

세침흡인 검체의 전자현미경 검색으로 진단된 전이성 악성 흑색종 1예

순천향대학병원 해부병리과

이 동 화 · 진 소 영 · 권 계 현

= Abstracts =

Electron Microscopic Study on Fine Needle Aspiration Cytology of Metastatic Malignant Melanoma

Dong Wha Lee, M.D., So Young Jin, M.D., and Kye Hyun Kwon, M.D.

Department of Anatomical Pathology, Soonchunhyang University Hospital, Seoul

Electron microscopy (EM) can provide a valuable contribution to light microscopy (LM) in the interpretation of fine needle aspiration cytology (FNAC) specimen, especially in the diagnosis of the tumor. However, considerable care in processing the specimen is mandatory to recover the cells and avoid altering the fine structures.

We experienced a case of malignant melanoma in 33-yrs-old female, diagnosed by EM study of FNAC specimen from the axillary mass, who was initially thought as disseminated carcinomatosis on LM study.

The technique of EM study on FNAC specimen consisted of washing the needle and syringe in 2.5% glutaraldehyde after a rapid stain (Diff-Quik), which was used to obtain a preliminary diagnostic impression and to assure the adequacy of the EM specimen. After centrifugation in the steps of fixation and dehydration, the sediment was made into an epon block and examined. The whole processing time of EM study can be shortened within 7 or 8 hours, and results can be available within 48 to 72 hours.

Our experience suggests the EM study on FNAC can be a useful diagnostic method in the diagnosis of difficult FNAC cases.

Key words : Electron microscopy, Fine needle aspiration cytology,
Malignant melanoma.

서 론

세포 검체를 이용하여 전자현미경 검색을 시행하는 예가 점점 늘어나고 있으며, 특히 세침흡인세포 검사(fine needle aspiration cytology, 이하 FNAC)로 얻어진 검체에서 이의 이용이 유용하다는 보고가 많으나¹⁻⁶⁾, 아직 국내에서는 이에 관한 연구보고가 거의 없다. FNAC 검체에 대한 전자현미경 (electron microscopy, 이하 EM) 검색의 적응증은 미분화 및 저분화암종의 형을 결정, 저분화 암종 및 육종의 진단, 전이암종의 원발부위 추정, 전이암종과 원발성 암종의 감별, 신경내분비 종양의 동정, 그리고 광학현미경 진단의 확진 등이다⁷⁾.

저자들은 광학현미경소견상 저분화 선암으로 생각하였으나 FNAC 검체의 EM 검색으로 악성 흑색종을 진단한 1예를 경험하여 이의 임상 및 병리학적 소견을 기술하고 FNAC 검체의 EM 검색 방법의 유용성을 소개하며, 조직의 EM 검색 방법과의 차이점을 설명하고자 한다.

증 례

환자는 33세 여자로서 6개월간의 호흡곤란을 주소로 내원하였다. 과거력상 약 10년전에 오른쪽 손바닥의 점을 제거한 적이 있다고 하며, 가족력상 별 특이 소견은 없었다.

흉부 X-선소견상 양측 늑막의 삼출소견과 폐부종의 소견을 보였으며, 입원직후 호흡곤란이 심해져서 초음파 심장 촬영술을 시행한 결과 심장압전이 의심되었으며 심낭 및 흉강천자술로 삼출액을 채취하여 세포검사를 하였다.

우측 쇄골 상부의 림프절과 우측 액와부의 림프절이 축지되어 각각 FNAC를 시행하였으며 각각 소량의 혈액혼입이 없는 검체를 채취하였고, Diff-Quik 염색으로 심낭 및 흉강액에서 관찰되었던 암세포와 같은 세포임을 확인하고 액와부 림프절의 세포검체를 이용하여 EM 검색을 시행하였다.

