

유세포 측정기를 이용한 DNA 히스토그램의 해석

— 대장 및 직장암종 신선조직과 파라핀포매조직에서의 DNA 히스토그램 비교 —

서울 을지병원 해부병리과, 연세대학교 원주의과대학 병리학교실¹
인제의대 서울백병원 해부병리과², 연세대학교 의과대학 병리학교실³
BD사⁴ 및 고려대학교 의과대학 안암병원 해부병리과⁵

남 은 숙·정 순 희¹·서 연 립²
정 우 희³·김 경 민⁴·김 인 선⁵

Interpretation of DNA Histogram in Flow Cytometry

— A Comparative Study of DNA Ploidy in Fresh and Paraffin-embedded Tissues of Colorectal Adenocarcinomas —

Eun Sook Nam, M.D., Soon Hee Jung¹, M.D., Yeon Lim Suh², M.D.
Woo Hee Jung³, M.D., Keung Min Kim⁴, M.D., Insun Kim⁵, M.D.

Department of Pathology, Eul Ji Hospital, Yonsei University Wonju College of Medicine¹,
Inje University Seoul Paik Hospital², Yonsei University College of Medicine³,
BD⁴, Korea University Anam Hospital⁵

As flow cytometric analysis using paraffin-embedded tissue was developed by Hedley et al in 1983, retrospective study with large amount of archival material was possible. Many literatures reported that the result of paraffin embedded tissue was compatible with that of fresh tissue. We compared the DNA histograms of 26 cases of colorectal adenocarcinoma in which the analysis was done in both fresh and paraffin-embedded tissues. Aneuploidy in fresh and paraffin-embedded tissues was 73.0% and 50.0%, respectively. The concordance rate of fresh and paraffin-embedded tissues was 76.8% and six interpreters were agreed in 73.0% of the cases.

Because flow cytometric DNA analysis using fresh tissues can detect more aneuploid population than in paraffin-embedded tissue, the former is strongly recommended in DNA ploidy study. Also careful observation using standard criteria may improve the interpretation of DNA histogram. (**Korean J Pathol 1994; 28: 341~349**)

Key Words: Flow cytometry, DNA histogram, Colon adenocarcinoma

서 론

1983년 Hedley 등¹⁾에 의해 파라핀포매조직을 이용

한 유세포 측정법이 개발됨에 따라 신선조직의 이용이 어려운 경우나 많은 양의 archival material을 이용한 후향성 연구를 가능케 했으며, 그 결과는 신선조직을 이용한 결과와 비교할 만 하다는 다수의 논문들이 보고되어왔다²⁻⁶⁾. 그러나 파라핀포매조직을 이용하는 경우 신선조직에서 관찰될 수 있는 비배수성 집단이 소실되어 결과의 차이가 있고 히스토그램을 판독하는데에도 판독자간에 차이가 있음이 알려져 왔다.

접 수: 1993년 8월 27일, 게재승인: 1994년 3월 31일
주 소: 서울시 중구 을지로3가 302-1, 우편번호 100-193
서울 을지병원 병리과, 남은숙

저자들은 대장 및 직장암종을 대상으로 동시에 신선 조직과 파라핀포매조직을 이용하여 DNA 함량 검사를 시행하여 얻은 히스토그램을 여러명의 판독자들이 함께 비교분석하여 신선조직과 파라핀포매조직에서의 DNA 함량분석의 차이와 히스토그램의 판독상의 문제점을 검토하였다.

재료 및 방법

1. 연구재료

고려대학교 안암병원에서 외과적으로 절제된 대장 및 직장암종 신선조직에서 DNA 분석이 가능하였던 26예에서 파라핀포매조직을 선택하여 DNA 분석을 동시에 시행하였다. 유세포분석으로 시행한 DNA 분석에서 비배수성이 의심되거나 확실치 않은 경우 화상분석기를 이용한 DNA 분석이 시행되었다.

2. DNA 분석방법

1) 신선조직을 이용한 DNA 함량 측정: 신선하게 채취된 조직을 citrate 완충액에 넣고 페트리접시에서 가위를 이용하여 잘게 분쇄한 다음 35 μ m 구멍크기의 나일론망을 이용하여 세포부유액을 걸른 후 세포 계산기를 이용하여 ml당 2×10^6 에 세포수를 맞추었다. 정량된 세포부유액 50 μ l을 Falcon 튜브에 옮긴 다음 trypsin 완충액 450 μ l를 가하고 10분간 암소에서 반응시킨 다음 FACScan에서 2만개 세포의 DNA 함량을 측정하여 Cellfit program을 이용하여 분석하였다.

2) 파라핀포매조직을 이용한 DNA 함량 측정: H-E 염색된 조직을 관찰하여 괴사가 없고 고정이 잘된 부위를 선택한 후 불력에 표시하여 파라핀포매조직을 50 μ m 두께로 두개의 절편을 만들어 13 \times 100 mm Falcon 시험관에 넣었다. 4~5 ml의 xylene을 넣어 40분씩 2회 반응시켜 파라핀을 제거한 다음 3~4 ml의 100%, 95%, 70%, 50% 알코올을 단계적으로 첨가하여 20분씩 반응시켜 함수시켰다. 그 다음 PBS 용액 (pH 7.2)에 1시간씩 2회 작용시킨 후 pH 1.9의 0.4% 펩신용액 2 ml를 첨가하여 37 $^{\circ}$ C에서 45분간 부치시킨 후 1500 rpm으로 10분간 원심분리하여 상층액을 버리고 PBS 2 ml를 넣고 2회 세척하였다. PBS 용액 2 ml를 첨가하여 35 μ m 나일론망을 사용하여 조직을 걸러 단일세포 부유액을 만든 후 혈구계산기를 이용하여 세포수를 ml당 $1 \sim 2 \times 10^6$ 개로 계산하였다. Falcon 시험관에 세포부유액 50 μ l를 옮긴 후 1500 rpm에서 10분간 작용시킨 후 RNase 375 μ l를 가하고 다시 37 $^{\circ}$ C 수욕조에서 10분간 작용시킨 후 proplidium iodide 375 μ l를 가하고 10분간 4 $^{\circ}$ C 냉장상태에서 반응시킨 다음 FACScan으로 분석하였다.

