대한세포병리학회지 제 17 권 제 1 호
The Korean Journal of Cytopathology
17 (1) : 18-26 2006
ISSN 1017-0391

요 세포검사의 최근 검사기법

울산대학교 의과대학 서울아산병원 병리과

공 경 엽

= **Abstract** =

New Techniques for the Detection of the Malignant Cells in Urine Cytology

Gyungyub Gong, M.D.

Department of Pathology, Asan Medical Center, University of Ulsan College of Medicine, Seoul, Korea

Transitional cell carcinoma of the urinary bladder is common in the genitourinary tract. The gold standard for the diagnosis of bladder cancer has been cystoscopy, along with urine cytology. Cystoscopy is an invasive and relatively expensive technique. By comparison, urine cytology is easy to perform and specific for a diagnosis of bladder cancer, although less sensitive, especially in low-grade tumors. For this reason, there has been a need for superior noninvasive technology to increase our confidence in being able to detect bladder cancer. There are many reports of the various urinary tests that are available to facilitate the diagnosis. In this article, I reviewed the literature on urinary markers and tests that may be clinically useful, including fluorescence in situ hybridization, uCyt+/Immunocyte, the BTA® test, the NMP 22TM, the FDP® test, the telomerase activity test, the HA and HAse tests, and flow cytometry. Most of these tests have a higher sensitivity and specificity than cytology. However, urine cytology has the highest specificity, especially in individuals with a high-grade tumor. We conclude that no urinary markers or tests can replace the role of cystoscopy along with cytology in the diagnosis of transitional cell carcinoma of the bladder. However, some markers could be used adjunctively to increase the diagnostic accuracy during screening or during the postoperative follow-up examination of patients with bladder cancer.

Key words: Urine, Cytology, Urinary bladder, Neoplasm, New marker and test

논문접수 : 2006년 2월 1일
게재승인 : 2006년 2월 17일

책임저자 : 공 경 엽
주 소 : (138-760) 서울시 송파구 풍납동 388-1, 울산의대 서울아산병원 병리과
전 화 : 82-2-3010-4554
팩 스 : 82-2-472-7898
E-mail address : gygong@amc.seoul.kr

서 론

방광의 요로상피암종은 비뇨기계 악성 종양 중 흔히 접할 수 있는 암의 하나로 우리나라에서 발생률이 5위이며 남성에 있어서는 여성보다 그 발생률이 3~4배 높다.[1] 전통적인 진단 방법은 요 세포검사와 함께 방광경 검사를 시행하는 것이다. 요 세포검사가 신요로계암을 진단하는데 사용되기 시작한 것은 비교적 최근의 일이며 1945년 Papanicolaou 등이 88명의 환자를 대상으로 하여 방광암 진단을 위해 요 침전물을 사용한 보고가 있으며, 이 당시 "correct positive" 의 진단율을 88.8%로 보고하였다.[2] 요 세포검사는 검체를 얻기가 용이하며 반복해서 시행할 수 있고 특이성 (92~100%)이 높은 장점이 있는 반면, 민감성 (23~61%)이 낮은 단점이 있다. 특히 저등급 요로상피암종인 경우에는 민감도가 심각할 정도로 낮은데, 불행인지 다행인지 방광암의 약 80%는 표재층에 국한되어 있으며 저등급이 많다. 이에 대한 이유로는 저등급 암종을 진단하는 세포소견이 분명하게 나누어지지 않고 주관적인 의견에 따라 달라질 수 있어 주로 병리의사의 경험에 의존하는 경향이 많기 때문이다. 또한 저등급 암종세포의 형태학적 변화는 대단히 미묘해서 숙달된 병리의사도 이를 분별해 내는 것이 쉬운 일은 아니다. 이에 비해 방광경 검사는 다른 내시경검사와 마찬가지로 병변을 육안으로 직접 관찰할 수 있으며, 필요한 경우 조직검사까지 시행할 수 있는 장점이 있지만 비용이 비싸며, 방법이 침습적이어서 환자에게 고통을 주며 방광염이 있을 경우 진단이 어렵다. 게다가 방광경검사가 암을 100% 찾아낼 수 있는 것도 아니며, 방광암종은 등급에 관계없이 1/3~1/2에서 재발을 잘 하므로 지속적인 추적 관찰이 필요한데 방광경검사를 매번 시행하는 것은 결코 용이한 일이 아니다. 따라서 방법이 침습적이지 않아 환자에게 불편함을 주지 않고 검사결과를 믿을 만한 신뢰성 있는 검사법이 필요하다.

