

갑상샘 세침흡인검사에서 SurePath™ 액상세포검사의 임상적 유용성에 대한 연구: 고식적 도말검사와의 비교 및 BRAF 유전자변이검사의 적용

김옥연 · 이상화 · 고영신 · 임소덕¹
김완섭¹ · 한혜승¹ · 설혜실 · 오서영
문원진² · 황태숙¹

건국대학교병원 병리과, 건국대학교
의학전문대학원 병리학교실 및
²영상의학과교실

접 수: 2010년 12월 2일
게재승인: 2011년 3월 14일

책임저자: 황 태 숙
우 143-701 서울시 광진구 화양동 4-12
건국대학교병원 병리과
전화: +82-2-2030-5641
Fax: +82-2-2030-5629
E-mail: tshwang@kuh.ac.kr

*본 논문은 2009년도 건국대학교 학술진흥연
구비 지원에 의한 논문임.

갑상샘 세침흡인검사는 갑상샘의 결절성 병변을 진단하는 데 있어 가장 중요한 일차적 선별검사로 이용되어져 왔다. 그러나 지금까지 세침흡인검사의 기준으로 사용되어온 고식적 도말검사의 경우, 충분한 양을 흡인하여 제대로 시행한다면 그 자체만으로도 충분히 진단적이지만 세포의 중첩이나 건조로 인한 오류의 가능성과 함께 혈액 등의 불필요한 오염물질이 대부분인 검체인 경우 진단이 어렵거나 불가능할 수 있다는 점, 또 이를 피하고자 여러 번 채취하여 많은 양을 도말하게 되면 판독에 많은 시간이 소요되어 병리의사의 피로를 가중시킨다는 점 등이 단점으로 지적되어 왔다.¹

이러한 단점들을 극복하기 위해 부인과 영역에서 먼저 도입되어 대중화된 액상세포검사가 갑상샘 세침흡인검사에도 도입되기 시작했고, 고식적 도말검사와 액상세포검사를 진단적 정확성이나 효능의 관점에 의거하여 서로 비교한 결과들이 여러 차례 있었다.

이에 관련된 중전의 보고들은 크게 세 가지로 요약할 수 있는데, 즉 민감도나 특이도 등의 진단적 지표에서 고식적 도말검사가 더

Clinical Usefulness of SurePath™ Liquid-based Cytology in Thyroid Fine Needle Aspiration: Comparison with the Conventional Smear in Diagnostic Efficacy and Applicability of BRAF Mutation Test

Wook Youn Kim · Sang Hwa Lee · Young Sin Ko · So Dug Lim¹ · Wan Seop Kim¹
Hye Seung Han¹ · Hye Sil Seol · Seo Young Oh · Won-Jin Moon² · Tae Sook Hwang¹

Department of Pathology, Konkuk University Medical Center; Departments of ¹Pathology and ²Radiology, Konkuk University School of Medicine, Seoul, Korea

Background: Recently, liquid-based cytology (LBC) has been introduced as an alternative to the conventional smear (CS) technique in thyroid fine needle aspiration, due to its diagnostic convenience. **Methods:** We assessed 77 cases of thyroid fine needle aspiration using the SurePath™ method (SP) as LBC and CS via split-sample techniques. BRAF mutation tests were carried out via polymerase chain reaction and pyrosequencing immediately after diagnosis or a delay of more than one year. **Results:** In a comparison between SP and CS, the rate of concordance between SP and CS was as high as 84.4% (kappa value, 0.754). In comparison with histologic diagnosis, the overall sensitivity was 100% for both. The specificity was 62.5% for SP and 56.3% for CS. Relative to CS, papillary carcinomas on SP slides revealed more accentuated nuclear irregularities, nucleoli, and reduced nuclear size. In contrast to CS, the delayed BRAFV600E mutation test using SP slides after 1-2 years failed. The use of new primers amplifying shorter product size could help the delayed test achieve success. **Conclusions:** Differences in the diagnostic efficacy of SP and CS were negligible. The failure of the delayed BRAF mutation test on the SP slides might be associated with DNA degradation.

Key Words: Cytology; Biopsy, fine-needle; Thyroid gland; SurePath™; BRAFV600E

나은 결과를 보였다는 보고,¹⁻⁴ 액상세포검사가 더 우월했다는 보고,^{1,5,7} 그리고 서로 별 차이가 없었다는 보고 등이다.⁸ 또 두 방법을 비교할 때 민감도나 특이도 분석 외에 액상세포검사에서 미결정성 병변에 해당하는 진단군이 감소하거나 고식적 도말검사에서 미결정성 병변이나 조직진단에서 악성이었던 진단군을 더 확실히 악성으로 진단할 수 있었다는 점에서 액상세포검사의 장점을 기술한 연구도 있었다.^{6,9}

이러한 연구들은 주로 액상세포검사의 대표적 방법인 ThinPrep®을 이용한 것이 대부분이었는데,^{1-4,7,8,10} 이 방법은 흡인 및 여과를 주된 원리로 하는 방법으로 알려져 있다. 또 다른 대표적 방법으로 최근 들어 원심분리를 통한 침전을 주 원리로 하는 SurePath™이 액상세포검사에서 활발히 이용되고 있으나, 이 방법을 이용한 연구는 상대적으로 적은 편이다.^{5,6}

한편 ThinPrep®을 이용한 연구가 진단적 유용성을 평가하는 데 있어 위에서 말한 세 가지 결과를 비슷한 빈도로 보고한 반면,

SurePath™은 고식적 도말검사보다 더 우월하다는 몇몇 보고가 있었으나 그 수가 적어 아직 결론을 내리기에 부족한 실정이다.^{5,6}

액상세포검사를 추천하는 또 다른 이유는 면역화학염색이나 분자병리검사 등의 부가적 검사를 수행하기 용이하다는 점 때문이다.^{3,6,10-13} 국내 연구 결과에 따르면, *BRAF* 유전자변이검사는 한국의 유두암종 증례에서 *BRAF* 변이의 유병률이 80-90% 정도로 매우 높고, 특이도는 거의 100%에 가깝다고 알려져 있다.¹⁴⁻¹⁸ 이는 환자에게서 채취한 일차적 선별검사인 세포 검체에서 유전자 변이를 검출하는 것이 상당한 임상적 유용성이 있다는 것을 입증하는 것이다. 그러나 지금까지의 보고들은 고식적 도말검사 슬라이드에서 시행되어 온 결과들이고, 현재까지 액상세포검사 슬라이드에서 *BRAF* 유전자변이검사를 시행한 연구는 알려진 것이 없다. 따라서 액상세포검사의 고정 및 슬라이드 제작과정이 고식적 도말검사와 다르다는 점에서 액상세포검사에서의 *BRAF* 유전자변이검사의 적용 가능성을 검토하는 것이 필요하다.

