

병리검사를 위한 유방검체 고정의 질 향상 활동

삼성서울병원 병리과¹, 연세대학교 경영전문대학원²

조 승 일¹ · 최 명 섭¹ · 배 문 환¹ · 이 문 정¹ · 우 희 숙¹ · 박 순 채² · 조 은 윤¹

Quality Improvements of Breast Specimen Fixation for Histopathology Test

Seong-Il Cho¹, Myung-Sup Choi¹, Moon-Hwan Bae¹, Moon-Jung Lee¹,
Hee-Suck Woo¹, Soon-Chae Park², and Eun-Yoon Cho¹

Department of Pathology, Samsung Medical Center, Seoul 135-710, Korea¹
Graduate School of Business, Yonsei University, Seoul 120-749, Korea²

To improve accuracy of the immunohistochemical testing and fluorescence in situ hybridization (FISH) study as well as a routine histology diagnosis in breast cancer, quality improvement for optimal tissue handling is mandatory. We evaluate fraction defective of 7107 blocks from 349 breast cancer patients, who underwent surgical treatment at Samsung Medical Center Seoul, Korea from January 1, 2009 to March 31, 2010. We decided pre-improvement period from January, 2009 to June, 2009. In the first quality improvement period (July, 2009 to September, 2009) we made improvements in protocol of gross examination. In the second quality improvement period (October, 2009 to December, 2009) we attempted more effective formalin fixation such as frequent exchange of formalin and use of separate fixation container for each case. In the third quality improvement period (January, 2010 to March, 2010) improvement of tissue processor was performed. We achieved a marked reduction of fraction defective (9-16%) through efforts to improve quality of formalin-fixed, paraffin-embedded blocks when compared to pre-improvement period.

Received 28, OCT 2010 / Returned for modification 24, NOV 2010 / Accepted 23, DEC 2010

Key Words : Breast cancer, Fixation, quality improvement

I. 서 론

병리 조직 검사에 시행되는 여러 가지 수술 검체들 중에서 특히, 유방암 진단을 위해서 절취되는 유방 검체는 일반적으로 다른 검체들에 비하여 지방조직의 비율이 높

아 육안검색 시 얇게 자르기가 어렵고 formalin 고정 등이 잘 되지 않는 경향으로 이어지기 쉽다(한국유방암협회, 2005). 포르말린 고정이 되지 않은 조직은 자동침투기(tissue processor)를 거치면서 알코올과 xylene, 파라핀 등에서도 시약의 침투가 제대로 되지 않아서 제작된 파라핀 블록의 여러 가지 질적 결함을 일으킨다(전국임상병리교수협의회, 2009). 고정이 잘된 적절한 고정 검체만이 형태학적 특성과 면역조직화학 염색 상에서 양질의 염색 결과를 얻을 수 있으므로 조직 절편의 두께와 고정액의

교신저자 : 조은윤, (우) 135-710, 서울시 강남구 일원동 50번지 삼성서울병원 병리과
TEL : 02-3410-2796
E-Mail : eunyon.cho@samsung.com

종류 그리고 고정 시간 등이 매우 중요하다(김, 2002).

또한, 유방암 환자의 치료계획을 세우고 예후를 판단하는데 있어서 예후인자들에 대한 평가는 매우 중요하다(김 등, 2002a). 따라서 기본적인 외과병리검사 외에도 면역조직화학검사(immunohistochemistry, IHC)나 형광동소보합법(fluorescence in situ hybridization, FISH) 등의 bio-marker를 위한 검사가 추가로 이루어지는 경우가 많은데(Beenken 등, 2001), 유방 조직의 특성으로 인한 고정 과정의 정도관리가 중요하다. 이 과정에 대한 질 개선 실시 전후의 각 검사 불량률을 통계 비교하여 정도관리를 실시한다면 검사결과의 정확도 개선을 이룰 수 있을 것이다.

이에, 병리과에 의뢰되는 다수의 유방검체들 중에서 부분유방절제술(partial mastectomy, PM)이나 유방보존술(breast conserving surgery, BCS) 검체보다는. 일반적으로 검체 크기가 크고 지방조직이 많아 고정의 정도관리에 가장 적합하고 의미가 있는 변형근치적 유방절제술(modified radical mastectomy, MRM)을 대상으로(김 등, 2002b; 병리사랑분임조, 2006) 불량 블록의 빈도를 조사하였다. MRM 검체는 수술 중 유방조직 전체를 제거하기 때문에 제작하는 파라핀 블록 수도 많고 이에 따른 고정 시간도 더욱 길게 소요되므로 단계별로 집중적인 기술이 요구된다. 고정의 개념도 일반적인 파라핀 뿐만 아니라, 육안검색 후에 자동침투기를 거치는 모든 과정과 시약들의 범위까지도 포함하는 방법으로 질 향상 활동을 실시하였다.

