

대장 및 직장의 침윤성 선암종에서 AgNORs 수와 환자의 생존율과의 관계

한림대학교 의과대학 병리학교실, 일반외과학교실* 및 단국대학교 의과대학 병리학교실**

강 구 · 남은숙 · 신형식 · 김순란
박영의 · 이재정* · 박철재* · 이민철**

= Abstract =

The Relationship of AgNORs to the Survival Rate of Patients with Invasive Colorectal Adenocarcinoma

Gu Kang, M.D., Eun Sook Nam, M.D., Hyung Sik Shin, M.D.

Soon Ran Kim, M.D., Young Euy Park, M.D.

Jae Jung Lee, M.D.*, Chul Jae Park, M.D.* and Min Chul Lee, M.D.**

Department of Pathology and General Surgery,*

College of Medicine, Hallym University

*Department of Pathology, College of Medicine, Dankuk University***

Nucleolar organizer regions(NORs) are argyrophilic and have a loops of DNA that transcribes to ribosomal RNA by RNA polymerase I and are involved in formation of nucleolus. They are used in measuring proliferative activity of cells. Mean AgNORs count is increased or large and NORs are irregular in shape in malignant tumors. To examine the relationship of AgNORs to the survival rate of the patients with invasive colorectal adenocarcinoma, we counted mean AgNORs in 200 tumor cells and mean AgNORs*(mean AgNORs in counting AgNORs of the upper 40 nuclei after sorting AgNORs counts of 200 cell nuclei in descending order) after AgNOR staining using 45 cases of formalin-fixed, paraffin-embedded tissue surgically excised at Kang-Dong Sacred heart hospital.

The survival rates were not related to age, sex, locations, differentiation, mAgNORs and mAgNORs* except Dukes' stages. There were only statistical significances in AgNORs* between high and low age group($p=0.0001$), and between colon and rectum($p=0.005$).

But it is known that there could be different results according to staining time, fixation and preservation of tissues, counting methods in measuring AgNORs. There might be clinical usefulness of AgNOR if more cases are examined together with better tissue processing and staining methods.

Key Words: Colorectal, Adenocarcinoma, AgNORs, Survival rate

서 론

조기에 발견된 대장암은 외과적인 치유가 가능하나 진행된 대장암은 근치술에도 불구하고 그 병기에 따라 예후가 나쁘다. 점막하부이상 침윤한 대장 및 직장의 선암종에서 병기, 암세포의 혈관침윤 및 암세포의 분화도가 환자의 예후와 관련이 있다는 것은 잘 알려져 있으며 이는 통상의 hematoxylin eosin 염색으로 시행되고 있다^{11,7,35,36,42}. 그러나 기왕의 침윤성 암종의 예후를 알아보기 위하여 암종의 증식력 및 침윤성을 알기 위한 여러가지 연구가 진행되어 왔으며 그 중 AgNORs, PCNA, BrdU, 유세포측정법 등이 있다^{3,5,7,19,23,27,32,36}. 특히 AgNORs은 기술적으로 단순하고 비용이 적게 들며 파라핀에 포매된 조직을 이용할 수 있고, 단 클론 항체나 분자생물학적 기법이 없이도 검사실에서 일상적으로 할 수 있다^{11,24,34}.

핵소체는 염색체위의 NOR(nucleolar organizer region)이 조직화한 것으로 NOR은 r-RNA를 갖고 있는 ribosomal DNA의 환들(loops)이다. 핵소체는 r-RNA를 합성하고 리보솜을 만드는데 관여하고 리보솜의 기능이 단백질 합성에 깊이 관여한다^{12,27}. AgNORs은 은호기성으로 DNA polymerase I에 의해서 전사하는 DNA 부분을 갖고 있으며 핵소체 형성에 관여하고, 이것은 세포의 증식력을 측정하는데 이용될 수 있다^{12,13,35,42,46}.

저자들은 45예의 대장 및 직장의 선암종을 조직학적 소견, Dukes 병기, 암세포당 AgNORs 수 및 환자의 예후와의 관계를 조사하고 AgNORs의 임상적 적용 가능성을 알아보려고 하였다.

재료 및 방법

1988년 1월부터 1990년 12월까지 강동섭심병원에 서 외과적으로 절제된 대장 및 직장의 침윤성 선암종으로 환자의 추적조사가 가능했던 45예를 임상 및 병리학적으로 재검토하고 암세포 1개당 AgNORs (mAgNORs) 수를 가지고 환자의 예후와의 관계 및 병리학적 소견과의 관계를 조사해 보았다. 본 연구에서 직장 및 대장의 선암종과 무관한 사망과 추적조사가 중도에 불가능했던 경우, Duke기가 D로서 본 종

양의 절제가 이루어지지 않은 경우는 제외하였으며 예 후 추적기간은 60~92개월이었다. 보관된 formalin 에 고정하고 paraffin에 포매된 조직을 4 μ m의 두께 로 박절한후 hematoxylin-eosin 염색과 AgNOR 염색용액을 암실에서 상온에 45분 동안 적용한후 증 류수로 씻어내고 ethanol과 xylene으로 탈수시키고 광학현미경으로 관찰하였다⁹. 400배 배율에서 AgNORs이 핵안에 1개 이상 있는경우 200개의 세포 를 선택하여 핵내 AgNORs 수를 세었고(방법 1, mAgNORs), 상위 40개의 세포를 선택하여 세포당 AgNORs 수를 세었다(방법 2, mAgNORs*).

