

# 세포 검사시료에서 alkaline phosphatase 염색법을 활용한 개 골육종의 감별 진단

박병용 · 박 철 · 조호성<sup>1\*</sup>

전북대학교 수의과대학 및 생체안전성연구소, <sup>1</sup>전북대학교 수의과대학 및 동물질병진단센터

(접수 2011. 11. 16; 수정 2011. 11. 28; 게재승인 2011. 11. 30)

## Application of alkaline phosphatase staining of cytology specimen for differential diagnosis of canine osteosarcoma

Byoung-Yong Park, Chul Park, Ho-Seong Cho<sup>1\*</sup>

College of Veterinary Medicine and Bio-Safety Research Institute, Chonbuk National University, Jeonju 561-756, Korea

<sup>1</sup>College of Veterinary Medicine and Veterinary Diagnostic Center, Chonbuk National University, Jeonju 561-756, Korea

(Received 16 November 2011; revised 28 November 2011; accepted 30 November 2011)

### Abstract

Aspiration of lytic bone lesions is an excellent diagnostic test in the initial evaluation of primary bone tumor. However, cytologically, it can be difficult to differentiate osteosarcoma (OSA) from other bone neoplasms, including fibrosarcoma, chondrosarcoma, synovial cell sarcoma, malignant fibrous histiocytoma and malignant peripheral nerve sheath tumor. The purpose of this study is to introduce alkaline phosphatase (ALP) staining to differentiate OSA from other mesenchymal tumors. Tumors actively producing bone are specifically positive for ALP staining. Unstained, cytologic specimens were incubated for 10 minutes with nitroblue tetrazolium chloride/5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate toluidine salt-phosphatase substrate. Among 20 cases of cytology specimen, 14 were positive for ALP staining and histopathology, 6 were negative for ALP staining and histopathology. ALP staining was 100% sensitive and specificity for the diagnosis of OSA. Aspirate cytology with ALP staining was a simple, fast, safe and accurate diagnostic test for the evaluation of suspected OSA lesions in dogs.

**Key words** : Alkaline phosphatase, Bone, Cytology, Osteosarcoma

### 서 론

개의 골육종(Osteosarcoma)은 뼈에서 발생하는 가장 흔한 종양(뼈의 원발성 종양의 85%)으로 간엽조직 유래의 악성 종양세포가 풋뼈(osteoid) 또는 뼈를 생산하는 원발성 종양이다(Bleier 등, 2003; Phillips 등, 1986). 일반적으로 골육종은 빠른 성장을 보이기 때문에 치료가 어렵고 예후도 좋지 않다. 또한, 임상적으로는 심한 통증과 함께 뼈 주위 연부조직의 심한

종창을 동반한다. 개에서 골육종의 평균 발생 연령은 7세 전후이지만 18~24개월의 어린 연령에서도 발생하는 것으로 알려졌다(Brodey와 Riser, 1969; Misdrop와 Hart, 1979; Phillips 등, 1986; Spodnick 등, 1992). 성숙한 수컷과 대형견 중에서 호발하며 발생이 비교적 흔한 품종으로는 Saint Bernard, Great Dane, boxer, German shepherd, Irish setter 등이 있다(Brodey와 Riser, 1969; Misdrop와 Hart, 1979). 개 골육종의 경우 팔다리뼈가 몸통 뼈대보다 3~4배 정도 더 많이 발생하고, 앞다리와 뒷다리의 발생 비율은 약 2:1이다(Bleier 등, 2003; Brodey와 Riser, 1969). 호발부위는

\*Corresponding author: Ho-Seong Cho, Tel. +82-63-270-4872,  
Fax. +82-63-270-3780, E-mail. hscho@jbnu.ac.kr

장골의 뼈 몸통 끝 부위로 장골에서 유래한 골육종의 경우 75%가 폐로 전이되는 것으로 보고되었다(Jubb 등, 1999).

개 골육종의 표준진단법으로는 종양의 생검 조직에서 병리조직검사를 하는 것이다(Demell 등, 2001). 그러나 골생검은 침습적 방법으로 진단 시 탈회 과정을 거쳐야 하므로 진단 시간이 길어지는 단점이 있을 뿐 아니라 생검 부위에서의 병적 골절이 일어날 위험성이 커지는 문제가 있다. 이런 이유로 현재는 lytic bone lesion에서의 세침 흡인법을 널리 이용하고 있다(Agarwal 등, 2000; Fröstad 등, 2002; Ward와 Kilpatrick, 2000). 개의 골종양 진단에 있어 세포검사와 세침흡인 검사법 진단의 정확도는 병리조직 검사와 비교할 때 69%에서 92%라고 보고하고 있다(Berzina 등, 2008; Loukopoulos 등, 2005). 이처럼 진단 정확도가 다양한 것은 세포검사 소견상 골육종은 연골육종, 활막세포육종 및 섬유육종과 유사하게 보일 수 있기 때문이다(Mahaffey, 1999). 따라서 이를 보완하는 방법으로 alkaline phosphatase (ALP) 염색법을 이용한 진단방법을 제안한 바 있다(Barger 등, 2005).

