

급성백혈병 완전 관해 골수에서 항원형 이상 세포의 분포

신소영 · 강지민 · 김명신 · 임지향 · 김용구 · 한경자

가톨릭대학교 의과대학 진단검사의학교실

Distribution of Antigenic Aberration in the Bone Marrow of Acute Leukemia in Complete Remission

Soyoung Shin, M.D., Jimin Kahng, M.D., Myungshin Kim, M.D., Jihyang Lim, M.D., Younggoo Kim, M.D., and Kyungja Han, M.D.

Department of Laboratory Medicine, The Catholic University of Korea, College of Medicine, Seoul, Korea

Background : The aberrant, leukemia-associated antigen expression patterns allow us to discriminate leukemic blasts from normal precursor cells. Our major goal was to determine a guideline for the detection of minimal residual disease using CD20+/CD34+ and myeloid Ag+/CD19+ combination in the bone marrow of acute leukemia in complete remission (CR) after chemotherapy.

Methods : Bone marrow samples from 117 patients with acute leukemia in complete remission after chemotherapy and from 22 healthy controls were immunophenotyped by triple staining and measured by flow cytometry.

Results : The CD20+/CD34+ cells in the large lymphocyte gate (R1) ranged from 0% to 3.24% ($0.8 \pm 0.82\%$, $P=0.000$) in CD20+/CD34+ B-lineage ALL CR (N=31), from 0.03% to 4.2% ($0.7 \pm 0.83\%$, $P=0.000$) in CD20-/CD34- B-lineage ALL CR (N=66), from 0.1% to 0.96% ($0.45 \pm 0.32\%$, $P=0.016$) in T-ALL CR (N=10), and from 0.02% to 0.48% ($0.18 \pm 0.15\%$, $P=0.776$) in AML CR (N=10). The CD13,33+/CD19+ cells in R1 gate ranged from 0% to 2.69% ($0.37 \pm 0.48\%$, $P<0.001$) in CD13,33+/CD19+ B-lineage ALL CR (N=31), from 0% to 1.8% ($0.31 \pm 0.28\%$, $P<0.001$) in CD13,33-/CD19+ B-lineage ALL CR (N=65), from 0.02% to 0.64% ($0.29 \pm 0.22\%$, $P=0.071$) in T-ALL CR (N=9), and from 0% to 0.17% ($0.07 \pm 0.09\%$, $P=0.341$) in AML CR (N=3).

Conclusions : Using an immunophenotypic method for the detection of early relapse or minimal residual disease of B-lineage ALL bone marrow in CR after chemotherapy, different cutoff values should be applied according to antigen combination and gating. When the proportion of aberrant antigen combination was less than 5% in large lymphocyte gate, the results should be interpreted with caution. (*Korean J Lab Med* 2008;28:1-7)

Key Words : Aberrant antigen, CD20+/CD34+, Myeloid Ag+/CD19+

서론

접 수 : 2007년 10월 19일 접수번호 : KJLM2079
수정본접수 : 2008년 1월 4일
게재승인일 : 2008년 1월 4일
교신저자 : 한 경 자
우 150-713 서울시 영등포구 여의도동 62
가톨릭대학교 의과대학 성모병원 진단검사의학과
전화 : 02-3779-1297, Fax : 02-3779-2285
E-mail : hankja@catholic.ac.kr

ALL은 AML과 같이 흔한 백혈병으로서 특히 소아의 경우 ALL의 80-85%가 B림프구성백혈병(B-lineage ALL)이다[1]. B-lineage ALL은 B 림프구의 전구세포가 증식하는 백혈병으로서 비교적 항암제에 반응이 좋아서 항암제 치료만으로 완전관해에 도달하는 확률이 80-95%로 매우 높다[2-7]. B-lineage ALL 치료

평가에 가장 중요한 것이 골수검사로 완전관해 여부를 평가하는 것인데 골수에서 림프아구 5% 미만일 때 완전관해로 판정하도록 정의되어 있으나 형태학적 소견으로 B-림프구 전구세포인 혈구소아세포(hematogone)와 잔존 B-lineage ALL 백혈병 세포를 구별하는 것은 거의 불가능하다[1, 4, 5].

