

Epstein-Barr Virus에 의하여 불멸화를 초래한 인체 B-세포주의 특성

조선대학교 의과대학 병리학교실, 이비인후과학교실¹ 및 치료방사선과²

전 호 종 · 최 봉 남¹ · 오 윤 경²

Characteristics of the Immortalized Human B-cells by Epstein-Barr Virus

Ho Jong Jeon, M.D., Bong Nam Choi, M.D.¹ and Yoon Kyeong Oh, M.D.²

Department of Pathology, Otolaryngology¹ and Therapeutic Radiology²,
Chosun University Medical School, Kwangju, Korea

Human lymphoblastoid B-cell lines immortalized by Epstein-Barr virus (EBV) were established from peripheral blood of patients with acute myeloblastic and chronic lymphocytic leukemia and chronic fatigue syndrome. The sera of patients with acute myeloblastic and chronic lymphocytic leukemia did not show antibodies to Epstein-Barr viral capsid antigen (VCA), but serum of a patient with chronic fatigue syndrome disclosed antibodies to VCA (IgG, IgM), and EBNA was demonstrated in peripheral blood mononuclear cells by polymerase chain reaction. The established cell lines were mature B-cell phenotypes with polyclonal proliferation in early passage and no evidence for commitment to other lineages. The immortalized cells by EBV were designated as CSUP-1 and CSUP-2 (from acute myeloblastic leukemia, FAB classification M2 and M1), CSUP-3 (from chronic lymphocytic leukemia) and CSUP-4 (from a patient with chronic fatigue syndrome). The CSUP-1, 2, 3, and 4 grew in suspension forming clumps with a doubling time of 38 to 49 hours. Colony formation was not recognized in plate. By light and electron microscopic examination, the immortalized cells showed features of lymphoblastoid to plasmacytoid lymphocytes, and multinucleated giant cells. The lymphoblastoid cells showed scanty cytoplasm with poorly developed organelles. Immunophenotypic analyses of CSUP-1, 2, 3, and 4 with monoclonal antibodies by flow cytometry showed B-cell phenotype with polyclonal proliferation in early passage. Epstein-Barr virus nuclear antigen was confirmed in the extracted DNAs from immortalized cells by polymerase chain reaction. DNA analysis showed a non-modiploid stemline with a DNA index of 1.12. The established cells were strongly reactive for CD10, CD30 (Ki-1) in early passage, and bcl-2 and c-myc onco-protein in early and late passage. Karyotypic analysis of CSUP-1, 2, 3 and 4 showed 46, XY or 46, XX. No tumorigenesis in heterotransplanted SCID mouse was recognized. This immortalized cells by EBV should be a

접 수: 1997년 4월 7일, 게재승인: 1997년 6월 24일

주 소: 광주시 동구 서석동 588번지, 우편번호 501-140

조선대학교 부속병원 해부병리과, 전호종

ISSN : 0379-1149

이 논문은 1996년도 조선대학교 학술연구비의 지원을 받아 연구되었음.

valuable cell lines to study the pathogenesis of EBV-related malignant lymphoma. (Korean J Pathol 1997; 31: 832~846)

Key Words: Lymphoblastoid-B cell line, Epstein-Barr virus, Polyclonal and monoclonal proliferation, PCR, Flow cytometry

서 론

인체에서 악성 종양을 유발할 수 있는 병인중 현재까지 알려진 요인으로서는 다양한 화학적 암유발물질 (chemical carcinogen)과 방사선의 노출 그리고 종양을 유발할 수 있는 바이러스 (oncogenic virus)등이 있다. 이들 요인중 악성 림프종을 유발할 수 있는 바이러스는 RNA retrovirus의 일종인 Human T-cell leukemia virus type I (HTLV-I)이 성인 T 세포 백혈병/림프종 (adult T-cell leukemia/lymphoma: ATL)환자의 종양세포에서 검출됨으로서 ATL의 발병에 HTLV-I이 관계한다는 사실이 증명되었다¹. 또한 HTLV-II가 비정형 hairy cell 백혈병환자에서 검출되었으며², gamma group herpesvirus의 일종인 Epstein-Barr Virus (EBV)가 아프리카형의 Burkitt림프종과^{3,4} 일부 Hodgkin병⁵ 그리고 Human Immunodeficiency Virus (HIV)감염에 따른 면역 결핍상태시에 발생하는 악성 림프종과⁶ 장기 이식후 발생하는 악성 림프종⁷에서 EBV의 게놈이 관찰됨으로서 이들 악성 림프종의 발병에 EBV가 연관되어 있음을 강하게 시사해 주고 있다. 또한 중국 남부지역에서 흔하게 발생하는 상인두 (비인두)의 암종에서도 EBV의 게놈이 관찰됨으로서 이들 상인두 암종의 발생에 EBV가 관여하고 있음이 확인되었다⁸. 최근에는 위암종^{9,10}, natural killer (NK)세포 백혈병¹¹⁻¹³, T세포 림프종¹⁴⁻¹⁶, T/NK세포 림프종의 종양세포에서도 EBV 게놈이 관찰됨으로서¹⁷ 종양발생에 관한 EBV의 역할에 대하여 광범위한 연구가 이루어 지고 있다.

EBV는 인체내에서 중인두, 상인두 및 침샘의 상피세포 세포막에 존재하는 수용체 (CD21)와 직접 결합함으로써 세포질내에 감염을 초래한 후 이들 조직에 상응하는 림프조직으로 확산하는데 특히 B 림프구에 감염을 초래한다. B 림프구의 감염은 B 림프구의 세포표면 (endosomal membrane)에 존재하는 CD21 단백 (보체 C3d 수용체인 CR2^{18,19})과 EBV의 envelope glycoprotein (gp140)이 결합하여 B 림프

구에 감염을 초래한다²⁰. CR2는 145,000-Mw glycoprotein으로서²⁰⁻²² B 림프구의 세포표면에서 관찰되는 EBV의 수용체이며 이들 수용체는 B 림프구 이외에도 상인두와 중인두의 상피세포²³, T-lymphoblastoid cell line인 Molt4^{20,24} 이외에 follicular dendritic cells²⁵, histiocytosis X 세포²⁶에서 관찰된다고 알려져 있다. EBV에 감염된 B 림프구의 극히 일부는 감염 후 용해됨으로서 virion을 배출하여 중인두의 상피세포에 재감염을 초래하기도 하는데 이 경우에는 임상적 증상이 현저하지 않은 productive 감염이 된다. 한편으로 감염된 B 림프구의 대다수는 EBV의 viral DNA가 B 림프구의 genome에 통합 (integration)하여 연관성을 갖은 후 latent 감염을 초래하여 다클론성 활성화 (polyclonal activation)를 나타내는데 여기에는 EBNA2와 LMP-1과 같은 EBV관련 단백질이 관여한다고 알려져 있으며²⁷ 실제로 in vitro 에서 B 림프구에 EBV를 감염시키면 B 림프구는 불멸화를 초래하는 lymphoblastoid B-cell line이 수립되기도 한다²⁸.

저자는 in vivo에서 EBV의 감염이 혈청학적으로 증명되지 않은 급성 골수성 백혈병과 만성 림프구성 백혈병 환자의 혈액으로 부터 종양세포주 수립을 위하여 골수성 백혈병 세포와 림프구성 백혈병 세포를 배양하는 과정에서 EBV의 감염에 의한 B 림프구의 불멸화 (immortalization)를 초래한 세포를 관찰하였고, in vivo에서 EBV의 감염이 증명된 만성 피로 증후군 (chronic fatigue syndrome)환자의 혈액으로부터 림프구를 분리하여 배양하는 과정에서 B 림프구의 불멸화가 초래된 세포들로부터 몇가지 특성을 관찰하였기에 이에 보고하고자 한다.

연구재료 및 방법

1. 연구재료

세포배양을 위한 환자중 급성 골수성 백혈병 환자는 38세 남자로서 FAB분류상 M2형이었고 다른 한예는 26세 여자 환자로서 M1형이었다. 만성 골수성 백혈병환자는 67세의 남성으로서 전신에 림프절

증을 나타냈으며 이들 림프절은 병리조직학적으로 low grade의 미만성 소 림프구성 림프종의 소견을 보였다. 이들 환자들의 혈청을 이용한 혈청학적 검사상 EBV의 viral capsid antigen (VCA)에 대한 항체 검사는 음성이었다. 종양세포를 포함한 단핵세포의 분리는 말초혈액 10 ml를 채취하여 Ficoll-Hypaque (Histopaque-1077, Sigma)를 이용하여 분리하였다. 분리한 단핵세포는 RPMI1640 (Gibco, Grand, Island, NY, USA)배지로 2회 씻은 후 56°C에서 열처리한 fetal bovine serum (FBS, Gibco, BRL)을 10%되게 첨가한 후 여기에 100 units/ml의 penicillin G, 10 µg/ml의 streptomycin, 250 ng/ml의 amphotericin B를 첨가하여 25 cm²의 배양용기 (Falcon, Becton-Dickinson, New Jersey, USA)에 4×10⁷개의 세포밀도가 되게 하여 36.5°C의 7.5% CO₂배양기에서 배양하였다.