ALP는 유기인 화합물의 탈인 작용을 촉매하는 효소로서 골질환 환자의 골 조직 및 혈청에서 이 효소 활성도가 변화되며 이를 골질환의 표지자로 사람에게서 이용되어 왔다(이 등, 2001). 수의학 분야에서는 주로 병원체나 종양을 진단하기 위한 면역조직화학 염색 시나 단백질을 분석하는 western blotting 시에 표지물질로 주로 사용하는 효소로 Nitroblue tetrazolium chloride/5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate tol-

uidine salt (NBT/BCIP) 같은 발색제와 반응시 보라색의 발색반응이 나타나며 그 원리는 Fig. 1과 같다(Barger 등, 2005).

따라서 이번 논문에서는 소동물 임상에서 자주 만나게 되는 골육종 의심 증례를 대상으로 활용할 수 있는 간편한 ALP 진단 방법을 소개하고 이를 활용한 진단적 의의를 평가하고자 하였다.

## 증 례

임상적으로 뼈 주변에 종양이 발생하여 감별진단이 필요한 20마리 개의 세포학 검사 시료 20예를 대상으로 하였다. 세포 검사 시료는 세침흡인법으로 채취한 후 각 시료당 2장의 도말슬라이드를 만들고 하나는 Wright's Giemsa 염색을 통해 통상적인 세포학적 진단 검사에 이용하였다. 다른 한 장은 Barger 등(2005)의 방법을 일부 변형하여 ALP 염색을 수행하였는데 도말슬라이드를 Diff-Quik solution (Sysmex Co., Japan)의 1번 용액에서 고정한 후 NBT/BCIP (Millipore, USA) 용액을 슬라이드 뒤에 300 µl 도포하여 10분간 반응시켰다. 이후 증류수에 세척한 다음 Diff-Quik solution의 3번 용액으로 대조염색하여 검경하였다. 양성 대조 슬라이드는 개 신장의 압날 도말슬라이드를 이용하였고 슬라이드 내의 배경과 백혈구, 적혈구 등을 내부 음성 대조군으로 이용하여 비교하였다. 시료 내의 종양세포가 진한 보라색의 양성 반응을 75% 이상 보이는 경우를 양성으로, 색의 변

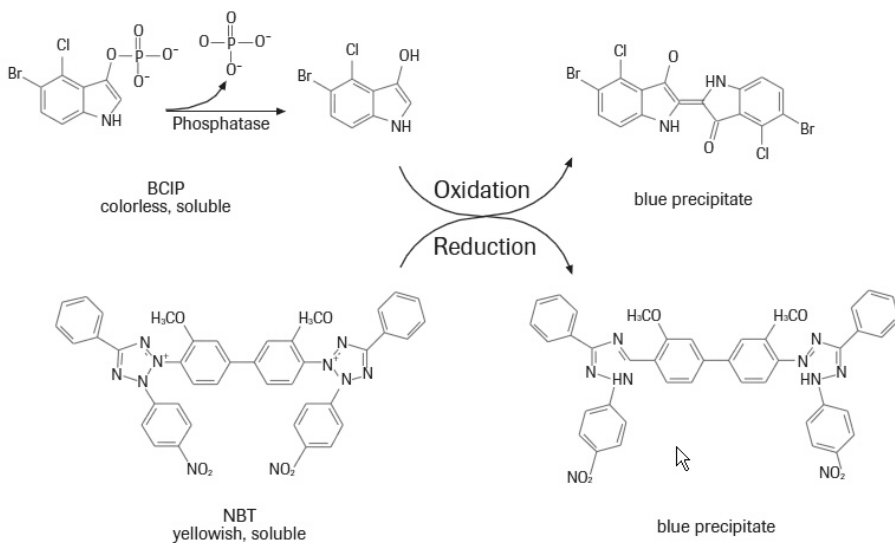


Fig. 1. Reaction scheme of the dye (Nitroblue tetrazolium chloride/5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate toluuidine salt)-generating redox reaction.

