mRNA In Situ Hybridization으로 확인된 Epstein Barr Virus-Associated Hemophagocytic Syndrome 1례

김정한 · 양창현 · 손영모 · 김호근*

연세대학교 의과대학 소아과학교실, 병리학교실*

서 론

Virus associated hemophagocytic syndrome(이하 VAHS)은 조직구 증식 증후군(histiocytosis syndrome)에 속하는 한 질환으로 여러종류의 바이러스 전신감염과 함께 발병되며 병리조직 소견상 양성 조직구의 증가와 활발한 적혈구 탐식을 보인다. 임상 증상으로는 발열, 간비장종대, 림프절종대, 범혈구 감소증, 간기능 장애, 범발성 혈관내응고 증후군 등이 나타난다. 국내에서도 수례[1-6]가 보고된 바 있으며 저자들은 국내에서는 처음으로 중합효소연쇄반응(polymerase chain reaction, 이하 PCR)과 Epstein-Barr virus encoded small RNA에 대한 in situ hybridization 방법을 이용하여 Epstein-Barr 바이러스(이하 EBV) 감염이 확인된 VAHS 1례를 경험하였기에 문헌고찰과 함께 보고하는 바이다.

증 례

환 아 : 김○○, 2세, 여자

주 소 : 발열, 경부 종괴

과거력 : 특이 사항 없음

가족력 : 특이 사항 없음

현병력 : 내원 7일전부터의 발열 및 3일전 우연히 발견된 경부의 종괴를 주소로 외부병원에서 Kawasaki disease 의심하에 치료중 증세 호전 없어 본원으로 전원되었다.

이학적 소견 : 혈압은 정상이였으며 맥박수는 분당 110회, 호흡수 분당 35회, 체온 40℃ 였다. 양측 안검 부종 및 삼출성 편도비대가 관찰되었고 공막과 피부에서 황달 소견은 관찰되지 않았다. 양측 경부에서는 1~2cm 크기의 고정된 림프절이 다수 촉지되었으며 이보다 작은 림프절이 양측 액와와 서혜부 에서도 발견되었다. 호흡음은 깨끗하였고 복부에서는 간과 비장이 양측 늑골 하연에서 5cm 정도 각기 촉지되었으며 압통은 동반되어 있지 않았다.

검사 소견(Table 1) : 입원당시 말초혈액 검사상 백혈구 11000/mm^3 (중성구 27%, 림프구 66%,비정형 림프구 11%), 혈색소 9.4g/dl, 적혈구 용적치 29.7%, 혈소판 184,000/mm^{3}였으며 CRP는 36.2 mg/l였고 prothrombin time(이하 PT), partial thromboplastin time(이하 PTT)은 정상 이었다. 생화학적 검사상 AST 61IU/L, ALT 36IU/L, 혈청 단백질 6.2g/dl, 알부민 3.2g/dl, 총 빌리루빈 0.5 mg/dl로 정상 소견 보였으며 LDH 433U/L, triglyceride 358 mg/dl, ferritin 1500 ng/ml로 증가되어 있었다. EBV 혈청학적 검사상 EBV early antigen (EA) IgM 1.516 양성 (cutoff 0.179), EBV early antigen(EA) IgG 음성, EBV-determined nuclear antigen(EBNA) IgG 0.151 양성 (cutoff 0.163) 이었으며, 말초혈액에서 검사한 EBV PCR 결과는 음성이였으나 골수혈액에서는 양성반응을 나타내었다 (Fig. 2). 이외 cytomegalovirus, herpes simplex virus, rubella, toxoplasma에 대한 항체는 모두 음성이었고 VDRL은 1:1 약양성이었다. 말초혈액 도말검사상 악성세포는 관찰되지 않았으며 비정형림프구의 증가 이외 특이할만한 소견은 없었다.

