

## 신 이식 후 거부반응 환자에서 *In Situ* 교잡법을 이용한 Herpesviruses의 검출

가톨릭대학교 의과대학 내과학교실, 해부임상병리학교실<sup>1</sup>, 소아과학교실<sup>2</sup>

신완식 · 박인석 · 장윤식 · 최영진<sup>1</sup> · 심상인<sup>1</sup> · 강진한<sup>2</sup>  
유진홍 · 김양리 · 윤영석 · 강문원 · 방병기

= Abstract =

### Detection of Herpesviruses in Renal Allograft Rejection by *In Situ* Hybridization

Wan Shik Shin, M.D., In Suk Park, M.D., Yoon Sik Chang, M.D., Yeong Jin Choi, M.D.<sup>1</sup>  
Sang In Shim, M.D.,<sup>1</sup> Jin Han Kang, M.D.,<sup>2</sup> Jin Hong Yoo, M.D., Yang Re Kim, M.D.  
Young Suk Yoon, M.D., Moon Won Kang, M.D. and Byung Kee Bang, M.D.

Department of Internal Medicine, Clinical and Anatomical Pathology,<sup>1</sup> Pediatrics,<sup>2</sup>  
Catholic University Medical College, Seoul, Korea

Viral infection would have a deleterious impact on renal graft survival, and increase the morbidity and mortality in renal transplant patients. The clinical diagnosis of viral infection in renal transplant is difficult. Standard procedure for identification of viruses is tissue culture, but it takes much time. Serological diagnosis of viral infection does not always represent the clinically apparent infections. Recently, the value of direct virus detection by nonisotopic DNA probe *in situ* hybridization (ISH) has been introduced.

To evaluate the potential role of cytomegalovirus(CMV), Epstein-Barr virus(EBV) and herpes simplex virus(HSV) on renal graft rejection, eleven rejected kidney allograft specimens were analyzed by ISH with the biotinylated DNA probes. CMV-infected lung tissue, EBV-infected lymph node tissue and HSV-infected skin tissues were used as positive controls. One specimen showed positive hybridization with CMV probe and one with EBV probe. The whole procedure can be completed in less than 1, 5 hours.

In conclusion, we suggest the colorimetric method for ISH could be a powerful tool of detection of viruses in tissues without the need of radioactive probe. Cytomegalovirus, Epstein-Barr virus and herpes simplex virus may be of minor importance in triggering allograft rejection in Korea.

### 서론

신 이식 후 생기는 중요한 합병증인 이식편에 대한 거부 반응의 원인중 하나로 herpesviruses의 감염이 제시되고 있으나 아직 정립이 되어있지는 않으며, 거부 반응과 바이러스 감염 사이의 감별도 매우 어렵다<sup>1-3)</sup>. 그러나 바이러스의 감염은 신 이식편의 생착에 영향을 미칠

수 있으며 환자의 이환 및 생존에도 중요한 요인으로 작용하므로 이에 대한 정확한 진단이 요구된다.

바이러스 감염의 표준적인 진단법으로 조직 배양법이 있으나, 배양되는 데에 시간이 많이 걸리기 때문에 임상적인 실용성이 적고 혈청학적인 방법도 사용되지만 이식 받는 환자의 기저 질환 및 이식 후에 받는 면역 억제 치료로 인해 항체의 발현율이 적어 신뢰도가 낮다. 최근들어 핵산 탐식자를 병변 조직에 직접 교잡시켜 바이러스

를 검출해 내는 *in situ* 교잡법의 시도가 성공적으로 이루어지고 있으며 이는 바이러스 질환의 진단에 임상적으로 많은 활용성을 지니고 있는 것으로 인식되고 있다<sup>4-7)</sup>.

이에 저자들은 신 이식 후 거부반응에 cytomegalovirus(CMV), Epstein-Barr virus(EBV) 및 herpes simplex virus(HSV) 등의 Herpesviruses들이 관여할 가능성 여부를 보기 위해 거부반응을 보인 동종 이식편 신 조직에 대해 *in situ* 교잡법을 시행하였다.

