

급성백혈병에서 증식된 조직구의 면역조직화학염색을 이용한 성상 규명

가톨릭대학교 의과대학 진단검사의학교실

채 호 진 · 박 훈 희

Characterization of the Proliferated Histiocytes in Acute Leukemia by Performing Immunohistochemistry

Hyojin Chae M.D. and Hun Hee Park

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

Background: The bone marrow biopsy sections of acute leukemia patients occasionally reveal a proliferation of large mononuclear cells that accompany the leukemic blasts, and this proliferation shows a starry sky pattern. We characterized these large mononuclear cells by performing immunohistochemistry with 12 different antibodies. The clinical characteristics were examined and then we determined their difference from hemophagocytic lymphohistiocytosis (HLH) and malignant histiocytic disorders.

Methods: Of the 200 acute leukemic bone marrow biopsy samples, 11 ALL and 10 AML cases showed large mononuclear cell proliferations. The panel of antibodies used for immunohistochemistry included those against the mononuclear phagocyte system, and immunohistochemistry was performed on the patients' initial specimens and the complete remission specimens. 10 normal specimens, 4 initial CML specimens and their complete hematologic response specimens were included as controls.

Results: The large mononuclear cells showed immunohistochemical results consistent with histiocytes. They were negative for the markers of dendritic cells the histiocytes and cytokines that are involved in the pathogenesis of HLH and vascular proliferation. Histiocyte proliferation was not observed in the complete remission specimens and in the initial and complete hematological response specimens of the CML patients and the normal bone marrow specimens. None of the cases fulfilled the criteria of HLH, and all 5 ALL cases, for which the immunophenotype results were available, showed a B cell phenotype.

Conclusion: We characterized the large mononuclear cell proliferations as reactive histiocyte proliferations and we differentiated these from those of secondary HLH and malignant histiocytic disorders. A proportion of the large mononuclear cells showed negative results for all 12 antibodies and they showed characteristics that were suggestive of small fat cells. The pathophysiology and the prognostic effect of the reactive histiocyte proliferation accompanying acute leukemia require further study. (*Korean J Hematol* 2009;44:8-13.)

Key Words: Histiocyte, Immunohistochemistry, Acute leukemia

접수 : 2008년 9월 2일, 수정 : 2009년 3월 13일

승인 : 2009년 3월 17일

교신저자 : 박훈희, 서울시 서초구 반포동 505

☎ 137-701, 가톨릭대학교 서울성모병원 진단검사의학과

Tel: 02-2258-1655, Fax: 02-2258-1719

E-mail: phh5240@hanmail.net

Correspondence to : Hun Hee Park

Department of Laboratory Medicine, Seoul St. Mary's Hospital, The Catholic University of Korea

505, Banpo-dong, Seocho-gu, Seoul 137-701, Korea

Tel: +82-2-2258-1655, Fax: +82-2-2258-1719

E-mail: phh5240@hanmail.net

서 론

급성백혈병의 골수 생검조직 소견은 일반적으로 고세포충실성의 골수 조직에서 모세포(blast)들의 간질성 혹은 sheet 형태의 침윤상을 관찰할 수 있으며 일부 정상 골수 구조와 조혈전구세포들 및 지방 세포들이 보존되어 있는 양상을 보인다. 또한, 잔존하는 조혈 단계의 이형성 소견과 골모양혈관의 붕괴나 세포의 잔해를 탐식한 포식세포 등이 관찰될 수 있다.¹⁾ 그러나 급성백혈병 증례들 중에는 탐식작용의 소견 없이 크고 깨끗한 세포질과 작고 둥근핵을 가지는 단핵구(이하 거대단핵구)들이 다수 동반되는 경우가 드물지 않게 관찰되는데(Fig. 1), 이들 세포들의 표현형적 특성은 확실히 규명되어 있지 않다. 이에 저자들은 진단 당시 거대단핵구 증식을 동반한 21예의 급성백혈병 증례들과 이들의 치료 후 최초로 완전 관해 판정을 받은 골수 생검 조직으로 면역조직화학염색을 시행하여 이들의 표현양상과 임상적 의의 및 화학요법 치료 후 거대단핵구 증식의 경과를 조사하였다. 또한 바이러스 혹은 악성종양과 연관된 이차 혈구탐식성 림프조직구증(hemophagocytic lymphohistiocytosis, HLH)과의 감별을 위해 의무기록을 후향적으로 조사하였으며 예후에 미치는 영향을 알아보기 위해 생존여부와 생존기간을 조사하였다.

