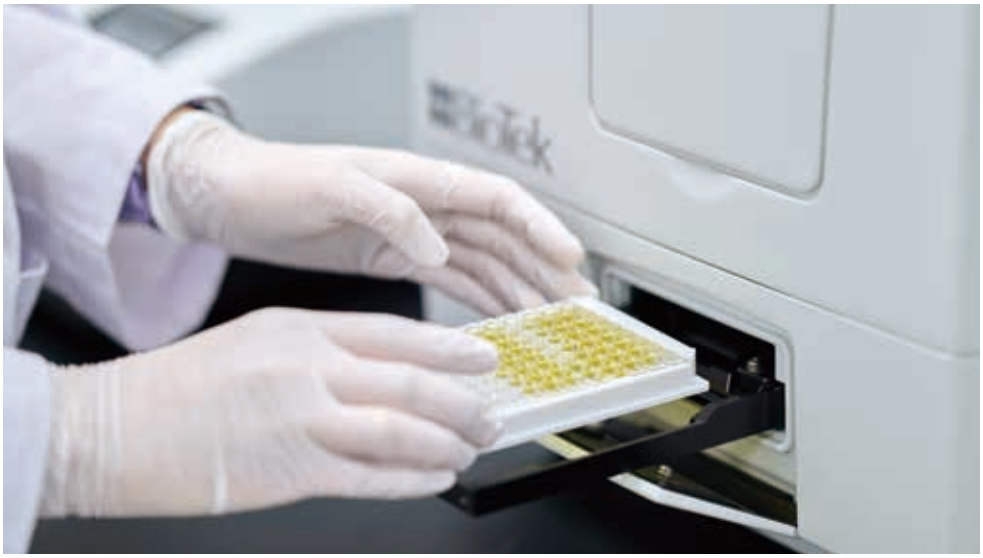
Vol.11

GREEN VET NEWSLETTER

11
JUNE



ABOUT CONTENTS

감염병 검사

고양이 범백혈구감소증 바이러스의 진단과 해석

조직 검사

면역조직화학염색법 (IHC)

Vol.11 JUNE

GREEN VET NEWSLETTER

감염병 검사

고양이 범백혈구감소증 바이러스의 진단과 해석

1. 고양이 범백혈구감소증 바이러스 (feline panleukopenia virus, FPV)의 특징

▶전신 질환을 유발

감수성이 있는 고양이에서 백혈구 감소증, 장염 등의 전신 질환을 유발하여 높은 치사율을 나타낼 수 있는 병원체입니다. 임상증상의 경중은 나이, 면역 상태, 동반 감염 여부 등 여러 요인에 영향을 받기 때문에 무증상 감염하거나 증상이 경미하게 나타나는 경우도 많이 있습니다.

▶환경에서 안정적으로 생존

일반 소독제에 강한 저항성을 나타냅니다. FPV 감염 환자가 있던 공간은 적절한 소독제로 철저하게 처리한 후 2주가 경과해야 FPV를 완전히 제거할 수 있습니다.

▶전염성이 매우 높음

분변-구강 경로를 통해 전파가 이루어집니다. 환경에서 안정적으로 생존하기 때문에 간접 전파도 중요한 전파 경로로 작용합니다. 고양이 방석, 급수기/급식기 등이 감염매개물로 작용할 수 있으며 사람의 의류, 벼룩 등도 기계적 매개체로 작용할 수 있습니다.

▶생독백신으로 예방 가능

생독백신 또는 사독백신을 접종하여 질병을 예방할 수 있습니다. WSAVA 백신 접종 가이드라인에 따르면 생독백신 접종 시에 방어능이 보다 빠르고 효과적으로 생성되어 오랜 기간 유지되기 때문에 생독백신을 접종하는 것이 추천됩니다 (Squires, R. A., et al., 2024).

2. 고양이 범백혈구감소증 바이러스의 진단

임상증상, 혈액검사 등을 바탕으로 고양이 범백혈구감소증 바이러스 (FPV) 감염증이 의심되는 경우 분변 검체에 대한 PCR 검사를 통해 확진에 도움을 받을 수 있습니다.

그린벳에서는 FPV를 포함하여 고양이에서 소화기 질환을 유발할 수 있는 19종의 병원체에 대한 검사를 제공하고 있습니다 **(참조: 표1, 표2)**. Real-time PCR 기법을 이용하여 신속하고 정확한 검사 결과를 얻을 수 있어 급성감염으로 빠른 결과 확인이 필요한 경우에도 도움이 될 수 있습니다. 실제로 그린벳에 의뢰된 PCR 검사에서 FPV는 약 20.56%의 높은 양성률을 나타냈습니다 (2024년 03월 양성률).

검사코드	검사명	검체	TAT	검사항목
GID407	소화기: Feline diarrhea pathogens plus (19종)	분변 5g	2	Feline immunodeficiency virus, Group A rotavirus, Feline panleukopenia virus, Feline coronavirus, Campylobacter jejuni/coli, Clostridium perfringens, Salmonella spp., E.coli-(장출혈성, 장병원성, 장독소성, 장침입성), Entamoeba histolytica, Giardia lamblia, Cryptosporidium parvum, Cyclospora cayetanensis, Tritrichomonas foetus, Toxocara cati, Toxoplasma gondii
GID408	소화기: Feline diarrhea pathogens (11종)	분변 5g	2	Feline immunodeficiency virus, Group A rotavirus, Feline panleukopenia virus, Feline coronavirus, Entamoeba histolytica, Giardia lamblia, Cryptosporidium parvum, Cyclospora cayetanensis, Tritrichomonas foetus, Toxocara cati, Toxoplasma gondii

<표 1> 그린벳 제공 고양이 범백혈구감소증 바이러스 PCR 검사

[감염병검사] 소화기: Feline diarrhea pathogens plus (19종)											
No.	Pathogens		결과 (양성, 음성)	Class						Ct
	분류	항목		1	2	3	4	5	6	
1	Virus	Feline immunodeficiency virus	음성	-						-
2		Group A rotavirus	음성	-						-
3		Feline panleukopenia virus	양성	4.8						20.97
4		Feline coronavirus	양성	5.0						20.17

<표 2> 그린벳 범백혈구감소증 바이러스 검사 결과 예시

3. PCR 결과 해석 관련 FAQ

(1) 건강검진으로 시행한 PCR에서 FPV 양성이 나와서 추적관찰 중인데 별다른 임상증상이 관찰되지 않습니다. 어떻게 해석하면 좋을까요?

▶어린 고양이가 FPV에 감염될 경우 증상이 심각하고 치사율이 매우 높을 수 있지만 FPV가 무증상 감염하거나 증상이 경미하게 나타나는 경우도 종종 있습니다. 특히 백신을 접종한 고양이에서는 면역력이 형성되어 증상이 심각하지 않을 수 있고 생독백신 접종 후 수주 동안은 백신주가 낮은 역가로 검출될 수 있습니다.

(2) 최근에 백신을 접종한 이력이 있는데 양성으로 검출된 FPV가 백신주인지 야외주인지 알 수 있을까요?