## 대상 및 방법

### 1. 대 상

1992년 1월부터 1992년 10월 사이에 가톨릭 대학교 의과대학 부속 강남성모병원에서 신 이식을 시술받은 환자들 중 거부반응을 보여 이식편 적출물을 얻을 수 있었던 11예를 대상으로 하였다.

### 2. 방 법

실험대상의 조직을 5  $\mu$ m 두께로 제작하여 특수처리한

슬라이드(ProbeOn plus microscopic slide, Fischer Scientific, U.S.A.)에 부착시킨 후 MicroProbe incubator (Biomedica corp., U.S.A.)를 사용하여 *in situ* 교잡법을 실시하였다. 양성 대조는 CMV가 감염된 폐 조직, EBV가 감염된 림프절 조직 및 HSV가 감염된 피부 조직을 사용하였다. CMV는 nick translated CMV probe (Enzo Co., U.S.A.)를 사용하였고, EBV와 HSV는 Dr. Brigati로부터 공여받은 NOT I/PST I EBV probe 및 glycoprotein C epitope-related HSV probe를 사용하였다.

#### 1) 표적의 전처리

파라핀 포매 신 조직을 슬라이드에 부착시킨 후 xylene과 histoclear (National Diagnostics, Somerville, U.S.A.)를 1:3으로 혼합한 용액에 30초씩 4~5차례 반복하여 담가서 파라핀을 제거하고 순수 알코올에 각 1분씩 2회 탈수시킨 후 웨신용액(Biomedica Corp., U.S.A.)에 110°C에 5분간 반응시킨 후 증류수로 2회 세척하였다.

#### 2) 교잡

조직에 바이오틴을 부착한 탐식자를 도포시키고 1분

Table 1. Clinical Characteristics and Evolution of the Allograft Patients

Age/Sex	Donor	IgM-CMV Ab recipient/donor	Rejection	Cause of nephrectomy	Interval after KT (days)	Immunosuppressant given
33/M	LRD <sup>1</sup>	- / -	chronic	2nd KT	1713	AZA <sup>3</sup> + PDN <sup>4</sup>
45/M	NRD <sup>2</sup>	- / -	chronic	gross hematuria	475	CsA <sup>5</sup> + PDN
51/M	LRD	- / -	chronic	2nd KT	3530	AZA + PDN
40/M	NRD	- / -	chronic	2nd KT	1365	CsA + PDN
47/M	NRD	- / -	chronic	2nd KT	515	CsA + PDN
57/M	NRD	- / -	acute	graft pain & swelling	60	CsA + PDN
33/M	NRD	- / -	acute	DIC, severe abdominal pain	20	CsA + PDN
54/M	NRD	- / -	acute	severe abdominal pain	11	CsA + PDN
37/M*	NRD	- / -	chronic	graft kidney tuberculosis	1143	CsA + PDN
37/M	NRD	- / -	chronic	2nd KT	909	CsA + PDN
38/M**	NRD	- / -	chronic	2nd KT	1150	CsA + PDN

1. LRD : live related donor

2. NRD : non related donor

3. AZA : azathioprine

\* : EBV positive

4. PDN : prednisolone

5. CsA : cyclosporin A

\*\* : CMV positive

간 방치한 후 92°C에서 10분간 가열하고 실온에서 2분간 방치한 후 다시 40°C에서 30분간 반응시켰다. 2분간 실온에서 방치 후 10% 에탄올 및 10×automation buffer (Biomed Corp., U.S.A.)로 10초 간, 5×SSC 용액 (sodium chloride 17.53 g, sodium citrate 8.82 g, 증류수 1,000 ml)으로 각 30초동안 3회 세척하였다.

