

# 악성 림프종의 진단을 위한 유전자 재배열 검사의 이용

전남대학교 의과대학 병리학교실, 미국 북캐롤라이나 국립환경건강과학연구소\*

김 경 수 · 최 찬\*

## Application of Gene Rearrangement Analysis for Diagnosis of Malignant Lymphoma

Kyung Soo Kim, M.D. and Chan Choi M.D.\*

Department of Pathology, Chonnam University Medical School;  
Laboratory of Molecular Carcinogenesis, National Institute of  
Environmental Health Science, North Carolina, USA\*

To evaluate the utility of gene rearrangement analysis, eight cases of malignant lymphoma, one case of Hodgkin's disease, two cases of angioimmunoblastic lymphadenopathy(AILD) and two cases of non-specific lymphadenitis were studied by immunohistochemical and genetic analysis. Southern blot analysis was performed by a using vacuum transfer system and a biotin-labelled probe. This method was faster, safer, and more convenient than conventional methods.

Gene rearrangement study showed rearranged novel bands in five of six cases of B cell lymphoma, in all cases of T cell lymphoma, and in all cases of AILD. No rearrangement of the B cell receptor(BCR) or of the T cell receptor(TCR) was seen in Hodgkin's disease or in nonspecific lymphadenitis.

These results suggest that gene rearrangement analysis of BCR and TCR is a recommended method for the diagnosis of clonality in lymphoproliferative disorders. It would allow pathologists to differentiate lymphoma from polyclonal lymphoid proliferation and to provide information for cell lineage. (Korean J Pathol 1995; 29: 415~422)

**Key Words:** Gene rearrangement analysis, Malignant lymphoma, B cell receptor, T cell receptor

## 서 론

림프구성 종양의 진단 및 분류에는 림프구 표면항원(lymphocyte surface antigen)을 이용하는 법이 많이

사용되어져 왔다. 표면항원을 이용한 방법은 림프구의 계열(lineage)과 분화수준을 평가하며, 악성종양과 양성질환과의 감별에도 많은 도움을 주어 왔다<sup>1-3</sup>. 그러나 악성 림프종의 진단에서는 단클론성(monoclonality)을 확인하는 과정이 필수적이나 림프구 표면항원을 이용한 면역조직화학적 염색 결과로는 불확실한 경우가 있다.

일반적으로 정상 림프구는 B세포와 T세포로 분류되며, B세포에서는 면역 글로블린(immunoglobulin, B

접 수:1994년 12월 23일, 게재승인:1995년 3월 2일  
주 소:광주시 동구 학 1동 5, 우편번호 501-757  
전남대학교 의과대학 병리학교실, 김경수

cell receptor, 이하 BCR) 유전자가, T세포에서는 T 세포 수용체(T cell receptor, 이하 TCR) 유전자가 분화과정상 다양하게 재배열된다<sup>4</sup>. 림프종의 종양세포는 대체로 단클론성으로써 유전자의 재배열상이 동일함을 보인다. 따라서 신선조직으로부터 DNA를 추출하여 제한효소(restriction enzyme)로 절단하게 되면 동일한 크기의 DNA절편이 비교적 다량으로 얻어지고, 이를 전기영동하여 DNA 크기별로 분리하여 BCR 및 TCR에 특이성이 있는 탐색자(probe)로 검출하면, 림프종양에서는 새로운 재배열의 띠(rearranged band, novel band)를 관찰할 수 있게 된다.

저자는 림프종 종양의 진단에 필수적 검사인 유전자 재배열 검사를 실험실에서 사용하는 고전적인 방법보다 간편하고 빠른 진공전이(vacuum transfer)법과 비방사선 탐색자를 이용하여 다양한 종류의 림프병변에서 이의 임상적 유용성과 의의를 확인코자 하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 재 료

연구 재료는 악성 림프종의 의진하에 의뢰된 조직 중 신선조직이 확보된 조직을 대상으로 하였다. 각 증례는 먼저 통상적 진단 방법인 헤마톡실린-에오신 염색 및 면역조직화학적 염색법으로 진단하여 악성 림프종 8예, Hodgkin병 1예, 혈관 면역아구성 림프선종(angioimmunoblastic lymphadenopathy) 2예, 그리고 비특이적 림프선염 2예를 선정하였다. 대조군으로는 손쉽게 조직을 얻을 수 있는 정상 태반 조직을 이용하였다.

### 2. 면역조직화학적 염색

절제된 조직은 통상적인 방법으로 10% 중성 완충 포르말린에 고정한 후 파라핀 포매괴를 만들어 4 $\mu$ m 두께로 박절하고 Probe-On Plus Slide(Fisher Scientific Co.)에 부착시켜 건조하여 염색에 사용하였다. 염색의 전과정은 capillary gap action의 원리를 응용한 Microprobe Immuno/DNA stainer(Fisher Co.)를 이용하여 시행하였다. 1차항체(primary Ab)로는 항 human T cell 항체(DAKO-CD45RO, UCHL1)와 항 human B cell 항체(DAKO-CD20, L26)를 사용하였고, biotin이 부착된 이차항체(universal secondary antibody, Biomed)를 반응시킨 후 streptavidin-alkaline phosphatase(Biomed)를 이용하여 Fast Red TR salt로 발색시켰다.

### 3. 유전자 재배열검사

1) DNA의 추출: -70 $^{\circ}$ C에 보관된 신선냉동조직 약 200mg을 glass homogenizer로 분쇄하여 여기에 proteinase K 1mg을 넣고 37 $^{\circ}$ C에서 14시간 반응시킨 후 phenol을 이용한 organic DNA extraction법으로 DNA를 추출하였다. 추출된 DNA는 TE buffer(1M Tris HCl, 0.5M EDTA (pH 8.0))에 용해시켜 4 $^{\circ}$ C에 보관하였다.