▶PCR 검사로 백신주와 야외주를 구분하기는 어렵습니다. 다만 생독백신의 경우 약독화된 바이러스를 이용하기 때문에 보통 낮은 역가로 검출이 됩니다. 야외주의 경우 낮은 역가로 검출될 수도 있지만 매우 높은 역가로 검출이 되는 경우도 있습니다.

(3) FPV 양성이 나온 경우 동거묘에게 전파될 위험이 있을까요?

▶PCR 검사는 살아있는 바이러스가 아니라 DNA를 보는 것이기 때문에 감염력 여부는 알기 어렵습니다. 하지만 환자가 임상증상이 없더라도 검출된 바이러스는 감염력은 있을 수 있으므로 추적관찰 및 동거묘와의 격리가 추천됩니다. 일반적으로 FPV에 감염된 고양이는 분변으로 약 2주 정도 (최대 6주) 바이러스를 배출하는 것으로 알려져 있습니다.

(4) 최근 입양한 길고양이인데 현재 뚜렷한 임상증상은 없지만 FPV 약양성으로 검출되었습니다. 잠복기일 수 있을까요?

▶잠복기 (Incubation period)는 바이러스에 감염된 순간부터 임상적인 증상이 나타날 때까지의 시기를 말합니다. FPV의 잠복기는 약 5일 (2~10일)로 알려져 있습니다. 임상증상이 나타나기 전의 잠복기일 수도 있고 무증상 감염일 수도 있습니다.

(5) 만성 설사 환자인데 FPV 양성으로 검출되었습니다. 설사의 원인이 FPV라고 볼 수 있을까요?

▶FPV는 일반적으로 급성 설사와 관련이 높지만 만성 설사 환자에서 검출되는 경우도 있습니다. FPV에 감염되어 장관계 기능이 약화된 경우 2차 감염 등으로 인해 만성 설사로 진행될 위험이 있습니다. 반대로 만성 설사 환자의 경우 장관계 기능이 저하되어 있어 감염에 취약하기 때문에 FPV 등이 2차 감염하는 경우도 있습니다. 즉 만성 설사의 원인은 복합적일 수 있으며 감염, 식이, 기저질환 등을 종합적으로 고려한 해석이 필요합니다.

(6) 최근 백신 접종 이력 없는 실내 사육 단묘 가정인데 FPV 양성이 나왔습니다. 어떻게 해석하면 좋을까요?

▶FPV의 경우 다른 고양이와 접점이 없는 실내 사육 단묘 가정에서도 많이 검출되는 것으로 알려져 있습니다 (Barrs, V. R., 2019).
즉 분변-구강 전파뿐만 아니라 간접 전파도 중요한 전파 경로 중 하나이며, 사람의 의류, 벼룩 등이 기계적 매개체로 작용하여 환경에서 안정적으로 생존하는 바이러스를 전파할 수 있습니다.

Reference

1. Sykes, J. E. (2022). Greene's Infectious Diseases of the Dog and Cat-E-Book. Elsevier Health Sciences.
2. Maclachlan, N. J., & Dubovi, E. J. (Eds.). (2010). Fenner's veterinary virology. Academic press.
3. Barrs, V. R. (2019). Feline panleukopenia: a re-emergent disease. Veterinary Clinics: Small Animal Practice, 49(4), 651-670.
4. Kruse, B. D., Unterer, S., Horlacher, K., Sauter-Louis, C., & Hartmann, K. (2010). Prognostic factors in cats with feline panleukopenia. Journal of veterinary internal medicine, 24(6), 1271-1276.
5. Squires, R. A., Crawford, C., Marcondes, M., & Whitley, N. (2024). 2024 guidelines for the vaccination of dogs and cats-compiled by the Vaccination Guidelines Group (VGG) of the World Small Animal Veterinary Association (WSAVA). Journal of Small Animal Practice.

글, 사진 최휘연 DVM, PhD, DACVM, KVD

Vol.11 JUNE

조직 검사

Immunohistochemistry (IHC) 면역조직화학염색법

조직 검사는 기본적으로 2-5μm 두께로 박절된 조직을 Hematoxylin과 Eosin 시약을 이용하여 핵과 세포질이 구분되도록 염색하고, 조직을 구성하는 세포의 형태와 세포가 이루는 조직학적 구조를 현미경을 통해 눈으로 확인하여 질병의 상태를 진단하는 검사입니다. Hematoxylin은 푸른 염색상을 가지는 염료로, 염기성/양이온성 물질이기 때문에 산성/음이온성 핵산 (Nucleic acid)에 강하게 결합하여 핵을 푸르게 보이게 합니다. Eosin은 반대로 붉은 염색상을 나타내는 염료로, 산성/음이온성 물질이기 때문에 세포질을 구성하는 단백질의 아르기닌과 라이신과 같은 양이온성 잔기 (Residue)에 강하게 결합하여 세포질을 붉게 보이도록 합니다. 이러한 원리를 이용한 H&E 염색은 1875년 Böhmer와 Fischer가 개발한 이후 현재까지 조직 구조를 관찰하기 위한 기본 염색의 Gold standard로 여겨지며 지속적으로 활용되고 있습니다[1].

H&E 염색은 세포의 형태와 이들이 이루는 조직학적 구조를 관찰하는 데에 있어 매우 유용한 염색으로, 대부분의 조직 검체는 H&E 염색 후 검경을 통해 판독과 진단이 가능합니다. 그러나 간혹 H&E 염색만으로는 판단하기 어려울 때, 관찰되는 세포의 정확한 기원 (Origin)이나 기능을 확인하기 위해 세포가 가지고 있는 고유한 단백질의 종류까지 알아야만 하는 경우가 있습니다.

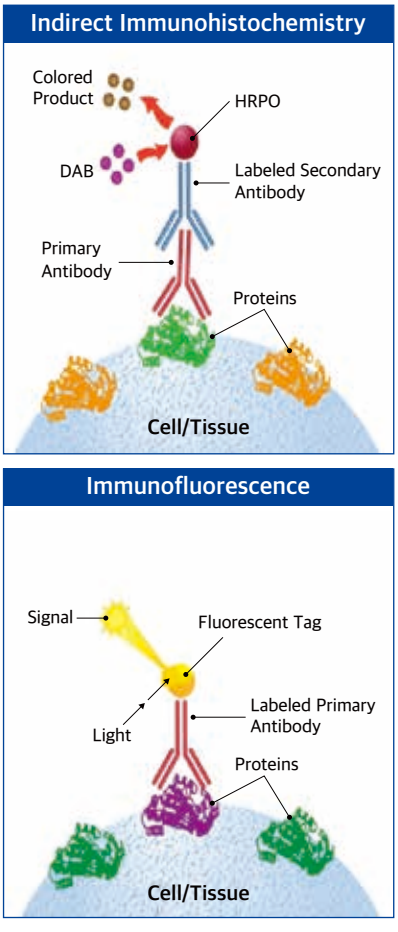
이번 Newletter에서는 조직을 구성하는 세포가 어떤 단백질을 발현하는지 확인하기 위한 검사법인 면역조직화학염색법에 대해 자세히 다뤄보고자 합니다.