선택된 종례의 특징은 평균 연령이 57세이고 남녀 가 각각 22와 23명이며 직장이 26예, 결장이 19예이 고, Dukes 병기에서 B1, B2, C1, C2, 그리고 D가 각각 8, 18, 1,16, 그리고 2명이고, 전체 환자의 90개 월 누적 생존율은 0.68이었다. 통계학적 검사는 생명 표 작성, Kruskal-Wallis 검정 및 log-rank 검정 으로 이루어졌다.

결 과

1) 생존율(Table 1)

전체 90개월까지의 누적생존율은 0.68이었다. Dukes 병기에 따른 90개월 누적생존율(이하 90개월 생존율 로 약칭)은 B1이 8예로 0.87, B2가 18예로 0.83, C1 은 1예로 65개월까지 예후추적시 생존하고 있었고, C2가 16예로 0.50이었으며 D가 2예로 수술후 14개 월, 24개월에 사망하였다. Dukes 병기에따른 생존율 에 통계학적 차이가 있었다($p=0.001<0.05$, Fig. 1). 암세포당 AgNORs 수의 평균치(mAgNORs, 방법 1)가 2이었으며 2 이상과 이하에서 생존율이 각각 0.70 및 0.68이었으며($p=0.82$), mAgNORs*(방법 2)가 3 이상과 이하인 경우 생존율이 각각 0.73 및 0.59이었다($p=0.26$, Fig. 2, 3).

전체 환자의 평균 나이는 57세이었고 57세 이상과 이하인 환자수가 각각 23 및 22명이었고 그들의 생존 율은 각각 0.65 및 0.72이었다($p=0.58$). 남녀수는 각 각 22 및 23명이었고 남녀성비에 따른 생존율은 각각 0.77 및 0.60이었다($p=0.22$).

암종 발생부위로 결장이 19예이고 직장이 26예이었 으며, 그 생존율이 각각 0.78 및 0.58이었다($p=0.20$).

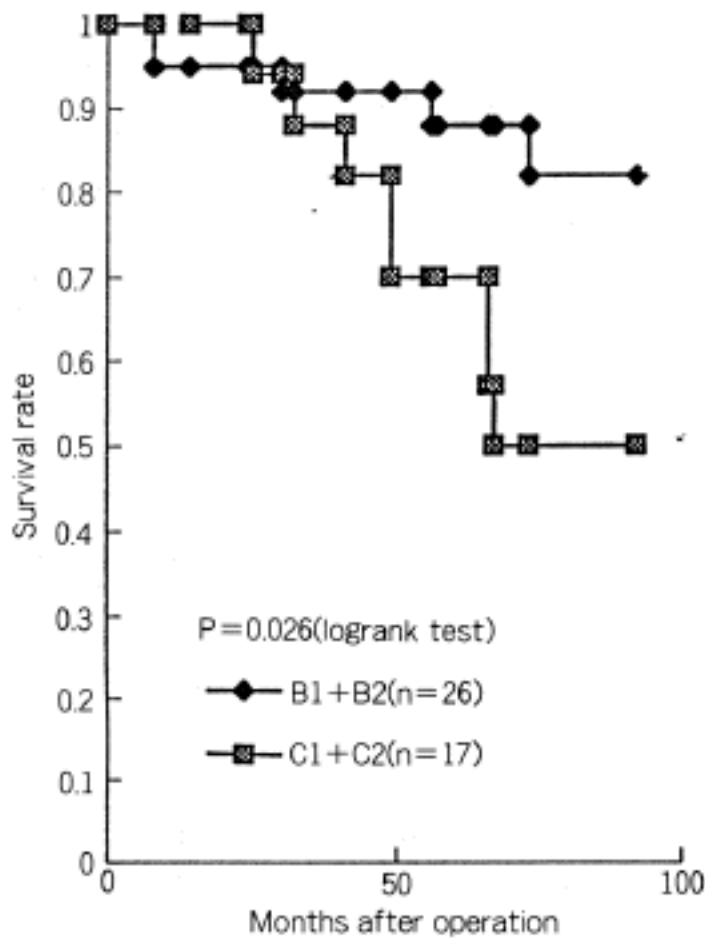


Fig. 1. Cumulative 90-month survival rate in the patients with invasive colorectal adenocarcinoma. There is statistical difference between Dukes' stages(B1+B2) and (C1+C2).