지금까지 논의된 이러한 문제들을 고려하여 본 연구에서는 크게 두 가지 방향으로 액상세포검사의 실질적 적용 가능성을 모색하였다. 우선 기존에 사용되어온 고식적 도말검사와의 비교를 통해 진단적 효능이 차이가 있는지를 검토하였고, 다음으로 *BRAF* 유전자변이검사가 고식적 도말검사에서도 시행되는 바와 동일하게 액상세포검사에서도 시행이 가능한지를 검토하였다.

재료 및 방법

연구 대상, 검체 채취, 슬라이드 제작 및 판독

본 연구는 2008년도 7월부터 2010년 9월까지 건국대학교병원에서 102명의 환자들에게 시행한 105예의 갑상샘 세침흡인검사를 대상으로 하였다. 총 105예 중 80예는 영상의학과 의사나 혹은 임상 의사가 환자로부터 초음파 유도 세침흡인검사를 통해 검체를 채취하였고, 25예는 외과적으로 절제된 갑상샘조직으로부터 직접 흡인하는 방법으로 검체를 채취하였는데, 80예와 중복되지 않도록 시기를 달리하여 진행하였다. 각 검체는 한번의 세침흡인을 통해 두 가지 검사인 고식적 도말검사와 액상세포검사를 동시에 시행하는 방법인 분리검사법(split-sample technique)으로 세포학적 검사를 진행하였다.

고식적 세포도말 검사는 흡인한 검체를 직접 슬라이드에 도말하여 95% 알코올에 고정한 후 파파니콜 염색을 하였고, 주사기에 남아 있는 검체는 액상세포검사용 보존용액(red solution; isopropanol, methanol, ethylene glycol, formaldehyde)에 분사하여 SurePath™ (TriPath Imaging Inc., Burlington, NC, USA)에서 사용하는 방법에 의해 액상세포검사 슬라이드를 제작하였다.

이때 세포학적 진단은 베데스다 갑상샘 세침흡인검사 분류체계(the Bethesda thyroid fine needle aspiration classification system)⁹에 따라 불충분(insufficient for diagnosis), 양성(benign), 미결정성

의 비정형 세포(atypical cells of undetermined significance, ACUS), 소포종양의증(suspicious for follicular neoplasm), 악성의증(suspicious for malignancy), 악성(malignant) 등으로 구분하였고, 각각의 상위 분류에 포함된 하위 분류에 따라 세부적으로 구분하였다. 또한 두 명의 병리의사가 각각 독립적으로 슬라이드를 판독한 후 다시 전체를 함께 판독하여 의견의 합의를 이루는 방식으로 세포학적 진단을 하였으며, 두 병리의사 사이에 의견이 일치하지 않는 경우는 다른 병리의사들과의 동시판독을 통해 합의를 달성하였다.

저자들은 이 연구에서 한 번의 흡인으로 검체를 분리하는 방법을 사용하였기 때문에 두 방법의 진단 효능을 동등한 수준에서 비교하기 위해서는 불충분 검체를 제외하는 것이 필요하다고 판단하였다. 따라서 두 방법 중 하나에서라도 불충분에 해당하는 경우가 생긴다면 연구 대상에서 제외하였다. 불충분 검체는 베데스다 분류 체계의 기준에 따라 10개 이상의 소포세포를 포함하는 세포군집이 6개보다 적을 때, 소포세포가 제대로 염색되지 않았거나 기타의 이유로 판독이 어려울 때 등으로 판정하였다. 그 결과 56명의 환자로부터 초음파 유도 세침흡인을 통해 시행한 59예와 18명의 환자로부터 절제된 갑상샘에서 직접 흡인한 18예를 최종적으로 연구 대상으로 하였다. 이 중 초음파 유도 세침흡인 59예 중 13예에서 이후에 갑상샘 절제가 시행되어 조직학적 진단이 확인되었고, 절제된 갑상샘에서 흡인한 18예를 합쳐 총 31예에서 조직학적 확진이 가능하였다.

그리고 이번 연구에서 사용한 액상세포 보존 용액(red solution)의 DNA 보존에 대한 문제점이 확인되면서 새로운 액상세포 보존 용액(blue solution; ethanol 42-44%, methanol 4-6%)을 사용하여 추가로 외과적으로 절제된 갑상샘의 유두암종 4예에서 액상세포검사를 시행, *BRAF* 변이 분석 및 세포학적 관찰을 시행하였다.

BRAF 변이 분석

BRAF 변이 분석은 연구에 포함된 77예 중 16예에서 진행하였고, 새로운 보존 용액(blue solution)을 사용한 액상세포검사 4예도 추가적으로 시행하였다. 검체 채취 당시에 시행한 검사는 9예를 분리검사법에 의해 각각 고식적 도말슬라이드와 액상세포슬라이드로 제작하여 *BRAF* 검사를 시행하였고 그 결과를 서로 비교하였다. 또 시간에 따른 DNA 보존 여부를 확인하기 위해 검체 채취로부터 1-2년이 지난 시점에 시행한 검사는 위에서 분석한 9예에 포함되지 않는 별개의 액상세포 증례 3예와 고식적 도말 증례 4예를 이용하여 *BRAF* 변이 분석을 시행하였다.

그리고 액상세포 보존 용액(red solution)의 DNA 보존 문제점이 알려지면서 새로운 액상세포 보존 용액(blue solution)을 사용하여 추가로 시행한 4예에서 액상세포슬라이드를 사용하여 *BRAF* 변이 분석을 시행하였다. 시간이 경과한 후 *BRAF* 유전자변이검사를 수행하는 데 실패했던 액상세포슬라이드로부터 추출한 DNA는 *BRAF* 유전자의 상대적으로 좁은 부위(72 염기쌍[base pair])를 증폭하는 새로운 시동체를 사용하여 다시 한번 *BRAF* 변이 분석을 시행하였다.

DNA 추출, 중합효소연쇄반응과 pyrosequencing 분석

세포슬라이드에서 *BRAF* 변이 여부를 분석하기 위해 DNA를 추출, 중합효소연쇄반응(polymerase chain reaction, PCR)을 통한 증폭과 pyrosequencing 기법을 이용한 유전자 변이 분석을 시행하였다.

