

## 악성림프증식성 질환에서 중합효소연쇄반응에 의한 유전자 재배열 검색

한양대학교 의과대학 병리학교실 및 서울대학교 의과대학 병리학교실\*

박 찬 금 · 김 철 우\*

### Non-Radioactive Detection of Clonality in Malignant Lymphoid Neoplasms using the Polymerase Chain Reaction

Chan Kum Park, M.D. and Chul Woo Kim, M.D.\*

Departments of Pathology, College of Medicine, Hanyang University and Seoul National University\*

The polymerase chain reaction(PCR) was performed to detect clonal rearrangements of the immunoglobulin heavy chain gene(IgH) or T-cell receptor(TCR) genes in 57 lymphoproliferative diseases including 26 B-cell lymphomas and 23 peripheral T-cell lymphomas(PTCL). Using the IgH primers, monoclonality was detected in 19 out of 22(86.4%) cases of diffuse lymphomas and 2 out of 4(50%) follicular lymphomas, respectively, but not in the 23 PTCL cases. Using the V and J regions of the TCR $\gamma$  chain primers, monoclonality was detected in 14 out of the 23(60.9%) PTCL cases. TCR  $\beta$  chain gene rearrangements were observed in 7 out of the 9 cases which did not show TCR $\gamma$  chain gene rearrangements. One non-T non-B acute lymphoblastic leukemia was found to have TCR  $\beta$  chain gene rearrangements. In conclusion, analysis of Ig and TCR gene rearrangements by using the PCR technique can be used as a useful diagnostic adjunct to establish the clonality of various lymphoproliferative diseases. (**Korean J Pathol 1996; 30: 311~317**)

**Key Words:** Polymerase chain reaction-Clonality-B-cell lymphoma-T-cell lymphoma

### 서 론

현재 우리나라에서는 악성 림프종의 진단시 생검 조직의 조직학적 진단방법에 기본을 두고 면역 조

접 수 : 1995년 9월 25일, 게재승인 : 1996년 1월 22일  
주 소 : 서울시 성동구 행당동 산 17, 우편번호 133-791  
한양대학교 의과대학 병리학 교실, 박찬금

\*본 논문은 한국과학재단 목적기초 연구비(KOSEF-92-29-00-16-03-2)에 의해 수행되었음

직화학 염색을 이용한 면역 표현형의 결정(immunophenotyping), 유식세포 분석기(flow cytometric analysis)에 의한 방법 등이 이의 진단에 있어 보조 수단으로 이용되고 있다. 비호지킨 악성림프종의 진단시 형태학적인 그리고 면역표현형의 분석만으로는 반응성 림프증식성 질환(reactive lymphoid hyperplasia) 및 가성 림프종과의 감별, 그리고 안와부속기, 폐장, 소화기계통, 피부이하선의 소림프구 침윤증 등의 경우에 악성림프종과의 감별이 어려울 때가 있다. 이러한 경우 면역글로블린(immunoglobulin, Ig)과 T세

포수용체(T-cell receptor, TCR) 유전자 재배열 분석은 진단병리 분야에 있어서 매우 중요한 역할을 담당하고 있다<sup>1-6</sup>. 전통적으로 이용되는 제한효소 절단과 Southern blot hybridization(SBH)을 이용한 유전자 재배열 검색은 병리 검사실에서 진단 목적으로 이용하기에는 여러가지 문제점이 있다<sup>7,8</sup>. SBH의 경우 항상 신선 조직을 이용하여야 하므로 후향성 검색을 할 수 없고, 다량의 DNA를 필요로 하므로 세포 도말 표본이나 생검 조직인 경우엔 충분한 양의 DNA를 얻을 수 없다. 방사능 표지(radiolabelling)를 위해 사용하는 방사능 물질은 인체에 해로울 뿐더러 반감기가 있으므로 환자의 검체가 많지 않으면 비경제적이다. 또한 여러 실험실 장비가 필요할 뿐만 아니라 DNA 추출로부터 자가방사기록(auto-radiography)까지 1~2주의 시간을 요한다<sup>8,9</sup>. 그러므로 중합효소연쇄반응(polymerase chain reaction, PCR)을 이용한 유전자 재배열 검색은 신선 조직뿐만 아니라 파라핀에 포매된 조직이 이용 가능하므로 후향성 검색이 가능하고 소량의 DNA로도 결과를 얻을 수 있을 뿐만 아니라 방사능 물질을 사용하지 않아도 된다. 또한 실험 방법이 훨씬 간편할 뿐더러 비용이 덜 비싸고 신속하게 결과를 얻을 수 있다. 그러므로 저자들은 악성림프종 및 림프구성 백혈병의 진단에 있어서 PCR 기법에 의한 유전자 재배열 검색을 시행하고자 본 연구를 시행하였다.