1. 전자현미경 검색 방법⁸⁾

액와부로부터 채취한 FNAC 검체를 즉시 2.5% glutaraldehyde 용액에 분주하고 반복하여 고정액으로 주사기를 세척한 후 잠시 고정한다. 2차 고정은 1% osmium tetroxide 용액에 약 1시간 고정하고, 60%, 70%, 80% 및 90% 알코올에 각각 10분씩, 95% 알코올에 20분, 무수알코올에 15분간 탈수를 하였으며, propylene oxide를 가한 후 15분간 방치한다. 이상의 모든 과정은 시험관에 들어 있는 검체에 용액을 바꾸는 각 과정마다 약 1,500 rpm에서 5분간 원심침전을 시행하여 상층액은 스포이드를 이용하여 버리고 침전된 세포 pellet에 각 단계의 용액을 가한다.

다음 단계는 검체를 포매 molds에 옮겨서 propylene oxide와 epon을 각각 1:1 및 1:2의 비율로 혼합하여 이를 검체에 가하고 각각 1시간씩 지난후 원심침전하여 상층액을 버리고(Fig. 1), epon에 포매하여 약 2시간동안 침전시킨 후 오븐에서 굳힌다. 이상의 과정중 오븐에서 굳히기 전까지 소요되는 시간은 원심침전시간을 포함하여 약 7~8시간이다. 이는 조직의 EM 검사방법에 비하여 훨씬 짧은시간이 소요된다(Table 1).

Table 1. The comparison of electronmicroscopic processing schedule between cytology and tissue specimen.

	Cytology	Tissue
First fixation (2.5% glutaraldehyde)	immediate	3 hr-over night
Second fixation (1% osmium)	1 hr	2 hr
60% alcohol	10 min	20 min
70% alcohol	10 min	20 min
80% alcohol	10 min	20 min
90% alcohol	10 min	20 min
95% alcohol	20 min	20 min
100% alcohol	15 min	20 min
Propylene oxide	15 min	20 min
Propylene oxide : Epon (1 : 1)	1 hr	2 hr
Propylene oxide : Epon (1 : 2)		over night
Epon	2 hr	2 hr
Total processing time	8 hr	48 hr

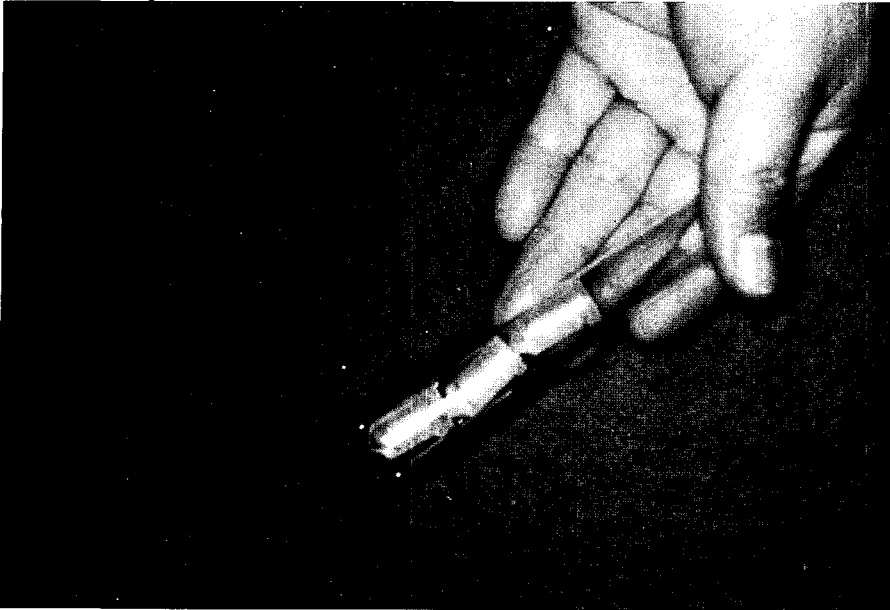


Fig. 1. Propylene oxide 과정부터 검체가 들어있는 embedding moulds를 시험관에 넣어 원심침전함.