DNA 추출과정은 흡인세포 슬라이드의 뒷개를 벗긴 후 세포들을 긁어 모아서 DNA를 추출하는 방식으로 이루어졌는데 이를 간단히 요약하면, 10%의 resin이 들어 있는 20-50 mL의 DNA 추출 버퍼 용액(50 mM Tris-Cl pH 8.3, 1 mM EDTA pH 8.0, 5% Tween 20, 100 mg/mL proteinase K)을 긁어 모은 세포에 첨가하여 최소 한 시간 동안 56°C에서 유지하였다. 그리고 한 시간이 지난 후 100°C까지 가열하여 10분 동안 유지한 후 다시 원심 분리하여 침전물을 제외한 상층액을 뽑아 PCR에 사용하였다.

PCR에서 시동체(primer)는 exon 15 (T1799A) forward, 5'-biotin-CTTCATAATGCTTGCTCTGATAGG-3', reverse, 5'-GGCCAAA-ATTTAATCAGTGGAA-3'을 사용하였고, *BRAF* 유전자의 227 염기쌍 길이의 부위를 증폭대상으로 하였다. PCR 반응액은 각 0.4 pmol 시동체에 1×PCR buffer, 15 mM MgCl₂, 0.2 mM dNTP, 그리고 1.5 U Immolase DNA taq polymerase (Bioline, London, UK)를 포함하여 총 20 µL를 반응시켰다. 이때 PCR의 조건은 94°C에서 5분, 35 cycles (94°C 45초, 59°C 45초, 72°C 1분), 72°C에서 5분, PTC-220 thermocycler (MJ Research, Waltham, MA, USA)를 이용하여 증폭하였다. 그리고 증폭된 DNA를 2% agarose에 전기영동하여 DNA 증폭 밴드를 확인하였다.

또 pyrosequencing 분석을 위하여 biotin이 결합된 증폭산물 20 µL를 Streptavidin-separose bead (Amersham Biotechnology, Uppersala, Sweden)가 있는 결합 완충액(Biotage, Uppersala, Sweden)과 혼합, 실온에서 10분 동안 교반하고 증폭산물을 bead에 결합시켰다. 증폭산물이 결합된 streptavidin-separose bead는 96 마그네틱 이젝터블 마이크로 실린더(Biotage)를 포함한 PSQ 96 샘플 플랫폼에 흡착시키고, streptavidin-separose bead에 결합된 증폭산물을 변성 및 수세한 후, 염기분석 시동체(sequencing primer; sequenc-

ing reverse, 5'-CCACTCCATCGAGATT-3')가 들어 있는 어닐링 완충액(Biotage)에 bead를 넣고 80°C에서 2분간 변성시켰다. 그다음 10분 동안 실온에서 염기분석 시동체와 증폭산물이 상호적으로 결합할 수 있도록 한 후, SNP 시약 키트 PSQ96MA System (Biotage)을 이용하여 분석하였다. 분석기계는 PyroMark ID (Biotage)를 사용하였고, 키트와 기계회사에서 제공된 매뉴얼에 따라 시행하였다.

BRAF 유전자의 상대적으로 좁은 부위(72 염기쌍)를 증폭하는 새 시동체를 사용한 경우는 위의 조건과 모든 조건을 동일하게 한 뒤 시동체만 바꾸어 시행하였다. 새 시동체의 염기서열은 forward 5'-biotin-TAGGTGATTTTGGTCTAGCTACAG-3', reverse 5'-ATC-CAGACAACCTGTTCAAAGTAT-3'이었다.

결 과

고식적 도말 검사와 액상세포검사의 진단 비교

총 77예에서 시행된 고식적 도말검사와 액상세포검사사이의 진단 비교는 Table 1에 요약하였다. 두 방법 사이의 세포학적 진단의 일치율(concordance rate)은 84.4% (65/77)로 상당히 높았고, 일치도 분석을 위해 이용한 카파값(kappa value) 역시 0.754로 높은 일치도를 나타내었다.

두 방법의 진단을 서로 비교해 본 결과, 두 방법은 대체로 유사하였으나 ACUS에 해당하는 군이 고식적 도말검사에서는 15예인데 반해 액상세포검사에서는 20예로 증가하였다는 것이 가장 차이는 나는 점이었다. 또한 액상세포검사에서 비정형세포로 진단된 5예는 고식적 도말검사에서도 유두암중의중(2예)이나 소포종양의중(1예), 유두암중(1예), 양성(1예)으로 진단되었다. 이러한 슬라이드들을 재검해 보았을 때 비정형세포의 양이 적어 진단을 구체적으로 주기가 어려운 경우가 대부분이었는데, 이것은 본 연구에서 사용한 검체 채취 방법인 한 번의 흡인으로 두 검사를 하는 방법의 특성상 검체가 균일하게 나누어지지 않으면서 액상세포검사에서의 세포량

Table 1. Diagnostic comparison between the conventional smear and SurePath™ methods

CS	SurePath™								Total
	Benign	ACUS	S/F FN	S/F PC	PC	MC	ML	SQCC	
Benign	39	4	0	0	0	0	0	0	43
ACUS	3	12	0	0	0	0	0	0	15
S/F FN	0	1	3	0	0	0	0	0	4
S/F PC	0	2	0	3	1	0	0	0	6
PC	0	1	0	0	5	0	0	0	6
MC	0	0	0	0	0	1	0	0	1
ML	0	0	0	0	0	0	1	0	1
SQCC	0	0	0	0	0	0	0	1	1
Total	42	20	3	3	6	1	1	1	77
Concordance rate	65/77 = 84.4%								
Kappa value	0.754								

CS, conventional smear; ACUS, atypical cells of undetermined significance; S/F FN, suspicious for follicular neoplasm; S/F PC, suspicious for papillary carcinoma; PC, papillary carcinoma; MC, medullary carcinoma; ML, malignant lymphoma; SQCC, squamous cell carcinoma.

이 감소한 것에 기인하는 것으로 판단했다.

조직학적 진단과 세포학적 진단의 비교

조직학적 확진이 가능했던 31예에서 두 방법에 의한 세포학적 진단과 조직학적 진단을 각각 서로 비교한 결과, 액상세포검사와 조직학적 진단 사이의 일치율은 67.7% (21/31)였고 고식적 도말검사와 조직학적 진단 사이의 일치율은 74.2% (23/31)였다(Table 2). 이 경우에도 위에서 언급한 것처럼 액상세포검사에서 부족한 세포량으로 인해 ACUS로 진단을 내렸던 사례들이 포함되어 액상세포검사에서 일치율이 약간 감소하였으나, 이러한 상황을 고려할 때 두 방법 사이에 큰 차이는 발견되지 않았다.

