

Minimal Residual Disease Detection in Acute Leukemia Patients by Flow Cytometric Assay of Cross-lineage Antigen Expression

Young-Uk Cho, M.D.^{1,4}, Chan-Jeoung Park, M.D.¹, Choong-Hwan Cha, M.D.^{1,5}, Hyun-Sook Chi, M.D.¹, Seongsoo Jang, M.D.¹, Mi-Jung Kim, Ph.D.¹, Kyoo-Hyung Lee, M.D.², Je-Hwan Lee, M.D.², Jung-Hee Lee, M.D.², Jong Jin Seo, M.D.³, and Ho Joon Im, M.D.³

Departments of Laboratory Medicine¹, Internal Medicine², and Pediatrics³, University of Ulsan College of Medicine and Asan Medical Center, Seoul; Department of Laboratory Medicine⁴, Eulji General Hospital, Eulji University School of Medicine, Seoul; Department of Laboratory Medicine⁵, Gangneung Asan Hospital, Gangneung, Korea

Background : It has been demonstrated that flow cytometric detection of minimal residual disease (MRD) has a prognostic significance in the treatment of patients with acute leukemia. We investigated the significance of flow cytometric MRD detection for the first time in Korea.

Methods : We analyzed the results of MRD detection in morphologically complete remission bone marrow aspirates from 89 patients with newly-diagnosed or relapsed acute leukemia, in which leukemic cells had cross-lineage antigen expression. Patients were grouped based on MRD frequencies: $\geq 1.0\%$, high MRD; $< 1.0\%$, low MRD.

Results : Forty-seven ALL patients consisted of 10 with high and 37 with low MRD levels. Patients with high MRD levels showed a tendency of more frequent relapse than those with low MRD levels (40.0% and 13.5%, respectively) ($P=0.08$). High MRD group showed a tendency of short relapse-free survival (RFS) and overall survival (OS), although the differences were not statistically significant. Forty-two AML patients consisted of 16 with high and 26 with low MRD levels. There were no correlations between the MRD levels and relapse rate, RFS or OS. AML patients with high MRD levels showed significantly higher rate of unfavorable cytogenetic risk categories and lower rate of favorable risk categories ($P=0.03$).

Conclusions : MRD detection by flow cytometric assay of cross-lineage antigen expression would be useful in predicting treatment outcome in patients with ALL rather than AML. We expect that the establishment of the standardization of methods, time to test or antibody combination would be achieved through further trials in this country. (*Korean J Lab Med 2010;30:533-9*)

Key Words : Minimal residual disease, Acute leukemia, Flow cytometric assay, Cross-lineage antigen expression

서론

급성백혈병의 치료에서 완전관해의 정의는 주로 형태학적 관

찰에 의존하고 있다. 그러나 형태학적 접근은 재발의 원인이 되는 소수의 잔존 백혈병 세포를 민감하게 검출할 수 없을뿐더러 관찰자의 주관에 개입되어 객관성을 확보할 수 없다는 한계를 지니고 있다. 그러므로 잔존 백혈병 세포의 정도를 민감하고 객관적으로 측정하여 치료효과를 보다 정확하게 평가할 수 있다면 이에 근거하여 적절한 치료가 가능하다. 즉 관해유도 치료 후 높은 미세잔존질환(minimal residual disease, MRD)을 보이는 경우, 보다 강화된 치료를 통해 재발의 위험도를 낮추어 생존율을 높일 수 있고, 치료 후 미세잔존질환이 거의 측정되지 않는 경우라면 항암제의 종류 또는 용량을 조절하여 부작용을 줄이면서도 향상된 치료효과를 꾀할 수도 있다.

Received : April 15, 2010

Manuscript No : KJLM10-067

Revision received : August 31, 2010

Accepted : October 20, 2010

Corresponding author : Chan-Jeoung Park, M.D.

Department of Laboratory Medicine, Asan Medical Center,
388-1 Poongnap 2-dong, Songpa-gu, Seoul 138-736, Korea
Tel : +82-2-3010-4508, Fax : +82-2-478-0884
E-mail : cjpark@amc.seoul.kr

*This study was supported in part by grant "the National R&D Program for Cancer Control (0520290)" from the Ministry of Health & Welfare of Korea.

ISSN 1598-6535 © The Korean Society for Laboratory Medicine

유세포분석(flow cytometry)은 현재 급성백혈병의 MRD 측정을 위해 널리 사용되고 있다. 백혈병 세포는 정상 혈액이나 골수세포에서는 발현되지 않거나 매우 드물게 발현되는 면역표현형을 보이는데, 이를 백혈병 연관 표현형(leukemia-associated phenotype, LAP)이라 한다. 대표적인 LAP로는 하나의 세포에 분화 초기와 후기의 항원이 혼재하는 항원 표현의 부조화(asynchronous antigen expression), 골수성백혈병 세포에 림프모구백혈병 세포의 항원이 표현되는 또는 림프모구백혈병 세포에 골수성 항원이 표현되는 교차계열 항원 표현(cross-lineage antigen expression), 항원의 과표현, 계열 특이 항원의 소실 등이 있다[1]. 유세포분석을 통한 MRD 모니터링은 이러한 LAP를 측정함으로써 이루어진다[1-5].