치료 및 경과 : 내원 당시 임상 소견상 전염성

Table 1. Laboratory Findings

	HD# 1	HD# 4	HD# 6	HD# 8	HD#10
WBC /mm^3	11000	16000	17700	10600	7800
Hb g/dl	9.4	8.5	10.4	8.5	7.3
Hct %	29.7	26.3	31.1	25.5	21.8
Platelet /mm^3	184K	115K	66K	10K	49K
Atypical lym %	11	21	13	17	18
PT %	93		65		40
PTT sec	29.8		44.9		94.2
D-dimer ng/ml			1000~2000		
Fibrinogen mg/dl			86		
AST IU/L	61		219		266
ALT IU/L	36		143		91
T.bil. mg/dl	0.5		1.6		3.5
T. pro. g/dl	6.2		5.5		6.0
Alb. g/dl	3.2		2.4		2.9
LDH U/L			433		
Triglyceride mg/dl			358		
Ferritin ng/ml			1500		

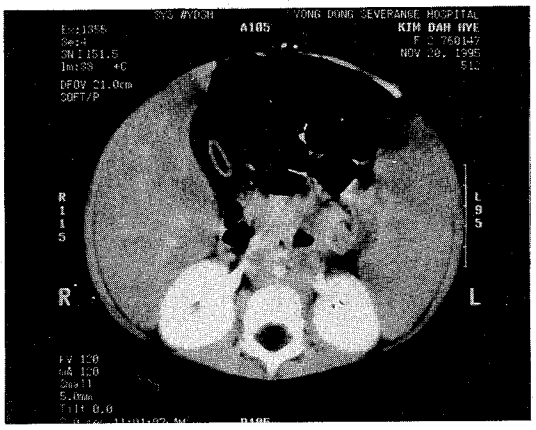

Fig. 1. Abdominal CT scan showing massive hepatosplenomegaly.

단핵구증 의심되어 항생제, acyclovir, dexamethasone을 정맥 투여하였고 혈액 검사상 혈소판수가 10,000/mm^{3}까지 감소하며 PT, PTT의 연장 및 D-dimer 양성반응 나와 범발성 혈관내 응고증 의심하에 Foy를 투여 하였다. IV globullin (400mg/kg/day) 5일 투여와 interferon-α(이하 IFN-α), VP-16으로 치료 시도하였으나 상태 호전 없었고, 간비장종대 및 편도 비대가 더욱 심해지면서 호흡

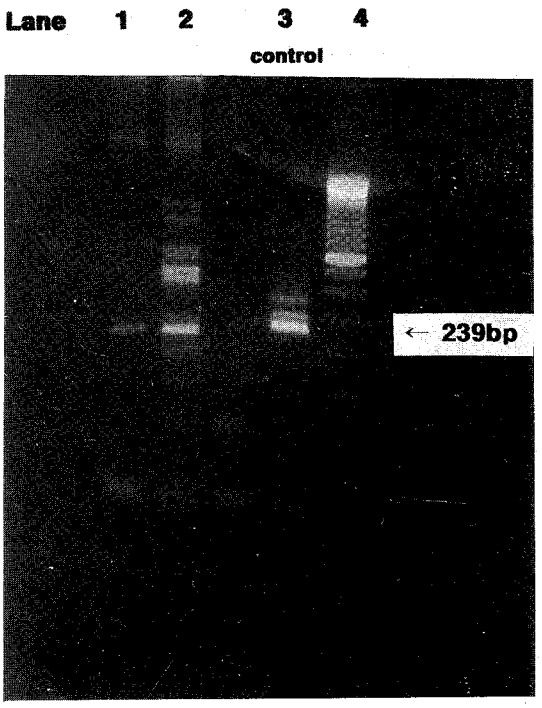

Fig. 2. Ethidium bromide stain of amplified DNA samples from bone marrow specimen. The amplified DNA was 239 base pairs in the region of gp220. (In the lane 2 the 239 base-paired amplified DNA is evident).

곤란 소견도 관찰되었다. 복부 초음파 추적 검사상 간실질에 증가된 에코가 특히 문맥(portal vein) 주위에서 현저함을 보였고 이는 부검(autopsy)을 하지 못해 병리소견을 확인 할 수는 없었다. 이외 복강내에서는 소량의 복수가 관찰되었으며 국소 공간 점유 병소는 없었다.