고식적 도말검사와 액상세포검사의 민감도와 특이도 비교

다음으로 두 방법의 진단적 효능을 비교하기 위해 조직학적 진단을 기준으로 각 방법의 진단적 민감도(sensitivity)와 특이도(specificity)를 구하였다(Table 3). 세포학적 진단에서 양성(benign)으로 진단된 것을 진단음성(negative), ACUS나 소포종양의증, 유두암종의증, 유두암종, 기타 악성종양 등은 모두 진단양성(positive)으로 간주하고 각 사례를 분류하였다.

조직학적 진단은 민감도를 구할 경우에는 민감도가 임상적으로 의미 있는 경우를 검색해 내는 지표라는 점을 감안하여 양성이나 악성에 상관없이 종양(neoplasm)을 검출해 내는 능력을 파악하고자 하였고, 악성종양 외에 양성 소포종양까지도 포함하는 종양과 이에 해당하지 않는 결절과다형성(nodular hyperplasia)이라는 기준으로 분류하였다. 또 특이도를 구할 경우에는 특이도의 의미를 고려하여 악성을 골라내는 진단적 능력을 평가하고자 양성과 악성으로 조직학적 진단을 분류하여 세포학적 진단과 비교하였다.

민감도는 고식적 도말검사와 액상세포검사 모두 100%였는데, 둘 다 임상적으로 의미 있는 경우를 구별해 내는 일차적 선별 검사로 매우 유의미함을 보여주었다. 또 특이도는 액상세포검사에서는 62.5% (10/16)였고, 고식적 도말검사에서는 56.3% (9/16)여서 두 검사 사이에 특별한 차이는 없었다. 따라서 두 검사의 진단적 효능을 비교하

는 지표로 민감도와 특이도를 사용할 때 두 방법 간에 특별한 차이는 없다고 생각된다.

고식적 도말검사와 액상세포검사에서 전반적 세포학적 소견 비교

고식적 세포도말 검사와 비교했을 때 액상세포검사는 여러 가지 다른 세포학적 소견을 나타내었다. 세포밀도를 비교하였을 때 고식적 도말검사에서는 도말된 슬라이드에서 많거나 적은 부위가 불규칙하게 나오는 반면, 액상세포검사에서는 비교적 균일한 세포밀도를 나타내었고 액상세포검사의 특성상 혈구세포가 제거되어 피가 섞인 검체의 경우 판독이 용이하였다.

또한 결절과다형성에서 특징적인 콜로이드(colloid)는 고식적 도말검사에서 두껍게 도말되어 균일하게 나타나는 반면 액상세포검사에서 콜로이드의 양이 전반적으로 감소하였고, 슬라이드 상에서 다양한 크기의 콜로이드 조각(fragment)이나 물방울(droplet) 형태로 관찰되었다. 림프구를 비롯한 염증세포는 두 검사 모두에서 양적인 차이를 보이지 않았고 액상세포검사에서 림프구 침윤 정도를 관찰하는 데 무리가 없었다. 그리고 핵소체(nucleoli)의 경우 고식적 도말검사에서는 잘 관찰되지 않았던 반면, 액상세포검사에

Table 3. Sensitivity and specificity of the conventional smear and SurePath™ method in comparison with histologic diagnosis

Histologic Dx	SurePath™		Conventional smear	
	Benign	ACUS above ^a	Benign	ACUS above
NH	10	1	9	2
Neoplasm	0	20	0	20
Sensitivity	20/20 = 100%		20/20 = 100%	
Benign	10	6	9	7
Malignant	0	15	0	15
Specificity	10/16 = 62.5%		9/16 = 56.3%	

^aACUS above category includes ACUS and other positive cytologic diagnoses such as suspicious for follicular neoplasm, suspicious for papillary carcinoma, papillary carcinoma and other malignancies.

Dx, diagnosis; ACUS, atypical cells of undetermined significance; NH, nodular hyperplasia.

Table 2. Diagnostic correlation between histology and cytology

Histology	SurePath™					Conventional smear				
	Benign	ACUS	S/F FN	PC ^a	Other	Benign	ACUS	S/F FN	PC ^a	Other
NH	10	1	0	0	0	9	2	0	0	0
FN	0	2	2	0	0	0	1	3	0	0
HN	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0
PC	0	6	0	6	0	0	4	0	8	0
Other	0	0	0	0	3	0	0	0	0	3
Total	10	9	3	6	3	9	7	4	8	3
Concordance rate	21/31 = 67.7%					23/31 = 74.2%				

^aCategory of S/F PC in cytologic diagnosis according to Bethesda system was incorporated into PC in this table.

ACUS, atypical cells of undetermined significance; S/F FN, suspicious for follicular neoplasm; PC, papillary carcinoma; Other, other malignancy; NH, nodular hyperplasia; HN, Hurthle cell neoplasm; S/F PC, suspicious for papillary carcinoma.

서는 양성병변에서도 붉은색을 띠는 핵소체가 보이는 경우가 많았다.

고식적 도말검사와 액상세포검사에서의 유두암종의 소견 비교

세포학적 검사로 진단할 수 있는 대표적 갑상샘 질환인 유두암종은 고식적 도말검사와 액상세포검사 모두에서 우수한 진단 능력을 보였지만, 세포학적 특징에 있어서는 약간 다른 양상을 보였다 (Table 4). 즉 고식적 도말검사에서 보이는 대표적 소견들인 핵 크기의 증대, 핵봉입체, 핵주름은 액상세포검사에서는 그 양상이 덜 현저하거나 약간 감소한 반면 핵소체와 핵막의 불규칙성은 더욱 강조되어 보였다 (Fig. 1).

한편 새로운 보존 용액 (blue solution)을 사용한 4예의 유두암종의 경우는 위의 두 검사 때와는 또 다른 핵의 특징이 관찰되었다. 즉 새 보존 용액을 사용하였을 경우 이전의 보존 용액을 사용하여 제작한 액상슬라이드보다 핵 크기가 좀 더 커지는 양상이었으며, 특징적으로 위의 두 검사와는 달리 세포질이 벗겨지면서 변성되어 핵 크기가 2-3배 커지고 염색질은 희미해진 나핵 (naked nuclei)이 자주 동반되었다.

