

In situ 교잡법을 활용한 Epstein-Barr 바이러스 림프선염의 임상연구

가톨릭대학교 의과대학 소아과학교실, 외과학교실*

김용기 · 최성동 · 허재균 · 강진한
오 세 정* · 박 승 만* · 김 영 하*

= Abstract =

Clinical Study of Epstein-Barr Viral Lymphadenitis by Using *In-situ* Hybridization Technique

Yong Gi Kim, M.D., Sung Dong Choi, M.D., Jae Kyun Hur, M.D., Jin Han Kang, M.D.
Se Jeong Oh, M.D.,* Seung Man Park, M.D.* and Young Ha Kim, M.D.*

Department of Pediatrics, of General Surgery,* Catholic University Medical College, Seoul, Korea

Lymphadenitis in children is usually associated with systemic viral illness. Especially, Epstein-Barr Virus(EBV) may have common causative roles of acute and chronic lymphadenitis in children. However, there were no definitive or practical tools to confirm diagnosis and pathogenesis of EBV lymphadenitis. Fortunately, molecular biological methods, especially *in situ* hybridization method, are using now to resolve the problems in recent time.

We started this study to determine the effectiveness of *in situ* hybridization technique for the diagnosis and pathogenetic study of EBV lymphadenitis. The case patients were 21 children presented with reactive hyperplasia on biopsied lymph node since Jan., 1990 to Jul., 1992 at Our Lady Mercy Hospital. Positive cellular staining were obtained with NotI PstI oligoprobe related to EBV lytic infection, and EBERs probe related to EBV latent infection in paraffin embeded sections of the cases. 6 positive signals of NotI PstI probe hybridization on B-blast, and 1 positive signal of EBERs probe hybridization on small lymphocyte were seen at lymphoproliferative paracortical area. The children with positive hybridization had history of acute or chronic tenderful lymphadenopathy, usually located posterior cervical region. Also, we confirmed that one EBERs and NotI PstI positive case was converted to malignant lymphoma one year later.

We conclude that this *in situ* hybridization method with probes related to variable representatble status of EBV infection is very useful in diagnosis and pathogenetic study of EBV lymphadenitis.

서 론

소아에서의 림프선염은 급성 또는 만성 감염과 염증 그리고 종양 질환에 의한 결과로 오는 흔한 임상소견으로서 특히 바이러스의 전신 감염과 연관되어 발현되는 경우가 대부분이며 세균성 감염이나 결핵에 의한 경우는

예상보다 드물고 종양질환에 의한 림프선증은 1.4% 이내의 낮은 빈도로 보인다¹⁾.

전신 바이러스 감염중 림프구 증식 질환을 유발하는 특성의 Epstein-Barr 바이러스(이하; EBV) 감염은 소아 급만성 림프선염의 중요 원인으로서 큰 임상적 의의를 지니고 있으나 EBV 림프선염의 실제 확진이 용이치 않아 이 질환의 임상 연구에 많은 난제가 있다. 즉 일

반적으로 감염원에 의한 림프선염은 감염원이 상기도내로 침투된 후 림프계로 진입되어 일부는 식균세포 활동에 의해 소멸되고 일부는 지속적 감염 활동을 일으켜 숙주내 면역환경에서 림프구 증식과 전환성 감염 염증을 일으킨 후 회복단계에서 섬유화되어 수개월에서 수년간 별다른 병적 소견없이 존재하다가 소실되는 경과를 밟는데 염증 활동이 있는 병적 상태에서 진단을 위한 생검을 실시하였을 경우 병리적 소견이 대부분 단순 림프선염이나 반응성 비후(reactive hyperplasia)와 같은 비특이한 것이므로 확진적 의의가 없어 림프선염의 원인 진단을 위해서는 반복적인 말초 혈액 검사, 흉부 방사선 검사, 초음파 검사, 감염원의 특이면역 혈청검사, 결핵 반응검사, transillumination 등을 보조적으로 시행해야 하는 어려움이 EBV 림프선염 진단에도 동일하게 있기 때문이다^{2~4)}. 그러나 최근 분자 생물학적 진단법들이 임상 실지에 활용화 되면서 바이러스 감염 질환 연구에 많은 진전이 있는데 이중 *in situ* 교잡법을 시행하여 이들 탐식자들을 통한 EBV 림프선염의 새로운 확진법을 규명하고 EBV 림프선염의 임상적 특성과 병인연구를 시도하였다.