그러나 혈구소아세포는 정상세포이므로 성숙단계에 따른 항원 발현 순서가 잘 지켜져 있고 다른 세포계열에서 나타나는 항원들의 발현은 관찰되지 않는다고 보고되어 있다[6, 7]. 반면 B-lineage ALL에서는 조혈모세포 항원인 CD34와 성숙 B 림프구항원인 CD20이 동시 표현되거나, 과립구 항원인 CD11b, CD13, CD15, CD33 등의 항원과 B림프구 항원이 동시에 표현되는 경우가 전체의 40%로 흔하다[8]. 따라서 이런 항원 조합을 B-ALL의 초기 재발이나 미세 잔존 백혈병 진단에 이용하고 있다. 그러나 이들 항원 조합을 이용하여 유세포분석으로 잔존 백혈병 세포를 검출하고자 할 때 각 항원 조합별로, 각 세포군(gate) 내에서 어느 정도 이상 검출되어야 잔존 백혈병이 존재하는 것으로 진단할 수 있는지에 대한 기준이 정해져 있지 않다. 단지 정상인 골수에서 이들 항원성 이상 소견을 나타내는 세포가 전 유핵세포의 0.3% 미만이었음이 보고 되었으나[9] 실제 미세 잔존 백혈병을 검출해 내야 하는 화학요법 후 골수나 골수 이식 후 골수 같은 재생중 골수에서는 얼마나 어디에 분포하는지 알려져 있지 않다. 또한 이들 항원성 이상 소견을 나타내는 세포들의 분포가 기존 백혈병의 유형에 따라 어떻게 다른지도 연구된 바가 없다. 이에 정상 골수와 여러 기존 백혈병으로 항암치료 후 완전관해 상태 골수를 이용하여 CD20+/CD34+, myeloid 항원별+/CD19+ 세포들의 골수 분포를 분석하여 여러 가지 백혈병 별로 재생 골수에서 이들 비정상 항원 조합을 이용한 미세 잔존 백혈병 진단 기준 설정에 도움이 되고자 하였다.

대상 및 방법

1. 대상

검사 대상은 2005년 12월부터 2006년 2월까지 성모병원 진단검사의학과에 골수 천자검사가 의뢰되어 급성백혈병으로 진단된 환자 중 화학 요법 후 말초혈액 검사 소견과 골수 검사 소견상 완전 관해에 합당한 소견을 보이고 골수내 아세포가 5% 미만인 92예와 골수이식 후 생착에 성공한 25예를 대상으로 하였다. 이 당시의 염색체 검사 결과는 음성이었다. 완전관해군 92예 중 23예는 완전관해 당시의 검사로 시행하였고 69예는 추적검사의시 검체였으며(평균 280.1일, 중앙값 95일, 범위 28-1,309일) 골수 이식군 25예 중 15예는 생착 확인 당시의 검체로 검사를 시행하였고

나머지 10예는 생착 확인 후 추적 검사의시 검체였다(평균 475.5일, 중앙값 360일, 범위 60-1,095일). 이 중 B-lineage ALL 완전관해 예가 97예, 급성 T-ALL 완전관해 예가 10예, AML 완전관해 예가 10예였다. 정상 골수는 골수 이식 공여자 골수 10예와 특발성혈소판감소성자반병 및 림프종 골수전이 판정을 위해 골수 검사를 시행하여 정상으로 판정받은 골수 12예를 포함하여 22예를 대상으로 하였다. 모든 대상 환자는 '검사 후 잔여 검체 사용 승낙서'를 자필 서명하여 제출한 경우로서 골수 검사 후 1 mL 이상의 골수 흡입액이 남은 예들을 대상으로 하였다.

2. 방법

EDTA로 항응고 처리한 골수 흡입액 100 μ L에 fluorescein isothiocyanate (FITC), phycoerythrin (PE) 또는 peridinin chlorophyll protein (PerCP)로 표지된 단일 클론성 항체를 각각 10 μ L씩 섞은 후 상온 암소에 15분간 방치한 다음 적혈구 용해액(Becton Dickinson, San Jose, CA, USA)을 2 mL 첨가하여 다시 상온 암소에 10분간 방치하여 적혈구를 용해하였다. 사용한 단일 클론성 항체는 모두 Immunocytometry Systems (Becton Dickinson)에서 구입하였다. 모든 골수검체는 FITC로 표지된 CD13, CD11b, CD15, CD33 항체와 PE로 표지된 CD19, CD20 항체 그리고 PerCP로 표지된 CD34 항체로 염색하였다. CD34 항체는 CD20 항체와 한 시험관내에서 반응시키고, CD13, CD11b, CD15, CD33 항체는 CD19 항체와 한 시험관내에서 반응시켰다. 음성대조로는 mouse IgG 1-FITC/IgG 2a-PE를 사용하였다. 적혈구 용해가 완료된 다음에는 인산완충액(phosphate buffered saline, PBS, pH 7.4)으로 2회 세척 후 다시 PBS에 부유시켜서 유세포 분석기(FACSCalibur, Becton Dickinson)의 Cell Quest program을 이용하여 20,000개의 세포를 분석하였다. Forward scatter channel (FSC)/side scatter channel (SSC)은 linear mode로 고정하고 형광 channel들은 log mode로 고정하였다. FSC와 SSC 분포에서 일반적으로 백혈병 세포가 속하는 아세포를 구획할 때 이용하는 FSC는 다양하지만 SSC가 낮은 부분을 큰림프구 구획(R1)으로 하였고 debris를 제외한 전 유핵 세포를 포함하는 구획을 전 유핵세포 구획(R2)으로 정하였다(Fig. 1). 각 구획 내에서 CD20+/CD34+, CD13,33+/CD19+, CD15+/CD19+, CD11b+/CD19+ 세포의 백분율을 계산하였다(Fig. 1).