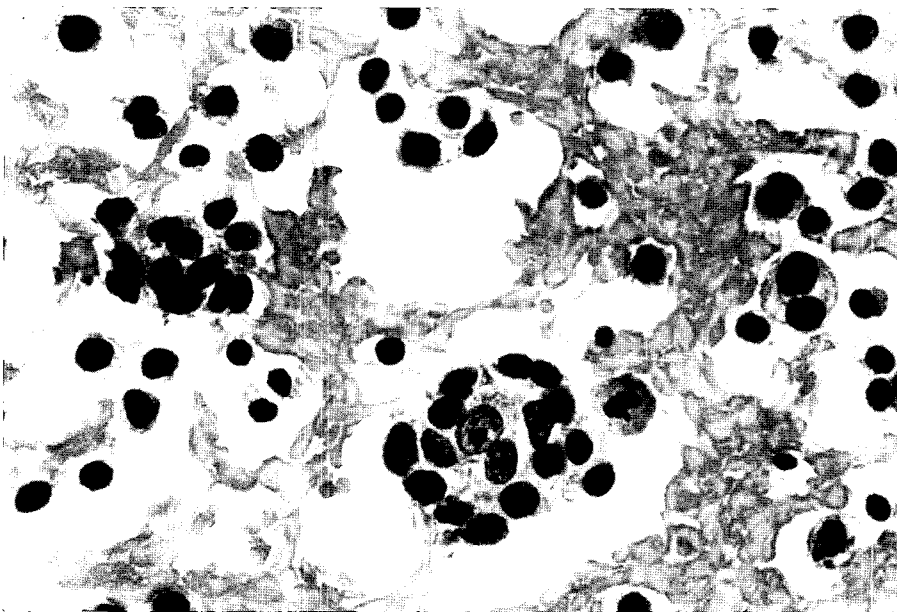


Fig. 2. 심낭액에서 다수의 단독 또는 군집을 이룬 비정형 암세포가 형성 배경에서 다수 관찰됨 (H-E, $\times 400$).

2. 병리학적 소견

(1) 심낭 및 흉강액의 세포학적 소견

혈성 배경에 다수의 비정형 세포가 관찰되었으며, 핵은 원형이고 한쪽으로 치우쳤으며 한개의 큰 핵소체가 뚜렷하였고, 풍부한 세포질을 함유하였다. 세포는 대개 단독이었으나 간혹 작은 판상배열을 이루기도 하였고 핵이 2개 또는 4개인 다핵성 거대세포도 관찰되어 (Fig. 2), 악성 종양의 심낭 및 흉강의 침범으로 진단하였으며, 저분화 선암종의 가능성이 높은 것으로 생각하였다.

(2) 우측 쇄골상부 및 액와부 림프절의 FNAC 소견

심낭 및 흉강액에서 관찰된 것과 유사한 종양 세포가 대개는 단독으로 또는 소군집을 이루기도 하였으며 세포의 이형성은 매우 심하였고 세포질은 풍부하였으며 경계가 뚜렷하였다 (Fig. 3). 드물게 세포질 내에 갈색의 색소가 관찰되었으나 멜라닌 색소와 철색소의 감별이 어려웠다.

(3) 전자현미경적 소견

Epon 블록을 두껍게 박절하여 toluidine blue 염색을 한 후 관찰하였으며, 다수의 단독세포가 형태가 잘 보존되었음을 확인하고 (Fig. 4) 얇게 박절하여 uranium acetate 및 lead citrate 로 복염색한 후 관찰하였다.

전자현미경 소견상 성글게 배열한 종양세포는 한쪽으로 치우친 난원형의 핵에 핵소체가 뚜렷하며 세포질내에 세포질내세망(ER)과 Golgi 체가 비교적 잘 발달하였으며 membrane bound vesicle 이 관찰되었다 (Fig. 5). 가장 특징적인 것은 종양세포의 세포질내에 다수의 III 기 및 IV 기의 멜라닌 소체가 관찰되어 용이하게 악성 흑색종을 진단할 수 있었다 (Fig. 6).