3) 유세포 측정 및 분석: 유세포 측정은 FACScan (Beckton-Dickinson, USA)을 calibrate beads와 QC particle(chicken red blood cell)로 자동보정 후 Cellfit program을 이용하여 각각 2만개의 세포를 분석하였다. 이때 DNA 배수성은 하나의 뚜렷한 G0/G1 극파를 가지며 DNA 지수가 0.95에서 1.05인 경우를 이배수성(diploidy)이라고 하였고, 비배수성은 이배수성 극파이외에 또 하나의 G0/G1 극파를 보일때로 정의하였고, 비배수성 중 DNA 지수가 0.95 이하일 때를 저이배수성(hypodiploidy)이라고 하였고 DNA 지수가 1.05~1.95는 과이 배수성(hyperdiploidy), DNA 지수가 1.95~2.05 사이에 있으며 전체 세포 중 15%이상의 세포집단을 보일 때를 사배수성(tetraploidy)이라고 하였다. DNA 지수가 2.05 이상은 과사배수성(hypertetraploidy)라고 하였으며 2개 이상의 비배수성 극파가 있을 때를 다배수성(multiploidy)으로 하였다. 신선조직 26예와 동예의 파라핀 포매조직에서 측정된 결과를 1년이상 유세포 DNA 분석 경험이 있는 5명의 병리전문의와 1명의 Beckton-Dickinson application specialist가 히스토그램을 분석하여 판독자간의 일치율을 검토하였고 신선조직과 파라핀포매조직에서의 결과를 비교하였다.

4) 화상 분석기를 이용한 DNA 함량 분석: -85 $^{\circ}$ C에 냉동보관되었던 신선조직을 압착도말한 유리슬라이드를 실온에서 30분 내지 2시간 건조시킨 다음 10% 중성 포르말린에 30분간 고정된 후 실온에서 다시 건조시켰다. 5M HCl 용액에서 1시간 가수분해 시키고 자력교반기(magnetic stirrer)위에 올려 놓은 상태에서 Schiff시약으로 1시간 동안 염색한 후 수세하고 탈수하여 포매한 다음 CAS 200 Image Analyzer의 Quantitative DNA Ploidy 프로그램을 이용하여 분석하였다. 이 때 200개 이상의 세포를 분석하였고 슬라이드에 포함된 정상림프구와 정상 상피세포의 DNA 함량을 내부기준으로 삼고 프로그램에 들어있는 표준세포의 DNA 양을 7.18 pg으로 하여 검사하는 세포의 DNA 지수를 구하였다.

결 과

절제된 대장암종의 신선조직으로 유세포 분석한 26예의 DNA 히스토그램과 동예의 파라핀포매조직의 DNA 히스토그램을 6명의 판독자가 분석한 결과를 요약하면 다음과 같다(Table 1).

1) 신선조직과 파라핀포매조직에서 배수성이 일치되고 6명의 판독자가 모두 배수성 판독에 의견이 일치하는 경우는 26예 중 15예(증례 1~15)로 58.0%에 해당하였다. 이중 8예의 비배수성 히스토그램에서 2예만이 파라핀포매조직과 신선조직 모두에서 뚜렷한 비배수성 극파를 보였으며(Fig. 1), 나머지 6예에서는 신선

Table 1. Result of histogram interpretation

	Ploidy pattern analysis			Conclusion
	Fresh(D/A)	Paraffin(D/A)	Final	
1.	6/0	6/0	F(D)/P(D)	Diploidy
2.	6/0	6/0	F(D)/P(D)	Diploidy
3.	6/0	6/0	F(D)/P(D)	Diploidy
4.	6/0	6/0	F(D)/P(D)	Diploidy
5.	6/0	6/0	F(D)/P(D)	Diploidy
6.	6/0	6/0	F(D)/P(D)	Diploidy
7.	6/0	6/0	F(D)/P(D)	Diploidy
8.	0/6	0/6	F(A)/P(A)	Aneuploidy
9.	0/6	0/6	F(A)/P(A)	Aneuploidy
10.	0/6	0/6q	F(A)/P(A)	Aneuploidy
11.	0/6	0/6q	F(A)/P(A)	Aneuploidy
12.	0/6	0/6q	F(A)/P(A)	Aneuploidy
13.	0/6	0/6q	F(A)/F(A)	Aneuploidy
14.	0/6	0/6q	F(A)/P(A)	Aneuploidy
15.	0/6q	0/6q	F(A)/P(A)	Aneuploidy
16.	0/6	6/0	F(A)/P(D)	Aneuploidy
17.	0/6	6/0	F(A)/P(D)	Aneuploidy
18.	0/6T	6/0	F(T)/P(D)	Tetraploidy
19.	0/6	6/0	F(A)/P(D)	Aneuploidy
20.	0/6	3/3	Reanalysis in PT	F(A)/P(A)
21.	0/6	3/2/1(ui)	Reanalysis in PT	F(A)/P(D)
22.	6/0	5/1	Reanalysis using ICM	ICM(A)
23.	4/2	1/5	Reanalysis using ICM	ICM(T)
24.	1/5T	6/0	Reanalysis in FT	F(T)/P(D)
25.	4/2T	1/5q	Reanalysis in FT	F(T)/P(A)
26.	5/1	0/6	Reanalysis in FT	F(A)/P(A)

* D/A; No. of persons interpreting as diploidy/as aneuploidy
 * Aq; questionable aneuploidy * T; tetraploidy * ui; uninterpretable
 * P(D)/F(A); Paraffin (Diploidy)/Fresh (Aneuploidy) * ICM; Image analysis
 * PT; paraffin tissue * FT; fresh tissue

조직에서 매우 뚜렷한 비배수성 극파가 관찰되었으나 파라핀포매조직의 히스토그램에서는 뚜렷한 비배수성 극파보다는 G0/G1 극파가 한쪽으로 치우치거나 shoulder를 가진 CV가 넓은 극파로 나타난 경우였다(Fig. 2).