입원 10일째 호흡곤란 있어 기관내삽관 시행하였으며 이때 위장관 및 폐출혈 소견이 관찰되었다. 환아는 입원 12일째 심한 폐출혈로 사망하였고 사망직후 시행한 부검(necropsy) 및 골수 천자도말검사상 골수, 경부 림프절, 비장에서 적혈구를 탐식하는 양성 조직구의 침윤과 증식을 관찰 할 수 있었으며(Fig. 3) 경부림프절조직에서 시행한 EBV에 대한 mRNA in situ hybridization 검사를 통하여 EBV의 존재를 핵에서 확인 할 수 있었다(Fig. 4).

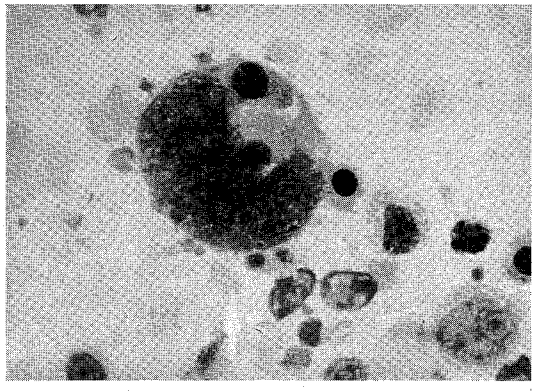

Fig. 3. Bone marrow aspiration smear showed proliferation of histiocytes and frequent erythrophagocytosis.

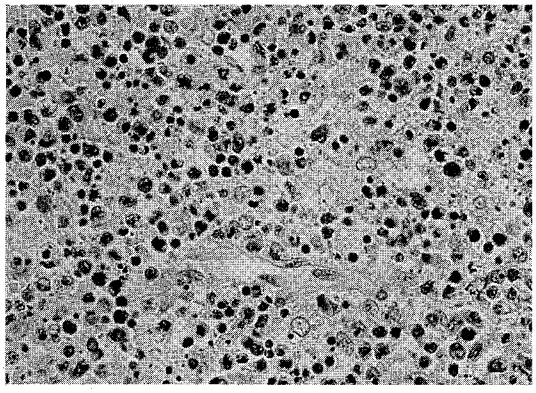

Fig. 4. Epstein-Barr virus encoded small RNA expression is identified in tumor cell nuclei by mRNA in situ hybridization using EBV specific oligoprobe.

고 찰

1979년 Risdall 등[7]에 의하여 처음 보고된 VAHS은 임상적으로 고열, 간비장 종대, 임파절 종대, 간기능 장애, 고페리틴증(hyperferritinemia), 고중성지방증(hypertriglyceridemia) 등을 보이며 전신적 바이러스 감염과 연관되어 나타나는 질환으로 조직학적으로 양성조직구의 증가와 현저한 혈구 탐식을 보인다. Risdall 등[7]이 처음 보고한 VAHS 19례중 15례에서 바이러스 감염을 입증하였으며 이중 cytomegalovirus 10례, EB virus 2례, 대상포진 바이러스, 단순포진 바이러스, 아데노 바이러스가 각각 1례 였다. 이후에도 보고된 원인 바이러스를 보면 hepatitis B virus[1], hepatitis A 와 Hepatitis C virus의 동시감염[8], measles virus[9], HIV 바이러스[10], Rubella virus[11] 등이 있으며 특히 EBV에 의한 경우가 다수 보고되고 있고 최근에는 EBV에 의한 VAHS의 예후가 가장 치명적이므로 다른 원인 바이러스와의 감별이 강조 되고 있다[12, 13].

Epstein Barr virus-associated hemophagocytic syndrome(이하EBV-AHS)은 동아시아의 유소아에서 비교적 흔히 발견되며 이는 이 지역에서 EBV의 초기 감염시의 나이가 수개월에서 2세라는 점과 연관성이 있다. EBV-AHS의 진단은 특징적인 임상

Table 2. Clinical Featrues and Laboratory Findings in Patients with EBV-VAHS

Clinical features	Fever
	Hepatosplenomegaly
	Lymphadenopathy
Laboratory findings	Pancytopenia
	Liver dysfunction
	Increased LDH
	Hypertriglyceridemia
	Hyperferritinemia
	Hypofibrinogenemia (DIC)
	Hypercytokinemia

양상(Table 2), 병리조직 소견, 혈청학적 검사에 의한 EBV 관련 항체의 검출등이 있으나 혈청학적 검사결과는 특히 면역억제 환자에서 해석에 논란이 있고 또한 EBV의 배양은 실용적이지 못하기 때문에 최근에는 PCR 과 RNA in situ hybridization 방법을 통한 바이러스 유전자의 직접적인 검출이 감염 확인에 중요시 되고 있다[14]. 따라서 본 증례에서도 경부림프절조직에서 시행한 mRNA in situ hybridization 방법을 이용하여 EBV를 검출 하였다.