2) 제한효소처리: 용해된 DNA를 10 $\mu$ g씩 분주하고 여기에 각각 Eco RI, Bam HI, Hind III 200U와 restriction enzyme buffer 4 $\mu$ l를 넣고 증류수로 전체 용량을 40 $\mu$ l로 만들어 37 $^{\circ}$ C에서 5시간 반응시켰다.

3) 전기영동 및 막전이(Membrane transfer): 전기영동과 막전이는 Probe Tech<sup>TM</sup>2(Oncor, Gaithersburg)를 이용하여 시행하였고,  $\lambda$  DNA를 Hind III로 절단하여 size marker로 사용하였다. 0.8% agarose gel에서 제한 효소로 처리된 DNA를 20 volt에서 14시간 동안 전기영동하여 크기에 따라 DNA를 분리하였다. 막전이 및 hybridization를 쉽게하기 위하여 agarose gel을 다시 강산인 depurination 용액(0.25 N HCl)에서 15분간, 그리고 강알칼리 용액인 denaturation 용액(0.5 M NaOH, 1.5 M NaCl)에서 30분간 처리하여 Probe Tech<sup>TM</sup>2 내에서 nylon membrane에 진공전이하였다. 그후 nylon membrane을 80 $^{\circ}$ C의 dry oven에서 1시간 동안 건조하여 막전이된 핵산을 완전히 고정하였다.

4) 탐색자 Hybridization: 탐색자의 비특이적 결합을 억제할 목적으로 nylon membrane을 membrane blocking solution(Oncor, S4200-12)에 넣어 45 $^{\circ}$ C에서 30분간 부치시켰다. 실험 목적에 따라 각각 immunoglobulin heavy chain gene의 표지자인 J<sub>H</sub>(Oncor, P1010-BIO), immunoglobulin kappa light chain gene의 표지자인 J<sub>K</sub>(Oncor, P1030-BIO), 또는 TCR  $\beta$ -chain gene의 표지자인 J $\beta$ I(Oncor, P1060-BIO)와 J $\beta$ II(Oncor, 1065-BIO)가 각각 12.5ng/ml씩 들어있는 hybridization solution(Oncor, Hybrisol III) 10ml와 nylon membrane을 비닐백에 넣어 45 $^{\circ}$ C 오븐에서 14시간 hybridization하였다.

5) 검 출: 표지자에 붙어 있는 biotin을 검출하기 위하여 streptavidin과 alkaline phosphatase를 각각 결합시킨 후 NBT/BCIP(nitroblue tetrazolium/5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate)를 이용하여 발색하였다. 이때 각 단계마다 비특이적 결합을 억제하기 위하여 membrane blocking 및 세척(washing)과정을 반복 시행하였다. 태반에서 관찰되는 germline 띠와 cross hybridization에 의한 띠를 제외한 새로운 띠가 관찰

되는 경우에 재배열의 띠로 판정하였다.

**결 과**

면역조직화학적 검사로 B형 림프종으로 진단된 6예중 5예에서 B세포 유전자 재배열검사서 새로운 유전자 재배열 띠를 관찰할 수 있었다. B 세포의 표

지자인 J<sub>H</sub> 탐색자(probe)에 대하여 5예, J<sub>K</sub> 탐색자에서 4예가 유전자 재배열을 보였다(Table 1, 2). J<sub>H</sub> Probe와 Eco RI 제한 효소를 사용한 경우에 B1 림프종은 9.4kb 근처에서 2개의 재배열 띠를 보였고, B2 림프종은 5kb 근처에서 1개, B3 림프종은 8kb 근처에서 2개, B4 림프종은 6.6kb 근처에서 1개, B5 림프종은 9.4kb 근처에서 1개의 재배열 띠를 보였다(Fig. 1).

**Table 1.** Results of immunohistochemical and genetic analysis for lymphoproliferative disease

No.	Diagnosis	Age	Sex	Site	Immunostain	Gene rearrangement studies			
						J <sub>H</sub>	J <sub>K</sub>	J <sub>β</sub> I	J <sub>β</sub> II
1(B1)	NHL	54	M	CERVICAL LN	B	+	-	-	-
2(B2)	NHL	62	M	STOMACH	B	+	+	-	-
3(B3)	NHL	71	M	CERVICAL LN	B	+	+	-	-
4(B4)	NHL	29	M	ILEUM	B	+	+	-	-
5(B5)	NHL	18	M	CERVICAL LN	B	+	+	-	-
6(B6)	NHL	36	M	ILEUM	B	-	-	-	-
7(T1)	NHL	20	M	CERVICAL LN	T	-	-	-	+
8(T2)	NHL	54	M	STOMACH	T	-	-	-	+
9(A1)	AILD	70	F	CERVICAL LN	B	-	-	-	+
10(A2)	AILD	59	M	CERVICAL LN	B	-	-	-	+
11(H1)	HD	12	M	SPLEEN	?	-	-	-	-
12(N1)	LA	32	M	CERVICAL LN	N	-	-	-	-
13(N2)	LA	32	M	CERVICAL LN	N	-	-	-	-

NHL: Non-Hodgkin's lymphoma      AILD: Angioimmunoblastic lymphadenopathy  
 HD: Hodgkin's disease              LA: lymphadenitis              LN: Lymph node  
 B: predominant B-cell population    T: predominant T-cell population  
 N: no dominant pattern                ?: unknown  
 +: rearranged band                      -: no rearranged band

