

뇌척수액에서 백혈병세포의 세포소견; 액상세포검사법과 고식적인 세포원심분리법과의 비교

유창영 · 이연수 · 강창석 · 심상인
이교영

가톨릭대학교 의과대학 병원병리학교실

접 수 : 2009년 1월 12일
게재승인 : 2009년 3월 5일

책임저자 : 이 연 수
우 150-030 서울시 영등포구 여의도동 62
가톨릭대학교 성모병원 병리과
전화: 02-3779-1072
Fax: 02-783-6648
E-mail: lys9908@catholic.ac.kr

*본 논문은 2008년 대한세포병리학회 제2회
연구과제비 지원을 받아 수행된 연구임.

The Cytology for Leukemic Cells in Cerebrospinal Fluid; Comparison of Conventional Cytology with Liquid-Based Cytology

Changyoung Yoo, Youn Soo Lee, Chang Suk Kang, Sang In Shim and Kyo Young Lee

Department of Hospital Pathology, College of Medicine, The Catholic University of Korea, Seoul, Korea

Background : The cytological examination of cerebrospinal fluid (CSF) using conventional cytology with a cytocentrifuge (cytospin) is an important method for evaluating the involvement of leukemia in the CNS. Liquid-based cytology (LBC) is now a widely used cytological method not only for gynecological and non-gynecological specimens, but its application to CSF for the identification of leukemic cell has not yet been reported. In this study, we tried to compare conventional cytology with using a cytospin with LBC and Papanicolaou (Pap) staining. We also examined the modified LBC with Wright staining to assess whether this modified method can be useful for diagnosing Leukemia. **Methods :** We studied 30 cases of CSF that were obtained from 16 patients, including 17 cases of acute myeloid leukemia, 12 cases of acute lymphoblastic leukemia and 1 case of diffuse large B cell lymphoma. We applied conventional cytology with a cytocentrifuge (cytospin), LBC with Pap staining and modified LBC with Wright staining. **Results :** The morphological features of the LBC with Pap staining showed difficulty for interpretation when compared with conventional cytology with a cytospin, and mainly because of cellular shrinkage. The modified LBC with Wright staining showed good morphological features. **Conclusions :** We suggest that modified LBC with Wright staining may be useful for examining CSF.

Key Words : Cerebrospinal fluid; Liquid-based cytology; Cytospin; Wright staining; Papanicolaou staining

뇌척수액 검사는 중추신경계의 감염질환뿐만 아니라 악성종양의 중추신경계 침범여부를 확인하는데 있어서도 중요한 수단이다.¹ 특히 악성림프종이나 백혈병 환자의 추적 관찰에 있어서 뇌척수액 검사는 필수 항목이 되고 있다. 즉, 현미경을 통해 뇌척수액 검체에서 악성세포를 관찰하는 일은 백혈병의 중추신경계 침범여부를 확인하는데 있어서 매우 중요하다.^{2,3} 또한 중추신경계를 침범한 백혈병의 치료는 전반적인 백혈병 치료에서 중요한 부분을 차지하고 있기 때문에 뇌척수액의 세포 검사는 치료를 위해서도 반드시 시행해야 할 방법이다.⁴ 뇌척수액을 통해 진단되는 백혈병으로는 소아에서 흔한 급성 림프모구백혈병(acute lymphoblastic leukemia, ALL)이 가장 흔하며,^{5,6} 그 다음으로 급성 골수백혈병(acute myeloid leukemia, AML)이 중추신경계를 흔히 침범한다.⁷ 드물게 만성 골수백혈병의 모세포

위기(blast crisis) 때도 뇌척수액에서 종양세포가 발견될 수 있고,^{8,9} 만성 림프구백혈병 때도 나타날 수 있다.^{10,11} 뇌척수액의 세포 검사가 이루어지는 주요 대상인 소아에서 백혈병이 발견되는 빈도는 한 보고에 따르면 13%에 이르고 있다.¹² 그러나 뇌척수액의 세포 검사는 검체 자체의 낮은 세포 밀도로 인해 많은 제약이 따른다. 일반적인 뇌척수액의 세포 검사는 세포원심분리법(conventional smear with cytocentrifuge)을 통해 세포밀도를 최대한 높인 다음 도말하여 Papanicolaou (Pap) 염색 및 Wright 염색과 같은 혈액염색을 통하여 이루어진다. 또한 필요에 따라서는 면역세포화학검사를 시행하여 진단에 도움을 받을 수 있다.¹³ 그러나 세포원심분리법을 이용한 세포 검사의 경우 대부분 여전히 낮은 세포밀도를 보이며, 고정 과정을 거치면서 나타나는 세포형태의 변형,^{14,15} 또는 변성으로 인한 세포의 용해

등으로 인해 백혈병의 중추신경계 침범 여부를 확인하는 일은 매우 어렵다. 따라서 실제 백혈병의 중추신경계 침범이 예상되는 경우에서도 많은 수가 비정형 또는 음성으로 진단되고 있다.¹⁶ 일부에서는 유속세포분석법이나 중합효소연쇄반응을 보조적으로 사용하여 진단율을 높이려는 시도도 하고 있다.^{2,17,18} 하지만 이런 보조적인 방법보다는 뇌척수액의 세포 검사를 이용한 형태학적 진단 과정을 통해 백혈병의 중추신경계 침범을 확인하는 것이 일반적이다.