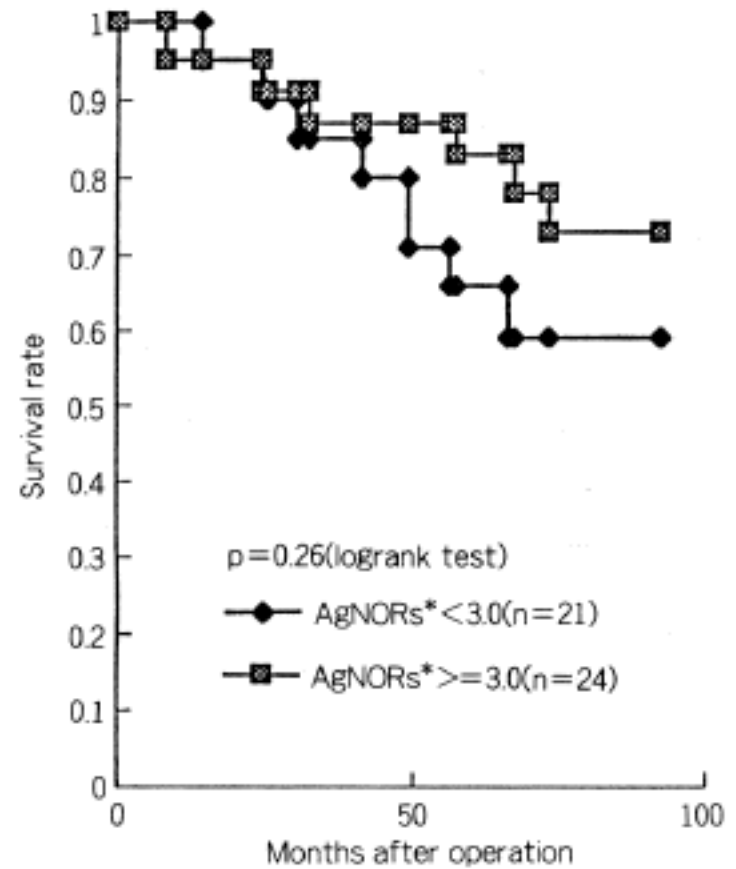


Fig. 3. Cumulative 90-month survival curves. There is no statistical difference between high AgNOR* and low AgNOR* counts.

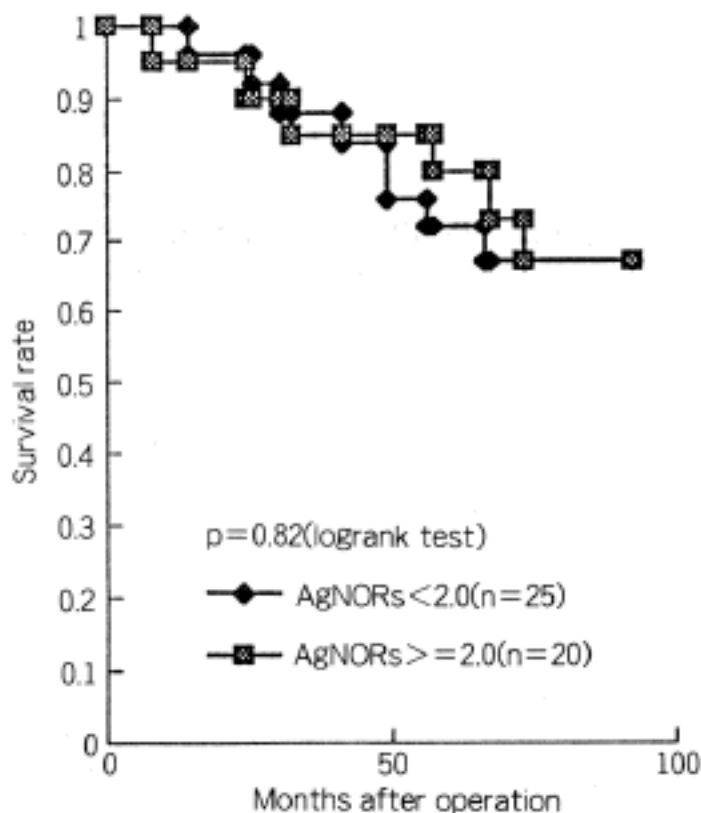


Fig. 2. Cumulative 90-month survival curves. There is no statistical difference between high AgNOR and low AgNOR counts.

선암종의 분화도를 편의상 고분화성(well differentiated)와 그렇지 않은 경우(moderately or poorly differentiated: 비고분화성)으로 나누었고 각각 31 및 14예이었다. 90개월 생존율은 고분화성 선암종에서 0.70이고 비고분화성 선암종에서 0.66으로 고분화성 암종에서 생존율이 높았으나 통계학적 의의는 없었다($p=0.86$).