**Table 2.** Summary of gene rearrangement study in lymphoproliferative disease

Diagnosis	No. of patient	BCR		TCR	
		J <sub>H</sub>	J <sub>K</sub>	J <sub>β</sub> I	J <sub>β</sub> II
NHL, B cell type	6	5	4	0	0
NHL, T cell type	2	0	0	0	2
Hodgkin's disease	1	0	0	0	0
*AILD-like					
T cell lymphoma	2	0	0	0	2
Lymphadenitis	2	0	0	0	0

NHL: Non-Hodgkin's lymphoma      AILD: Angioimmunoblastic lymphadenopathy  
 \*: Revised diagnosis by gene rearrangement studies

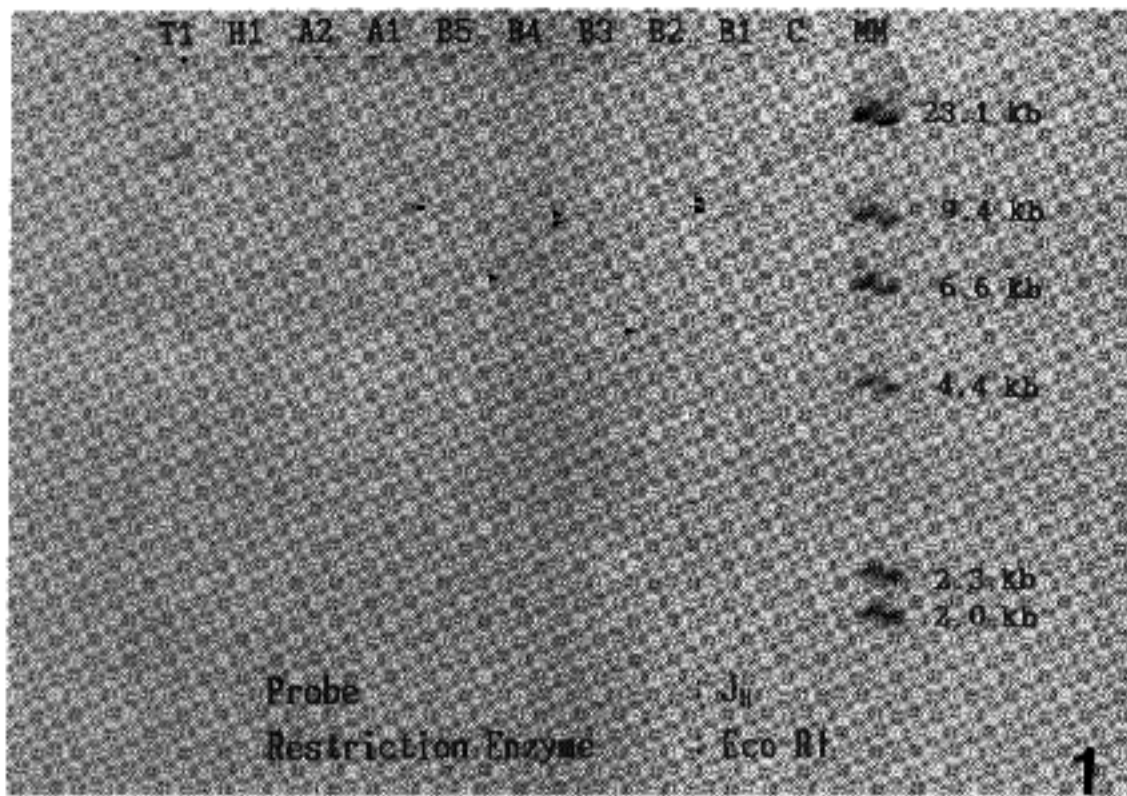


Fig. 1. Immunoglobulin heavy chain( $J_H$ ) genotype analysis. Eco RI restriction endonuclease digestion showing the germ-line band(18Kb) and rearranged bands (▶).

