

Roadmap to diagnosis

병리 진단 과정 및 결과 해석 – 면역조직화학염색을 중심으로

아주대학교 의과대학 병리학교실

한재호

**The Pathological Diagnosis and Interpretation of Pathological Results:
Emphasis on Immunohistochemical Staining**

Jae Ho Han

Department of Pathology, Ajou University School of Medicine, Suwon, Korea

Hematoxylin and eosin staining is simple and one of the most important techniques in pathological diagnosis. However, it cannot provide complete information about the disease of a patient. Immunohistochemical staining (IHC) is an important method for demonstrating the distribution of a certain molecule or antigen in tissues using specific antigen-antibody reactions. It is used in routine diagnostic work and research to explore biomarkers. In this review, I aim to provide an adequate interpretation of the results of IHC and pathological diagnosis for clinicians. (Korean J Med 2017;92:36-40)

Keywords: Pathological diagnosis; Immunohistochemical staining

서 론

환자의 생검 조직 및 수술 적출물 등의 조직을 검색하는 분야를 외과병리학이라 하고, 탈락세포 또는 세침흡인 세포로 세포 진단을 담당하는 분야를 세포병리학이라 한다[1,2]. 조직 진단에 이용되는 방법은 통상의 혜마톡실린-에오신 (hematoxylin-eosin, H/E) 염색이 기본이다. 그러나 이 염색으로 질병의 원인, 예후 판단 또는 양성 및 악성 종양의 구분이 어려운 경우가 있다. 이러한 단점을 해결하기 위해 조직화학법, 면역조직화학법, 제자리부하법 등이 흔히 사용되고, 필요에 따라 종합효소연쇄반응, 유전자염기서열 분석 등도 이용한다[3]. 면역조직화학염색은 항체가 특정 항원 물질에 결

합하는 성질을 이용하는 것으로, 조직, 세포에 항원의 존재 부위를 검출하는 방법이다. 항원-항체 반응물은 그대로 현미경으로 관찰할 수 없어서 표지자를 붙인 후 그 표지자를 발색시켜 볼 수 있다.

세포학적 검사의 종류는 검사물의 채취 방법에 따라 탈락 세포 검사와 세침흡인세포 검사(fine needle aspiration cytology, FNAC)가 있다[4]. 세포 진단에 이용되는 염색 방법은 일반 염색과 특수 염색으로 구분된다. 대부분의 탈락세포는 Papanicolaou (PAP) 염색이 기본이며 FNAC에서는 PAP 염색과 H/E 염색이 병용된다. FNAC는 채취된 세포들의 결합 구조가 관찰되어 생검 검사와 같은 진단 결과를 얻을 수 있다. 또한 도말 표본 이외에도 세포 군집절편(cell block section)이

Correspondence to Jae Ho Han, M.D., Ph.D.

Department of Pathology, Ajou University School of Medicine, 164 Worldcup-ro, Yeongtong-gu, Suwon 16499, Korea
Tel: +82-31-219-5932, Fax: +82-31-219-5934, E-mail: hanpathol@naver.com

Copyright © 2017 The Korean Association of Internal Medicine

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>) which permits unrestricted noncommercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

진단에 이용된다. 본문에서는 진단을 위한 조직, 세포 처리 과정과 추가적으로 시행하는 면역조직화학 검사의 적용 및 결과 해석에 필요한 기본적인 지식을 기술한다.

조직 검체 처리 과정

일반적인 조직 표본의 제작은 검체의 고정, 육안 검색 후 병소 부위를 절취한 다음, 파라핀 블럭 제작을 위한 탈수, 투명, 침투, 포매 과정 후에 박절, 염색 과정으로 진행된다[3]. 이 중 임상 의사에게 가장 중요한 과정은 고정이며, 고정시 유의할 점을 기술하고자 한다. 점막으로 구성된 커다란 수술 검체는 코르크판에 잘 펴서 고정해야 하고 이외의 큰 검체(약 3 cm 이상)는 자른 후에 고정시켜야 한다. 위 과정이 곤란한 경우 고정액에 통째로 고정시키면 조직의 내부에는 변성이 일어나므로 즉시 병리검사실에 보내거나 냉장 보관해야 한다. 생검된 작은 조직은 고정액이 담긴 용기에 즉시 집어넣어서 병리검사실에 보내야 한다.