2) AgNORs 수

종양세포의 분화도에 따른 암세포당 평균 AgNORs 수는 고분화성이 2.26 ± 0.56 (SD)이고 비고분화성이 1.85 ± 0.46 (SD)이었으며($p=0.39$) mAgNORs*은 각각 3.25 및 2.92이었다($p=0.46$). 광학현미경상 세포당 AgNORs수가 분화도가 좋을 수록 작고 많은 수의 세포당 AgNORs수가 관찰되고 분화도가 낮을수록 크고 적은 수의 AgNORs가 관찰되는 경향이 있었으나 통계학적 의의는 없었다. Duke병기에 따른 세포당 AgNORs수는 B1, B2, C2에서 각각 $1.88 \pm$

Table 1. Invasive colorectal carcinoma. 90-month cumulative survival rate, and mean AgNORs counts

	No. of patients	Survival rate	p	Mean AgNORs count			
				mAgNORs	p	mAgNORs*	p
Age							
>57	23	0.65	0.58	2.11	0.39	2.97	0.0001
<57	22	0.72		2.00		3.33	
Sex							
Male	22	0.77	0.22	1.99	0.49	3.13	0.15
Female	23	0.60		2.13		3.16	
Location							
Colon	19	0.78	0.20	2.03	0.48	3.55	0.005
Rectum	26	0.58		2.08		2.86	
Differentiation							
Well	31	0.70	0.86	2.15	0.39	3.25	0.46
Moderate, poorly	14	0.66		1.85		2.92	
Dukes							
B1	8	0.87	0.001	1.88	0.15	2.68	0.38
B2	18	0.83		1.98		3.35	
C1	1	1					
C2	16	0.5		2.25		3.24	
D	2	0					
B(B1+B2)	26	0.82	0.026	1.95	0.24	3.14	0.49
C(C1+C2)	17	0.50		2.19		3.20	
mAgNORs count							
mAgNORs							
>2	20	0.68	0.82				
<2	25	0.67					
mAgNORs*							
>3	24	0.73	0.26				
<3	21	0.59					

mAgNORs: mean AcNORs count. mAgNORs*: mAgNORs in counting AgNORs of upper 40 nuclei after sorting AgNORs counts of 200 cell nuclei in descending order

0.37, 1.98 ± 0.46 , 2.25 ± 0.61 이었으며 병기가 진행될 수록 세포당 AgNORs수가 증가하는 것처럼 보였으나 통계학적 의의는 없었다($p=0.15$). 또한 mAgNORs*은 각각 2.68 ± 0.49 , 3.35 ± 1.54 , 그리고 3.24 ± 1.02 이었다($p=0.38$).

환자의 나이가 57세 이상과 이하인 경우 AgNORs 수는 각각 그 평균치가 2.11 및 2.00이었으며($p=0.39$), AgNORs* 수는 각각 2.97 및 3.33이었다($p=0.0001 < 0.05$).

남녀에 따른 평균 AgNORs 수는 각각 1.99 ± 0.52

및 2.13 ± 0.60 이었으며($p=0.49$)

평균 AgNORs*수는 각각 3.13 ± 1.40 및 3.16 ± 0.60 이었다($p=0.15$).

부위에 따른 암세포당 평균 AgNORs 수는 결장에서 2.03 ± 0.51 이고 직장에서 2.08 ± 0.60 이었으며($p=0.48$), AgNORs* 수는 각각 3.55 ± 1.59 및 2.86 ± 0.73 이었다($p=0.005 < 0.05$).

고 안

암 환자의 치료에 가장 중요한 것은 조기 발견, 조

기 치료하는 것이다. 그러나 암종이 진행되었을 경우 환자의 예후를 알아내는 것은 중요한 일이다. 일반적으로 암종의 크기, 침윤한 정도, 조직학적 분화도, 주위 림프질의 전이 및 다른 장기로의 전이 유무 등이 예후 판정에 도움을 준다^{1,7,29,33,40,41,42}. 그러나 이들 외에 암의 예후 판정에 도움을 주는 인자를 밝혀내기 위해 암세포의 증식 능력, 침윤성에 관여하는 단백질 및 유전자에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다. 그럼에도 불구하고 환자의 예후 판정에 도움을 주거나 이용할 수 있는 방법에는 한계가 있는 것이 사실이다.