고 찰

FNAC 검체에 대한 EM 검색은 1973년 Hagelquist와 Engstrom⁹⁾에 의하여 종양의 진단에 중요한 정보를 제공할 수 있는 방법으로서 소개된 이래로 많은 연구가 행하여 졌으며, 최근에는 FNAC 검사가

접증함에 따라 EM 검사실의 건수중에 상당부분을 차지하게 되었다고 한다⁹⁾. 이에 대한 연구는 기술적인 측면, 즉 좋은 결과를 얻기 위하여 어떻게 검체를 취급하는 것이 좋은가에 관한 것^{3, 10-14)}과, FNAC 진단에서 EM 검색의 유용성에 대한 것^{1, 2, 15-18)}으로 나눌 수 있다.

FNAC 검체의 EM 검색은 조직에서와 마찬가지로 검체의 취급이 적절히 되어야만 유용한 정보를 얻을 수 있으므로 기술적인 면이 아주 중요하다. FNAC 검체는 조직에 비하여 세포의 양이 훨씬 적기 때문에 이를 손실없이 모으는 것이 중요하다. 세포를 모으는 방법으로는 세포 수가 적절한 때에는 직접 원심침전(일반적으로 1,500 rpm에서 5~10분)이 가장 좋다고 하며^{3, 15, 16)}, 세포 수가 적을 때에는 우혈청 알부민¹²⁾이나 한천¹⁹⁾을 첨가하여 침전물을 단단하게 만드는 방법이 이용되기도 한다. 특히 혈액이 혼입된 검체는 검색에 방해가 되므로 세포로부터 혈액을 분리해내는 여러 방법이 시도되었다. 이 방법으로는 저장액을 이용하여 용혈을 시키거나²⁰⁾, dextran, 알부민 또는 Ficoll-hypaque와 같은 gradient 매개체를 이용하여²¹⁾ 원심침전후 검색하고자 하는 세포만 분리해내기도 하나, 여과법³⁾이 가장 많이 이용되고 있다. 본 증례는 혈액이 혼입되지 않았으므로 단순한 원심침전(1500 rpm에서 5분)만으로 세포를 모을 수 있었다.

FNAC 검체는 glutaraldehyde 용액에 고정된 후 epon에 포매한 블록을 만들기까지는 조직으로 제작할 때보다 모든 단계의 시간을 줄여서 진행이 되므로, 조직은 대체로 48시간 가량 소요되는 데에 비해 7~8시간 정도로서 훨씬 적게 걸리며 때로는 semi-rapid 및 ultrarapid 법을 이용하여 더욱 시간을 단축하기도 한다^{7, 16, 17)} (Table 2, 3). 따라서 FNAC 검체의 EM 관찰과 사진 촬영까지는 조직의 통상적인 H-E 염색 후 검색까지에 소요되는 시간과 거의 비슷하므로 매우 신속하게 정확한 정보를 얻을 수 있는 방법이라고 할 수 있겠다.

이상의 과정으로 FNAC 검체를 EM으로 관찰을 하면, 조직검체를 관찰할 때보다 세포의 보존이 아주 잘 된다. 이는 조직은 생검후 고정까지 시간이 걸



Fig. 3. 액와부 림프절의 FNAC 소견상 난원형의 핵에 뚜렷한 핵소체가 특징인 암세포가 개개 또는 불규칙한 괴를 형성함(H-E, $\times 400$).