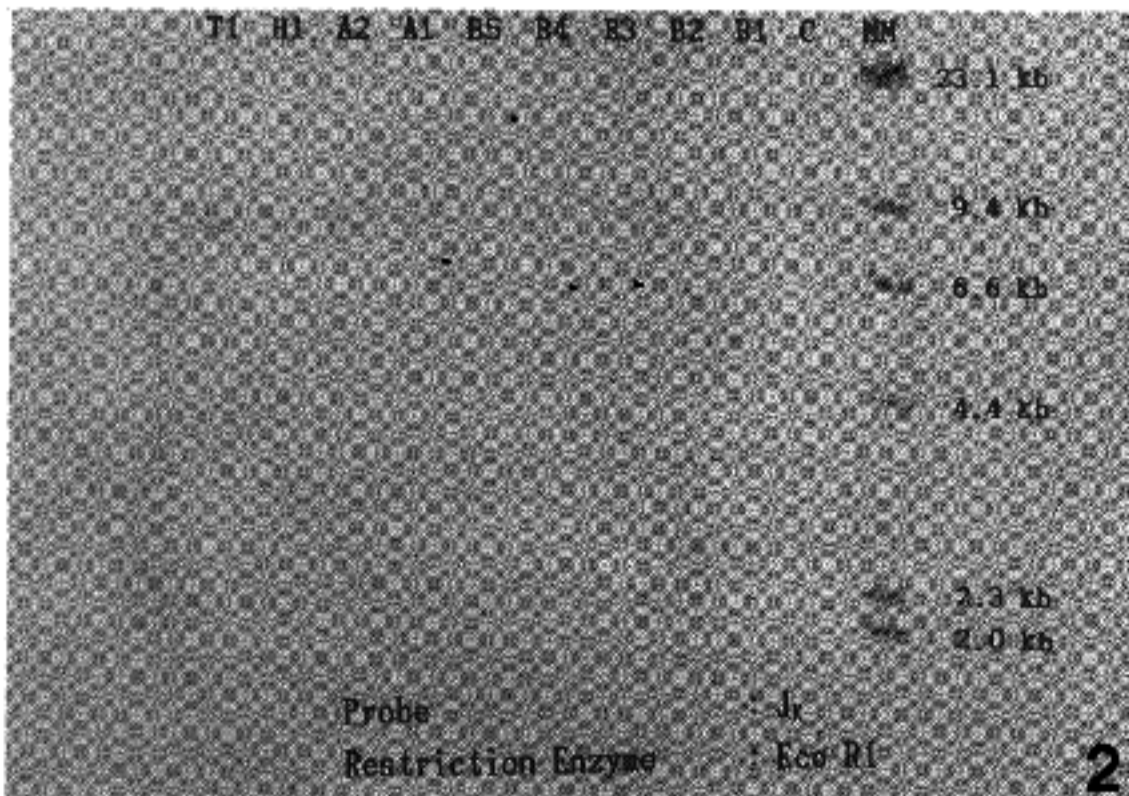


Fig. 2. Immunoglobulin kappa light chain( $J_K$ ) genotype analysis. Eco RI restriction endonuclease digestion showing the germ-line band(9.4Kb) and rearranged bands (▶).

$J_K$  탐색자와 Eco RI 제한효소를 사용한 경우에는 B1 림프종에서는 재배열 띠가 없이 germ line 띠만 관찰되었다. 그러나 B2 림프종에서는 6.6kb 근처에서 1개, B3 림프종에서는 6.6kb 근처에서 1개, B4 림프종에서는 23kb와 9.4kb 사이에서 1개, B5 림프종에서는 7kb 근처에서 1개의 재배열의 띠를 보였다(Fig. 2). 그러나 TCR의 표지자인  $J_{\beta I}$ 과  $J_{\beta II}$ 에서 Eco RI와 Hind III 제한효소를 사용한 경우 B형 림프종에서 모두 재배열의 띠가 관찰되지 않았다.

면역조직화학적 검사에서 T세포 림프종으로 진단된

2예는  $J_{\beta I}$ 과  $J_{\beta II}$  탐색자를 이용한 TCR 유전자 재배열 검사상  $J_{\beta II}$  탐색자에 대해서만 2예 모두 재배열 띠를 보였다(Table 1, 2).  $J_{\beta II}$  탐색자와 Eco RI과 Hind III 제한효소를 사용한 경우 T1 림프종에서 각각 5kb 근처와 9.4kb 근처에서 재배열 띠를 관찰할 수 있었고, T2 림프종에서는 각각 6.6kb 근처에서 2개, 8kb 근처에서 1개와 5kb 근처에서 1개의 재배열의 띠를 관찰할 수 있었다(Fig. 4).

면역조직화학적 염색에서 B cell 표지자에 양성 세포가 많았던 혈관 면역아구성 림프선종에서는 TCR

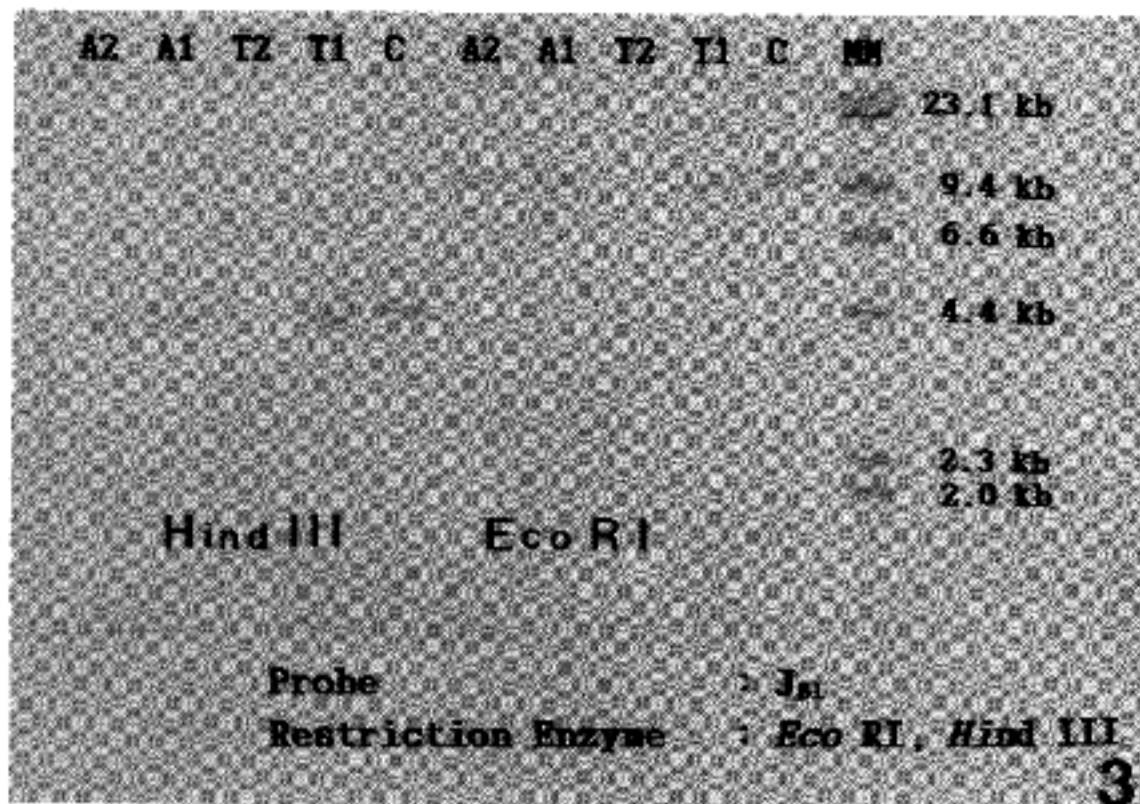


Fig. 3. T-cell receptor( $J_{\beta 1}$ ) genotype analysis. Germ-line bands in 11kb (Eco RI) and 4.1kb(Hind III) and rearranged bands(▶).