만성 피로 증후군을 나타낸 환자는 24세의 미혼 남성으로서 미열, 식욕감퇴등의 전신 쇠약감을 약 2년간 호소하였으며 신체 이학적 검사나 혈청학적 검사 및 방사선학적 검사상 특이 소견은 없었으나 EBV의 VCA에 대한 IgG, IgM이 양성반응을 보였으며 말초혈액의 림프구 증식은 관찰되지 않았다. 간생검상 림프구의 침윤이 portal triad 및 hepatic sinusoid에서 관찰되었으며 말초혈액에서는 비정형 림프구가 관찰되었다. 이 환자의 혈액 30 ml를 채취한 후 Ficoll-Hypaque를 이용하여 상기한 방법에 따라서 림프구를 분리하였으며, 4×10⁶개의 세포밀도로 배양하였다. 배양액은 일주일에 2회 교환하였다.

2. 연구방법

1) **형태학적 검색:** 광학현미경 검색을 위하여 세포가 수립된 후 autospread (Sakura, Tokyo, Japan)를 이용하여 유리슬라이드 위에 세포를 준비한 후 실온에서 아세톤에 10분간 고정하여 Wright염색을 하여 형태를 검색하였다. 전자현미경적 검색을 위하여 수립된 세포는 원심분리관을 이용하여 2500 rpm으로 15분간 원심분리하여 pellet을 만든 후 phosphate buffered saline (PBS)으로 제작한 4°C의 3% glutaraldehyde용액에서 24시간 동안 일차 고정 후 4°C의 1% osmium tetroxide에서 1시간 동안 이차고정하여 계열별 알코올로 탈수시킨 후 epoxy resin에 포매하여 초박절편을 제작한 후 uranyl acetate와 lead citrate로 이중 염색하여 JEM 2000FXII를 이용하여 검색하였다.

2) **세포주의 면역표현형 (Immunophenotype):** 수립된 세포주에 대한 면역표현형의 검색은 autospread를 이용하여 유리슬라이드 위에 세포를 준비하여 아세

톤에서 10분 동안 실온에서 고정한 후 horseradish peroxidase (HRP)를 이용한 ABC법을 사용하여 면역세포 화학적 염색을 실시하여 검색하였다. 수립된 세포주의 세포표면과 세포질에 있는 항원성 물질의 검색에 대한 보다 정확한 양성률을 검색하기 위하여 유세포계측기를 이용하였다. 유세포검색을 위하여 10⁶개의 세포를 4°C의 PBS로 2회 씻은 후 FITC 또는 PE가 부착된 단클론 항체와 4°C에서 1시간 동안 반응시킨 후 FACScan과 FACSCalibur (Becton-Dickinson, USA)를 이용하여 검색하였다.

본 검색에서 사용된 단클론항체는 CD3, CD4, CD5, CD8, CD10, CD11c, CD13, CD14, CD16, CD19, CD21, CD33, CD56등이었으며 이들 일차항체의 설명은 Table 1에 요약하였다.

3) **면역글로부린의 검색:** 수립된 세포주의 단클론성 또는 다클론성을 검색하기 위하여 세포의 표면에 존재하는 면역글로부린 (surface Ig: sIg)과 세포질내 면역글로부린 (cytoplasmic Ig: cIg)을 FITC-conjugated IgG와 PE-conjugated IgM 그리고 FITC-conjugated kappa 경쇄와 PE-conjugated lambda 경쇄를 이용하여 검색하였다. 세포질내 면역글로부린을 검색하기 위하여 수립된 세포 10⁶개를 4°C의 0.25% saponin (Sigma)과 1% paraformaldehyde의 PBS용액에서 5분 동안 고정한 후 PBS에서 2회 씻은 후 FACScan과 FACSCalibur를 이용하여 검색하였다.

4) **Plating Efficiency (PE):** 세포의 집락 (colony)형성능력을 검사하기 위하여 세포주가 수립된 후 20% FBS가 함유된 0.33% 한천배지 (Bio-Rad)를 35 mm 페트리접시 (Falcon, USA)에 넣은 후 cm²당 20개의 세포를 심어 36.5°C의 7.5% CO₂배양기에 배양하였다. 2주 후 형성된 집락수를 검사하여 심은 세포수로 집락수를 나눈 후 100을 곱하여 PE를 산출하였다.

5) **Epstein-Barr Virus 검색:** Epstein-Barr Virus Nuclear Antigen (EBNA)의 검출은 중합효소 연쇄반응 (polymerase chain reaction, PCR)을 이용하여 검색하였다. PCR반응 혼합액은 수립된 세포주에서 검출한 DNA 1 µg과 50pM의 oligonucleotide primer 1, 2와 200 mM의 4 dNTP (Boehringer Mannheim, Germany), 10× reaction buffer (USB, Amersham, USA), 1.5 mM MgCl₂ (USB, Amersham, USA), 2.5 Unit Taq polymerase (USB, Amersham, USA)와 170 µg/ml의 bovine serum albumin (Janssen, Belgium)으로 제작하여 250 µl의 eppendorf tube에 넣은 후 100 µl의 mineral oil (Sigma)을 첨가하여 DNA Thermal Cycler (UNO-Thermoblock, Biometra, Germany)에서 30cycle을 증폭시켰다. 처음 29 cycle은 변성은 90°C에서 60초, annealing은

Table 1. Primary antibodies used in this study

Marker	CD	Specificity	Working dilution	Commercial source
B-cells				
CALLA	CD10	pre-B cell subset	1 : 30	Dako
Leu 16	CD19	precursor B and B cells	1 : 20	BD
	CD20	mature B cells	1 : 20	Dako
	CD21	precursor and mature B cells	1 : 50	Dako
T-cells				
Leu 4	CD3	pan T cells	1 : 20	BD
Leu 3a	CD4	Helper/inducer T cells	1 : 20	BD
Leu 1	CD5	Mature T cells, thymocytes	1 : 50	BD
Leu 2a	CD8	Cytotoxic/suppressor T cells	1 : 20	BD
Monocyte/macrophage				
Leu M5	CD11c	Monocytes, granulocytes	1 : 1	BD
Leu M3	CD14	Monocytes, macrophages, granulocytes, dendritic cells	1 : 20	BD
NK-cells				
Leu 11b	CD16	Fc- γ RIIIA/Fc- γ RIIIB	1 : 20	BD
Leu 19	CD56	NK cells, some T cells	1 : 50	BD
Myeloid				
My 7 (g-1)	CD13	Myeloid cells	1 : 50	Dako
Leu M9	CD33	Pan myeloid, monocytic cells	1 : 20	BD
Surface Ig				
IgM	anti-human surface IgM		1 : 10	BD
IgG	anti-human surface IgG		1 : 10	BD
kappa	anti-human kappa light chain		1 : 10	BD
lambda	anti-human lambda light chain		1 : 10	BD

PB: peripheral blood

45°C에서 120초, elongation은 63°C에서 120초 이었으며 마지막 cycle의 postelongation은 63°C에서 420초를 시행하였다. oligonucleotide primer는 EBNA-2A Bam hY 분절과 (5' oligo: 5'CCA CCA GCA GCA CCA GCA CA 3', 3'oligo: 5' GGT GGC CAC CAT GGT GGC CC 3'), BNF1 (5'oligo: 5'GGT AGG TCC CCT GGA CCT GCC GCT3', 3'oligo: 5'CCC TCC CTC AGG TCC AAC GAC ACT3')이었다. 양성 대조군은 Raji세포주와 PTLC-1세포주²⁸를 이용하였으며 음성 대조군으로서는 HTLV-1감염세포주인 JP-1 세포주²⁹를 이용하였다. 증폭된 PCR생성 용액 18 ml를 3% Nuisieve/1% Seakem 한천 (FMC, US)에서 분자량 표식자, ϕ ×174RF DNA/Hae III fragment (Gibco)을 이용하여 전기영동한후 ethidium bromide를 이용하여 염색한 다음 자외선등 (UV/DNA, photographic

system SLIII, Vilber Lourmat, TFP-20M, France)에서 검색하였다.

6) **bcl-2 및 c-myc종양 단백 검출:** bcl-2 및 c-myc 종양단백의 검출을 위하여 수립된 세포 10⁶개를 4°C의 0.25% saponin과 1% paraformaldehyde의 PBS용액에서 5분간 고정한 후 PBS에서 2회 씻은 후 bcl-2종양단백 (Dako)과 c-myc 종양단백 (Oncogene science)을 4°C에서 1시간동안 반응시킨 후 FITC-conjugated goat antimouse IgG (BioSource)와 4°C에서 1시간동안 반응시켜 FACScan을 이용하여 양성률을 검색하였다.

7) **DNA index와 Parameter:** DNA분석을 위하여 수립된 세포 10⁶개를 PBS에서 2회 씻은 다음 4°C의 100% ethanol에서 30분간 고정한 후 37°C에서 40분간 RNase로 처리하고 propidium iodide (50 mg/ml)로 염색하여 cell cycle과 DNA index에 관하여 FACScan

을 이용하여 검색하였으며 대조군으로서는 닭의 백혈구를 사용하였다.

8) **염색체 검사:** 수립된 세포의 염색체 검사는 Giemsa 염색을 사용하여 염색체의 수를 분석하였다. 이들 수립된 세포는 log-phase 성장기에 colcemid 0.05 $\mu\text{g/ml}$ 를 넣은 후 1시간이 경과한 다음 0.075 mol/l의 potassium chloride에 incubation한 다음 메탄올 (3)/빙초산 (1)에서 3회 고정한 후 50% 에탄올로 깨끗하게 처리한 슬라이드 위에 떨어뜨린 후 Giemsa 염색을 시행하여 염색체의 숫자를 검색하였다.