본 환자에서 복부 초음파검사 추적상 간실질에 증가된 에코가 특히 문맥주위에서 현저함을 보였고 이는 부검을 하지 못해 병리소견을 확인할 수는 없었으나 Risdall 등[7], 한 등[5], Wu 등[8]이 VAHS 환자의 간부검시 관찰한 문맥주위의 조직구 침착과 활발한 혈구탐식 소견과 일치하는 것으로 추정된다.

본 환자에서 나타난 혈청 triglyceride, ferritin, LDH는 정상치에 비해 월등히 증가되어 있었는데 이는 최근 다른 보고와도 일치한다. Ferritin의 증가는 혈관내 응고증과 관련이 있으며[15], LDH의 상승과 더불어 VAHS에서 증가되는 cytokine과 상관관계가 있는 것 같다[16]. VAHS에서 관찰되는 양성조직구 증식과 이에 의한 혈구탐식의 원인은 아직 정확히 알려져 있지 않지만 반응성 조직구의 기능변화나 세포 표면항원의 변화에 의한 적혈구 탐식이 원인으로 추측되었다[17]. 혈구탐식과 혈액 응고장애의 기전은 림프세망 기관(lymphoreticular system)에서 증식된 EBV에 의한 면역기관의 자극과 VAHS에서 현저히 증가하는 혈청 cytokine과 관련된 것으로 생각되고 있다[18~23]. 다수의 cytokine이 acute phase reactants의 생성을 촉진하며 발열을 유도하거나 염증반응을 일으키는 것으로 알려져 있고, 이러한 염증반응에 대한 작용 이외에 면역조절의 기능이 있는데 VAHS에서도 cytokine의 역할이 연구되어 왔다[16, 19]. Ohga 등[16]은 VAHS 환자에서 여러 cytokine의 혈청내 농도를 측정하였으며 이 결과 IFN-γ 및 tumor necrosis factor (TNF)가 주요 역할을 한다고 보고 하였다. IFN-γ는 in vitro에서 항바이러스 작용을 하며, 대식세포의 활성화(macrophage activation)와 식작용(phagocytosis) 및 골수억제 상태를 강화하고 class II 주요 조직적합항원(major histocompatibility antigen complex)의 세포 표현을 조절한다[24]. 또한 TNF의 응혈촉진(procoagulant effect)과 이화작용(catabolic effect)으로 VAHS의 임상적 특징인 고열, 범혈구 감소증, 혈구탐식이 나타나는 것으로 생각된다. TNF의 응혈촉진 작용으로 인한 DIC와 저파이브리노젠혈증(hypofibrinogenemia)은 VAHS환자의 주요 사망원인이 출혈에 의함을 고려할때 혈중 TNF의 측정은 예후에 한 지표가 되겠다[21]. 실제 VAHS 환자중 혈중 TNF 상승을 동반하지 않고 IFN-γ만 상승시 혈액응고 장애는 발견 되지 않았다[16]. Cytokine은 바이러스 감염[25], 뇌막염[26, 27], 패혈증[28], 기타 악성질환[29] 등에서도 증가한지만 VAHS에서는 타질환에 비해 월등히 높아 VAHS는 hypercytokinemic condition의 임상적 표현이라고 볼수 있다[16]. 현재 가설로서는 활성화된 T 세포가 IL-2 와 IFN-γ의 분비 조절능력을 상실하여 대식세포(macrophage)의 혈구탐식을 유도하고 TNF의 유리를 증가시키는 것이다[30, 31]. 그러나 cytokine을 분비하는 T 세포를 자극하는 항원에 대해서는 밝혀진 바가 없다.