대상 및 방법

1. 대상

2002년 1월부터 2005년 12월까지 가톨릭대학교부속

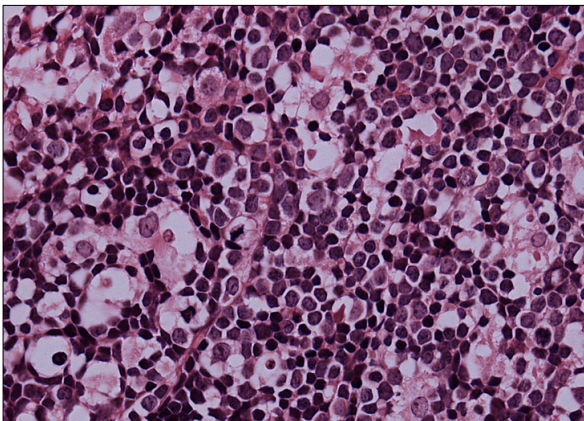


Fig. 1. Bone marrow biopsy specimen of acute leukemia showing prominent starry sky pattern (H&E stain, ×400).

성모병원에서 시행한 골수검사상 급성백혈병으로 진단된 증례 중 200예를 무작위로 선별하여 그 중에서 골수 생검조직에서 거대단핵구 증식의 소견을 보인 21예(10.5%)의(급성림프모구백혈병 11예(5.5%), 급성골수성백혈병 10예(5%), 진단당시의 골수 생검조직과 치료 후 최초로 완전 관해 판정을 받은 골수 생검조직을 연구대상으로 하였다. 또한 이에 대한 대조군으로 10예의 정상 골수 생검조직 및 4예의 만성골수성백혈병의 진단당시와 완전혈액학적반응을 보인 골수 생검조직을 포함시켰다.

2. 방법

연구 대상 증례의 골수 흡인천자도말과 생검조직의 세포학적 소견을 재검토하였으며 환자의 의무기록을 후향적으로 검토하였다. 골수 생검조직을 이용하여 면역조직화학염색을 시행한 12개의 단클론성 항체는 Table 1과 같다. 면역조직화학염색은 먼저, 포르말린 용액에 고정하고 파라핀에 포매된 골수 생검조직으로 5 μ m의 연속 절편을 만들고 파라핀을 제거한 다음 슬라이드에 얹어 37°C에서 건조시킨 후 파라핀 제거와 함수 과정을 거쳐 각각의 항체와 반응시켰다. 면역조직화학염색의 발색은 streptavidin biotin-horseradish peroxidase법을 이용한 UltraVision LP Detection System (Lab Vision Corporation, Fremont, CA, USA) kit를 사용하여 biotin이 부착된 2차 항체를 반응시킨 다음 streptavidin-horseradish peroxidase와 반응시켰다. 부착된 horseradish peroxidase는 DAB (3,3'-Diaminobenzi-

Table 1. Antibodies used in the immunohistochemical staining

Specificity	Source	Dilution
CD1a	Labvision	1:50
CD14	Labvision	1:20
CD21	Labvision	1:10
CD29	Labvision	1:10
CD35	Labvision	1:50
CD68	Labvision	1:40
CD169	Abcam	1:50
S100	Labvision	1:100
VEGF	Labvision	1:50
Lysozyme	Labvision	1:100
IL-1	Santa cruz	1:50
TNF- α	Hycult biotechnology	1:50

Abbreviations: CD, cluster of differentiation; VEGF, vascular endothelial growth factor; LI, interleukin; TNF, tumor necrosis factor.

dine tetrahydrochloride)를 이용하여 발색하였으며, hematoxylin으로 대조 염색한 후 광학현미경으로 관찰하였다.