2) 신선조직과 파라핀포매조직에서 배수성이 일치되지 않았으나 판독자 6명이 모두 히스토그램의 배수성 분석에 같은 의견을 보인 경우가 4예(증례 16~19)로 신선조직에서 비배수성인 것이 파라핀포매조직에서는 관찰되지 않았던 경우였다(Fig. 3).

3) 7예(27.0%)에서는 신선조직이나 파라핀포매조직의 히스토그램 판독에서 의견이 일치 하지 않았다.

판독자간에 서로 의견이 일치하지 않은 7예 중 2예(증례 20, 21)에서는 신선조직의 히스토그램에서는 분명한 비배수성 극파가 있었으나 파라핀포매조직의 히스토그램 분석에서 의견이 달라 파라핀포매조직으로 다시 분석한 결과 증례 20에서는 처음 분석 시 불분명하던 비배수성 극파가 DI 1.53 근처에서 좀 더 확실히 보였으며 동예의 보존되어 있던 신선냉동조직의 압착도말로 화상분석 한 결과 DNA 지수 1.27을 갖는 비배수성 극파가 관찰되었다(Fig. 4). 그러나 증례 21에서는 조직파편이 적어지면서 오히려 이배수성으로 해석되었다. 또 다른 2예(증례 22, 23)에서는 파라핀이나 신선조직 히스토그램 모두에서 G2/M 극파에

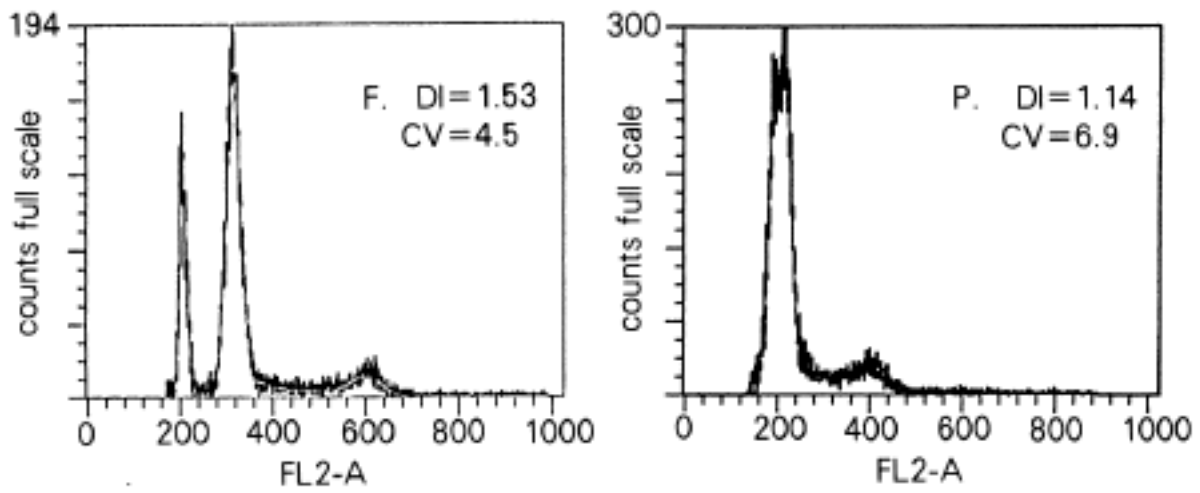


Fig. 1. DNA concordant case. Well separate aneuploid peak in fresh tissue(left), but fusion of G0/G1 peak in paraffin-embedded tissue (right) (case 8). (F; histogram using fresh tissue, P; histogram using paraffin-embedded tissue).

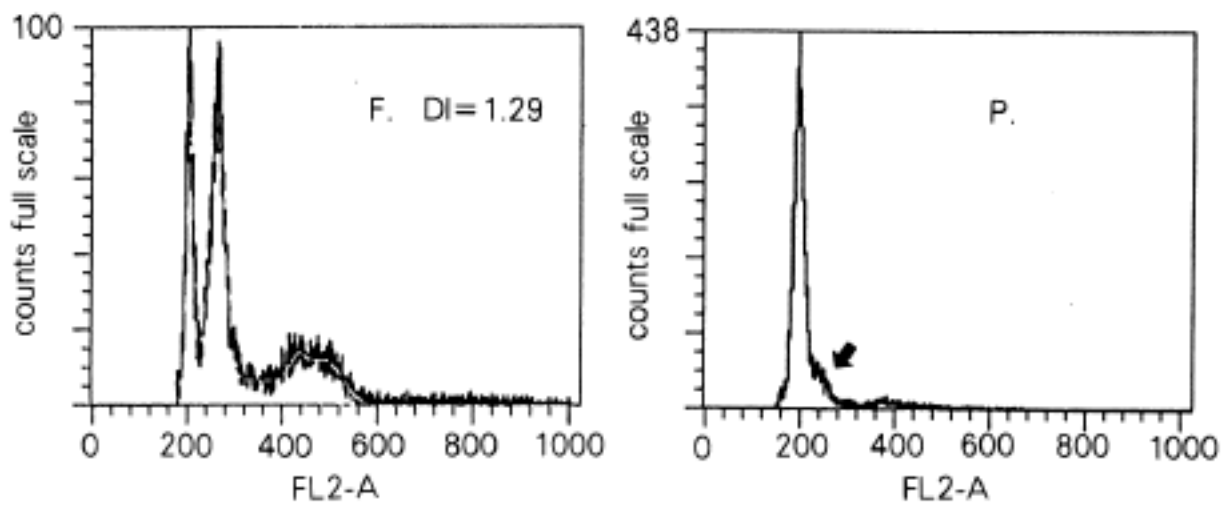


Fig. 2. Prominent aneuploid peak at DI 1.29 in fresh tissue (left), but questionable hump on the right shoulder of G0/G1 in paraffin-embedded tissue (right) (case 12).