암 선별진단에 사용되는 검사법의 결과에 대한 신뢰성에 있어서, 임상의사의 입장에서의 희망사항을 크게 두 가지로 나누어 볼 수 있다. 첫째, 검사결과가 암의 존재를 확실히 배제해 줄 수 있는가 하는 것이다. 즉 민감도와 음성 예측도가 높아서 위음성을 얼마나 줄일 수 있냐는 것이다. 둘째, 방광경을 통해서 보았을 때 눈에 보이든 안 보이든지 암의 존재를 확실히 진단해 줄 수 있느냐는 것이다. 즉 특이도와 양성 예측도가 높아서 위양성이 없어야 한다는 점이다. 이런 조건을 100% 충족시켜 줄 수 있는 검사법은 현재로서는 없다. 따라서 방광경검사처럼 침습적이지 않고 행하기 쉬우며 민감도와 특이도가 동시에 높은 검사법의 개발이 필요하다. 이전부터 이에 대한 필요성이 제기되어 많은 연구가 있어 왔으며, 많은 검사법에 대한 보고들이 있다.[3]

새로운 검사법은 크게 형태학적 소견과 연계되어서 하는 방법과 그렇지 않은 방법으로 둘로 나누어 볼 수 있으며, 형태와 무관한 검사법에는 요 속에 분비되어 있는 항원에 대한 항체를 이용한 단백질 관련 검사법, 미세부수체 (microsatellite) 분석법, DNA 배수성을 분석하는 법, 단백체 (proteomics) 분석법 등 여러 방법들이 보고되고 있다. 형태학적인 소견과 연계해서 사용할 수 있는 검사법은 FISH, uCyt+/Immunocyte, morphometry 등이 있다. 본 장에서는 각 검사법들의 장점과 한계점들을 기술해 보고자 한다.

우선 요 속에 분비되어 있는 항원을 검사하는 방법 중 bladder tumor antigen (BTA) 관련 검사법이 있는데 기저막 성분을 인지하는 original BTA 검사법, human complement related H factor를 측정하는 BTA stat 및 BTA TRACK assay가 있다.[4-6] 이의 민감도 및 특이도는 보고자에 따라 다양한데 57~83% 및 50~72% 이다. 이 중 BTA stat 검사법은 FDA 승인을 받은 검사법이다. 다음으로 핵바탕질 단백 (nuclear matrix protein)과 관련된 검사법인데 NMP-22 test이다.[7] NMP22는 핵분열 장치로 세포 증식 때 염색질의 분포가 적절하게 되도록 도와주는 기능이 있다. 두 항체를 사용하여 효소연계면역측정법 (enzyme- linked immunoassay, ELISA)을 이용하여 이 성분을 측정하는 검사법이다. 민감도 및 특이도는 각각 68~88% 및 65~91%이며 이 역시 FDA 승인을 얻은 검사법이다. 위에서 언급한 두 검사는 비교적 방법이 용이하기는 하지만 형태학적인 소견과 연관해서 관찰하기는 어려운 점이 있다. 최근 개발된 방법 중 형태학적 소견과 함께 이용할 수 있는 방법이 있는데 uCyt+/Immuno Cyte 이다.[8] 이는 요를 여과막에 걸러서 검체를 만든 후 형광물질이 부착된 세 종류의 항체를 이용하여 면역형광염색을 시행한 후 양성인 세포를 찾아내는 것인데, 현미경 관찰시 양성인 세포의 형태학적 관찰도 동시에 할 수 있다는 장점이 있다. 민감도는 53~100%이고 특이도는 64~95%로 보고되고 있다. Fluorescence in situ hybridization (형광제자리 보합법, FISH)은 형광 물질이 부착되

어 있는 DNA 탐색자 (probe)를 이용해 세포에서 유전자의 숫자적 변화나 치환 (translocation)같은 변화가 있는 지를 쉽게 알 수 있는 방법으로 민감도와 특이도가 높은 검사법이다.[9,10] 그 외 fibrin-fibrinogen degradation product 측정법,[11] 끝분절효소 (telomerase) 활성도 측정법,[12] hyaluronic acid/ hyaluronidase 측정법,[13,14] microsatellite 검사법[15] 등 여러 다양한 검사가 있다. 검사 방법의 종류가 다양하다는 말은 우리의 원하는 이상적인 표지자 (“dream marker”)는 없다는 의미이기도 하다. 하지만, 보고된 문헌들을 검토해 보면 보고자에 따라 각 검사들을 어떻게 시행하여 어떤 식으로 이용하는지에 따라 환자 및 의사가 도움을 얻을 수 있는 정도의 차이가 상당히 큰 것을 알 수 있다. 따라서 여러 검사법들에 대한 방법, 임상적인 의의 등을 분석해 보고, 우리가 요로상피암종을 진단할 때 유용하게 쓸 수 있는 방법들에 대해 알아보고자 한다.

본 론

형광제자리 보합법 (Fluorescence in situ hybridization, FISH)