결 과

거대단핵구의 증식을 동반한 급성백혈병증례들의 임상적인 특징은 Table 2, 3과 같았다. 급성림프모구백혈병 환자군(median 7세, range 3~49세)은 급성골수성 백혈병 환자군(median 35.5세, range 18~54세)에 비해 나이가 유의하게 낮았다. 급성림프모구백혈병 증례 중 면역표현형검사가 가능하였던 5예는 모두 B세포 계열이었으며, 급성골수성백혈병 증례는 M1과 M4가 각각 1예, M2와 M3가 각각 4예로 AML 아형에 무관하게

관찰되었다.

골수 생검조직에서 증식을 보인 세포들은 광학현미경적으로 낮은 핵/세포질 비, 성숙한 핵염색질, 뚜렷하지 않은 핵소체, 많은 양의 세포질을 함유하였으며 비정형적인 세포학적 소견이나 유사분열의 소견은 거의 관찰되지 않아 양성 조직구의 소견에 합당하였다(Fig. 1). 면역조직화학염색 결과는 증식을 보인 세포들은 단구 표지자인 CD14, CD169와, 조직구 표지자인 CD68, Lysozyme에 양성하였고, 이들 양성세포의 분포는 증례에 따라 변이가 심해 전체 거대단핵구 형태로 관찰되는 세포의 30~80%를 차지하였다(Fig. 2). 즉 증례에 따라 20~70%의 거대단핵구 형태의 세포들은 어떤 표지자에도 음성소견을 나타냈다. S-100항원에 대해서는 일부 세포에서만 양성소견을 보였으며(Fig. 3) 소포수지상세포(follicular dendritic cell) 표지자인 CD21, CD35와 랑게르한스세포 표지자인 CD1에 음성

Table 2. Clinical characteristics of ALL patients with histiocytosis

Case	Age	Sex	Phenotype	Outcome (survival, mos)
1	7	M	B	Alive (58+)
2	34	M	ND	Alive (78+)
3	17	M	ND	Alive (68+)
4	7	M	ND	Alive (67+)
5	4	F	ND	Alive (63+)
6	49	F	ND	Alive (61+)
7	4	M	B	Alive (57+)
8	16	M	B	Dead (9)
9	3	M	B	Dead (38)
10	6	M	ND	Alive (44+)
11	27	F	B	Dead (4)

Abbreviation: ND, lineage not-determined.

Table 3. Clinical characteristics of AML patients with histiocytosis

Case	Age	Sex	Phenotype	Outcome (survival, mos)
1	18	F	M2	Alive (58+)
2	29	M	M2	Alive (58+)
3	38	M	M3	Alive (71+)
4	54	F	M3	Alive (34+)
5	38	F	M4	Dead (5)
6	39	M	M1	Alive (64+)
7	24	M	M2	Dead (12)
8	49	F	M3	Alive (63+)
9	21	M	M3	Alive (61+)
10	33	F	M2	Dead (32)