## 연구재료 및 방법

임상적으로 악성림프종이 의심되거나 악성림프종인 경우 그리고 조직학적 및 면역 표현형에 의해서 악성림프종과 기타 양성림프증식성 질환의 감별이 어려운 총 57예(말초 T-세포 림프종 23예, B-세포 림프종 26예, Non-T, Non-B 세포 백혈병 1예, 호지킨 림프종 3예, 과립세포육종 1예, 하시모토씨질병 1예, 쇼그렌 증후군 1예)의  $-70^{\circ}\text{C}$ 에 냉동시킨 신선 조직과 포르말린에 고정된 파라핀 포매 조직을 대상으로 하여 TCR $\gamma$  유전자 재배열 및 IgH 유전자 재배열 검색을 동시에 시행하였다. 면역 표현형이 T 세포 림프종이면서 TCR $\gamma$  유전자 재배열을 보이지 않은 예에 대해서는 TCR $\beta$  유전자 재배열 검색도 함께 시행하였다. 고형성 조직에 대해서는 avidin-biotin peroxidase complex법으로 면역 조직 화학 염색을 시행하였으며 림프구 표지자의 일차항체로는 CD20 (L26, Dakopatts), MB-2 (CD45RA, Biotest), CD45RO (UCHL-1, Dakopatts), MT-1 (CD43, Biotest), CD68 (Dakopatts)에 대한 단클론성 항체를 이용하였

다. 말초 혈액 및 골수 표본은 유식세포 분석을 시행하여 분석하였다. 유식세포 분석은 단세포 부유액 상태로 세포 표면의 면역 표지 검색을 시행하였는데 이에 이용된 단클론 항체는 CD2, CD3, CD4, CD7, CD8의 T림프구 특이 항원과 CD10, CD15, CD19, CD20과 Kappa/Lambda light chain등 B림프구 특이 항원을 이용하였다.

### 1. 중합효소연쇄반응에 의한 유전자재배열 검색

1) 파라핀 조직에서의 DNA 추출: 파라핀에 포매된 조직을 박절기로 4~5  $\mu\text{m}$  두께로 잘라 파라핀을 제거하지 않고 15 ml 관에 넣은후 xylen 2 ml을 넣고 vortex하였다. 2000 rpm에서 5분간 원심 분리하고 이 과정을 2~3회 되풀이 하였다. 99.9% 알코올 2 ml을 넣고 vortex한 후 2000rpm에서 5분간 원심분리하고 이 과정을 2회 되풀이하였다. 파라핀을 덮고 구멍을 뚫은후 1시간 동안 진공 건조기에서 건조시켰다. 1 ml의 추출 완충액(양이 많으면 2 ml) (1M Tris pH8.0, 100 mM NaCl, 10 mM EDTA)을 첨가한 후 50  $\mu\text{l}$ 의 20% SDS와 50  $\mu\text{l}$ 의 proteinase K(10 mg/ml)를 첨가하였다. Vortex한 후  $48^{\circ}\text{C}$ 에서 4~5일경까지 부유물이 거의 없을 정도로 부란시켰다. Phenol/chloroform을 동량 넣고 Vortex한 후 3000RPM에서 15분간 원심분리하였다. 상층액을 따서 보관용과 실험용을 따로 구분하여 실험용은 300  $\mu\text{l}$ 만 취하여 1.5 ml 에펜도르프관으로 옮겼다. 추출된 DNA는 다음 단계의 중합효소 연쇄 반응을 효율적으로 수행할 수 있도록 GeneClean II kit(Bio 101, USA)를 이용하여 정제하였다. 정제된 DNA는  $-20^{\circ}\text{C}$ 에 보관하고 장기간 보관시엔  $-70^{\circ}\text{C}$ 에 보관하였다. 포르말린에 고정하지 않은 신선조직인 경우엔 탈파라핀 과정을 생략하였다. PCR을 위해 1  $\mu\text{l}$ 의 일정부분을 사용하였다.

2) 중합효소연쇄 반응에 사용된 시발체(primer)들: PCR에 사용된 시발체는 Table 1에 기술되어 있다. IgH 유전자를 증폭시키기 위해서는 seminested PCR을 시행하였으며 TCR $\gamma$  유전자를 증폭시키기 위해서는 nested PCR을 시행하였다.