FISH는 형광 물질이 부착되어 있는 DNA 탐색자를 이용해 유전자의 획득, 소실 등 숫자적 변화, 치환같은 변화가 있는지를 쉽게 알 수 있는 검사법으로 과거에는 혈액암의 진단 및 분류에 많이 이용되어 왔다. 최근 들어 전 처리 기법이 좋아짐에 따라 사이기 (interphase) FISH 의 사용이 혈액암과 고형암 진단에 이용되고 있다.[16] 방광암에도 유전자의 변화에 대한 연구가 활발히 이루어져 정상 요로 상피세포에서 암으로 이행될 때의 유전자 변화가 이미 잘 알려져 있다.[17] 일차적으로 9p21의 소실, 이차적으로 3p, 7, 5q, 15p의 획득 다음으로 11p, 6q, 13q, 18q의 획득이 관련이 있는 것으로 알려져 있어 처음 이 기법이 연구되기 시작할 때는 9개의 탐색자를 써서 시작을 하여,[18] 여러 실험을 거친 후에 가장 민감도가 높은 4개의 탐색자를 하나의 단위로 묶어 키드로 만들어 시판되고 있는데 이것이 UroVysion (Vysis/Abbott, Downers Grove, IL, U.S.A.) 이다.[9,10] 이 검사는 3, 7, 17번 염색체의 중심절 (centromere)과 9번 염색체의 9p21 영역을 표적으로 하는 4개의 다색 탐색자 (multicolor probe)를 사용하며 2개 이상의 염색체의 변화가 있는 세포가 5개 이상 관찰될 때를 ‘양성’이라고 보고한다. 보고자에 따라 차이가 있기는 하지만 Halling 등에 의하면 민감도 81%, 특이도 98%로 대단히 높다.[19] 민감도 및 특이도가 높아 결과는 우수하나 검사 비용이 고가이며 형광현미경등 특수 장비가 필요한 것이 단점이라 할 수 있다. FISH 이외에도 비교 유전체 제자리 보합법 (comparative genomic hybridization, CGH), 분자 클로닝 (molecular cloning) 및 microarray 기법 등 다양한 방법이 염색체 및 유전자 변화를 관찰하는데 이용되고 있다.

uCyt+/ Immunocyte

uCyt+/Immunocyte (Diagnocure Inc., Saint-Foy Quebec, Canada) 1997년 Fradet 등이 개발하여 보고한 검사법으로 면역형광염색을 이용한 검사법이다.[8] 이 검사법에는 3개의 항체가 이용되는데 그 중 하나는 CEA의 high molecular weight form으로 단항성 항체 (monocloncal antibody, 19A211)이며 Texas red로 부착되어 있고 나머지 두 항체는 세포질의 점액 성분을 표적으로 하는 항체이며 (M344 및 LDQ 10) 이 항체들은 형광이 부착되어 있다. 이 중 M344는 300kd의 sialoglycoprotein으로 특히 저등급 암종에 발현이 높아, 병기 Ta-T1 방광암의 71%에서 발현되고, 19A211은 Ta-T1 종양의 90%정도 발현하는 것으로 보고되었다.[20] 검사법은 비교적 간단하며, 50ml 정도의 요이면 충분하며 여과막 (Milipore filter)에 요를 걸러서 세포 성분을 모은 다음 위에서 기술한 세 항체를 이용하여 면역형광염색을 시행하면 된다. 현재 상품화되어있는 키트는 세 항체를 묶어서 하나의 용액으로 만들어 두었으므로 한 번의 항원 항체 반응만 시행하면 된다. 형태학적 소견을 관찰하면서 볼 수 있는 장점이 있어 병리의사로서는 편한 마음으로 접근할 수 있는 검사법이지만, FISH처럼 형광현미경이 필요하며, Texas-red와 FITC (green)를 동시에 관찰할 수 있는 이중 필터 (dual filter)가 구비되어야 용이하게 관찰할 수 있다. 세포를 전부 관찰하여 붉은 색이든 녹색이든지 염색된 세포를 1개 이상 관찰하면 양성으로 판별을 한다. 이 때 양성 염색 유형이 세포질에 미세한 과립모양으로 염색된 것만 취해야 위양성 판단의 오류를 피할 수 있다. 검사성적은 보고자에 따라 다양한데,[21-23] 민감도 90% (53～100%) 특이도 74% (64～95%)로 민감도가 높은 반면 특이도가 낮은 것이 이 검사법의 단점이며

이는 통상적인 세포검사를 병행하면 어는 정도 보정이 가능하다.

방광암 항원 검사법 (Bladder Tumor Antigen Test, BTA Test)

최초에 보고된 original BTA test (C. R. BARD Inc., Redmond, WA, U.S.A.) 는 방광암의 기저막 복합체 성분의 일부를 인지하는 검사법으로 인체 IgG 가 이용되는 latex agglutination 기법이 이용되었다.[4] 이 성분은 16-165kd 크기의 polypeptide이다. 결과는 검사띠 (test strip)의 색깔 변화로 알 수 있었다. 그러나 original BTA test의 민감도는 34~70% 정도이고 특이도도 낮았으며 신세포암종과 전립샘암종을 가진 환자의 86.4%에서도 양성으로 나오며, 그 외 방광염 및 전립샘 비대증 등 다른 양성 질환에서도 높은 양성율이 나오는 등 그 특이성에 문제점이 제기되었다.[24] 따라서 그 이후에는 original 검사법보다 BTA stat test[5]와 BTA TRAK test (Blow Diagnostic Sciences, Redmond , WA, U.S.A.)[6]를 주로 사용하는데 이들은 human complement factor H related protein (hCFHrp)을 측정하는 검사법이다. hCFHrp는 종양세포들이 complement에 의해 주도되는 면역계를 피해갈 수 있도록 도와주는 성분이며 이들의 존재는 암 세포의 생존을 유도한다. BTA stat test는 정성적인 검사법으로 immunochromatographic test인 반면, BTA TRAK test 는 정량적인 검사법으로 ELISA 검사법이다. BTA stat test는 두 종류의 단항성 항체를 사용하여 5분 정도면 결과를 알 수 있을 정도로 빠르고 간단하여 외래에서도 손쉽게 할 수 있다. 상품화된 요시험지(dip stick) 방식의 검사법으로서 일정 시간이 경과한 후 색깔의 변화를 읽으면 된다. 민감도는 57~83%이고, 저등급 요로상피암종의 민감도는 약 50%이지만, 고등급은 이보다 낮아 29~83% 이다.[25] 특이도는 68~72%로 보고되고 있다. 전립샘 비대증 (88%), 염증성 병터 (70%), 등에 높은 양성율을 나타낸다.[26] BTA TRAK test는 sandwich immunoassay 로 항체가 입혀져 있는 96 well에 요를 넣은 후 일정시간 항원 항체 반응을 일으킨 후 세척하고 발색제를 넣어 450nm의 파장에서 판독하면 된다. Stat test 보다는 시간이 더 걸리지만 정량분석까지 가능하다는 장점이 있고, 민감도도 전 등급의 종양에서 기존의 세포검사 결과보다는 높아서 62~77% (54% GRADE1-78% Grade 3) 이지만 이 검사 역시 특이도는 50~75%이다.[27] 민감도와 특이도가 낮은 것은 아니나 그렇다고 만족할 만한 수준도 아닌 것 같다.