대상 및 방법

1. 대 상

1991년 1월에서 1992년 7월까지의 기간내에 가톨릭의대 부속 성모자애병원 소아과와 외과에서 여러 임상형의 림프선염과 림프선증으로 생검을 실시하였으나 조직 소견상 비특이적 반응성 비후 림프선염으로 진단되었던 21명의 환아를 대상으로 하였다.

2. 방 법

EBV 림프선염의 진단과 병인 연구를 시행하기 위해서 상기 대상 환아들의 생검 후 얻어진 파라핀 포매 조직 절편을 사용하여 다음과 같은 *in situ* 교잡을 실시 하였다. 즉 이들 대상군의 파라핀 포매 조직 절편을 4 μ m 두께로 절단하여 silianized, positive charged slide (Probe on Plus Slide; Biomedica Company) 1/3 하단에 붙인 다음 xylene과 hemode solution으로 탈파라핀시킨 다음 100% alcohol로 탈수시키고 110°C에서 pepsin으로 permeabilization을 하고 고농도 염기와 저농도 formamide, 9-sequenced random primer

(Research Genetics)로 구성된 낮은 stringency의 교잡 완충액(hybridization solution)내에 Not I Pst I EBV oligonucleotide 탐식자(Research Genetics)를 혼합하여 EBV의 활동성 감염 검출을 시도하였고, EBERs 탐식자(c-DNA Probe; Research Genetics)를 혼합하여 EBV의 잠복성 감염 검출을 시도하였다.

즉 이들 탐식자가 혼합된 교잡 완충액을 92.5°C로 가열하여 조직내 EBV 표적 핵산을 변형시키고 40°C에서 교잡이 일어나도록 하고 사용된 탐식자들은 모두 biotin으로 처리된 탐식자이므로 avidin alkaline phosphatase로 확인 결합케한 후 red chromogen으로 발색시켜 양성 교잡 반응(signal)을 얻었다. 이들 모든 과정은 Brigati^{23,24)} 등에 의해 개발된 모세관 방법으로 Microprobe(Biomedica Company) 기구 위에서 시행되어졌다(Table 1, 2). EBV 림프선염의 임상적 연구는 위와 같은 *in situ* 교잡법에서 양성 반응을 보인 환아들의 의무 기록을 토대로 하여 시행하였다.

결 과

대상환아들의 생검전 임상진단은 급성 경부 림프선염(9예), 결핵성 림프선염(7예), 림프종양(3예) 화농성

Table 1. Station and Reagents for EBV in Situ Hybridization

Station	Reagents
01	Hemode sol. Xylene
02	Absolute Alcohol
03	10% Ethanol Tris Buffer
04	5X SSC washing sol.
05	Detergent Contained DW I
06	Detergent Contained DW II
07	Enhancer
08	Hematoxylin
9A	Reducing reagent
9C	Pepsin
10B	Probe, Hybridization sol.
11A	Detection system
11C	Red chromogen
12	PAD
INC	Incubator