Immunohistochemistry (IHC)의 원리

H&E 염색은 조직을 구성하는 세포의 핵과 세포질을 대조 염색함으로써, 세포의 형태적 특징이나 세포들이 배열된 구조적인 특징을 관찰하기에 용이한 염색입니다. 그러나 세포가 어떠한 종류의 단백질을 발현하는지는 H&E 염색된 조직 슬라이드로는 확인할 수 없습니다.

면역조직화학염색법 (Immunohistochemistry, IHC)은 세포가 특정 단백질을 발현하는지 여부를 확인하기 위한 염색법으로, 박절된 조직을 구성하는 세포가 가지고 있는 단백질을 항원-항체 반응을 이용하여 시각화시켜 확인하는 기법입니다. 항원-항체 반응을 이용하여 절편된 조직 상에서 특정 단백질을 확인하는 실험은 1941년 Albert Coons 연구팀에 의해 처음 시도되었고, 연구팀은 냉동절편 조직에 형광을 표지한 1차 항체를 반응시켜 특정 단백질의 존재를 확인하였습니다 [2, 3]. 이후 1965-1967년 효소가 표지된 1차 항체와 해당 효소에 의해 분해되어 색을 나타낼 수 있는 Chromogen을 사용한 방법이 고안되어 현재와 같은 광학현미경으로 확인이 가능해졌습니다 [4]. 또한, 포르말린으로 고정된 조직에서도 단백질을 효과적으로 확인할 수 있도록 열을 가하는 방법 (Boiling method 등)으로 항원을 복원 (Antigen retrieval) 해주는 방법과 1차 항체만을 적용했을 때 관찰될 수 있는 비특이적인 위양성 반응을 최소화하기 위한 2차 항체의 사용법도 개발되면서 현재의 IHC 기법이 완성되었습니다 **(그림 1)**.

그림 1에서 이해할 수 있듯이 세포를 구성하는 성분 중 특정 단백질에 특이적으로 결합하는 항체가 1차로 달라붙고, 1차 항체의 Fc receptor에 특이적인 친화성을 가진 2차 항체에는 효소가 표지되어 있어, 마지막 단계에서 이 효소에 의해 분해되면서 색깔을 나타내게 되는 Chromogen을 처리하면, 최종적으로는 단백질이 있는 곳에서만 염색상을 나타내게 되는 원리입니다. 일반적으로 IHC는 두 가지 효소-Chromogen의 짝 (Pair) 중 하나를 사용하게 되는데 3,3'-Diaminobenzidine (DAB)을 분해시키는 Horseradish peroxidase (HRP)와 Fast red를 분해시키는 Alkaline phosphatase를 사용합니다.
DAB의 경우 효소에 의해 발색되면 갈색으로, Fast red의 경우 빨간 색으로 변하는데, DAB은 발색력이 좋고 알코올과 같은 용매에도 사라지지 않아 보다 널리 사용하고 있는 Chromogen입니다.



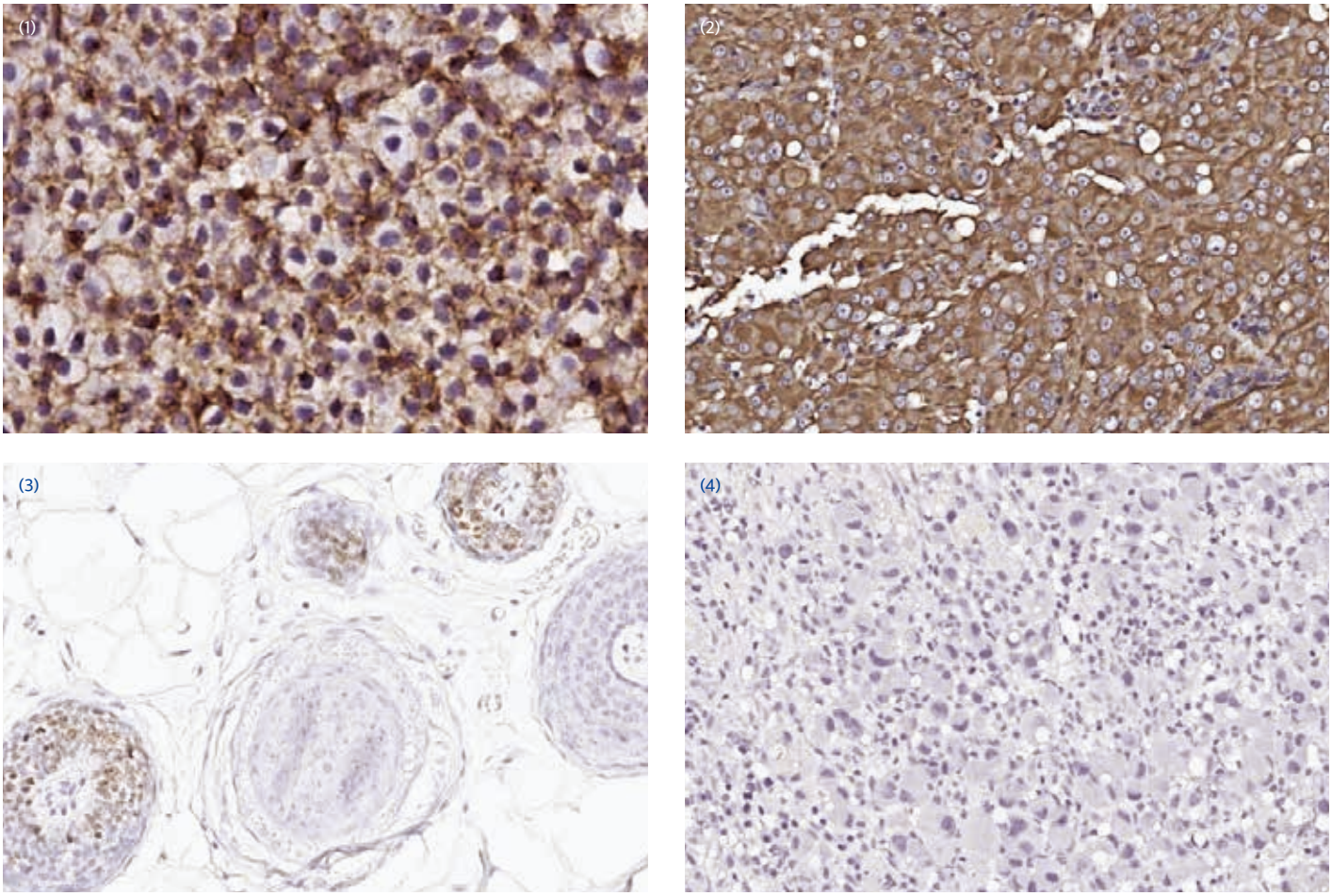
<그림 1> 면역조직화학염색법(위)과 면역조직형광염색법 (아래)의 모식도

Immunohistochemistry (IHC)의 실제

IHC는 H&E 염색과는 달리 과정이 복잡하고 많은 시간이 필요한 작업입니다. 때문에 조직과의 접착력이 우수한 코팅된 슬라이드에 박절한 조을 올려 건조시켜 진행합니다. 또한 수화 (Rehydrated)된 조직 내 단백질이 삼투압 차이 등으로 인해 손상되지 않도록 인산완충생리식염수 (Phosphate-buffered saline, PBS)내에서 다뤄집니다.