유세포분석에 의한 면역표현형 검사는 이미 급성백혈병의 진단 및 분류에 있어 필수적인 도구로 정착되어 있다. 외국에서는 초기 진단에서 한 발 더 나아가 1990년대 후반부터 급성백혈병에서 유세포분석을 이용한 MRD 측정에 대한 많은 연구가 시도되어 재발위험도 또는 생존 예측 및 치료방식 선택에 있어 유용하다는 보고가 지속적으로 이루어지고 있다[6-22]. 반면 국내에서는 이에 대한 연구가 아직 미진하여 저자들이 검색한 바로는 유세포분석을 이용한 급성백혈병의 MRD 측정에 관한 보고가 아직 없고, 단지 '급성백혈병의 완전관해 골수에서 항원성 이상 세포의 분포'에 관한 보고가 있을 뿐이다[23]. 따라서 국내에서도 유세포분석을 활용한 급성백혈병의 MRD 측정이 급성백혈병의 치료 후 예후 예측 및 치료 방침 결정에 이용되어 질병 극복에 기여하여야 할 것으로 생각한다. 이에 저자들은 단일 기관 급성백혈병 환자들을 대상으로 유세포분석을 이용한 MRD 측정의 의의를 분석하고, 이를 통해 향후 국내 검사실에서 유세포분석 MRD 측정이 활발히 시행되어 일상검사로 정착되는데 도움이 되고자 하였다.

재료 및 방법

1. 대상군 및 검색

급성백혈병으로 처음 진단되었거나 형태학적으로 재발한 환자들 중 처음 진단 또는 재발 시 면역표현형 검사에서 정상 골수에서 발현되지 않는 교차계열항원이 표현되며, 관해유도 치료 후 형태학적 관해 판정을 받은 환자들을 대상으로 하였다. 급성백혈병의 진단 당시 사용한 면역표현형검사의 패널은 Table 1과 같다. 2004년 5월부터 2007년 2월까지 47명의 ALL 환자와 42명의 AML 환자를 대상으로 하였다. MRD는 관해유도 또는

Table 1. Monoclonal antibody panel for immunophenotyping of acute leukemia

	FITC	PE	PerCp	APC
AML	CD14	CD33	CD41	CD45
	CD65	CD10	CD3	CD45
	CD56	CD117	CD34	CD45
	CD19	CD13	CD7	CD45
	CD15	CD2	-	CD45
	TdT	cytoCD22	cytoCD3	-
	ALL	CD2	CD13	CD7
	CD56	CD33	CD3	CD45
	CD19	CD10	CD34	CD45
	CD5	CD20	-	CD45
	TdT	cytoCD22	cytoCD3	-
	-	surfaceIgM	-	-
	-	cytoIgM	-	-

Abbreviations: FITC, fluorescein isothiocyanate; PE, phycoerythrin; PerCp, peridinin-chlorophyll-protein; APC, allophycocyanin.

공고요법 항암치료 후 형태학적으로 완전관해 소견을 보인 골수 검체로 측정하였다.

2. 유세포분석을 이용한 MRD 측정

MRD 검출을 위한 유세포분석검사는 진단 시 나타난 교차계열항원 양상을 이용하여 단클론항체를 조합하여 형광염색을 시행하였다. 이때 양성인 교차계열항원으로 4색 형광 조합을 만들기 위하여 진단 시 사용한 형광 결합 항체 외에도 CD33-FITC, CD7-FITC, CD19-PE를 추가로 사용하였다. 형광염색 후 적혈구를 용혈시킨 다음 혈소판과 세포 부스러기(debris)가 분석에서 제외되도록 역치(threshold)를 정하여 입력하고, 20,000개의 세포를 획득하였다. MRD 측정은 Kern 등[24]이 고안한 연속 gating법으로 분석하였다. 첫째 단계로 백혈병세포의 형태학적 특징을 고려하여 CD45가 약양성이거나 음성이며 낮은 side scatter 영역에 분포하는 세포들을 gating하였고, 둘째 단계는 gating된 세포에서 다수의 백혈병세포가 양성인 계열별 양성세포(AML의 경우 CD13/CD34 또는 CD33/CD34, B계열 ALL의 경우 CD19/CD34, T계열 ALL의 경우 CD7/CD34, 드물게 CD34가 음성인 경우 주계열 양성 표지자/side scatter cytogram [SSC])을 다시 gating한 다음, 셋째 단계에서 두 번째 gating된 세포 가운데 교차계열항원 양성을 보이는 세포를 측정하여 전체 유효세포에서의 백분율로 나타내었다. Fig. 1과 같이 진단 당시 CD13양성 골수모구가 CD19양성 소견을 보인 경우, 항암화학요법 후 형태학적으로 완전관해를 나타내는 골수를 CD19-FITC/CD13-PE/CD34-PerCP/CD45-