Table 2. Procedure for EBV in Situ Hybridization by Using Microprobe

Station	Time (min)	Temp (°C)	Solution	Station	Time (min)	Temp (°C)	Solution
01	1.0		Clear	INC	20.0	40	Incubator
12	0.2		PAD	12	0.2		PAD
01	1.0		Clear	03	0.5		Tris buffer
12	0.2		PAD	12	0.2		PAD
01	1.0		Clear	04	0.5		5 X SSC
12	0.2		PAD	12	0.2		PAD
01	1.0		Clear	04	0.5		5 X SSC
12	0.2		PAD	12	0.2		PAD
02	0.5		Ethanol	11A	0.2		Detection
12	0.2		PAD	INC	10.0	45	Incubator
9A	4.0		Reducing	12	0.2		PAD
12	0.2		PAD	05	0.5		Enhancer
9C	0.5		DW I	12	0.2		PAD
INC	6.0	110	Incubator	05	0.5		Enhancer
12	0.5		PAD	12	0.2		PAD
05	0.5		DW I	11C	0.5		Chromogen
12	0.5		PAD	INC	15.0	40	Incubator
10B	0.5		Probe	12	0.2		PAD
INC	10.0	92.5	Incubator	06	0.5		DW I
10B	4.0		Probe	08	0.5		Hematoxylin
				12	0.2		PAD
				07	0.5		DW II
				12	0.2		PAD

INC : Incubator, DW : Distilled Water

림프선염(1예), 선천성 낭종(1예)들 이었으나, 이들의 병리조직학적 진단은 모두 비특이성 진단인 반응성 비후이었다. 이러한 대상 환아들에게 실시된 EBV *in situ* 교잡 반응 결과는 6예에서 양성을 확인되었으며 EBERs *in situ* 교잡반응이 양성이었던 환아들의 생검전 진단은 3예에서 림프종양, 2예에서 결핵성 림프선염, 1예에서 급성 경부 림프선염이었고 연령 분포는 3세에서 16세이 있었으며 남자환아가 5예로 많았다(Table 3).

EBV *in situ* 교잡 반응 양성 환아들의 임상 특성들은 4예에서 다발성 후경부 림프선 종괴가 있었고 2예에서는 경부, 액와부의 다발성 림프선증이 보였다. 그리고 림프선종의 발생 양상은 3예에서는 수일간내의 급성적 발병 소견이 있었으나 3예에서는 1개월 이상의 장기적인 발병 형태를 보였다. 또한 4예에서는 림프선 종괴에 국소 동통이 동반되었고 국소 발열 동반은 1예에서만 있었다. 림프선종의 크기는 전례에서 직경이 1cm 이상이었고,

말초 혈액 소견상 비특이 림프구증은 1예에서만 있었으나 3예에서 단핵구증 소견이 있었다(Table 3).

생검 림프절내에서의 EBV *in situ* 교잡반응의 양성 신호는 paracortical area의 림프 증식 세포들 중 hyperchromic, hypernucleic large lymphocyte (blast from)에서 주로 확인되었고 일부는 피사 부위와 배중심(germinal center)내의 림프구에서도 확인되었다. 그리고 이들 양성 교잡 반응 림프구는 림프구의 특이표면 항원 면역조직화학 검사상 B-림프구로 확인되었다(Fig. 1, 2).

EBERs *in situ* 교잡반응에 양성을 보인 1예(4번째)는 생검 전 진단이 림프종양으로 추정된 경우로서 EBERs 양성 교잡 신호는 paracortical area내의 림프구 증식부에서 작은 림프구들 몇개 세포에서만 확인되었다. 이 환아는 생검 약 1년후 동일부위에 림프종괴가 재발되어 타병원에서 제거술이 시행되었으나 Hodgkin'

Table 3. Clinical Characteristics of EBV Lymphadenitis in Cases of Positive EBV in Situ Hybridization

Case No.	Age (yrs)	Sex	Initial Dx	Concomitant fever	Onset of L A P	Location of L A P	Tenderness	Local heatness	Size	Abnormal CBC finding
1	3	M	Tbc Lymphadenitis	-	Incidious	Cx	+	-	2.5 cm	N-S
2	7	M	Tbc Lymphadenitis	-	Incidious	Cx	-	-	2 cm	Mono-cytosis
3	9	M	Lymphoma	+	Abrupt	Cx Axillary	+	-	1.5 cm, 2 cm	Atypical Lympho-cytosis
4	9	M	Lymphoma	-	Incidious	Cx	-	-	3 cm	N-S
5 EBERs +	13	M	Cx LAP	+	Abrupt	Cx	+	+	2 cm	Mono-cytosis
6	16	F	Lymphoma	-	Abrupt	Cx Axillary	+	-	1 cm, 3 cm	Mono-cytosis

Cx : Cervical

N-S : Non-Specific

LAP : Lymphadenopathy

s lymphoma로 진단되었음을 확인할 수 있었다.