Table 4. Nuclear features of papillary carcinoma in the conventional smear and SurePath™ methods

	Conventional smear	SurePath™ method
Nuclear size	More enlarged	Less enlarged
Nuclear irregularity	Less accentuated	More accentuated
Nucleoli	Less accentuated	More accentuated with red color
Nuclear pseudoinclusion	More frequently found	Less frequently found
Nuclear groove	Present and more prominent	Present but less prominent

고식적 도말검사와 액상세포검사에서의 BRAF 유전자변이 검사와 시간 경과에 따른 DNA 보존

갑상샘 세침흡인검사의 중요한 보조 수단인 BRAF 유전자변이검사를 고식적 도말검사와 액상세포검사서 진행 시기를 서로 달리 하여 시행하였는데, 검사의 첫 번째 단계인 DNA 추출과 PCR에 의한 유전자 증폭 결과는 Table 5와 같다.

고식적 도말검사에서는 검체 채취 당시나 1-2년이 지난 후 모두 유전자를 증폭하여 검사를 성공적으로 진행할 수 있었던 반면 액상세포검사에서는 검체 채취 당시에는 검사를 성공적으로 진행할 수 있었으나, 1년 이상의 시간이 경과한 후에는 PCR을 통한 유전자 증폭이 이루어지지 않아 검사를 수행할 수 없었다 (Fig. 2A).

이러한 문제점을 해결하기 위해 두 가지 방향으로 조건을 변경하였다. 이전에 사용한 시동체의 경우는 표적으로 삼는 부위가 약 227의 염기쌍 정도에 해당되었는데, 그 표적 부위를 72 염기쌍 정도로 좁히는 새로운 시동체를 사용하여 검사를 시행하였다. 그 결과 이전에 검출되지 않았던 3예에서 성공적으로 검사가 이루어졌다 (Fig. 2C).

또 하나의 조건 변경은 보존 용액의 교체였는데, 이전의 보존 용

Table 5. BRAF mutation test in the conventional smear slides, SP slides using old red solution, and SP slides using new blue solution as a preservative solution

BRAF	CS	SP in red solution	SP in blue solution
Initial test	Successful (9/9)	Successful (9/9)	Successful (4/4)
Delayed test ^a	Successful (4/4)	Failed (3/3)	Ongoing
Delayed test using new primer ^b	Successful (4/4)	Successful (3/3)	Ongoing

^aDelayed test was performed 1-2 years after sampling cytologic specimens; ^bNew primer targets shorter region of BRAF gene that is 72 base pairs long, compared to previous primer amplifying 227 base pairs. SP, SurePath™; CS, conventional smear.

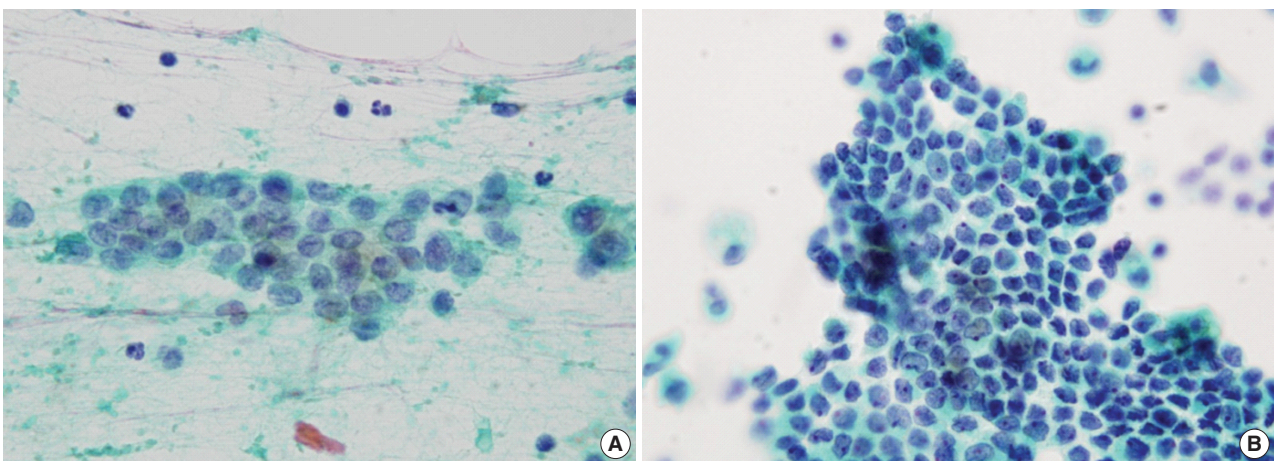


Fig. 1. Nuclear features of papillary carcinoma in (A) conventional smear and (B) SurePath™ slides, obtained from an identical case (Papanicolaou stain). The SurePath™ slide is prepared using red solution as preservative solution. In the SurePath™ slide (B), papillary carcinoma exhibits less enlarged nuclei with more accentuated nuclear irregularity and red nucleoli than the conventional smear slide (A).