액상세포검사는 최근 들어서 그 유용성이 확인되면서 부인과 검체뿐만 아니라 비부인과 영역의 다양한 검체들, 예를 들어 기관지세척액, 미세침흡인검체 그리고 체액 등에 대해서도 적용 범위가 넓어지고 있다.¹⁹⁻²¹ 그러나 혈액세포의 경우 액상세포검사 방법의 특성상 발생하는 세포수축으로 인해 진단적 어려움이 존재하고 있으며, 특히 뇌척수액을 사용한 액상세포검사는 초기단계에 머물고 있어서 액상세포검사에서의 보이는 형태학적 소견을 기술한 문헌은 접하기 어려운 실정이다. 현재 국내에는 액상세포검사의 한 종류인 Manual Liquid-Based Cytology Liquid-PREP (TM) 방법을 사용하여 뇌척수액의 세포형태를 기술한 문헌이 있지만,¹⁵ 전반적으로는 많이 연구되지 않은 분야이다. 게다가 핵의 형태와 세포질 과립 등 미세한 세포학적 소견의 관찰이 필수적인 백혈병 세포 존재 여부의 진단에 관한 문헌은 없다. 저자들은 뇌척수액이 지니는 이러한 어려움에도 불구하고 현재 중요한 위치를 점유해가고 있는 액상세포검사를 통하여 뇌척수액에서 관찰되는 백혈병 세포의 세포 소견을 기술하여 뇌척수액을 통한 백혈병의 중추신경계 침범 여부를 진단하는데 있어서 액상세포검사의 유용성을 제시하려고 한다. 본 연구에서는 먼저 뇌척수액의 백혈병 세포 확인을 위한 표준적인 검사 방법인 세포원심분리법에서 관찰되는 형태를 기본으로 하여 Pap 염색된 뇌척수액의 액상세포검사에서 관찰되는 백혈병 세포의 형태와 비교해보고자 하였으며, 다음으로 혈구세포의 미세한 형태학적 소견을 관찰하기 위해 공기 건조된 검체에서 사용하는 Wright 염색을 액상세포검사에서 적용이 가능한지 여부 및 Wright 염색된 기존의 세포원심분리법에서 보이는 소견과 비교 관찰을 통하여 백혈병 진단에 대한 유용성을 확인해 보고자 한다. 마지막으로 terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT)와 myeloperoxidase (MPO)에 대한 면역세포화학염색을 시행하여 혈액종의 양의 진단에 유용한 보조수단이 될 수 있는지 여부를 확인해보고자 한다.

재료 및 방법

본 연구는 2007년 9월부터 2008년 9월까지 액상세포검사를 이용하여 뇌척수액 검사를 시행한 환자 가운데 중추신경계 침범이 확인된 환자 16명을 대상으로 하였으며, 일부 환자는 여러 번에 걸쳐 악성 소견이 나왔기 때문에 대상이 되는 검체는 30예가

되었다. 이 가운데 17예는 급성 골수백혈병, 12예는 급성 림프모구백혈병, 그리고 1예는 미만성 B 큰세포 림프종이었다. 만성 골수백혈병이 1예가 있었으나 모세포 위기로 전환되어 중추신경계 침범이 있었기 때문에 급성 골수백혈병에 포함시켰다(Table 1).

연구 목적으로 모든 뇌척수액 검체에 대해 액상세포검사 및 세포원심분리법을 동시에 시행하였으며, 액상세포검사에서는 Pap 염색과 Wright 염색을 모두 시행하였고 세포원심분리법의 경우에는 Wright 염색만 시행하였다. 검체의 양이 적을 때는 액상세포검사의 Pap 염색은 생략하였다. 액상세포검사는 SurePath (Becton-Dickinson/TriPath, Burlington, NC, USA) 방법을 사용하였다. 현미경소견에서 급성 림프모구백혈병 세포가 확인된 경우에는 TdT, 그리고 급성 골수백혈병 세포가 확인된 경우는 MPO에 대한 면역세포화학염색을 실시하였다. 각 증례들에서 시행한 검사는 Table 2와 같다.

본 연구에서 사용한 슬라이드의 제작 방법은 다음과 같다.

세포원심분리법

신선한 뇌척수액 검체의 500 μ L를 cytospin clip/chamber set에 넣고 Shandon cytospin 4에서 1,500 rpm으로 10분간 원심분리하여 슬라이드를 제작하였다. 공기 중에 10분간 건조시킨 후에 자동염색기(Shandon Varistain Gemini, Cheshire, ENGLAND)에서 Wright 염색을 하였다. Wright 염색은 메탄올에서 20초 고정, Wright 염색 시약으로 2분 처리, 완충액(증류수 400 mL+Wright 염색 시약 10 mL)에 5분 처리, 흐르는 물로 8분간 세척, 60°C에서 20분간 건조, 그리고 봉입의 과정을 거쳤다.

Table 1. The clinical characteristics of patients with leukemic involvement of the cerebrospinal fluid

No. of patients	Sex	Age	Diagnosis	No. cytological examination with positive result
1	M	16	ALL	6
2	F	24	AML	4
3	M	4	ALL	1
4	F	33	ALL	2
5	M	55	AML	1
6	F	6	ALL	1
7	M	25	AML	1
8	M	44	AML	3
9	M	54	DLBCL	1
10	M	49	AML	1
11	M	8	ALL	1
12	F	56	AML	2
13	M	45	AML	2
14	M	42	AML	2
15	M	28	AML	1
16	M	24	ALL	1

ALL, acute lymphoblastic leukemia; AML, acute myeloid leukemia; DLBCL, diffuse large cell lymphoma.