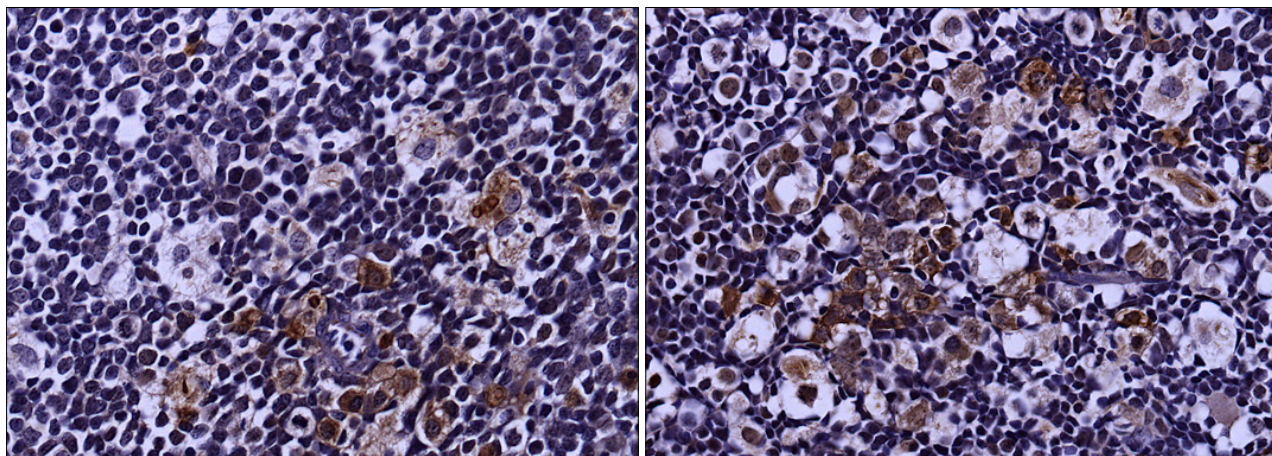


Fig. 2. Histiocytes showing positive staining with anti-CD68 monoclonal antibody (Immunohistochemical stain, ×400).

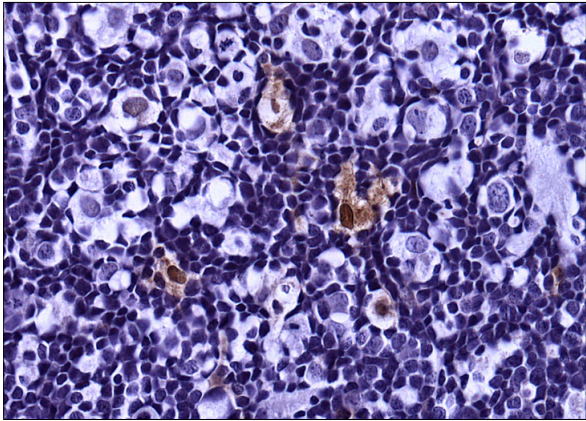


Fig. 3. Histiocytes showing positive staining with S-100 monoclonal antibody (Immunohistochemical stain, $\times 400$).

이었고 HLH 발생에 관여하는 사이토카인인 IL-1, TNF- α 와 혈관 신생에 관여하는 항원인 CD29, VEGF에 음성이었다.

HLH와의 감별을 위해 후향적으로 의무기록을 조사하였으나 21예 모두에서 HLH 진단을²⁾ 만족시키는 예는 없었다. 급성백혈병 증례의 최초 완전 관해시 골수 생검조직에서 면역조직화학염색상 양성세포는 정상 골수에 비해 증가되지 않았다. 또한, 만성골수성백혈병의 진단 당시와 완전혈액학적반응시 골수 생검조직에서도 양성세포의 증가는 관찰되지 않았다.

고 찰

일반적으로 일부 악성 림프종 조직에서 관찰되는 “starry sky” 형상은, 단형성 악성림프종 세포들 가운데 자멸한(apoptotic) 종양 세포를 탐식한 양성 조직구들의 수가 증가하고 그 모양이 산발적으로 존재하는 양상을 묘사하는 용어이다.³⁾ 그러나 이와 같은 형상은 악성 림프종에서만 특이적으로 관찰되는 소견이 아니며 저자들은 급성 백혈병 골수 생검조직에서도 이와 같은 소견이 드물지 않게 관찰된다는 점에 착안해 면역조직화학염색을 이용하여 이들의 표현형을 규명해보았다. 사용된 12개의 단일클론 항체 패널에는 단핵포식세포계(mononuclear phagocytic system)에 속하는 소포수지상세포, 랑게르한스세포, 조직구의 표지자를 포함하여 HLH 발생에 관여하는 사이토카인과 혈관신생의 표지자를 포함시켰다. 단핵포식세포계는 골수 줄기세포에서 유래한, 세포학적 기원을 공유하고 있는 세포들로 구성되어 있으나 분화과정에서 서로 다른 두