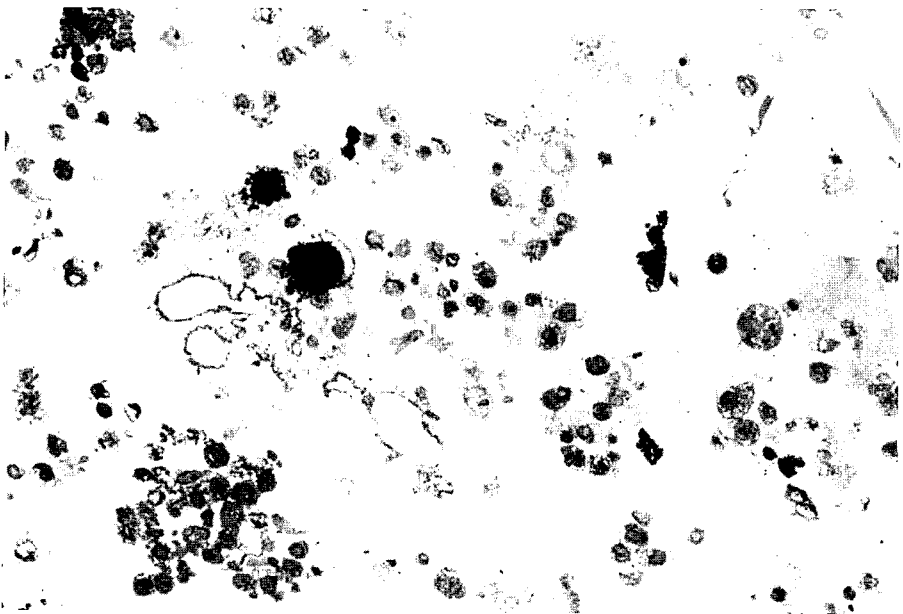


Fig. 4. Thick section에서 epon block내에 다수의 증양세포가 관찰됨(toluidin blue, $\times 100$).

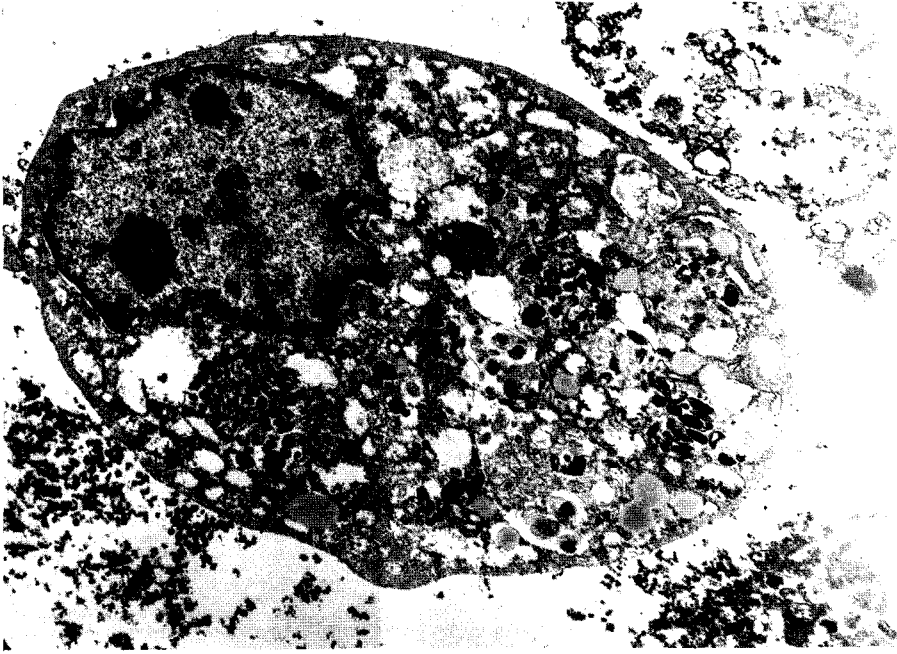


Fig. 5. 전자현미경 소견 : 핵은 일측으로 치우치고 핵소체가 뚜렷하며 세포질내에 ER, Golgi체 및 membrane bound vesicle이 보이고 다수의 멜라닌 소체가 관찰됨($\times 7,000$)