핵바탕질 단백 검사법 (Nuclear Matric Protein Test, NMP 22)

NMP는 핵의 구조를 견고하게 유지하는 구조물로서 DNA 복제, RNA 전사 및 유전자의 발현에 관여한다.[28] 특정한 장기 또는 특정한 암과 관련이 있는 NMP에 대한 보고가 되었으며, 방광암과도 관련이 있는 NMP가 보고되었는데 이를 기반으로 NMP 22 test (Mattritech Inc., Newton, MA, U.S.A.)가 개발되었다. NMP-22는 세포 분열시에 염색질의 적절한 재분포가 이루어지도록 조정하는 역할을 하는데 방광암의 요속에 정상보다 약 25배 정도 NMP22가 많이 분비되는 것으로 알려져 있다.[7] 원래 검사 방법은 두 개의 단항성 항체를 사용한 ELISA 검사법으로 정량 분석법이다. 민감도는 68.5~88.5%로 높게 보고되고 있으며, 특이도는 65.2~91.3% 정도이며 이 역시 전립샘 비대증 등 양성 병변 및 다른 암에도 비교적 높게 보고되고 있어 변별력에 있어서는 BTA와 마찬가지로 한계점이 있다.[29.30] 최근 BTA stat test와 유사한 신속한 검사법이 개발되었는데, bladder check test (Matritech) 이며 이는 stat test와 마찬가지로 정성적인 검사방법이며 방법 또한 이와 유사하고 신속하여 30분 정도면 결과를 알 수 있다. 이 역시 외래에서 직접 시행해 볼 수 있는 쉬운 검사로서 민감도는 68~88%이고 특이도는 65~91%이다.

Fibrin-fibrinogen degradation product, FDP

McCabe 등이 1984년 FDP가 방광암과 연관이 있으며 FDP test (Accu Dx, Intracel Corp., Rockville, MD, U.S.A.)로 측정이 가능하다는 보고를 하였다.[11] 이 검사법의 원리는 종양세포가 혈관내피성장인자 (vascular endothelial growth factor)를 많이 분비하여 미세혈관계의 투과력이 증가하고 혈장 단백 중 하나인 섬유소원이 빠져나가고 이것이 혈관 바깥에서 섬유소로 전환되고 다시 plasmin에 의해 분해되어 섬유소-섬유소원 분해산물을 만드는데 요속에 분비되어 있는 이 산물을 정성적으로 측정하는 것이다. 처음에 검사법이 보고될 당시의 방법은 면역분석법이었으나 검사 시간 등 여러 단점을 보완하여 hemagglutination immuno-

inhibition method, latex agglutination, ELISA 방법을 거쳐 신속한 정성법으로 까지 발전되었다. 민감도는 82% (27~100%)이고 특이도는 약 80%이다.[31,32]

Hyaluronic acid-Hyaluronidase test

Hyaluronic acid (HA)는 nonsulfated glycosaminoglycan으로 조직의 바탕질 및 체액의 한 성분이다. HA는 조직의 통합성 및 수분 항상성에 주요한 성분이며 hyaluronidase (HAse)는 HA를 분해시키는 효소이다. HA는 방광암에 5~7배 증가되어 HAse는 고등급의 방광암에만 4~7배 증가되어 있는 것으로 알려져 있다.[13,14] 이것은 면역분석법으로서 HA test의 민감도는 83%이고, 특이도는 90%, HAse test의 민감도는 81.5%, 특이도는 83.8%이다.[13] HA test는 방광암을 찾는데 주로 이용되고 HAse test는 방광암의 등급을 평가하는데 유용하다.