3. 통계

SPSS 통계프로그램을 이용하여 Mann-Whitney U test를 시

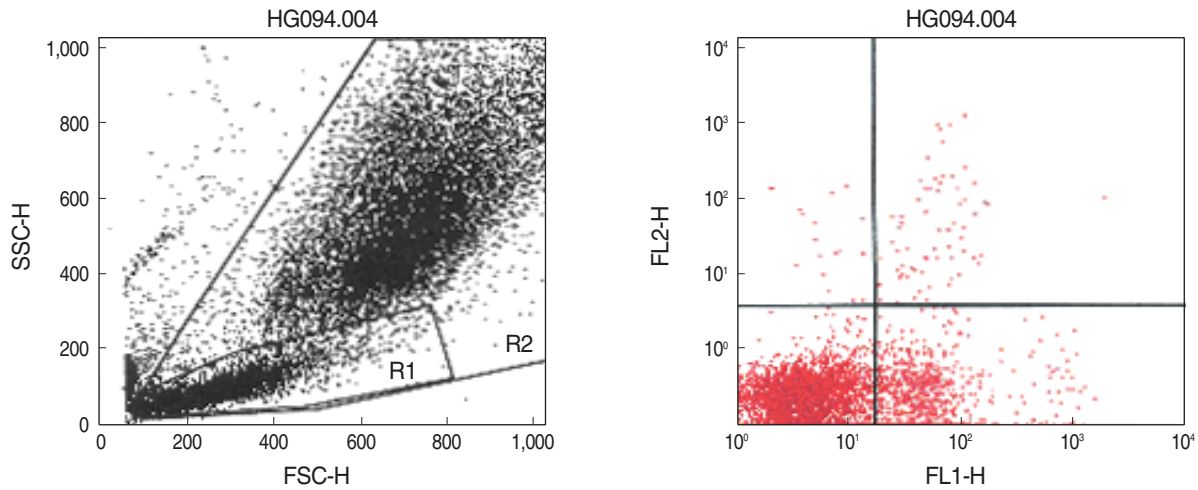


Fig. 1. Dot plot scattergrams of bone marrow cells of a B-lineage ALL patient stained with anti-CD20-PE/anti-CD34-PerCP. The large lymphocyte gate (R1) and all nucleated element gate (R2) were set using forward scatter (FSC) and side scatter (SSC) characteristics. The CD20+/CD34+ cells in the R1 gate (upper right quadrant) were 1.26%.

Table 1. Proportion of CD20+/CD34+ cells in the large lymphocyte gate (R1) and all nucleated element gate (R2) in the bone marrow of acute leukemia patients in complete remission (mean±SD %)

Gate	Normal control (N=22)	B-ALL, CR (N=97)		T-ALL, CR (N=10)	AML, CR (N=10)
		Initial Dx CD20,34+ (N=31)	Initial Dx CD20,34- (N=66)		
R1	0.18±0.12 (0-0.47)	0.8±0.82* (0-3.24) <i>P</i> <0.001	0.7±0.83* (0.03-4.2) <i>P</i> <0.001	0.45±0.32* (0.1-0.96) <i>P</i> =0.016	0.18±0.15 (0.02-0.48) <i>P</i> =0.776
R2	0.13±0.12 (0-0.3)	0.17±0.18 (0-0.72) <i>P</i> =0.796	0.16±0.17 (0.01-1.76) <i>P</i> =0.548	0.17±0.2 (0.01-0.49) <i>P</i> =1.0	0.23±0.17 (0.01-0.43) <i>P</i> =0.11

P, compared with normal control. *, *P*<0.05.

Abbreviation: CR, complete remission.

행하여 정상골수와 여러 기존 백혈병 완전관해 골수 사이의 구획별, 표지자별 유의성을 검정하였다. 또한 기존 백혈병의 유형별 및 이상 항원 발현 여부간의 표지자별 유의성을 검정하였다. 각각의 유의수준은 *P*<0.05로 하였다.

결 과

1. 급성백혈병 진단별 완전 관해 상태에서의 골수내 CD20+/CD34+ 세포의 분포

급성백혈병 진단별 완전 관해 상태에서의 골수내 CD20+/CD34+ 세포의 분포는 Table 1과 같았다.

정상 대조군의 골수내 CD20+/CD34+ 세포는 R1에서 0.18±0.12% (범위 0-0.47%), R2에서 0.13±0.12% (범위 0-0.3%)였다. B-lineage ALL 완전관해 골수에서는 초기 진단 시 CD20+/CD34+이었던 B-lineage ALL (N=31)은 R1에서는 0.8±0.82% (범위 0-0.72%)로 정상 대조군에 비해 높았으나(*P*=0.000),

R2에서는 0.17±0.18% (범위 0.06-2.69%)로 정상 대조군과 유의한 차이가 없었다(*P*=0.796). 초기 진단 시 백혈병 세포의 면역 표현형이 CD20+/CD34+가 아니었던 B-lineage ALL (N=66)인 경우에서도 R1에서는 0.7±0.83% (범위 0.01-1.76%)로 정상 대조군에 비해 높았으나(*P*=0.000), R2에서는 0.16±0.17% (범위 0-1.8%)로 정상 대조군과 유의한 차이가 없었다(*P*=0.548). B-lineage ALL 중 초기 진단 시 CD20+/CD34+이었던 B-lineage ALL과 기타 B-lineage ALL 사이에는 R1, R2 모두 유의한 차이가 없었다(*P*=0.503, 0.899).