3) 중합효소연쇄반응 조건: PCR은 Perkin Elmer Cetus DNA Thermal Cycler를 사용하였으며 총 반응 용량은 10  $\mu\text{l}$ 로 하였다. DNA 추출 후  $\beta$ -actin/ $\beta$ -globin primer를 사용하여 DNA가 제대로 뽑혔는지 확인하기 위하여 PCR을 시행하여 띠를 확인 후 IgH와 TCR $\gamma$  유전자 증폭을 위하여 "seminested" 및 "nested PCR"을 시행하였다. PCR 각 sample의 용량은 10  $\mu\text{l}$ 로써 DNA 1  $\mu\text{l}$ 에 master mix 9  $\mu\text{l}$ (AmpliTaq

polymerase 1U, 각각의 시발체 100 nM, dNTPs 200 uM, MgCl<sub>2</sub> 1.5 mM, KCl 50 mM, Tris-Hcl 10 mM, 0.01% gelatin)을 섞고 광유 한방울을 떨어뜨린 후 first round PCR을 시행하였다. PCR 산물에서 1 μl를 취하여 9 μl의 master mix와 섞고 광유 한방울을 떨어뜨린 후 2nd round PCR을 시행하였다. IgH 유전자를 증폭하기 위한 first round PCR은 LJH primer와 FR3A 시발체를 사용하여 먼저 94°C에서 5분간 변성시켜 94°C 1분, 55°C 1분, 72°C 1분에서 30회 시행한 후 72°C에서 1분간 사슬 연장 반응을 시행하였다. First round PCR 산물에서 1 μl을 취하여 VLJH와 FR3A 시발체를 첨가하여 first round PCR과 똑같은 방법으로 20회의 second round PCR을 시행하였다. TCRγ 유전자 재배열을 보기 위한 PCR은 outer pair의 시발체로 94°C에서 5분간 변성시키고 94°C 1분, 55°C 1분, 72°C 1분에서 30회 시행한 후 72°C에서 1분간 사슬 연장 반응을 시행하였다. First round PCR 산물에서 1 μl을 취하여 inner pair의 시발체를 첨가하여 first round PCR과 똑같은 방법으로 20회의 second round PCR을 시행하였다. TCRβ 유전자를 증폭시키기 위하여 D<sub>1</sub>J<sub>2</sub> 시발체와 D<sub>2</sub>J<sub>2</sub> 시발체를 사용하였다. 먼저 94°C에서 5분간 변성시킨 후 94°C 1분,

60°C 1분, 72°C 1분에서 35회 시행한 후 72°C에서 10분간 사슬 연장 반응을 시행하였다. PCR산물은 2% nusieve gel에서 100~120 voltage에서 전기 영동에서 초검하고 IgH와 TCRβ은 12% polyacrylamide gel에서 그리고 TCRγ는 5% polyacrylamide gel에서 16시간 전기영동 후 ethidium bromide로 염색하여 UV 광선 하에서 관찰하였다.

결 과

PCR 산물을 전기영동한 결과 3가지군으로 나누어 결과를 판독하였는데 양성(단클론성, monoclonality)은 반응성 림프구의 DNA 증폭에 의해 발생하는 smear 양상의 배경에 상관없이 하나 내지 두개의 뚜렷한 띠가 관찰될때로 하였으며 이때 관찰되는 단클론성의 띠는 인접해 있는 띠보다 강도가 적어도 두배 이상 강할 때를 양성으로 정하였다. 다클론성(polyclonality)은 일정한 간격을 두고 동일한 강도의 다발성띠(-15)가 관찰될 때로하였으며 음성(nonreac-

Table 1. Primers used for polymerase chain reaction

IgH	
V region primer	FR3A: 5'-ACACG GC(C/T)(G/C)T GTATT ACTGT-3'
J region primer	
LJH(Outer nest):	5'-TGAGG AGACG GTGAC C-3'
VLJH(Inner nest):	5'-GTGAC CAGGG T(A/G/C/T) CCT TGGCC CCAG-3'
TCRγ	
V region primer	
primer A(Outer nest)	5'-GAAGC TTCTA GCTTT CCTGT CTC-3'
Primer A'(Inner nest)	5'-CTCGA GTGCG CTGCC TACAG AGAGG-3'
J region primer	
primer B(Outer nest)	5'-CGTCG ACAAC AAGTG TTGTT CCAC-3'
Primer B'(Inner nest)	5'-GGATC CACTG CCAAA GAGTT TCTT-3'
TCRβ	
Diversity region	
D1:	5'-CAAAG CTGTA ACATT GTGGG GAC-3'
D2:	5' TCATG GAGTA ACATT GTGGG GAC-3'
Joining region	
J2:	5'-AGCAC CGTGA GCCTG GTGCC-3'