고정의 실제

일반 조직검사에서는 포르말린에 의한 담금 고정이 가장 많이 사용된다. 포르말린은 값이 싸고, 인체에 무해하고, 사용법이 간편하고 응용 범위가 넓고 일부 특수한 경우를 제외하고는 거의 대부분의 염색이 가능하다. 용기는 조직의 크기를 감안하여 충분히 여유있는 크기의 입구가 넓은 용기를 사용한다. 고정액의 양은 조직 부피의 10-30배 정도가 필요하다. 고정 시간은 고정액의 종류와 조직 크기에 따라 다른데 일반적으로 포르말린 고정의 경우 작은 생검 조직은 수 시간에서 12시간, 두께가 5 mm 초과되는 조직은 24시간 정도 고정한다. 대부분의 검체는 실온에서 고정하면 된다.

세포 검체 처리 과정

기관지, 방광, 담낭, 늑막강, 복막강, 뇌척수액에서 자연 탈락된 세포를 슬라이드 위에 도말시켜 고정 염색한 후 검경한다. 객담을 포함한 호흡기계 검체 등은 12-24시간, 체액은 24-48시간, 소변은 1-2시간 냉장 보관이 가능하다[4]. 세침흡인 검사 장기로는 갑상샘, 유방, 림프절 등이 있다. 이러한 장기에서 세침(fine needle = 22 gage 혹은 23 gage)을 부착한 주사기로 병소를 찔러 흡인하여 강제적 채취하고 슬라이드에 도말시켜 즉시 고정하고 염색 후 검경한다. 도말할 때 검

체가 얇게 펴지도록 하고, 도말의 빠른 고정이 중요한데 만약 도말 슬라이드가 고정 전에 공기 중에서 건조되면 세포는 심한 변성을 초래한다. 세포 검사에 흔히 사용되는 고정액은 ether ethanol, alcohol 고정액이 있고 가장 보편적으로 사용되는 고정액은 95% ethanol이다. 도말 표본에 사용하고 남은 검체는 버리지 말고 남은 침전물에 95% ethanol을 첨가하고 원심분리 후 침전물을 조직검사와 같이 파라핀 블록으로 제작하고 박절하여 슬라이드로 만든 것을 세포 군집 절편이라 한다. 파라핀 블록으로 보관되므로 재 염색 및 특수 염색이 필요시 언제나 가능하다.

면역조직(세포)화학염색의 실제 및 결과 해석

면역조직화학염색은 파라핀 블럭에 보관된 조직으로 시행할 수 있다. 그러나 매우 가는 조직은 박절시 조직의 소실이 심해 시행할 수 있는 항목이 제한적이다. 또한 세포 검체로 면역세포화학염색을 시행할 경우에는 염색하지 않은 여러분의 유리 슬라이드가 필요하므로 미리 검사실에 알려줘야 시행할 수 있으나 세포 군집절편 제작용 침전물을 검사실에 도말된 슬라이드와 함께 의뢰하면 필요한 경우 면역세포화학염색을 시행할 수 있다. 면역조직화학염색은 조직 또는 세포 검체에서 핵, 세포질 또는 세포막에 존재하는 단백질(항원)의 유무를 광학현미경으로 관찰하기 위해 관심 있는 항체를 조직 위에 반응시키는 원리를 이용한다.

항체의 종류

병리 진단에서 사용하는 항체의 대부분은 조직 특이 표지자를 염색하여 종양의 유형을 결정하는데 유용하고 종양의 예후 판정, 항암제 선택을 위하여 사용된다.

병리 진단과 항체

흔히 사용되는 항체는 조직의 종류와 세포기원에 따라 표 1과 같은 항목으로 분류할 수 있다[3].

중간세사는 정상 및 종양세포의 세포골격 성분이다[2]. 조직의 종류가 다르면 다른 중간세사를 발현한다. 그러므로 어떤 중간세사의 존재는 종양의 분류와 진단에 유용하게 사용된다. 중간세사는 케라틴(keratin), 비멘틴(vimentin), 데스민(desmin), 신경세사(neurofilament), 신경교원섬유산단백(glial fibrillary acidic protein)의 다섯 종류가 존재한다. 암종(carcinoma)은 사이토케라틴(cytokeratin)을 발현하고, 육종(sarcoma),

Table 1. Immunohistochemical staining according to the tissue and origin of the tumor

Lung	TTF-1	Colon	CEA CK20
Breast	Estrogen receptor Progesterone receptor Mammaglobin BRST-1	Myogenic tumor	Actin (pan) Smooth muscle actin (SMA) Desmin Myoglobin Myogenin
Liver	CAM5.2 (LMW Keratin) AFP Hep BS Ag	Melanoma	Vimentin S100 HMB-45 (melanosome) Melan-A (MART-1)
Ovary	PAX-8 Estrogen receptor Progesterone receptor	Seminoma	Vimentin PLAP Ferritin
Thyroid	Thyroglobulin Calcitonin (medullary) TTF-1	Vascular tumor	Factor VIII CD34 CD31
Prostate	PAP PSA Leu-7	Neuroendocrine tumor	Chromogranin Synaptophysin NSE CD56