모두 2예가 재발하였는데 모두 B-ALL이었고 1예는 초기 진단 시 CD20+/CD34+이었으며 R1에서 CD20+/34+가 1.62%였고 다른 1예는 초기 진단 시 CD20+/CD34+ 면역 표현형이 아니었으며, R1에서 CD20+/CD34+가 2.03%였다. B-lineage ALL에 중 가장 높은 비율로 CD20+/34+ 세포가 존재했던 예는 R1에서 4.2%였으며 기존 백혈병 세포는 CD20+/34+가 아닌 예였다.

T-ALL 완전관해 골수(N=10)에서는 R1에서는 0.45±0.32% (범위 0.01-0.49%)로 정상대조군에 비해 높았으나(*P*=0.016),

Table 2. Proportion of CD13,33+/CD19+ cells in the large lymphocyte gate (R1) and all nucleated element gate (R2) in the bone marrow of acute leukemia patients in complete remission (mean \pm SD %)

Gate	Normal control (N=17)	B-ALL, CR (N=96)		T-ALL, CR (N=9)	AML, CR (N=3)
		CD13,33+ (N=31)	Initial Dx CD13,33- (N=65)		
R1	0.12 \pm 0.08 (0-0.29)	0.37 \pm 0.48* (0.06-2.69) <i>P</i> <0.001	0.31 \pm 0.28* (0-1.8) <i>P</i> <0.001	0.29 \pm 0.22 (0.02-0.64) <i>P</i> =0.071	0.07 \pm 0.09 (0-0.17) <i>P</i> =0.341
R2	0.42 \pm 0.29 (0.01-0.98)	0.43 \pm 0.26 (0.01-0.94) <i>P</i> =0.737	0.52 \pm 0.34 (0.01-1.76) <i>P</i> =0.101	0.49 \pm 0.28 (0.01-0.81) <i>P</i> =0.483	0.36 \pm 0.15 (0.23-0.52) <i>P</i> =0.916

P, compared with normal control. *, *P*<0.05.

Abbreviation: See Table 1.

R2에서는 0.17 \pm 0.2% (범위 0.02-0.64%)로 정상대조군과 유의한 차이가 없었다(*P*=1.0). T-ALL과 B-lineage ALL 사이에는 R1과 R2 모두 유의한 차이가 없었다(*P*=0.395, 0.888).

AML 완전관해 골수에서는 R1, R2 구획 각각 0.18 \pm 0.15% (범위 0.01-0.43%) (*P*=0.776), 0.23 \pm 0.17% (범위 0-0.17%) (*P*=0.11)으로 정상대조군과 유의한 차이가 없었으며 B-lineage ALL에 비해 R1에서는 낮았고(*P*=0.001), R2에서는 유의한 차이가 없었다(*P*=0.296). T-ALL에 비해서도 R1에서는 낮았고(*P*=0.049) R2에서는 유의한 차이가 없었다(*P*=0.497).

2. 급성백혈병 완전 관해 상태에서의 골수내 CD13,33+/CD19+ 세포의 분포

급성백혈병 진단별 완전 관해 상태에서의 골수내 CD13,33+/CD19+ 세포의 분포는 Table 2와 같았다.

정상 대조군의 골수내 CD13,33+/CD19+ 세포는 R1에서 0.12 \pm 0.08% (범위 0-0.29%), R2에서 0.42 \pm 0.29% (범위 0.01-0.98%)였다. B-lineage ALL 완전관해 골수에서는 초기 진단 시 CD13,33+/CD19+이었던 B-lineage ALL (N=31)은 R1에서는 0.37 \pm 0.48% (범위 0.06-2.69%)로 정상 대조군에 비해 높았으나(*P*=0.000), R2에서는 0.43 \pm 0.26% (범위 0.01-0.94%)로 정상 대조군과 유의한 차이가 없었다(*P*=0.737).

초기 진단 시 백혈병 세포의 면역 표현형이 CD13,33+/CD19+가 아니었던 B-lineage ALL (N=65)인 경우에서도 R1에서는 0.31 \pm 0.28% (범위 0-1.8%)로 정상 대조군에 비해 높았으나(*P*=0.000), R2에서는 0.52 \pm 0.34% (범위 0.01-1.76%)로 정상 대조군과 유의한 차이가 없었다(*P*=0.101). B-lineage ALL 중 초기 진단 시 CD13,33+/CD19+이었던 B-lineage ALL과 기타 B-lineage ALL 사이에는 R1, R2 모두 유의한 차이가 없었다(*P*=0.845, 0.371).

T-ALL 완전관해 골수(N=9)에서는 R1에서는 0.29 \pm 0.22% (범위 0.02-0.64%)로 정상대조군과 유의한 차이가 없었고(*P*=

Table 3. Proportion of CD15+/CD19+ cells in the large lymphocyte gate (R1) and all nucleated element gate (R2) in the bone marrow of patients with B-lineage ALL complete remission (mean \pm SD %)

Gate	Normal control (N=17)	B-ALL, CR (N=11)
R1	1.49 \pm 0.98 (0.22-2.9)	0.38 \pm 0.41 (0.01-1.17) <i>P</i> =0.001*
R2	1.4 \pm 0.64 (0.29-2.41)	1.39 \pm 0.85 (0.27-2.98) <i>P</i> =0.744

P, compared with normal control. *, *P*<0.05.