### 3) 발색반응에 의한 양성 판정

alkaline phosphatase (Dako A/S, Denmark) 용액을 37°C에서 20분간 반응시킨 후 naphthol AS-MX phosphate (Sigma Co., U.S.A.)를 dimethyl formamide (Amresco, U.S.A.)를 0.1 M sodium carbon-

ate에 녹인 용액을 혼합시켜서 여과지에 여과시킨 용액을 색소원으로 사용하여 37°C에서 15분간 반응시켰다. 색소신호의 증폭을 위하여 증강액 (0.1 M Tris buffer, pH 9.0)을 반응시키고 색소원을 40°C에서 8분간 반응시킨 후 다시 증강액에 15초, 색소원에 40°C 6분, 증강액에 15초간 차례로 반응시키고 증류수로 10초간 2회 세척 후 hematoxylin 염색으로 30초간 대조염색을 하여 광학 현미경으로 관찰하였다. 세포핵 내에 강하게 적색으로 염색된 경우 양성으로 판정하였으며 이상의 모든 검사과정은 평균 1.5 시간 이내로 완료되었다.

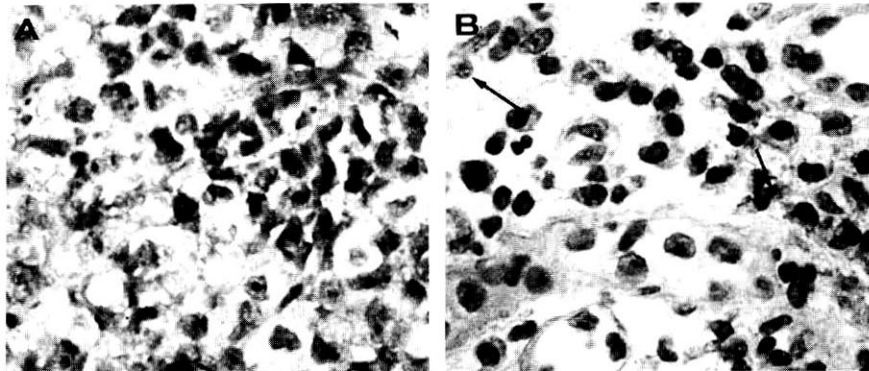


Fig. 1. Result of *in situ* hybridization for CMV.

A) positive control, B) The cells give positive signals as homogenous staining and enlarged cytoplasm with perinuclear halo (arrow).

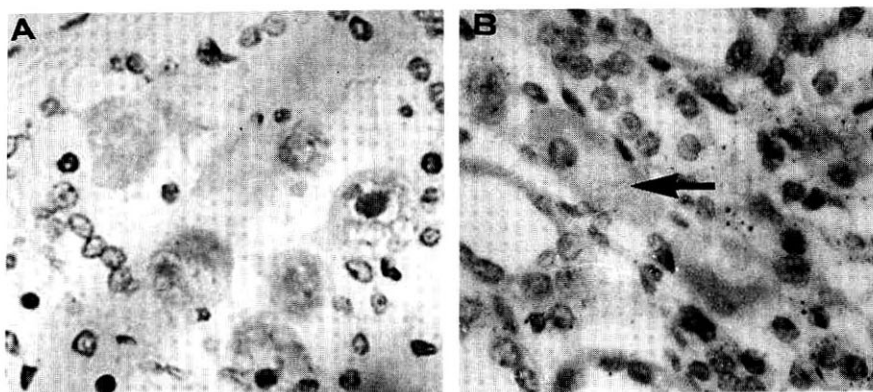


Fig. 2. Result of *in situ* hybridization for EBV.

A) positive control, B) Two cells show positive signals as intranuclear staining (arrows).

## 결 과

### 1. 대상 환자

대상 환자들의 특징을 보면 급성 거부반응이 3예, 만성 거부반응이 8예이었으며, 2예에서 azathioprine과 prednisolone을 면역억제제로 사용하였고 나머지는 cyclosporin A와 prednisolone을 투여 받았다. 2예만 제외하고는 모두 조직적합항원상 연관이 없는 공여자로부터 신 이식을 받았으며, 이식 전에 시행한 IgM 항 CMV 항체는 모두 음성이었다(Table 1).

### 2. In Situ 교잡 성적

11예중 1예에서 CMV 발현이 양성으로 나왔는데, 세포질내에 균일하게 붉은 색으로 염색된 양상을 관찰할 수 있었다(Fig. 1). EBV의 경우에도 1예만 양성으로 나왔으며 핵내에 붉은 색으로 염색된 양상을 보이고 있었다(Fig. 2). 그러나 HSV의 양성발현은 없었다.