끝분절효소 검사법 (Telomerase test)

끝분절효소는 염색체의 끝 부분에 존재하는 짧은 DNA 연쇄 (sequence)이며 염색체 불안정성 (chromosomal instability) 및 세포사에 관여한다.[33] 세포분열이 일어남에 따라 끝분절의 길이가 짧아지는데, 결국 끝분절 길이가 짧아져 없어지면 세포는 죽게 되는 것이다. 끝분절효소는 끝분절의 유지에 필요한 효소이며 인간에서는 생식 세포에 가장 풍부하게 존재하며 암세포에서도 끝분절효소의 활성이 왕성한데 이 끝분절효소 활성도를 PCR 기법을 이용해 측정하는 것으로 Telomereric Repeat Action Protocol (TRAP) 검사법이다.[12] 민감도는 70~86%이고 특이도는 60~90%이다.[34-36] 전립샘 비대증 및 염증성 병터에도 23.3%정도 양성이 나올 수 있다.[36]

미세부수체 분석법 (Microsatellite analysis)

미세부수체는 대단히 다양한 DNA 반복 구조로 인간의 유전체에서 흔히 관찰된다. Loss of heterozygosity (LOH)나 microsatellite instability (MSI) 같은 암생성과 관련이 있는 변화를 인지할 수 있는 미세부수체 표지자가 있다. 그 중 방광암에서는 염색체 4p, 8p, 9p, 9q, 11p 및 17p에서 자주 LOH가 관찰된다. Mao 등이 1996년[13] MS 분석법을 이용하여 20명의 환자/25개 검체를 대상으로 13개의 미세부수체 표지자를 사용하여 MA를 통해 환자의 95%를 진단하였으며 이 때 함께 시행한 요세포 검사의 진단율은 50%밖에 되지 않았다. 물론 환자 대상 수가 적어서 의의가 약간 희석될 수도 있지만 분자병리와 요의 접목이라는 점에서 괄목할만한 보고이었다. 이후 계속 연구가 이어져 제2상 임상 시험이 보고되기도 하였으며[37] 민감도 83~95%, 특이도 100%로 결과가 우수하였다. 단 여러 개의 미세부수체 DNA 표지자를 사용해야 하며 이미 잘 알려져 있고 흔히 사용되는 PCR 기법을 이용하기는 하지만 검사 방법도 간단치 않아 임상 적용이 용이하지만은 않다. 따라서 저렴한 자동화기계의 개발과 표지자 비용이 같이 저렴해 진다면 가장 강력한 검사법이라 할 수 있겠다.

Table 1. Summary of FDA approved techniques

Urinary markers	Test materials	Marker identified	Test type	Testing place	Time taken	Sensitivity	Specificity
FISH	Bladder washing	Chromosomal alteration-loss or deletion	In situ hybridization	Lab.	Hrs	69-87%	85-97%
uCyt+	Urine	CEA and mucin	IF	Lab.	Hrs	53-100%	64-95%
BTA	Urine	H factor of complement	Immunoassay	Point of care (Stat) and lab	Few mins. and hrs.	Stat 57-83% TRAK 62-77%	BTA Stat 68-72% TRAK 50-75%
NMP 22	Urine	Nuclear mitotic apparatus	ELISA	Point of care and lab.	Mins and hrs	68.5-88.8%	65.2-91.3%
Accu-dx	Urine	Fibrin degradation product	Immunoassay	Point of care	Hrs	68%	86.2%

Modified from Dey P[3]

세포주기 조절 인자 (Cell cycle regulator)

정상적으로 세포 주기 조절 단백은 세포의 증식과 진행에 관여하며 잘 통제되어 있다. 그러나 암 세포에서는 이의 통제가 풀어져 무제한 세포 증식이 초래된다. 방광암의 생성 및 증식에 관여하는 세포주기 조절 단백 및 유전자들이 많이 있다.[24] 그 중 대표적인 것이 p53 종양억제 유전자인데 진행형 방광암종과 상피내암종에서 p53의 변화를 볼 수 있다.[38] p53 단백 발현은 면역화학염색을 통해서 관찰할 수 있으며, p53의 변이는 PCR을 통해서 확인할 수 있다. 요에서의 p53 민감도는 23.5%로 낮고 특이도는 75%이다. 그 외에도 pRb, p15, p21 및 cyclin-dependant kinases 등에 대한 연구도 이루어지고 있다.

Cytokeratins

Cytokeratins (CK)은 중간 미세섬유 (intermediate filament)로 세포의 골격을 유지하는 단백성분이다. 상피세포 유형에 따라 발현되는 CK의 종류가 다르다. 이 성질은 암이 생기거나 전이가 되어도 유지되는 편이다. 이행상피암종은 전기영동의 결과를 보면 CK 7, 8, 18, 19 및 20을 갖고 있으며, CK 13, 17의 발현양은 다양하며, CK 4, 5, 6, 10, 14 및 16은 소량 표현한다. CK 중 CK20은 우산세포를 제외한 정상 요로 상피세포에서는 발현이 안 되나 저등급의 암세포에서는 발현이 잘 된다는 보고가 있다.[39] 민감도는 91%이고 특이도는 67~100%이다.[40] CK 18도 방광암 진단에 도움을 줄 수 있는 CK이다.[41] Nisman 등은 방광암 진단에 CYFRA 21-1 assay를 이용해 용해성 CK 19를 측정하여 보고 하였다.[42] 민감도는 79.3%, 특이도 88.6% 이었다.

