

Histiocytic necrotizing lymphadenitis에서 HHV6과 EBV의 검출

부산대학교 의학전문대학원 소아과학교실, 병리학교실*

박경희□박성식□김지연*□박수은

= Abstract =

Detection of HHV6 and EBV in histiocytic necrotizing lymphadenitis

Kyung Hee Park, M.D., Sung Shik Park, M.D., Ji Yeon Kim, M.D.* and Su Eun Park, M.D.

Department of Pediatrics and Pathology*, School of Medicine, Pusan National University, Busan, Korea

Purpose : Kikuchi-Fujimoto disease (KFD), also known as histiocytic necrotizing lymphadenitis (HNL), is a self-limited disease characterized by cervical lymphadenopathy and fever. The etiology of KFD remains unknown; however, the self-limiting nature of HNL suggests the cause of this disease could be viral infection. For this reason, several viruses have been evaluated as possible etiologies of HNL, including Epstein-Barr virus (EBV), human herpesvirus 6 (HHV6), human herpesvirus 8 (HHV8), and cytomegalovirus (CMV). The aim of this study was to examine the relationship of EBV and HHV6 to HNL.

Methods : Data pertaining to 51 cases with biopsy-confirmed HNL were collected between January 1999 and December 2005, from the Department of Pathology, College of Medicine, Pusan National University, Busan, Korea. The clinical records-including data regarding age, gender, duration of fever, and lymph node involvement were reviewed retrospectively. The in situ hybridization (ISH) assay was performed by EBER PNA probe (Dako, Carpinteria, CA, USA), and immunohistochemistry testing was performed with anti-HHV type 6 monoclonal antibodies (Chemicon, Temecula, CA, USA).

Results : The HNL patients in this study were 24 males and 27 females, ranging in age from seven to 61 years (median: 25.9). ISH for EBV was positive in 8/51 (15.7%) biopsies, and immunohistochemistry for HHV6 was positive in 15/51 (29.4%) biopsies. Serologic analysis of EBV IgM was performed in 23 cases; only one patient was positive for EBV IgM and EBV ISH.

Conclusion : Our study could not provide supportive evidence of a viral pathogenesis for HNL; therefore, cases of HNL may not have a dominant viral cause. However, some rare exceptional cases may have been caused by viral infection. (Korean J Pediatr 2008;51:987-991)

Key Words : Kikuchi-Fujimoto disease, Histiocytic necrotizing lymphadenitis, Epstein-Barr virus, Human herpesvirus 6

서 론

조직구성 괴사성 림프절염(Histiocytic necrotizing lymphadenitis, HNL)은 Kikuchi-Fujimoto disease (KFD)으로 기술되기도 하는 질환으로 주로 경부 림프절 비대와 발열을 동반하며 젊은 여성에서 호발한다¹⁻⁴⁾. 침범된 림프절의 조직학적 특징은 많은 핵 붕괴물질들로 이루어진 괴사성 결절이며 조직구, 면역아세포, 림프구 등 다양한 세포들의 집단으로 구성되어 있으며 괴사부위에 형질세포와 다형백혈구는 거의 발견되지 않는 것이 특

징이다⁴⁻⁶⁾.

HNL의 원인은 현재까지 밝혀지지 않았다. 그러나 HNL의 대부분이 자연 호전되는 경과를 보이고, C-반응단백질이나 적혈구 침강속도 등과 같은 급성기 반응 단백질의 상승이 대부분 없다는 점 등을 근거로 바이러스 감염이 HNL의 발병과 연관되어 있을 것으로 추정되고 있다. Sumiyoshi 등⁷⁾은 HNL의 조직구에서 -interferon을 입증하였고 이는 바이러스 감염을 시사한다고 보고하였다. Epstein-Barr virus (EBV), human herpesvirus type 6 (HHV6), human herpesvirus type 8 (HHV8), parvovirus B19, human T-cell leukemia virus (HTLV1), parainfluenza, cytomegalovirus (CMV) 등은 원인 인자로 추정되는 바이러스들로서 HNL과의 연관성에 대한 연구 보고가 있어왔으나 아직 확실하게 증명된 바이러스 원인체는 없다⁶⁻¹³⁾.

저자들은 이들 바이러스 중에서 연구가 가장 많이 된 EBV와 여러 질환의 원인으로 부각되고 있는 HHV6을 선택하여 HNL과

Received : 7 March 2008, Revised : 24 July 2008, Accepted : 5 August 2008

Address for correspondence : Su Eun Park, M.D.