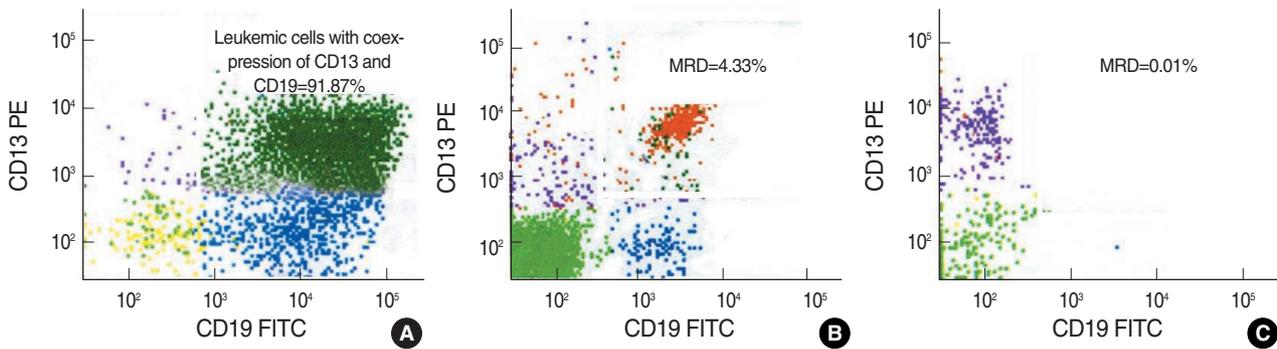


Fig. 1. MRD detection in the bone marrow aspirates from an ALL patient at diagnosis (A), and patients with morphological remission (B and C). The leukemia-associated phenotype includes CD13 and CD19 expression. The MRD levels were 4.33% (B) and 0.01% (C). Abbreviations: PE, phycoerythrin; FITC, fluorescein isothiocyanate; MRD, minimal residual disease.

Table 2. Characteristics of patients with acute leukemia

Characteristics	ALL patients (N=47)	AML patients (N=42)
Age (yr)	7 (1-62)	41 (1-69)
Pediatric/adult	32/15	7/35
Sex (M/F)	33/14	25/17
Cross-lineage antigen expression*		
CD13	20	CD7 14
CD13 & CD33	15	CD56 & CD19 8
CD33	5	CD56 8
Others [†]	7	CD19 4
		Others [‡] 8
Cytogenetic risk categories		
Favorable	19	18
Intermediate	12	18
Unfavorable	11	4
Unknown	5	2
Follow-up duration (months)	14 (3-40)	12 (3-28)

All continuous variables are expressed as median (range).

*Fluorochromes conjugated with monoclonal antibody: CD13-PE, CD33-PE or FITC, CD3-PerCP, CD7-PerCP or FITC, CD19-FITC or PE, CD56-FITC; [†]CD7 in 3 patients; CD7 & CD13 in 2 patients; CD56 in 1 patient; CD7 & CD33 in 1 patient; [‡]CD7 & CD56 in 5 patients; CD7 & CD19 in 2 patients; CD10 & CD56 in 1 patient.

APC로 염색하여 CD45 dim/SSC low로 gating하고, 다시 CD13+/CD34+로 gating한 다음, CD19/CD13 cytogram을 분석하여, CD19+/CD13+ 양성인 CD19 양성 골수모구의 전체 유핵 세포에서의 백분율을 구하였다. 사용한 유세포분석기는 FAC-SCanto (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA)였고, 분석 소프트웨어는 FACS Diva (Becton Dickinson)였다. MRD의 임상적 유용성을 평가하고자 MRD 수준이 높은 군과 낮은 군으로 나누어 재발, 무재발생존기간, 전체생존기간을 비교하였다. 두 군을 나누는 기준은 다른 연구자들의 기준을 참고하였고[7, 13], MRD 결과의 분포와 분석의 편의를 고려하여 0.1%, 0.5%, 1.0%로 각각 설정하여 분석하였다. 또한 임상 경과 및 예후를 결정하는 중요인자로 알려져 있는 세포유전학적 소견과의 관련성도 분석하였다.