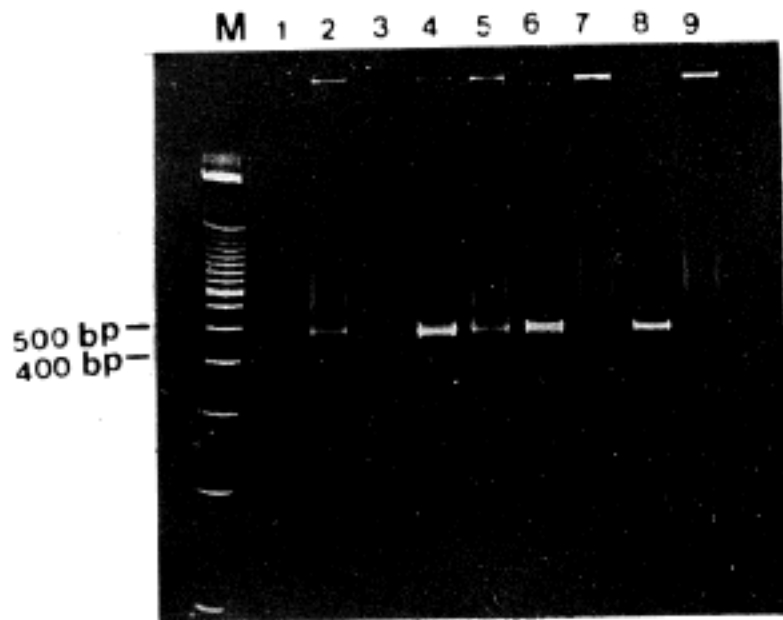
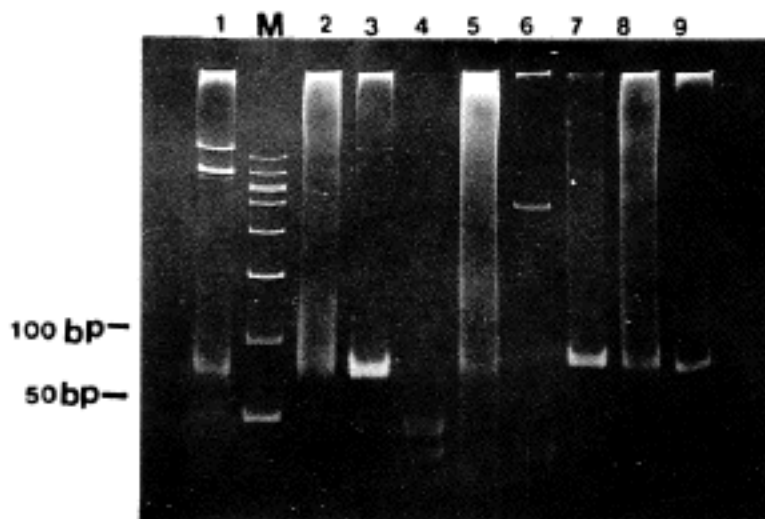
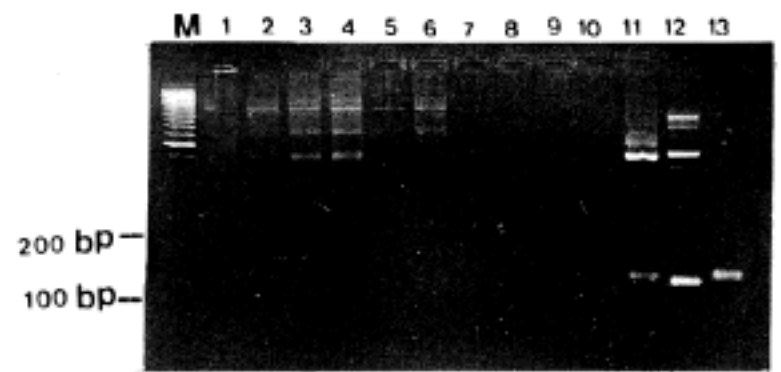


Fig. 1. PCR amplification using the TCRγ primers. Ethidium bromide-stained 5% polyacrylamide gel showing discrete monoclonal bands between 400 and 500 base pairs. The size of the resulting bands are shown in base pairs. Lane 2,5,6,8: Peripheral T-cell lymphoma. Lane 4: T-cell line. Lane 1,3,7,9: Non-tumorous condition. Lane M: DNA molecular weight marker VIII(Boehringer Mannheim).



**Fig. 2.** PCR amplification using the TCR $\beta$ (D<sub>1</sub>J<sub>2</sub>) primers. Ethidium bromide-stained 12% polyacrylamide gel showing discrete monoclonal bands between 50 and 100 base pairs. The size of the resulting bands are shown in base pairs.  
 Lane 1,3,7-9: Peripheral T-cell lymphoma.  
 Lane 4: Negative control.  
 Lane 5: Tonsil.  
 Lane 2,6: Non-tumorous condition.  
 Lane M: DNA molecular weight marker VIII(Boehringer Mannheim).