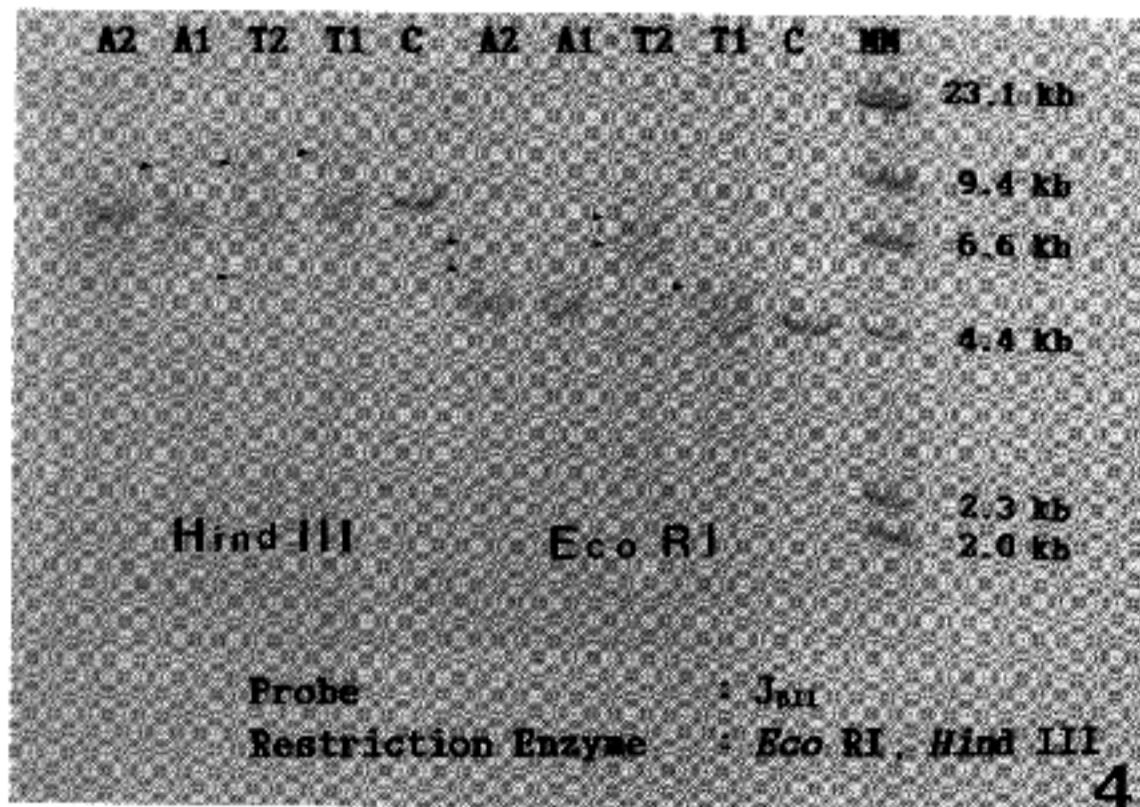


Fig. 4. T-cell receptor( $J_{\beta 1}$ ) genotype analysis. Germ-line bands in 4.2kb(Eco RI) and 7.7kb(Hind III) and rearranged bands(▶).

유전자 재배열검사상 2에 모두에서 재배열 띠가 관찰되었다.  $J_{\beta 1}$  탐색자를 사용한 경우 A1 림프종에서 Hind III 제한효소 처리시 8kb 근처에서 재배열 띠를 관찰할 수 있었고 A2 림프종에서는 Eco RI 제한효소 처리시 6.6kb와 4.4kb 사이에서 2개의 재배열 띠를 관찰할 수 있었다(Fig. 4).

Hodgkin병에서는 면역조직화학적 염색에서 단클론성이 인정되지 않았으며, BCR 와 TCR 유전자 재배열검사에서도 단클론성이 확인되지 않았다. 헤마톡실린-에오신 염색상 비특이적 림프선염으로 진단된

2에 역시 유전자 재배열 검사에서 재배열 띠가 관찰되지 않았다.

실험에 이용된 증례가 적어 예민도와 특이도를 평가하는 것은 부리가 있으나 재배열 검사의 예민도는 82%(9/11)이고 특이도는 100%(2/2)이었다.

## 고 찰

일반적인 림프구성 종양의 진단 및 분류에는 헤마톡실린-에오신 염색 및 림프구 표면항원을 이용한

면역조직화학적 염색법이 이용되어 왔다<sup>2,3</sup>. 임상에서 면역조직화학적 염색에 의하여 세포의 기원 및 분화의 정도를 판단하고자 할 때 악성 림프구 세포와 양성 림프구 세포가 섞여 있는 경우나 분화가 좋지 않은 경우에는 림프구 표면항원의 발현이 좋지 않아 관독에 어려움이 많다. 그러나 새로운 유전자 진단법은 유전자 수준에서 단클론성을 증명함으로써 이러한 문제점을 극복할 수 있다. 유전자 진단법은 병리학적인 진단분야에서 1) 단클론성과 다클론성 림프구 증식을 감별할 수 있으며, 2) 면역조직화학적 염색에 의한 림프구의 표현형 분류(immunophenotyping)을 보완하여 cell lineage를 알 수 있고, 3) 미분화 비림프구성 종양과 림프종을 감별할 수 있고, 4) 초기질환이나 조기재발을 진단할 수 있어<sup>5</sup> 림프종의 진단에 유용한 방법이다.