Table 2. The cytological examinations and immunocytochemistry performed in 30 cases

No. of patients	Diagnosis		Cytological examinations			Immunocytochemistry	
			Cytospin	LBC pap	LBC Wright	MPO	TdT
1	ALL	1	+	+	-	-	+
		2	+	+	-	-	+
		3	+	-	+	-	+
		4	+	-	+	-	-
		5	+	-	+	-	+
		6	+	-	+	-	-
2	AML	1	+	+	-	-	-
		2	+	+	-	+	-
		3	+	+	-	+	-
		4	+	+	-	+	-
3	ALL	1	+	+	-	-	+
4	ALL	1	+	+	-	-	+
		2	+	+	-	-	+
5	AML	1	+	+	+	+	-
6	ALL	1	+	+	+	-	+
7	AML	1	+	-	+	+	-
8	AML	1	+	-	+	+	-
		2	+	+	+	+	-
		3	+	+	+	+	-
9	DLBCL	1	+	+	+	-	-
10	AML	1	+	+	+	+	-
11	ALL	1	+	+	+	-	+
12	AML	1	+	-	+	+	-
		2	+	-	+	+	-
13	AML	1	+	+	+	+	+
		2	+	-	+	-	-
14	AML	1	+	-	+	+	+
		2	+	-	+	+	+
15	AML	1	+	-	+	+	+
16	ALL	1	+	-	+	-	+

+, test done; -, test not done.

LBC Wright, liquid-based cytology with Wright staining; LBC pap, liquid-based cytology with papanicolaou staining; MPO, myeloperoxidase; TdT, terminal deoxynucleotidyl transferase.

Pap 염색을 한 액상세포검사

세포원심분리법 후 남은 검체(보통 2 mL)에 CytoRich® red preservative (CRR) 6 mL 넣고 30분 이상 고정을 하고 원심분리기(Rotina 46)에서 10분간 1,860 rpm으로 원심분리한 후 상층액을 제거하였다. 여기에 트리스 완충액(Tris buffer solution, SIGMA, St. Louis, MO, USA) 원액을 2 mL 넣고 희석을 시킨 후 1,860 rpm으로 5분간 원심분리하였다. 원심분리 후에 생긴 상층액을 제거한 후 보텍스 교반기에서 잘 섞은 다음 PrepStain preprocessor (Tripath Image™, Burlington, NC, USA)에 거치하였다. 슬라이드 제작을 위한 설정은 다음과 같이 하였다. 희석된 트리스 완충액 200 μ L (1:20)와 검체 250 μ L 혼합액을 슬라이드에 분주하고 여기에 희석된 트리스 완충액 200 μ L

를 다시 분주한다. 10분 대기한 후 알코올 세척 3회를 하고 슬라이드 제작을 완료하였다. Pap 염색은 다음 과정을 거쳤다. 알코올 탈수 70% 1분, 95% 30초, 흐르는 물에 세척 1분, 헤마톡실린 3분 30초, 흐르는 물에 세척 1분, 산성 알코올 15초, 흐르는 물에 세척 30초, 청색염료 25초 처리, 흐르는 물 세척 30초, 알코올 80% 30초, 90% 3분, Orange G-6 2분 30초, 알코올 95% 30초, 알코올 95% 30초, EA-50 2분 30초, 알코올 95%, 95%, 100%, 100%, 각 30초, 100% 1분으로 탈수, 자일렌 처리 후 봉입하여 완성한다. 이 과정도 자동염색기(Shandon Varistain Gemini)에서 시행하였다.

Wright 염색을 한 변형된 액상세포검사

세포원심분리법 후 남은 검체를 10분간 1,860 rpm으로 원심분리한 후 상층액을 제거하고, 트리스 완충액 원액 2 mL로 희석한 후 다시 5분간 1,860 rpm로 원심분리한 다음 상층액을 제거하고 PrepStain preprocessor (Tripath Image™)에 거치하였다. 여기서는 일반적인 액상세포검사와는 달리 희석된 트리스 완충액을 쓰지 않고 트리스 완충액 원액 200 μ L와 검체 400 μ L 혼합액을 슬라이드에 도말하였다. 여기에 다시 트리스 완충액 원액 200 μ L를 추가한 후 10분 방치한 슬라이드를 10분 동안 공기 중에서 건조시킨 다음 Wright 염색을 하였다.

뇌척수액의 면역세포화학검사

남은 검체로 액상세포검사 슬라이드 제작 후 95% 알코올로 1시간 동안 재고정한다. 세척은 증류수에 10번 담그는 정도로 한다. 항원 재생은 하지 않고 H₂O₂에 10분간 처리한 후 증류수에 세척하고 인산염 완충액에 10회 담그면서 세척한 후 1차 항체를 넣고 실온에서 40분 동안 항원반응을 시킨다. 급성 골수백혈병의 경우에는 MPO (DAKO, Glostrup, Denmark) predilution을 사용하였고, 급성 림프모구백혈병의 경우에는 TdT (Cell Marker, Hotsprings, AR, USA)를 1:500으로 희석하여 사용하였다. 이후 인산염 완충액에서 세척을 하고 2차 항체 Dako REAL™ EnVision™ (DAKO, Glostrup)를 넣고 실온에서 35분간 항원 반응을 시켰다. 인산염 완충액에 세척을 하고 DAB (DAKO, Glostrup) 5분간 처리하여 발색을 한 후 증류수에 세척을 하였다. 헤마톡실린으로 30초 처리하여 대조염색을 시행하였다.