II. 재료 및 방법

1. 연구 재료 및 시약

1) 연구 재료

본 연구에서는 2009년 1월부터 2010년 3월까지 1년 3개월간 삼성서울병원 병리과에 검사 의뢰된 MRM 유방암 증례 중 전산상의 임상기록과 병리학적 검사 결과의 검토가 가능한 총 7,107개의 파라핀 블록과 해당 블록들로 재검사 의뢰된 IHC와 FISH 검사의 슬라이드를 대상으로 조사하였다.

2) 사용 시약

검체의 고정을 위해서 포르말린(10% neutral buffered formalin NBF pH7.0-7.2 Samchun, Korea)를 사용하였으며, 자동 침투기에 95%에서 100%까지 ethanol (Mallinckrodt Baker, Inc., Philadelphia, USA)로써 탈수를 하였고 xylene(Mallinckrodt Baker, Inc., Philadelphia, USA))로 처리하여 파라핀(Merck KGaA, Darmstadt, Germany)에 포매된 조직으로 블록을 만들어 사용하였다. 먼저, 박절기로 trimming과 cutting을 하여 3 µm 두께의 외과병리 표본을 만들어서 슬라이드 위에 일반염색(Hematoxylin, 영동제약, 서울)을 시행하고 추가 박절하여 대표적인 유방암 단백질 발현인자인 C-erbB-2(Novocastra, Leica Microsystems, Biosystem Division, Seoul, Korea) 면역염색을 하였으며 끝으로 grade가 2+ 이상 나온 검체(DPSMC, 2010)에 한하여 Her-2 FISH(Vysis, Abbott Laboratories, Illinois, USA) 검사를 시행하였다.

2. 검사 방법

1) 검체 채취

수술실에서 절제한 MRM 조직을 육안검색 하여 림프절 등을 분리하고 종괴를 1 cm 미만으로 절편하여 포르말린으로 고정하고 자동침투기에 하룻밤 처리하여 파라핀으로 포매한 블록을 슬라이드로 제작하였다. 제작된 슬라이드는 일반염색을 거친 다음 현미경으로 종양유무를 확인하고, 필요에 따라서 면역염색 및 FISH 검사를 시행하였으며 판독이 어려운 불량 검체는 재염색을 실시하였다. 최종 판독이 끝난 블록과 슬라이드는 정리하고 결과를 전산에 기록하였다. 해당 기간의 MRM 파라핀 블록과 재염색이 시행된 면역검사, FISH 검사 데이터를 후향적으로 살펴보아 통계처리를 하였다. 고정 불량에 대한 발생 원인을 브레인스토밍(brainstorming)을 통하여 목록을 작성하였으며, 의견수 중에서 다수를 차지하는 발생원인 목록을 작성하였다(Fig. 1).

2) 검체 처리 방법의 개선을 위한 질 향상 활동

검체 처리과정에서의 불량의 원인으로 가장 많은 의견이 모아진 세가지 원인에 대하여 Fig. 2에서 보는 바와 같이 세 가지 단계로 질 향상 활동을 실시하였다. 즉, 1차 질 향상 활동을 2009년 7월부터 9월까지 실시하여 육안



Fig. 1. List of cause and elimination method in breast tissue preparation problem.

검색 시 발생할 수 있는 불량 원인들을 고정하였다. 먼저, 육안검사 전에 걸리는 시간을 임상 각과와 긴밀한 연락을 통해 신속하고 적극적인 접수로 조직의 괴사 및 변성 등을 줄였다. 또한, 고정에 방해가 되는 두껍고 사이즈가 크거나 지방조직이 많은 검체들은 얇고 사이즈가 작으며 지방조직을 최대한 제거한 상태로 블록 제작을 하였다.