가지 기능을 갖는 세포들로 크게 구분된다. 즉 항원제시세포(antigen-presenting cell)와 항원처리세포(antigen-processing cell)로 구별되며, 수지상세포는 전자에 조직구는 후자에 속하여 입자(particulate) 항원을 제거하는 주된 기능을 갖는다.²⁾ 본 연구를 통해서 저자들은 급성백혈병 골수 생검조직에서 동반된 증식 소견을 보이는 세포의 30~80%가 단핵포식세포계중 조직구에 해당한다는 사실을 증명하였다. 그 결과 급성백혈병에서도 드물지 않게 조직구 증식이 동반됨을 확인하였다.

급성백혈병과 동반된 조직구증식증은 악성 조직구 질환이 1969년 Clark 등에 의해 처음으로 보고된 이래,⁴⁾ 국내의 보고를 포함하여,⁵⁻⁸⁾ 다양한 종류의 백혈병과 림프종에서 조직구증식증이 동반된 예가 보고되었으나,⁹⁾ 급성백혈병 골수 생검조직에서 관찰되는 조직구 증식의 소견은 악성 조직구 질환 및 HLH와의 감별이 필요하다. HLH는 비종양성 증식성 질환으로 악성 조직구 질환보다 빈도가 더 높으며, 가장 흔하고 임상적으로 중요한 대식세포의 증식성 질환이다.³⁾ HLH는 상염색체 열성으로 유전되는 familial HLH와 바이러스성 감염이나 악성종양과 연관된 secondary HLH로 나뉘며²⁾ HLH의 병리기전은 단핵포식세포들을 자극하는 Interleukin (IL)-1, IL-2, IL-10, tumor necrosis factor (TNF)- α , interferon- γ 등의 사이토카인의 과다 생성과 연관되어 있다.³⁾ 증가된 탐식 활동은 범혈구감소증을 유발하며 이와 같은 혈구탐식의 소견은 대부분의 악성 조직구 질환에서는 뚜렷하게 나타나지 않으므로 광범위한 탐식 소견은 HLH를 시사한다. 국내 보고를 포함하여 급성백혈병과 림프종에서 조직구증식증이 동반된 예들은 대부분이 바이러스성 감염과 연관된 바이러스 연관 세포탐식증(virus-associated hemophagocytosis)이거나 악성종양 연관 세포탐식증(malignancy-associated hemophagocytosis)으로 구분되는 예들이다. 그러나, 본 연구의 대상이 되었던 증례들은 HLH 진단 기준을 만족시키는 예가 없었으며, 완전 관해 골수 조직에서 조직구의 증식이 소멸된 점, 그리고 면역조직화학염색상 HLH의 병리 기전에 관여하는 사이토카인인 IL-1, TNF- α 의 음성소견으로 미루어 HLH의 가능성을 배제 할 수 있었으며 악성 조직구 질환과도 구별되는 급성백혈병에 의한 반응성 증식임을 확인할 수 있었다. 또한, 기존의 보고와의 차이점은, 기존의 보고들에서는 급성림프모구백혈병에서 세포탐식증으로 생각되는 조직구증식증이 동반된 예가 대부분이 T세포 계열이었으며 T세포 기원의 악성세포에서 macrophage-

activating factor를 과다 생산하여 증식을 유발하는 것으로 설명하고 있는데 비해¹⁰⁾ 본 연구에서는 표현형 검사가 이루어진 5예 모두에서 B세포 계열로 확인되었다.