Abbreviation: See Table 1.

0.071), R2에서는 0.49 \pm 0.28% (범위 0.01-0.81%)로 정상대조군과 유의한 차이가 없었다(*P*=0.483). T-ALL과 B-lineage ALL 사이에는 R1과 R2 모두 유의한 차이가 없었다(*P*=0.986, 0.745).

AML 완전관해 골수에서는 R1, R2 구획 각각 0.07 \pm 0.09% (범위 0-0.17%), 0.36 \pm 0.15% (범위 0.23-0.52%)으로 정상대조군과 유의한 차이가 없었으며(*P*=0.341, 0.916) B-ALL에 비해 R1에서는 낮았고(*P*=0.035), R2에서는 유의한 차이가 없었다(*P*=0.538). T-ALL에 비해서는 R1, R2 모두 유의한 차이가 없었다(*P*=0.1, 0.373).

3. 정상 골수와 B-lineage ALL 완전관해 골수에서 골수내 CD15+/CD19+ 세포의 분포

급성백혈병 진단별 완전 관해 상태에서의 골수내 CD15+/CD19+ 세포의 분포는 Table 3과 같았다.

정상 대조군의 골수내 CD15+/CD19+ 세포는 R1에서 1.49 \pm 0.98% (범위 0.22-2.9%), R2에서 1.4 \pm 0.64% (범위 0.29-2.41%)였다. B-lineage ALL 완전관해 골수(N=11)은 R1에서는 0.38 \pm 0.41% (범위 0.01-1.17%)로 정상 대조군에 비해 유의하게 낮았으나(*P*=0.001), R2에서는 1.39 \pm 0.85% (범위 0.27-2.98%)로 정상 대조군과 유의한 차이가 없었다(*P*=0.744).

Table 4. Proportion of CD11b+/CD19+ cells in the large lymphocyte gate (R1) and all nucleated element gate (R2) in the bone marrow of acute leukemia patients in complete remission (mean±SD %)

Gate	Normal control (N=6)	B-ALL, CR (N=85)	T-ALL, CR (N=8)
R1	0.61±0.62 (0.12-1.76)	0.5±0.58 (0.02-4.03) <i>P</i> =0.648	0.73±0.14 (0.09-1.98) <i>P</i> =0.897
R2	0.35±0.23 (0.03-0.62)	0.55±0.42 (0.01-2.33) <i>P</i> =0.269	0.46±0.49 (0.01-1.48) <i>P</i> =0.948

P, compared with normal control. *, *P*<0.05.

Abbreviation: See Table 1.

4. 급성백혈병 완전 관해 상태에서의 골수내 CD11b+/CD19+ 세포의 분포

급성백혈병 진단별 완전 관해 상태에서의 골수내 CD11b+/CD19+ 세포의 분포는 Table 4와 같았다.

정상 대조군의 골수내 CD11b+/CD19+ 세포는 R1에서 0.61±0.62% (범위 0.12-1.76%), R2에서 0.35±0.23% (범위 0.03-0.62%)였다. B-lineage ALL 완전관해 골수에서는(N=85)은 R1에서는 0.5±0.58% (범위 0.02-4.03%)로 정상 대조군과 유의한 차이가 없었고(*P*=0.648), R2에서는 0.55±0.42% (범위 0.01-2.33%)로 정상 대조군과 유의한 차이가 없었다(*P*=0.269).

T-ALL 완전관해 골수(N=8)에서는 R1에서는 0.73±0.14% (범위 0.09-1.98%)로 정상대조군과 유의한 차이가 없었고(*P*=0.897), R2에서는 0.46±0.49% (범위 0.01-1.48%)로 정상대조군과 유의한 차이가 없었다(*P*=0.948). T-ALL과 B-lineage ALL 사이에는 R1과 R2 모두 유의한 차이가 없었다(*P*=0.651, 0.413).

고 찰

혈구소아세포는 정상인의 골수에 존재하는 B 림프구의 전구세포들로서 신생아에서는 21%까지 증가할 수 있으며 항암제 투여 후에는 45%까지도 증가할 수 있는 것으로 보고되고있다[10, 11]. 이들은 형태학적으로 아세포와 유사한 모양을 갖고 있기 때문에 백혈병 아세포와 혼동할 수 있다는 점에서 의의가 있다. 혈구소아세포는 정상 세포들이기 때문에 성숙 단계에 따른 항원 발현 순서가 잘 지켜져 있고 다른 세포 계열에서 나타나는 항원들의 발현은 관찰되지 않는다. 그러나 종종 B-lineage ALL 백혈병 세포들에서는 정상 성숙 단계에서는 관찰될 수 없는 미성숙 항원과 성숙

단계의 B 림프구 항원이 동시에 관찰되거나 과립구계 세포들에서 표현되는 항원들이 B 림프구 항원들과 동시에 발현되며 이와 같은 비정상 면역 표현형 양상이 미세 잔존 백혈병이나 초기 재발을 진단하는데 이용되고 있다[12-20].