Department of Pediatrics, School of Medicine, Pusan National University, 1-10 Ami-dong, Seo-gu, Busan 602-739, Korea

Tel : +82.51-240-7674, Fax : +82.51-240-6205

E-mail : pse0731@daum.net

This work was supported by the research grant of Pusan National University in 2006.

의 연관성을 알아보하고자 *in situ* hybridization (ISH)와 면역화학염색 검사를 각각 시행하였다.

대상 및 방법

1. 대 상

1999년 1월부터 2005년 12월까지 부산대학교병원에 경부림프절 종대를 주소로 내원한 환자들 중에서 림프절 생검으로 얻은 조직의 소견에서 HNL으로 진단되었던 경우를 대상으로 하였고 두 명의 병리 전문의가 다시 이들의 조직을 검사하여 진단이 일치하는 경우만을 대상으로 하였다. 총 51명의 환자가 분석에 포함되었고 이들의 의무기록을 바탕으로 환자들의 나이, 성별, 발열기간, 침범된 림프절 등에 대해 후향적으로 분석하였고 전신성 홍반성 루푸스(SLE)와 림프종과 같은 기저질환이 있는 환자는 대상에서 제외하였다.

이들 대상 환자 중 EBV에 대한 혈청학적 검사가 시행되었던 환자를 확인하여 자료를 분석하였다.

2. 방 법

1) 면역조직화학염색(Immunohistochemistry for HHV6)

조직표본에 대한 면역조직화학적 염색은 10% 중성 완충 포르말린에 조직을 고정한 후 파라핀에 포매한 조직을 4 마이크론의 두께로 박절하여 자일렌으로 탈파라핀시킨 후 citrate 완충액에서 가열한 후 과산화수소로 처리하여 내인성 과산화효소의 작용을 차단하였다. 여분의 용액을 제거한 후 일차 항체인 human herpes virus type 6 (monoclonal 1:50, Chemicon, Temecula, CA, USA)와 작용시킨후 통상적인 avidin-biotin complex법으로 20분간 반응시켰다. Mayer's hematoxylin으로 대조염색하여 봉입한 후 광학 현미경으로 관찰하였다(Fig. 1).

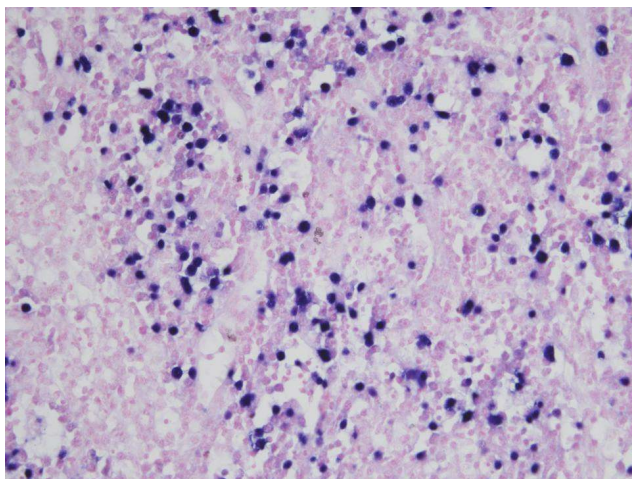


Fig. 1. Positively stained cells are identified in parts of lesions. (immunohistochemical stain for HHV6, ×400).

2) *In situ* hybridization for EBV

10% 중성 포르말린에 고정한 후 파라핀에 포매한 조직을 2 마이크론 절편으로 박절하여 자일렌으로 파라핀을 제거한 후, 99%와 95% 알코올에 각각 2분씩 함수과정을 거치게 하였다. 공기 중에 5분 정도 말린 후 증류수에 처리한 후 RNase free 습윤상자에 슬라이드를 두고, 60 DL proteinase K를 실온에서 30분간 처리하였다. 증류수로 알코올에 10분간 처리하고 실온에서 5분간 건조시켰다. 조직절편에 EBER PNA probe (Dako, Capintaria, CA, USA)를 한방울 떨어뜨린 후 커버슬립을 덮어 55°C 부화기에 2시간동안 두었다. 1:60으로 희석하여 55°C로 데워둔 stringent wash에 25분간 중탕한 후 TBS에 10초간 처리하였다. 습윤상자에 slide를 두고, anti-FITC/AP Vial No. 5(PNA ISH detection kit, Dako, Capintaria, CA, USA)를 3방울 떨어뜨려 실온에서 30분간 두었다. 그 후 TBS로 3분간 2회 그리고 증류수로 1분간 2회 수세시키고 나서 Substrate Vial No.6 (PNA ISH detection kit, Dako, Capintaria, CA, USA)을 4방울 떨어뜨린 후 60분 정도 반응시켰다. 발색이 되면 흐르는 물에 5분간 씻어낸 후 nuclear fast red를 이용하여 대조염색을 한 다음 봉입하였다(Fig. 2).