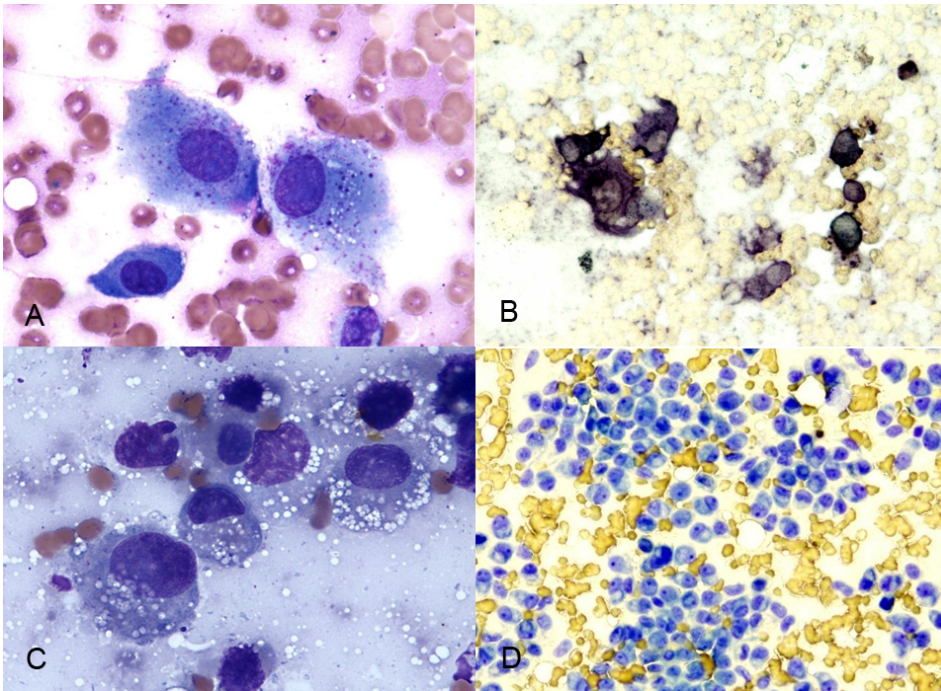


Fig. 2. Alkaline phosphatase (ALP) staining findings of Bone aspirate of osteosarcoma (case no. 1) and malignant fibrous histiocytoma (case no. 2). Wright-Giemsa staining of neoplastic osteoblasts (A). ALP staining of neoplastic osteoblasts. Black granular material within cytoplasm indicates ALP activity (B). Wright-Giemsa staining of neoplastic cells from bone aspirate (C). ALP stain. Sample is negative (D).

화가 나타나지 않은 경우를 음성으로 판정하였다.

모든 증례는 확진을 위해 병리조직검사를 수행하였다(Cavalcanti 등, 2004). 생검 또는 외과적 절제물 얻은 시료를 10% 중성포르말린에 고정하고 5% nitric acid에서 탈회하였다. 통상적인 조직처리 과정을 거쳐 5 µm 두께로 절편을 만들고 hematoxylin and eosin (H&E) 염색을 한 다음 검경하였다. 또한, ALP 염색의 민감도와 특이도는 병리조직검사 확진 소견과 비교하여 평가하였다(Shin 등, 2007).

병리조직검사 결과 전체 20증례 중 14예는 골육종으로 진단되었으며 6예는 각각 다른 종양으로 진단되었는 바 3예는 섬유육종(fibrosarcoma), 2예는 악성 섬유 조직구종(Malignant fibrous histiocytoma, MFH), 1예는 악성 말포신경초종(malignant peripheral nerve sheath tumor)으로 진단되었다.

세포진단검사 소견상 20증례 모두 간엽유래 종양인 spindle cell tumor의 형태로 감별진단이 필요하였다. 특히 병리조직검사상 골육종으로 진단된 증례 1 (6세, 암컷, 라브라도리트리버)의 경우 세포 진단 검사상 Wright's Giemsa 염색에서 골모세포(osteoblast)가 관찰(Fig. 2A)되었고 ALP 염색 결과 세포질 내에서 보라색의 양성반응을 확인할 수 있었다(Fig. 2B). 이와 달리 악성 섬유 조직구종으로 진단된 증례 2 (6세, 암컷, 그레이드덴)는 세포 진단 검사 소견상 골육종의 감별이 필요하였고(Fig. 2C) ALP 염색 결과 음

Table 1. Sensitivity and specificity of ALP staining of canine osteosarcoma and non-canine osteosarcoma

ALP staining	Tumor type	
	OSA	Non-OSA
Positive	14	0
Negative	0	6

Relative sensitivity: 14/14=100%. Relative specificity: 6/6=100%.