TTF, thyroid transcription factor; CEA, carcinoembryonic antigen; CK, cytokeratin; CAM, mouse anti cytokeratin 8 & 18; LMW, low molecular weight; AFP, alpha fetoprotein; HMB, human melanoma black; MART, melanoma antigen recognized by T cell; PAX, paired box gene; PLAP, placental alkaline phosphatase; CD, cluster designation; PAP, prostatic acid phosphatase; PSA, prostate specific antigen; NSE, neuron specific enolase.

흑색종(melanoma), 정상피종(seminoma)은 비멘틴을, 신경종 양과 신경내분비종양은 신경세사를 발현한다. 케라틴은 모든 상피세포와 암종에 예민한 표지자이며 20개 이상의 아형이 존재한다. 크게 저분자량(low molecular weight)의 케라틴과 고분자량(high molecular weight)의 케라틴으로 분류된다. 저분자량의 케라틴 검출에 사용되는 단클론 항체로는 AE1, CAM5.2, 35betaH11 등이 있으며 유방암종이나 위장관암종 등에서 양성 반응을 보인다. 고분자량의 단클론 항체로는 AE3, 34betaE12가 있고 편평상피암종에서 양성 반응을 보인다. 간세포암종은 CAM5.2와 AE3에 양성이고 전이성 암종은 AE1에 양성을 보인다. CK7 (cytokeratin 7)과 CK20 (cytokeratin 20)은 암종의 기원을 결정하는데 중요하다. CK7은 폐, 유방, 자궁 및 난소에서 나타나고, CK20은 대장에서 나타난다. 방광의 이행세포암종과 점액성 난소종양은 보통 CK7과 CK20에 모두 양성이고, 신세포암종, 간세포암종, 전립선암종, 폐의 소세포암종, 대부분의 편평상피암종은 둘 다 음성이다. 일부 상피세포기원의 암종 진단을 위해 특이 종양 표

지자, 즉 전립샘의 경우 prostate specific antigen, 갑상샘은 thyroglobulin, 폐는 thyroid transcription factor, 유방의 경우 mammaglobin이 사용된다. 그러나 대부분의 종양은 특이 표지자를 가지고 있지 않아서 진단을 위한 항체패널이 필요하다(Fig. 1). 케라틴은 상피성 악성 종양에 매우 예민한 표지자이지만 윤활육종(synovial sarcoma), 흑색종, 신경아교종(glioma), 여러 방추세포육종에 이상 양성 반응을 보인다.

멜라닌세포는 S100 단백질에 양성을 보이지만 여러 암종이나 신경세포 또는 비신경세포에서도 양성 반응을 보일 수 있다. HMB45는 흑색종 진단에 가장 널리 사용된다. MART 또는 Melan-A는 대다수 흑색종 및 피부와 망막의 정상 멜라닌 세포에도 나타난다. 그러나 부신피질 종양 및 고환의 Sertoli cell tumor 또는 Leydig cell tumor에서도 양성 반응을 보인다.

비호지킨 림프종의 대부분은 CD45로 알려진 leukocyte common antigen에 양성이다. 림프계 세포는 세포의 종류, 성숙 단계에 따라 다른 항원을 표현하여 림프종 분류시 다양한 종류의 표지자를 이용한다. T세포 유래 림프종은 CD3, CD4,

CD5, CD8, CD43 등에 양성이고 B세포 유래 림프종은 CD19, CD20, CD79a 등에 양성이다.

환자 예후와 치료를 위한 흥체

많은 종양의 세포증식은 환자의 질병 결과와 밀접히 관련

되어 있다. 세포증식 표지자인 Ki-67 (MIB-1)은 대부분의 악성 종양에서 발현이 증가하고 이 증가가 종양의 공격성을 높이고 질환의 재발률과 전이율을 높인다. 종양 유전자 또는 세포성장 인자도 환자의 예후와 항암제 선택과 관련이 높다. 이 중 대표적인 것이 epidermal growth factor receptor이다. 이