급성백혈병과 동반되어 증식하는 조직구의 기능은 아직 잘 규명되어 있지 않다. Shumichi 등¹¹⁾은 급성전골수구성백혈병에서 all-trans retinoic acid (ATRA) 치료에 의해 분화가 유도된 급성전골수구를 조직구가 탐식하여 제거함으로써 완전관해를 유도함을 밝힌 바 있으며, Vacca 등¹²⁾은 이와는 반대로 침윤하는 조직구들의 수는 미세혈관 수와 양의 상관성을 보이며, 양성 림프절병증에 비해 비호지킨림프종에서 유의하게 증가되어 있고, 저등급(low-grade)보다 고등급(high-grade) 림프종에서 그 수가 더 많은데, 이는 조직구가 혈관신생 인자들의 분비를 통해 혈관신생을 촉진하기 때문이며 종양의 진행과 연관이 있음을 뒷받침한다고 보고한 바 있다. 본 연구 대상이었던 급성백혈병에 동반된 조직구 증가는 환자들의 증례를 살펴볼 때 예후가 비교적 양호한 편에 속하였으며, 혈관신생을 반영하는 표지자인 CD29와 VEGF는 음성이었으므로 본 증례에서 조직구의 증식이 혈관신생을 유도하거나 악성 종양의 진행을 촉진시킨다는 가설을 뒷받침 하지는 않는 것으로 생각되며 추후 이와 같은 반응성 증식이 예후에 미치는 영향과 증식된 조직구의 면역학적인 기능에 대한 전향적인 연구가 필요할 것이라고 사료된다.

또한 조직구와 형태학적으로 유사한 세포들 중 일부 분은(20~70%) 조직구 표지자를 비롯하여 어느 항체에 대해서도 반응하지 않는 양상을 나타내었으며 이들 세포들은 기존 골수에 존재하던 지방세포가 급성백혈병의 발병에 따른 세포충실성의 증가로 인해 크기가 축소되어 세포학적 형상이 조직구와 유사해 보이는 것으로 생각되었다.¹³⁾ 이를 확인하기 위해서는 추후로 골수 생검조직의 동결절편을 이용하여 지방염색을 시행해야 할 것으로 사료되었다. 이상으로 본 연구를 통하여 급성백혈병 골수에서 드물지 않게 관찰되는 거대단핵구 형태의 세포의 증식은 HLH나 악성 조직구 질환과는 구분되는 조직구의 반응성 증식임을 확인하였으며 증례에 따라 그 비율의 차이를 보이나 거대단핵구 형태의 세포 중 일부는 지방세포로 생각된다. 이와 같은 급성백혈병과 동반되는 반응성 조직구 증식이 급성백혈병의 예후에 미치는 영향은 더 많은 수의 증례를 대상으로 하는 추후 연구가 더 필요할 것으로 생각된다.

요 약

배경: 급성백혈병의 골수 생검조직에서 드물지 않게 백혈병 모세포들의 증식과 동반된 starry sky 양상의 거대단핵구의 증식소견이 관찰된다. 저자들은 이 거대단핵구의 정상 규명을 위해 12개의 서로 다른 항체를 사용하여 면역조직화학염색을 시행하였다. 또한 거대단핵구의 증식소견이 동반된 급성백혈병 환자들의 임상적인 특징을 조사하였으며 이를 혈구탐식성 림프조직구증 및 악성 조직구 증식질환과 감별하였다.

방법: 200개의 급성백혈병 골수 생검조직 중 급성림프모구백혈병 11예와 급성골수성백혈병 10예에서 거대단핵구의 증식소견을 보였다. 단핵포식세포계에 대한 항체들이 포함된 패널로 진단 당시와 완전 관해 판정을 받은 골수 생검조직에 대해 면역조직화학염색을 시행하였다. 또한 10개의 정상 골수와, 4개의 만성골수성백혈병 증례의 진단 당시와 완전혈액학적반응을 보인 골수 조직을 대조군으로 포함시켰다.