B세포의 Ig 유전자와 T세포의 TCR 유전자는 각각 Ig heavy, Ig kappa, Ig lambda와 T alpha/delta, T beta, T gamma로 구성되어 있고, 이들의 DNA 구조는 배세포계(germline) 상태에서 가변부위(variable region, 이하 V), 다양성 부위(diversity region, 이하 D), 결합부위(joining region, 이하 J) 및 불변부위(constant region, 이하 C)등으로 구성된 수많은 DNA의 부분들이 불연속적으로 배열되어 이루어져 있다. 이들은 B 또는 T세포가 분화하는 과정에서 V, D, J의 부분(segment)들의 재조합이 이루어져 다양한 항원에 대하여 항원 수용체 유전자가 만들어지게 된다<sup>4,5</sup>.

Southern blot 법에 의한 유전자 재조합 검사는 제한효소에 의하여 잘라진 DNA 절편중 검출하고자 하는 절편을 탐색자로 검출하는 방법이다. 비림프구성 세포나 미분화 림프구의 DNA를 제한효소로 절단하면 다양한 크기의 절편으로 만들어지나, 이들중 탐색자가 결합하는 결합부를 가진 절편은 동일한 크기이어서 전기영동으로 분리시 일정부위에 모이게 되어 hybridization 띠(germline band)를 관찰할 수 있다. 그러나 유전자 재배열을 일으킨 정상 림프구들은 탐색자가 결합하는 결합부위의 DNA 조합이 다양하여 제한효소로 절단시 다양한 크기의 절편을 만들게 되며, 전기영동시 산란되어져 모아진 형태의 hybridization 띠를 만들지 못한다. 악성 림프종은 단일 클론성 증식을 하는 질환이므로 제한효소로 절단시 동일한 크기의 DNA 절편이 만들어지고, 탐색자로 검출시 동일 절편에 의해 모아진 새로운 띠를 만들게 된다. 따라서 Southern blot법에 의한 유전자 재배열 검사는 유전자 수준의 단클론성을 증명하는 방법으로 새로운 재배열의 띠가 관찰될 때에는 단클론성 증식이 있다고 해석할 수 있다<sup>5</sup>.

본연구에는 탐색자(probe)로서  $J_H$ ,  $J_K$ ,  $J_{\beta I}$  그리고  $J_{\beta II}$ 를 이용하였다<sup>6,7</sup>.  $J_H$ 는 14번 염색체의 단완(32)에 존재하며, 크기는 5.6kb이고, heavy chain 유전자와 결합하여 있고, Eco RI 와 Bam HI 그리고 Hind III 제한효소로 절단하는 경우 각각 18kb, 11.5kb, 11kb에서 germ line 띠를 보인다.  $J_K$ 는 2번 염색체의 단완에 존재하며, 크기는 1.8kb이고, kappa light chain 유전자와 결합하여, Eco RI 와 Bam HI 그리고 Hind III 제한효소로 절단시 각각 9.4kb, 12kb, 5.4kb에서 germ line 띠가 관찰되며  $J_H$  와  $J_K$ 에서 새로운 재배열 띠를 관찰시 B 세포 림프종으로 확진하게 된다.  $J_{\beta I}$  과  $J_{\beta II}$ 는 각각 7번 염색체의 단완(32, 36)에 존재하며, TCR의  $\beta$  chain 유전자에 위치한다.  $J_{\beta I}$ 은 Eco RI(11kb), Bam HI(24kb), 그리고 Hind III(4.1kb)에서  $J_{\beta II}$ 는 Eco RI(4.2kb), Bam HI(24kb) 그리고 Hind III(7.7kb)에서 각각 germ line 띠를 보이며 이때 새로운 재배열 띠가 관찰되면 T세포 림프종으로 진단할 수 있다.

본 연구에서 면역조직화학적 염색상 B 림프종으로 진단된 6예중 5예(83%)에서, T 림프종으로 진단된 2예중 2예(100%) 모두에서 단클론성 증식이 확인되었다. 그리고 비특이성 림프선염으로 진단된 2예에서는 모두 새로운 재배열 띠를 관찰할 수 없어서 좋은 민감도(82%)와 높은 특이도(100%)를 나타내었다. 단클론성 증식의 확인이 않된 B 림프종 1예는 회장을 침범한 경우로 정상 점막과 근층에 악성 림프구의 침윤이 관찰된 증례이었으나, 신선조직이 채취된 부위는 악성 림프구의 침윤이 적은 부위로 추정되며 이런 이유 때문에 단클론성이 확인이 되지 않은 것으로 생각되었다. 이러한 위음성을 보완할 수 있는 방법으로 PCR법<sup>8</sup>이 있다. PCR법은 Southern blot법에 비하여 예민도가 훨씬 높고, 소량의 DNA도 PCR로 증폭하여 검출이 가능하여 뇌척수액의 세포검사나 세침검사<sup>9</sup>, 파라핀포매 조직에서까지도 검사가 가능하다. 그러나 Southern blot법은 PCR법의 단점인 위양성을 확인할 수 있는 방법으로 림프종양의 단클론성의 확진방법으로 널리 쓰이고 있다.