고 찰

EBV감염은 림프구 증식을 일으키는 대표적 질환으로서 이들 EBV에 의한 감염활동은 전세계적으로 문제가 되는 것으로 보고되고 있다^{4,5)} 이러한 EBV에 의한 림프선염의 임상적 특성을 살펴보면, 전염성 단핵구증으로 알려져 있는 EBV의 급성감염질환은 발열, 인후편도염, 림프선염, 비장종괴, 발진등과 같은 임상증상을 보이는 데 이중 림프선염은 대개 단발성으로 후경부에 위치하며 동통도 동반되는 림프선증의 형태로 전염성 단핵구증 전례에서 발현되는 것으로 알려져 있고¹⁴⁾ 반복성 림프선증의 형태로 EBV 만성 림프선염이 학동기 이후 연령에 발생될 수 있어 EBV는 소아 림프선염의 중요한 감염원으로 알려져 있다. 저자들의 연구결과에서 EBV DNA 양성교잡반응을 보인 환자들에서도 동통이 동반된 림프선염이 급만성 형태로 있었음을 알 수 있었다.

이들 EBV 림프선염의 생검조직에서는 배중심(germinal center) 외측부위에 림프구 증식에 따른 확장과 다양한 염증성 괴사, Reed-Sternberg양 세포발현과 같은 반응성 비후 소견이 보이며¹⁵⁾ 증식된 림프구들은 림프구 표면항원검사상 B-림프구로 확인되었고 이러한 B-림프구 표면에 large-cell anaplastic (Ki-1) lymphoma에서 발견되는 CD30 (Ki-1) 항원도 존재한다고 한다.¹⁶⁾ 그러므로 EBV 림프선염의 비후성 반응이 극심한 경우에는 lymphoma와의 조직학적 감별이 용이치 않은 경우도 있어 EBV 감염과 연관된 임상적 특성을 충분히 고려하여 조직진단을 하여야 한다. 저자들의 연구에서 EBV DNA 양성교잡반응 림프선염의 조직소견에서도 핵이 크고 과다한 림프구 증식과 괴사성 염증반응, Reed-Sternberg양 세포들이 관찰되었다(Fig. 1, 3).

EBV 림프선염의 병인과정은 EBV가 일차적으로 구강인후점막상피나 이하선관 점막상피에 침입하여 증식된 후^{19,20)} 림프계로 들어와 편도나 림프절내에서 감염활동을 일으키는 것으로 요약할 수 있다. 즉 이 EBV는 B-림프구 표면에 EBV에 대한 특이보체수용체가 존재하여 주로 B-림프구내 감염을 일으키게 되는데 이러한 B-림프구는 정상적인 기능적 항원수용체를 갖지 못하여 항원선택기전에 따른 배중심내 진입이 거의 이루어지지 않고 배중심 외측부에 위치하게 되며 이곳에서 B-림프구의