암종의 연구에서 흔히 의학분야 중 그 진단과 치료에 관심이 집중되어 있다. 진단병리학 분야에선 보다 정확히 진단하고 환자의 예후를 알아 내는데 있고 치료분야에선 우선 조기진단에 필요한 연구 및 기왕에 진행된 암을 치유하는데 관심을 갖고 있다. 일반적으로 암종의 생물학적 특성은 암세포의 증식율과 관련이 있는 것으로 생각됨으로 이 증식력을 반영하는 인자를 찾아내고 암종의 재발 및 전이 능력과의 상관관계를 밝히는데 관심이 집중되어 왔다. AgNORs 염색은 손쉽고 저렴하면서도 세포의 증식력을 잘 반영해 주는 것으로 알려져 있다. AgNORs 수는 흔히 예후 판정보다는 세포의 이형성 정도 및 암종으로의 전환에 따른 그 수의 변화에 대한 연구가 많이 진행되어 왔다. 또한 일부 학자들에 의해서 일부의 암에서 암세포의 AgNORs 수가 암환자의 예후와 관계가 있는 것으로 발표되고 있다. 그러나 학자나 장기에 따라 다양한 결과가 나타났다. AgNORs 수가 환자의 예후와 관련이 있다는 보고가 있는가 하면 그렇지 않다는 보고가 나오는 등 아직은 AgNORs 수를 임상에 적용하기에는 문제가 적지 않은것으로 보인다^{7,14,19,20,25,32,35,36,39,42,43}. AgNORs 수가 세포의 증식력과 관련성이 있다는 보고는 많으나 AgNORs 수와 양을 측정하는 방법과 그 자료를 어느 장기, 어떤 종류의 신생물에 적용하는가가 문제이다. 저자들은 직장 및 대장의 선암종이 비교적 육안소견 및 조직학적 형태가 유사하여 임상-병리학적 연구에 좋은 자료라고 생각했다. 또한 대장 및 직장은 암발생과정에서 선종-선암종 순서(adenoma-carcinoma sequence)가 흔히 적용되는 장기이기도 하다. 그러나 궤양부위가 외부에 노출되어 다양한 정도의 염증 및 괴사가 동반되고 장기의 퇴행성 변화가 있어 적축물을 신속히 처리하지 않으면 좋은 질의 블

락을 얻기 어렵다. 이런 요인이 보관된 파라핀 블락을 가지고 연구하는데 어느정도 제한 요인이 되기도한다.

Mourad등²⁷⁾은 유방암에서 암세포당 평균 AgNORs 수(mAgNORs)가 2.4 이상일 경우 DNA의 이수성(aneuploidy)과 관련이 있으며 전체 AgNORs 수 중 AgNORs 수가 5 이상인 세포의 핵분율(pAgNORs)이 8% 이상일때 유세포측정시 합성기의 증식력을 반영한다하며 이때 이수성과 종양의 등급과 유관하다고 하였다. 또한 AgNORs은 침윤인생검과 같이 생검조직이 작은 경우 종양세포의 증식력 평가에 사용될 수 있겠다²⁷⁾.

Derenzini등¹⁵⁾은 만성 간질환 환자들에서 높은 수준의 평균 AgNOR 면적은 간세포암종의 높은 위험도와 관련이 있다고 보고하였다. 정상, 과형성(hyperplasia), 이형성(dysplasia)이나 선종성 과형성(adenomatous hyperplasia) 및 암종에 있어서 단계적으로 AgNORs의 수나 면적이 증가함은 이들의 증식력에 차이가 있음을 말해준다^{2,4,6,9,10,13,16,22,31,44,45}. 또한 일부 학자들은 이러한 차이점이 양성 및 악성의 감별에 이용될 수 있다고 하였다^{8,11,12}. 그러나 실제적으로 종양의 악성 및 양성 여부를 진단하는데는 어떤 특수 염색으로 이루어지지 않는다고 생각된다. 그런데 종양세포의 침윤성과 증식력과의 관계는 어떠할까? Mourad등²⁰⁾은 유방의 in situ 관상암종에서 AgNORs로 측정된 DNA의 배수성 및 증식력은 이 병변의 악성 잠재력(potentiaal)을 예측하는데 가치가 있다고 했으며 비면포성보다 면포성 관상 잠재암종(comedo ductal carcinoma in situ)에서 DNA의 이수성 빈도, 증식력, 그리고 침윤성 암종의 빈도가 높다고 하였다. 갑상선의 여포상 선종과 선암종의 감별진단은 세포형태만으로 진단하기 곤란하고 혈막이나 혈관침윤이 진단에 중요하다. Ruschoff등³⁷⁾은 AgNORs의 분포 점수(AgNORs수가 5 이상인 세포의 핵분율)가 이들의 감별에 도움을 준다고 보고했으며 Kanitakis등²¹⁾은 피부의 편평상피암종과 keratoacanthoma의 감별진단에 도움을 주나 AgNORs 수가 두 종양 사이에 겹치는 영역이 넓다고 하였다. Daren등¹⁰⁾은 자궁경부의 선암종에서 침윤성 선암종과 잠재성 선암종사이에 AgNORs 수의 차이가 있는 것으로 보아 잠재성 선암종은 전암성 병변일 가능성이 매우 크다고 하였다. 방광의 pTa(papillary transi-

tional cell carcinoma, noninvasive)에서 종양의 등급 II(Bergkvist grade)과 mAgNORs 수가 8 이상인 경우 종양의 재발을 예측하는데 도움이 된다는 보고도 있다. 그러나 AgNORs 수 단독으로는 재발여부에 차이는 있으나 그 수가 겹치는 영역이 넓어 비침윤성 암종의 재발여부의 예측에 도움이 되지 않는다고 하였다¹⁶⁾.