VAHS과 감별되어야 할 질환으로는 다른 조직구 증식 증후군이 있으며 histiocytic medullary reticulosis(이하 HMR), familial hemophagocytic lymphohistiocytosis(이하 FHL), X-linked lymphoproliferative syndrome(이하 XLP)가 포함 된다. 1939년 Scott과 Robb-Smith 등[32]에 의하여 발표된 HMR은 이후 Rappaport 등[33]에 의해 malignant histiocytosis로 분류 되었으며 VAHS와 주요 감별기준은 악성세포의 존재 및 비교적 적은 빈도로 관찰되는 혈구탐식이라 하겠다. 그러나 HMR로 진단받은 환자의 조직검사상 EBV에 감염된 비정형 조직구가 발견된 예[34]가 있으므로 HMR과 EBV 감염이 무관하다고는 할 수 없겠다[12]. FHL은 상염색체 열성 유전질환(autosomal recessive disorder)으로 생각이 되며 정확한 유전기전에 대해서는 알려진 바 없지만 대개 영아에 발병하면서 가족력이 있으며 예후가 불량하고, 바이러스 감염과의 연관성이 일부에서 보고되고 있어 HMR과 함께 VAHS와

의 정확한 감별이 모호한 경우가 많다[12, 35].

아직까지 VAHS에 대한 특별한 치료법은 없고 대증요법이 주된 치료로 행해지고 있다. Risdall 등[7]이 VAHS를 처음 보고시, 치료로서 세포독성제재나 면역억제재는 금기시 하였는데, 이는 이러한 제재에 의한 파종성 바이러스 감염증(disseminated viral infection)이 치명적인 효과를 초래할 수 있고 VAHS가 가역성의 양성질환으로 간주되었기 때문이다. McKenna 등[17] 역시 이러한 면역억제재의 사용을 금기시 하였으나 최근에는 Zovirax(Acyclovir) 이외 steroid, Ara-A, VP-16(epipodophyllotoxin), gamma globulin, interferon, plasmapheresis, 방사선 조사, 골수 이식, 비장 절제술, G-CSF 등이 시도되고 있다[36]. 따라서 본 환자에서도 acyclovir, IV globulin, IFN-α, VP-16등으로 치료를 하였으나 호전이 없었다. Kikuta[12, 36]와 Harabuchi 등[37]은 EBV-AHS가 종양으로 이행되는 전암상태의 가능성에 대해 언급하였고 이러한 이유로 세포독성제의 사용으로 EBV에 감염된 림프구를 제거함이 타당하다고 하였다. VP-16의 효과에 대한 정확한 통계는 아직 없는 상태이나 Takai 등[38]이 치료로 시도하여 일시적인 효과를 보았고 Kikuta[12]도 EBV-AHS 초기에 steroid와 병행투여 할 수 있으며 이에 대한 연구가 더 필요 하다고 하였다.

결 론

저자들은 국내에서는 처음으로 PCR과 Epstein-Barr virus encoded small RNA에 대한 in situ hybridization 방법을 이용하여 EBV 감염이 확인된 VAHS 1례를 경험 하였기에 문헌 고찰과 함께 보고하는 바이며 본 증례에서 세포독성제 및 면역억제재로 치료를 하였으나 범발성 혈관내 응고증에 의한 폐출혈로 사망하였고 앞으로 이의 병태생리기전이 더욱 규명되어야 치료에 도움이 되겠다.

참 고 문 헌

1) 최영미, 김진우, 임경수, 정인석, 김호균, 정영기: *B*형 간염 *Virus-Associated Hemophagocytic Syndrome 1*예. 대한내과학회지 *40(6):838-843, 1991*

2) 강양수, 양의종, 정해일, 박호진, 신미자: *Virus Associated Hemophagocytic Syndrome 1*례. 소아과 *32(4):567-575, 1989*

3) 최미란, 김원천, 심영학, 이경원: *Herpes Virus* 감염과 관련된 *Virus*성 혈구 탐식증 *1*예. 대한내과학회잡지 *30(2):383-389, 1986*