과정을 간단하게 요약하면, 탈파라핀 된 조직 슬라이드는 세포가 자체적으로 함유한 분해효소 (Lysozyme)를 불활성화 시키기위해 H2O2처리를 하며, 이후 포르말린 고정 시 발생한 단백질의 3차원적으로 변형 (Folding)을 복원하기 위해 항원 복원 (Buffer내에서 열을 가해 끓여주는 방법을 주로 사용) 과정을 거칩니다. 이렇게 전처리 과정이 끝난 조직을 순차적으로 1차 항체, 2차 항체와 반응시킨 후 Chromogen을 처리합니다. 표적 단백질에 특이적으로 결합하는 1차 항체는 대개 냉장 온도에서 12시간 이상의 반응 시간이 필요하기 때문에 실험은 1박 2일이 소요됩니다. 또한, 항원 복원 과정이나 여러 번의 수세 (Washing)과정 중에 조직 일부가 코팅 슬라이드에서 탈락되는 일이 간혹 발생하기 때문에 재실험이 필요한 경우도 있습니다: 따라서 해당 검사를 아무리 응급으로 진행한다고 하여도 시간이 소요될 수밖에 없는 점을 기본적으로 이해해주시면 좋겠습니다.

이렇게 항원-항체 반응과 발색 과정을 거친 슬라이드는 염색된 단백질 이외에 세포와 조직 구조를 확인하기 위한 대조염색을 짧게 거친 후 봉입하여 검경하게 됩니다. 실제로 모든 염색 과정이 끝난 슬라이드에서는 사진2와 같이 세포막, 세포질, 또는 핵에서 단백질 발현 (Brown)을 확인할 수 있습니다.



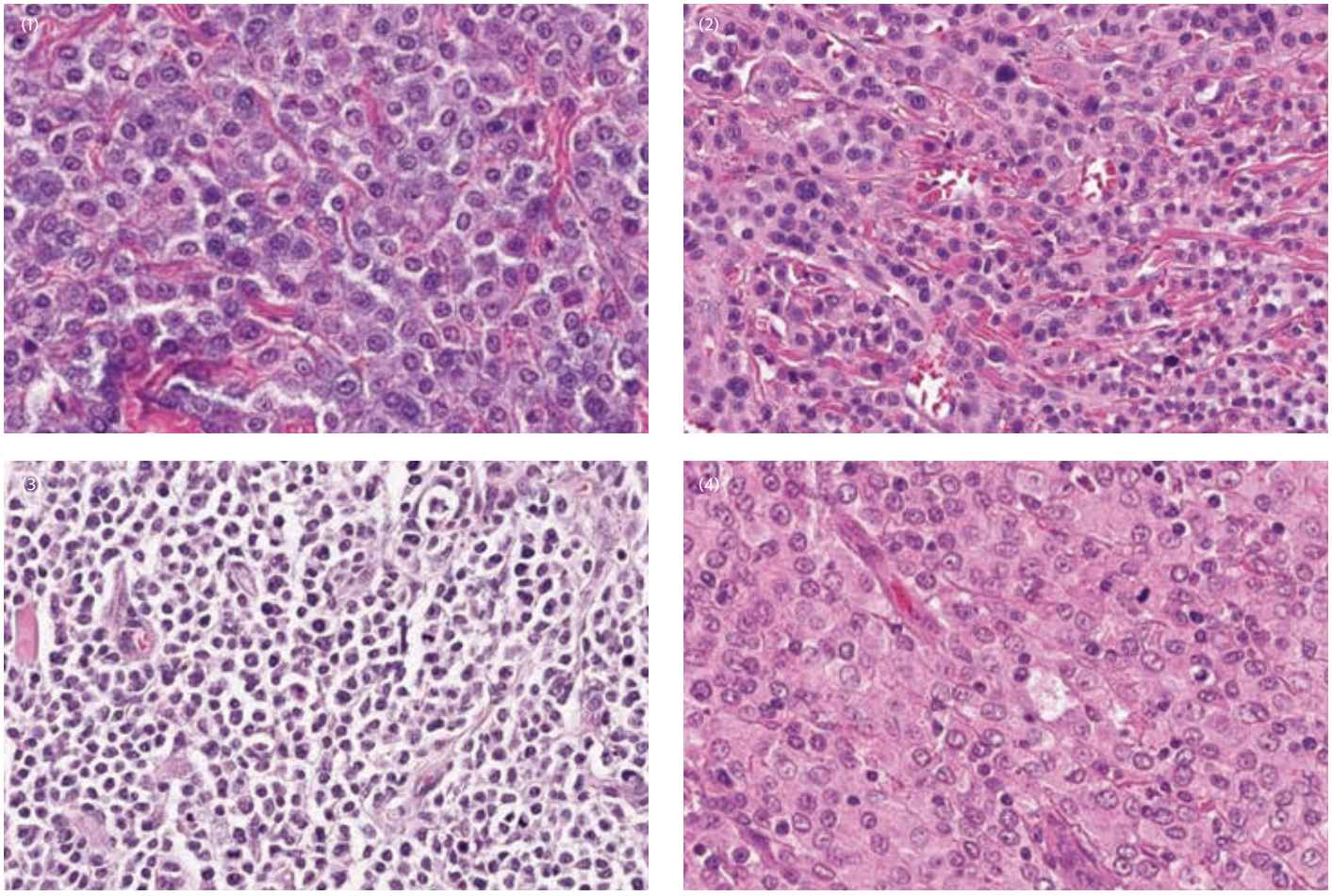
<사진 2> 단백질의 발현 위치에 따른 염색상.
1)세포막에서 강한 양성 반응이 확인 (CD117), 2)세포질에서 강한 양성 반응이 확인 (Vimentin), 3)핵에서 강한 양성 반응이 확인 (Ki-67), 4)양성 반응이 확인되지 않음 (Negative).

Immunohistochemistry (IHC)가 필요한 순간?

IHC는 모든 케이스에서 필요한 검사는 아니지만, 특정 케이스에서는 진단 또는 예후에 대한 판단, 치료 전략을 수립하는 데에 큰 도움이 될 수 있습니다.

먼저, 종양의 진단에 있어서 간혹 종양 세포의 역형성 (Anaplastic)에 의한 변화가 심하거나 다형태성 (Pleomorphism)이 뚜렷하여 일반 염색상에서 종양 세포의 기원을 명확하게 판단하기 어려운 경우가 있습니다. 일반적으로 원형세포종 (Round cell tumor)은 대개 종양 세포가 기원(Origin)에 따라 세포질이 적거나 (림프구 유래), 이염색성 과립을 나타내거나 (비만세포 유래), 편측으로 치우친 핵상 또는 다핵세포를 나타내거나 (형질세포 유래), 풍부한 세포질과 Bean-shape의 핵상을 나타내는 (조직구/대식세포 유래) 등의 특징으로 서로 구분됩니다 **(사진3)**.