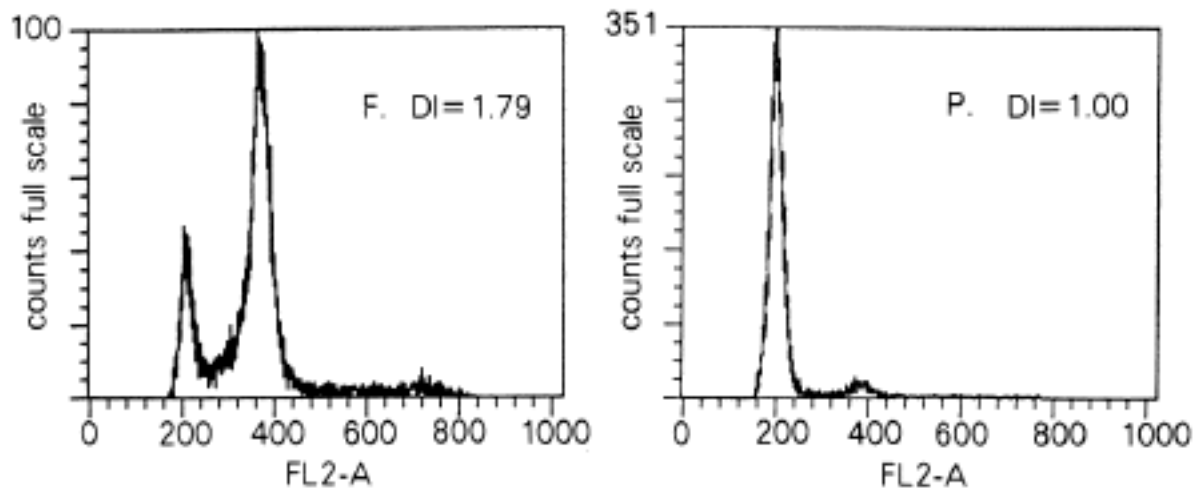


Fig. 3. DNA discordant case. Typical aneuploid peak in fresh tissue(left) but no aneuploid peak in paraffin-embedded tissue (right) (case 16).

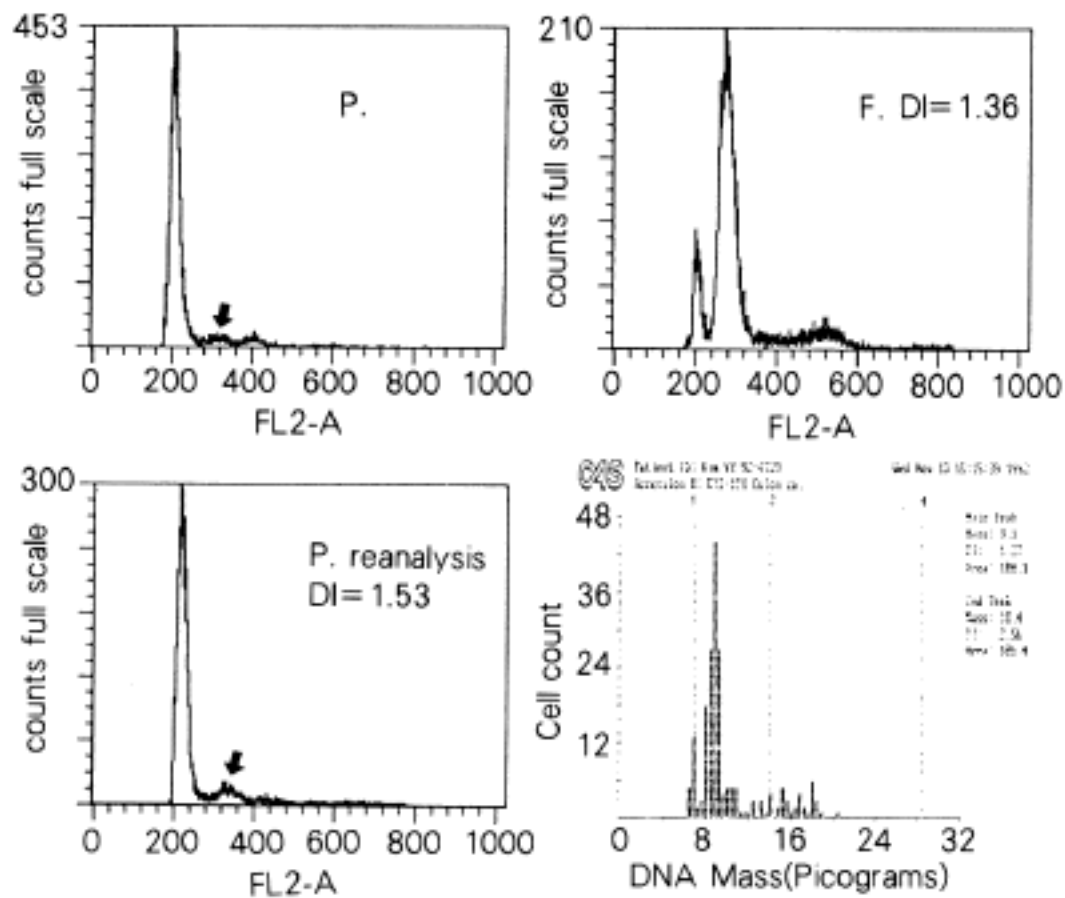


Fig. 4. S-phase irregularity in paraffin tissue (left above) and more prominent hump with DI 1.53 in reanalysis of paraffin-embedded tissue (left below, arrow). Compare with an aneuploid peak in fresh tissue (DI 1.36, right above) and image analysis (DI 1.27, right below) (case 20).