혈액형 연관 항원 (Blood group-related antigens)

정상 인구 70~80%의 요로상피에서 ABO (H) 및 Lewis blood group-related (Lex) antigens 및 Thomas-Friedenreich-related antigen (T-antigen) 이 관찰된다. 발암과정은 아마도 이러한 항원들의 발현에 이상이 생긴 것이라고 보고되었다.[43] ABO 항원 발현의 소실과 비역행분화암과의 상관성, Lex 항원 및 T 항원 발현과 이행상피암종의 연관성이 알려지기 시작하였다. 이 이론에 근거를 두고 종양과 연관이 있는 p-12 같은 혈액형 연관 항원에 대한 항체가 개발되어 이를 면역화학염색을 이용하여 측정할 수 있게 되었다.[44] 민감도는 85~89%이고 특이도는 51%로 대단히 낮다.[24]

흐름세포측정기 (Flow cytometry), 영상 분석기 (Image cytometry) 및 Quanticyt

흐름세포측정기는 1980~90년대 충실성 종괴에서의 DNA 분포유형을 분석하여 배수성과 증식 분획을 관찰하는데 많이 사용되었다. 이후 요에서도 새로운 침전 기법이 개발되어 흐름세포측정기의 사용이 보고되어 왔는데 고등급 방광암종과 상피내암종에서는 흐름세포측정기 검사에서 비배수성이 많은 것으로 보고되고 있다.[24] 이와는 대조적으로 저등급은 대부분이 이배수성이다. 따라서 요에서 방광암을 찾아내는 역할보다는 저등급과 고등급 암을 감별하는데 더 의의가 있는 검사라 할 수 있다. 또한 정확한 결과를 얻기 위해서는 많은 양의 암세포가 필요하고 고가의 장비를 사용함에도 불구하고 검사의 정확성이 낮고 복잡하여 때문에 방광암을 찾아내고 재발을 추적 관찰 하는 검사로는 제한점이 많은 방법이라 할 수 있다. 영상분석기는 세포 및 세포 성분의 분류를 좀 더 객관적으로 분석하기 위해 고안된 방법으로 Feulgen 염색을 통해 요로 상피에서 DNA 배수성을 분석할 수 있으며 동시에 세포 형태의 관찰도 가능한데, 핵:세포질 비 등의 지표에 따라 정상 세포와 구분하는데 흐름세포측정기처럼 저등급 암종보다 고등급 암종을 찾아내는 능력이 더 뛰어 나다. 물론 보고된 결과에 따르면 기존 세포검사 보다는 낫다고는 하지만[45] 제한점이 있는 검사라 최근 들어서는 그 사용 빈도가 감소되고 있다. Quanticyt system은 광학현미경상에 잡히는 이미지와 DNA 양을 분석하여 방광암의 위험성을 결정하는 기법이다.[46] 앞서 기술한 흐름세포측정기와 영상분석기를 합쳐 놓은 것으로 보면 된다. 민감도는 59~69%이고 특이도는 70%정도이다. 이 역시 많은 양의 검체가 필요하며 검체 처리과정도 복잡하고 영상분석 체계도 필요하므로 상용화되기에는 한계점이 많다.

새로운 단백체 연구법 (Novel Proteomic approach)

단백연구에 전통적으로 2D gel-protein map이 많이 이용되어 왔다. 최근 들어 단백 연구에 획기적인 발달

이 이루어져 단백 분석에 질량분석기(mass spectrometry) 가 이용되기 시작하였다. 이 기법은 2-D gel에 비해 민감도도 높고 속도도 빠르며 재현성 또한 우수한 기법이다. 최근 기법인 ProteinChip/SELDI technology (surface enhanced laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry)를 이용하여 새로운 방광암 생물학적 표지자를 찾고자 하는 연구가 보고되었다.[47] 이 연구를 통해 5개의 새로운 요로상피암종의 생물학적 표지자와 7개의 단백 군집을 찾아냈는데, 이 영역은 3.3~133kd에 이른다. 개개의 생물학적 표지자의 민감도는 43~70%이고 특이도는 70~86%이며 생물학적 표지자와 단백군집을 조합하였을 때는 민감도가 87%이고 특이도가 66%이었다. 특히 저등급 암종의 인지에 민감도가 78%로 높았다. 비교적 좋은 결과가 나왔으나 이 방법을 임상적으로 사용하기에는 방법의 용이성, 경제적 측면 다 한계가 있다. 따라서 발견된 생물학적 표지자를 잘 개발하여 상품화 하는 것이 좀 더 현실적이라 생각되는데 후속 연구 보고는 아직 없는 실정이다.

기타 표지자 (Other biomarkers)

c-erb 및 c-ras 같은 종양유전자, Ki-67, PCNA (proliferation cell nuclear antigen) 같은 증식항원, 성장인자, 또한 cadherins 및 integrin 등의 세포부착인자 등에 대한 연구도 이루어지고 있다, 또한 방광암과 연관이 있는 항원으로 알려진 것에는 BL2-10D1 antigen, T43 및 T138 antigen, 48693/12 antigen 등이 보고되고 있으나 임상적으로 이용하기에는 좀 더 많은 검증 과정이 필요하다.