결 과

환자의 성별은 남자가 24명, 여자가 27명이었고 연령분포는 7세에서 61세까지로 평균 연령은 25.9세였다. 1명을 제외하고 대부분의 환자에서 경부 림프절 종대가 있었다. 37명의 환자에서 발열이 있었으며 평균 발열 기간은 10.3일이었다. 이들 중 3명은 재발을 경험하였다(Table 1).

EBV에 대한 ISH는 51명의 환자 중 8명에서 양성 소견으로 나와서 15.7%의 양성률을 보였고 HHV6에 대한 면역화학염색 검사 결과는 51명의 환자 중 15명에서 양성으로 29.4%의 양성률

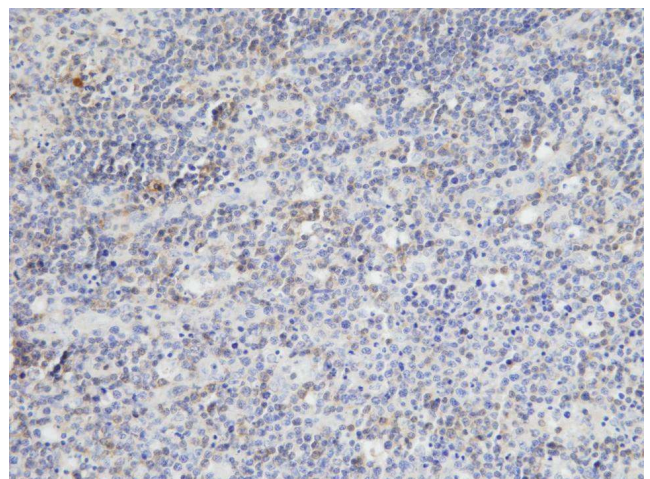


Fig. 2. Many EBER positive cells are detected (*in situ* hybridization for EBER, ×400).

Table 1. Clinical Characteristics and Results of HHV6 and EBV Studies

Case	Sex	Age (yrs)	Lymph node	Fever duration (days)	Serologic study		Histologic study		Case	Sex	Age (yrs)	Lymph node	Fever duration (days)	Serologic study		Histologic study	
					VCA Ig G	VCA Ig M	HHV6	EBV						VCA Ig G	VCA Ig M	HHV6	EBV
1	F	12	C	10	P	N	N	N	27	F	43	C	0	-	-	N	N
2	M	19	C	7	P	N	N	N	28	M	33	C	20	P	N	N	N
3	F	35	C	8	P	N	P	N	29	M	8	C	15	P	N	N	N
4	F	31	C	2	-	-	N	N	30	F	30	C	0	-	-	N	P
5	F	26	C	21	-	-	P	N	31	M	11	C	1	-	N	N	N
6	F	11	C	0	-	-	P	N	32	M	46	C	0	-	-	P	N
7	F	26	C	10	-	-	N	N	33	F	12	C	21	-	N	N	N
8	F	12	C	11	P	N	N	N	34	M	14	C	14	P	N	N	N
9	M	11	C	20	N	N	N	N	35	F	31	C	15	-	-	N	N
10	M	14	A	24	P	N	P	N	36	F	26	C	15	N	N	N	N
11	M	22	C	20	-	-	N	N	37	M	29	C	7	-	-	N	P
12	M	28	C	7	P	N	N	N	38	F	29	C	30	P	N	N	P
13	F	17	C	10	-	N	N	P	39	F	8	C	6	P	N	P	N
14	F	31	C	0	-	-	N	N	40	F	28	C	0	-	-	N	P
15	M	18	C	17	N	N	N	N	41	F	14	C	3	P	N	N	N
16*	M	12	C	20	-	N	N	N	42	F	29	C	20	-	-	N	N
17	M	7	C	14	-	-	N	N	43	M	33	C	28	-	-	P	N
18	M	59	C	14	-	-	P	P	44	M	24	C	14	P	P	P	P
19	M	61	C	7	-	-	N	N	45	F	32	C	0	-	-	N	N
20	F	38	C	0	-	-	P	N	46	M	39	C	10	-	N	N	N
21	F	37	C	0	-	-	N	P	47*	M	10	C	9	-	-	N	N
22	F	40	C	0	-	-	P	N	48	F	29	C	0	-	-	P	N
23	M	41	C	8	-	-	N	N	49	M	12	C	21	-	N	N	N
24	M	19	C	0	-	-	P	N	50*	F	32	C	21	-	-	P	N
25	F	46	C	0	-	-	N	N	51	M	9	C	24	P	N	N	N
26	F	38	C	0	-	-	P	N									