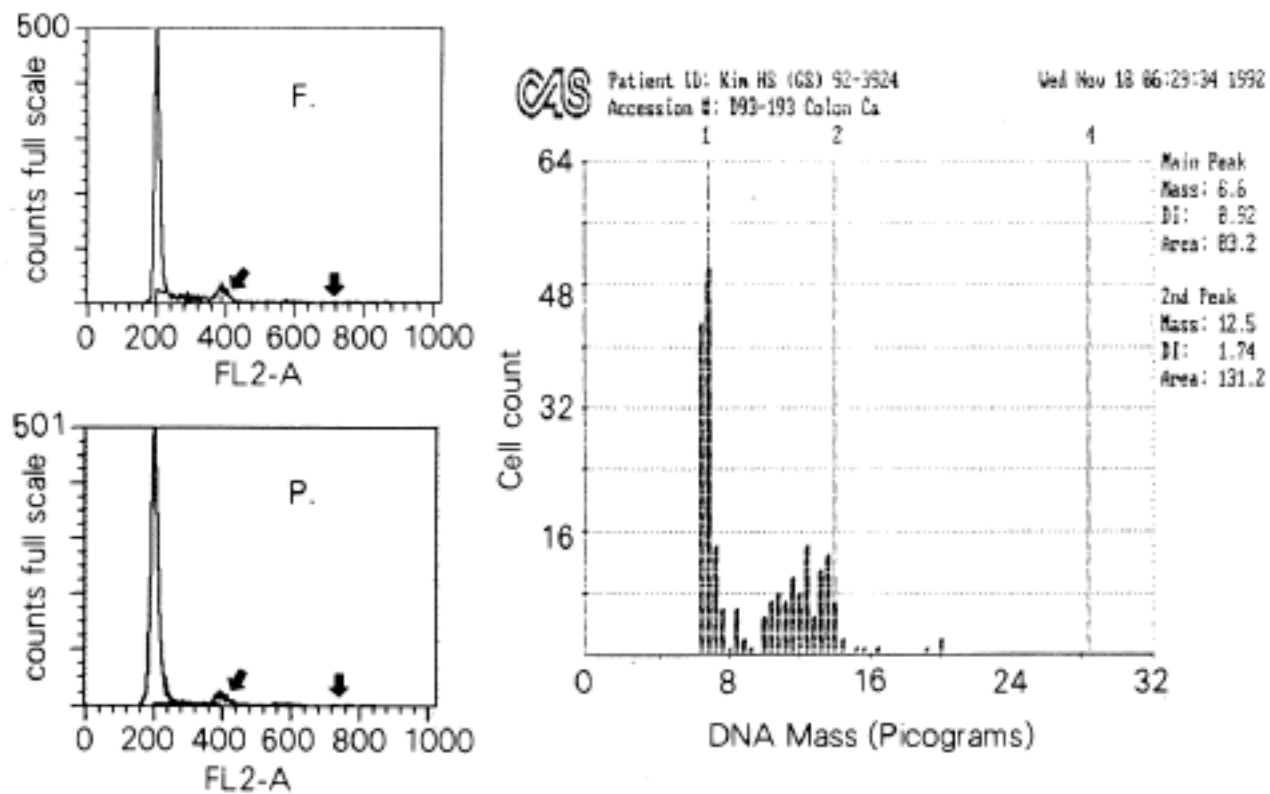


Fig. 5. Split of G2/M peak and successive appearance of hypertetraploid cells (arrow) in both fresh and paraffin-embedded tissues. Image analysis reveals small aneuploid peak at DI 1.74 (case 22).

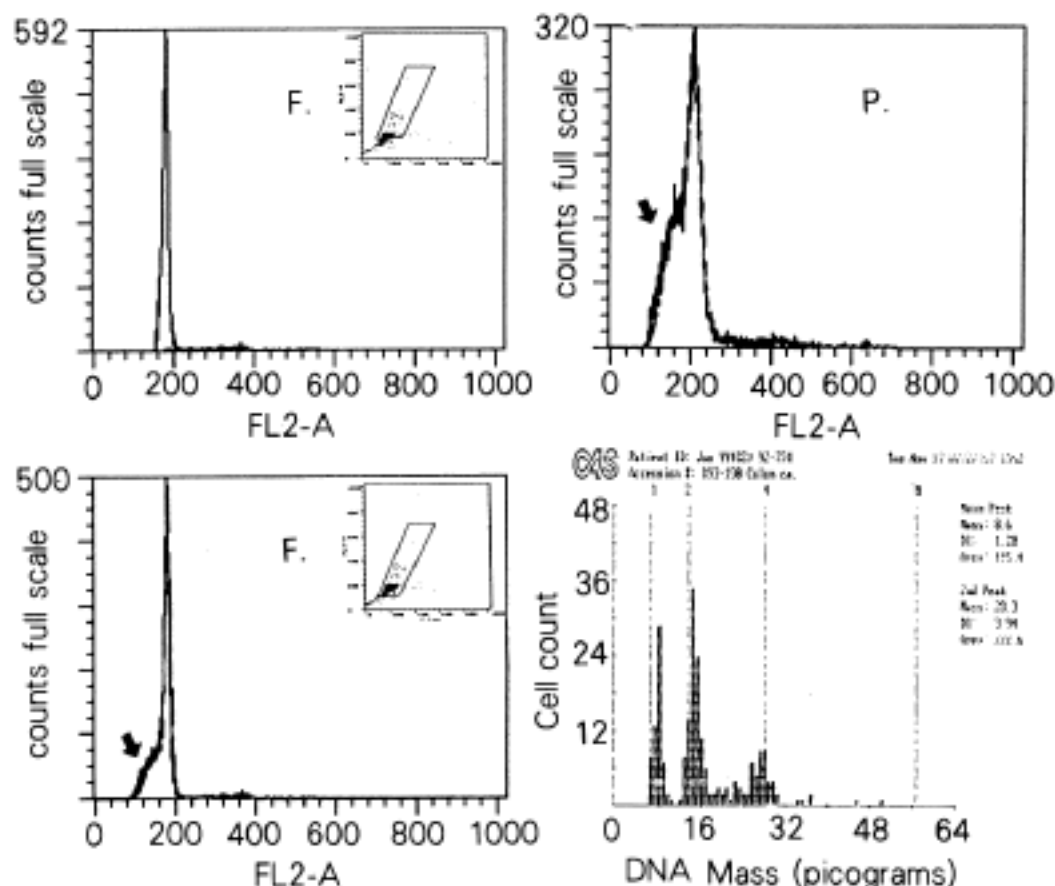


Fig. 6. Incorrectly gated histogram interpreted as diploidy (left above), and correctly gated histogram in fresh tissue (left below) and paraffin-embedded tissue (right above) revealing peridiploid aneuploid peak (arrow). Multiploidy with DI 1.28, 2.10 and 3.94 in image analysis (right below) (case 26) (inset; dot plot).