Table 2. Method for immunohistochemical staining

Step	Protocol
Fixation	10% Neutral buffered formalin for 24 h at room temperature
Embedding and sectioning	Paraffin-embedding Mostly 4 µm
Deparaffinization and hydration	60°C hot plate
Antigen (or epitope) retrieval	Heat-induced epitope retrieval is most widely used
Blocking	Normal sera of the same species of the secondary antibody, or premixed Varies from 30 min to overnight, from 4°C to room temperature
Primary antibody	Antibody dilution in protein blocking solution or premixed Ab diluents Appropriate antibody selection and titration
Incubation	30-60 min at room temperature
Wash (TBS-T)	3 × 5 min
Secondary antibody	-
Incubation	30-60 min, room temperature
Wash	3 × 5 min, TBS-T
Add substrate	250 µL of 1% DAB, and 250 µL of 0.3% hydrogen peroxide in 5 mL of PBS, 1-3 min at room temperature
Wash	3 × 5 min, DW
Counterstain	Hematoxylin, 1 min

TBS-T, tris buffered saline-Tween 20; DAB, diaminobenzidine; PBS, phosphate-buffered saline; DW, deionized water.

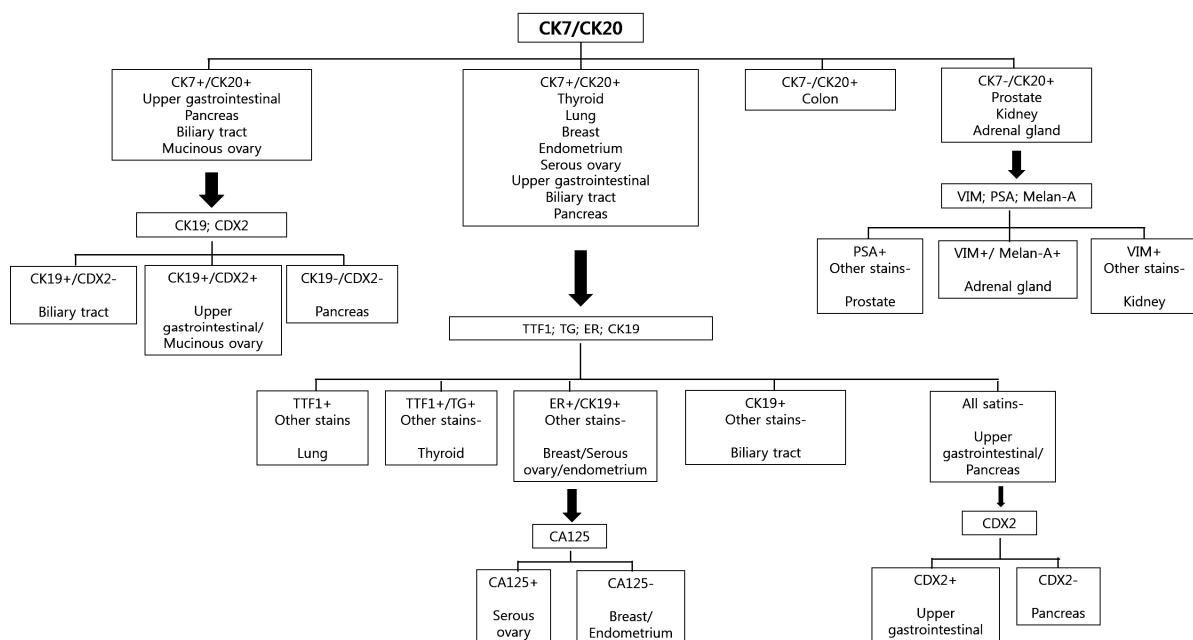


Figure 1. Diagnostic algorithm for a malignant tumor using an immunohistochemical staining panel. CK, cytokeratin; CDX, caudal-related homeobox transcription factor; TTF, thyroid transcription factor; TG, thyroglobulin; ER, estrogen receptor; CA, cancer antigen; VIM, vimentin; PSA, prostate-specific antigen.

에 해당하는 유전자는 ERBB1과 ERBB2 (HER2)이며 폐의 선암종과 유방암에서 돌연변이가 발생하면 면역조직화학염색으로 검출되고 특히 항암제를 선택하여 치료에 좋은 반응을 보인다[5].