백혈병 세포를 분석하기 위해서는 유세포 분석시 R1 구획을 이용하는데 특히 항암요법 후 회복기에는 호중구 수를 증가시키기 위하여 과립구집락자극인자(granulocyte colony stimulating factor) 등 과립구 증식을 유도하는 치료를 병행하기 때문에 과립구 분획이 증가하여 골수내 전 유핵세포중의 분포는 별로 이용되지 않고 있다.

정상인 골수에서 CD20+/CD34+세포는 전체 유핵 세포중 0.13±0.12% 관찰되었는데 R1 구획에서는 0.18±0.12%였다. 전체 유핵 세포 중 0.1% 미만이라는 기존 보고와 큰 차이가 없었으나[9] R1 구획에서는 0.47%까지 관찰된 예도 있었다. B-lineage ALL, CR 예에서는 기존 백혈병이 CD20+/CD34+ 여부와 상관없이 모두 R1 구획에서 정상인보다 유의하게 다수 관찰되었다. 이것은 이들 세포들이 잔존 백혈병이기보다는 재생하는 과정에서 출현한 세포들로 사료된다. 그러나 전체 유핵세포 중의 분획은 정상인과의 차이가 통계적으로 유의하지 않아서 다수 출현하는 과립구계 세포들에 의해 희석되었음을 알 수 있었다. 이와 같은 양상은 T-ALL, CR 예들에서도 동일하게 관찰되었다. 그러나 AML, CR 예들에서는 R1 구획에서도 정상인에 비해 증가되지 않아서 재생 골수라는 점은 동일해도 항암제 종류 등 치료 유형이 달라짐에 따라 재생 골수내 비정상 표현형을 나타내는 B 림프구 분포에 차이가 나타남을 알 수 있었다. 또 다른 가능성은 기존 질환이 림프구 계열에 생긴 백혈병에서는 AML과는 달리 비정상 림프구 분획이 증가되어 있을 수도 있다. Dworzak 등[17]이 정상골수보다 미성숙 단계가 우세한 화학요법 후 재생 중 골수에서는 이런 조합이 발견이 된다고 하였으나 정확히 어느 구획에 어느 정도까지 나타나는지는 보고되어 있지 않다. 재발한 B-lineage ALL 2예에서 1예는 초기 진단 시 CD20+/CD34+이었는데 R1에서 CD20+/34+가 1.62%였고 다른 1예는 초기 진단 시 CD20+/CD34+ 면역 표현형이 아니었으며, R1에서 CD20+/CD34+가 2.03%로서 완전 관해 시점에서의 R1내 CD20+/CD34+ 세포들이 높은 군에서 재발이 더 잘 된다고 볼 수는 없었다. B-lineage ALL 예 중 가장 높은 비율로 CD20+/34+ 세포가 존재했던 예는 R1에서 4.2%였으며 기존 백혈병 세포는 CD20+/CD34+가 아닌 예였으며 현재까지 완전관해 상태를 유지하고 있다. 이것은 B-lineage ALL 화학 요법 치료 후 골수에서 초기 재발이나 미세 잔존 백혈병 검출 목적으로 CD20+/CD34+ 세포를 검출할 때 R1 구획에서 cutoff 값이 5%는 되어야 함을 의미한다.

과립구 항원 양성 B 림프구는 정상인의 골수에서 CD13+/CD19+ 세포와 CD33+/CD19+ 세포가 각각 0.3% 이내로 존재한다고 알려져 있으나[9] 이는 전체 골수세포를 분석한 것이며, 화학요법 후 재생 중 골수에 대한 보고는 없으며 골수아세포를 구획할 때 이용하는 R1 구획에 대한 분석 보고도 없다. 본 연구 결과 정상인 골수에서 CD13,33+/CD19+ 세포는 R2 구획에서는 $0.42 \pm 0.29\%$ 로 관찰되어 기존 보고와 유사하였는데[9] R1 구획에서는 $0.12 \pm 0.08\%$ 만 관찰되어 대부분이 과립구 구획에 분포함을 알 수 있었다. B-lineage ALL, CR 예에서는 기존 백혈병이 CD13,33+/CD19+여부와 상관없이 모두 R1 구획에서 정상인보다 유의하게 다수 관찰되었다. 또한 1예에서는 2.69%까지도 관찰되어 정상인이나 다른 백혈병 환자들에 비해 매우 많은 수로 출현할 수도 있음을 나타냈다. 이것은 이들 세포들이 과립구계나 잔존 백혈병이기보다는 재생하는 과정에서 출현한 세포들로 사료된다. 따라서 B-lineage ALL 화학 요법 치료 후 골수에서 초기 재발이나 미세 잔존 백혈병 검출 목적으로 CD13,33+/CD19+ 세포를 검출할 때 R1 구획에서 경계치(cutoff)가 3%는 되어야 함을 의미한다. 그러나 R2 분획은 정상인과의 차이가 통계적으로 유의하지 않아서 다수 출현하는 과립구계 세포들에 의해 희석되었음을 알 수 있었다. T-ALL, CR 예들에서는 R1에서 평균값은 정상 대조군보다 높았으나 통계적으로는 의의가 없었는데 분석 수가 적어서 정확한 결론은 내기 어려웠다. AML, CR 예들에서는 R1 구획에서도 정상인에 비해 증가되지 않아서 재생 골수라는 점은 동일해도 CD20+/CD34+ 세포들과 마찬가지로 기존 질환에 따라 B 림프구 분포에 차이가 나타남을 알 수 있었다.