shoulder가 있어 비배수성의 가능성이 제기되어 압착도발로 화상분석 한 결과 증례 22에서는 DI 1.74에 해당되는 극과가 관찰되었고(Fig. 5), 증례 23에서는 사배수성으로 분류되었다. 나머지 3예(증례 24~26) 중 증례 24와 증례 25에서는 gate로 얻어진 신선조직의 히스토그램에서 보드라운 G2/M 극과가 사배수성을 의심케 했으며 증례 26에서는 분리된 G2/M 극과와 S 분획에 불규칙한 작은 극과들이 관찰되고 파라핀포매조직의 히스토그램에서는 분명한 이배수성부근의 비배수성 극과가 관찰되어서 dot plot를 재검토해보니 증례 24와 25에서는 8n부근에 사배수성의 G2/M에 부합되는 dot들이 발견되어 사배수성으로 재분류되었다. 증례 26에서는 신선조직의 DNA 히스토그램에서 뚜렷한 극과 앞쪽으로 hump가 관찰되었는데(Fig. 6, F left below), 이를 조직과편에 의한 것으로 간주하고 잘못 gating하여 얻은 히스토그램(Fig. 6, F left above)을 이배수성으로 판독하였다. 그러나 파라핀포매조직에서도 조직과편에 의한 signal과 별도로 신선조직에서보다 더 큰 shoulder를(Fig. 6, P, arrow) 볼 수 있었다. 이를 화상분석으로 시행한 결과 DI 1.28, 2.10, 3.94에 해당되는 다배수성 극과가 관찰되어, 비배수성 세포집단이 이배수성 세포집단보다 많고 chicken RBC로 내부 표준검체를 사용하지않아 발생한 오류로 판단하였다.

Table 2. Comparison of ploidy and CV of DNA histogram from fresh and paraffin tissue of colorectal carcinomas

Ploidy/Tissue	Fresh	Paraffin
Aneuploidy(%)	19/26(73.0%)	13/26(50.0%)
Range of D	4.0~6.7(4.9%)	3.0~6.9(5.6%)
CV(mean)% A	2.3~8.6(4.8%)	2.2~6.8(5.3%)

* CV; coefficient of variation, A; aneuploidy, D; diploidy

결과적으로 DNA 분석에서 신선조직 26예 중 비배수성은 19예(73.0%)였고 DNA지수는 0.60에서 1.94의 분포를 보였으며 이배수성 집단의 CV는 4.0%에서 6.7%까지 분포되어 있었고 평균 CV는 4.9%이었다. 동 예의 파라핀포매조직으로 분석한 결과 비배수성은 13예(50.0%)로 신선냉동조직으로 분석한 예에서보다 낮은 비율을 보였고, 이배수성집단의 CV는 3.0%에서 6.9%까지 분포하였고 평균 CV는 5.6%이었다. 또한 신선조직과 파라핀포매조직의 배수성은 20예(76.8%)에서 일치하였고 6예(23.2%)에서 불일치 하였으며 관독자간의 일치율은 26예 중 19예(73.0%)였다

(Table 2).

고 안

종양에서의 DNA 함량이 생물학적 예후인자로서 인정되어오고 있지만 그 임상적 중요성에 대해서는 아직 논란의 대상이 되고 있다^{7,8)}. 그러나 그 중 유방암⁹⁾이나 대장암¹⁰⁾, 방광암¹¹⁾, 난소상피암¹²⁾ 및 전립선암¹³⁾ 등에서는 독립적인 예후인자로서 혹은 임상병기나 조직학적 등급과 관련된 예후인자로서 상용검사의 하나로 쓰여지고 있는 추세이다. 국내에서도 유세포추정기의 보급과 더불어 이에 관련된 연구들이 다수 발표되고 있다¹⁴⁻¹⁶⁾. Hedley 등¹⁾에 의해 파라핀포매조직을 이용한 유세포 측정법이 개발됨에 따라 많은 양의 보존된 조직을 이용한 후향성연구도 가능하게 되었으며 파라핀포매조직으로 분석할 경우 발생하는 여러 단점에도 불구하고 많은 논문에서 그 결과가 신선조직의 결과와 비교할만하다고 보고되어 있다. Frierson 등³⁾에 의하면 30예의 고형암종 중 26예(87.0%)에서 파라핀포매조직과 신선조직의 결과가 일치하였고 4예에서 불일치하였는데 그 중 2예는 다시 파라핀포매조직으로 분석하였더니 처음 분석 시 없었던 과이배수성 극과가 나타나서 배수성의 이질성이라고 보았다. 그러나 나머지 2예에서는 신선조직의 결과에서 보인 이배수성 근처의 비배수성이 나타나지 않았다. 이들은 신선조직이 배수성을 판단하기에 더 좋기는 하나 치료에 대한 반응이나 예후를 위해 고형암종의 배수성을 비교하는 후향성 연구를 위해서는 파라핀포매조직으로 유세포분석하는 것도 유용하다고 하였다. 그러나 파라핀포매조직을 이용한 경우와 신선조직에서의 비배수성 극과의 출현도에 차이가 있을 뿐 아니라 DNA 히스토그램을 분석하는 기준도 관독자간에 차이가 있어 DNA 비배수성의 임상적 의의에 관해 이견이 있다. 이에 본 연구에서는 한국에서 비교적 흔히 접하는 대장암종을 대상으로 파라핀포매조직과 신선조직 모두에서 DNA 배수성을 분석하였고 6명의 관독자가 히스토그램을 분석하여 일치율을 검토하였다.