면역조직화학염색 과정

염색 과정은 크게 조직의 고정 및 파라핀 블럭 제작, 절편 제작 및 탈파라핀, 항원성 부활, 내인성 활성 물질의 활성 억제, 일차 항체와의 반응, 이차 항체의 반응, 발색 과정으로 구분할 수 있다(Table 2) [6]. 그러나 최근 여러 회사에서 자동면역염색기가 시판되어 일차 항체와의 반응 과정부터 자동화되어 있다. 많은 양의 검체 처리가 가능하고 염색 시간과 시약의 절감 효과가 크고 재현성이 좋다. 또한 탈파라핀, 가열처리에 의한 항원성 부활 과정도 가능한 기종도 있다. 염색 과정 중 불량한 면역조직화학 슬라이드가 제작될 경우 각 과정마다 고려해야 할 점이 있으나 임상 의사에게 가장 중요한 점은 조직/세포 채취 후 적절한 검체 처리 과정이고 나머지는 병리과에서 해결해야 할 문제이므로 생략한다. 실제로 조직의 허혈이 발생하면 허혈 시간에 따라 estrogen receptor (ER), progesterone receptor (PR), HER2, Ki-67의 발현 차이가 발생한다[7].

결과의 정량화 및 데이터 분석

진단을 위한, 즉 종양세포의 기원을 위한 염색에서는 단순히 양성 또는 음성으로 표시한다. 대부분의 종양세포가 같은 항원을 가지고 있어 하나의 항체에 균일하게 양성으로 발현되면 결과 해석이 어렵지 않다. 그러나 그렇지 않은 경우 염색된 세포의 수 또는 강도로 표시한다. 세포의 수는 보통 백분율로 표시하며 가장 흔하게 사용되지만 항체의 종류에 따라 양성 세포의 강도가 달라지면 이것도 고려해야 한다. Combinative semiquantitative scoring은 가장 일반적으로 사용되는 방법으로 항체의 양적 및 질적 평가를 모두 포함하는 점수를 산출한다. 강도는 일반적으로 0에서 3까지 점수가 매겨지고 유방암의 ER과 PR 상태를 평가하는 Allred 점수는 가장 잘 알려진 방법이다[8]. 그러나 조합에 따라 많은 변형을 만들 수 있어 연구자 간에 다른 해석이 가능할 수 있는 단점이 있다. 점수화의 민감도와 재현성을 높이기 위해 평균 4-5점의 점수가 권장된다[9]. 면역조직화학염색 결과를 정량적으로 분석한 후에 백분율과 같은 연속변수는 분석이 쉬어지도록 계층화할 수 있게 한다. 계층화하는데 필요한 cut-off 값은 일

반적으로 측정의 중앙값과 4분위수에 의해 선택되거나 단순히 5% 또는 10% 이상의 기준이 사용된다[6]. Cut-off 값을 설정하는 표준화된 방법은 없으나 두 가지 통계방법 즉 최소 p -값 접근법(minimum p -value approaches) 또는 수신기작동특성곡선(receiver operating characteristic curves)으로 cut-off 값을 정하는 것이 일반적이다.

결 론

정확한 병리 진단을 위해서는 검체의 보관을 포함한 적절한 처리 과정이 필수이다. 또한 진단 및 예후 판정, 치료 약제 선택을 위한 면역조직화학염색의 필요성이 증가되어 각각의 항체의 의미에 대하여 숙지해야 한다.

국문 색인: 병리 진단; 면역조직화학염색

REFERENCES

1. The Korean Society of Pathologists. Textbook of Pathology. 7th ed. Seoul: Komoonisa, 2010.
2. Rosai M. Rosai and Ackerman's surgical pathology. 10th ed. Vol. 1. New York: Elsevier, 2011.
3. Korea Institute of Clinical Pathology Professor. Histotechnology, 4th ed. Seoul: Korea Medical Book Publishing Company, 2006.
4. Kim JY, Kim JS, Kim TJ, Shin YC, Hwang GY, Kim SI. Cytology for microscopic diagnosis. Seoul: Shinkwang, 2006.
5. Kumar V, Abbas AK, Aster JC. Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease. 9th ed. Philadelphia: Elsevier, 2015.
6. Kim SW, Roh J, Park CS. Immunohistochemistry for pathologists: protocols, pitfalls, and tips. J Pathol Transl Med 2016;50:411-418.
7. Pekmezci M, Szpaderska A, Osipo C, Erşahin C. The effect of cold ischemia time and/or formalin fixation on estrogen receptor, progesterone receptor, and human epidermal growth factor receptor-2 results in breast carcinoma. Patholog Res Int 2012;2012:947041
8. Phillips T, Murray G, Wakamiya K et al. Development of standard estrogen and progesterone receptor immunohistochemical assays for selection of patients for antihormonal therapy. Appl Immunohistochem Mol Morphol 2007;15:325-331.
9. Shackelford C, Long G, Wolf J, Okerberg C, Herbert R. Qualitative and quantitative analysis of nonneoplastic lesions in toxicology studies. Toxicol Pathol 2002;30:93-96.