Ruschoff 등³⁶⁾은 영상분석기를 이용하여 AgNOR 양을 측정하였는데 s-결장 및 직장의 선암종에서 pN 범주, AgNOR 양, pT 범주, 그리고 염증세포의 수가 환자의 예후와 관련이 있다고 하였으나 임상예 AgNOR을 적용하는 데에는 방법상의 문제가 있다고 하였다. 그 밖에 여러 연구자들에 의해 유방암, 간세포암종, 피부의 기저세포암종, 식도의 편평상피세포암, 폐의 비소포암, 신세포암종 등에서 AgNOR이 환자의 예후나 암종의 재발과 관련이 있다는 보고가 있다^{25, 26, 30, 32, 43)}. 그러나 Adachi⁷⁾, Hennigan¹⁹⁾, Rayter 등³⁵⁾은 대장 및 직장의 선암종에서 AgNOR이 환자의 예후와는 통계학적으로 의미있는 관련성이 없다고 보고했다. 그러나 본 연구에서 Dukes 병기를 제외하고는 나이, 성별, 부위, 암의 분화도, mAgNORs 수는 환자의 생존율과 통계학적으로 의미있는 관계가 없었다. Rayteff³⁷⁾ 보고에서처럼 AgNOR은 대장 및 직장암에서 예후인자로서 가치가 없고 Dukes 병기 및 종양세포의 분화도와 상관관계가 없었다. 환자의 예후를 판정하는 많은 기준은 연구의 대상에 따라 달라질 수 있다. Wied 등⁴⁷⁾은 결장의 선암종에서 성별과 Dukes 병기는 예후와 무관하였으며 나이와 암세포의 정맥침윤이 독립적인 예후인자라고 하였고 Broder 등급 및 암세포의 신경침윤이 경계치의 예후인자인 것으로 보고하였다.

AgNOR 염색은 세포의 증식력을 반영하는 기술임에도 불구하고 누구나 공감하는 염색방법이나 결과의 해석에 기준이 없는 실정이다. Rath-Wolfson 등³⁸⁾은 AgNOR의 염색과정이 중요하다고 하였으며 이에 탈이온화수(deionized water)의 사용, 시약의 반응 시간 조절, 봉입재(mounting medium)로 DPX를 사용할 것, 그리고 가능한한 신속히 슬라이드를 검사할 것을 추천했다. 본 연구에 사용한 파라핀 블럭은 그 보관상태가 완벽했다고 말할 수 없으며 수술후 조직이 병리과에 도착하는 시간이 일정하지 않았고 또한

고정시간도 그러 했다. AgNOR 수를 세는데 400배 이상의 배율로 세지 않았으며 화상분석기와 같은 장비를 이용하지 않았다. 그렇지 않았다면 AgNOR 수는 많은 것으로 측정될 수 있었을 것이다. 그러나 얼마나 작은 AgNOR를 세어야 되는지 기준은 없다. 다만 연구자들은 보통의 방법으로 비교적 세기 쉬운 크기의 AgNOR들 세어서 이 연구의 자료로 사용했다. Greenson 등¹⁷⁾은 Dukes 병기 B인 직장 및 결장의 선암종에서 anticytokeratin 항체(AE1/AE3)를 이용하여 림프절의 잠복한 극소전이(occult micrometastasis)를 찾아낸 결과 전이가 발견된 경우 그렇지 않은 경우보다 예후가 나빴다. 결장암에서 Dukes 병기가 예후에 중요하다는 것은 잘 알려진 사실이므로 병기의 정확성을 높이는 방법이 당장 임상예 적용할 수 있을 것이라고 생각된다.

결 론

Nucleolar organizer regions(NORs)은 은호기성으로 RNA polymerase I에 의해서 전사하는 DNA 부분을 갖고 있으며 핵소체 형성에 관여한다. 이것은 세포의 증식력을 측정하는데 이용되며 악성 암종에서 수가 증가하거나 크고 불규칙한 모양을 갖는다. 세포당 AgNORs 수와 환자의 생존율과의 관련성을 조사해 보기위해서 강동성심병원에서 외과적으로 절제된 대장 및 직장의 침윤성 선암종 45예의 파라핀 블럭을 이용하여 AgNORs 염색을 시행한 후 세포당 평균 AgNORs 수(mAgNORs)와 상위 40개의 세포에서의 평균 AgNORs 수(mAgNORs)를 측정하였다.

Dukes 병기를 제외하고 연령, 성별, 부위, 분화도, mAgNORs 및 mAgNORs*은 환자의 예후와 무관하였다. 단지 mAgNORs*가 저연령군에서 고연령군(57세 이상)보다 높았으며(p=0.001), 결장에서 직장보다 높았다(p=0.005).

그러나 mAgNORs 수의 측정에 있어서 염색시간, 조직의 고정 및 보존상태, 관찰하는 방법 등에 의한 차이가 있는 것으로 알려져 있다. 조직을 보다 최적의 상태로 처리하고 고배율로 확대하여 관찰하고 화상분석기를 이용하고, 보다 많은 종례를 가지고 연구한다면 AgNORs의 임상적인 유용성을 찾을 수 있을지

모른다.