정상인 골수에서 CD15+/CD19+ 세포는 R1이나 R2 모두에서 1.4% 정도로 매우 다수 관찰되었고 오히려 B-lineage ALL, CR 예들에서 R1내 정상 대조군보다 감소되는 양상을 나타내는 특이한 결과를 나타냈다. 추후 이들 세포들이 무엇인지 연구해야 할 것으로 사료되었다.

또 다른 과립구계 항원인 CD11b와 CD19가 동시 발현되는 세포들은 B-lineage ALL과 T-ALL, CR 모두에서 정상 대조군과 유의한 차이를 나타내지 않았다. 그러나 B-lineage ALL, CR R1 구획에서 4.03%까지 관찰되어 B-lineage ALL 화학 요법 치료 후 골수에서 초기 재발이나 미세 잔존 백혈병 검출 목적으로 CD11b+/CD19+ 세포를 검출할 때 R1 구획에서 경계치(cutoff) 값이 5%는 되어야 함을 알 수 있었다.

이상으로 B-lineage ALL 항암 요법 치료 후 골수에서 초기 재발이나 미세 잔존 백혈병 검출 목적으로 면역 표현형 검사를 시행할 때는 항원 조합에 따라, 또한 분석 세포 구획에 따라 경계치(cutoff)를 달리 정해야 하는데 백혈병 세포가 속하는 R1 구획에

서 5% 이내인 경우에는 면역 표현형 검사 결과만으로는 해석에 주의해야 함을 알 수 있었다. 또한 이와 같은 비정상적인 면역 표현형을 나타내는 세포들의 분포는 기존 질환에 따라 동일한 재생 골수 상태라 하더라도 다를 수 있었다.

요 약

배경 : 비정상 면역 표현형 양상은 백혈병 세포와 정상 전구세포를 감별하는데 도움을 준다. 정상 골수와 여러 기존 백혈병으로 항암 치료 후 완전관해 상태의 골수로 CD20+/CD34+, myeloid 항원별/CD19+ 세포들의 골수 분포를 분석하여 여러 가지 백혈병 별로 재생 골수에서 이들 비정상 항원 조합을 이용한 미세 잔존 백혈병 진단 기준을 설정하고자 하였다.

방법 : 2005년 12월부터 2006년 2월까지 단일 기관에서 시행된 골수 검사상 급성백혈병으로 진단되어 화학요법 후 완전관해에 도달한 117예와 정상 골수 22예를 대상으로 유세포분석기를 이용하여 면역 표현형 검사를 시행하였다.

결과 : B-lineage ALL 완전관해(N=31), CD20-/CD34- B-lineage ALL 완전관해(N=66), T-ALL 완전관해(N=10) 그리고 AML 완전관해(N=10) 골수에서 CD20+/CD34+ 세포의 분포는 큰림프구 구획(large lymphocyte gate, R1)에서 각각 0%에서 3.24% ($0.8 \pm 0.82\%$, $P < 0.000$), 0.03%에서 4.2% ($0.7 \pm 0.83\%$, $P < 0.000$), 0.1%에서 0.96% ($0.45 \pm 0.32\%$, $P = 0.016$) 그리고 0.02%에서 0.48% ($0.18 \pm 0.15\%$, $P = 0.776$)였다. CD-13,33+/CD19+ B-lineage ALL 완전관해(N=31), CD13,33-/CD19+ B-lineage ALL 완전관해(N=65), T-ALL 완전관해(N=9) 그리고 AML 완전관해(N=3) 골수에서 CD13,33+/CD19+ cells 세포의 분포는 R1 구획에서 각각 0에서 2.69% ($0.37 \pm 0.48\%$, $P = 0.000$), 0%에서 1.8% ($0.31 \pm 0.28\%$, $P = 0.000$), 0.02%에서 0.64% ($0.29 \pm 0.22\%$, $P = 0.071$) 그리고 0%에서 0.17% ($0.07 \pm 0.09\%$, $P = 0.341$)였다.

결론 : B-lineage ALL 항암 요법 치료 후 골수에서 초기 재발이나 미세 잔존 백혈병 검출 목적으로 면역 표현형 검사를 시행할 때는 항원 조합에 따라, 또한 분석 세포 구획에 따라 경계치(cutoff)를 달리 정해야 하며 백혈병 세포가 속하는 R1 구획에서 5% 이내인 경우에는 면역 표현형 검사 결과만으로는 해석에 주의해야 함을 알 수 있었다.