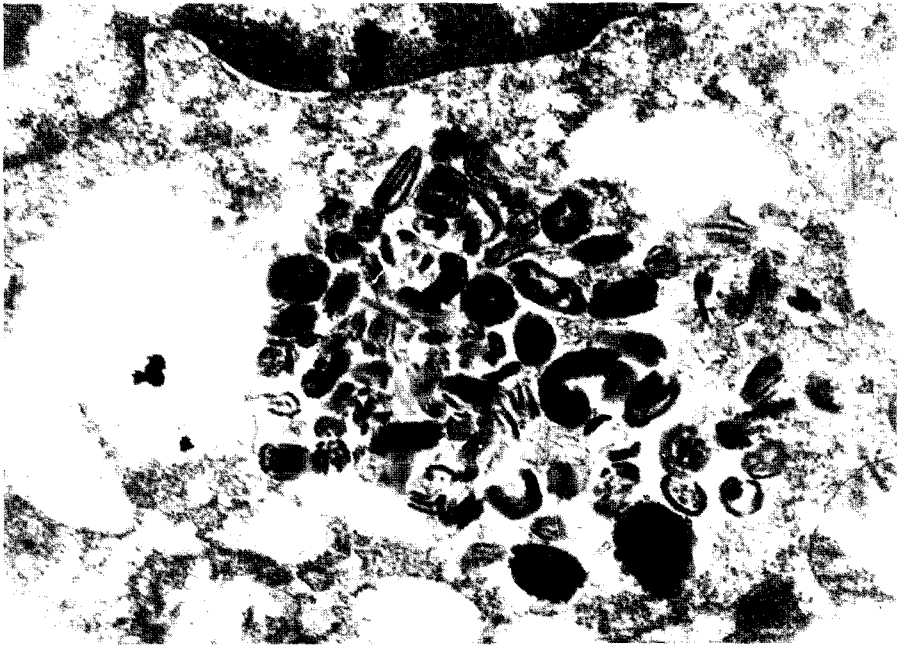


Fig. 6. 전자현미경 소견 : 멜라닌 소체는 stage III 및 IV의 형태를 보임($\times 20,000$).

Table 2. Semirapid Embedding Procedure for Electron Microscopy of FNAC Specimen.

	Semirapid
After primary fixation	
Buffer wash	2×5 min
Osmium tetroxide/buffer	1 hr
Distilled water wash	2×5 min
Ethanol 50%	2×5 min
Ethanol 70%	2×5 min
Ethanol 90%	2×5 min
Ethanol 100%	3×10 min
Propylene oxide	2×5 min
Propylene oxide/epon (1 : 1)	15 min
Propylene oxide/epon (1 : 3)	30 min
Pure epon	30 min
Total processing time :	3 3/4 hr

Table 3. Ultrarapid Embedding Procedure for Electron Microscopy of FNAC Specimen.

Aldehyde fixation (room temperature)	30 min
Rinse three times in buffer	
Osmium tetroxide (1% in cacodylate buffer)	15 min
Uranyl acetate (1% aqueous)	5 min
2,2-dimethoxypropane (DMP ; add 1drop hydrochloric acid[37%] per 100 ml)	15 min
DMP	5 min
DMP/epoxy resin (1 : 1)	10 min
Epoxy resin	10 min
Total processing time :	1.5 hr

리게 되어 세포가 저산소증에 빠지기 쉬운데 반하여, FNAC 검체는 각각의 세포가 고정되어 있으므로 고정액의 침투 (penetrance)가 신속하고 용이하기 때문이라고 한다^{3, 10)}. 본 연구의 증례도 세포의 보존 상태가 매우 좋아서 미세구조를 확실히 관찰할 수 있었으므로 이러한 장점을 인정할 수 있었다.

FNAC 검체에서 EM 검색을 할 것인가를 결정하기 위하여는 검체를 채취후 곧 신속염색 (예 : Diff-Quik)을 하여서 세포에 대한 예비 의진하에 시행하는 것이 검사의 특이성과 정확성을 높일 수 있을뿐 아니라¹⁰⁾, 신속염색을 하게 되면 검체의 세포 수가

적절할지도 아울러 알 수 있으므로 매우 유용하다. 본 증례도 FNAC 검사시에 즉시 Diff-Quik 염색으로 다수의 비정형 세포가 관찰되었으며, 이 세포들이 흉강 및 심낭액에서 보았던 세포와 유사하여서 EM 검색을 즉시 시행할 수 있었다.