그러나 간혹 종양성 증식을 나타내는 원형세포가 본래의 특징을 뚜렷하게 나타내지 않는 경우가 있으며, 피부의 조직구종이나 피부형 형질세포종은 양성 종양의 경과를 나타내는 데에 반해, 림포마 (Lymphoma)나 비만세포종 (Mast cell tumor)은 원거리 전이가 가능한 악성 종양의 경과를 나타낼 수 있기 때문에 감별이 반드시 필요합니다. 이 경우 각각의 세포가 특징적으로 발현하는 단백질을 면역염색을 통해 확인함으로써 세포의 기원을 알아낼 수 있습니다. 림포마는 종양세포가 T cell이 발현하는 단백질인 CD3에 대한 항체나 B cell이 발현하는 단백질인 PAX5, CD20, 또는 CD79α에 대한 항체에 반응성을 나타내는지 확인하여 진단할 수 있습니다. 비만세포는 CD117 (KIT) 단백질을 특이적으로 발현하므로 이에 대한 항체를 주로 이용하며, 형질세포종은 Mum-1, 조직구종은 CD68, Iba1에 대한 항체를 이용하여 감별하여 진단할 수 있습니다.

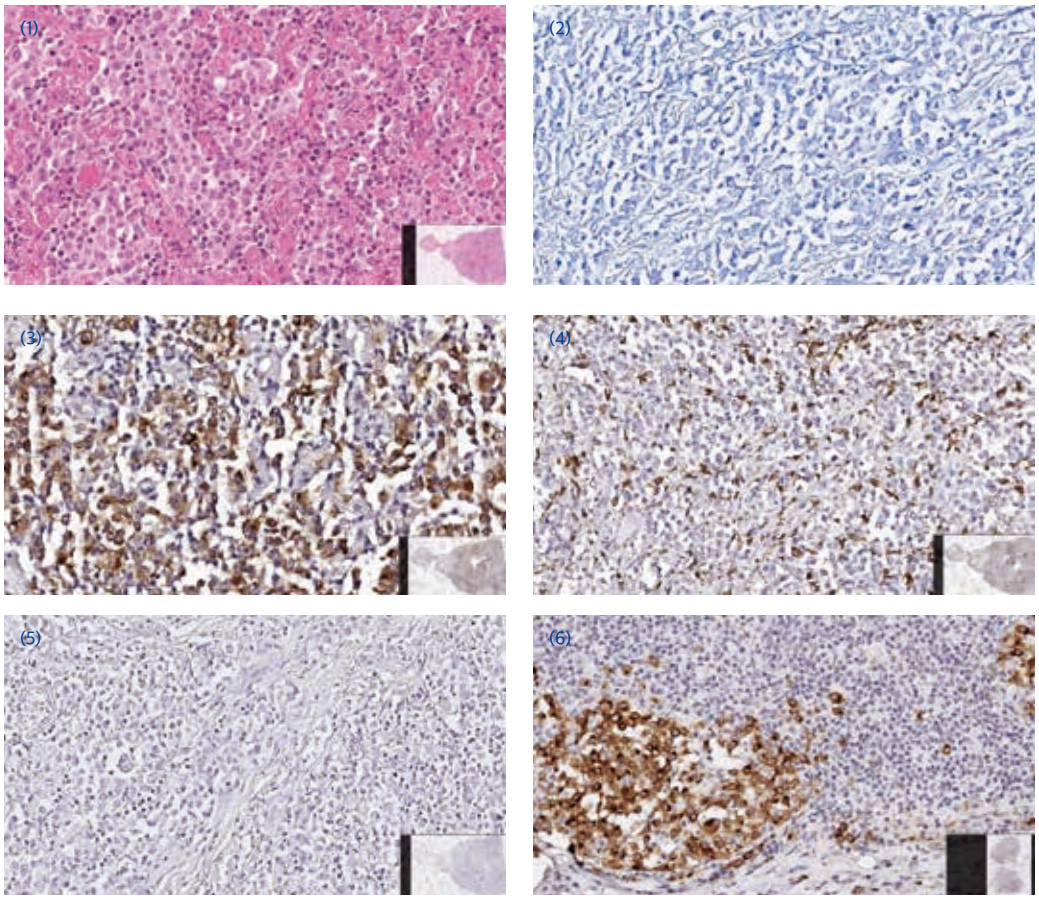


<사진 3> 종양세포의 과립이 뚜렷한 비만세포종(1) 편측의 핵, 이소부동이 심한 핵, 다핵세포를 특징으로 하는 형질세포종(2) 세포질이 적은 원형세포로 구성된 림포마(3) 풍부한 세포질과 Bean-shape의 핵을 가진 세포의 증식으로 특징되는 조직구종(4)

Immunohistochemistry (IHC)가 필요한 순간?

실제로 IHC를 통해 최종 진단된 비만세포종의 예를 살펴보겠습니다 **(사진4)**. 해당 환자는 콧등에 형성된 3x2x1cm의 피부 종괴를 주증으로 하고, 인근 림프절의 종대가 관찰되어 피부 종괴와 림프절이 함께 의뢰되었습니다. 피부의 결절성 병변은 종양성 원형세포로 형성되었고, 원형 세포는 비교적 풍부한 세포질을 가지고 있지만 종양 세포의 분포가 표피를 파고드는 조직구종의 특징으로도 관찰되지 않고, 많은 부분은 아니지만 국소적으로는 호산구가 함께 관찰되는 시야가 있어 미분화 세포로 구성된 비만세포종의 가능성을 배제할 수 없었습니다. 이에 Toluidine blue 특수 염색을 수행하여 1차로 비만세포종을 감별하고자 하였으나, 특수 염색에서도 세포 내 비만세포 특유의 이염색성 과립은 뚜렷하게 확인되지 않았습니다. 따라서 추가적인 IHC 검사를 진행하실 것을 추천드렸고, 그 결과 종양성 원형세포는 CD117 (KIT) 항체에 강한 양성 반응을 나타내어 비만세포 유래로 최종 확인할 수 있었습니다. 원형세포종의 경우, 종종 림프절 내 전이된 종양 세포가 반응성 림프절에서 증가하는 대식세포로 인해 쉽게 판별되지 않는 경우가 있습니다. 해당 증례는 함께 의뢰된 림프절의 피질 (Cortex)에서도 CD117 항체에 양성 반응을 나타내는 비만세포의 존재가 뚜렷하게 식별되어 IHC를 통해 원형세포종의 림프절 전이도 명확하게 확인할 수 있었습니다.