tive pattern)은  $\beta$ -actin과  $\beta$ -globin에는 증폭된 DNA 산물을 관찰할 수 있었으나 consensus primer로 증폭시 때가 관찰되지 않을 때로 정하였다. 말초 T-세포 림프종(peripheral T cell lymphoma, PTCL) 23예중 14예에서 TCR $\gamma$ 에 400~500bp에서 증폭된 유전자 산물이 관찰되었으며(Fig. 1), TCR $\gamma$  유전자가 증폭되지 않은 9예중 7예에서는 TCR $\beta$  시발체에 -50~100bp에서 증폭된 유전자 산물의 뚜렷한 띠가 관찰되어 TCR $\beta$  유전자의 단클론성을 확인할 수 있었다(Fig. 2). Non-T, Non-B 세포 백혈병 1예에서 TCR $\beta$ 의 뚜렷한 띠가 관찰되었으며 PTCL을 포함한 24예 모두에서 IgH에는 단클론성의 띠가 관찰되지 않았다. 즉 PTCL 총 23예중 21예(91.3%)에서 TCR $\gamma$  및 TCR $\beta$ 에 재배열된 뚜렷한 띠가 관찰되어 면역표현형과 일치함을 확인할 수가 있었으며 Non T, Non-B 세포 백혈병 1예가 PCR에 의한 유전자 재배열 검색상 T세포 림프종으로 판명되었다. 호지킨 림프종 3예와 과립세포육아종 1예에서는 TCR $\gamma$ , TCR $\beta$  및 IgH유전자의 재배열을 관찰하지 못하였다. B 세포 림프종은 미만형 림프종(diffuse lymphoma) 22예중 19예에서(86.4%) IgH chain에 단클론성의 재배열된 증폭된 유전자 산물을 관찰할 수 있어 악성 림프종의 B세포 단클론성을 확인할 수 있었다(Fig. 3). 위장에 발생한 림프종 1



**Fig. 3.** PCR amplification of clonal IgH VDJ gene rearrangement in genomic DNA. Ethidium bromide-stained polyacrylamide gel analysis showing discrete monoclonal bands between 100 and 200 base pairs. The size of the resulting bands are shown in base pairs.  
 Lane 1 to 3, 5 and 6: Non-tumorous condition.  
 Lane 4: Peripheral T-cell lymphoma.  
 Lane 7: T-cell line.  
 Lane 8: Hodgkin's disease.  
 Lane 9 and 10: Non-tumorous condition.  
 Lane 11-13: B-cell lymphoma.  
 Lane M: DNA molecular weight marker VIII(Boehringer Mannheim).

**Table 2.** Monoclonality detected by polymerase chain reaction

Disease	Total patient studied	IgH	TCR $\gamma$	TCR $\beta$
PTCL	23	0/23	14/23	7/23
B-NHL	26	21/26	1/26	0/26
Hodgkin's disease	3	0/3	0/3	0/3
granulocytic sarcoma	1	0/1	0/1	0/1
Hashimoto's disease	1	0/1	0/1	N.D.
Sjogren's syndrome	1	0/1	0/1	N.D.
Mickulicz disease	1	0/1	0/1	N.D.
Non-T Non-B ALL	1	0/1	0/1	1/1
Total(number of cases)	57	21/57	15/57	8/54

PTCL: Peripheral T-cell lymphoma  
 NHL: Non-Hodgkin's lymphoma  
 ALL: Acute lymphoblastic leukemia  
 N.D.: Not done

예에서는 TCR $\gamma$ 에 양성반응을 보였다. 4예의 여포 림프종(follicular lymphoma)중 2예에서 IgH에 양성이고 나머지 2예는 음성이나 bcl-2 유전자 재배열 가능성은 확인치 못했다. 1예의 하시모토 질환과 1예

의 쇼그렌 증후군에서 IgH에 다클론성의 여러개의 띠를, 그리고 TCR $\gamma$ 에 음성을 보인 반면 1예의 Mickulicz disease에서는 IgH에 음성, 그리고 TCR $\gamma$ 에 여러개의 띠를 보여 자가면역성 질환과 위장관계 림프종에서 PCR을 이용한 유전자 재배열 검색의 조 심스러운 판독이 필요한 것으로 생각하였다(Table 2).