*indicates the cases who had experience the recurrence
 Abbreviations : A, axillar; C, cervical; EBV, Epstein Barr virus; F, female; HHV6, human human herpesvirus 6; M, male; N, negative; P, positive; VCA, viral capsid antigen

을 나타내었다. 2명의 환자에서는 EBV와 HHV6에 동시에 양성으로 나타났다(Table 1).

51명의 환자 중 EBV에 대한 VCA IgG 및 VCA IgM 검사가 시행되었던 경우는 23명이었으며 이들 중 단 한 사람에서 VCA IgM 양성이면서 조직의 EBV 검사에서 양성이었다.

고 찰

HNL의 원인은 현재까지 밝혀지지 않았지만, 자가면역질환과 바이러스 감염이 유력하게 제기되어 왔다. 대부분이 자연 호전되는 경과를 보이고, C-반응단백질과 적혈구침강속도 등과 같은 급성기 반응 단백질의 상승이 대부분에서 없고, 항생제에 반응하지 않는 점 등은 바이러스 감염이 HNL의 발병과 연관되어 있을 것으로 추정되어 이에 대한 연구가 진행되어 왔다.

전 세계적으로 가장 많이 연구된 바이러스는 EBV^{10-12, 14-17)}으로 Stephan 등¹⁶⁾은 2명의 HNL 환자의 조직에서 면역화학염색, ISH, PCR의 방법으로 EBV의 존재를 입증하였고 Chiu 등¹⁷⁾은

DNA PCR과 RNA ISH의 방법으로 연구한 결과 두 검사에서 모두 양성인 경우가 10명 중 9명이라고 하여 EBV 감염이 HNL의 원인이라고 하였다. 그러나 몇몇 연구에서는 HNL의 조직에서 EBV의 검출에 실패를 하였다. Huh 등¹⁰⁾은 12례의 HNL 환자의 조직에서 EBV DNA PCR 검사를 시행하였으나 모두 음성이었다고 보고하였고, Cho 등¹²⁾에 의하면 45례에서 EBV에 대해 ISH를 통해 EBV의 검출을 시도하였으나 모든 경우에서 음성으로 나타났다고 하였다. Takano 등¹⁵⁾도 28명에 대해 PCR 및 ISH 방법으로 검사하였으나 모두 음성으로 나타났다고 보고하였다.

저자들의 연구에서는 ISH를 통해 8명(15.7%)의 환자에서 EBV RNA를 검출하였다. 이러한 결과는 Maeda 등⁶⁾의 연구 결과와 유사하며 Maeda 등은 20례에서 실시간중합효소연쇄반응(Real-time PCR) 방법으로 6명(30%)에서 양성을 확인하였다. 따라서 HNL에서 EBV가 원인적 역할을 한다고 추측할 수는 없으나 연관이 있을 수 있음을 보여준다고 할 수 있다. 이번 연구에서 51명 중 EBV에 대한 혈청학적 검사가 동시에 시행되었던 23명에

대해서 양성여부를 같이 조사하였다. 한 명의 환자에서 VCA IgM이 양성이고 EBV ISH에서도 양성으로 나타났다. 이러한 결과는 HNL 환자에서 드물게 EBV와 연관되어 발생할 수 있음을 보여준다.