2차 질 향상 활동은 2009년 10월부터 12월까지 실시하여 고정용기 및 고정방식을 개선하였는데, 기존에 육안검색을 시행한 여러 증례의 블록 제작 카세트를 하나의 좁은 통에 담아 단체로 고정하던 방식에서 고정용기를 개별화함으로써 개별고정을 실시하였고, 고정액의 제조와

교체 또한, 기존 2~3일의 주기를 매일 제조하고 교체하는 방식으로 변경하였다. 추가로 고정용기를 2~3시간 간격으로 일정하게 흔들어 주어 고정액이 잘 섞이도록 하였다.

마지막으로, 3차 질 향상 활동은 2010년 1월부터 3월까지 실시하였고 tray 및 자동침투와 관련된 부분을 개선을 하였는데, 검체를 고정용기에서 꺼내 침투기에 장착하기 전까지 이동 및 보관되는 tray를 스프링 모양으로 변형시켜 각 카세트 간 여유 공간을 확보하여 더욱 고정 및 시약 침투가 잘 이루어지게 하였으며 노후 된 자동침투기도 신규장비로 교체하였다.

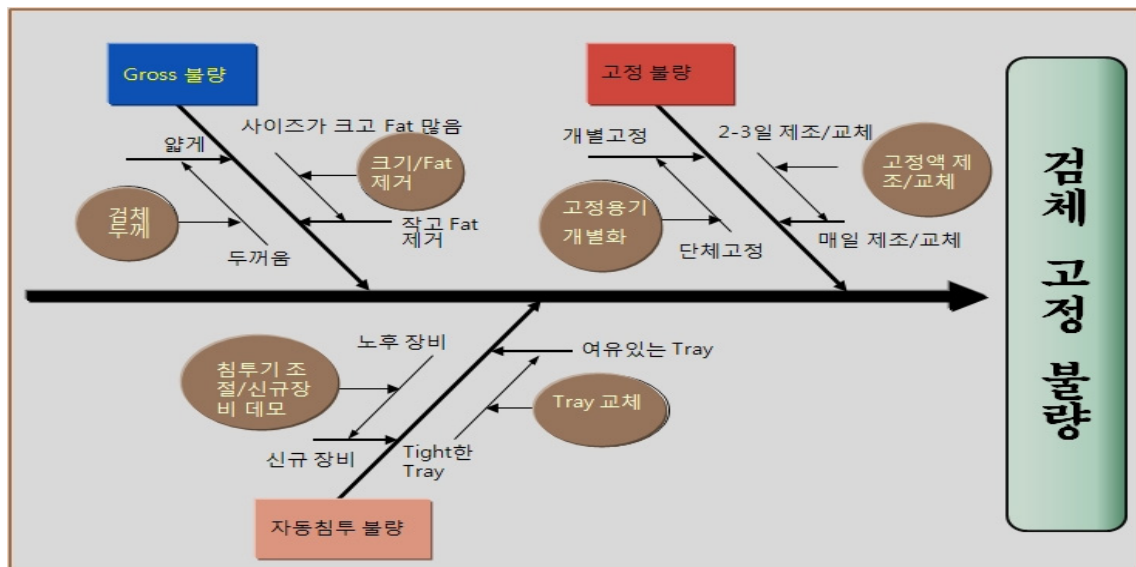


Fig. 2. Fish-bone chart for the quality improvement of breast tissue fixation

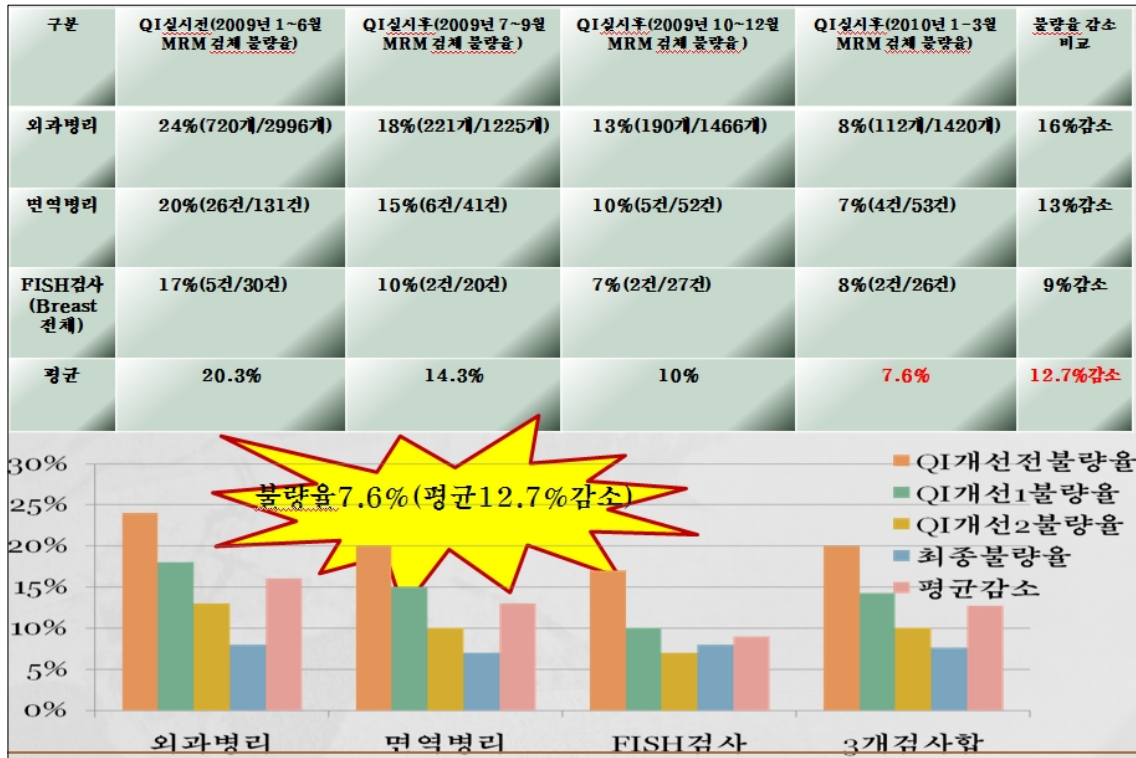


Fig. 3. The quality improvement movements in breast tissue fixation process at various histological test categories.

3) 검체 고정 불량률 측정 방법

불량률은 외과병리검사, 면역병리검사, FISH검사 불량률로 나누어 조사하였고, 질 향상 활동 시행 전인 2009년 1월에서 6월까지의 불량률을 기준으로 하여, 질 향상 활동 시행 후인 1차 QI(2009년 7월부터 9월까지), 2차 QI(2009년 10월부터 12월까지), 3차 QI(2010년 1월부터 3월까지)의 불량률을 각각 측정 비교하였다. 여기서, 불량률은 전체 대상 블록 중에서 고정 불량으로 블록이 현저하게 함몰되거나 수축, 경화된 블록의 재검사를 실시한 블록 비율을 의미한다.

