였다(Davis 등, 1989; Greinix 등, 1994 ; Dalal 등, 1996; Grotto 등, 1999).

II. 대상 및 방법

1. 대상

2002년 9월부터 2003년 3월까지 본원에서 골수이식을 시행한 33명의 환자가 대상이었으며 여자 13명, 남자 20명이었다. 나이는 15세에서 49세 까지 평균 35.3세이었으며 환자의 기저질환은 Table 1과 같다.

Table 1. Clinical characteristics of 33 patients studied

Diagnosis	Number of patients
Acute myeloid leukemia	10
Acute lymphoblastic leukemia	7
Acute mixed lineage leukemia	1
Myelodysplastic syndrome	2
Chronic myelogenous leukemia	10
Severe aplastic anemia	3

2. 방법

백혈구, 혈소판, 망상적혈구, 미성숙망상적혈구 검사는 자동혈구분석기인 XE-2100(Sysmex Co. Japan)을 이용하여 시행하였으며 절대호중구수는 말초혈액도말표본을 제작하여 검경한 결과로 구하였으며 골수이식 2일전부터 생착이 완성된 시점까지 매일의 누적된 결과를 조회하여 분석하였다. XE-2100은 형광염색액인 Polymethine dye를 이용한 유세포분석의 원리로서 염색된 망상적혈구의 RNA를 반도체 레이저로 측정 후 reticulocyte scattergram을 얻고 이를 해석하며 망상적혈구의 성숙도를 RNA양이 많아지는 순서에 따라 low, middle, high fluorescence ratio(LFR, MFR, HFR) 분획으로 나누어 각각의 분포도에 대한 정보를 제공한다. 생착을 판별할 수 있는 기준은 절대호중구수가 500/uL이상이 3일 지속되는 날의 첫째 날로, 미성숙망상적혈구는 Grotto 등 (1999)의 제시대로 골수이식 후 최저치의 두 배 이상의 결과를 보이는 날로 정하였다. 말초혈액 백혈구 수는 $1.0 \times 10^3/uL$ 이상, 망상적혈구 수는 1.0% 이상, 혈소판 수는 $20 \times 10^3/uL$ 이상 3일 지속되는 날의 첫째 날로 정하였다(김 등, 1997).

3. 통계

통계분석은 SPSS통계 프로그램을 사용하였다. 미성숙망상적혈구와 각 지표들 간의 생착시기를 비교하기 위해서 평균 및 표준편차, 변이계수를 구하였고, Wilcoxon Rank Sum test를 이용하여 유의성을 검정하였다. 각각의 유의수준은 $P < 0.05$ 로 하였다.

III. 결 과

33 명의 골수이식 환자들의 검사결과를 이용해서 생착일을 정하고 각 항목별로 분석한 결과 지표들의 생착일은 미성숙망상적혈구가 11.0±3.94일, 호중구수는 16.2 ± 4.63일, 백혈구는 16.4 ± 4.34일, 혈소판수는 19.1 ± 7.37 일, 망상적혈구는 31.4 ± 14.37일로 미성숙망상적혈구가 다른 지표들보다 가장 유의하게 빠르게 나타났다 (p<0.001)(Table 2)(Fig. 1). 환자별 생착일은 Table 3와 같 으며 골수이식 후 28일째 골수 생검을 통하여 생착을 확인한 결과 33명 모두 생착이 되었음을 확인할 수 있었고 32명의 환자에게서 말초혈액상의 절대호중구수, 백혈구, 혈소판, 망상적혈구, 미성숙망상적혈구가 생착 판별기준에 도달하였다. 환자 4의 각 지표별 생착일은 백혈구 11 일, 절대호중구수 10일, 혈소판 18일, 미성숙망상적혈구 11일을 나타내 다른 환자와 큰 차이를 보이지 않았으나 망상적혈구수는 생착기준에 도달하지 못하였고 이후 질병이 재발하는 결과를 보였다.