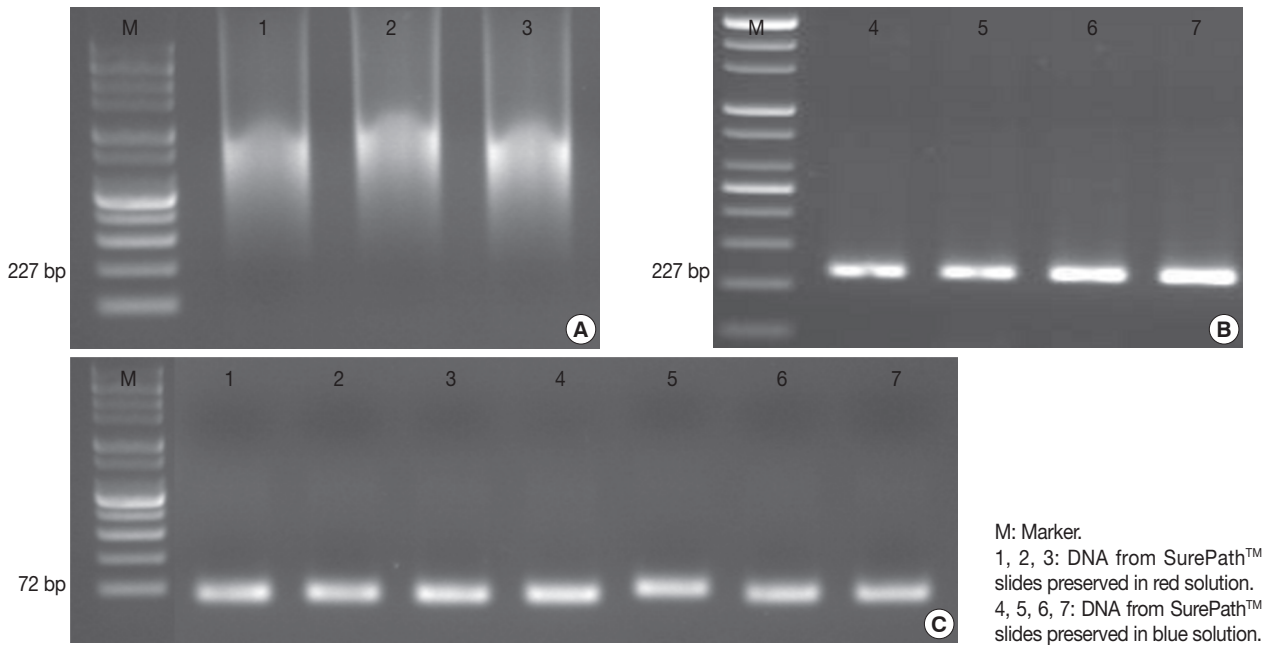


Fig. 2. Amplification of the *BRAF* gene via polymerase chain reaction in (A) the DNA extracted from SurePath™ slides preserved in red solution using a old primer set amplifying 227 base pairs after a one or two year delay, (B) the DNA extracted from SurePath™ slides preserved in blue solution using a old primer set at the time of diagnosis, and (C) the DNA extracted from SurePath™ slides using a new primer set amplifying 72 base pairs at the time of diagnosis.

Table 6. Comparison of *BRAF* mutation test between CS and SP slides

		CS	SP in red solution
Benign (7)	<i>BRAF</i> (+)	0	0
	<i>BRAF</i> (-)	7	7
PC (2)	<i>BRAF</i> (+)	2	1
	<i>BRAF</i> (-)	0	1

CS, conventional smear; SP, SurePath™; PC, papillary carcinoma.

액과 달리 에탄올과 메탄올을 주성분으로 하는 새 보존 용액을 사용하여 검사를 진행하였다. 새 보존 용액을 사용해 제작한 슬라이드에서 검체 채취 당시에 시행한 *BRAF* 유전자변이검사는 성공적으로 수행되었다(Fig. 2B, C).

고식적 도말검사와 액상세포검사에서의 *BRAF* 유전자변이 검사의 결과 비교

고식적 도말검사와 액상세포검사에서도 시행한 *BRAF* 유전자변이 검사의 pyrosequencing 결과 중에서 진단 당시 동일 검체에서 시행하여 서로 비교가 가능한 9예의 결과를 Table 6에 제시하였다. 초기검사 9예 중 7예는 세포학적 진단이 양성(결절과다형성)이었고, 2예는 유두암종이었는데 유두암종 1예에서 고식적 도말검사 결과 *BRAF* 유전자변이가 확인된 반면 액상세포검사에서는 *BRAF* 유전자변이가 관찰되지 않은 것 외에는 결과가 서로 일치하였다. 차이를 보이는 유두암종 1예의 경우 액상세포 슬라이드에 도말된 종양

세포의 양이 고식적 도말슬라이드에 도말된 세포의 양보다 상대적으로 많이 적었을 뿐만 아니라 조직구나 림프구 같은 염증세포가 도말된 세포의 80% 이상을 차지하였다. 나머지 8예는 종양세포의 밀도를 고, 중, 저 세 단계로 구분하였을 때 모두 중등도 이상의 세포밀도를 보였고, 함께 도말된 염증세포의 비율은 50%를 넘지 않았다.

후기검사(delayed test)를 시행한 고식적 도말검사 4예는 양성 2예, 유두암종 2예이며 액상세포검사 3예는 양성 2예, 유두암종 1예였다. 유두암종 3예는 모두 *BRAF* 유전자 변이가 확인되었으며, 양성 4예는 모두 음성이었다. 후기검사를 시행한 7예 모두 세포밀도는 중등도 이상이었고 섞여 있는 염증세포의 양도 50%를 넘지 않았다.

한편 새 보존 용액(blue solution)을 사용하여 액상슬라이드를 제작한 추가 검사 4예는 양성 1예, 유두암종 3예였고, 유두암종 3예는 모두 *BRAF* 유전자변이가 관찰되었으며 양성 1예는 *BRAF* 유전자변이가 관찰되지 않았다. 또한 추가로 검사한 4예 모두 세포밀도가 고밀도였으며, 염증세포는 거의 포함되지 않았다.

고 찰

이번 연구에서는 크게 두 가지 방향으로 액상세포검사의 실질적 적용 가능성을 모색하였다. 우선 기존에 사용되어 온 고식적 도말 검사와의 비교를 통해 진단적 효능에 있어 차이가 있는지를 검토하였고, 다음으로 *BRAF* 유전자변이검사의 적용을 통해 고식적 도말

검사에서 시행되는 바와 동일하게 액상세포검사에서도 시행이 가능한지를 검토하였다.

고식적 도말검사와 진단적 효능을 비교해 보았을 때 액상세포검사는 통계적으로 유의할 정도의 지표상의 차이를 보이지 않았다. 고식적 도말검사와 액상세포검사는 80% 이상의 높은 일치율과 0.754의 카파값으로 높은 일치도를 나타내어 양자 간에 유의할 만한 차이는 보이지 않았다. 또 조직학적 진단과의 비교를 통해 민감도와 특이도를 조사하였을 때에도 양자는 유사한 정도의 민감도와 특이도를 보였다.

이러한 결과는 두 방법 사이에 별다른 차이가 없다고 보고한 Scurry와 Duggan⁸의 연구 결과와도 일치한다. 물론 이번 연구에서 ACUS로 진단된 사례가 액상세포검사에서도 더 많았지만, 이것은 본 연구에 사용된 검체 채취 방법인 분리검사법(split sample technique)으로 인해 검체가 불균일하게 나뉘지면서 초래된 세포 수 부족에서 오는 오류일 가능성이 커서 유의한 차이는 없다고 판단하였다. 분리검사법을 사용한 기존의 연구결과에서도 먼저 고식적 방법으로 도말한 뒤 남은 검체에서 세포 수가 적은 샘플이 액상세포 검사에 이용되어 발생한 경우를 많이 보고하고 있어¹³ 이것은 연구 방법상의 기술적 한계로 봄이 타당하다고 하겠다.