Hodgkin병은 Reed-Sternberg 세포가 악성 종양세포로 알려져 있고, Reed-Sternberg 세포의 기원의 확인이 병리기전의 이해에 필수적이다<sup>10</sup>. Reed-Sternberg 세포에 대한 기원에 대해서는 B 림프구, T 림프구, dendritic cell, 대식세포, myelomonocytic precursor등 다양한 가능성이 제시<sup>11-13</sup>되어 왔다. 그러나 Hodgkin병의 유전자 재배열 검사에서 B 혹은 T 세포의 단클론성 증식이 없다는 보고<sup>14</sup>도 있고, 소수에서 단클

론성 증식이 있다고 보고<sup>15,16</sup> 되기도 하였다.

본연구에서 Hodgkin병은 비장을 침범한 nodular sclerosis 형으로 면역조직화학적 염색에서 Reed-Sternberg 세포가 leukocyte common antigen에 양성이나 B나 T cell marker에 비특이적 염색을 나타내어 정확한 판독이 어려웠고, 주변에서는 양성의 B형 혹은 T형 림프구들이 혼재하였다. 유전자 재배열 검사에서 BCR 및 TCR에 대하여 음성으로 관찰되었으나, 저자는 Reed-Sternberg 세포의 수가 적어 단클론성을 확인하지 못한 것으로 생각하여 좀더 민감한 방법으로 검사시 확인이 가능할 것으로 생각하였다.

혈관면역아구성 림프선종(angioimmunoblastic lymphadenopathy) 2예 모두 TCR 유전자의 재배열이 관찰되었다. 면역조직화학적 염색에서는 많은 B 세포들이 존재하고 소수의 T 세포들이 존재하였으나, DNA 수준의 유전자 재배열 검사에서는 T 세포의 종양으로 판정되었다. 그러나 탐색자와 제한효소의 종류에 따라 검출 유무가 달라지는 결과로 보아 정확한 진단을 위해서는 가능한 한 모든 검사를 전부 시행하는 것이 좋을 것으로 생각되었다. 처음에는 이 질환이 B 림프구와 관련이 되어 있고 림프종의 발생 빈도가 높은 질환으로 생각<sup>17,18</sup>되었으나, 유전자 재배열 검사가 도입됨에 따라 이 질환이 T 림프종의 일종으로 T 세포의 B 세포 조절기능의 상실로 인하여 비정상적인 B 림프구의 증식이 발생함으로써 다양한 B 림프구의 증식과 함께 혈액내에서 다클론성 단백혈증(polyclonal gammopathy)이 나타나게 된다<sup>19</sup>.

림프종의 진단에서 유전자 재배열 검사의 가장 중요한 의의는 역시 경한 초기질환이나 조기재발을 발견할 수 있다는 점이다. 초기의 경미한 병변이나 재발 병변은 병변의 크기가 작거나 다른 정상세포와 섞여 있는 경우가 많아, 통상적인 헤마톡실린-에오신 염색과 면역조직화학적 염색상 판별에 어려움이 많고 오진 가능성이 높다. 이와 같이 정상세포가 많이 섞여 단클론성을 확인할 수 없는 경계성의 병변인 경우에 가성 림프종(pseudo-lymphoma)나 비정형 림프종(atypical lymphoma)등으로 분류하기도 하였다<sup>20</sup>. 이런 질환은 추후 악성 림프종으로 진행되거나 소퇴되는데 이런 경우에 특이성이 높은 유전자 재배열 검사를 시행한다면 정확하고 객관적인 결과를 얻을 수 있어서 환자의 치료에 많은 도움을 주게 될 것이다.

Southern blot 범용 막전이(membrane transfer) 방법에는 모세관 현상을 이용하는 고전적인 방법, 전기를 이용한 electrophoretic transfer 방법, 그리고 진공전이법등이 있다. 검출방법에 있어서도 방사선 동위

원소를 이용하는 방법과 비방사선 방법인 biotin이나 digoxigenin을 이용하는 법이 있다<sup>21</sup>. 모세관 현상을 이용한 고전적인 막전이 방법은 전이 효율은 좋으나 방법 자체가 번거롭고 많은 시간(overnight)이 소요되는 단점이 있으며, 방사선 탐색자 역시 민감성은 좋으나 방사선 동위원소의 사용에 따른 생체유해, 사용기간의 제약등이 있어서 부정기적이고 검사 빈도가 적은 임상에서는 검사법으로 적합하지 않다. 그래서 본 연구에서는 간편하고 빠른 시간내에 막전이가 가능한 진공전이법을 이용하였고, 탐색자(probe)는 생체 유해성이 전혀 없고 장기간 어느때나 사용이 가능한 biotin이 붙은 탐색자를 사용하였다. 본 연구에서는 전기영동과 진공전이가 한장치내에서 연속적으로 이루어지는 장치를 이용하여 7일이 소요되는 고전적인 Southern blot법을 4일로 단축시켜 임상 적용도를 증가시켰고, 검사결과 역시 좋은 민감도와 높은 특이도를 나타내어, 손쉽고 정확한 임상검사법으로 사용 가능성을 확인하였다.

본연구에 이용한 유전자 재배열 검사는 DNA 수준에서 단클론성 증식을 증명하는 방법으로, 앞으로 병리진단 분야에서 유전자 검사(genomic biopsy)로 널리 사용될 것으로 전망된다. 이러한 유전자 수준의 검사법들은 선천성 질환과 감염성질환의 조기진단등에 이용되고 있으며 그 활용범위는 더욱 넓어질 것이다<sup>21</sup>.

## 결 론

림프종양의 진단에 있어서 유전자 재배열 검사의 임상적 유용성과 의의를 확인하기 위하여 악성림프종 8예, Hodgkin 병 1예, 혈관 면역아구성 림프선종(Angioimmunoblastic lymphadenopathy) 2예, 그리고 비특이적 림프선염 2예를 연구 대상으로 하여 유전자 재배열 검사를 시행하였다.