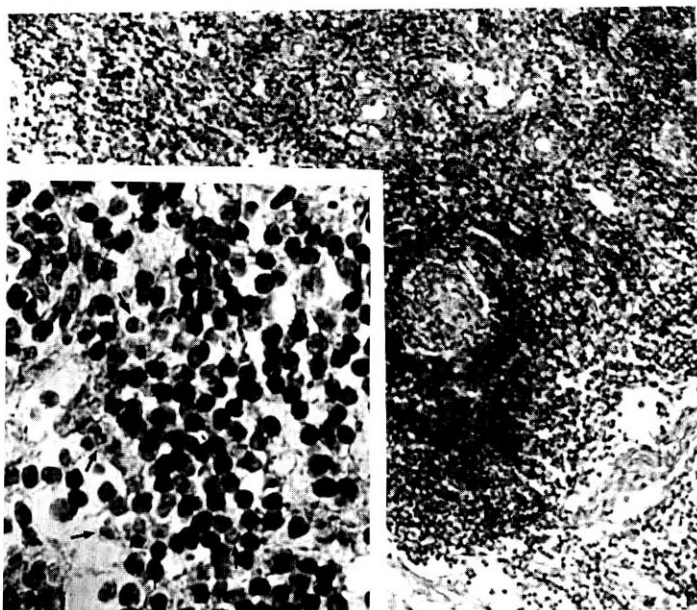


Fig. 1. multiple positive signals (black arrows) of NotI PstI probe hybridization were seen on the hypernuclear, large lymphocyte of lymphoproliferative paracortical area

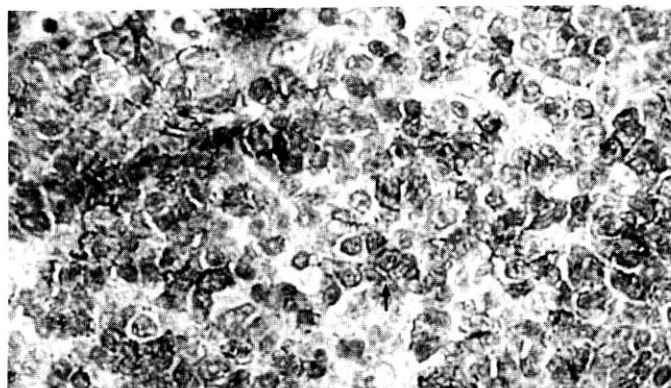


Fig. 2. Proliferative lymphocytes were identified with B-cell marker (black arrow) by using immunoperoxidase staining method.

증식과 전환자극을 유발시킨다. 그러나 극히 일부 EBV 감염 B-림프구도 배중심내로 진입되어 세분화 될 수 있어 체내순환되는 경우도 있다고 한다^{12,13,21}.

한편 이러한 급성 EBV 감염활동이 소실되면, EBER1, EBER2와 같은 EBV의 m-RNA 물질이 다량 복제되어 소림프구내에 존재하는 잠복감염상태를 유지하게 되고 숙주의 면역상태에 따라 활동을 재개할 수 있

다 한다^{10,11}. 저자들의 경우 EBV DNA가 검출된 임파구가 면역조직검사상 B-cell marker가 양성임을 확인하였고(Fig. 2) 이들이 비후성 반응이 있는 배후성 외측부에 주로 위치하는 것을 관찰하였다.

EBV 림프선염의 임상적 의의는 EBV 감염활동에 따라 차이가 있으나 이들이 Hodgkin's lymphoma, Burkitt lymphoma, B-cell 또는 T-cell lymphoma 등과

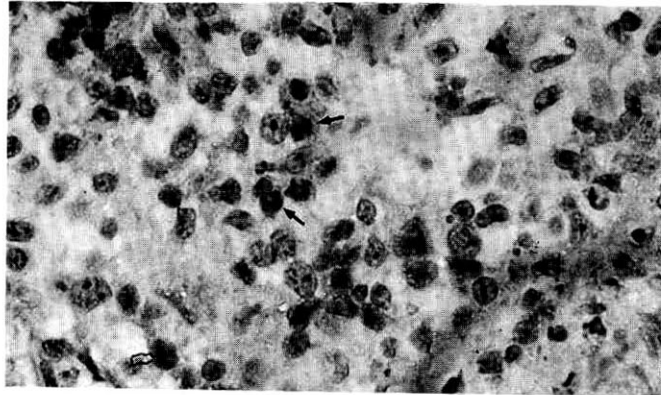


Fig. 3. positive signals (black arrow) of EBERs probe hybridization were represented at cytoplasm and nucleus of small lymphocytes on reactive paracortical area.