9) **DNA 유출과 면역글로부린 중쇄에 대한 Southern blot hybridization:**

(1) **DNA 유출:** 수립된 세포로부터의 고분자 genomic DNA를 유출하였다. DNA의 분리는 TE buffer (10 mM EDTA) 5 ml에, proteinase K (최종농도, 20 $\mu\text{g/TE buffer 1 ml}$)와 RNase (최종농도, 5 $\mu\text{g/TE buffer 1 ml}$) 그리고 SDS (최종농도, 0.5%)를 첨가하여 37°C에서 24시간 동안 반응시킨 후 phenol, phenol (24): chloroform (1): isoamylalcohol (25)로 각각 처리하여 단백질을 제거하였다. 불순물이 제거된 상층액에 상층액의 1/10에 해당하는 3 M sodium acetate와 2배량의 100% 에탄올로 DNA를 침전시킨 후 침전된 DNA를 70% 에탄올에 옮긴 후 침전시킨 다음 실온에서 건조시켰다. TE (Tris 10 mM, EDTA 1 mM) 완충액에 DNA를 녹인 후 DNA의 순도와 농도를 UV spectrophotometer (Kontron Co, Japan) 흡광도 260 nm와 280 nm에서 측정하여 순수도를 결정한 다음 DNA의 농도를 측정하여 사용하였다.

(2) **전기영동:** 검체 DNA 10 μg 를 취하여 EcoRI (4 unit/DNA 1 μg , BM)과 Hind III (4 unit/DNA 1 μg , BM) 효소로 37°C에서 10시간 동안 반응시킨 후 총량의 1/10에 해당하는 3 M sodium acetate와 2배량에 해당되는 100% 에탄올로 DNA를 침전시킨 후 -80°C에서 1시간 동안 방치하였다. 12,000 rpm에서 10분간 원심분리 한 후 침전된 DNA를 70% 에탄올에 옮겨 12,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 침전시킨 다음 상층액은 버리고 실온에서 건조시켰다. TE (Tris 10 mM, EDTA 1 mM) 완충액 10 ml에 DNA를 녹인 후 수평형의 전기영동장치 (Bio-Rad)를 이용하여 0.8% agarose gel에서 전기영동하였고 ethidium bromide (10 mg/ml)를 첨가하여 DNA의 존재를 확인하였다. 분자량 표지자는 λ DNA/Hind III (BRL)를 사용하였다. 전기영동이 끝난 후 agarose gel내에 포함되어 있는 DNA는 Hybond H+ membrane (Amersham)에 paper towel법을 이용하여 nylon membrane에 옮겼다.

(3) **DNA probe:** 본 연구에 사용된 DNA probe인

JH (Immunoglobulin heavy chain joining region gene, 5.6 kb fragment)는 Oncor (USA) 제품을 사용하였다.

(4) **Probe DNA의 ^{32}P -labelling 제작:** DNA probe 50 ng (2 μl)과 λ DNA/Hind III 500 pg (1 μl)과 증류수 24 μl 를 혼합하여 100°C에서 4분 30초 동안 반응시킨 후 즉시 얼음속에 넣어 4분 30초 동안 식혔다. 여기에 megaprime DNA labelling kit (Amersham)를 첨가하여 ^{32}P -dCTP를 DNA probe에 labelling시켰다.

제작 방법은 primer 10 μl , labelling buffer 5 μl , ^{32}P -dCTP 5 μl 와 DNA polymerase (Klenow enzyme) 3 μl 를 혼합하여 37°C에서 4시간 동안 반응시킨 다음 4M ammonium acetate 50 μl 와 2배량의 100% 에탄올을 첨가하여 probe DNA의 침전을 유도한 후 -80°C에서 1시간 동안 방치하였다. 12,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 상층액은 버리고 여기에 TE 완충액 50 μl 를 넣어 실온에서 1시간 정도 방치한 후 100°C에서 4분 30초 동안 반응시켜 즉시 얼음속에 넣어 4분 30초 동안 식혀 이를 사용하였다.

(5) **Southern blot hybridization;** nylon membrane을 45°C의 prehybridization buffer (500 μl of 10 mg/ml sheared DNA, Oncor) 10 ml에서 4시간 동안 반응시킨 후 ^{32}P -labelled JH probe DNA를 넣어 45°C에서 18시간 동안 반응시킨 후 세척한 다음 자가방사기록 (autoradiography)하였다.

10) **종양형성능력의 검색:** 이들 수립된 세포의 종양형성능력을 확인하기 위하여 각 세포주에 따라서 4마리의 4주령 숫컷 SCID mouse (Fox Chase SCIDTM, C.B.-17/1cr Crl-SCID, Charles River, USA)의 복강내에 $5 \times 10^6/0.1\text{ml}$ PBS 세포를 이식한 후 pathogen free 환경에서 키우다가 이식 후 약 3개월째 도살하여 종양형성의 유무를 확인하였다.

결 과

1. 세포의 불멸화에 의한 세포주 수립

1) **FAB분류상 M2형인 급성 골수성 백혈병 환자:** 말초혈액의 단핵구 세포를 채취하여 배양을 시작한 후 68일 (M2형)이 경과한 후 부터 육안적으로는 관찰이 불가능하나 inverted 현미경으로 관찰이 가능한 극히 적은 집락의 형성이 관찰되었다. 골수성 백혈병의 종양세포는 사멸하였다. 관찰된 집락은 점차 그 크기와 숫자가 증가하고 세포의 증식은 clump를 형성하면서 증식하였다. 이들 clump 주변에는 크기가 정상 림프구에 비하여 매우 큰 개개의 세포가 관찰되었다. 계대배양은 배양을 시작한 후 80일째에 시행하였다. 계대배양을 시작한 후 세포는 매우 빠

른 속도로 지속적인 증식을 보였으며 세포수의 2배 증가에 걸리는 배가시간은 38시간이었으며 이세포를 CSUP-1이라고 명명하였다.

2) FAB분류상 M1형인 급성 골수성 백혈병 환자: 배양을 시작한 후 73일째 부터 집락형성이 현미경적으로 관찰되었으며 골수성 백혈병의 세포는 사멸하였다. 처음 계대배양은 배양을 시작한 후 97일째에 시행하였으며 세포의 배가시간은 49시간이었다. 이세포를 CSUP-2이라고 명명하였다.

3) 만성 림프구성 백혈병 환자: 말초혈액을 사용하여 배양을 시작한 후 58일째부터 집락의 형성이 관찰되었다. 종양성 림프구는 배양을 시작한 시간으로부터 매우 빠른속도로 사멸하였다. 처음 계대배양은 배양을 시작한 후 3개월째에 시행하였으며 세포의 배가시간은 46시간이었다. 이세포는 CSUP-3이라고 명명하였다.

4) EBV의 VCA IgG와 IgM에 양성반응을 보인 만성 피로증후군 환자: 말초혈액으로 부터 림프구를 선별하여 배양한 결과 림프구는 2주 후부터 빠른속도로 증식하였다. 처음 계대배양은 배양을 시작한 후 17일째에 시행하였으며 세포의 배가시간은 39시간이었다. 이세포는 CSUP-4라고 명명하였다.

2. Epstein-Barr Virus의 검색결과

EBV의 primer인 B NRF1과 EBNA-2A를 이용하여 PCR의 방법으로 검색한 결과 수립된 세포주인 CUSP-1, -2, -3, -4에서 B NRF1은 225bp에서 EBNA-2A는 89bp에서 그 band가 확인되었다 (Fig. 1, 2).

3. 세포의 면역표현형 검사결과

모든 세포는 B-cell lineage이었으며 CD20에 대하여는 90~95%의 양성률을 보였으나 CD19항원은 5%~67%의 양성률을 보여 부분적인 소실이 관찰되었다. T-cell lineage 표식자 (CD3)나 myeloid-cell lineage 및 단핵구/NK세포의 표식자에 대하여는 음성반응을 나타냈다. 특이한 사항은 EBV의 수용체에 대한 항-CD21항체에 대한 검색결과 5% 미만에서 양성률을 보였다. 또한 CD10은 초기배양에서 19%~49%까지 다양한 양성률을 보였으나 후기 배양에서는 완전히 소실되었다 (Table 2).

4. 면역글로부린의 검색결과

세포주의 면역글로부린에 대한 초기 (4~7 passage) 검색결과 세포질과 세포막에서 IgG는 98% 이상에서

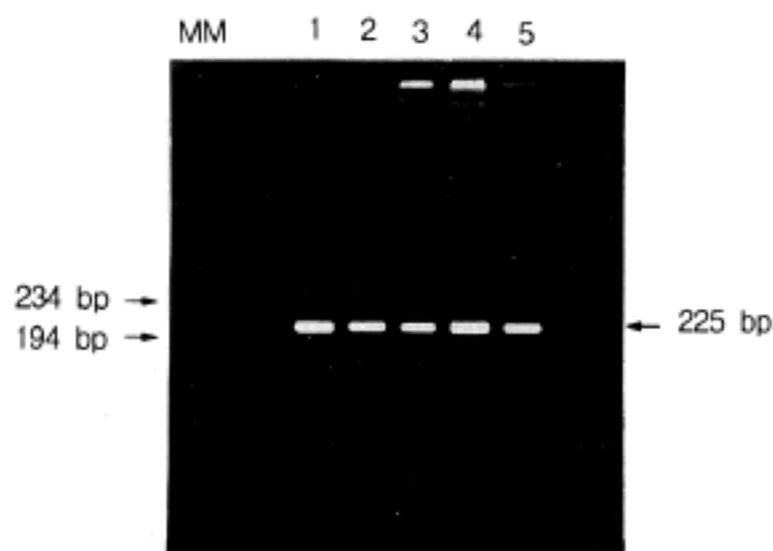


Fig. 1. Amplified DNA products from cells immortalized by Epstein-Barr virus showed fragment of 225 bp of B NRF1 fragment of Epstein-Barr Virus.