## 고 찰

신 이식 후 거부반응에 바이러스가 관여할 가능성에 대해서는 여러 차례 제시되어 왔으나 아직 논란의 대상이다. 대개의 거부반응에서 주된 목표물이 HLA항원이고 특히 CMV가 HLA 항원의 표현을 유발한다는 보고가 거부반응에 바이러스가 관여할 것이라는 가설을 제시하고 있다<sup>8-10</sup>. 또한 HLA class I 항원 중 하나인  $\beta$  2-microglobulin이 CMV 침투의 주 수용체이며 바이러스 자체가 HLA class I 항원과 분자 구조적으로 유사한 물질을 만들어낸다는 보고도 이 가설을 뒷받침하고 있다<sup>11</sup>. 임상적으로도 CMV 감염이 신 이식 후 거부반응 빈도의 증가와 관련성이 있다는 성적이 많이 보고되고 있다<sup>1-3</sup>. 그러나 이에 대한 반론으로 Anderson 등<sup>12</sup>은 신 이식 환자를 대상으로 CMV에 대한 *in situ* 교잡을 시행하고 그 성적을 항체 양성 유무 및 HLA 항원 표현빈도 사이의 상관 관계로 조사한 결과 아무런 관련성을 볼 수 없었으며, 따라서 CMV가 신 이식후의 거부반응에 주 역할을 한다고 보기는 어렵다고 하였다. EBV의 경우는 신 이식 후 림프 증식성 질환에 관련된다 고 알려져 있으나<sup>13,14</sup>, 거부반응에 연관되어 발현한다는

보고는 아직까지는 없고 HSV의 경우에도 거부반응에 관여한다는 보고를 아직 찾기 어렵다. 이와 같이 신 이식 후의 거부반응에 바이러스의 관련여부는 아직까지 결론이 내려지지 않고 있다. 그러나 저자들은 CMV의 경우 HLA 항원중 하나인  $\beta$ 2-microglobulin 이 병태생리 기전에 중요한 역할을 하며, 거부반응 자체가 HLA 항원을 주 목표물로 삼는다는 사실에 근거하여 신 이식 후 거부반응에 바이러스가 어느 정도 관여는 할 것으로 추정하고 바이러스 감염여부를 진단하여 이를 증명하고자 본 연구를 시도하였다. 바이러스 감염여부를 알아보기 위한 방법 중 배양검사는 시간이 많이 걸리고, 항체검사는 신 이식 환자처럼 면역기능이 저하되어 있는 경우 정확도 및 신뢰도 면에서의 문제가 있다고 판단하였으며, 신조직에서 바이러스를 직접 검출하는 것이 가장 정확하다고 생각하여 *in situ* 교잡법을 선택하였다. *in situ* 교잡법은 어느 특정 바이러스에 특이한 염기 서열을 지닌 DNA나 complementary DNA (cDNA) 탐식자를 교잡 시킴으로써 진단의 정확도를 높일 수 있고, 조직에서 직접 시행하므로 바이러스의 병변위치와 동시에 병리적 조직조건을 함께 관찰할 수 있다. 또한 기술적인 발전으로 자동화 되어 짧은 시간 내에 검출할 수 있다는 장점이 있다<sup>7</sup>. 저자들은 CMV 이외에 같은 herpesviruses인 EBV 및 HSV도 관여하는지에 대한 단서를 얻기 위하여 각 바이러스의 특정 염기서열을 지닌 탐식자를 사용하여 *in situ* 교잡법을 시행하였는데 CMV 및 EBV 각 1예씩만 양성으로 나타났으며 이는 신 이식 후 거부반응에 바이러스가 관여하는 빈도가 매우 적음을 시사한다고 생각된다. 바이러스 발현이 양성으로 나온 각 1예에 대해 CMV 및 EBV가 거부반응의 직접적 원인인지 아니면 거부반응 기전과는 별도로 단순히 바이러스가 검출된 것인지는 확실히 말하기는 어렵다. 따라서 적어도 우리나라에서 바이러스 감염이 신 이식 후 거부반응 기전에 관여하는 비중은 그리 크지는 않을 것으로 사료되나 향후 더 많은 예에 *in situ* 교잡법을 시행하여 거부반응과 바이러스 감염사이의 상관 관계를 확립하여야 할 것으로 생각한다.