## 고 찰

악성림프종의 분지계와 클론성을 분석하는데 전통적으로 사용되는 제한효소절단에 의한 SBH보다 PCR 기법에 의한 분석이 상기 언급한 여러가지 이 점이 있어 대체방법으로 사용되고 있다<sup>8-14</sup>. 배선 지놈(germline genome)의 가변형 부위(variable region, V)와 결합부위(joining region, J)에 대부분 존재하는 "consensus" primers를 사용하여 배선 지놈의 재배열 동안에 형성되는 독특한 경계 부위를 포함하는 절편을 증폭함으로써 악성림프종 및 다른 종양성 림프종증식성 질환에서 TCR 유전자 및 Ig 유전자의 클론성을 분석할 수 있다<sup>8-14</sup>. 즉 여러 종류의 V region은 서로 DNA 배열순(sequence)이 같으면서도 독특한 DNA 배열순을 갖고 있기 때문에 대다수의 V region에 공통적인 비교적 짧은 길이의 consensus primer에 의한 증폭이 가능하다. 또한 배선 구조에서는 V와 J가 거리상 멀리 떨어져 있기 때문에 PCR 증폭이 일어날 수 없다. 그러나 재배열된 B와 T 세포에서는 flanking primers가 VJ 또는 VDJ 재조합에 의해 서로 근접하게 되므로 그 사이에 존재하는 DNA를 성공적으로 증폭시킬 수 있다. TCR $\beta$  채 유전자는 배선에서 IgH 채 유전자와는 다소 다른 방법으로 재배열 되기는 하나 미분화된 피질 흉선세포에서 일어나는 재배열 양상은 동일하다<sup>15</sup>. TCR $\gamma$  유전자 및 IgH 유전자도 TCR $\beta$  유전자와 거의 동일한 양상으로 유전자 재배열이 일어난다<sup>9,14,15</sup>. 그 결과 B 세포에서는 complementarity-determining region III(CDR-III)로 명명되는 부위가 생긴다. IgH의 diversity region을 포함하는 이 부위는 심한 체세포 돌연변이에 의해 개개의 B 세포 클론에 특이한 DNA 배열순이 생긴다. 그러므로 유전자 재배열 결과 이들 병변들이 서로 근접하게 되므로 PCR로 재배열된 부위를 효과있게 증폭할 수가 있다. PCR에 의한 림프세포의 단일 클론은 동일한 크기의 증폭된 유전자 산물을 입증함으로써 규명할 수 있다<sup>8,9</sup>. 유전자 재배열 결과 재결합된 부위에서 무작위 양상으로 뉴클레오티드를 삽입하거나 결손시키기 때

문에 다클론성 B 세포군에서 증폭된 산물은 다른 크기의 올리고뉴클레오티드가 관찰된다. 그러나 단클론성 세포군에서는 다수의 동일한 크기의 올리고 뉴클레오티드가 생기므로 특정한 재배열을 관찰할 수가 있다. 이러한 올리고뉴클레오티드는 전기영동에 의해 뉴클레오티드의 크기를 분리시킴으로써 하나 또는 두개의 뚜렷한 띠(band)를 관찰함으로써 세포의 단클론성을 입증할 수가 있다. 다클론성 림프 세포인 경우엔 "smear" 또는 다수의 띠가 관찰된다<sup>8,9</sup>. 저자들은 PCR에 의한 유전자 재배열 검색을 각종 림프종증식성 질환에 시도함으로써 악성림프종과 백혈병의 분지계(lineage)와 클론성(clonality)을 밝힐 수가 있었다. 특히 면역글로브린 유전자 재배열 분석은 종래의 악성림프종을 진단하는 방법에 비해 여러가지 이점이 있는데, 즉 전체 세포의 약 1%에 해당하는 소수의 악성 림프세포도 인지할 수 있을 정도로 감수성이 높을 뿐만 아니라 세포표면 또는 세포질내에 존재하는 면역글로브린이 결여되어 면역표현형을 결정할 수 없는 경우에도 클론성의 면역글로브린 유전자 재배열로 B 림프세포 기원의 악성 종양의 단클론성을 입증할 수 있다<sup>1,3,4,6,9-12</sup>. IgH 유전자의 단클론성 재배열과는 대조적으로 TCR $\gamma$  유전자의 재배열은 분지계에 특이하지 않을 수가 있는데<sup>14,16,17</sup> B-급성 림프모 세포 백혈병의 약 75%, B-비호지킨 림프종의 약 5%에서 관찰될 수 있다. 본 연구에서도 위장에 발생한 B세포 림프종 1예에서 TCR $\gamma$  시발체에 단클론성 띠를 관찰할 수가 있었다. PCR의 효율성은 여러 인자에 의해서 영향 받을 수 있는데 시발체 농도나 annealing 온도, 완충액 성분, 사이클 회수 등이다. 그러므로 PCR 반응의 stringency에 변화가 있으면 agarose gel에서 PCR 산물을 전기 영동시 DNA 띠 모양에 영향을 미칠 수 있다<sup>18</sup>. PCR을 이용한 유전자 재배열 검색에서는 특히 시발체 선택이 가장 중요한데 SBH에서 단클론으로 인지될 수 있는 클론이 PCR 시행시 consensus 시발체로 증폭시킬 수 없는 경우가 있는데 이는 종양세포가 consensus 시발체와 효과적으로 anneal되지 않기 때문이다. 이러한 위음성의 빈도는 10% 미만에서 40%로 보고되고 있다<sup>9-12</sup>. 위음성의 원인에는 여러가지 이유가 있을 수 있는데<sup>10</sup> 첫째 항원 수용체 유전자의 불완전 재배열과 염색체 전위로 인하여 consensus V와 J 시발체가 가까이 근접하지 않게 되므로 그사이의 재배열된 DNA는 증폭시킬 수 없다. 두 번째는 특히 여포성 림프종과 같은 어떤 종류의 악성 림프종에서는 체세포 돌연변이가 쉽게 일어나서 올리고뉴클레오티드 시발체가 DNA와 보합 결합할