성을 확인(Fig. 2D)하였으며 다른 표지 인자에 대한 추가 면역 세포 검사와 병리조직 검사를 통해 확진할 수 있었다(자료 제시 없음). 병리조직 검사의 확진 소견을 근거로 한 ALP 염색에 대한 민감도와 특이도는 모두 100%로 매우 정확한 진단임을 확인하였다 (Table 1).

## 고 찰

이번 연구에서는 국내 소동물 임상에서 빈번하게 진단되는 개의 골육종을 세포학 검사 단계에서 간단한 ALP 염색을 통해 효과적으로 진단할 수 있는 방법을 소개하였다. ALP는 조골세포에서 분비되는 골형성의 표지자로 가장 보편적으로 사람과 동물에서 혈액 검사 항목으로서 뼈의 질병을 진단하는데 이용하고 있다(Mahaffey, 1999). 그러나 ALP는 뼈 외에도

간, 신장, 태반 등에 다양한 isotype이 있어서 이곳에서 생성된 50% 이상의 효소들 때문에 혈액 검사상 뼈의 진단 검사 항목이 되기에는 민감도와 특이도가 다소 낮은 것으로 알려져 있다(Mahaffey와 Lago, 1991).

개에서 골 및 골 주변에서 발생한 종양 시료에서 세포학적 검사를 수행할 때에 간엽계 유래의 spindle cell tumor로 확인되는 경우에는 추가로 골육종(osteosarcoma), 활막육종(synovial sarcoma), 섬유육종(fibrosarcoma), 악성 섬유 조직구종(Malignant fibrous histiocytoma, MFH), 그리고 악성 말포신경초종(malignant peripheral nerve sheath tumor) 등과 감별해야 한다. 이들은 모두 세포학적 소견이 유사하여 진단에 어려움을 겪는 경우가 많다.

이번 연구 결과와 같이 20증례 가운데 병리조직검사 소견상 골육종으로 진단된 14증례에서 모두 ALP 양성이었으며 그 외 다른 종양으로 진단된 6증례 모두 ALP 음성 소견을 보여서 골육종이 의심되는 상황에서 생검 시료에 대한 세포학적 검사를 수행할 때 추가로 사용하면 진단의 정확성을 높일 수 있음을 알 수 있었다. 또한, 이 결과는 골육종의 세침 흡인법을 통한 세포학적 진단의 정확도는 85%인 것으로 보고된 결과에 비추어 볼 때 ALP 염색이 이 부분을 보완하여 진단의 민감도와 특이도를 100%까지 끌어 올릴 수 있는 장점이 있음을 확인하였다.

일부 연구에서는 개 연골육종의 경우 때때로 ALP 양성 소견을 보여 진단에 어려움을 준다고 하였고 추가적인 면역 염색을 통해 감별할 수 있다고 하였으나(Barger 등, 2005) 이번 증례들에서는 연골육종 증례가 없어서 확인할 수 없었다.

또한, 일반적인 종양 진단에서와 같이 골육종의 진단에 있어 ALP 염색법은 부가적인 검사법으로만 사용되어야 한다. 발생연령, 발생부위, 품종, 임상 증상 및 영상진단학적 소견 등 골육종이 의심되고 세포학적 검사 소견상 골육종을 포함한 다른 종양들을 감별 진단 해야 할 필요가 있는 상황에서만 적용되어야 진단의 정확성을 높일 수 있다.

한편, ALP 염색은 재료 및 방법에서 언급한 바와 같이 검사 방법이 매우 간단하다는 장점이 있다. 주로 면역 조직화학 염색에서 발색제로 사용되는 NBT/BCIP를 이용할 수 있다. 또한, 고정과 대조염색 모두 거의 모든 진단 실험실에서 사용하는 Diff-Quik 염색 시약을 그대로 사용할 수 있어서 본 염색을 추가로 도입하기 위해 별도의 장비나 시약이 요구되지 않는다.

다. 따라서 일선 동물병원에서도 기존의 진단 방법과 연계하여 간단하게 도입할 수 있는 검사가 될 것이다.