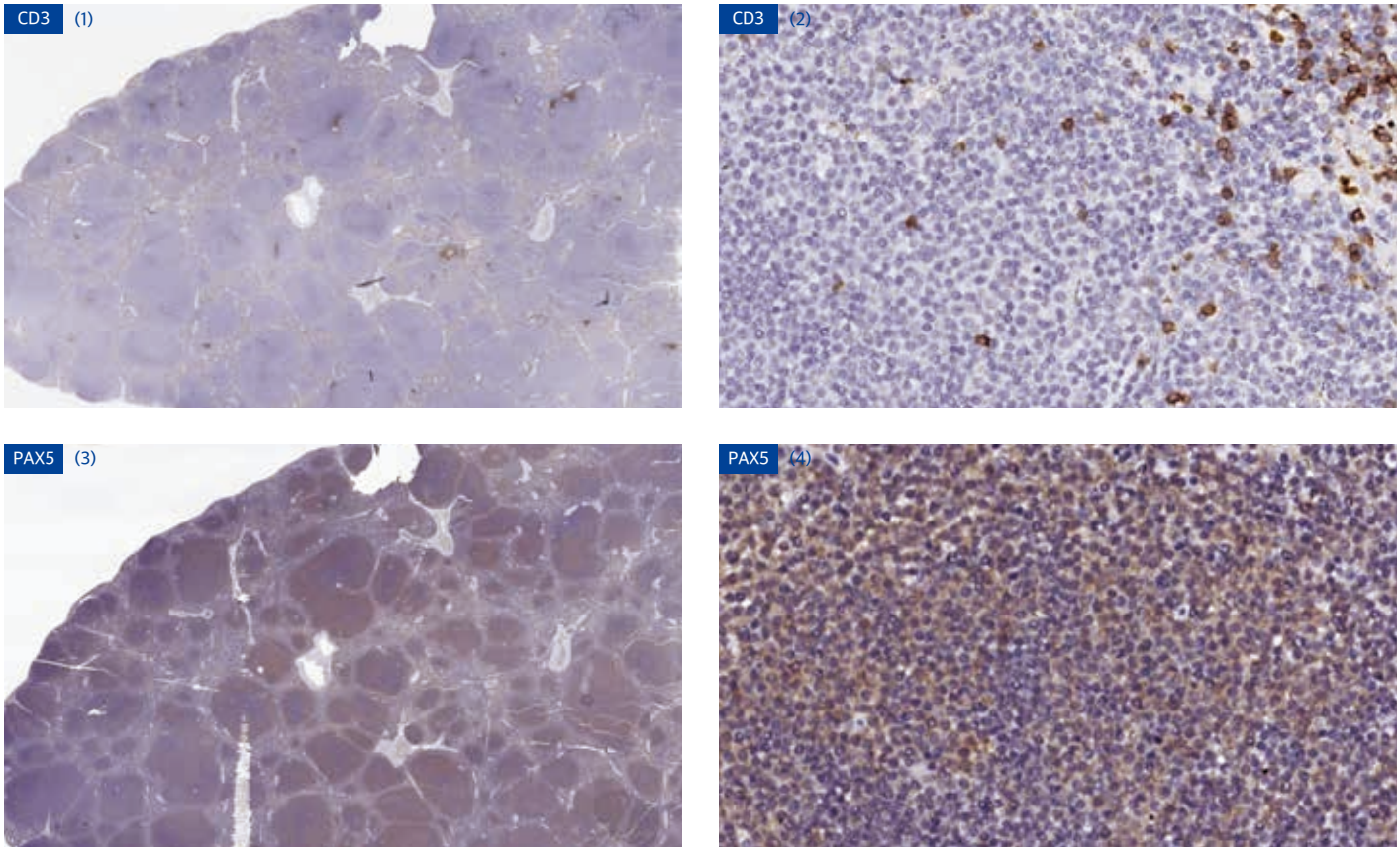
이렇듯, 주로 악성도가 높은 종양의 경우, 세포의 미분화 정도가 높고 심한 역형성이 발생하여 종양 세포의 형태가 비전형적 (Atypia)인 경우가 많지만, 때로는 악성도가 높지 않아도 일반 염색상에서 종양 세포의 형태가 감별되기 어려운 경우도 있습니다.
멜라닌 세포 유래의 종양은 조직학적으로 워낙 다양한 아형 (Subtype)으로 분류되며, 세포의 형태가 원형, 다각형, 방추형으로 다양하게 관찰될 수 있어 무색소성 멜라노마 (Amelanotic melanoma)의 경우 확인을 위한 IHC가 종종 추천되곤 합니다. 또한 위장관에서 발생하는 평활근육종 (Leiomyosarcoma, Smooth muscle 유래)과 위장관기질종양 (Gastrointestinal stromal tumor; GIST, Interstitial cell of Cajal 유래)은 일반 염색상에서 잘 구분되지 않아 α-SMA과 CD117에 대한 항체를 이용하여 감별하곤 합니다. 다양한 육종 (Sarcoma) 역시 방추형의 세포 증식으로 관찰되는 공통점이 있어 정확한 감별을 위해서는 α-SMA (Leiomyosarcoma), vWF 또는 CD31 (Hemangiosarcoma), Desmin 또는 MyoD (Rhabdomyosarcoma), Iba-1 또는 CD68 (Histiocytic sarcoma)와 같은 항체를 이용한 면역 염색이 필요하지만, 일반적으로 혈관육종이나 횡문근육종을 제외한 일반 연부조직육종으로 통칭되는 육종들은 임상적인 진행 양상이나 예후에 큰 차이가 없으며, 조직학적 등급 역시 동일한 기준으로 분류할 수 있어 반드시 IHC 추가 검사가 필요한 것은 아닙니다.



<사진 4> Poorly granulated mast cell tumor, High grade. 과립상이 관찰되지 않는 원형세포종 (HE;1).
특수염색에서도 과립상이 확인되지 않는 원형세포종 (Toluidine blue; 2).
CD117 positive neoplastic cells; 원발 종양: Mast cell tumor(3),
종양 세포는 Iba-1 항체에 양성 반응 나타내지 않았으며, 주변에 산발적으로 흩어진 Macrophage들에서 Iba-1 항체에 양성 반응 확인됨 (4).
Mum-1 negative neoplastic cells(5),
CD117 positive cells; 림프절: Metastasized mast cell tumor(6)

Immunohistochemistry (IHC)를 이용한 예후 예측, 치료제의 선택

일반적으로 IHC를 가장 많이 수행하는 종양은 단연 림포마 (Lymphoma)입니다. 세포를 직접 공격하는 T 림프구와 항체를 생산하여 면역 반응에 기여하는 B 림프구는 형태적으로는 구분할 수 없기 때문에 세포가 발현하는 특정 단백질로 구분합니다. IHC는 림포마와 다른 종류의 원형 세포종을 감별하기 위해서도 수행하기도 하지만, 림포마가 T cell 유래인지 B cell 유래인지와, 조직학적, 그리고 분자면역학적 Subtype을 명확히 판단하기 위해서도 종종 수행합니다. Pan-T cell이 발현하는 특이적인 단백질 항원으로는 일반적으로 CD3를, Pan-B cell의 경우에는 CD79α나 PAX5를 이용합니다.