3. 통계분석

MRD 크기에 따른 환자군의 비교에는 연속변수의 경우 Mann-Whitney test를, 순위변수의 경우 Fisher's exact test를 이용하였다. 무재발생존곡선 및 전체생존곡선 분석은 Kaplan-Meier 방법을 이용하여 평가하였다. 모든 통계분석은 MedCalc[®] version 9.1.0.1 (MedCalc Software, Mariakerke, Belgium)를 사용하였으며, 유의수준은 P<0.05로 하였다.

결 과

대상군의 특성은 Table 2에 요약하였다. 높은 MRD의 3가지 기준들 중 1.0%를 적용하였을 때, 0.5%와 0.1%보다 상대적으

Table 3. Clinical characteristics according to the MRD levels

MRD group	ALL patients				AML patients			
	N	Relapse (%)	RFS (months)	OS (months)	N	Relapse (%)	RFS (months)	OS (months)
High ($\geq 1.0\%$)	10	4 (40.0)*	9.9	10.9	16	5 (31.3) [†]	8.8	9.7
Low ($< 1.0\%$)	37	5 (13.5)*	13.3	13.8	26	5 (19.2) [†]	9.2	12.8
High ($\geq 0.5\%$)	14	4 (28.6)	10.0	10.6	22	5 (22.7)	8.4	8.8
Low ($< 0.5\%$)	33	5 (15.2)	13.5	14.0	20	5 (25.0)	9.4	13.6
High ($\geq 0.1\%$)	35	7 (20.0)	10.0	10.5	34	7 (20.6)	8.6	9.7
Low ($< 0.1\%$)	12	2 (16.7)	16.7	16.9	8	3 (37.5)	9.6	15.5

All continuous variables are expressed as median.

* $P=0.08$; [†] $P=0.46$.

Abbreviations: MRD, minimal residual disease; RFS, relapse-free survival; OS, overall survival.

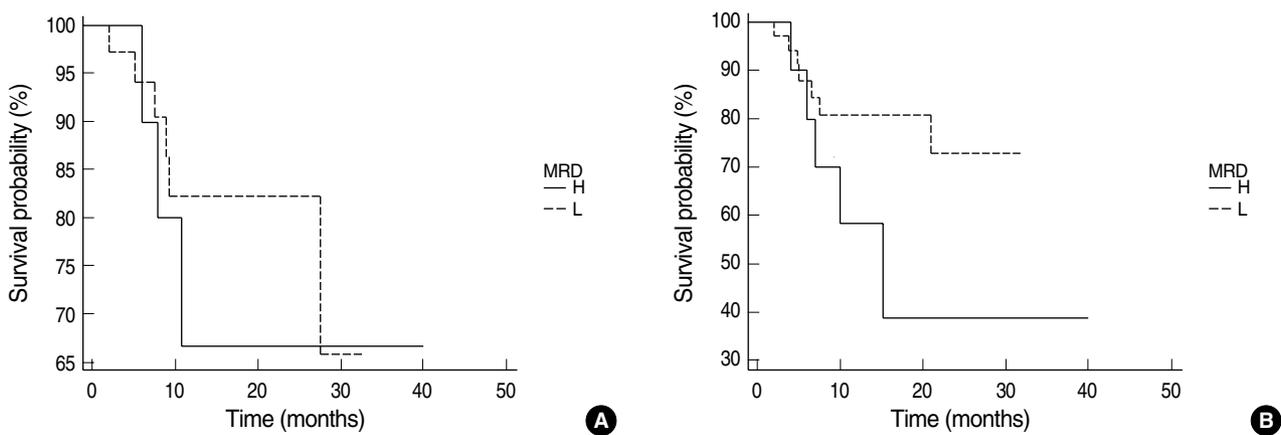


Fig. 2. Prognostic significance of minimal residual disease (MRD) frequency in bone marrow aspirates after morphological remission in ALL patients. (A) High MRD group showed a tendency of shorter relapse-free survival (RFS) than low MRD group using a cutoff level of 1.0% ($P=0.11$). (B) High MRD group also showed a tendency of shorter overall survival (OS) than low MRD group ($P=0.54$).

Table 4. Distribution of the MRD groups according to the time of sample collection

MRD group	ALL patients		AML patients	
	Post-induction (N=26)	Post-consolidation (N=21)	Post-induction (N=27)	Post-consolidation (N=15)
High ($\geq 1.0\%$)	3	6	9	7
Low ($< 1.0\%$)	23	15	18	8

Abbreviation: MRD, minimal residual disease.