기존의 액상세포검사를 이용한 연구에서는 액상세포검사가 고식적 도말검사보다 더 진단적으로 효능이 우월하거나 미결정성 병변의 진단에 장점이 있다는 보고가 있었지만,^{5,6} 이번 연구에서 그러한 면은 발견되지 않았다. 하지만 본 연구에서 이러한 우월성이 보이지 않았다고 해도 비슷한 정도의 진단적 효능을 보이기만 한다면 이미 보고된 액상세포검사의 여러 장점들을 감안할 때 액상세포검사의 도입을 고려할 만한 근거는 충분하다고 본다.¹ 또 세포분포가 균일한 한 장의 슬라이드만 제작하여 병리의사가 판독함으로써 판독에 걸리는 시간과 노력을 경감할 수 있다는 실질적 장점은 진단적 효능에 있어 크게 문제가 없다면 충분히 액상세포검사가 고식적 도말검사를 대체하는 실질적 근거로 작용할 수 있으리라 판단된다.¹

기존에 알려진 액상세포검사의 또 하나의 장점은 면역화학염색이나 분자병리 검사를 시행하기에 유리하다는 것이었다.^{3,6,10-13} 따라서 이번 연구에서는 액상세포검사법으로 제작된 슬라이드에서 채취한 세포의 DNA에서 *BRAF* 유전자변이검사를 시행하여 기존의 고식적 도말슬라이드를 이용한 *BRAF* 검사와 비교함으로써, 액상세포검사 표본을 *BRAF* 검사에 이용하는 데 문제가 없는지를 검토하였다.

검체 채취 당시에 *BRAF* 검사를 시행한 총 9예에서는 두 방법 모두 성공적으로 DNA를 추출하여 첫 단계인 PCR을 통한 증폭과 두 번째 단계인 pyrosequencing을 통한 유전자 변이의 검출까지 별 문제 없이 시행되었다. 그러나 이 9예 가운데 유두암중 1예의 고식적 도말검사에서는 *BRAF* 검사가 양성인 반면 액상세포검사에서는 음성이어서 그 결과에 있어 차이가 있었다. 이 증례는 검사를 시행한 액상세포검사 슬라이드에 종양세포가 거의 포함되어 있지 않고, 조직구나 염색세포 같은 정상세포가 더 많이 포함되어 *BRAF* 변이된

종양 DNA를 증폭 과정에서 압도하였기 때문으로 추정하였다. 다시 말해 차이가 생긴 1예는 이번 연구에서 사용한 분리검사법으로 인한 오류 때문일 것으로 추정하였고, 충분한 수의 종양세포가 채취된다면 액상세포 표본을 *BRAF* 검사에 이용하는 데 문제가 없는 것으로 판단하였다.

반면 검체 채취 당시가 아닌 1년 이상의 시간이 경과한 후에 *BRAF* 검사를 시행했을 때 고식적 도말슬라이드에서 검사가 성공적으로 이루어진 것과는 달리, 액상세포슬라이드에서 채취한 세포로 검사를 시행하였을 때는 첫 단계인 PCR에서 증폭이 이루어지지 않았다. 이를 극복하고자 조건을 변경하여 *BRAF* 유전자의 좀 더 좁은 부위(72 염기쌍)를 표적으로 하는 새로운 시동체를 제작하였고, 이를 이용하여 다시 검사를 진행한 결과 성공적으로 증폭된 밴드를 확인할 수 있었다. 이처럼 좁은 부위를 표적으로 하는 새로운 시동체를 사용한 경우 검사가 성공적으로 진행된다는 것은 액상세포슬라이드를 제작하여 보존하는 과정 중에 DNA가 짧은 분절로 분해(degradation)되어 장기적인 DNA의 보존에 문제가 생긴다는 것을 의미한다. 이러한 문제는 채취된 세포들이 바로 95% 에탄올에 고정되는 고식적 도말검사와 달리 액상세포검사는 회사에서 제공하는 보존 용액에 세포를 넣어 일정시간이 지난 뒤 슬라이드 제작과정에 돌입하게 되므로 실제 고정과정은 제작과정의 마지막에서나 이루어진다는 점을 고려할 때, 보존 용액의 일부 구성성분이 DNA 분해를 촉진하였을 가능성이나, 보존 용액 자체가 생물학적 효소 활성도를 중지시키는 고정(fixation)이 아니라는 점에서 보존 용액에 담겨 있는 동안 DNA를 분해하는 효소의 활성도가 중지되지 않은 채 시간이 경과하여 생긴 문제일 수 있다. 하지만 진단 당시에 시행했던 검사에서는 별 문제가 없다는 점에서 이러한 DNA 분해 문제가 급격하게 검체 제작과정의 초기에 발생한다기보다는 서서히 진행하다가 장기간 DNA가 보존될 때 발생한다고 생각된다.

기존 액상세포검사에 사용되어 왔던 보존 용액(red solution)은 isopropanol 20-25%, methanol 10%, ethylene glycol 5-10%, formaldehyde 1% 등으로 구성되어 있는데, 이 성분 중 DNA 보존에 문제를 일으킬 수 있다고 생각되는 것은 알콜 성분이 아닌 ethylene glycol이다. 그러나 이 성분도 이전의 연구에서는 DNA 증폭에 관련된 특별한 문제는 발견되지 않았다.^{20,21} 그렇지만 동일한 제조회사 제품으로 알콜 성분(에탄올 42-44%, 메탄올 4-6%)으로만 이루어진 새로운 보존 용액(blue solution)을 도입하여 다시 검사를 진행하였을 때 초기검사는 표적부위 염기쌍의 길이와 상관없이 성공적으로 진행되었다. 시간이 경과된 후의 검사는 향후 진행될 예정인데, 이 결과가 나온다면 이 문제가 보존 용액의 성분 때문인지 아니면 보존 용액 자체 내에서 겪게 되는 변성 과정 때문인지 좀 더 분명하게 언급할 수 있으리라 생각된다. 하지만 채취하자마자 95% 에탄올로 고정하는 고식적 도말검사와 비교해 볼 때 액상세포검사의 검체 처리 과정상 DNA 보존 능력은 떨어질 수밖에 없을 것으로 판단된다.