일반적으로 FNAC 검체에서 EM 검색을 하는 적응증으로는 천자부위에서 채취된 세포가 통상적으로 볼 수 있는 세포가 아닌 경우, 소세포암종 및 육종이 의심된 때 등이며, 특히 조혈계, 신경내분비성 또는 멜라닌세포성 분화를 하는 암종에서 좋은 결과를 얻어서 진단의 정확도를 높일 수 있다.

악성 흑색종은 세포 및 조직 표본에서 저분화 및 미분화 암종처럼 관찰되고, 멜라닌 색소가 없는 예에서는 EM 검색으로 전형 또는 비전형적인 멜라닌 소체를 관찰하는 것이 진단에 필수이며, 특히 전이성 병변에서의 확진에 더 도움을 준다. FNAC 검체에서도 저분화 및 미분화 암종에서 멜라닌 소체의 관찰로서 전이성 악성흑색종의 진단이 가능하였던 예의 보고가 종종 있다^{3, 22)}. 본 증례도 입원 당시에 악성 흑색종을 의심할 만한 근거가 전혀 없었으므로 심낭압전 및 흉강액내에서 관찰된 암세포를 저분화 선암으로 생각하였으나 FNAC 검체의 EM 검색으로 확진한 예이다. 환자는 진단 후에 상세히 과거력을 추적한 결과 약 10년전에 우측 손바닥에서 점을 제거한 적이 있었으며 그 당시의 진단은 알 수 없었다.

FNAC 검체의 EM 검색은 검체 채취후 24시간 이내에 결과를 낼 수 있다는 보고도 있으나¹⁴⁾, 일반적으로 48시간 내지 72시간이 소요되어 통상 조직검사에 소요되는 시간과 거의 비슷하며 조직의 EM 검사보다 훨씬 신속하게 결과를 얻을 수 있다고 하지만 FNAC의 대부분의 예에서 광학현미경 검색으로 진단이 되므로 모든 암종에서 EM을 통상적으로 시행할 필요는 없는 것으로 생각된다. 그러나 심부장기에서 FNAC 검체의 전자현미경 소견이 확진에 절대적으로 필요한 경우가 약 30% 정도라는 보고가 있으므로⁶⁾, 적응증에 속하는 예에서는 처음 FNAC 검사시에 검체를 일단 전자현미경 고정액에 넣어 두었다가 신속 염색 (Diff-Quik)으로 광학현미경 검색

만으로도 확진이 가능하다고 생각되면 그 이상의 과정을 중지하고, 만약에 필요하게 되면 검사를 진행 시킴으로서 이를 효과적으로 이용하는 것이 바람직하다¹⁰⁾. 그리고 FNAC 검사는 EM 검색과 아울러 면역세포화학적 검사를 병행한다면 안전하고 신속하게 정확한 결과를 얻어서 최대의 효과를 얻을 수 있다고 하겠다.

세침흡인세포 검체의 전자현미경 검색을 위하여 이상적인 표본 제작법과 이 검사의 장점 및 유용성을 알아보고자 광학현미경 검색으로 진단이 어려웠던 33세 여성에서 발생한 전이성 악성 흑색종을 대상으로 연구하였다. 세침흡인세포 검체는 조직에 비하여 신속하게 결과를 얻을 수 있었으며 세포 보존상태도 우월하였다.