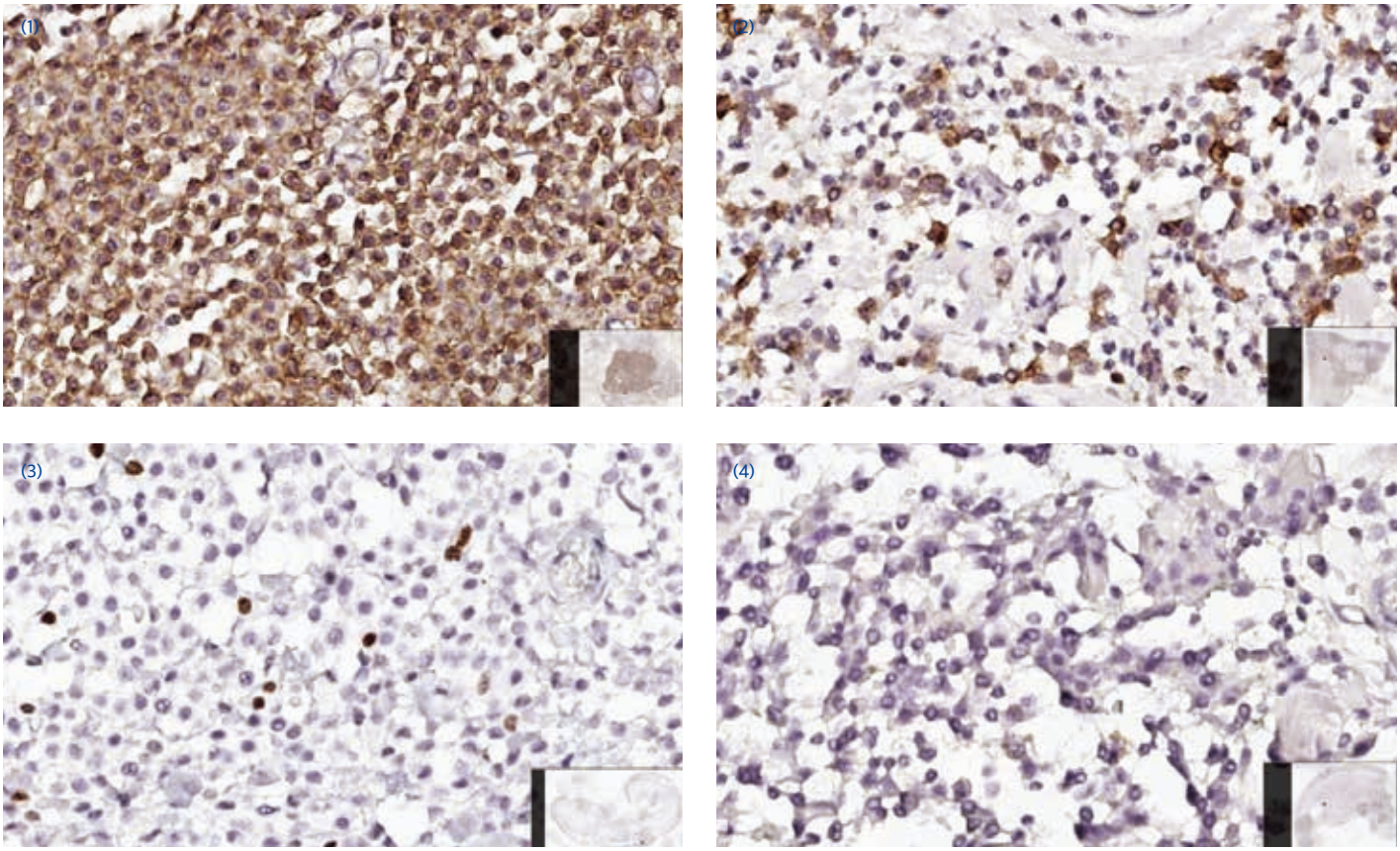


<사진 5> Follicular lymphoma (B cell type), 비장. CD3 Negative neoplastic cells (1,2), PAX5 Positive neoplastic cells (3,4).

개와 고양이의 림포마는 전체 종양의 각 7-14%, 20-30% 정도로 진단되는 비교적 흔한 종양입니다. 림포마는 발생 위치 (림프절이나 비장과 같은 림프 계통, 위장관계, 체표, 비강 등), 종양 세포의 형태적 특징 (Large cell vs. Small cell type), 조직 구조적인 특징과 분자면역학적 특징 (다양한 Subtype)에 따라서 다양한 예후로 경과하고, 항암제 (Chemotherapy)에 대한 반응성도 다양하게 나타날 수 있습니다. 따라서 림포마로 진단되는 것만으로 치료 전략을 수립하거나 정확한 예후를 예측하기 어려운 경우가 많아 종양 세포의 기원확인과 조직학적 세분화를 위해 T cell과 B cell 각각에 특이적인 두 종류의 항체를 이용하여 2 Panel IHC를 수행하곤 합니다. 일반적으로 미분화 중대형 림프구의 증식으로 인한 Large cell, Diffuse type의 림포마가 공격적인 진행 성향이 강하고, B cell 림포마가 항암제에 대한 치료 반응성이 더 좋다고 알려져 있으나, 그 외에도 전술한 대로 발생한 위치나 조직학적 세분화 (개의 경우 50개 이상의 Subtype으로 분류됨)에 따라 예후에 대한 다양한 연구 결과가 존재하는 만큼, 림포마는 진단 후 IHC 추가 검사가 일반적으로 추천되는 종양입니다.

간혹 B cell이나 T cell 한 종류의 항체만 이용하여 검사를 진행할 수 있는지 궁금해하시는 분들이 있는데, 조직학적 Subtype을 명확하게 판단하기 위해서는 종양성 림프구와 비종양성 림프구의 분포를 관찰해야 가능하기 때문에 추천되지 않습니다. 또한, T cell, B cell 두 Marker모두 표지되지 않는 Null cell type이나 림프구와 형태적으로 잘 구분되지 않는 다발성 골수종 (Multiple myeloma)의 가능성도 검토해야 하므로, T cell 또는 B cell 한 가지 분포만 확인하는 것은 정확하고 세분화된 진단에 도움이 되지 않습니다.

Immunohistochemistry (IHC)를 이용한 예후 예측, 치료제의 선택



<사진 6> 개의 비만세포종의 예후 판정과 치료제의 선택을 위한 검사. 세포막에 한정적으로 관찰되는 CD117 (KIT) Protein expression(1). 세포질 전반에 걸쳐 관찰되는 CD117 (KIT) Protein expression(2). 핵 분열상이 높은 Mast cell tumor; 많은 수의 ki67 Positive cells(3). 핵 분열상이 낮은 Mast cell tumor; 매우 적은 수의 Ki67 Positive cells(4)

그 외 비만세포종의 KIT Protein의 발현 패턴이나 핵의 분열지수 (Ki67)에 대한 정밀 평가는 비만세포종의 예후 예측과 항암제의 선택에 도움이 될 수 있습니다. 미국 미시건대학의 Dr. Kiupel 연구팀은 오랜 기간 동안 개의 비만세포종을 연구하여 다양한 연구 결과를 도출하였습니다 [6]. 연구 결과에 따르면, C-KIT Gene의 변이와 해당 유전자로부터 발현되는 단백질인 KIT Protein의 발현 양상은 개의 비만세포종의 예후나 Tyrosine Kinase inhibitor (TKI)계열 항암제에 대한 치료 반응성과 통계적으로 유의한 연관 관계가 있는 것으로 나타났습니다. 일반적으로 종양성 비만 세포가 KIT Protein을 세포막에 한정적으로 발현하는 경우 (Pattern 1)는 수술적으로 완전히 제거되면 대체로 양호한 예후로 경과하는 것으로 연구되었으나, KIT Pattern 2를 나타낸 환자의 20%는 10개월 이내에, KIT Pattern 3을 나타낸 환자의 30%는 6개월 이내에 사망하였습니다. 다만 KIT Pattern 2와 3에 해당하는 경우 TKI종류의 치료제에 대한 반응이 양호하고 Pattern 1은 TKI종류의 치료제가 효과적이지 않은 것으로도 연구되어 있습니다. 또한, 개의 비만세포종은 종양 세포의 분열 활성 정도 (Mitotic activity)가 예후와 매우 밀접한 것으로 오랜 기간의 연구에서 공통적으로 확인되었고, 세포분열시 발현하는 단백질인 Ki67을 발현하는 세포의 수/비율 역시 개의 비만세포종의 예후를 예측하는 데에 유용한 정보를 제공합니다.