최근 HNL의 원인으로 HHV6에 대한 연구가 이루어지고 있으며¹⁹⁻²³⁾ 발열을 동반한 경부 림프절염 환자에서 혈청학적으로 HHV6의 증거를 제시하기도 하였고^{20, 21)} Kruger 등²²⁾은 14례를 대상으로 HHV6에 대해 ISH 방법으로 12명에서 HHV6를 입증하였다고 보고하였다. 이와는 대조적으로 Hollingsworth 등⁸⁾은 15례에 대해 연구하였으나 HHV6의 원인적 역할을 증명할 수 없다고 발표하였다. 최근 Maeda 등⁶⁾은 20명의 환자에서 HHV6에 대한 면역화학염색 및 실시간중합효소연쇄반응 검사를 시행하였으며 모든 경우에서 면역화학염색에 음성이었고 실시간중합효소연쇄반응에서는 소수에서 양성으로 나왔다고 발표하였다. 그러나 한 명에서 광대한 수의 복제가 입증되었고 동시에 면역화학염색에서도 양성인 HHV6와 HNL이 연관성이 있음을 추측하게 만들었다. 본 연구에서도 51명 중 HHV6 면역화학염색에서 15명에서 양성으로 나왔으나 이러한 결과로 HHV6가 HNL의 발생 이전에 중요한 역할을 한다고 추측하기는 어렵다. 또한 본 연구에서는 조직의 HHV6 면역화학염색에서 양성인 경우의 판정에 있어서 어려움이 있어 면역화학염색 방법은 HHV6의 검출에 좋은 방법은 아니라고 할 수 있겠다.

지금까지 많은 연구가 있었지만 HNL에서 바이러스의 원인적 역할의 입증에는 불충분한 결과들이었다. 저자들의 연구 역시 바이러스의 병인적 역할을 입증할 수 있는 결정적인 자료를 얻는 것에는 실패하였으나, HNL의 원인으로 드물게 바이러스 감염이 관여할 것으로 추측된다.

요 약

목적 : Kikuchi-Fujimoto disease는 histiocytic necrotizing lymphadenitis라고도 불리는 질환으로 발열과 경부 림프절염을 특징으로 하며 자연 호전되는 경과를 보이는 질환이다. 원인에 대해서는 아직 잘 밝혀지지 않았다. 자연 호전되는 경과 등은 이 질환의 원인으로 바이러스 감염을 추측하게 되고, 고려되는 바이러스로는 대표적으로 EBV, HHV6, HHV8, CMV 등이 있다. 본 연구는 그 중에서 EBV, HHV6를 선택하여 HNL와의 연관성을 밝히고자 하였다.

방법 : 1999년에서 2005년 사이 부산대학교 병원에서 조직검사에서 KFD로 진단된 환자 51명을 대상으로 나이, 성별, 발열 기간, 침범된 림프절 등에 대하여 의무기록지를 바탕으로 후향적으로 분석하였고 이들의 조직을 이용하여 EBV에 대한 ISH을 시행하고, HHV6에 대한 면역조직화학염색을 각각 시행하였다.

결과 : 대상환자는 남자가 24명, 여자가 27명이었고 평균 연령은 25.9세였다. EBV에 대한 ISH에서 양성을 나타낸 환자는 51명 중에서 8명으로 15.7%였으며 HHV6에 대한 면역조직화학

염색에서 양성을 나타낸 환자는 15명으로 29.4%였다. EBV의 경우 혈청검사(VCA IgG와 VCA IgM)가 같이 시행된 경우가 23명이었고 이중 한 명에서 EBV VCA IgM이 양성이면서 EBV ISH에서도 양성이었다.

결론 : 본 연구는 HNL의 원인으로 EBV와 HHV6의 역할을 증명하지 못하였으나, 드물게 HNL의 원인으로 바이러스 감염이 관여할 것으로 추측된다.