## 결 론

국내 소동물의 수의임상에서 빈번하게 접하게 되는 개 골육종 진단 시에 세포학적 검사에 부가적으로 시행할 수 있는 간단하고 신속한 ALP 염색법을 적용하였다. 그 결과 매우 높은 민감도와 특이도로 골육종과 다른 간엽 유래의 종양을 감별 진단할 수 있음을 확인하였다. 이러한 ALP 염색법을 일선 동물병원에서도 적용한다면 별도의 장비나 추가 시약의 구매 없이도 효과적으로 개의 골육종을 진단할 수 있을 것으로 판단된다.

## 참 고 문 헌

- 이창우, 조우진, 조재림, 김태승, 황진성. 2001. 골육종의 생화학적 표지자에 관한 연구. 대한골관절종양학회지 7: 41-50.
- Agarwal S, Agarwal T, Agarwal R, Agarwal PK, Jain UK. 2000. Fine needle aspiration of bone tumors. *Cancer Detect Prev* 24: 602-609.
- Barger A, Graca R, Bailey K, Messick J, de Lorimier LP, Fan T, Hoffmann W. 2005. Use of alkaline phosphatase staining to differentiate canine osteosarcoma from other vimentin-positive tumors. *Vet Pathol* 42: 161-165.
- Berzina I, Sharkey LC, Matise I, Kramek B. 2008. Correlation between cytologic and histopathologic diagnoses of bone lesions in dogs: a study of the diagnostic accuracy of bone cytology. *Vet Clin Pathol* 37: 332-338.
- Bleier T, Lewitschek HP, Reinacher M. 2003. Canine osteosarcoma of the penile bone. *J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med* 50: 397-398.
- Brodey RS, Riser WH. 1969. Canine osteosarcoma. A clinicopathologic study of 194 cases. *Clin Orthop Relat Res* 62: 54-64.
- Cavalcanti JN, Amstalden EMI, Guerra JL, Magna LC. 2004. Osteosarcoma in dogs: clinical-morphological study and prognostic correlation. *Brazil J Vet Res Anim Sci* 41: 299-305.
- Demell WS, Straw RC, Withrow SJ. 2001. Tumors of the skeletal system. pp. 378-417. In: Withrow SJ, MacEwen EG(ed.). *Small animal clinical oncology*. 3rd ed. WB Saunders, Philadelphia.
- Fröstad B, Tani E, Brosjö O, Skoog L, Kogner P. 2002. Fine nee-

- dle aspiration cytology in the diagnosis and management of children and adolescents with Ewing sarcoma and peripheral primitive neuroectodermal tumor. *Med Pediatr Oncol* 38: 33-40.
- Jubb KVF, Kennedy PK, Palmer N. 1999. Pathology of domestic animals. 4th ed. pp. 133-135. Academic press, San Diego.
- Loukopoulos P, Rozmanec M, Sutton RH. 2005. Cytological versus histopathological diagnosis in canine osteosarcoma. *Vet Rec* 157: 784.
- Mahaffey EA. 1999. Cytology of the musculoskeletal system. pp. 120-124. In: Cowell RL, Tyler RD, Meinkoth JH. *Diagnostic cytology and hematology of the dog and cat*. 2nd ed. Mosby, St. Louis, MO.
- Mahaffey EA, Lago MP. 1991. Comparison of techniques for quantifying alkaline phosphatase isoenzymes in canine serum. *Vet Clin Pathol* 20: 51-55.
- Misdrop W, Hart AA. 1979. Some prognostic and epidemiological factors in canine osteosarcoma. *J Natl Cancer Inst* 62: 537-545.
- Phillips L, Hager D, Parker R, Yanik D. 1986. Osteosarcoma with a pathologic fracture in a six month-old dog. *Vet Radiol* 27: 18-19.
- Shin JB, Park NY, Kim YH, Cho HS. 2007. Dual priming oligonucleotide system for the multiplex detection of tuberculosis in Hanwoo. *Kor J Vet Serv* 30: 527-532.
- Spodnick GJ, Berg J, Rand WM, Schelling SH, Couto G, Harvey HJ, Henderson RA, MacEwen G, Mauldin N, McCaw DL, Moore AS, Morrison W, Norris AM, O'Bradovich J, O'Keefe DA, Page R, Ruslander D, Klausner J, Straw R, Thompson JP, Withrow SJ. 1992. Prognosis for dogs with appendicular osteosarcoma treated by amputation alone: 162 cases (1978-1988). *J Am Vet Med Assoc* 200: 995-999.
- Ward WG Sr, Kilpatrick S. 2000. Fine needle aspiration of primary bone tumors. *Clin Orthop Relat Res* 373: 80-87.