결 론

방광암 진단 시 요 세포검사의 한계점인 낮은 민감도를 보완할 수 있는 여러가지 검사법을 검토하였다. 그러나 세포검사를 시행하지 않고 이를 대체할 검사법은 없다는 것이 결론이다. 하지만 세포검사는 제한점이 있으므로 이들 검사의 보조적인 도움을 받으면 방광암의 선별진단이나 술 후 추적관찰시 방광암 진단율을 높이는데 기여할 수 있을 것이다. 위에서 기술한 검사법 중 검증 과정이 끝나 FDA 인가를 받은 검사법은 NMP22, BTA test FDP test, Immunocyte FISH 이며 Table 1에 이들 검증된 검사법들의 장단점을 정리하였다. 이들을 잘 분석한 후 각 병원의 실정에 맞는 검사법의 도입이 방광암 진단에 도움을 줄 수 있으리라 생각한다.

참 고 문 헌

1. Annual Report of Cancer Registry Program in Republic of Korea. Ministry of Health and Welfare, Republic of Korea, 2002.
2. Papanicolaou GN. Marchall VF. Urine sediment smears: A diagnostic procedure in cancers of the urinary tract. *Science* 1945;101:519-21.
3. Dey P. Urinary markers of bladder carcinoma. *Clin Chim Acta* 2004;340:57-65.
4. Sarosdy MF. The use of the BTA Test in the detection of persistent or recurrent transitional-cell cancer of the bladder. *World J Urol* 1997;15:103-6.
5. Sarosdy MF, Hudson MA, Ellis WJ, et al. Improved detection of recurrent bladder cancer using the Bard BTA stat Test. *Urology* 1997;50:349-53.
6. Ellis WJ, Blumenstein BA, Ishak LM, Enfield DL. Clinical evaluation of the BTA TRAK assay and comparison to voided urine cytology and the Bard BTA test in patients with recurrent bladder tumors. The Multi Center Study Group. *Urology* 1997;50:882-7.
7. Keesee SK, Briggman JV, Thill G, Wu YJ. Utilization of nuclear matrix proteins for cancer diagnosis. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 1996;6:189-214.
8. Fradet Y, Lockhard C. Performance characteristics of a new monoclonal antibody test for bladder cancer: ImmunoCyt trade mark. *Can J Urol* 1997;4:400-5.
9. Bubendorf L, Grilli B, Sauter G, Mihatsch MJ, Gasser TC, Dalquen P. Multiprobe FISH for enhanced detection of bladder cancer in voided urine specimens and bladder washings. *Am J Clin Pathol* 2001;116:79-86.
10. Halling KC. Vysis UroVysion for the detection of urothelial carcinoma. *Expert Rev Mol Diagn* 2003;3:507-19.
11. McCabe RP, Lamm DL, Haspel MV, et al. A diagnostic-prognostic test for bladder cancer using a monoclonal antibody-based enzyme-linked immunoassay for detection of urinary fibrin(ogen) degradation products. *Cancer Res* 1984;44:5886-93.
12. Dalbagni G, Han W, Zhang ZF, et al. Evaluation of the telomeric repeat amplification protocol (TRAP) assay for telomerase as a diagnostic modality in recurrent bladder cancer. *Clin Cancer Res* 1997;3:1593-8.