4) 강만춘, 송호신, 손창학, 이춘희, 박숙자: *Virus Associated Hemophagocytic Syndrome 3*예. 대한혈액학회잡지 *20(2):293-301, 1985*

5) 한재희, 이현철, 김황민, 김종수, 이경원: *Virus Associated Hemophagocytic Syndrome 2*례. 소아과 *36(10):1458-1465, 1993*

6) 한경아, 송태의, 김성희, 한창순 : 전신성 홍반성 낭창에 동반된 *Virus Associated Hemophagocytic Syndrome.* 대한혈액학회지 *24(2):509-514, 1989*

7) Risdall RJ, McKenna RW, Nesbit ME, Krivit W, Balfour HH, Simmons RL, Brunning RD: *Virus-associated hemophagocytic syndrome. Cancer 44:993-1002, 1979*

8) WU CS, Chang KY, Dunn P, Lo TH: *Acute hepatitis A with coexistent hepatits C virus infection presenting as a virus-associated hemophagocytic syndrome. Am J Gastroenterol 90(6):1002-1005, 1995*

9) Komatsuda A, Chubachi A, Miura AB: *Virus-associated hemophagocytic syndrome due to measles accompanied by acute respiratory failure. Intern Med 34(3):203-206, 1995*

10) Dalle JH, Dollfus C, Courpotin C, Tabone AM, Landman-Parker J, Leverger G, Lasfargues G: *Human immunodeficiency virus-associated hemophagocytic syndrome in children. Pediatr Infect Dis J 13(12):1159, 1994*

11) Marusawa H, Hamamoto K: *Virus-associated hemophagocytic syndrome due to rubella virus in an adult. Jpn J Clin Hematol 35(6):576-580, 1994*

12) Kikuta H: *Epstein-Barr Virus-Associated Hemophagocytic Syndrome. Leuk Lymphoma 16:425-429, 1995*

13) Yatabe Y, Mori N, Oka K, Iijima T, Saga S, Takada K, Asai J: *Fatal Epstein-Barr Virus-Associated Lymphoproliferative Disorder in Childhood. Arch Pathol Lab Med 119:409-417, 1995*

14) Telenti A: *Epstein-Barr virus and lymphoproliferative disorders: Basic concepts and diagnostic approach. Clin Immunol Newsl 11: 81-88, 1991*

15) Esmui N, Ikushima S, Hibi S, Todo S, Imashuku S: *High serum ferritin level as a marker of malignant histiocytosis and virus associated hemophagocytic syndrome. Cancer 61:2071-2076, 1988*

16) Ohga S, Matsuzaki A, Nishizaki M, Nagashima T, Kai T, Suda M, Ueda K: *Inflammatory Cytokines in Virus-associated Hemophagocytic Syndrome. Am J Pediatr Hematol Oncol 15(3):291-298, 1993*

17) McKenna RW, Risdall RJ, Brunning RD: *Virus associated hemophagocytic syndrome. Hum Pathol 12:395-398, 1981*

18) Ishii E, Ohga S, Aoki T, et al.: *Prognosis of children with virus associated histiocytic syndrome and malignant hitiocytosis: correlation with levels of serum interleukin-1 and tumor necrosis factor. Acta Haematol 85:93-99, 1991*

19) Komp DM, McNamara J, Buckley P: *Elevated soluble interleukin-2 receptor in childhood hemophagocytic histiocytic syndrome. Blood 73:2128-2132, 1989*

20) Dinarello CA: *Interleukin-1 and its biologically related cytokines. Adv Immunol 44: 153-205, 1989*

21) Grunfeld C, Palladino MA: *Tumor necrosis factor: immunologic, antitumor, metabolic, and cardiovascular activities. Adv Intern Med 35:45-72, 1990*

22) Platania LC, Vogelzang NJ: *Interleukin-1: biology, pathophysiology, and clinical prospects. Am J Med 89:621-629, 1990*

23) Morimoto A, Murakami N, Takeda M, Teshirogi S, Watanabe T: *Fever and acute phase response induced in rabbits by human recombinant interferon-γ. J Physiol 391:209-218, 1987*

24) Pestka S, Langer JA: *Interferons and their actions. Ann Rev Biochem 56:727-757, 1987*