외과병리검사 및 면역조직화학검사는 재염색이 실시된 모든 MRM 증례에 대해 조사하여 불량률로 기록하였는데, FISH 검사의 경우는 2009년 MRM 총건수가 14건에 불과하여 FISH 검사를 시행한 모든 유방 검체 전체를 대상으로 불량률을 조사하였다. 각 기간별 외과병리검사, 면역조직화학검사(C-erbB-2), FISH검사(Her-2) 불량률을 각각 계산하였다.

4) 통계처리

통계처리는 Microsoft Excel Version 2007(Microsoft, Redmond, WA)과 R Project Program Version 2.12.0(www.R-project.org)을 이용하여 QI 실시 전후 비교와 각 기간별 비교를 하였다.

III. 결 과

Fig. 3에서 보는 바와 같이 질 향상 활동 실시 전의 불량률은 외과병리 24%(720/2996건), 면역병리 20%(26/131건), FISH 17%(5/30건)인데 반하여, 1차 질 향상 활동 실시 후 외과병리 18%(221/1225건), 면역병리 15%(6/41건), FISH 10%(2/20건)로 감소되었다. 2차 질 향상 활동 실시 후는 외과병리 13%(190/1466건), 면역병리 10%(5/52건), FISH 10%(2/27건)로 감소되었고, 3차 질 향상 활동 실시 후도 외과병리 8%(112/1420건), 면역병리 7%(4/53건), FISH 8%(2/26건)로 감소하였다. 따라서 질 향상 활동 시

Table 1. Effects of quality improvement process in histological fixation process of modified radical mastectomy tissue