신선조직에서 분석한 26예에서 비배수성이 73.0%였는데 이는 외국에서 보고한^{2,17-19)} 신선조직에서의 비배수성 비율인 62.0%~82.0%(평균 73.0%)에 상응하는 비율을 보였다. 동예의 파라핀 포매된 대장암종 26예 중 비배수성 비율은 50.0%로 외국에서 파라핀포매조직으로 분석한 비배수성 비율인^{10,20-22)} 54.0%~69.0%(평균 61.2%)보다 낮은 결과를 보였으며 국내에서 임등²³⁾이 보고한 파라핀 포매된 38예의 대장암종의 비배수성 비율인 48%와 비슷하였다. 이와같이 파라핀포매조직에서의 비배수성 비율이 일반적으로 낮은 원인으로 많은 조직파편과 넓은 CV에 의해 적은 양의 비배수성 군집이 가리거나 검체조작 도중 그 수가 소실되었을 가능성이 크다. 그러나 26예의 파라핀포매조

직 중 50%의 비배수성 비율은 저자들이 발표했던²⁴⁾ 35예의 파라핀 포매된 대장암종을 유세포분석한 결과인 34.2%의 비배수성 비율보다는 높아졌는데 그 원인으로 검체조작상의 문제와 히스토그램 분석상의 문제를 들 수 있겠다. 검체조작과정이 잘 되있는 가의 판정은 G0/G1극과의 CV 값으로 평가할 수 있는데, 이전의 35예의 파라핀포매조직에서의 CV는 평균 6.5%인데 반해 본 연구에서의 파라핀포매조직의 CV는 평균 5.4%로 CV값을 낮출 수 있었던 것도 비배수성의 비율을 높이는 데 공헌하였다고 생각되나 더 큰 원인으로서는 히스토그램 분석의 차이라고 생각된다. Wersto 등⁴⁾에 의하면 기관간 차이점은 재료의 선택과 준비, DNA 염색과정, 기계적 조작과정과 히스토그램 분석 등에 의해 발생된다고 하였으며, 검체조작상의 문제는 check sample을 사용한 자가수정으로 효과가 있으나 DNA 히스토그램의 분석은 애매한 극과의 출현, 증가된 G2/M 극과의 해석, 넓은 CV와 조직파편으로 인한 히스토그램 분석의 차이, 그리고 DNA 비배수성을 정하는 기준에 따라 차이가 있기 때문이다.

본 연구에서 배수성이 일치한 15예에서는 DNA 지수가 매우 일치하는 경우도 있었지만 상당히 차이가 있는 경우도 있었고 신선조직에서는 분명한 비배수성 극과가 보이지만 파라핀포매조직에서는 이배수성 극과가 한쪽으로 치우치거나 shoulder만 보여 비배수성이 의심되나 분명한 비배수성 극과는 보이지 않는 경우도 있었다. 이런 경우 파라핀포매조직의 넓은 CV로 인해 이배수성 극과 근처에 있는 비배수성 극과가 분리되지 못했기 때문으로 히스토그램 분석에 유의하여야 한다. 증례 20과 증례 21에서 다른 파라핀 불력을 선택하여 분석해 본 결과 배수성의 양상이 확실해졌는데 파라핀 불력을 선택할 때 될수록 과사가 적고 종양세포로만 구성된 부위를 선택하여 유세포 분석하는 것이 좋겠다. Wersto 등²⁵⁾은 60예의 대장암종을 각 예마다 3개의 검체를 채취하여 유세포 분석한 결과 63.3%만이 3개의 검체 모두에서 배수성이 일치하였고 나머지는 3개의 검체 중 1개의 검체에서는 배수성이 일치하지 않아 적어도 한 예 당 3개 이상의 검체를 분석하기를 권했다. 또 증례 22와 23에서와 같이 비배수성이 의심스러우나 확실치 않은 경우 화상분석기로 분석해보면 비배수성이 뚜렷해지는데 이는 화상분석의 장점 중 하나인 직접 종양세포를 선택하여 분석할 수 있기 때문이다. 유세포분석과 화상분석의 결과를 비교한 논문들을 보면 불일치한 경우 대개 유세포분석에서 관찰되지 않았던 비배수성 극과가 화상분석에서 나타난 경우들이었다^{26,27)}. 화상분석 재료로는 신선냉동조직이 보관되어 있지 않은 경우라도 파라핀포매조직의 세포부유액을 도말하여 분석해보면 파라핀포매조직으로 유세포분석 시의 넓은 CV를 보완 할 수 있어 특히 파라핀포매조직으로 유세포분석 시 매우 가치있는 통제방법이라고 하였다²⁸⁾. 사배수성의 정의로 G2/M 분획의

크기가 임의의 기준이상으로 증가되어 있을 때로 정하고 있으나 그 기준이 다양하여 S와 G2/M구획의 세포수가 비정상적인 관계를 보일 때나 5N 이상의 세포수가 증가한 경우 사배수성으로 분류하는것이 좋다고 하였으며²⁰⁾ 증례 24와 25의 히스토그램에서처럼 G2/M분획이 애매하게 증가되어있을 때 dot plot에서 5n 이상의 dot가 많이 나타나는 것을 확인하면 사배수성의 분류에 도움이 될 수 있다고 생각한다. 증례 26의 경우는 잘못된 gating으로 인해 비배수성을 이배수성으로 분류해버리는 실수를 하였는데 dot plot에서 gating시 주의를 기울이기 바라고 5N 이상의 dot들이 관찰되었을 때는 이를 포함하여 gate하여야 되리라 생각되며 doublet를 잘 판별할 수 있고 또한 엄격한 세포주기분석을 위한 좀 더 좋은 통계적인 분석 프로그램이 나오기 바란다.

결 론

대장암종의 비배수성 비율은 신선조직에서 유세포분석 시 73.0%였으며 파라핀포매조직에서 50.0%로 파라핀포매조직으로 시행할 경우가 비배수성의 빈도가 낮음을 알 수 있었고, 동일한 예를 두 방법으로 분석했을 때 배수성의 일치율은 76.8%이며 관독자간에 일치율은 73.0%였다. 비배수성을 확인하는데는 신선조직이 우수하다고 생각되어 가능한 한 신선조직의 이용이 필요하며 히스토그램 분석 시 표준기준에 입각한 배수성의 분류와 세밀한 관찰이 관독자간의 불일치율을 낮추리라 사료된다.