결 과

세포원심분리법에서 세포의 보존 상태는 양호하였으며 세포밀도도 대부분 높게 나타났다. 세포들은 원심분리의 영향으로 다소 변형된 모습으로 서로 엉겨있는 형태로 관찰되었는데, 이러한 세포의 분포 양상은 세포원심분리법의 특성으로 생각된다. 세포

도말 부위의 배경은 다소 지저분하였다. 관찰되는 세포의 형태를 보면, 급성 골수백혈병에서 백혈병세포의 크기는 주변 정상 림프구의 2 내지 3배이며, 핵의 다형성도 현저하게 관찰되었다. 백혈병 세포의 특성인 핵의 돌출 및 과다분엽이 잘 관찰되었고 핵소체는 1개 내지 3개의 빈 공간과 같은 형태로 뚜렷이 관찰되었다. 세포질의 양은 많지 않아서 대부분 얇은 테두리 정도로 관찰되었다. 혼하지는 않지만 세포질 내에 붉은 색의 과립도 볼 수 있었다(Fig. 1A). 급성 림프모구백혈병에서 보이는 백혈병세포의 형태를 보면, 크기는 정상 림프구의 2 내지 3배, 뚜렷하게 잘 관찰되는 핵의 돌출 및 과다분엽, 1개 내지 3개의 빈 공간 형태의 핵소체, 그리고 얇은 세포질 테두리 등의 소견이 관찰되는 등 급성 골수백혈병의 경우와 비슷하였으나 핵의 특성은 좀더 더 과다하게 관찰되었다. 급성 골수백혈병의 경우와는 달리 세포질 내

에 과립은 관찰되지 않았다(Fig. 2A).

Pap 염색을 사용한 액상세포검사에서는 세포밀도도 충분하고 세포원심분리법과는 다르게 배경이 깨끗한 장점이 있었다. 그리고 세포들은 서로 엉겨있는 대신 하나 하나 개별적으로 흩어져서 분포하였다. 그러나 고정에 따른 세포의 수축이 심해 백혈병 세포의 형태학적 관찰이 어려웠다. 급성 골수백혈병과 급성 림프모구백혈병 모두에서 백혈병 세포는 정상 림프구의 2 내지 3배의 크기였지만 세포원심분리법에서 보였던 핵의 특징적인 모습인 핵의 돌출 및 과다분엽은 그리 뚜렷하게 보이지 않았다. 핵소체는 1개 내지 3개의 검은 점 모양으로 관찰되었다. 이 방법에서는 급성 골수백혈병에서 세포질 내 과립을 관찰할 수 없었다(Fig. 1B, 2B).