Steps	Periods	No. of cases	Rates of unsatisfactory (%)		p-values
			Before QI	After QI	
Controls	JAN 2009 ~ JUN 2009	3,157	23.8	-	
1st QI	JUL 2009 ~ SEP 2009	1,286	23.8	17.8	<0.0001
2nd QI	OCT 2009 ~ DEC 2009	1,545	17.8	12.8	0.0001
3rd QI	JAN 2010 ~ MAR 2010	1,499	12.8	7.9	<0.0001
Total	JAN 2009 ~ MAR 2010	Mean	23.8	12.6	<0.0001

행 전인 2009년 1-6월 대비, 질 향상 활동 마감인 2010년 3월까지 각각 9-16% 평균 12.6%의 불량률 감소의 효과를 보았으며, 개선 활동을 시행한 후 외과병리검사, 면역조직화학검사, FISH검사의 불량률은 모두 10% 이내로 감소하였다($p < 0.05$).

질 향상 활동(2009년 1월부터 2010년 3월까지) 실시 전후를 전체적으로 비교하면 질 향상 활동 전의 불량률이 23.8%이며 각 단계의 불량률 평균이 12.6%로 질 향상 활동 실시 후 불량률이 실시 전보다 유의하게 낮아졌다($p < 0.001$, Table 1). 질 향상 활동 단계별로 구분한 통계의 결과 또한, 실시 전보다 실시 후 불량률이 낮아졌으며, 기간별 불량률도 점차 개선되었다($p < 0.001$, Table 1).

IV. 고 찰

질 향상 활동 실시 전인 2009년 1-6월까지의 유방 MRM 검체의 불량률 파악을 위하여 전산 통계와 파라핀 블록 및 슬라이드를 직접 대조 확인하면서 관련 자료를 수집하여 측정된 결과 외과병리, 면역병리, FISH검사 각각 24%, 20%, 17%라는 적잖은 불량률이 확인되었다(Fig. 3).

1차 질 향상 활동에서 육안검사 시 두꺼운 검체 때문에 고정액의 침투가 잘 이루어지지 않아서 고정 불량 검체가 발생할 수 있는 것을 관련 직원들에게 적극적으로 교육하고 홍보하여 얇은 두께와 작은 크기로 그리고, 지방조직을 최대한 제거하여 제작하도록 하였다. 또한, 수술 후 검체에 대한 표본을 신속한 확인 및 적극적인 처방요구로 접수가 이루어져 검체 적출 후 육안검색 시 걸리는

시간을 줄일 수 있어 개선 전과 비교하여 각각 5~7%, 평균 6%의 불량률을 감소시킬 수 있었다(Fig 3). 이는 접수와 동결절편으로 제작되는 검체 그리고, 접수 후 육안검색 등으로 이어지는 검체 제작 등에 이르기 까지 매 과정마다 불량을 일으키는 소지가 발생할 수 있으므로 숙련된 기술과 아울러 기본적인 정도관리를 위한 자세와 홍보가 절실하였다.

2차 질 향상 활동 활동에서는 고정용기가 대용량으로써 한꺼번에 모든 블록들이 단체 고정으로 실시됨에 따른 고정액 침투의 불량에서 착안하여, 고정용기를 개별화하고 하나의 검체가 하나의 용기 속에 고정이 되도록 개별 고정시켜서 충분한 고정 공간을 확보하였다. 또한, 2-3일에 한 번씩 제조하여 사용하는 고정액은 3일째 교체하여도 변질되거나 고정의 약화로 이어질 수 있기 때문에 고정액을 매일 제조하고 고정용기의 고정액도 하루 1회 이상 교체함을 원칙으로 하여 고정액의 회전율을 높였다. 사실, 포르말린을 사용하는데 있어서 인체에 해로운 물질이며 효소 단백질의 용해나 항원이 열에 약하다는 등의 불안전함에도 불구하고 많은 장점으로 인하여 표준 고정액으로 사용하고 있다(Cattoretto 등, 1993). 따라서 기존에 고정용기를 부유 온수조에 넣고 일정하게 가열하는 방식 등과 몇 가지 다른 고정액들의 비교 실험은 효과를 보지 못했으며, 오히려 관리자의 건강에도 좋지 않다는 판단을 하였기에 실온에서도 일정한 관리와 주기적인 혼합을 통하여 고정 효율도 높이고 관리자의 안전에도 도움을 주도록 하였다. 그 결과 1차 질 향상 활동에 비하여 각각 3-5%, 평균 4%의 불량률 감소효과를 얻었다. 이는 신속한 접수와 표본제작 시 주의가 이루어 졌다 하더라도, 고정액과 고정용기 관리가 좋지 않다면 검체의 고정 불량

으로 이어지기 때문에 신선한 고정액의 제조와 교체가 매우 중요하다고 할 수 있겠다. 다만, 개별방식 교체로 인한 관리자의 피로도와 안전에도 각별한 관심과 교육이 필요하였다.