Lane 1: Positive control (DNA from Raji cell line); lane 2: DNA from immortalized cells by EBV in acute myeloblastic leukemia, FAB M2 type (CSUP-1); lane 3: DNA from immortalized cells by EBV in acute myeloblastic leukemia, FAB M1 type (CSUP-2); lane 4: DNA from cells of chronic lymphocytic leukemia (CSUP-3); lane 5: DNA from immortalized cells by EBV in chronic fatigue syndrome (CSUP-4).

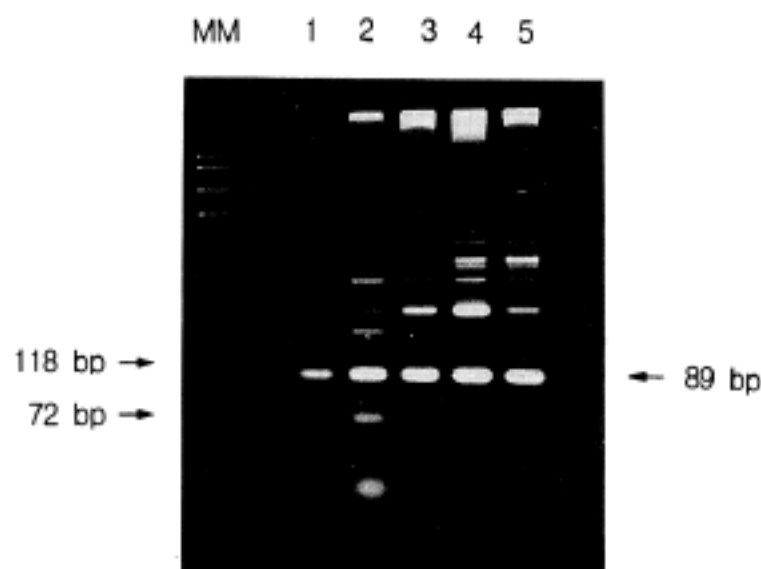


Fig. 2. Amplified DNA products from cells immortalized by Epstein-Barr virus showed fragment of 89 bp of EBNA-2A Bam hY fragment of Epstein-Barr virus.

Lane 1: Positive control (DNA from Raji cell line); lane 2: DNA from immortalized cells by EBV in acute myeloblastic leukemia, FAB M2 type (CSUP-1); lane 3: DNA from immortalized cells by EBV in acute myeloblastic leukemia, FAB M1 type (CSUP-2); lane 4: DNA from cells of chronic lymphocytic leukemia (CSUP3); lane 5: DNA from immortalized cells by EBV in chronic fatigue syndrome (CSUP-4).

Table 2. Marker studies of immortalized cells by Epstein-Barr Virus from acute myeloblastic leukemia (M1: CSUP-1 and M2: CSUP-2), chronic lymphocytic leukemia (CSUP-3) and chronic fatigue syndrome (CSUP-4)

Marker	CD	Early passage (4~7 passage)				Late passage (>50 passage)			
		Immortalized cells by EBV							
		CUSP -1(%)	CUSP -2(%)	CUSP -3(%)	CUSP -4(%)	CUSP -1(%)	CUSP -2(%)	CUSP -3(%)	CUSP -4(%)
B-cells									
CALLA	CD10	34.6	18.9	48.9	39.2	0	0	0	0
Leu 16	CD19	4.9	67.8	10.8	11.5	31	73	70	19
	CD20	92	95	92	90	89	96	94	91
	CD21	1.9	2.9	4.8	1.8	1.2	0.3	4.5	1.5
T-cells									
Leu 4	CD3		less than 1%				less than 1%		
Leu 3a	CD4		less than 1%				less than 1%		
Leu 1	CD5		less than 1%				less than 1%		
Leu 2a	CD8		less than 1%				less than 1%		
Monocyte/macrophage									
Leu M5	CD11c		less than 1%				less than 1%		
Leu M3	CD14		less than 1%				less than 1%		
NK-cells									
Leu 11b	CD16		less than 1%				less than 1%		
Leu 19	CD56		less than 1%				less than 1%		
Myeloid									
My 7(g-1)	CD13		less than 1%				less than 1%		
Leu M9	CD33		less than 1%				less than 1%		
Surface Ig									
IgM		94	97	92	90	43	41	0	48
IgG		98	97	90	92	7	3	14	48
kappa		49	29	29	19	28	1	0	5
lambda		18	69	68	49	3	80	14	52

PB: peripheral blood

그리고 IgM은 97% 이상에서 양성반응을 보였으며 kappa경쇄는 28~32%에서, lambda경쇄는 68~72%에서 양성물을 보여 다클론성 증식 (polyclonal proliferation)을 나타냈다 (Table 2). 그러나 50 passage가 경과한 후 이들 세포의 면역 글로부린의 발현양상은 CUSP-1, CUSP-2, CUSP-3에서 단클론성 증식 (monoclonal proliferation) 소견을 나타내 보였으며 CUSP-4에서는 oligoclonal proliferation이 관찰되었다 (Fig. 3). 또한 면역글로부린의 발현은 세포의 크기에 따라서 약간의 차이가 관찰되었다 (Fig. 4)

5. B-세포 유전자 (면역글로부린 중쇄, JH)에 대한 Southern blot hybridization 결과

11 kb에서 germline만 관찰되었고 재배열된 bands는 관찰되지 않았다.

6. 형태학적 특징

광학현미경적 검색상 수립된 세포는 정상 림프구에 비하여 크기가 크고 세포질의 양이 비교적 풍부한 세포이었으며 핵소체가 뚜렷하였다.

전자현미경 검색상 세포는 림프구로 분화가 빈약한 세포 (Fig. 5)로 부터 비교적 분화가 좋은 형질세포양 림프구 (Fig. 6)까지 다양하였다. 림프구모세포

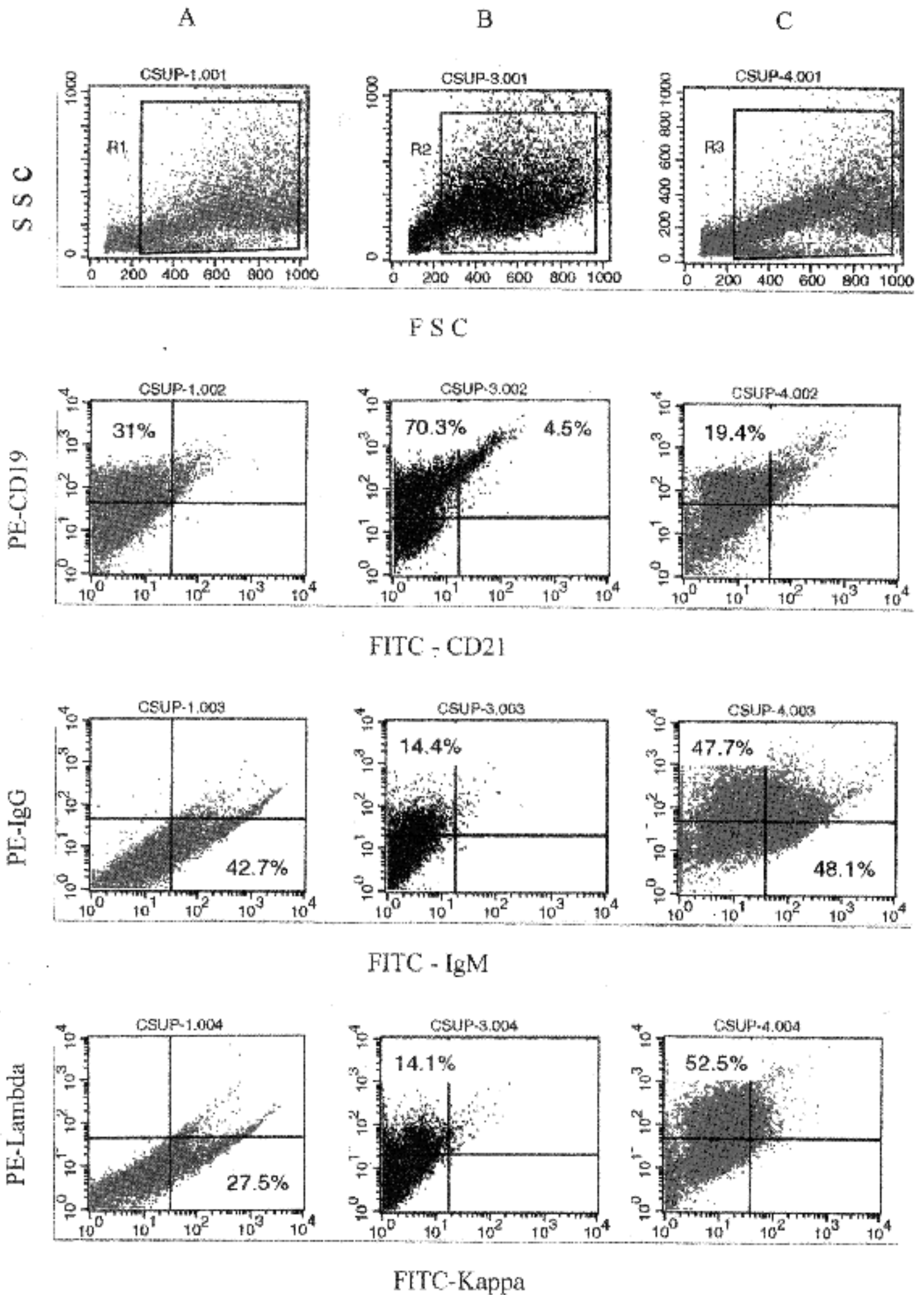


Fig. 3. Flow cytometric analysis of immunophenotype of CUSP-1, CUSP-3 and, CUSP-4 showed decreased expression of CD19 and CD21. The monoclonalities were observed in CUSP-1, CUSP-3 and CUSP-4. CUSP-3 and CUSP-4 showed lambda light chain restriction, whereas CUSP-1 showed kappa light chain restriction. The surface IgG and IgM was observed in CUSP-4.