미성숙망상적혈구의 결과를 본원에서 현재 사용하고 있는 기준방법인 절대호중구수와 비교하고자 골수이식 2 일전부터 골수이식 후 20일까지의 미성숙망상적혈구와 절대호중구수 의 평균은 Table 4와 같다. 미성숙망상적혈구와 절대호중구수는 골수이식 후 점점 감소하여 골수이식 8일경에 최저값을 나타내고 이후 다시 증가하는 양상을 보였다(Fig. 2). 각 검사별 생착기준으로 환자의 생착일을 정하고 생착일의 평균값을 계산한 결과 미성숙망상적혈구는 평균 11.0일 ± 3.94일이었고 생착 당시 미성숙망상적혈구의 평균값은 5.0% ± 3.64%였으며 절대호중구수는 평균 16.2일 ± 4.63일의 생착일을 나타냈고 당일의 절대호중구수 평균은 1,164/uL±880.9/uL이었다. 또한 33 명의 골수이식 환자 중 29명(87.9%)에서 절대호중구수 지표보다 미성숙망상적혈구 지표로 설정한 생착시기를 1-22일(평균-5.2일) 빠르게 설정할 수 있어서 미성숙망상적혈구 검사가 생착시기 판정에 더욱 유용함을 알 수 있었다(Fig. 3).

Table 2. Average engraftment days of each parameters (mean±SD)

Average engraftment days				
IRF	ANC	WBC	PLT	RETI
11.0±3.94*	16.2±4.63	16.4±4.34	19.1±7.37	31.4±14.37

*P<0.001 compared with other parameters

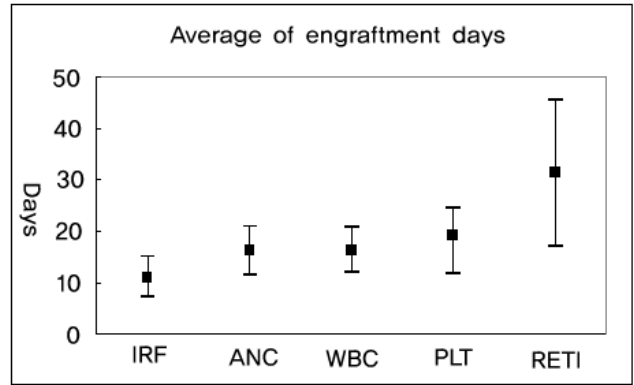


Fig. 1. Average engraftment days of each parameters (mean±SD).

Table 3. Engraftment days after bone marrow transplantation

Patient	Sex	Age	Diagnosis	Engraftment days				
				IRF	ANC	WBC	PLT	RETI
1	F	41	CML	11	12	15	21	18
2	F	29	AML	11	20	20	28	19
3	F	42	CML	17	20	20	10	45
4	F	41	AML	11	10	11	18	NA
5	M	33	MDS RA	8	17	17	20	24
6	F	41	AML	11	14	14	12	17
7	F	35	AMLL	7	20	20	12	32
8	F	35	AML	13	11	12	14	19
9	M	45	AML	16	21	21	18	32
10	M	28	CML	12	12	13	12	53
11	F	48	SAA	10	10	10	13	29
12	F	32	ALL	6	11	11	14	48
13	M	30	ALL	8	30	29	30	55
14	M	36	ALL	5	19	19	21	64
15	F	31	AML	10	12	12	12	25
16	M	48	AML	8	20	20	20	21
17	M	45	MDS RA	17	19	20	15	35
18	M	35	AML	7	20	20	19	37
19	M	49	CML	17	15	15	17	24
20	M	17	SAA	11	21	21	28	59
21	M	15	ALL	21	24	23	24	30
22	M	15	ALL	15	18	19	49	49
23	M	28	ALL	8	11	12	22	17
24	F	33	SAA	7	12	12	18	26
25	M	48	AML	13	16	16	20	51
26	M	45	CML	10	17	17	24	18
27	M	44	CML	12	17	17	21	19
28	M	25	ALL	13	17	17	22	17
29	M	39	AML	13	11	11	13	21
30	F	36	CML	14	15	15	17	26
31	M	37	CML	5	11	11	13	18
32	F	24	CML	5	14	14	16	17
33	M	35	CML	11	17	18	18	41

CML = Chronic myelogenous leukemia ; AML=Acute myeloid leukemia ; ALL=Acute lymphoblastic leukemia AMLL = Acute mixed lineage leukemia ; RA = refractory anemia ; MDS=Myelodysplastic syndrome ; SAA = Severe aplastic anemia ; IRF=Immature reticulocyte fraction ; ANC= Absolute neutrophil count ; RETI =reticulocyte count