로 높은 임상적 분별력을 보였다(Table 3). MRD 1.0%를 기준으로 하였을 때, ALL 환자군에서 높은 MRD군이 10명, 낮은 MRD군이 37명이었다. 임상경과 중 재발은 높은 MRD군에서 4명(40.0%), 낮은 MRD군에서 5명(13.5%)으로 높은 MRD군에서 재발률이 높은 경향을 보였다($P=0.08$). 무재발생존 및 전체 생존 기간의 중앙값은 높은 MRD군에서 각각 9.9개월과 10.9개월로 낮은 MRD군의 13.3개월과 13.8개월에 비해 불량한 결

과를 보였으나 통계적으로 유의한 차이는 없었다(각각 $P=0.11$ 과 $P=0.54$) (Table 3, Fig. 2). AML 환자군의 경우 높은 MRD군이 16명, 낮은 MRD군이 26명이었다. 추적기간 중 재발은 높은 MRD군에서 5명(31.3%), 낮은 MRD군에서 5명(19.2%)으로 높은 MRD군에서 상대적으로 높은 재발률을 보였으나 통계적으로 유의한 차이는 없었다($P=0.46$). 무재발생존 및 전체생존 기간의 중앙값은 높은 MRD군에서 각각 8.8개월과 9.7개월, 낮은 MRD군에서 각각 9.2개월과 12.8개월로 통계적으로 유의한 차이는 없었다(각각 $P=0.39$ 과 $P=0.24$) (Table 3). 검체 채취 시기에 따른 MRD군 분포의 통계학적 차이는 없었다(Table 4).

ALL 환자의 경우 MRD 정도와 세포유전학적 예후군[25] (양호군, 불량군, 표준 예후군) 분포와의 상관성이 없었다. 그러나, AML 환자에서는 높은 MRD군에서 낮은 MRD군보다 세포 유전학적 예후 불량군의 빈도가 높았고, 양호군의 빈도가 낮았던 반면, 낮은 MRD군에서는 그 반대의 결과를 보여 통계적으로 유의한 차이를 나타내었다($P=0.03$) (Table 5).

Table 5. Relation between MRD groups and cytogenetic risk categories

MRD group	Cytogenetic risk categories in ALL patients (<i>P</i> =0.29)				Cytogenetic risk categories in AML patients (<i>P</i> =0.03)				
	F	I	U	US	F	I	U	US	
High (≥ 1.0%)	6 (60.0%)	1 (10.0%)	2 (20.0%)	1 (10.0%)	3 (18.8%)	9 (56.3%)	3 (18.8%)	1 (6.3%)	
Low (< 1.0%)	13 (35.1%)	11 (29.7%)	9 (24.3%)	4 (10.8%)	15 (57.7%)	9 (34.6%)	1 (3.8%)	1 (3.8%)	

Abbreviations: MRD, minimal residual disease; F, favorable; I, intermediate; U, unfavorable; US, unknown significance.

고 찰

급성백혈병의 치료에 있어 정기적인 골수검사를 통한 치료효과 판정은 필수적인 요소이다. 그러나 백혈병 세포와 정상적인 조혈계 전구세포를 형태학적으로 완벽하게 판별하는 것은 아무리 숙련된 진단검사의학 전문의에게도 거의 불가능한 일이기 때문에, 아세포가 관찰되더라도 유핵세포 감별계산의 5% 미만이면 형태학적 완전관해로 판정하고 있다. 따라서 형태학적 완전관해 판정을 받은 일부 환자에서 실제로는 상당한 수준의 백혈병 세포가 잔존해 있을 가능성이 있으며, 이러한 환자들은 생물학적으로 필요한 치료보다 낮은 수준의 치료를 받을 수 있다 [4]. 이와는 반대로 백혈병 세포 수를 과다하게 판정한 경우에는 불필요한 강화치료를 실시하여 결과적으로 항암치료의 독성에 노출될 가능성이 있다[4]. 최근 10여 년간 급성백혈병 치료 후 MRD를 보다 민감하고 객관적으로 측정할 수 있는 방법 및 이의 의의에 대한 연구들이 이루어져 왔다. 현재 세포표면항원을 분석하는 유세포분석과 유전자의 클론 변화나 분자생물학적 융합 전사를 검출하는 PCR이 임상적인 유용성을 보이는 MRD 검출 방법으로 알려져 있다[2-5]. 그러나 유세포분석과 PCR 중 어느 것이 MRD 모니터링의 일상검사법으로 최적인가에 대해서는 아직 확실한 결론이 없다. PCR (10^{-4} - 10^{-6})이 유세포분석(10^{-3} - 10^{-4})보다 좀 더 나은 민감도를 보이긴 하지만, 일상검사로 적용 시 고려해야 할 점 즉, 검사소요시간, 검사의 복잡성, 비용 등에서 어느 한 쪽이 다른 쪽을 확고하게 압도하지 못하기 때문이다 [4, 5]. 그러나 유세포분석이 PCR보다 신속하게 결과를 낼 수 있고, 임상적으로 적용하기 쉬우며 비용이 덜 든다는 것이 일반적으로 받아들여지는 유세포분석의 상대적인 장점이다[4, 5].