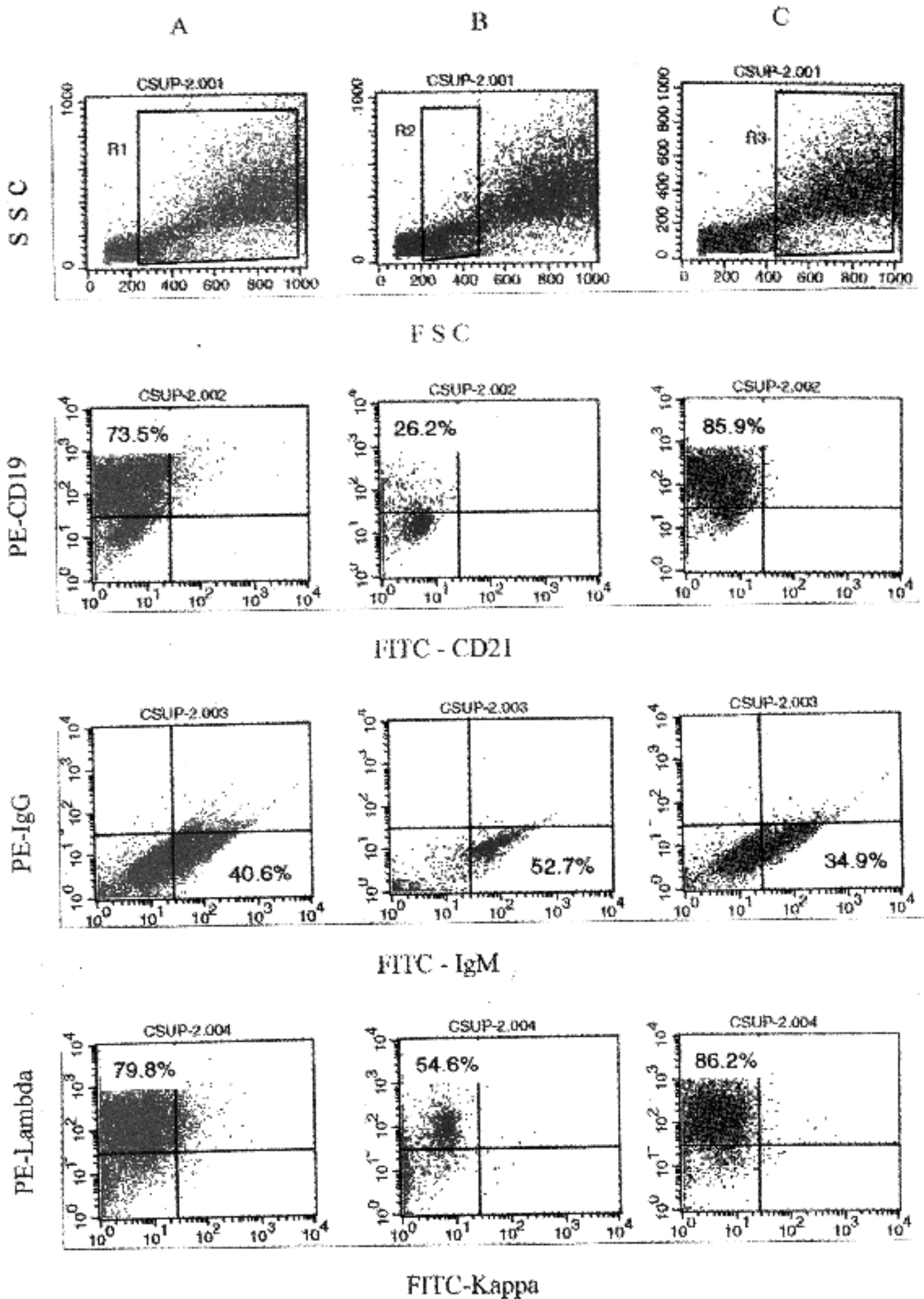


Fig. 4. Flow cytometric analysis of the CUSP-2 showed monoclonality showing lambda light chain restriction. There is some variations of expression patterns in CD19, IgM and lambda light chain. The large size cells of the CUSP-2 showed 86.2% reactivity of lambda light chain, but the small size cells showed 52.7% reactivity.

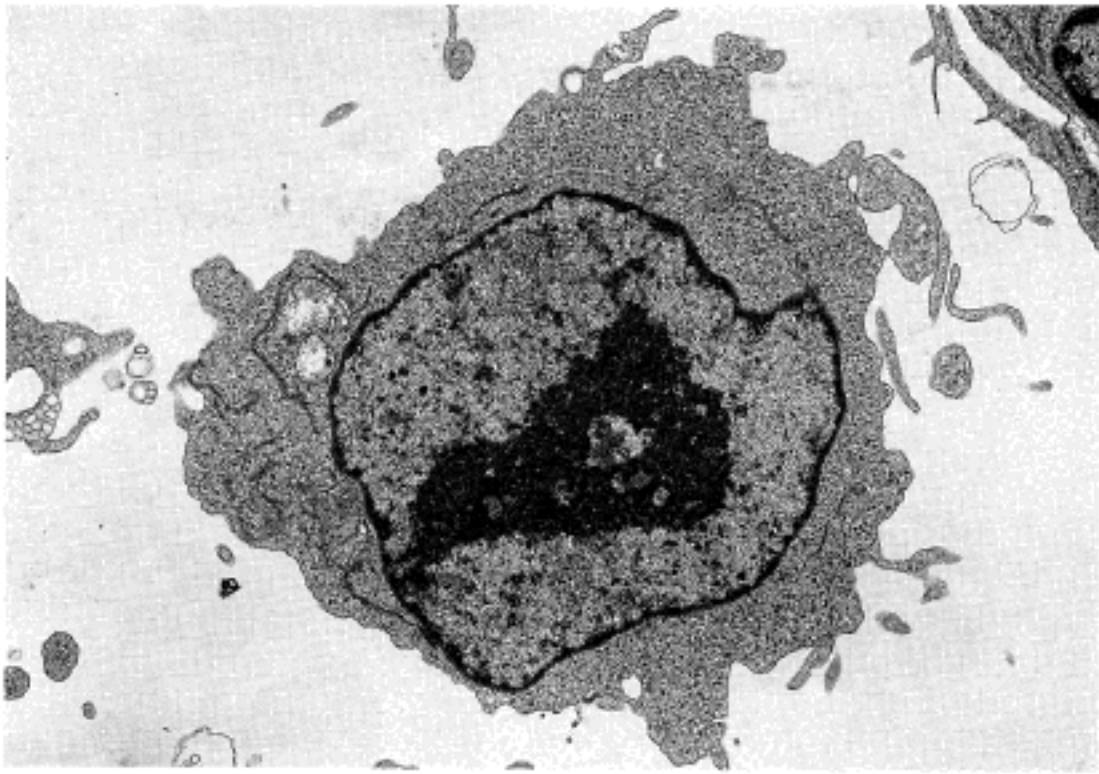


Fig. 5. Lymphoblastoid cell immortalized by EBV (CSUP-3) showed prominent nucleoli, abundant euchromatin and less developed cytoplasmic organelle, uranyl acetate and lead citrate, $\times 2800$.