이전에 제기되지 않았던 이러한 단점들은 검체 진단 당시 분자병리 검사를 시행하는 데에는 별 문제가 없고 후향적 연구를 할 경우에는 문제가 될 수 있겠으나, 임상적 가치를 결정적으로 떨어뜨리

지는 않을 것으로 생각한다. 또한 *BRAF* 유전자의 좁은 부위를 표적으로 하는 시동체를 사용하는 방법 등으로 문제를 극복할 수 있는 가능성도 고려되어야 할 것이다.

한 가지 주의를 요하는 점은 새로운 보존 용액(blue solution)이 바로 대체 가능한 방법이 아니라 기본적인 세포학적 형태가 기존의 방법들과 차이가 있어 판독에 또 다른 어려움을 초래할 수 있다는 점이다. 특히 세포질이 파괴되어 벗겨지면서 크기가 2-3배 커진, 변성된 나핵이 많이 보인다는 점이 새로운 판독상의 문제가 될 가능성이 있다. 따라서 이번 연구에 포함된 4예의 유두암종의 관찰만으로 결론을 내리기에는 충분하지 않고 사례의 축적을 통해 새로운 비교 연구가 필요할 것으로 판단된다.

결론적으로 액상세포검사의 일종인 SurePath™ 액상세포검사는 고식적 도말검사와 비교해 볼 때 진단적 효능에서 별다른 차이를 보이지 않아서 진단적 용이함을 감안한다면 고식적 도말검사를 대체하는 방법으로 충분히 고려될 만하다고 생각한다. 그러나 액상세포검사는 *BRAF* 유전자변이검사를 시행함에 있어 장기간의 DNA 보존에 문제가 있음을 확인하였으므로 향후 고식적 도말검사를 완전히 대체하기 위해서는 이러한 문제가 먼저 해결될 필요가 있다고 하겠다.

참고문헌

- Kim JY. Liquid-based cytology in fine-needle aspirates of the thyroid and breast. *Korean J Pathol* 2009; 43: 99-106.
- Frost AR, Sidawy MK, Ferfelli M, *et al.* Utility of thin-layer preparations in thyroid fine-needle aspiration: diagnostic accuracy, cytomorphology, and optimal sample preparation. *Cancer* 1998; 84: 17-25.
- Cochand-Priollet B, Prat JJ, Polivka M, *et al.* Thyroid fine needle aspiration: the morphological features on ThinPrep slide preparations. Eighty cases with histological control. *Cytopathology* 2003; 14: 343-9.
- Affify AM, Liu J, Al-Khafaji BM. Cytologic artifacts and pitfalls of thyroid fine-needle aspiration using ThinPrep: a comparative retrospective review. *Cancer* 2001; 93: 179-86.
- Kim DH, Kim MK, Chae SW, *et al.* The usefulness of SurePath(TM) liquid-based smear in sono-guided thyroid fine needle aspiration: a comparison of a conventional smear and SurePath(TM) liquid-based cytology. *Korean J Cytopathol* 2007; 18: 143-52.
- Jung CK, Lee A, Jung ES, Choi YJ, Jung SL, Lee KY. Split sample comparison of a liquid-based method and conventional smears in thyroid fine needle aspiration. *Acta Cytol* 2008; 52: 313-9.
- Stamataki M, Anninos D, Brountzos E, *et al.* The role of liquid-based cytology in the investigation of thyroid lesions. *Cytopathology* 2008; 19: 11-8.
- Scurry JP, Duggan MA. Thin layer compared to direct smear in thyroid fine needle aspiration. *Cytopathology* 2000; 11: 104-15.
- Rossi ED, Raffaelli M, Zannoni GF, *et al.* Diagnostic efficacy of conventional as compared to liquid-based cytology in thyroid lesions: evaluation of 10,360 fine needle aspiration cytology cases. *Acta Cytol* 2009; 53: 659-66.
- Malle D, Valeri RM, Pazaitou-Panajiotou K, Kiziridou A, Vainas I, Destouni C. Use of a thin-layer technique in thyroid fine needle aspiration. *Acta Cytol* 2006; 50: 23-7.
- Tulecke MA, Wang HH. ThinPrep for cytologic evaluation of follicular thyroid lesions: correlation with histologic findings. *Diagn Cytopathol* 2004; 30: 7-13.
- Fadda G, Rossi ED, Mulè A, Miraglia A, Vecchio FM, Capelli A. Diagnostic efficacy of immunocytochemistry on fine needle aspiration biopsies processed by thin-layer cytology. *Acta Cytol* 2006; 50: 129-35.
- Cheung CC, Carydis B, Ezzat S, Bedard YC, Asa SL. Analysis of *ret/PTC* gene rearrangements refines the fine needle aspiration diagnosis of thyroid cancer. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86: 2187-90.
- Kim SK, Kim DL, Han HS, *et al.* Pyrosequencing analysis for detection of a *BRAFV600E* mutation in an FNAB specimen of thyroid nodules. *Diagn Mol Pathol* 2008; 17: 118-25.
- Kim SK, Song KH, Lim SD, *et al.* Clinical and pathological features and the *BRAF(V600E)* mutation in patients with papillary thyroid carcinoma with and without concurrent Hashimoto thyroiditis. *Thyroid* 2009; 19: 137-41.
- Chung KW, Yang SK, Lee GK, *et al.* Detection of *BRAFV600E* mutation on fine needle aspiration specimens of thyroid nodule refines cytopathology diagnosis, especially in *BRAF600E* mutation-prevalent area. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2006; 65: 660-6.
- Kim TY, Kim WB, Rhee YS, *et al.* The *BRAF* mutation is useful for prediction of clinical recurrence in low-risk patients with conventional papillary thyroid carcinoma. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2006; 65: 364-8.
- Lee HJ, Choi J, Hwang TS, Shong YK, Hong SJ, Gong G. Detection of *BRAF* mutations in thyroid nodules by allele-specific PCR using a dual priming oligonucleotide system. *Am J Clin Pathol* 2010; 133: 802-8.
- Crippa S, Mazzucchelli L, Cibas ES, Ali SZ. The Bethesda System for reporting thyroid fine-needle aspiration specimens. *Am J Clin Pathol* 2010; 134: 343-4.
- Dillon N, Austin AD, Bartowsky E. Comparison of preservation techniques for DNA extraction from hymenopterous insects. *Insect Mol Biol* 1996; 5: 21-4.
- King JR, Porter SD. Recommendations on the use of alcohols for preservation of ant specimens (Hymenoptera, Formicidae). *Insect Soc* 2004; 51: 197-202.