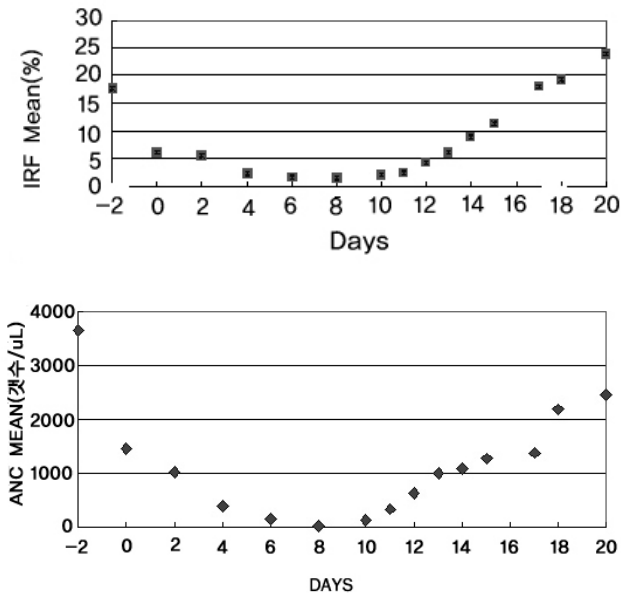


Fig. 2. Changes of mean values of IRF and ANC after BMT.

IV. 고찰 및 결론

골수이식은 약 100년 전에 악성 빈혈이나 백혈병 환자에 대한 치료법의 하나로 골수를 경구로 투입하는 치료법이 시도된 이후로 프랑스를 중심으로 연구가 활발히 진행되어져 왔으며 오늘날에는 악성림프종이나, 백혈병, 재생불량성 빈혈 등 각종 혈액 질환의 치료법으로 널리 사용되고 있다(O Reilly, 1983). 또한 골수이식의 성공여부 판단에는 골수의 생착시기를 판별하는 것이 무엇보다 중요하다.

골수 생착의 판단기준은 병원마다 달라서 골수검사, 말초혈액의 호중구수, 백혈구, 혈소판, 망상적혈구 등 여러 가지 지표들을 사용하고 있으며 서울아산병원에서는 현재 말초혈액상 절대 호중구수가 500/uL 이상이 3일 지속되는 날의 첫째 날로 그 기준을 잡고 있다. 그러나 이들 지표들은 수혈, 감염, 투여약물 등에 영향을 받아 정확한 판단이 어렵고 최근 들어 새로운 검사장비가 속속 개발됨에 따라 미성숙망상적혈구 등 새로운 검사를 그 지표

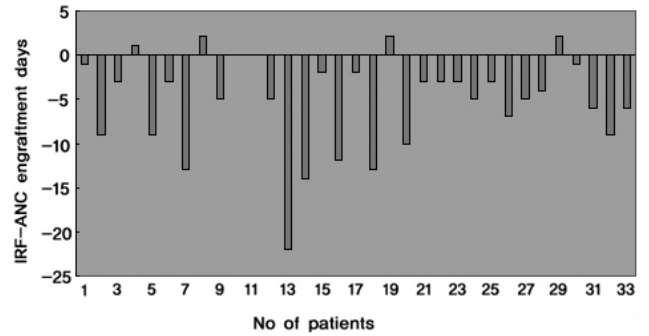


Fig. 3. Comparison of IRF engraftment days to ANC engraftment days in 33 patients.

로 삼는 데에 대한 연구가 활발해 지고 있다. Davis 등 (1989)은 망상적혈구성숙지표가 골수이식 후 최저치의 20%이상 증가를 보이는 시기를 생착시기로 정하여 보고한 바 있고 Greinix 등 (1994)은 적혈구내의 RNA양에 따라 저, 중, 고(low/middle/high fluorescence ratio : LFR, MFR, HFR)분획으로 분류하여 고형광망상구(HFR) 수가 500/uL이상이 된 날을 생착 시기로 정하여 HFR이 골수이식 후 생착 시기의 판별을 위한 중요한 지표라고 주장하였다. Dalal 등(1996)도 망상적혈구성숙지표가 2.0 이상으로 3일간 유지되는 것을 기준으로 다른 지표보다 빠른 생착을 나타냄을 증명하였다. Spanish Multicentric Study (1994)는 HFR값이 3% 이상되는 시점이 적혈구 조혈기능이 회복되는 시점이라고 주장하였으며, Torres 등(2001)도 골수이식 후 HFR값이 3%이상 3일 연속이고 MFI와 IRF값이 각각 10 과 10%이상 나올 경우 적혈구계 조혈기능이 회복되었다고 발표하였다. 따라서 저자들은 본원에서 사용하는 XE-2100 (Sysmex Co. Japan)을 이용하여 미성숙망상적혈구검사가 골수이식의 생착시기를 예견하는데 유용한지를 판단하고자 서울아산병원에서 골수이식을 받은 33명의 환자를 대상으로 비교해 보고자 하였다. XE-2100의 미성숙망상적혈구검사의 측정원리를 살펴보면 형광염색액인 Polymethine dye를 이용한 유세포분석의 원리로서 염색된 망상적혈구의 RNA를 반도체 레이저로 측정후 RET scattergram을 얻고 이를 해석하며 망