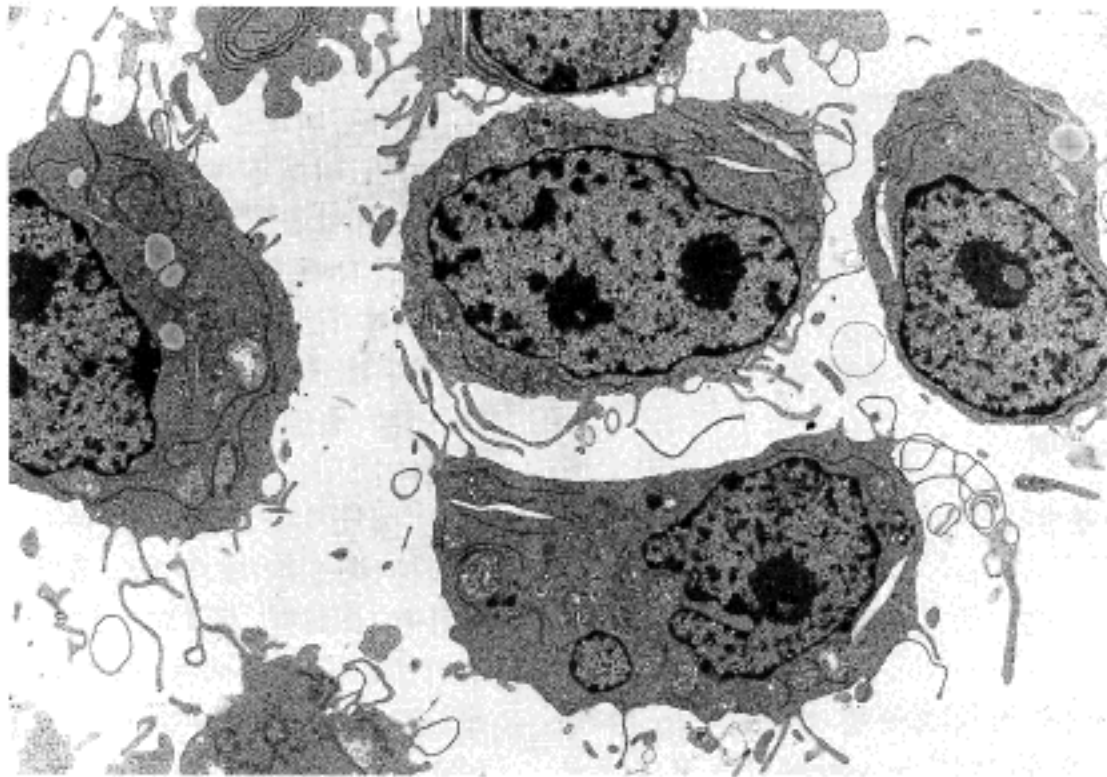


Fig. 6. Plasmacytoid lymphocytes from CSUP-3 showed eccentrically located nuclei and abundant cytoplasm, uranyl acetate and lead citrate, $\times 2000$.

와 비슷한 림프구는 세포가 비교적 적고 세포질이 빈약하며 핵소체가 뚜렷한 것이 특징이었다. 분화도가 보다 좋은 림프구는 핵소체의 크기가 적거나 없으며 세포질내 소기관 특히 조면소포체 (rough endoplasmic reticulum)의 발달이 현저하였으며 사립체도 많이 관찰되었고 특히 glycogen과립이 많이 관찰되었다. 다핵거대세포도 관찰되었다 (Fig. 7)

7. Plating Efficiency

세포의 colony형성은 관찰 할 수 없었다.

8. bcl-2 및 c-myc종양단백 검출결과

bcl-2 종양단백은 94%에서 양성물을 c-myc 종양단백은 92%에서 양성물을 보였다.

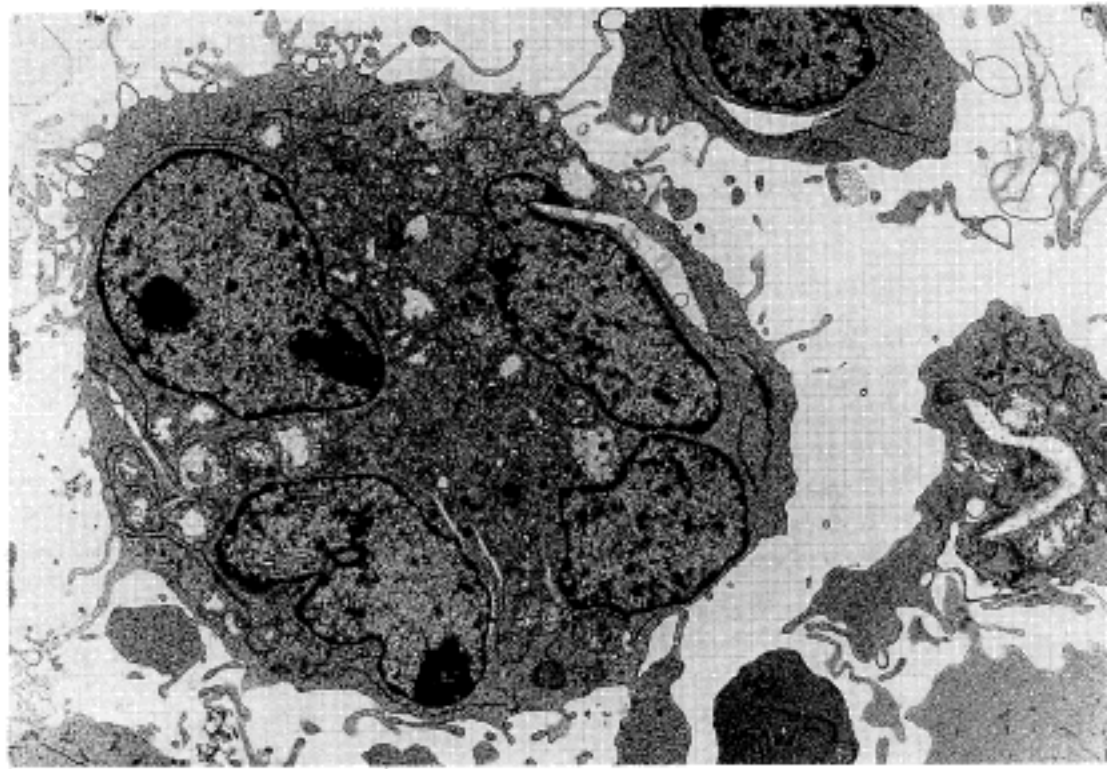


Fig. 7. Multinucleated giant cells showed well developed cytoplasmic organelles devoid of phagosome, uranyl acetate and lead citrate, $\times 2800$.

9. DNA Index 및 Parameter

수립된 세포의 DNA Index는 1.0~1.1로 normodiploid stemline을 보였다.

10. 염색체 검사

정상 핵형 (46XY, 46XX)을 보였다.

11. 종양형성능력

세포주의 종양형성능력은 없었다 (0/16).

고 찰

EBV는 *in vivo*에서 B 림프구에 감염을 일으켜 감염성 단핵구증을 초래하며³⁰ *in vitro*에서는 B 림프구에 감염을 일으켜 불멸화를 초래한 lymphoblastoid B 세포가 되기도 한다.³¹ 악성 B 세포 림프종 세포주의 수립에 EBV의 존재가 반드시 필요하다는 이론이 한때 주장되기도 하였으나³¹ EBV-음성 악성 B 세포 림프종 세포주가 수립됨으로서 *in vitro*에서 EBV의 감염에 의하여 불멸화가 초래된 세포의 특성이 어느정도 밝혀지게 되었다.³²⁻³⁷ 따라서 EBV의 감염에 의하여 불멸화를 초래한 lymphoblastoid B 세포와 EBV의 게놈이 확인된 Burkitt림프종으로 부터 수립된 세포주의 특성에는 분명한 차이가 있음이 확인되었다.

아프리카형 Burkitt림프종 종양세포에서 EBV의 게놈이 확인된 이래로³⁴ 인두에서 발생한 암종⁸, Hodgkin 병⁵, 장기 이식후 발생한 B 세포 악성 림프종⁷을 비롯하여 위암종^{9,10}, NK세포 백혈병¹¹⁻¹³, T 세포 림프종¹⁴⁻¹⁶, T/NK세포 림프종¹⁷에서 EBV의 genome이 관찰되었다는 보고는 EBV가 단순한 림프구의 증식성 질환과 함께 악성 림프구성 질환을 포함한 다양한 악성 종양을 초래하는 바이러스로 주목을 받게 되었다.

본 실험에서 EBV에 의하여 불멸화가 초래된 세포들의 특징은 몇가지로 요약될 수 있다. 첫째, 불멸화를 초래한 세포는 성숙 B 림프구이며 이들은 면역표현형 검사에서 세포배양의 초기에는 다클론성 증식임이 증명되었다. 즉 세포표면과 세포질에서 IgM, IgG등이 관찰되었고 kappa 경쇄와 lambda 경쇄가 말초혈액에서 관찰되는 비율과 거의 동일한 비율로 관찰된 점 그리고 특히 불멸화를 일으킨 세포의 DNA를 이용한 면역유전형검사에서 사용된 면역글로부린 중쇄의 DNA probe인 JH에 대하여 재배열된 band가 관찰되지 않은 점 등으로 미루어 보아 수립된 세포들은 다클론성 B 림프구임이 증명되었다. 한편 세포배양의 50 passage 이상이 경과한 CUSP-1, -2, -3에서는 부분적인 단클론성 증식이 관찰되었으나 이들세포의 면역유전형검사에서 면역글로부린 중쇄의 DNA probe인 JH에 대하여 재배열된 band가 관찰되지 않았다. B림프구의 표면에는 CD19, CD20,

CD21, CD22등 항원성을 나타내는 다양한 분자들이 발현되는데 이중 CD21은 특히 EBV의 수용체로 알려져 있다. 본 연구에서 수립된 세포는 EBV의 감염에 의하여 불멸화를 초래한 B 림프구임에도 불구하고 CD21 항원의 발현은 12% 이하에서만 관찰되었으며 특히 B 세포 고유 항원인 CD19도 평균 30% 이하에서 양성 반응을 보였다. 이와 같이 정상 성숙 B 림프구에서 관찰되는 CD19와 CD21의 발현이 감소되는 원인에 대한 보다 정확한 연구는 앞으로 지속되어야 한다고 생각한다.