수 없기 때문이다. 셋째는 consensus 시발체, 특히 V region에 대한 consensus 시발체가 여러 종류의 V region 모두와 상보결합 하지 못하기 때문이다. 그러므로 PCR 결과가 음성이라고 해서 단클론성이 아니라고 할 수 없다. 본 실험에서도 PCR에 의한 유전자 재배열 검색상 PTCL 23예 중 9예에서 TCR $\gamma$  시발체로 증폭시킨 후 단클론성을 입증할 수 없었다. 또한 PCR은 너무 감수성이 높기 때문에 조직 소견상 악성 세포가 아니거나 면역표현형상 단클론성을 나타내지 않더라도 소수의 세포가 PCR에서 단클론성으로 인지될 수 있다. 특히 다수의 B세포 클론들이 CDR III 부위에 매우 유사한 수의 뉴클레오티드를 갖고 있기 때문에 PCR 산물을 전기 영동시 마치 단클론성의 띠처럼 뚜렷한 띠가 관찰될 수 있다<sup>19</sup>. 이런 경우 PCR 산물을 클로닝하여 염기서열 분석을 시행하였을 경우 서로 다른 클론이 혼합되어 관찰될 수 있다. 그러므로 전기영동에서 뚜렷한 띠가 관찰된다고 해서 항상 단클론성임을 나타내는 것은 아니며 염기서열 분석을 시행하는 것이 좋다<sup>20</sup>.

증합효소 연쇄 반응에 의한 유전자 재배열 검색은 다클론성 세포군에서 유래한 미만성의 증폭된 signal의 배경하에서 단클론성 세포군에서 기원한 뚜렷하게 증폭된 유전자의 signal을 관찰하는 것이다. 증폭된 DNA는 종양세포에 국한되어 일어나는 것이 아니고 단클론성과 다클론성의 B 또는 T 림프세포의 상대적인 수에 기초하는 것이므로 유전자 재배열 검사 결과는 조직학적 소견 및 면역 표현형과 연관지어 판독하여야 한다. PCR에 의한 유전자 재배열 검색은 악성림프종 진단시 조직학적 진단 및 면역표현형과 아울러 1차적인 진단방법으로 사용되어야 하고 SBH는 PCR로 DNA를 증폭시키지 못했을 경우, 또는 다량의 신선한 조직이 이용 가능할 때 시도하는 것이 좋으리라고 생각된다.

## 결 론

저자들은 IgH 유전자와 TCR $\gamma$  유전자의 V와 J region에 대한 consensus 시발체, 그리고 TCR $\beta$  유전자의 D1J2, D2J2 시발체를 사용하여 PCR에 의한 유전자 재배열 검색을 시행한 결과 Non-T Non-B 급성 림프모세포 백혈병 1예를 포함한 50예의 비호지킨 림프종중 43예(86%)에서 단클론성 띠를 관찰할 수가 있었다. 즉 말초 T-세포림프종 23예중 14예에서 TCR $\gamma$ 에 시발체에 400~500bp에서 단클론성 띠가 관찰되었다. TCR $\gamma$ 에 음성 반응을 보인 말초 T-세포림프종 9예중 7예에서 TCR $\beta$ 에 양성 반응을 보였다.

Non-T Non-B 급성 림프모세포 백혈병 1예가 TCR $\beta$  시발체로 증폭하여 단클론성의 띠가 관찰되었다. Non-T Non-B 급성 림프모세포 백혈병 1예를 포함한 24예의 말초 T-세포림프종 모두에서 IgH 시발체로 재배열된 단클론성 띠를 관찰할 수 없었다. 26예의 B세포 림프종중 21예에서 IgH에 유전자의 FR3A, LJH, VLJH 시발체에 100~120bp에서 단 클론성 띠가 관찰되었다. 호지킨 질환, 과립세포 육종, 그리고 자가면역 질환에서는 음성 반응을 보였다. 이상과 같은 소견을 종합하여 볼 때 PCR에 의한 유전자 재배열 분석은 악성 림프 증식성 질환의 단클론성을 규명하는데 진단병리 분야에서 간편하게 사용할 수 있는 보조 수단이라고 생각한다.