REFERENCES

- 1) 김영우, 박재갑, 권오중 등: 고유근층 대장암의 임상적 고찰. 대한소화기병학회지 23: 459, 1991
- 2) 김준미, 김인선, 백승룡: 정상조직과 증식성 및 종양성 병변에서의 Nucleolar Organizer Regions. 대한병리학회지 23: 208, 1989
- 3) 박혜림, 박영희: 방광 이행상피암에서 Proliferating Cell Nuclear Antigen과 Nucleolar Organizer Regions의 발현에 관한 연구. 인간과학 15: 773, 1991
- 4) 윤철희, 이상숙, 장은숙: 간세포암종의 진단에 Argynophilic Nucleolar Organizer Regions(AgNORs)의 적용. 대한병리학회지 27: 553, 1993
- 5) 장은숙, 박관규: 유방암에서 호르몬 수용체, PCNA, AgNOR 및 조직학적 소견간의 비교연구. 대한병리학회지 27: 605, 1993
- 6) 재갈승주, 정주연, 곽효일 등: 자궁경부의 정상조직과 상피내종양 및 침윤암종에서의 핵소체형성부위. 임상병리검사과학회지 27: 195, 1995
- 7) Adachi Y, Kido A, Mori M, et al: Nuclear DNA content and nucleolar organizer regions in colorectal cancer. J Surg Oncol 59: 177, 1995
- 8) Bancroft JD, Stevens A: Theory and practice of histological techniques. 3rd ed., pp642, Churchill Livingstone, 1990
- 9) Bolondi L, Gramantieri L, Chieco P, et al: Enzymatic cytochemistry, DNA ploidy and AgNOR quantitation in hepatocellular nodules of uncertain malignant potential in liver cirrhosis. Digestive Diseases and Sciences 41: 800, 1996
- 10) Brustmann H, Riss P, Naude S: Nucleolar organizer regions as markers of endometrial proliferation: A study of normal, hyperplastic, and neoplastic tissue. Hum Pathol 26: 664, 1995
- 11) Cardillo MR: Ag-NOR technique in fine needle aspiration cytology of salivary gland masses. Acta Cytol 36: 147, 1992
- 12) Chida T, Ajioka Y, Watanabe H: Use of nucleolar organizer regions in the histopathological diagnosis of colorectal epithelial neoplasia. Jpn J Clin Oncol 22: 73, 1992
- 13) Daren JF, Polaczar SV, Sheridan E, et al: Nucleolar organizer regions in adenocarcinoma in situ and invasive adenocarcinoma of the cervix. J Clin Pathol 43: 657, 1990
- 14) De Rosa G, Staibano S, Barra E, et al: Nucleolar organizer regions in aggressive and nonaggressive basal cell carcinoma of the skin. Cancer 69: 123, 1992
- 15) Derenzini M, Trere D, Oliveri E, David E, et al: Is high AgNOR quantity in hepatocytes associated with increased risk of hepatocellular carcinoma in chronic liver disease? J Clin Pathol 46: 727, 1993
- 16) Deschenes J, Weidner N: Nucleolar organizer regions(NOR) in Hyperplastic and neoplastic prostate disease. Am J Surg Pathol 14: 1148, 1990
- 17) Greenson JK, Isenhardt CE, Rice R, et al: Identification of occult micrometastases in pericolic lymph nodes of Dukes' B colorectal cancer patients using monoclonal antibodies against cytokeratin and CC49. Cancer 73: 563, 1994
- 18) Hansen AB, Bjerregaard B, Ovesen H, et al: AgNORs counts and histological grade in stage pTa bladder tumors: reproducibility and relation to recurrence pattern. Histopathology 20: 257, 1992
- 19) Hennigan TW, Dawson PM, Shousha S, et al: Prognostic value of nucleolar organizer regions in colorectal neoplasia. Eur J Surg Oncol 20: 215, 1994
- 20) Ishida T, Kaneko S, Akazawa K, et al: Proliferating cell nuclear antigen expression and argyrophilic nucleolar organizer regions as factors influencing prognosis of surgically treated lung cancer patients. Cancer Research 53: 5000, 1993
- 21) Kanitakis J, Hoyo E, Hermier C, et al: Nucleolar organizer region enumeration in keratoacanthoma and squamous cell carcinoma of the skin. Cancer 69: 2937, 1992
- 22) Kobayashi I, Matsuo K, Ozeki S, et al: The proliferative activity in oral epithelial dysplasia analyzed by proliferating cell nuclear antigen immunostaining and argyrophilic Nucleolar organizer region staining. Hum Pathol 26: 907, 1995
- 23) Limas C, Bigler A, Bair R, et al: Proliferative activity of urothelial neoplasms: Comparison of BrdU incorporation, Ki67 expression and nucleolar organizer regions. J Clin Pathol 46: 159, 1993
- 24) Miller B, Flax S, Dockter M, et al: Nucleolar organizer regions in adenocarcinoma in the uterine cervix. Cancer 74: 3142, 1994