둘째, 이들 수립된 세포는 apoptosis를 방지하는 단백질로 알려진 bcl-2 종양단백의 활성화와 악성 림프종을 포함한 다양한 종양에서 흔히 관찰된 c-myc 종양 단백질의 활성화를 보인다. bcl-2 종양단백의 과도한 생산은 여포성 악성 림프종에서 흔히 관찰되는데³⁸ 이는 bcl-2 종양단백이 위치해 있는 염색체 18q21과 면역글로부린의 중쇄 위치인 14q32의 전좌[t (14; 18) (q32; q21)]가 초래됨으로 bcl-2는 정상적 조절기능을 벗어나 과도한 생산이 유도되고 결국 이들 세포는 apoptosis를 일으키지 않고 지속적인 증식을 초래함으로써 악성 림프종이 발생한다고 알려져 있다³⁹. 또한 c-myc 종양단백의 증식은 주로 Burkitt림프종에서 흔히 관찰되는데 c-myc 종양단백의 증식 역시 c-myc 종양단백이 위치해 있는 8q24와 면역글로부린의 중쇄가 위치하여 있는 염색체 14q32의 전좌 [t (8; 14) (q24; q32)] 또는 면역글로부린의 kappa경쇄가 위치한 염색체 2p12의 전좌 [t (2; 8) (p12; q24)] 및 면역글로부린의 lambda경쇄가 위치해 있는 22q11과의 전좌 [t (8; 22) (q24; q11)]등에 의하여 c-myc 종양유전자의 증식이 초래되어 결국 종양증식을 초래한다고 알려져 있다⁴⁰⁻⁴². 본 실험에서 유세포계측기를 이용한 면역형광염색 결과 EBV에 감염되어 불멸화를 초래한 B-세포의 세포질 및 핵내에서 bcl-2와 c-myc 종양단백의 강한 발현이 관찰되었으나 정확한 banding기법을 이용한 염색체 검사가 이루어지지 않음으로 이들 세포가 어떤 기전을 통하여 정상 핵형을 보인 EBV-감염세포에서 bcl-2와 c-myc 종양단백이 증식을 초래하였는지는 정확하게 규명하지 못하였다.

셋째, EBV에 의하여 불멸화가 초래된 B 림프구의 형태학적 변화이다. 성숙 림프구는 핵과 세포질의 비율이 낮고 핵소체가 없으며 heterochromatin이 euchromatin의 양에 비하여 많은 것이 특징이나 EBV의 감염에 의하여 불멸화가 초래된 세포는 미성숙 림프모양세포에서 형질양 림프구까지 그 분화도에 있어서 매우 다양하였다. 특히 림프모양세포는 핵이

매우 크며 뚜렷한 핵소체가 관찰되었고 euchromatin의 양이 heterochromatin에 비하여 증가되어 있으며 세포질내 소기관의 발달도 빈약하여 마치 미성숙 림프모세포와 형태학적으로 닮아 있었다.

따라서 EBV의 감염에 의하여 불멸화를 초래한 세포의 형태학적 특징은 미성숙형태를 보이는 세포에서부터 성숙한 세포에 이르기까지 매우 다양하였다.

넷째, 불멸화를 초래한 이들 세포의 증식성 유무를 확인하기 위하여 실시한 PE검사서 불멸화를 초래한 세포가 집락을 형성하지 않는 점 그리고 염색체의 숫자 검사에서 정상 핵형을 보이는 점과 종양 형성능력을 검색하기 위하여 SCID mouse에 세포를 이종이식 한 결과 종양형성이 없었던 점 등이 EBV감염에 의하여 불멸화를 초래한 세포들의 특징이라고 할 수 있다.

한편 급성 골수성 백혈병과 만성 골수성 백혈병 환자로부터 분리한 혈청에 대한 EBV의 VCA에 대한 검사 결과 IgG, IgM이 음성이었음에도 in vitro에서 이들 종양세포를 배양시 EBV의 감염에 의한 B 림프구의 불멸화가 초래되었으며 이들 불멸화를 초래한 세포의 DNA에서 EBV의 EBNA 분절이 PCR에 의하여 증명된 점은 매우 흥미로운 사실이다. 본 실험에서 사용된 primer는 EBV의 EBNA-2A Bam hY 분절⁴³과 BNF1 분절⁴⁴이었는데 이들은 EBV를 검색하는데 아주 유용하게 사용되는 oligonucleotide primer이다. 따라서 이들 세포, 즉 in vivo에서 EBV의 증명이 혈청학적으로 증명되지 않은 세포가 in vitro에서 감염을 초래한 세포가 되기 위한 가능성은 두가지로 요약될 수 있다. 그 가능성은 첫째, 이들 세포가 in vivo에서 EBV에 대하여 VCA가 음성이었다 할지라도 EBV의 계놈에 대한 생체의 면역반응이 초래되지 않은 상태로 B 림프구내에 잠복하여 있을 가능성이 있는데 이는 백혈병과 같은 면역기능이 손상된 상태에서 EBV의 감염은 EBV에 대한 면역반응이 생체내에서 발행하지 않은 상태로 B 림프구에 잠복하여 있을 수 있다는 가능성이 확인되었다. 둘째로는 EBV에 감염이 초래되지 않은 세포를 in vitro에서 배양할때 EBV가 감염될 수 있는 가능성을 생각 할 수 있다. 그러나 이러한 경우 EBV의 감염은 EBV가 포함된비말을 통하여 인체에서 인체로 감염된다는 사실을 미루어 볼때 in vitro 배양시 EBV의 감염에 의하여 불멸화가 초래되었다는 유추는 매우 어렵다. 이와 같은 실험결과는 기존의 EBV에 감염을 초래하여 불멸화를 초래한 lymphoblastoid B 세포와 형태학적인 측면과 면역표현형에서 매우 유사한

소건을 나타낸다고 볼 수 있으나^{31,32,34,35} 세포의 배양기간을 장기화 할수록 세포의 단클론성이 증가한 점이 본 연구에서는 특이하다고 볼 수 있다.

한편 SCID mouse에 이종이식한 결과 종양형성능력이 없는 것은 EBV의 단순감염에 의하여 불멸화를 초래한 B 세포는 종양 형성능력이 없으며 이들 세포가 종양형성능력을 획득하기 위해서는 EBV에 감염을 초래한 세포에 제 2의 인자가 작용하여 이들 다클론성세포가 단클론성 세포로 변형하는 것과 역으로 어떤 인자에 의하여 종양형성이 있고 여기에 EBV가 이차적으로 감염을 초래하였을 가능성 그리고 종양을 초래할 수 있는 인자가 작용함과 동시에 EBV의 감염이 이루어짐으로서 종양이 발생할 수 있다는 가능성에 대하여 충분한 검토가 있어야 할 것으로 판단된다.

결 론

실험관외에서 EBV의 감염에 의하여 불멸화를 초래한 세포의 특성을 규명하기 위하여 EBV의 감염이 혈청학적으로 확인되지 않은 급성 골수성 백혈병 M1, M2형, 만성 림프구성 백혈병과 EBV의 감염이 확인된 만성 피로증후군 환자의 말초혈액으로부터 림프구를 분리하여 배양하는 과정에서 B 림프구의 불멸화가 초래된 세포들을 검색한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. EBV의 감염에 의하여 불멸화가 초래된 초기 세포는 다클론성 B 림프구이며 불멸화가 초래된 B 림프구의 세포 표면에서는 CD10, CD30 항원의 활성화가 관찰되었으나 CD19와 CD21의 항원성은 많은 부분이 소실되었다. 그러나 배양후기 세포에서는 CD10의 소실이 관찰되었으며 면역표현형상에서 단클론성 B 세포의 증식이 관찰되었다.

2. *in vivo*에서 혈청학적으로 EBV에 음성을 보인 급성 골수성 백혈병과 만성 림프구성 백혈병 환자로부터 분리한 세포가 EBV에 감염을 초래하여 불멸화를 초래할 수 있는 경로는 정상적인 면역기능이 억제된 상태에서는 EBV의 감염에 의하여 면역반응이 초래되지 않은 상태에서 EBV의 잠복이 B 림프구에 있을 수 있다고 판단하였으며 *in vitro*에서 세포배양시 EBV의 감염 가능성은 배재하였다.

3. EBV에 의하여 불멸화를 초래한 B 림프구의 핵형은 정상이었으며 *bcl-2* 종양단백과 *c-myc* 종양단백의 활성화가 관찰되었다.

4. EBV의 감염에 의하여 불멸화를 초래한 세포는 종양형성능력이나 집락형성능력이 없었다. 따라서

EBV의 감염에 의한 악성 종양세포의 변형은 EBV의 감염이외에 제 2의 인자에 의한 작용이 있어야 할 것으로 사료된다.

결론적으로 EBV의 감염에 의하여 불멸화가 초래된 초기 B 림프구는 세포표면항원 특히 CD19와 CD21의 소실이 수반되었으며 형태학적으로 매우 다양한 변형을 보이는 세포이었다. 그러나 세포배양의 기간이 장기화 될수록 이들 세포의 표면항원은 CD10의 소실과 같은 변화를 초래하였으며 면역글로부린은 단클론성을 나타냈으나 종양형성능력은 획득하지 않았다.

이들 세포가 종양형성능력을 획득하기 위해서는 EBV의 감염이외에 제 2의 인자가 작용하여야 할 것으로 사료되며 면역기능이 소실된 생체내에서 EBV는 면역반응이 발생하지 않은 상태에서 EBV의 잠복 감염이 초래될 수 있다고 판단된다.