## 참 고 문 헌

1. Arnold A, Cossman J, Bakhshi A, Jaffe ES, Waldman TA, Korsmeyer SJ. Immunoglobulin gene rearrangement as unique clonal markers in human lymphoid neoplasms. *N Engl J Med* 1983; 309: 1593-9.
2. Bertness V, Kirsch I, Hollis G, Johnson B, Bunn PA. T-cell receptor gene rearrangements as clinical markers of human T-cell lymphomas. *N Engl J Med* 1985; 313: 534-8.
3. Cleary ML, Chao J, Warnke R, Sklar J. Immunoglobulin gene rearrangement as a diagnostic criterion of B-cell lymphoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 1984; 81: 593-7.
4. Cossman J, Uppenkamp M, Sundeen J, Coupland R, Raffeld M. Molecular genetics and the diagnosis of lymphoma. *Arch Pathol Lab Med* 1988; 112: 117-27.
5. Bourguin A, Tung R, Galili N, Sklar J. Rapid, non-radioactive detection of clonal T-cell receptor gene rearrangements in lymphoid neoplasms. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87: 8536-40.
6. Cossman J, Zehnbaueer B, Garrett CT, Smith LJ, Williams M, Jaffe ES, Hanson LO, Love J. Gene Rearrangements in the diagnosis of lymphoma/leukemia. *Am J Clin Pathol* 1991; 95: 347-54.
7. Southern EM. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol* 1975; 98: 503-17.
8. Mederios LJ, Weiss LM. The utility of the polymerase chain reaction as a screening method for the detection of antigen receptor gene rearrangements. *Hum Pathol* 1994; 25: 1261-3.
9. Reed TJ, Reid A, Wallberg K, O'Leary TJ, Frizzera

- G. Determination of B-cell clonality in paraffin embedded lymph nodes using the polymerase chain reaction. *Diag Mol Pathol* 1993; 2: 42-9.
10. Diss TC, Peng H, Wotherspoon AC, Isaacson PG, Pan L. Detection of monoclonality in low-grade B-cell lymphomas using the polymerase chain reaction is dependent on primer selection and lymphoma type. *J Pathol* 1993; 169: 291-5.
  11. Inghirami G, Szabolcs MJ, Yee HT, Corradini P, Cesaman E, Knowles DM. Detection of immunoglobulin gene rearrangement of B cell non-Hodgkin's lymphomas and leukemias in fresh, unfixed and formalin-fixed, paraffin-embedded tissue by polymerase chain reaction. *Lab Invest* 1993; 68: 746-57.
  12. Slack DN, McCarthy KP, Wiedemann LM, et al. Evaluation of sensitivity, specificity, and reproducibility of an optimized method for detecting clonal rearrangements of immunoglobulin and T-cell receptor genes in formalin-fixed, paraffin-embedded sections. *Diag Mol Pathol* 1993; 2: 223-32.
  13. McCarthy KP, Sloque JP, Kabarowski JHS, Matutes E, Wiedemann LM. The rapid detection of clonal T-cell proliferations in patients with lymphoid disorders. *Am J Pathol* 1991; 138: 821-8.
  14. Trainor KJ, Brisco MJ, Wan JH, Neoh S, Grist S, Morley AA. Gene Rearrangement in B-and T-lymphoproliferative disease detected by the polymerase chain reaction. *Blood* 1992; 78: 192-6.
  15. Waldmann TA: The arrangement of immunoglobulin and T cell receptor genes in human lymphoproliferative disorders. *Adv Immunol* 1987; 40: 247-321.
  16. Greenberg JM, Quertermous T, Scidman JG, Kersey JH. Human T cell  $\gamma$ -chain gene rearrangements in acute lymphoid and nonlymphoid leukemia: Comparison with the T cell receptor  $\beta$ -chain gene. *J Immunol* 1986; 137: 2043-9.
  17. Asou N, Matsuoka M, Hattori T, Kawano F, Maeda S, Shimada K, Takatsuki K. T cell  $\gamma$  gene rearrangements in hematologic neoplasms. *Blood* 1987; 69: 968-70.
  18. Fey MF, Kulozik AE, Hansen-Hagge TE, Tobler A. The polymerase chain reaction: A new tool for the detection of minimal residual disease in haematological malignancies. *Eur J Cancer* 1991; 27: 89-94.
  19. Trainor KJ, Brisco MJ, Story CJ, Morley AA. Monoclonality in B-lymphoproliferative disorders detected at the DNA level. *Blood* 1990; 75: 2220-2.
  20. Corradini P, Boccadoro M, Pileri A. Analysis of immunoglobulin heavy chain gene rearrangement using the polymerase chain reaction. *Blood* 1992; 79: 291-2.
-