결과: 증식소견을 보이는 거대단핵구는 면역조직화학염색 결과 조직구임을 확인하였다. 거대단핵구 세포들은 소포수지상세포, 조직구, 혈구탐식성 림프조직구증, 혈관 신생의 표지자등에 음성이었다. 완전 관해 시와 대조군으로 포함되었던 만성골수성백혈병의 진단 시와 완전혈액학적반응 조직 및 정상골수조직에서 조직구 증가는 관찰되지 않았다. 또한 21예 모두에서 HLH 진단 기준을 만족시키는 예는 없었고 면역표현형 검사가 가능했던 5예의 급성림프모구백혈병은 모두 B 세포 계열이었다.

결론: 저자들은 거대단핵구의 증식이 반응성 조직구 증식임을 규명하였으며 이를 이차성 혈구탐식성 림프조직구증과 악성 조직구 증식질환과 감별하였다. 거대단핵구의 일부에서 12개 항체에 모두 음성을 보인 세포들은 축소된 지방세포로 추정되는 특성을 보였다. 급성백혈병 골수 생검조직에서 동반된 조직구 증가의 병태생리와 예후에 관하여 향후 추가적 연구가 더 필요할 것으로 사료된다.

참 고 문 헌

- 1) Frisch B, Bartl R. Acute leukemias. In: Frisch B, Bartl R, eds. Biopsy interpretation of bone and bone marrow. 2nd ed. Oxford, England: Oxford University Press, 1999:209-25.

- 2) Henter JL, Horne A, Arico M, et al. HLH-2004: diagnostic and therapeutic guidelines for hemophagocytic lymphohistiocytosis. *Pediatr Blood Cancer* 2007;48:124-31.
- 3) Jaffe ES. Histiocytic and dendritic cell neoplasms. In: Jaffe ES, Harris NL, Stein H, Vardiman JM, eds. World health organization classification of tumours. Pathology and genetics of tumors of haematopoietic and lymphoid tissues. Lyon, France: IARC Press, 2001:273-89.
- 4) Clark BS, Dawson PJ. Histiocytic medullary reticulosis presenting with a leukemic blood picture. *Am J Med* 1969;47:314-7.
- 5) Kim SJ, Cho HI, Ahn HS. Two cases of virus associated hemophagocytic syndrome after chemotherapy of acute myelogenous leukemia. *Korean J Hematol* 1990;25:281-5.
- 6) Yoon SY, Cho YJ, Lee KN. Histiocytosis occurring in a patient with B-lineage acute lymphoblastic leukemia. *Korean J Clin Pathol* 1994;14:391-6.
- 7) Lee HK, Kim YG, Han KJ, Shim SI. Two cases of reactive histiocytosis with peroxidase positivity in acute myelogenous leukemia. *Korean J Clin Pathol* 1996;16:447-52.
- 8) Yoon HR, Ko YH, Kim SH. Peripheral T cell lymphoma associated with hemophagocytic histiocytosis mimicking malignant histiocytosis. *Korean J Clin Pathol* 1997;17:934-43.
- 9) Falini A, Pileri S, DeSolas I, et al. Peripheral T-cell lymphoma associated with hemophagocytic syndrome. *Blood* 1990;75:434.
- 10) Jaffe ES, Costa J, Fauci AS, Cossman J, Tsokos M. Malignant lymphoma and erythrophagocytosis simulating malignant histiocytosis. *Am J Med* 1983;75:741-9.
- 11) Shumichi K, Hiroto I, Hiroto T, Shotai K. Phagocytosis of terminally differentiated acute promyelocytic leukemia cells by marrow histiocytes during treatment with all-trans retinoic acid. *Leuk Lymphoma* 2003;44:2147-50.
- 12) Vacca A, Ribatti D, Ruco L, et al. Angiogenesis extent and macrophage density increase simultaneously with pathological progression in B-cell non-Hodgkin's lymphomas. *Br J Cancer* 1999;79:965-70.
- 13) Mehler PS, Howe SE. Serous fat atrophy with leucopenia in severe anorexia nervosa. *Am J Hematol* 1995;49:171-2.