참 고 문 헌

1. Yoshida M, Seiki M, Yamaguchi K, Takatsuki K. Monoclonal integration of human T-cell leukemia provirus in all primary tumors of adult T-cell leukemia suggests causative role of human T-cell leukemia virus in disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 1984; 81: 2534-7.
2. Kalyanaraman VS, Sarngadharan MC, Robert-Guroff M, et al. A new subtype of human T-cell leukemia virus (HTLV-II) associated with a T-cell variant of hairy-cell leukemia. *Science* 1982; 218: 571-3.
3. Burkitt D. A sarcoma involving the jaws in African Children. *Br J Surg* 1958; 46: 218-38.
4. Burkitt DP. Etiology of Burkitt's lymphoma- an alternative hypothesis to a vectored virus. *J Natl Cancer Institute* 1969; 42: 19-28.
5. Weiss LM. Epstein-Barr Virus DNA in tissues of Hodgkin's disease. *Am J Pathol* 1987; 129: 87-9.
6. MacMahon EME, Glass JD, Hayward SD, et al. Epstein-Barr Virus in AIDS-related primary central nervous system lymphoma. *Lancet* 1991; 338: 969-73.
7. Hanto DW, Frizzera G, Gajl-Peczalska KJ, Sadamoto K. Epstein-Barr Virus induced B-cell lymphoma after renal transplantation. *N Engl J Med* 1982; 306: 913-8.
8. Zur Hausen H, Schulte-Holthausen HS, Henle W, et al. EBV DNA in biopsies of Burkitt tumors and anaplastic carcinomas of the nasopharynx. *Nature* 1970; 228: 1056-8.
9. Tokunaga M, Uemura Y, Tokudome T, et al. Epstein-Barr virus related gastric cancer in Japan: A molecular

- patho-epidemiological study. *Acta Pathologica Japonica* 1993; 43: 574-81.
10. Imai S, Koizumi S, Sagiura M, et al. Monoclonal epithelial malignant cells expressing Epstein-Barr Virus latent infection protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 9131-5.
 11. Imamura N, Kisunoki Y, Kajihara H, Okada K, Kuramoto A. Aggressive natural killer cell leukemia/lymphoma with N 901-positive surface phenotype: evidence for the existence of a third lineage in lymphoid cells. *Acta Hematol* 1988; 80: 121-8.
 12. Imamura N, Kusunoki Y, Kawaha K, et al. Aggressive natural killer cell leukemia/lymphoma: report of four cases and review of the literature. *Br J Hematol* 1990; 75: 49-59.
 13. Sun T, Brody J, Susin M, et al. Aggressive natural killer cell lymphoma/leukemia: a recently recognized clinicopathologic entity. *Am J Surg Pathol* 1993; 17: 1289-99.
 14. Jones JF, Shuin S, Abramowsky C, et al. T-cell lymphomas containing Epstein-Barr viral DNA in patients with chronic Epstein-Barr virus infections. *N Engl J Med* 1988; 318: 733-41.
 15. Petra K, Ioannis A, Michael H, et al. Frequent Latent Epstein-Barr virus infection of neoplastic T cells and bystander B cells in human immunodeficiency virus-negative European peripheral pleomorphic T-cell lymphomas. *Blood* 1993; 82: 217-23.
 16. Khan G, Norton AJ, Slavin G. Epstein-Barr virus in angioimmunoblastic T-cell lymphomas. *Histopathology* 1993; 22: 145-9.
 17. Jaffe ES, Chan JKC, Su JJ, Fizzera G, Mori S, Ho FCS. Report of the workshop on nasal and related extranodal angiocentric T/NK-cell lymphomas: definitions, differential diagnosis, and epidemiology. *Am J Surg Pathol* (in press).
 18. Idea K, Nadler L, Nussenzweig V. Identification of the membrane fragment for the complement fragment C3d by means of a monoclonal antibody. *J Exp Med* 1983; 158: 346-9.
 19. Weiss JJ, Tedder TF, Fearon DT. Identification of a 145,000 Mr membrane protein as the CR2 receptor (CR2) of human B lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1984; 81: 881-5.
 20. Fingerhuth JD, Weiss JJ, Tedder TF, Strominger JL, Biro PA, Fearon DT. Epstein-Barr virus receptor of human B lymphocytes is the C3d receptor CR2. *Proc Natl Acad Sci USA* 1984; 81: 4510-6.
 21. Frade RM, Barel M, Ehlin-Herniksson B, Klein G. gp140, the C3d receptor of human B lymphocytes, is also the Epstein-Barr virus receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985; 82: 1490-3.
 22. Nemerow GR, Wolfert R, McNaughton ME, Cooper NR. Identification and characterization of the Epstein-Barr virus receptor on human B lymphocytes and its relationship to the C3d complement receptor (CR2). *J Virol* 1985; 55: 347-51.
 23. Young LS, Clark D, Sixbey JW, Rickinson AB. Epstein-Barr virus receptors on human pharyngeal epithelia. *Lancet* 1986; i: 240-2.
 24. Menezes J, Seigneurin JM, Patel P, Bourka A, Lenoir G. Presence of Epstein-Barr virus receptors, but absence of virus penetration, in cells of an Epstein-Barr virus genome-negative human lymphoblastoid T line (Molt 4). *J Virol* 1977; 22: 816-21.
 25. Reynes M, Aubert JP, Cohen JH, et al. Human follicular dendritic cells express CR1, CR2 and CR3 complement receptor antigens. *J Immunol* 1985; 135: 2687-94.
 26. Bieber T, Hanau D, Heid E, Kazatchkine MD. Histocytosis-X cells express C3b, C3d, and C3bi receptor (CR1, CR2 and CR3) antigens. *Arch Dermatol Res* 1985; 277: 495-8.
 27. Rowe M, Lear AL, Croom-Carter D, Davies AH, Rickinson AB. Three pathways of Epstein-Barr virus gene activation from EBNA1-positive latency in B lymphocytes. *J Virology* 1992; 166: 122-31.
 28. Kawashima K, Hayashi K, Ohnishi T, Teramoto N, Kimura I. Epstein-Barr virus-associated post-transplant non-Hodgkin's lymphoma: establishment and characterization of a new cell line. *Jpn J Cancer Res* 1994; 85: 1080-6.
 29. Jeon HJ, Akagi T, Yoshino T, et al. Aberrant expression of the monocyte/macrophage phenotype in a human T cell line immortalized by HTLV-I and an adult T cell leukemia/lymphoma cell line. *Pathology International* 1994; 44: 39-48.
 30. Chang MY, Campbell WG. Fatal infectious mononucleosis. Association with liver necrosis and herpes-like virus particles. *Arch Pathol* 1975; 99: 185-91.
 31. Miller G. Human lymphoblastoid cell lines and Epstein-Barr virus: A review of their interrelationships and their relevance to the aetiology of leukoproliferative disorders in man. *Yale J Biol Med* 1971; 43: 358-84.
 32. Epstein AL, Henle W, Henle G, Hewestson J, Kaplan H. Surface marker characteristics and Epstein-Barr virus studies of two established North American Burkitt's lymphoma cell lines. *Proc Natl Acad Sci USA* 1976; 73: 228-32.

33. Klein G, Lindahl T, Jondal M, et al. Continuous lymphoid cell lines with B-cell characteristics that lack Epstein-Barr virus genome, derived from three human lymphomas. *Proc Natl Acad Sci USA* 1974; 71: 3283-8.
 34. Magrath IT, Pizzo PA, Whang-Peng J, et al. Characterization of lymphoma-derived cell lines: Comparison of cell lines positive and negative for Epstein-Barr virus nuclear antigen: I Physical, cytogenetic and growth characteristics. *J Natl Cancer Inst* 1980; 64: 465-76.
 35. Magrath IT, Freeman CB, Pizzo PA, et al. Characterization of lymphoma-derived cell lines: Comparison of cell lines positive and negative for Epstein-Barr virus nuclear antigen: II Surface markers. *J Natl Cancer Inst* 1980; 64: 477-83.
 36. Phillip I, Phillip T, Farvot M, et al. Establishment of lymphomatous cell lines from bone marrow samples from patients with Burkitt's lymphoma. *J Natl Cancer Inst* 1984; 73: 835-40.
 37. Sundstrom C, Nilsson K. Establishment and characterization of a human histiocytic lymphoma cell line (U-937). *Int J Cancer* 1976; 17: 565-74.
 38. Mohamed AN, Al-Katib A. Establishment and Characterization of a human lymphoma cell line (WSU-NHL) with 14; 18 translocation. *Leukemia Research* 1988; 10: 833-43.
 39. Van Oo, Teghem RBC, Smit EME, et al. A new B-cell line showing a complex translocation (8; 14; 18) and Bcl2 rearrangement. *Cancer Genet Cytogenet* 1994; 74: 87-94.
 40. Zech L, Haglund U, Nilsson K, Klein G. Characteristic chromosomal abnormalities in biopsies and lymphoid-cell lines from patients with Burkitt and non-Burkitt lymphomas. *Int J Cancer* 1976; 17: 47-56.
 41. Berger R, Berheim A, Weh HJ, et al. A new translocation in Burkitt's tumor cells. *Hum Genet* 53: 111-2.
 42. Van Den Berghe H, Parloir H, Gosseye S, Englebienne V, Cornu G, Sokal G. Variant translocation in Burkitt lymphoma. *Cancer Genet Cytogenet* 1979; 1: 9-14.
 43. Rowe M, Young LS, Cadwallader K, Petti L, Kieff E, Rickinson AB. Distinction between Epstein-Barr virus type A (EBNA 2A) and type B (EBNA 2B) isolates extends to the EBNA3 family of nuclear proteins. *J Virology* 1989; 63: 1031-9.
 44. Hennessy K, Wang F, Bushman EW, Kieff E. Definitive identification of a member of the Epstein-Barr virus nuclear protein 3 family. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986; 83: 5693-7.
-