Table 4. Mean values of IRF and ANC after BMT in 33patients

	-2	0	2	4	6	8	10	11	12	13	14	15	17	18	20
Average of IRF (% /uL)	20.2	7.2	5.2	2.5	1.5	1.3	1.8	2.3	3.4	4.5	7.0	7.7	12.2	14.3	23.1
Average of ANC(갯수/uL)	3685	1463	1255	311	101	13	139	413	784	1,331	1,369	1,278	1,117	1,131	1,363

상적혈구의 성숙정도를 RNA양이 많아지는 순서에 따라 low, middle, high fluorescence ratio(LFR, MFR, HFR) 분류으로 나누어 각각의 분포도에 대한 정보를 제공하고 있다(강 등, 2001 ; 최 등, 2000). 망상적혈구가 미성숙할 수록 형광의 강도가 높기 때문에 MFR과 HFR 분류를 합쳐서 미성숙망상적혈구(immature reticulocyte fraction, IRF)이라고 정의하고 있다(Remacha 등, 1996).

서울아산병원에서 골수이식을 받은 환자 33명을 대상으로 한 연구결과를 살펴보면 각 지표들의 생착시기는 미성숙망상적혈구가 11.0 ± 3.94 일, 절대호중구수는 16.2 ± 4.63 일, 백혈구수는 16.4 ± 4.34 일, 혈소판은 19.1 ± 7.37 일, 망상적혈구수는 31.4 ± 14.37 일로 미성숙망상적혈구가 다른 지표보다 가장 유의하게 빠르게 나타났다($p < 0.001$, Table 2, Fig. 1). 이 결과에서 미성숙망상적혈구가 평균 생착일로 볼 때 백혈구와 비교하여 1.5배, 절대호중구수 1.5배, 혈소판 2배, 망상적혈구보다는 3배 빠르게 나타났다. 특히 환자 4의 경우 골수생검을 통하여 생착도 확인되고 각 지표별 생착일이 백혈구 11 일, 미성숙망상적혈구 11일, 혈소판 18일로 평균 생착일과 큰 차이가 없었으나, 망상적혈구만이 생착기준에 도달하지 못하였으며, 이후 질병이 재발하는 흥미로운 결과를 보였다. 골수이식 2일 전부터 20일까지 미성숙망상적혈구와 절대호중구수의 평균값을 구해 보니 두 가지 지표 모두 골수이식 후 점점 감소하다가 골수이식 8일 경에 최저값을 나타내고 이후 다시 증가하는 양상을 보였다. 즉 미성숙망상적혈구는 골수이식 당일에 7.2% 이었다가 8일째에 1.3%를 보였고, 절대호중구수 역시 골수이식 당일 1463/uL, 이식 8일째에는 13/uL로 최저값을 보인 후 상승하였으므로 평균 골수이식 후 8일경이 생착지표의 상승 점임을 알 수 있었다. 또한 생착일로 판정된 당일의 미성숙망상적혈구 평균값은 $5.0 \pm 3.64\%$ 였으며 절대호중구수 평균값은 $1,164 \pm 880.86/uL$ 이었다. 또한 33명의 골수이식 환자 중 29명에서 절대호중구수 지표보다 미성숙망상적혈구 지표가 더 빠른 생착시기를 나타내었고 4명만이 절대호중구수 지표보다 늦게 나타났다. 이들 4명에서도 미성숙망상적혈구지표가 절대호중구수 지표보다 1-2일 늦게 나타나는 것으로 나타나, 33명의 골수이식 환자 대부분의 생착지표를 절대호중구수 지표에서 미성숙망상적혈구 지표로 대체 할 수 있으리라 사료되었다. 본 연구결과에서 골수이식 후 생착일의 기준으로 볼 때, 미성숙망상적혈구가 평균 11.0일, 절대호중구수가 16.2일로 현재 사용하고 있는 절대호중구수 지표보다 평균 5.2일

빠르게 나왔으며, 통계학적으로도 유의하였다($P < 0.001$). 이 결과는 또한 Grotto 등(2003)의 보고와도 일치된 소견이었다. 또한 절대호중구수는 슬라이드를 제작 염색하여 현미경으로 감별 계산하는 방법을 택하고 있으므로 백혈구수 감소시 차이가 있을 수 있고 결과보고가 신속하지 못하다는 단점이 있는 반면, 미성숙망상적혈구는 자동화 장비를 이용하고 있어 정확성과 신속성이 뛰어난 장점이 있다.