Wright 염색을 사용한 변형된 액상세포검사에서는 일부 세포

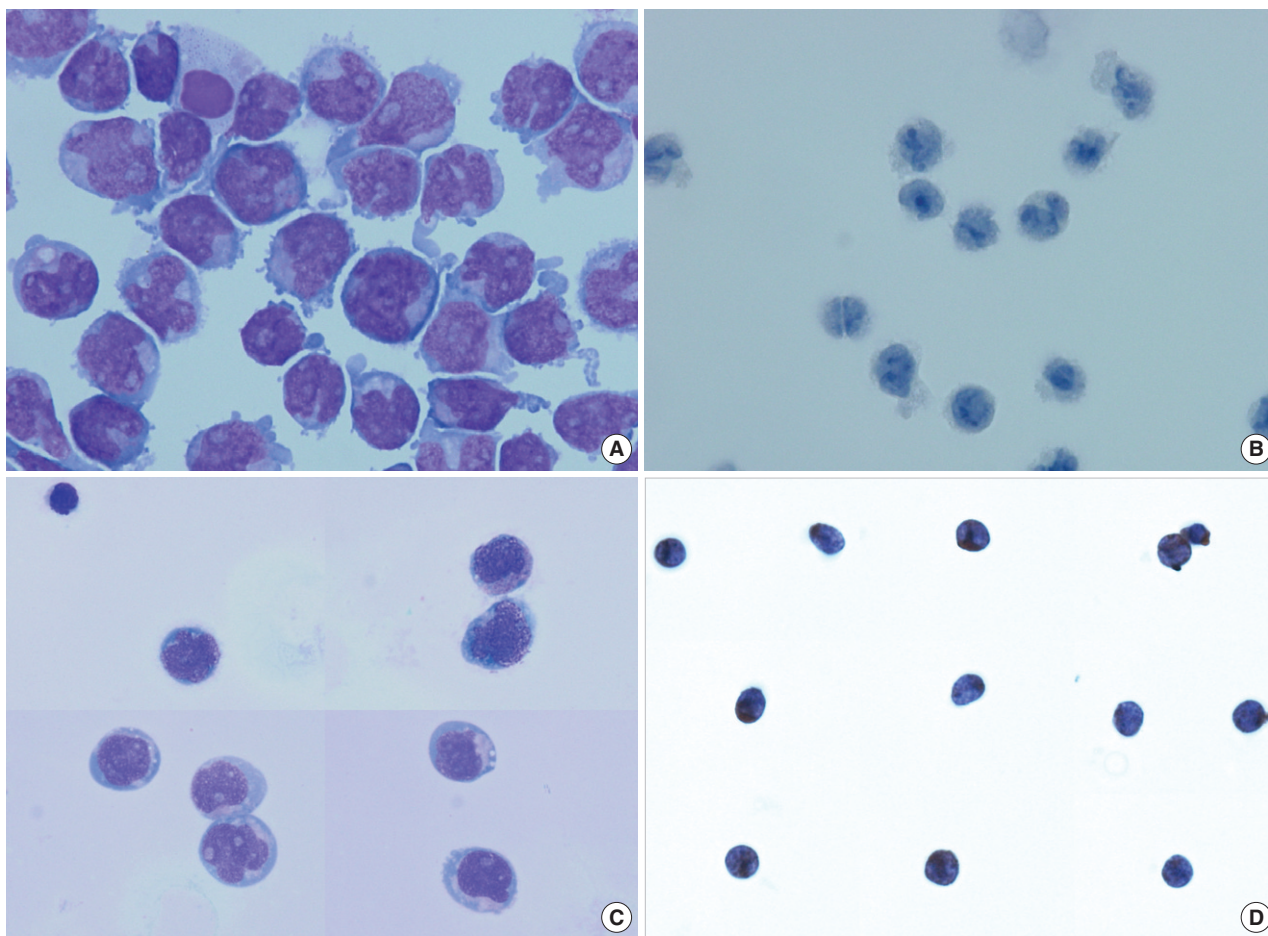


Fig. 1. The cytological features of AML. In the cytospin preparation with Wright staining, the leukemic cells of AML show characteristic nuclear features, such as hyperlobulation, protrusion and several nucleoli in the form of empty spaces. A few cytoplasmic granules are also noted (A). In the LBC with Pap staining, the leukemic cells show marked shrinkage after alcohol fixation. Nuclear protrusion and hyperlobulation are noted but not prominent as that of the cytospin. Nucleoli are presented as black dots (B). In the LBC preparation with Wright staining, the leukemic cells are distributed in the individual fashion, therefore cellular features are more clearly identified than cytospin preparation. The leukemic cells show prominent nuclear protrusion and hyperlobulation with thin cytoplasmic rim. Nucleoli are presented as empty spaces. The cytoplasmic granules are also found (C). Immunocytochemically, MPO is stained in the cytoplasm of leukemic cells (D). ([C] [D] are grouped images captured from several foci).