같은 악성종양으로 전환될 수 있다는 사실로⁶⁻⁹⁾ 이러한 종양으로의 전환되는 기전은 EBV 감염시 숙주내에서 EBV를 선별하여 사멸시킬 수 있는 cytotoxic-T 세포가 제대로 생성되지 않을 경우 EBV 감염활동에 의한 림프구의 전환성 자극이 극대화 되어짐에 따라 point mutation이 결국에 일어나 발생하는 것으로 설명되고 있다^{4,21)}. 또한 EBV 감염활동이 지속될 경우 suppressor-T세포가 활성화되어 숙주면역이 anergy 상태로 전환되어 기회감염의 위험성이 높아지게 되는 수가 있는데 이러한 상황에서는 녹농균의 기회감염이 잘 올 수 있는 것으로 알려져 있다^{19,22)} 이와같은 EBV 림프선염의 임상적 위기는 면역결함이 있는 모든 경우에 올 수 있지만 면역력이 정상인 경우에도 EBV 감염정도에 따라 올 수 있다는 사실은 중요한 것이라 할 수 있다²¹⁾. 저자들의 연구에서도 EBV DNA와 EBERs에 양성교잡반응이 있었던 1명의 환자에서 악성종양 발생이 있었음을 확인할 수 있었다.

결 론

저자들은 EBV 활동성감염과 연관된 EBV Not I Pst I oligonucleotide 탐식자와 EBV 잠복감염과 연관된 EBERs c-DNA 탐식자를 사용하여 반응성 비후조직 소견이 관찰된 21명의 환자들의 생검조직에서 *in situ* 교잡을 시행한 결과 6예에서 EBV DNA 양성교잡반응과 1예에서 EBERs 양성교잡반응을 확인하여 이들의 급만

성 EBV 림프선염의 임상적, 조직적 특성을 관찰할 수 있었던 바 이같은 진단법이 EBV 림프선염의 진단과 병인연구에 유용함을 평가할 수 있었고, EBV 림프선염이 악성종양으로 전환되는 임상적 의의를 확인할 수 있었다.

REFERENCES

- 1) Andrew M, Margileth: *Cervical adenitis. Pediatrics In Review* 7:13-24, 1985
- 2) Marcy SM: *Infection of lymphnodes of the head and nek. Pediatr Infect Dis* 23:397, 1983
- 3) Zitelli BJ: *Neck masses in children; Adenopathy and malignant disease. Pediatr Clin North Am* 28:813, 1981
- 4) Gerold Niedobitek, et al: *Patterns of Epstein-Barr Virus infection in non-neoplastic lymphoid tissue. Blood* 79:2520, 1992
- 5) Roche G, Defelici A, Ragona G, Heinza: *Quantitative evaluation of Epstein-Barr Virus infected mononuclear peripheral blood leukocytes in infectious mononucleosis. N Engl J Med* 296:132, 1977
- 6) Zur Hausen H, Schulte-Holthausen H, Klein G, Henle W, Henle G, Clifford P, Santesson L: *EBV DNA in biopsies of Burkitt tumors and anaplastic carcinomas of the nasopharynx. Nature* 228:1056, 1970
- 7) Pallesen G, Hamilton-Dutoit SJ, Rowe M, Young Ls: *Expression of Epstein-Barr Virus latent gene*