- 25) Morita M, Kuwano H, Matsuda H, et al: *Prognostic significance of argyrophilic Nucleolar organizer regions in esophageal carcinoma. Cancer Research 51: 5339, 1991*
- 26) Mourad WA, Setrakian S, Hales ML, et al: *The argyrophilic Nucleolar organizer regions in ductal carcinoma in situ of the breast. The significance of ploidy and proliferative activity analysis using this silver staining technique. Cancer 74: 1739, 1994*
- 27) Mourad WA, Erkman-Balis B, Livingston S, et al: *Argyrophilic Nucleolar organizer regions in breast carcinoma. Cancer 69: 1739, 1992*
- 28) Murray D, Hreno A, Dutton J, et al: *Prognosis in colon cancer. A pathologic assessment. Arch Surg 110: 908, 1975*
- 29) Nacopoulou L, Azaris P, Papacharlalampous N, et al: *Prognostic significance of histologic host response in cancer of the large bowel. Cancer 47: 930, 1981*
- 30) Oda H, Machinami R: *Sarcomatoid renal cell carcinoma. A study of its proliferative activity. Cancer 71: 2292, 1993*
- 31) Ogunbiyi OA, Scholefield JH, Sharp F, et al: *Nucleolar organizer regions(AgNORs) in anal intraepithelial neoplasia and invasive anal squamous cell carcinoma. J Clin Pathol 45: 889, 1992*
- 32) Pich A, Margaria E, Chiusa L: *Proliferative activity is a significant prognostic factor in male breast carcinoma. Am J Pathol 145: 481, 1994*
- 33) Pihl E, Nairin RC, Milne BJ, et al: *Lymphoid hyperplasia: A major prognostic features in 519 cases of colorectal carcinoma. Am J Pathol 100: 469, 1980*
- 34) Rath-Wolfson L, Hamel I, Halpern M, et al: *Nucleolar organizer regions in breast cytology material. Acta Cytol 39: 852, 1995*
- 35) Rayter Z, Surtees P, Tildsley G, et al: *The prognostic value of argyrophilic Nucleolar organizer regions (AgNORs) in colorectal cancer. Eur J Surg Oncol 18: 37, 1992*
- 36) Ruschoff J, Bittinger A, Neumann K, et al: *Prognostic significance of Nucleolar organizer regions(NORs) in carcinomas of the sigmoid colon and rectum. Path Res Pract 186: 85, 1990*
- 37) Ruschoff J, Prasser C, Cortz T, et al: *Diagnostic value of AgNOR staining in follicular cell neoplasm of the thyroid: Comparison of evaluation methods and nucleolar features. Am J Surg Pathol 17: 1281, 1993*
- 38) Shimizu K, Izumi R, Ii T, et al: *Prognostic significance of Nucleolar organizer regions in hepatocellular carcinoma. Hepatology 21: 393, 1995*
- 39) Shiro T, Seki T, Naitoh Y, et al: *A correlation of argyrophilic nucleolar organizer regions with stages of hepatocellular carcinoma. Cancer 71: 44, 1993*
- 40) Steinberg SM, Barkin JS, Kaplan RS, et al: *Prognostic indicators of colon tumors. The gastrointestinal tumor study group experience. Cancer 57: 1866, 1986*
- 41) Steinberg SM, Barwick KW, Stablein DM: *Importance of tumor pathology and morphology in patients with surgically resected colon cancer. Findings from the gastrointestinal study group. Cancer 58: 1340, 1986*
- 42) Subramanian S, Shariff S, Andrade C: *AgNORs and their relationship to cell size, histological grade, lymph node involvement, metastases, and survival pattern in carcinoma of the breast: A study from south india. J Surg Oncol 62: 139, 1996*
- 43) Tannapfel A, Hahn HA, Katalinic A, et al: *Prognostic value of ploidy and proliferation markers in renal cell carcinoma. Cancer 77: 164, 1996*
- 44) Terada T, Nakanumaa Y, Ohta T et al: *Histological features and interphase organizer regions in hyperplastic, dysplastic and neoplastic epithelium of intrahepatic bile ducts in hepatolithiasis. Histopathology 21: 233, 1992*
- 45) Terasaki S, Terad T, Nakaanuma Y, et al: *Argyrophilic Nucleolar organizer regions and alpha-fetoprotein in adenomatous hyperplasia in human cirrhotic livers. Am J Clin Pathol 95: 850, 1991*
- 46) Weeks SC, Beroukas D, Jarvis LR, et al: *Video image analysis of AgNOR distribution in the normal and adenomatous colorectum. J Pathol 166: 139, 1992*
- 47) Wied U, Nilsson T, Knudsen JB, et al: *Postoperative survival of patients with potentially curable cancer of the colon. Dis Colon Rectum 28: 333, 1985*