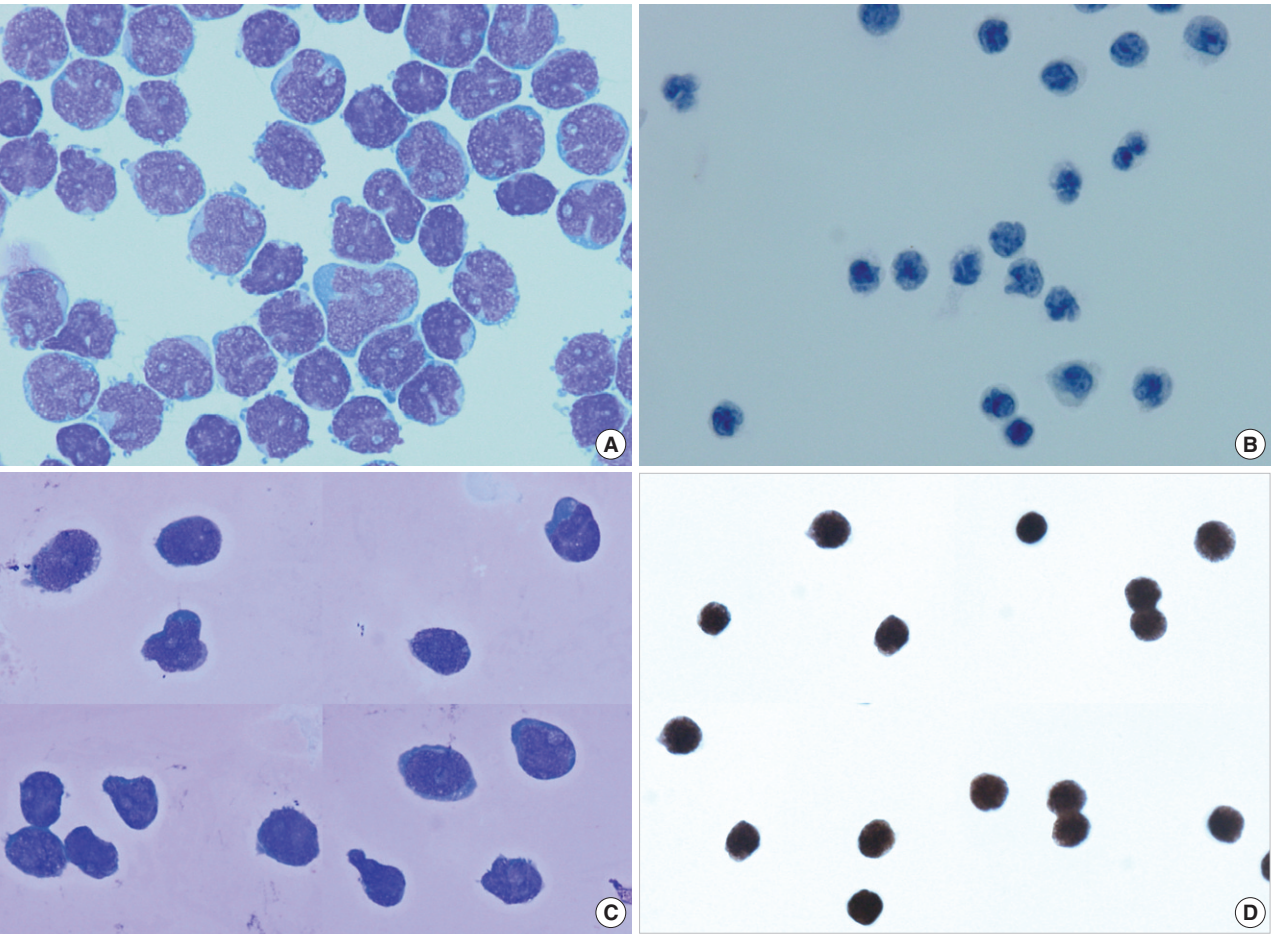


Fig. 2. The cytological features of ALL. In the cytospin preparation with Wright staining, the leukemic cells of ALL show similar nuclear features with AML such as hyperlobulation, protrusion and several nucleoli in the form of empty spaces. The cytoplasmic granules are not found (A). In the LBC with Pap staining, the leukemic cells also show marked shrinkage after alcohol fixation. Other morphological features are similar with AML (B). In the LBC preparation with Wright staining, the leukemic cells are distributed in the individual fashion. The leukemic cells show prominent nuclear protrusion and hyperlobulation with thin cytoplasmic rim. These features are more prominent than AML. Nucleoli are presented as empty spaces. The cytoplasmic granules are not found (C). Immunocytochemically, TdT is stained in the nucleus of the leukemic cell (D). ([C] [D] are grouped images captured from several foci).

Table 3. Morphologic characteristics of leukemic cells in cytospin, LBC Wright and LBC pap.

	Cytospin	LBC Wright	LBC pap
Background	Somewhat dirty	Clear	Clear
Preservation of cells	Moderate	Satisfactory but accompany with hemolysis	Satisfactory
Distribution of cells	Clumped	Individually	Individually
Size of leukemic cells	2-3 times than normal lymphocytes	2-3 times than normal lymphocytes	2-3 times than normal lymphocytes
Cellular pleomorphism	Prominent	Prominent	Not clear
Nuclear features			
Protrusion	Prominent	Prominent	Not clear
Hyperlobulation	Prominent	Prominent	Not clear
Nucleoli	1 to 3 as empty spaces	1 to 3 as empty spaces	1 to 3 as dark spots
Amount of cytoplasm	As thin rim	As thin rim	Inconspicuous
Cytoplasmic granules in AML	Sometimes observed	Sometimes observed	Not observed

LBC Wright, liquid-based cytology with Wright staining; LBC pap, liquid-based cytology with papanicolaou staining.

들의 용혈이 있었지만 세포밀도는 충분하였고 배경도 깨끗하였다. Pap 염색을 사용한 액상세포검사와는 달리 세포의 수축이 없었으며, 또한 세포들이 개별적으로 흩어져서 분포하고 있었기 때문에 세포의 형태 관찰이 세포원심분리법보다 더 용이하였다. 백혈병 세포들의 형태는 세포원심분리법의 경우와 유사하였다. 급성 골수백혈병에서는 크기가 정상 림프구의 2 내지 3배였으며, 핵의 돌출, 과다분엽, 빈 공간 형태의 핵소체, 그리고 얇은 테두리 형태의 세포질이 잘 관찰되었고 드물게 세포질 내 과립도 관찰할 수 있었다(Fig. 1C). 급성 림프모구백혈병의 경우에서 관찰되는 백혈병 세포는 급성 골수백혈병의 경우와 유사하였으나 세포원심분리법의 경우와 같이 핵의 특성이 좀 더 뚜렷하게 관찰되었다(Fig. 2C). 이들 세 가지 방법에서 보이는 형태학적 소견을 비교하여 Table 3에 정리하였다.

세포원심분리법에서는 Wright 염색을 이용한 세포학적 진단 후 다시 동일 검체를 이용해 면역세포화학염색을 해야 할 때는 검체의 변성으로 인해 불가능하였지만 액상세포검사에서 남은 검체로 추가 면역세포화학염색을 할 수 있었다. 면역조직화학염색을 시행하였을 때 급성 골수백혈병에서 MPO는 얇은 세포질 테두리에(Fig. 1D), 그리고 급성 림프모구백혈병에서는 TdT가 핵에 모두 양성으로 염색되었다(Fig. 2D).