B세포 유전자 재배열검사서 6예중 5예에서 새로운 유전자 재배열 띠를 관찰할 수 있었고, TCR 유전자 재배열 검사에서 2예중 2예 모두에서 유전자 재배열이 관찰되었다. 혈관 면역아구성 림프선종에서는 2예 모두 TCR 유전자 재배열이 관찰되었으나 Hodgkin's 병에서는 BCR 과 TCR 모두 음성이었다. 그리고 비특이적 림프선염에서는 역시 모두 음성이었다.

이상의 성적에서 악성 림프종양의 11예중 9예에서 단일 클론성을 증명하여 81%의 민감도를 보였고, 비특이적 림프선염 모두에서 음성으로 관찰되어 100%의 특이성을 나타내었다. 그리고 진공전이법등의 사

용으로 인하여 검사기간을 4일로 단축하였고, 비방사선 탐색자를 사용하여 사용의 간편성을 배가시켰다.

이상의 결과로 BCR 및 TCR 유전자 재배열 검사는 림프구의 단클론성 증식을 확인하는 방법으로 림프구의 계열을 알 수 있고, 면역조직화학적 염색으로 진단이 어려운 경미한 초기질환이나 경계성 병변 등을 발견할 수 있어 림프종양의 진단에 면역조직화학적 염색을 보완하는 유용한 검사법임을 알 수 있었다.

## 참 고 문 헌

1. Aisenberg AC. Cell-surface markers in lymphoproliferative disease. *N Engl J Med* 1978; 304: 331-6.
2. Jaffe ES, Braylan RC, Nanba K, Frank MM, Berard CW. Functional marker: a new perspective on malignant lymphomas. *Cancer Treat Rep* 1977; 61: 953-62.
3. Rudders RA, Ahl ET Jr, DeLellis RA. Surface marker and histopathologic correlation with long-term survival in advanced large-cell non-Hodgkin's lymphoma. *Cancer* 1981; 47: 1329-35.
4. Tonegawa S. Somatic generation of antibody diversity. *Nature* 1983; 302: 575-81.
5. Willman CL, Griffith BB, Whittaker M. Molecular genetic approaches for the diagnosis of clonality in lymphoid neoplasm. *Clin. Lab. Med.* 1990; 10: 119-49.
6. Arnold A, Cosmann J, Bakhshi A, Jaffe ES, Waldmann TA, Korsmeyer SJ. Immunoglobulin-gene rearrangements as unique clonal markers in human lymphoid neoplasm. *N Eng J Med* 1983; 309: 1593-1599.
7. Xerri L, Horschowski N, Lejeune C, Carcassonne Y, Hassoun J. Rearrangement of the  $\beta$  T-cell receptor gene in a monocytoid B-cell lymphoma. *Arch Pathol Lab Med* 1990; 114: 109-11.
8. 이종욱, 김춘추. 림프증식 질환에서 재배열된 항원 수용체 유전자의 증폭에 의한 클론성의 증명과 B 또는 T 계열의 구별. 가톨릭대학교 의과대학 논문집 1993; 46: 533-45.
9. Trainor KJ, Brisco MJ, Story CJ, Morley AA. Monoclonality in B-lymphoproliferative disorders detected at DNA level. *Blood* 1990; 75: 2220-2.
10. Cotran GS, Kumar V, Robbins SL. *Pathologic basis of disease*. 5th edition. Saunders, 1994: 643-8.
11. Kadin ME, Stites DP, Levy R, et al. Exogenous immunoglobulin and the macrophage origin of Reed-Sternberg cells in Hodgkin's disease. *N Engl J Med* 1978; 299: 1208-14.
12. Hsu SM, Yang K, Jaffe ES. Phenotypic expression of Hodgkin's and Reed-Sternberg cells in Hodgkin's disease. *Am J Pathol* 1985; 118: 209-17.
13. Strauchen JA, Dimitriu-Bona A. Immunopathology of Hodgkin's disease characterization of Reed-Sternberg cells with monoclonal antibodies. *Am J Pathol* 1986; 123: 293-300.
14. Linden MD, Fishleder AJ, Katzin WE, Tubbs RR. Absence of B-cell or T-cell clonal expansion in nodular, lymphocyte predominant Hodgkin's disease. *Hum Pathol* 1988; 19: 591-4.
15. Weiss LM, Strckler JG, Hu E, Warnke RA, Sklar J. Immunoglobulin gene rearrangements in Hodgkin's disease. *Hum Pathol* 1986; 17: 1009-14.
16. Griesser H, Feller AC, Mak TW, and Lenner K. Clonal rearrangements of T-cell receptor and immunoglobulin genes and immunophenotypic antigen expression in different subclass of Hodgkin's disease. *Int J Cancer* 1987; 40: 157-160.
17. Frizzera G, Moran EM, Rappaport H. Angio-immunoblastic lymphadenopathy with dysproteinemia. *Lancet* 1974; 1: 1070-3.
18. Frizzera G, Moran EM, Rappaport H. Angio-immunoblastic lymphadenopathy. *Am J Med* 1975; 59: 803-18.
19. Weiss LM, Strickler JG, Dorfman RF, Horning SJ, Warnke EA, Sklar J. Clonal T-cell population in angioimmunoblastic lymphadenopathy and angioimmunoblastic lymphadenopathy-like lymphoma. *Am J Pathol* 1986; 122: 392-7.
20. Knowles DM, Jakobiec FA. Orbital lymphoid neoplasms. *Cancer* 1980; 46: 576-89.
21. 광주원, 권석태 등. 분자생물학노트, 제1판. 유전공학연구소. 1991: 74-86.
22. Craig RK. Methods in molecular medicine. *Br Med J* 1987; 295: 646-9.