참 고 문 헌

1. Hagelquist E : Light and electron microscopic studies on material obtained by fine needle aspiration. *Acta Otolaryngol*{supp} 354 : 1-75, 1978
2. Akhtar M, Ali MA, Owen EW, Bakry M : A simple method for processing fine needle aspiration biopsy specimens for electron microscopy. *J Clin Pathol* 33 : 1214-1216, 1980
3. Akhtar M, Ali MA, Owen EW : Application of electron microscopy in the interpretation of fine needle aspiration biopsies. *Cancer* 48 : 2458-2463, 1981
4. Sehested M, Francis D, Hainam B : Electron microscopy of transthoracic fine needle aspiration biopsies. *Acta Pathol Microbiol Immunol Scand*[A] 91 : 457-461, 1983
5. Strausbauch P, Neill J, Dabbs DJ, Silverman JF : The impact of fine needle aspiration biopsy on a diagnostic electron microscopy laboratory. *Arch Pathol Lab Med* 113 : 1354-1356, 1989
6. Dardick I, Yazdi HM, Brosko C, Rippstein P, Hickey NM : A quantitative comparison of light and electron microscopic diagnosis in specimens obtained by fine needle aspiration biopsy. *Ultrastruct Pathol* 15 : 105-129, 1991
7. Yazdi HM, Dardick I : Guides to Clinical Aspiration Biopsy ; Diagnostic Immunocytochemistry and Electron Microscopy. New York. Tokyo, Igaku-Shoin, pp 1-27, 1992
8. Mackay B, Fanning T, Bruner JM, Steglich MC : Diagnostic electron microscopy using fine needle aspiration biopsies. *Ultrastruct Pathol* 11 : 659-672, 1987
9. Hagelquist E, Engstrom B : Electron microscopy studies on cytologic material acquired by fine needle biopsy. *Ups J Med Sci* 78 : 153-159, 1973
10. Dabbs DJ, Silverman JF : Selective Use of electron microscopy in fine needle aspiration cytology. *Acta Cytol* 32 : 880-884, 1988
11. di Sant' Agnes P, de Mesy J, Bonfiglio T, King D, Patten S : Plastic-embedded semi-thin sections of fine needle aspiration biopsies with dibasic staining ; Diagnostic and didactic applications. *Acta Cytol* 29 : 477-483, 1985
12. Lazzaro AV ; Technical note : Improved preparation of fine needle aspiration biopsies for transmission electron microscopy. *Pathology* 15 : 399-402, 1983
13. Odselius R, Falt K, Sandell L : A simple method for processing cytologic samples obtained from body cavity fluids and by fine needle aspiration biopsy for ultrastructural studies. *Acta Cytol* 31 : 194-198, 1987
14. Dvorak AM : Procedural guide to specimen handling for the ultrastructural pathology service laboratory. *J Elect Microscopy Tech* 8 : 255-301, 1987
15. Berkman W, Chawdury L, Brown N, Padleckoro R : Value of electron microscopy in cytologic diagnosis of fine needle aspiration biopsy. *Amer J Roentgenol* 140 : 1253-1258, 1982
16. Kindblom LG : Light and electron microscopic examination of embedded fine needle aspiration diagnosis of soft tissue and bone tumors. *Cancer* 51 : 2264-2277, 1983
17. Nordgren H, Akerman M : Electron microscopy of fine needle aspiration biopsy from soft tissue tumors. *Acta Cytol* 26 : 179-188, 1982
18. Stark P, Hildebrandt-Stark HE : Electron microscopy of cells obtained by fine needle aspiration biopsy of lung lesions. *Radiology* 22 : 327-328, 1982
19. Hirsch JG, Fedorko ME : Ultrastructure of human leukocytes after simultaneous fixation with glutaraldehyde and osmium tetroxide and "post fixation" in uranyl acetate. *J cell Biol* 38 : 615-627, 1968
20. Olsen M, Bourgeois GA : A technique for hemolysing erythrocytes and erythrocyte debris in bloody vaginal smears. *J Lab Clin Med* 36 : 766-768, 1950
21. Fawcett DW, Vallee BL : Studies on the separation of cell types in serosanguinous fluids, blood and vaginal fluids by floatation of bovine plasma albumin. *J Lab Clin Med* 39 : 354-364, 1952
22. Wills EJ, Carr S, Philips J : Electron microscopy in the diagnosis of percutaneous fine needle aspiration specimens. *Ultrastruct Pathol* 11 : 361-387, 1987