## 결 론

저자들은 신 이식 후 거부반응에 cytomegalovirus (CMV), Epstein-Barr virus (EBV) 및 herpes sim-

plex virus (HSV) 등이 관여할 가능성 여부를 보기 위해 거부반응을 보인 동종 이식편 신 조직 11예에 대해 바 이오틴이 부착된 CMV, EBV, HSV 탐식자를 사용하여 *in situ* 교잡법을 시행한 결과 11예 중에서 1예에서만 CMV 양성이었다고, EBV의 경우에도 1예만 양성으로 나왔으나 HSV의 양성발현은 1예도 없었다. 이상의 성적 으로 보아 CMV, EBV 및 HSV는 신이식 후 이식편의 거부반응에 주된 인자로 보기는 어려울 것으로 사료된다.

## REFERENCES

- 1) Fryd DS, Peterson PK, Ferguson RM, Simmons RL, Balfour HH, Najarian JS: *Cytomegalovirus as a risk factor in renal transplantation*. *Transplantation* 30: 436, 1980
- 2) Marker SC, Howard RJ, Simmons RL, Kails JM, Connelly DP, Najarian JS, Balfour HH: *Cytomegalovirus infection; a quantitative prospective study of three hundred twenty consecutive renal transplantation*. *Surgery* 89:660, 1981
- 3) Kahan BD: *The impact of cyclosporine on the practice of renal transplantation*. *Transplant Proc* 21(s):63, 1989
- 4) 강진한: *in situ hybridization을 활용한 바이러스 질환의 진단과 연구*. *감염* 25:189, 1993
- 5) Fenoglio-Preiser CM, William CL: *Molecular biology and the pathologist*. *Arch pathol Lab Med* 111: 601, 1987
- 6) Hiborne LH, Nieberg RK, Cheng L, Lewin KJ: *Direct in situ hybridization for rapid detection of cytomegalovirus in bronchoalveolar lavage*. *Am J Clin Pathol* 87:766, 1986
- 7) Brigati DJ, Myerson D, Leary JJ, Spalholz B, Travis SZ, Fong CKY, Hsiung GD, Ward DC: *Detection of viral genomes in cultured cells and paraffin-embedded tissue sections using biotin-labeled hybridization probe*. *Virology* 126:32, 1983
- 8) Grundy JE, Ayles HM, McKeating JA, Butcher RG, Griffiths PD, Poulter LW: *Enhancement of class I HLA antigen expression by cytomegalovirus: role in amplification of virus infection*. *J Med Virol* 25: 483, 1988
- 9) Waltzer WC, Arnold AN, Anaise D, Hurley S, Raisbeck A, Egelandssdal B, Pullis C, Rapaport FT: *Impact of cytomegalovirus infection and HLA-matching on outcome of renal transplantation*. *Transplant Proc* 19:4077, 1987
- 10) von Willebrand E, Petersson E, Ahonen J, Häyry P: *CMV infection, class II antigen expression, and human kidney allograft rejection*. *Transplantation* 42:364, 1986
- 11) Beck S, Barrell BG: *Human cytomegalovirus encodes a glycoprotein homologous to MHC class I antigen*. *Nature* 331:269, 1988
- 12) Anderson CB, Ladefoged SD, Lauritsen HK, Hansen PR, Larsen S: *Detection of CMV DNA and CMV antigen in renal allograft biopsies by in situ hybridization and immunohistochemistry*. *Nephrol Dial Transplant* 5:1045, 1990
- 13) Purtilo DT, Strobach RS, Okano M, Davis JR: *Epstein-Barr virus-associated lymphoproliferative disorders*. *Lab Invest* 67:5, 1992
- 14) Montone KT, Friedman H, Hodinka RL, Hicks DG, Kant JA, Tomaszewski JE: *in situ hybridization for Epstein-Barr virus NotI repeats in posttransplant lymphoproliferative disorder*. *Mod Pathol* 5:292, 1992