고 찰

액상세포검사는 원래 자궁경부의 세포 검사를 위해 도입된 방법으로서, 기존의 고식적인 방법에서 보이는 여러 결점들을 보완하여 상피세포를 깨끗한 시야에서 관찰할 수 있는 훌륭한 진단 방법으로 정착되고 있다.²² 현재 여러 액상세포검사 방법이 국내에 소개되고 있지만, 본 연구에서는 SurePath (Becton-Dickinson/TriPath) 방법을 사용하였다. 이 방법은 에탄올에 고정된 검체를 밀도차 원심분리 방법으로 세포를 분리하여 이를 다시 슬라이드에 침강시켜 관찰하는 방법으로서,²³ 다른 액상세포검사 방법에 비해 슬라이드 제작 과정이 복잡하지만 아주 우수한 시야를 제공해주고 있다. 따라서 이 방법은 부인과 영역을 넘어 일반 비부인과 검체에 대해서도 널리 적용되고 있다. 그러나 뇌척수액을 검체로 사용한 액상세포검사 결과를 제시한 보고는 아주 드물게만 접할 수 있으며, 이들 보고는 주로 고형 암종의 뇌 전이에서 보이는 소견에 한정되어 있다.²⁴

혈액세포는 공기 중에서 건조한 도말 검체를 Wright 염색을 하여 관찰하는 것이 표준적인 방법이 되어 왔다. 혈액세포들은 일반 상피세포와는 달리 알코올 고정 후에는 세포의 수축이 심해져서 형태의 관찰에 어려움이 크다. 따라서 세포의 수가 적을 때는 음성으로 판독할 가능성이 높다.¹⁴ 저자들은 액상세포검사 방법을 사용하면서 세포원심분리법이 가지는 이점을 살릴 수 있는 길을 모색하였는데, 액상세포검사 과정에서 위에서 설명한 대로 다소 변형된 기법을 사용하여 슬라이드를 만들고 여기에

Wright 염색을 하여 염색결과를 평가하였다. 또한 새로운 방법이 진단에 오류를 줄 수 있는 위험성을 피하고자 세포원심분리법을 함께 시행하였다.

본 연구의 가장 큰 관심사는 세포원심분리법에서 관찰되는 형태학적 소견을 액상세포검사에서 동일하게 얻는 것이다. 가장 큰 장애는 혈액세포의 용혈을 막는 일이었다. 본 연구에서 트리스 완충액으로는 SIGMA를 사용하였는데, 이는 0.05 M의 Tris, 0.138 M의 NaCl, 그리고 0.0027 M의 KCl로 구성된 분말로 되어 있으며 이를 1 L의 탈이온수에 pH8.0 상태로 녹여서 사용한다. 슬라이드 제작과정에서 추가되는 희석된 트리스 완충액은 증류수로 20배 희석한 것이기 때문에 저장성 상태가 되어 혈액세포의 용혈을 초래하였다. 따라서 저자들은 희석된 트리스 완충액 대신에 트리스 완충액 원액을 사용하였는데, 사용된 트리스 완충액 원액은 구성 용질들의 몰농도가 등장성을 이루기 때문에 혈액세포에 거의 영향을 주지 않아 일부 세포의 용혈은 피할 수 없었지만 희석된 트리스 완충액을 사용하였을 때와 비교하였을 때 세포의 보존상태는 현저하게 증가하였으며 남아있는 세포들이 보여주는 형태학적 소견은 세포원심분리법에서 관찰되었던 소견과 유사하였다.

결론적으로, 세포원심분리법이 중추신경계의 백혈병 세포 침윤을 확인하는 훌륭한 방법으로 정착되었으나 새로운 진단 방법의 발전과 함께 뇌척수액의 백혈병 세포 확인에 있어서도 새로운 진단 방법의 적용 가능성 여부가 대두된다. 그러나 액상세포검사의 표준적인 방법인 알코올 고정과 Pap 염색을 통해서만 만족할 만한 결과를 얻지 못하였기 때문에 세포원심분리법의 장점과 액상세포검사의 장점을 모두 얻을 수 있는 방법의 모색이 필요하였으며, 위에 기술한 바와 같은 변형된 방법을 통해 만족스러운 결과를 얻을 수 있었다. 더불어 추가 면역세포화학염색을 통한 진단 과정의 보조방법을 시행할 수 있는 이점도 확인하였다.

본 연구는 방법의 특성상 뇌척수액에서 악성세포가 침윤된 검체를 기다려야 하는 상황으로 인해 많은 증례를 관찰할 수 없었던 제한점이 있었다. 그러나 이상의 결과를 통해 현재 세포검사의 많은 부분에서 유용성이 입증되고 있는 액상세포검사를 뇌척수액의 세포 검사에도 확대 시행할 수 있다는 결론을 얻었다. 세포원심분리법에서 보이는 단점을 보완하면서 특징적인 세포형태를 제공해주고, 면역세포화학검사와 같은 보조적인 수단의 적용도 용이하게 해주는 액상세포검사 방법은 뇌척수액을 통한 중추신경계의 백혈병 침윤 진단에 유용한 정보를 제공하리라 생각한다.

참고문헌

1. Suh JH, Gong G, Khang SK, Kim OJ. Cytologic analysis of malignant tumor cells in cerebrospinal fluid. Korean J Cytopathol 1998; 9: 21-8.