그 외 유선 종양의 HER2 발현 여부를 검사하기 위해 IHC를 이용하기도 합니다. HER2는 Human Epidermal growth factor Receptor 2의 약자로 세포의 성장을 조절하는 유전자와 해당 유전자가 코딩하는 단백질입니다. 유방암 (유선종양), 위암, 폐암, 요로상피암을 포함한 다양한 상피암종의 세포의 표면에서 HER2 단백질 (수용체)이 과발현 (Overexpression)될 수 있는데, 특히 HER2 과발현은 사람의 유방암에서 잘 연구되어 있습니다. 이 단백질을 표적으로 하는 Herceptin과 같은 항암제는 HER2의 세포전달 경로만을 선택적으로 차단하는 제제로 기존의 항암제보다 구토, 탈모, 혈구감소증과 같은 부작용이 낮고 치료 효과가 우수한 것으로 알려져 있습니다. 해당 기전의 항암제의 사용을 선택지로 고려하고 있다면 HER2 발현을 IHC를 통한 확인이 추천됩니다.

Immunohistochemistry (IHC): 100% 개런티 할 수 없음

결론적으로, 위에 언급된 다양한 이유로 IHC는 최종 진단이나 문헌에 기반한 환자의 예후 예측, 항암제의 선택에 있어 종종 가치 있는 정보를 제공할 수 있습니다. 그러나 IHC를 진행한다고 해서 모든 경우에 진단이나 예후 예측에 도움이 된다고 단언할 수는 없습니다.
먼저, 수의학에서 사용하고 있는 대부분의 항체는 수요가 적어 개나 고양이에 맞춰서 개발되어 있지 않습니다. 대개 사람의 항원을 이용하여 제조한 항체들을 수의학 분야의 연구자들이 개, 고양이, 또는 그 외의 반려 동물의 조직에 일일이 실험하여 사용 가능성을 검증한 후 사용하고 있다 보니 검증 과정에서는 어느 정도 종간 교차반응성과 범용성 (개 또는 고양이의 해당 단백질을 표지함)이 확인되었더라도 실제 특정 환자의 조직에서는 항원-항체 반응의 특이성이나 민감성이 충분하지 않은 경우가 있습니다. 또한, 악성도 높고 역형성 정도가 심한 미분화암종의 경우 세포의 형태 뿐 아니라 세포가 발현하는 단백질에도 변이나 변형이 일어나기도 하며, 단백질의 발현 자체나 항체가 인지 (Recognition)할 수 있는 Epitope이 변하면 IHC 시 항원-항체 반응이 제대로 일어나지 않기도 합니다.

실제로, 어떠한 문제에 기인하는지는 정확히 알 수 없으나 개의 흑색종 (Melanoma)의 진단에 널리 활용하고 있는 Melan A 항체의 민감도는 대략 76% 정도로 연구되어 있습니다 [7]. 나머지 24%의 증례의 경우 진단 보조 (확인)를 위해서는 PNL-2와 같은 멜라닌세포에서 특이적으로 발현하는 다른 단백질 항원을 이용한 추가 IHC를 수행하거나, 특이도는 낮지만 민감도가 높은 S100과 같은 항체를 이용한 IHC 결과를 참고해야 합니다.

또한, 앞서 간략히 언급되었지만 T cell 유래도 B cell 유래도 아닌 림포마 (Null cell type, NK cell과 같은 다른 Lymphoid progenitor cell 유래의 경우)도 일반적으로 수행하는 pan-T cell, Pan-B cell marker에 반응하지 않기 때문에 IHC 수행에도 세포의 기원이나 Subtyping에 필요한 정보를 얻지 못할 수 있습니다. 그리고 부신 유래의 종양 역시 종양 세포가 피질 (Cortex) 유래인지 수질 (Medulla) 유래인지 조직 소견 상에서 구분하기 어려운 경우 Enkephalin (수질 유래 세포 Marker) 또는 Inhibin (피질 유래 세포 Marker)과 같은 항체를 이용한 IHC로 감별을 시도할 수 있으나, 양성과 악성 부신 피질 종양 (Adrenal cortical adenoma/Adenocarcinoma)의 80% 정도만이 Inhibin 항체에 반응을 나타내는 것으로 보고되기도 하였습니다 [8]. 따라서 IHC는 "반드시 최종 감별진단을 할 수 있는 최후의 검사"로 인식하기보다는 "정확한 감별을 위해 대개는 도움이 되는 추가 검사"로 인식하시는 것이 좋겠습니다.

그리고 예후의 예측에 대한 자료 역시 수 십여 년 간의 다양한 연구 결과를 분석한 통계에 기반한 것일 뿐, 모든 환자는 통계상의 수치가 아닌 각자의 종양과 질병을 안고 살아가는 것이기 때문에 이를 참고하여 개별 환자에 맞는 최선의 치료 전략을 수립하는 것은 주치의의 역할일 것입니다. 그린벳은 임상 수의사가 질병을 보다 정확하게 이해하고 효과적인 치료 전략 수립할 수 있도록, IHC가 필요하다고 판단되는 환자의 경우 필요한 검사에 대한 개요와 검사 결과에 대한 충분한 학술적 정보를 제공하도록 계속 노력하겠습니다.

Reference

1. H&E Stain. In book: Cytopreparation. DOI: 10.1007/978-1-4614-4933-1_12.
2. Methods Mol Biol. 2022:2422:17-31. doi: 10.1007/978-1-0716-1948-3_2.
3. Exp Biol Med. 1941; 47:200-202.
4. History of Immunohistochemistry. In book: Pathobiology of Human Disease: A Dynamic Encyclopedia of Disease MechanismsChapter: History of Immunohistochemistgry DOI: 10.1016/B978-0-12-386456-7.07401-3.
5. https://www.sigmaaldrich.com/KR/ko/applications/protein-biology/immunohistochemistry
6. https://cvm.msu.edu/vdl/laboratory-sections/anatomic-surgical-pathology/biopsy-service/detecting-c-kit-mutations
7. https://doi.org/10.1177/0300985810382095
8. https://academic.naver.com/article.naver?doc_id=142153205

글, 사진 조직검사Unit 이지영 수의사

고객센터 Tel. 031-270-1500 | www.greenvet.co.kr | www.gcgreenvet.co.kr