참 고 문 헌

- 1) Hedley DW, Friedlander ML, Taylor IW, Rugg CA, Musgrove EA. *Method for analysis of cellular DNA content from paraffin-embedded archival material using flow cytometry. J Histochem Cytochem* 1983; 31: 1333-5.
- 2) Emdin SO, Stenling R, Roos G. *Prognostic value of DNA content in colorectal carcinoma, a flow cytometric study with some methodologic aspects. Cancer* 1987; 60: 1282-7.
- 3) Frierson HF. *Flow cytometric analysis of ploidy in solid neoplasm, comparison fresh tissues with formalin-fixed paraffin-embedded specimen. Hum Pathol* 1988; 19: 290-4.
- 4) Wersto RP, Liblit RL, Koss LG. *Flow cytometric DNA analysis of human solid tumor, a review of the interpretation of DNA histograms. Hum Pathol* 1991; 22: 1985-98.
- 5) Camplejohn RS, Macarthey JC. *Comparison of DNA flow cytometry from fresh and paraffin em-*

- bedded samples of non-Hodgkin's lymphoma. J Clin Pathol* 1985; 38: 1096-9.
- 6) Joensuu H, Klemi P, Eerola E. *DNA aneuploidy in follicular adenomas of the thyroid gland. Am J Pathol* 1986; 124: 373-6.
- 7) Uyterlinde AM, Schipper NW, Baak JPA, Peterse H, Matze E. *Limited prognostic value of cellular DNA content to classical and morphologic parameters in invasive ductal breast carcinoma. Am J Clin Pathol* 1988; 89: 301-7.
- 8) Friedlander ML, Hedley DW, Taylor HI. *Clinical and biological significance of aneuploidy in human tumors. J Clin Pathol* 1984; 37: 961-74.
- 9) Auer G, Eriksson E, Azabedo E, Caspersson T, Wallgren A. *Prognostic significance of nuclear DNA content in mammary adenocarcinoma in humans. Cancer Res* 1984; 44: 394-6.
- 10) Kokal W, Sheibani K, Terz J, Harada R. *Tumor DNA content in prognosis of colorectal carcinoma. JAMA* 1986; 255: 3123-7.
- 11) Tribukait B, Gustafson H, Esposti PL. *The significance of ploidy and proliferation in the clinical and biological evaluation of bladder tumor. A study of 100 untreated cases. Br J Urol* 1982; 54: 130-5.
- 12) Friedlander ML, Hedley DW, Taylor IW, Russel P, Coates AS, Tattersall MHN. *Influence of cellular DNA content on survival in advanced ovarian cancer. Cancer Res* 1984; 44: 397-400.
- 13) Franfur OS, Chin JL, Englander LS, Greco WR, Pontes JE, Rustum YM. *Relationship between DNA ploidy, glandular differentiation and tumor spread in human prostate cancer. Cancer Res* 1985; 45: 1418-23.
- 14) 김윤미, 정상우, 유주용, 조규혁. 난소 점액성 종양의 DNA ploidy 유형에 관한 연구, 대한병리학회지 1991; 25: 397-406.
- 15) 김성숙, 박석진, 한동선, 허만하. 간세포암종의 DNA 분석, 유세포 분석법과 화학분석법의 비교 고찰, 대한병리학회지 1992; 26: 1-9.
- 16) 이흥기, 서광선, 강대영, 박종우. 전립선 선암종의 조직학적 분화도와 DNA ploidy. 대한병리학회지 1993; 27: 40-9.
- 17) Russo A, Bazan V, Plaja A, Leonardi P, Bazan P. *Patterns of DNA-ploidy in operable colorectal carcinoma, a prospective study of 100 cases. J Surg Oncol* 1991; 48: 4-10.
- 18) Kouri M, Pyrhonen S, Mecklin JP, Jarvinen H, Laasonen A, Franssila K, Nording S. *The prognostic value of DNA-ploidy in colorectal carcinoma: a prognostic study. Br J Cancer* 1990; 62: 976-81.
- 19) Hiddemann W, Bassewitz DBV, Kleinemeier HJ, Brochterbeck ES, Hauss J, Lingemann B, Buchner T, Grundmann E. *DNA stemline heterogeneity in*

- colorectal cancer. Cancer* 1986; 58: 258-63.
- 20) Quirke P, Dixon NF, Clayden AD, Durdey P, Dyson JD, Williams NS, Bird CC. *Prognostic significance of DNA aneuploidy and cell proliferation in rectal adenocarcinomas. J Pathol* 1987; 151: 285-91.
- 21) Baretton G, Gille J, Oevermann E, Lohrs U. *Flow-cytometric analysis of the DNA-content in paraffin-embedded tissue from colorectal carcinomas and its prognostic significance. Virchows Arch B Cell Pathol* 1991; 60: 123-31.
- 22) Schutte B, Reynders MMJ, Wigger T, Arends JW, Volovics L, Bosman FT, Blijham GH. *Retrospective analysis of the prognostic significance of DNA content and proliferative activities in large bowel carcinoma. Cancer Res* 1987; 47: 5494-6.
- 23) 임채용, 채권묵. 대장 및 직장암에서 DNA ploidy의 예후인자로서의 의의. *외과학회지* 1991; 41: 467-72.
- 24) 남은숙, 김인선, 정순희, 정우희, 서연림. 유세포 측정기를 이용한 대장암종 신선조직과 파라핀포매조직에서의 DNA 함량과 세포주기분석 비교. *대한병리학회지 (부록)* 1992; 26: A74.
- 25) Wersto RP, Liblit RL, Deitch D. *Variability in DNA measurements in multiple tumor samples of human colonic carcinoma. Cancer* 1991; 67: 106-15.
- 26) Bauer TW, Tubbs RR, Edinger MG, Suit EP, Gephardt GN, Levin HS. *A prospective comparison of DNA quantitation by image and flow cytometry. Am J Clin Pathol* 1990; 93: 322-6.
- 27) Claud RD, Weistein RS, Howeedy H, Straus AK, Coon JS. *Comparison of image analysis of imprints with flow cytometry for DNA analysis of solid tumors. Mod Pathol* 1989; 2: 463-7.
- 28) McFadden PW, Clowry LJ, Daehnert K, Hause LL, Koethe SM. *Image analysis confirmation of DNA aneuploidy in flow cytometric DNA distributions having a wide coefficient variation of the G0/G1 peak. Am J Clin Pathol* 1990; 93: 637-42.