항체조합의 종류와 수, 적용한 LAP의 특질, 검체 채집 시기 등이 연구마다 다양하므로 임상적인 의미를 갖는 MRD의 기준에 대해 일률적으로 정의할 수는 없다. 지금까지의 연구 결과들을 살펴보면 항암치료 기간이 길수록 예후적 의미를 갖는 MRD의 역치가 낮아지는 경향을 보이기는 하지만, 계열에 상관없이 0.01%에서 1.0%까지의 범위 내에서 제시되고 있음을 알 수 있다[7, 8, 10-14, 16-18, 21, 22]. 본 연구에서는 이전 보고에서

사용하였던 기준과 실제 MRD 결과의 분포와 분석의 편의를 고려하여 높은 MRD의 기준을 0.1%, 0.5%, 1.0%로 설정하였는데, 1.0%를 기준으로 나누었을 때가 0.5% 또는 0.1%보다 상대적으로 유의한 임상적 분별력을 나타내었다.

지금까지 많은 연구들을 통해 유세포분석을 이용한 MRD 측정이 급성백혈병의 예후인자로 인정받고 있다. 소아 ALL 환자군에서는 관해 후 MRD 수준이 강력하면서도 독립적인 예후인자로 알려져 있다[6-12]. 195명의 소아 ALL 환자를 대상으로 한 연구에서는 높은 MRD를 보인 환자들(관해유도 치료 후 1% 이상 또는 지속적인 치료 14주 후 0.1% 이상)이 MRD가 검출되지 않은 환자들보다 유의하게 높은 재발률을 보였다[7]. 최근 2,143명의 소아 B세포 ALL 환자를 대상으로 세 가지 시점(관해유도 8일, 29일, 공고요법 후)에서 실시한 유세포분석 MRD의 의의에 대한 연구결과가 보고되었는데, 관해유도 8일과 29일째 측정된 MRD가 예후적 의미가 있었다. 특히 29일째 측정된 MRD가 0.01% 이상인 경우 다변량분석에서도 다른 어떤 변수보다 강력한 예후인자이었다[12]. 본 연구의 ALL 환자군에서도, 통계학적으로 유의하지는 않았으나, 높은 MRD군에서 낮은 MRD군보다 높은 재발률 및 짧은 생존기간 등 불량한 임상 경과를 보였다.

AML 환자를 대상으로 한 연구에서도 관해 후 MRD 정도와 임상 경과와의 연관성이 지속적으로 보고되고 있다[13-22]. 53명의 AML 환자를 대상으로 한 초기 연구에서 관해유도 후 MRD가 0.5% 이상인 환자들과 0.5% 미만인 환자들보다 유의하게 높은 재발률을 보였다[13]. 이후 56명의 환자를 대상으로 한 연구에서는 공고요법 후 MRD가 0.035% 이상인 환자들과 그 미만인 환자들보다 유의하게 높은 재발률을 보였고, 세포유전학적 표준 및 불량 예후군, MDR1 표현형, 짧은 무재발생존 및 전체생존 등과 상관성을 보였다[14]. 72명의 환자를 대상으로 한 최근 연구에서는 백분율로 표현된 MRD뿐 아니라 mL당 세포수로 나타낸 절대값도 임상결과를 예측할 수 있는 표지자라고 하였다[21]. 본 연구의 AML 환자군에서는 높은 MRD군이 낮은 MRD군보다 상대적으로 높은 재발률 및 짧은 생존기간을 보였으나 그 차이가 ALL에 비해 작았다. 이러한 결과의 원인으로는

적은 대상 수, 짧은 추적기간, ALL에 비해 AML 백혈병 세포가 보이는 면역표현형의 다양성 등을 생각할 수 있다.

본 연구 결과 특기할 만한 사항은 AML 환자의 경우 높은 MRD군에서 통계학적으로 유의하게 세포유전학적 예후 불량군의 빈도가 높고, 양호군의 빈도가 낮았다는 것이다. 일반적으로 치료 전 세포유전학적 소견은 급성백혈병 환자의 완전관해율, 완전관해 유지기간, 그리고 전체생존기간 등을 예측할 수 있는 강력한 예후인자로 알려져 있다[25]. 그러나 AML과는 달리 ALL 환자에서는 MRD군과 세포유전학적 예후군의 분포가 연관성이 없었다. 오히려 세포유전학적 예후 양호군에서 1.0% 이상의 높은 MRD의 빈도가 더 높게 분석되는 양상을 보였다. 이러한 소견의 원인으로는 역시 적은 대상 수와 짧은 추적기간 등을 들 수 있다. 하지만 높은 MRD가 측정된 ALL 환자에서 불량한 임상 경과를 보였다는 점을 고려하면, ALL에서는 유세포 분석에 의한 MRD 측정이 세포유전학적 분류와는 독립적으로 작용하는 예후인자일 수도 있다. 이에 대해서는 장기간 전향적 연구가 필요할 것으로 생각된다.