2. Nückel H, Novotny JR, Noppene R, Savidou I, Dührsen U. Detection of malignant haematopoietic cells in the cerebrospinal fluid by conventional cytology and flow cytometry. *Clin Lab Haematol* 2006; 28: 22-9.
3. Nolan CP, Abrey LE. Leptomeningeal metastases from leukemias and lymphomas. *Cancer Treat Res* 2005; 125: 53-69.
4. Sandlund JT, Murphy SB, Santana VM, *et al.* CNS involvement in children with newly diagnosed non-Hodgkin's lymphoma. *J Clin Oncol* 2000; 18: 3018-24.
5. Huang L, Lequin M, Pieters R, van den Heuvel-Eibrink MM. The clinical value of follow-up examinations in childhood T-cell acute lymphoblastic leukemia and T-cell non-Hodgkin's lymphoma. *Pediatr Blood Cancer* 2007; 48: 468-72.
6. Bürger B, Zimmermann M, Mann G, *et al.* Diagnostic cerebrospinal fluid examination in children with acute lymphoblastic leukemia: significance of low leukocyte counts with blasts or traumatic lumbar puncture. *J Clin Oncol* 2003; 21: 184-8.
7. Colovic N, Bogdanovic A, Miljic P, Jankovic G, Colovic M. Central nervous system relapse in acute promyelocytic leukemia. *Am J Hematol* 2002; 71: 60-1.
8. Rajappa S, Uppin SG, Raghunadharao D, Rao IS, Surath A. Isolated central nervous system blast crisis in chronic myeloid leukemia. *Hematol Oncol* 2004; 22: 179-81.
9. Rytting ME, Wierda WG. Central nervous system relapse in two patients with chronic myelogenous leukemia in myeloid blastic phase on imatinib mesylate therapy. *Leuk Lymphoma* 2004; 45: 1623-6.
10. Morrison C, Shah S, Flinn IW. Leptomeningeal involvement in chronic lymphocytic leukemia. *Cancer Pract* 1998; 6: 223-8.
11. Hanse MC, Van't Veer MB, van Lom K, van den Bent MJ. Incidence of central nervous system involvement in chronic lymphocytic leukemia and outcome to treatment. *J Neurol* 2008; 255: 828-30.
12. Prayson RA, Fischler DF. Cerebrospinal fluid cytology: an 11-year experience with 5951 specimens. *Arch Pathol Lab Med* 1998; 122: 47-51.
13. Dahmouch L, Hijazi Y, Barnes E, Stetler-Stevenson M, Abati A. Adult T-cell leukemia/lymphoma: a cytopathologic, immunocytochemical, and flow cytometric study. *Cancer* 2002; 96: 110-6.
14. Renshaw AA, Hughes JH, Wang E, *et al.* Leukemia/lymphoma in cerebrospinal fluid: distinguishing between cases that performed well and poorly in the College of American Pathologists Interlaboratory Comparison Program in Non-gynecologic Cytology. *Arch Pathol Lab Med* 2006; 130: 1762-5.
15. Park G, Lee K, Jung CK, *et al.* Evaluation for cytopreservability of manual liquid-based cytology liqui-PREP (TM) and its application to cerebrospinal fluid cytology: comparative study with cytospin. *Korean J Cytopathol* 2007; 18: 46-54.
16. Schinstine M, Filie AC, Wilson W, Stetler-Stevenson M, Abati A. Detection of malignant hematopoietic cells in cerebral spinal fluid previously diagnosed as atypical or suspicious. *Cancer* 2006; 108: 157-62.
17. Roma AA, Garcia A, Avagnina A, Rescia C, Elsner B. Lymphoid and myeloid neoplasms involving cerebrospinal fluid: comparison of morphologic examination and immunophenotyping by flow cytometry. *Diagn Cytopathol* 2002; 27: 271-5.
18. Pine SR, Yin C, Matloub YH, *et al.* Detection of central nervous system leukemia in children with acute lymphoblastic leukemia by real-time polymerase chain reaction. *J Mol Diagn* 2005; 7: 127-32.
19. Kim DH, Kim MK, Chae SW, *et al.* The usefulness of SurePath (TM) liquid-based smear in sono-guided thyroid fine needle aspiration: a comparison of a conventional smear and SurePath (TM) liquid-based cytology. *Korean J Cytopathol* 2007; 18: 143-52.
20. Lee S, Park JH, Do SI, *et al.* Diagnostic value of urine cytology in 236 cases; a comparison of liquid-based preparation and conventional cytospin method. *Korean J Cytopathol* 2007; 18: 119-25.
21. Ryu CK, Park JI, Min JS, *et al.* The clinical significance and detection of intraperitoneal micrometastases by ThinPrep(R) cytology with peritoneal lavage fluid in patients with advanced gastric cancer. *J Korean Gastric Cancer Assoc* 2008; 8: 189-97.
22. Klinkhamer PJ, Meerding WJ, Rosier PF, Hanselaar AG. Liquid-based cervical cytology. *Cancer* 2003; 99: 263-71.
23. Belsley NA, Tambouret RH, Misdraji J, Muzikansky A, Russell DK, Wilbur DC. Cytologic features of endocervical glandular lesions: comparison of SurePath, ThinPrep, and conventional smear specimen preparations. *Diagn Cytopathol* 2008; 36: 232-7.
24. Sioutopoulou DO, Kampas LI, Gerasimidou D, *et al.* Diagnosis of metastatic tumors in cerebrospinal fluid samples using thin-layer cytology. *Acta Cytol* 2008; 52: 304-8.