References

- 1) Kikuchi M. Lymphadenitis showing focal reticulum cell hyperplasia with nuclear debris and phagocyte. A clinicopathological study. Nippon Ketsueki Gakkai Zasshi 1972;35:379-80.
- 2) Fujimoto Y, Kozima Y, Yamaguchi K. Cervical subacute necrotizing lymphadenitis: A new clinicopathologic entity. Naika 1972;30:920-7.
- 3) Bosch X, Guilbert A, Miquel R, Campo E. Enigmatic Kikuchi-Fujimoto disease: a comprehensive review. Am J Clin Pathol 2004;122:141-52.
- 4) Dorfman RF, Berry GJ. Kikuchi's histiocytic necrotizing lymphadenitis; an analysis of 108 cases with emphasis on the differential diagnosis. Semin Diagn Pathol 1988;5:329-45.
- 5) Ah MH, Horton LWL. Necrotizing lymphadenitis without granulocytic infiltration (Kikuchi's disease). J Clin Pathol 1985;36:1252
- 6) Maeda N, Yamashita Y, Kimura H, Hara S, Mori N. Quantitative analysis of herpesvirus load in the lymph nodes of patients with histiocytic necrotizing lymphadenitis using a real-time PCR assay. Diagn Mol Pathol 2006;15:49-55.
- 7) Sumiyoshi Y, Kikuchi M, Takeshita M, Ohshima K, Masuda Y. Alpha-interferon in Kikuchi's disease. Virchows Arch. B, Cell Pathol Incl Mol Pathol 1991;61:201-7.
- 8) Hollingsworth HC, Peiper SC, Weiss LM, Weiss LM, Mark Raffeld, Jaffe ES. An investigation of the viral pathogenesis of Kikuchi-Fujimoto disease. Lack of evidence for Epstein-Barr virus or human herpesvirus type 6 as the causative agents. Arch Pathol Lab Med 1994;118: 134-40.
- 9) Meyer O, Kahn MF, Grossin M, Ribard P, Belmatoug N, Morinet F, et al. Parvovirus B19 infection can induce histiocytic necrotizing lymphadenitis associated with systemic lupus erythematosus. Lupus 1991;1:37-41.
- 10) Huh JY, Chi HS, Kim SS, Gong GY. A Study of the viral etiology of histiocytic necrotizing lymphadenitis (Kikuchi-Fujimoto disease). J Korean Med Sci 1998;13:27-30.
- 11) George TI, Jones CD, Zehnder JL, Warnke RA, Dorfman RF. Lack of human herpesvirus 8 and Epstein-Barr virus in Kikuchi's histiocytic necrotizing lymphadenitis. Hum Pathol 2003;34:130-5.
- 12) Cho KJ, Lee SS, Khang SK. Histiocytic necrotizing lymphadenitis. A clinicopathologic study of 45 cases with in situ hybridization for Epstein-Barr virus and hepatitis B virus. J Korean Med Sci 1996;5:409-14.
- 13) Bataille V, Harland CC, Behrens J, Cook MG, Holden CA. Kikuchi disease (histiocytic necrotizing lymphadenitis) in association with HTLV1. British J of Dermatology 1997;136:

- 610-2.
- 14) Oshima K, Shimazaki K, Kume T, Suzumiya J, Kanda M, Kikuchi M. Perforin and Fas pathways of cytotoxic T-cells in histiocytic necrotizing lymphadenitis. *Histopathology* 1998; 33:471-8.
 - 15) Takano Y, Saegusa M, Okudaira M. Pathologic analysis of non-overt necrotizing type Kikuchi and Fujimoto's disease. *Acta Pathol Jpn* 1993;43:635-45.
 - 16) Stephan JL, Jeannoel P, Chanoz J, Gentil-Perret A. Epstein-Barr virus associated Kikuchi disease in two children. *J Pediatr Hematol Oncol* 2001;23:240-3.
 - 17) Chiu CF, Chow KC, Lin TY, Tsai MH, Shih CM, Chen LM. Virus infection in patients with histiocytic necrotizing lymphadenitis in Taiwan. Detection of Epstein-Barr virus, type 1 human T cell lymphotropic virus, and parvovirus B19. *Am J Clin Pathol* 2000;113:774-81.
 - 18) Hudnall SD. Kikuchi-Fujimoto disease. Is Epstein-Barr virus the culprit? *Am J Clin Pathol* 2000;113:761-4.
 - 19) Dominguez DC, Torres ML, Antony S. Is human herpesvirus 6 linked to Kikuchi-Fujimoto disease? The Importance of consistent molecular and serologic analysis. *Southern Medical Journal* 2003;96:226-33.
 - 20) Niederman JC, Lin CR, Kaplan MH, Brown NA. Clinical and serological features of human herpesvirus-6 infection in three adults. *Lancet* 1988;2:817-9.
 - 21) Steeper TA, Horwitz CA, Ablashi DV, Salahuddin SZ, Saxinger C, Saltzman R, et al. The spectrum of clinical and laboratory findings resulting from human herpesvirus-6 (HHV-6) in patients with mononucleosis-like illness not resulting from Epstein-Barr virus or cytomegalovirus. *Am J Clin Pathol* 1990;93:776-83.
 - 22) Krueger GR, Huetter ML, Rojo J, Romero M, Cruz-Ortiz H. Human herpesviruses HHV-4(EBV) and HHV6 in Hodgkin's and Kikuchi's disease and their relation to proliferation and apoptosis. *Anticancer Res* 2001;21:2155-61.
 - 23) Hallas C, Neipel F, Huettnner C, Schreiner D, Fleckenstein B, Muller Hermelink HK. Presence of human herpesvirus type 6 in sporadic lymphoproliferative disorders: A comparative study. *Diagn Mol Pathol* 1996;5:166-72.