본 연구는 유세포분석을 통한 MRD 측정의 임상적 의의에 대해 국내에서 처음으로 기술한 보고이고, 교차계열 항원을 표현한 환자들만 대상으로 하여 분석에 사용한 항원의 수를 최소화함으로써 MRD 측정에 있어 유세포분석의 가용성을 제시하였다. 본 연구 결과 높은 MRD군에 속한 환자들이 불량한 임상 경과를 보이는 경향이 있었고, 이러한 경향은 AML보다 ALL에서 더 두드러졌다. 향후 국내에서도 더 많은 기관에서 유세포분석을 이용한 MRD 측정에 관한 연구가 이루어져 측정방법, 검사 시기, 항체조합 등에 대한 표준화가 이루어지고, 궁극적으로 환자 치료에 직접적인 도움이 되길 기대한다.

요 약

배경 : 급성백혈병의 치료에 있어 유세포 분석에 의한 미세잔존질환(minimal residual disease, MRD) 측정은 예후적 의의를 지니는 것으로 알려져 있다. 이에 저자들은 국내에서는 처음으로 유세포분석을 이용한 MRD 측정의 의의를 평가하고자 하였다.

방법 : 교차계열 항원을 표현하는 급성백혈병으로 처음 진단되었거나 형태학적으로 재발한 환자 89명의 완전관해 당시의 골수흡입 검체를 이용하여 MRD를 측정하였다. MRD 빈도에 따라 1.0% 이상은 높은 MRD군으로, 1.0% 미만은 낮은 MRD군으로 분류하였다.

결과 : 급성림프모구백혈병(ALL) 환자는 47명이었고, 높은

MRD군은 10명, 낮은 MRD군은 37명이었다. 높은 MRD군에서 낮은 MRD군보다 재발 빈도가 높은 경향을 보였다(각각 40.0%와 13.5%, $P=0.08$). 무재발생존율 및 전체생존율은 높은 MRD군에서 불량하였으나 통계학적 유의성이 없었다. 급성골수성백혈병(AML) 환자는 42명이었고, 높은 MRD군은 16명, 낮은 MRD군은 26명이었다. MRD의 정도에 따라 재발률, 무재발생존율, 전체생존율은 유의한 차이를 보이지 않았으나 높은 MRD군에서 통계학적으로 유의하게 세포유전학적 예후 불량군의 빈도가 높았고, 양호군의 빈도는 낮았다($P=0.03$).

결론 : 교차계열 항원의 유세포 분석을 이용한 MRD 측정은 AML보다 ALL 환자군에서 치료경과 예측에 유용할 수 있을 것으로 생각된다. 향후 국내에서도 추가 연구들을 통해 유세포분석의 측정법, 측정시기, 항체조합 등에 대한 표준화가 이루어질 것 기대한다.

참고문헌

- Vidriales MB, San-Miguel JF, Orfao A, Coustan-Smith E, Campana D. Minimal residual disease monitoring by flow cytometry. *Best Pract Res Clin Haematol* 2003;16:599-612.
- Chung NG, Buxhofer-Ausch V, Radich JP. The detection and significance of minimal residual disease in acute and chronic leukemia. *Tissue Antigens* 2006;68:371-85.
- Kern W, Haferlach C, Haferlach T, Schnittger S. Monitoring of minimal residual disease in acute myeloid leukemia. *Cancer* 2008;112:4-16.
- Campana D. Status of minimal residual disease testing in childhood haematological malignancies. *Br J Haematol* 2008;143:481-9.
- Al-Mawali A, Gillis D, Lewis I. The role of multiparameter flow cytometry for detection of minimal residual disease in acute myeloid leukemia. *Am J Clin Pathol* 2009;131:16-26.
- Ciudad J, San Miguel JF, Lopez-Berges MC, Vidriales B, Valverde B, Ocqueteau M, et al. Prognostic value of immunophenotypic detection of minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Oncol* 1998;16:3774-81.
- Coustan-Smith E, Sancho J, Hancock ML, Boyett JM, Behm FG, Raimondi SC, et al. Clinical importance of minimal residual disease in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2000;96:2691-6.
- Coustan-Smith E, Sancho J, Behm FG, Hancock ML, Razzouk BI, Ribeiro RC, et al. Prognostic importance of measuring early clearance of leukemic cells by flow cytometry in childhood acute lym-