이상의 결과로 보아, 미성숙망상적혈구는 골수이식 후 생착의 조기판별 지표로 유용하게 이용될 수 있을 것이며, 이를 위하여 각 검사실마다 표준화된 판정기준이 설정되어야 할 것으로 사료된다.

참 고 문 헌

1. Dalal BL, Stockford GR, Naiman SC, Spinelli JJ, PHillips GL. Criteria for marrow engraftment comparison of reticulocyte maturity index with conventional parameters. *Bone Marrow Transplant* 17:91-2, 1996
2. Davis BH, Bigelow NC, Ball ED, Mills L, Cornwell III GG. Utility of flow cytometric Reticulocyte Quantification as a predictor of Engraftment in Autologous Bone Marrow Transplantation. *Am J Hematol* 32: 81-7, 1989
3. Davis BH, Bigelow NC. Flow cytometric reticulocyte quantification using thiazole orange provides clinically useful reticulocyte maturity index. *Arch Pathol Lab Med* 113:684-98, 1989
4. Greinix HT, Linkech, Keil F, Kalhs P, Schwarzinger I, Schneider B et al, Early detection of hematopoietic engraftment after bone marrow and peripheral blood stem cell transplantation by highly fluorescent reticulocyte. *Bone marrow transplant* 14:307-13, 1994
5. Grotto HZW, Vigortto AC, Noronha JFA, Lima GALM. Immature reticulocyte fraction as a criterion for marrow engraftment. Evaluation of a semi- automated reticulocyte method. *Clin Lab Hematol* 21: 285-7, 1999
6. Grotto HZW, Vigortto AC, Noronha JFA, Lima GALM. Immature reticulocyte as an early predictor of

- engraftment in autologous and allogeneic bone marrow transplantation. *Clin Lab Hematol* 25:47-54, 2003
7. O'Reilly RJ. Allogeneic bone marrow transplantation. current status and future directions. *Blood* 62:941-64, 1983
 8. Remacha AF, Martino R, Sureda A, Sarda MP, Sola C, Tugues D, Amill B, Garcia J, Oliver A. Change in reticulocyte fractions during peripheral stem cell harvesting : Role in monitoring stem cell collection. *Bone Marrow Transplant* 17:163-8, 1996
 9. Spanish Multicentric Study Group For Hematopoietic Recovery. Flow cytometric reticulocyte quantification in the evaluation on hematologic recovery. *Eur J of Hematol* 53:293-7, 1994
 10. Torres A, Sanchez J, Lakomsky D, Serrano J, Alvarez M.A, Martin C, Nevado L, Rodriguez A, Casano J, Martinez F, Gomez P. Assessment of hematologic progenitor engraftment by complete reticulocyte maturation parameters after autologous and allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Hematology* 86:24-9, 2001
 11. 강윤희, 박찬정, 김상철, 권수진, 권석운, 지현숙. 말초혈액 조혈모세포 채집시기 결정인자로서 자동혈구계산기 Sysmex SE-9000위 IMI, HPC 및 Sysmex R-3000의 IRF, HFR의 유용성. 대한혈액학회지 36: 51-9, 2001
 12. 김명신, 조석구, 김용구, 한경자, 김춘추, 심상인. 골수이식 후 생착의 조기판별을 위한 망상적혈구성숙지표의 임상적 유용성 검토 대한임상병리학회지 17:361-9, 1997
 13. 박경희, 이유경, 최태윤, 김원배, 이동화 : 자동혈구분석기로 측정된 미성숙망상적혈구 분획의 임상적 의의. 대한혈액학회지 32:281-7, 1999
 14. 최미옥, 김천희, 조병철, 지현숙 XE-2100을 이용한 망상적혈구와 미성숙망상적혈구 분획의 측정. 임상병리검사학회지 32:14-9, 2001