25) Ohga S, Miyazaki C, Okada K, Akazawa K, Ueda K: *The inflammatory cytokines in measles: correlation between serum interferon-gamma levels and lymphocyte subpopulations. Eur J Pediatr 151:492-496, 1992*

26) Minamishima I, Ohga S, Ishii E, Miyazaki C, Hamada K, Akazawa K, Ueda K: *Aseptic meningitis in children: correlation betweenn fever and interferon-γ level. Eur J Pediatr 150:726-729, 1991*

27) Mustafa MM, Lebel MH, Ramilo O, Olson KP, Reisch JS, Beutler B, McCraqcken GH: *Correlation of interleukin 1 beta and cachectin concentration in cerebrospinal fluid and outcome from bacterial meningitis J Pediatr 115:208-213, 1989*

28) Waage A, Brandtzaeg P, Halstensen A, Kierulf P, Espevik T: *The complex pattern of cytokines in serum from patients with meningococcal septic shock. J Exp Med 169:333-338, 1989*

29) Ishii E, Ohga S, Ueda K, Akazawa K: *Serum interleukin-1 and tumor necrosis factor activities in febrile convulsion with acute leukemia. Int J Hematol 54:79-84, 1991*

30) Tomkinson BB, Wagner, DK, Nelson DL, Sullivan JL: *Activated lymphocytes during acute Epstein-Barr virus infection. J Immunol 139:3802-3807, 1987*

31) Oyama Y, Amako T, Hirakawa S, Hironaka K, Suzuki S, Ota Z: *Hemophagocytic syndrome treated with cyclosporin A: a T cell disorder? Br J Haematol 73:276-278, 1989*

32) Scott RB, Robb Smith, AHT: *Histiocytic medullary reticulosis. Lancet 2:194-198, 1939*

33) Rappaport H: *Tumors of the hematopoietic system. In atlas of tumor pathology. 49,*

Washington D.D., Armed forces institute of pathology, 1966

34) Su IJ, Lin DT, Hsieh HJ, Lee CY: *Fatal primary Epstein-Barr virus infection masquerading as histiocytic medullary reticulosis in young children in Taiwan. Hematologic Pathol 4:189-195, 1990*

35) Lanzkowsky P, M.B., Ch.B., Sc.D., F.R.C.P., D.C.H., F.A.A.P.: *Manual of Pediatric Hematology and Oncology. 2nd ed. New York, Churhill Livingstone Inc, 1995, p493-511*

36) Kikuta H, Sakiyama Y, Matsumoto S, Ohishi T, Nakano T, Nagashima T, Oka T, Hironaka T, Hirai K: *Fatal Epstein-Barr Virus-Associated Hemophagocytic Syndrome. Blood 82(11):3259-3264, 1993*

37) Harabuchi Y, Yamanaka N, Kataura N: *Epstein Barr virus in nasal T-cell lymphomas in patients with lethal midline granuloma Lancet, 335:128-130, 1990*

38) Takai K, Sanada M, Shibuya H: *Epstein-Barr virus associated natural killer cell leukemia: report of an autopsy case. Jpn J Clin Hematol 36(5):500-505, 1995*

= Abstracts =

A Case of Epstein Barr Virus-Associated Hemophagocytic Syndrome Confirmed by mRNA In Situ Hybridization and Polymerase Chain Reaction.

Chung Han Kim, M.D., Chang Hyun Yang, M.D., Young Mo Sohn, M.D. and Hoguen Kim, M.D.*

Department of Pediatrics, and Pathology, Yonsei University College of Medicine, Seoul Korea*

Virus associated hemophagocytic syndrome(VAHS), a class II histiocytosis syndrome, is characterized by high fever, liver dysfunction, coagulation abnormalities, and generalized histiocytic proliferation with marked hemophagocytosis in bone marrow and lymph nodes.

VAHS is associated with several viral infections including Epstein Barr virus which has a relatively high mortality rate.

We report a fatal case of Epstein Barr virus associated hemophagocytic syndrome and its diagnosis by mRNA in situ hybridization and polymerase chain reaction.

A brief review of related literaure is also presented.

Key Words : Epstein Barr virus, Virus-associated hemophagocytic syndrome