참고문헌

1. Van Wering ER, van der Linden-Schreder BE, Szczepanski T, Will-

- emse MJ, Baars EA, van Wijngaarde-Schmitz HM, et al. Regenerating normal B-cell precursors during and after treatment of acute lymphoblastic leukaemia: implications for monitoring of minimal residual disease. *Br J Haematol* 2000;110:139-46.
2. Silverman LB, Gelber RD, Dalton VK, Asselin BL, Barr RD, Clavell LA, et al. Improved outcome for children with acute lymphoblastic leukemia: results of Dana-Farber Consortium Protocol 91-01. *Blood* 2001;97:1211-8.
3. Schrappe M, Reiter A, Ludwig WD, Harbott J, Zimmermann M, Hiddemann W, et al. Improved outcome in childhood acute lymphoblastic leukemia despite reduced use of anthracyclines and cranial radiotherapy: results of trial ALL-BFM 90. German-Austrian-Swiss ALL-BFM Study Group. *Blood* 2000;95:3310-22.
4. Caldwell CW, Poje E, Helikson MA. B-cell precursors in normal pediatric bone marrow. *Am J Clin Pathol* 1991;95:816-23.
5. Muehleck SD, McKenna RW, Gale PF, Brunning RD. Terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT)-positive cells in bone marrow in the absence of hematologic malignancy. *Am J Clin Pathol* 1983;79:277-84.
6. Longacre TA, Foucar K, Crago S, Chen IM, Griffith B, Dressler L, et al. Hematogones: a multiparameter analysis of bone marrow precursor cells. *Blood* 1989;73:543-52.
7. Davis RE, Longacre TA, Cornbleet PJ. Hematogones in the bone marrow of adults. Immunophenotypic features, clinical settings, and differential diagnosis. *Am J Clin Pathol* 1994;102:202-11.
8. Lucio P, Gaipa G, van Lochem EG, van Wering ER, Porwit-MacDonald A, Faria T, et al. BIOMED-I concerted action report: flow cytometric immunophenotyping of precursor B-ALL with standardized triple-stainings. BIOMED-I Concerted Action Investigation of Minimal Residual Disease in Acute Leukemia: International Standardization and Clinical Evaluation. *Leukemia* 2001;15:1185-92.
9. Ciudad J, Orfao A, Vidriales B, Macedo A, Martinez A, Gonzalez M, et al. Immunophenotypic analysis of CD19+ precursors in normal human adult bone marrow: implications for minimal residual disease detection. *Haematologica* 1998;83:1069-75.
10. Vogel P and Bassen FA. Sternal marrow of children in normal and pathologic states. *Am J Dis Child* 1939;57:245-68.
11. McKenna RW, Asplund SL, Kroft SH. Immunophenotypic analysis of hematogones (B-lymphocyte precursors) and neoplastic lymphoblasts by 4-color flow cytometry. *Leuk Lymphoma* 2004;45:277-85.
12. Van Dongen JJ, Szczepanski T, de Bruijn MA, van den Beemd MW, de Bruin-Versteeg S, Wijkhuijs JM, et al. Detection of minimal residual disease in acute leukemia patients. *Cytokines Mol Ther* 1996;2:121-33.
13. Ciudad J, San Miguel JF, Lopez-Berges MC, Garcia Marcos MA, Gonzalez M, Vazquez L, et al. Detection of abnormalities in B-cell differentiation pattern is a useful tool to predict relapse in precursor-B-ALL. *Br J Haematol* 1999;104:695-705.
14. Dworzak MN, Fritsch G, Fleischer C, Printz D, Froschl G, Buchinger P, et al. Comparative phenotype mapping of normal vs malignant pediatric B-lymphopoiesis unveils leukemia-associated aberrations. *Exp Hematol* 1998;26:305-13.
15. Cap J, Babusikova O, Kaiserova E, Jamarik M. Expression of CD10, CD19 and CD34 markers in bone marrow samples of children with precursor B cell acute lymphoblastic leukemia in clinical and hematological remission. *Neoplasma* 1998;45:231-6.
16. Hurwitz CA, Loken MR, Graham ML, Karp JE, Borowitz MJ, Pullen DJ, et al. Asynchronous antigen expression in B lineage acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 1988;72:299-307.
17. Dworzak MN, Fritsch G, Fleischer C, Printz D, Froschl G, Buchinger P, et al. Multiparameter phenotype mapping of normal and post-chemotherapy B lymphopoiesis in pediatric bone marrow. *Leukemia* 1997;11:1266-73.
18. Ciudad J, San Miguel JF, Lopez-Berges MC, Garcia Marcos MA, Gonzalez M, Vazquez L, et al. Detection of abnormalities in B-cell differentiation pattern is a useful tool to predict relapse in precursor-B-ALL. *Br J Haematol* 1999;104:695-705.
19. Farahat N, Morilla A, Owusu-Ankomah K, Morilla R, Pinkerton CR, Treleaven JG, et al. Detection of minimal residual disease in B-lineage acute lymphoblastic leukaemia by quantitative flow cytometry. *Br J Haematol* 1998;101:158-64.
20. Lavabre-Bertrand T, Janossy G, Ivory K, Peters R, Secker-Walker L, Porwit-MacDonald A. Leukemia-associated changes identified by quantitative flow cytometry: I. CD10 expression. *Cytometry* 1994;18:209-17.