- products in tumors cells of Hodgkin's disease. *Lancet* 337:320, 1991
- 8) Herbst H, Dallenbach F, Hummel M, Niedonbitek G, Pileri S, Müllers-Lantzsch, N, Stein H: *Epstein-Barr Virus latent membrane protein expression in Hodgkin's and Reed-Sternberg cells. Proc Natl Acad Sci USA* 88:4766, 1991
 - 9) Hamilton-Dutoit SJ, Pallesen G, Franzmann MB, karkov J, Black F, Skinhoj P, Pedeson C: *AIDS-related lymphoma, Histopathology, immunophenotype, and association with Epstein-Barr Virus as demonstrated by in situ nucleic acid hybridization. Am J Pathol* 138:149, 1991
 - 10) Wu TC, Mann RB, Charache P, Hayward SD, Staal S, Lumbe BC, Ambinder RT: *Detection of EBV gene expression in Reed-Sternberg cells of Hodgkin's disease. Int J Cancer* 46:801, 1990
 - 11) Howe JG, Steits JA: *Localization of Epstein-Barr Virus encoded small RNAs by in situ hybridization. Proc Natl Acad Sci USA* 83:9006, 1986
 - 12) Robinson JE, Smith D, Niederman J: *Plasmacytic differentiation of circulating Epstein-Barr Virus infected B lymphocyte during acute infectious mononucleosis. J Exp Med* 153:235, 1981
 - 13) Joned JF, Shunrin S, Abramowsky C, Tubbs RR, Sciotto CG, Wahl R, Sands J, Gotlman D, katz BZ, Sklar J: *T-cell lymphomas containing Epstein-Barr viral DNA in patients with chronic Epstein-Barr virus infections. N Engl J Med* 318:733, 1988
 - 14) Susan L, Abbondanzo, Nariko Sato, Stephen E, Straus, Elaine S, Jaffe: *Acute infectious mononucleosis. Am J Clin Pathol* 93:698, 1990
 - 15) Childs CC, Parham DM, Bernad CW: *Infectious mononucleosis; the spectrum of morphologic changes simulating lymphoma in lymphnodes and tonsils. Am J Surg Pathol* 11:122, 1987
 - 16) Delsol G, Al Saati T, Gatter Kg, et al: *Coexpression of epithelial membrane antigen (EMA), Ki 1 and interleukin-2 receptor by anaplastic large cell lymphomas. Am J Pathol* 130:59, 1988
 - 17) Lawrence M, Weiss and Lucile A: *Movahed: In situ demonstration of Epstein-Barr viral genomes in viral-associated B cell lymphoproliferations. Am J Pathol* 134:651, 1989
 - 18) Wolf H, Haus M, Wilmes E: *Persistence of Epstein-Barr virus in the parotid gland. J Virol* 51:795, 1984
 - 19) Kathleen T, Montone, Lynn Rae Budgeon, David J Brigati: *Detection of Epstein-Barr Virus genomes by in situ DNA hybridization with a terminally biotin-labeled synthetic oligonucleotide probe from the EBV Not 1 and Pst 1 tandem repeat regions. Mod Pathol* 3:89, 1990
 - 20) G. Niedobitek, et al: *Identification of Epstein-Barr Virus infected cells in tonsils of acute infectious mononucleosis by in situ hybridization. Hum Pathol* 20:796, 1989
 - 21) J. Jeffery Malatack, et al: *Orthotopic liver transplantation, Epstein-Barr virus, cyclosporine, and lymphoproliferative disease: A growing concern. J Pediatr* 118:667, 1991
 - 22) Nossal GJV: *The basic components of the immune system. N Engl J Med* 316:1320, 1987
 - 23) Montone KJ, Brigati DJ, Budgeon LR: *Anatomic viral detection is automated: The application of a robotic molecular pathology system for the detection of DNA viruses in anatomic pathology substrated using immunocytochemical and nucleic acid hybridization techniques. Yale J Biol Med* 62:141, 1989
 - 24) JC Iezzoni, Jin-Han Kang, KT Montone, JA Reed, DJ brigati: *Colorimetric detection of herpes virus by DNA in situ sandwich hybridization: A rapid, formamide-free, random oligomer enhanced method. Nucleic Acids Research* 20:1149, 1992
 - 25) 강진한: *In situ hybridization을 활용한 바이러스 질환의 진단과 연구. 감염* 25:189, 1993