3차 질 향상 활동에서는 고정액 침투용 검체 tray의 종류와 선택도 고정 불량에 영향을 주기 때문에, 여러 가지 tray를 테스트 하여 고정액 침투에 가장 우수한 tray를 개량하거나 확보하였다. 이는 tray 배열의 간격이 여유 있도록 사용하고 여분이 없다면 배열의 순서라도 재배치하여 최선의 효과를 얻도록 하였다. 노후 된 자동침투기의 경우도, 적절한 신규장비로 교체가 중요하며 침투기의 프로그램도 시약 침투시간을 충분히 배정하는 것이 훨씬 효과적이다. 2차 정도관리 대비 각각 -1%에서 5%, 평균 2%의 불량을 감소로 이어졌다.

이번 질 향상 활동으로 개선 실시 후 고정 및 처리방법이 개선됨에 따라서 양질의 블록을 제작하여 외과병리검사, 면역조직화학검사, FISH검사 등의 질 향상을 이룰 수 있었다. 특히, 면역조직화학검사나 Her-2 FISH검사를 불량률 지표 염색으로 선택한 이유는 유방암 예후 예측인자 및 치료반응 예측인자의 발현을 검사하는데 가장 보편화된 검사이기 때문이다(Manfred, 1999). 따라서 불량률 감소로 인한 효과는 환자의 치료계획 및 예후판단에 대한 신속한 진단을 가능케 하였다는 점과 다른 검체와도 연계하여, 정도관리를 확대 실시하면 재염색 및 추가 표본제작의 감소 등, 업무의 효율화를 이룰 수 있다는 점이다.

특히, 불량률 감소로 오는 제비용의 절감은 적잖은 낭비 요소를 줄일 수 있으며 이것은 궁극적으로 검사실 운영에도 효과적이다. 질 향상 활동을 위한 육안검색 및 표본제작 관리와 고정액 및 고정방법의 개선 그리고, 자동침투 기기의 효율적인 운영 등은 일반적으로 이미 알고 있는 내용들이지만, 쉽게 지나칠 수 있는 업무이기도 하다. 따라서 검체 처리와 고정과정의 지침 등을 마련하여 충분히 숙지 할 수 있도록 지속적인 관심과 교육이 요구된다.

참 고 문 헌

1. Beenken SW, Grizzle WE, Crowe DR, Conner MG, Weiss HL, Sellers MT, Krontiras H, Urist MM, Bland KI. Molecular biomarkers for breast cancer prognosis: coexpression of c-erbB-2 and p53. *Ann Surg* 233:630-638, 2001.
2. Cattoretti G, Pileri S, Parravicini C, Becker MH, Poggi S, Bifulco C, Key G, D'Amato L, Sabattini E, Feudale E, et al. Antigen unmasking on formalin-fixed, paraffin-embedded tissue sections. *J Pathol* 171:83-98, 1993.
3. DPSMC (Department of Pathology Samsung Medical Center). Manual for Residents. Samsung Medical Center, Seoul, 2010.
4. Manfred K. c-erbB-2 in breast cancer Therapeutic advances in oncology, European Cancer Conference 1999.
5. 김경덕. 인체 조직의 면역조직화학 염색에서 고정방법의 연구. 아주대학교 산업대학원 석사학위논문, 2002.
6. 김병년, 박호용, 이영하, 박지영, 손운경. 유방암 환자에서 면역조직화학염색을 이용한 c-erbB2 단백질 발현의 연구. *대한외과학회지* 62:456-462, 2002a
7. 김형진, 박우찬, 박경신, 정상설. 유방암에서 동결절편 조직검사의 유용성. *대한외과학회지* 63:445-448, 2002b
8. 병리사랑분임조. 병리고정방법 개선으로 검사품질향상. 한국표준협회. 2006.
9. 전국임상병리교수협의회. 조직검사실습(Practice Histotechnology). 고려의학. 서울, 2009.
10. 한국유방암학회. 유방학. 일조각. 서울, 2005.