13. Lokeshwar VB, Block NL. HA-HAase urine test. A sensitive and specific method for detecting bladder cancer and evaluating its grade. *Urol Clin North Am* 2000;27:53-61.
14. Pham HT, Block NL, Lokeshwar VB. Tumor-derived hyaluronidase: a diagnostic urine marker for high- grade bladder cancer. *Cancer Res* 1997;57:778-83.
15. Mao L, Schoenberg MP, Scicchitano M, et al. Molecular detection of primary bladder cancer by microsatellite analysis. *Science* 1996;271:659-62.
16. King W, Proffitt J, Morrison L, Piper J, Lane D, Seelig S. The role of fluorescence in situ hybridization technologies in molecular diagnostics and disease management. *Mol Diag* 2000;5:309-19.
17. Sidransky D, Messing E. Molecular genetics and biochemical mechanisms in bladder cancer. Oncogenes, tumor suppressor genes, and growth factors. *Urol Clin North Am* 1992;19: 629-39.
18. Sokolova IA, Halling KC, Jenkins RB, et al. The development of a multitarget, multicolor fluorescence in situ hybridization assay for the detection of urothelial carcinoma in urine. *J Mol Diagn* 2002;2:116-23.
19. Halling KC, King W, Sokolova IA, et al. A comparison of cytology and fluorescence in situ hybridization for the detection of urothelial carcinoma. *J Urol* 2000;164:1768-75.
20. Allard P, Fradet Y, Tetu B, Bernard P. Tumor- associated antigens as prognostic factors for recurrence in 382 patients with primary transitional cell carcinoma of the bladder. *Clin Cancer Res* 1995;1:1195-202.
21. Pfister C, Chautard D, Devonec M, et al. Immunocyt test improves the diagnostic accuracy of urinary cytology: results of a French multicenter study. *J Urol* 2003;169:921-4.
22. Lodde M, Mian C, Negri G, et al. Effect of intravesical instillation on performance of uCYT+ test. *Urology* 2004;63:878-81.
23. Tetu B, Tiguert R, Harel F, Fradet Y. ImmunoCyt/uCyt+ improves the sensitivity of urine cytology in patients followed for urothelial carcinoma. *Mod Pathol* 2005;18:83-9.
24. Burchardt M, Burchardt T, Shabsigh A, De La Taille A, Benson MC, Sawczuk I. Current concepts in biomarker technology for bladder cancers. *Clin Chem* 2000;46:595-605.
25. Sanchez-Carbayo M, Herrero E, Megias J, et al. Initial evaluation of the diagnostic performance of the new urinary bladder cancer antigen test as a tumor marker for transitional cell carcinoma of the bladder. J Urol 1997;161:1110-5.
26. Pode D, Shapiro A, Wald M, Nativ O, Laufer M, Kaver I. Noninvasive detection of bladder cancer with the BTA stat test. *J Urol* 1999;161:443-6.
27. Thomas L, Leyh H, Marberger M, et al. Multicenter trial of the quantitative BTA TRAK assay in the detection of bladder cancer. *Clin Chem* 1999;45:472-7.
28. Berezney R, Coffey DS. Identification of a nuclear protein matrix. *Biochem Biophys Res Commun* 1974;60:1410-7.
29. Grocela JA, McDougal WS. Utility of nuclear matrix protein (NMP22) in the detection of recurrent bladder cancer. *Urol Clin North Am* 2000;27:47-51.
30. Ponsky LE, Sharma S, Pandrangi L, et al. Screening and monitoring for bladder cancer: refining the use of NMP22. *J Urol* 2001;166:75-8.
31. Johnston B, Morales A, Emerson L, Lundie M. Rapid detection of bladder cancer: a comparative study of point of care tests. *J Urol* 1997;158:2098-101.
32. Schmetter BS, Habicht KK, Lamm DL, et al. A multicenter trial evaluation of the fibrin/fibrinogen degradation products test for detection and monitoring of bladder cancer. *J Urol* 1997;158:801-5.
33. Harley CB, Futcher AB, Greider CW. Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts. *Nature* 1999;345:458-60.
34. Kavaler E, Landman J, Chang Y, Droller MJ, Liu BC. Detecting human bladder carcinoma cells in voided urine samples by assaying for the presence of telomerase activity. *Cancer* 1998;82:708-14.
35. Yokota K, Kanda K, Inoue Y, Kanayama H, Kagawa S. Semi-quantitative analysis of telomerase activity in exfoliated human urothelial cells and bladder transitional cell carcinoma. *Br J Urol* 1998;82:727-32.
36. Mayfield MP, Shah T, Flannigan GM, Hamilton Stewart PA, Bibby MC. Telomerase activity in malignant and benign bladder conditions. *Int J Mol Med* 1998;1:835-40.
37. van Rhijn BW, Lurkin I, Kirkels WJ, van der Kwast TH, Zwarthoff EC. Microsatellite analysis--DNA test in urine competes with cystoscopy in follow-up of superficial bladder carcinoma: a phase II trial. *Cancer* 2001;92:768-75.
38. Habuchi T, Kinoshita H, Yamada H, et al. Oncogene amplification in urothelial cancers with p53 gene mutation or MDM2 amplification. *J Natl Cancer Inst* 1994;86:1331-5.
39. Moll R, Lowe A, Laufer J, Franke WW. Cytokeratin 20 in human carcinomas. A new histodiagnostic marker detected by monoclonal antibodies. *Am J Pathol* 1992;140:427-47.
40. Klein A, Zemer R, Buchumensky V, Klaper R, Nissenkorn I. Expression of cytokeratin 20 in urinary cytology of patients with bladder carcinoma. *Cancer* 1998;82:349-54
41. Sanchez-Carbayo M, Urrutia M, Gonzalez de Buitrago JM, Navajo JA. Evaluation of two new urinary tumor markers: bladder tumor fibronectin and cytokeratin 18 for the diagnosis of bladder cancer. *Clin Cancer Res* 2000;6: 3585-94.
42. Nisman B, Barak V, Shapiro A, Golijanin D, Peretz T, Pode D. Evaluation of urine CYFRA 21-1 for the detection of primary and recurrent bladder carcinoma. *Cancer* 2002;

94:2914-22.
43. Hakomori S. Aberrant glycosylation in cancer cell membranes as focused on glycolipids: overview and perspectives. *Cancer Res* 1985;45:2405-14
44. Cordon-Cardo C, Reuter VE, Lloyd KO, et al. Blood group-related antigens in human urothelium: enhanced expression of precursor, LeX, and LeY determinants in urothelial carcinoma. *Cancer Res* 1988;48:4113-20.
45. Katz RL, Sinkre PA, Zhang HH, Kidd L, Johnston D. Clinical significance of negative and equivocal urinary bladder cytology alone and in combination with DNA image analysis and cystoscopy. *Cancer Cytopathol* 1997;81:354-64.
46. van der Poel HG, Witjes JA, van Stratum P, Boon ME, Debruyne FM, Schalken JA. Quanticyt: karyometric analysis of bladder washing for patients with superficial bladder cancer. *Urology* 1996;48:357-64.
47. Vlahou A, Schellhammer PF, Mendrinos S, et al. Development of a novel proteomic approach for the detection of transitional cell carcinoma of the bladder in urine. *Am J Pathol* 2001;158:1491-502.