- phoblastic leukemia. *Blood* 2002;100:52-8.
9. Dworzak MN, Froschl G, Printz D, Mann G, Potschger U, Muhlegger N, et al. Prognostic significance and modalities of flow cytometric minimal residual disease detection in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2002;99:1952-8.
 10. Coustan-Smith E, Gajjar A, Hijjiya N, Razzouk BI, Ribeiro RC, Rivera GK, et al. Clinical significance of minimal residual disease in childhood acute lymphoblastic leukemia after first relapse. *Leukemia* 2004;18:499-504.
 11. Coustan-Smith E, Ribeiro RC, Stow P, Zhou Y, Pui CH, Rivera GK, et al. A simplified flow cytometric assay identifies children with acute lymphoblastic leukemia who have a superior clinical outcome. *Blood* 2006;108:97-102.
 12. Borowitz MJ, Devidas M, Hunger SP, Bowman WP, Carroll AJ, Carroll WL, et al. Clinical significance of minimal residual disease in childhood acute lymphoblastic leukemia and its relationship to other prognostic factors: a Children's Oncology Group study. *Blood* 2008;111:5477-85.
 13. San Miguel JF, Martinez A, Macedo A, Vidriales MB, Lopez-Berges C, Gonzalez M, et al. Immunophenotyping investigation of minimal residual disease is a useful approach for predicting relapse in acute myeloid leukemia patients. *Blood* 1997;90:2465-70.
 14. Venditti A, Buccisano F, Del Poeta G, Maurillo L, Tamburini A, Cox C, et al. Level of minimal residual disease after consolidation therapy predicts outcome in acute myeloid leukemia. *Blood* 2000;96:3948-52.
 15. Plata E, Choremi-Papadopoulou H, Viglis V, Yataganas X. Flow-cytometric detection of minimal residual disease with atypical antigen combinations in patients with de novo acute myeloid leukemia. *Ann Hematol* 2000;79:543-6.
 16. San Miguel JF, Vidriales MB, Lopez-Berges C, Diaz-Mediavilla J, Gutierrez N, Canizo C, et al. Early immunophenotypical evaluation of minimal residual disease in acute myeloid leukemia identifies different patient risk groups and may contribute to postinduction treatment stratification. *Blood* 2001;98:1746-51.
 17. Venditti A, Tamburini A, Buccisano F, Del Poeta G, Maurillo L, Pannetta P, et al. Clinical relevance of minimal residual disease detection in adult acute myeloid leukemia. *J Hematother Stem Cell Res* 2002;11:349-57.
 18. Coustan-Smith E, Ribeiro RC, Rubnitz JE, Razzouk BI, Pui CH, Pounds S, et al. Clinical significance of residual disease during treatment in childhood acute myeloid leukaemia. *Br J Haematol* 2003;123:243-52.
 19. Kern W, Voskova D, Schoch C, Hiddemann W, Schnittger S, Haferlach T. Determination of relapse risk based on assessment of minimal residual disease during complete remission by multiparameter flow cytometry in unselected patients with acute myeloid leukemia. *Blood* 2004;104:3078-85.
 20. Kern W, Voskova D, Schoch C, Schnittger S, Hiddemann W, Haferlach T. Prognostic impact of early response to induction therapy as assessed by multiparameter flow cytometry in acute myeloid leukemia. *Haematologica* 2004;89:528-40.
 21. Feller N, van der Pol MA, van Stijn A, Weijers GW, Westra AH, Evertse BW, et al. MRD parameters using immunophenotypic detection methods are highly reliable in predicting survival in acute myeloid leukaemia. *Leukemia* 2004;18:1380-90.
 22. Buccisano F, Maurillo L, Gattei V, Del Poeta G, Del Principe MI, Cox MC, et al. The kinetics of reduction of minimal residual disease impacts on duration of response and survival of patients with acute myeloid leukemia. *Leukemia* 2006;20:1783-9.
 23. Shin S, Kahng J, Kim M, Lim J, Kim Y, Han K. Distribution of antigenic aberration in the bone marrow of acute leukemia in complete remission. *Korean J Lab Med* 2008;28:1-7. (신소영, 강지민, 김명신, 임지향, 김용구, 한경자. 급성백혈병 완전 관해 골수에서 항원형 이상 세포의 분포. *대한진단검사의학회지* 2008;28:1-7.)
 24. Kern W, Danhauser-Riedl S, Ratei R, Schnittger S, Schoch C, Kolb HJ, et al. Detection of minimal residual disease in unselected patients with acute myeloid leukemia using multiparameter flow cytometry for definition of leukemia-associated immunophenotypes and determination of their frequencies in normal bone marrow. *Haematologica* 2003;88:646-53.
 25. Mrozek K, Heerema NA, Bloomfield CD. Cytogenetics in acute leukemia. *Blood Rev* 2004;18:115-36.