

유식세포 분석법에 의한 진도개 전파성 성기육종의 DNA Ploidy 유형분석

박남용, 정치영, 이계웅, 박영석

전남대학교 수의과대학

Flow cytometry analysis of DNA ploidy of transmissible venereal tumors in the Jindo dogs

Nam-Yong Park, Chi-Young Chung, Gye-Woong Lee, Young-Seok Park

College of veterinary medicine, Chonnam National University

Abstract. Transmissible venereal tumor(TVT) is a naturally occurring contagious neoplasm which can be transmitted by mechanical contact during mating in dogs and transplanted as intact viable cells to dogs and other members of canine family such as coyotes, jackals, wolves, and foxes. The incidence of this tumors tends to increase in Korean native Jindo dogs. This is probably due to the high density and unrestrained management system. With time, TVT reaches the maximum size and then tends to regress spontaneously unless individuals are immunologically compromised. It consists of different types of cells depending on the stage. In this study, 10 tumors were selected from Jindo dogs. These were histologically calssified into three stages; progressive, steady-state, and regressive. Mitotic figures were counted, and their histological appearance at each stage is compared with their DNA ploidy. Histologically, 5 tumor cases were calssed as the progressors, 3 cases as the steady-state tumors, and 2 cases as regressors. Progressors were composed of round cells with large nuclei containing conspicuous nucleoli and frequent mitotic figures. A few spindle-shaped cells and inflammatory cells including mainly lymphocytes, a few neutrophils and macrophages were also seen. In the steady-state tumors, there was an increased number of spindle shaped cells and mitotic figures were rare. Six tumors were diploid and four were aneuploid with the variation coefficient of 7.02. Two of five progressive tumors were aneuploid. Two of three steady-state tumors were aneuploid while both tumors at the regressive stage were diploid. Progressive and steady-state tumors had a much larger S/G2M fraction and a higher mitotic index than regressive tumors. Two tumors which persisted for more than one year were aneuploid. These results suggest that the progressive and steady-state tumors had more active cell division than the regressive neoplasms.

Key words: transmissible venereal tumor, DNA ploidy, Flow cytometry, TVT

서 론

개의 전파성 성기육종(transmissible venereal tumor; TVT)은 스티커육종(Sticker's Sarcoma) 등 여러 가지 이름으로도 불리우며, 일반적으

로 이환견과의 교미나 핥는 등의 직접적인 접촉 수단에 의해 전파되어 개의 음경이나 질부와 같은 외음부 생식기에 발생한다(Nielson and Kennedy, 1990). 이러한 특징 때문에 생식 능력이 가장 왕성한 때에, 암컷

이 수컷 보다 발생하기 쉽고 처녀 개에서는 발생되지 않으며 개를 자유롭게 풀어놓고 키우는 경향이 있는 곳에서 전파빈도가 높다(Nielson and Kennedy, 1990; Richardson, 1981).

본 종양의 발생 원인과 기원에 대해서는 확실하게 규명되지는 않았지만(Nielson and Kennedy, 1990; Bostock and Owen, 1975; Chevillat, 1983; Theilen and Madewell, 1987) 세포를 형질 전환시키는 바이러스에 의해 유발되지 않고 살아있는 종양 세포를 이식함으로써 유발되는 것으로 보고되고 있다(Nielson and Kennedy, 1990; Yang and Jones, 1973). 현재까지는 종양의 유래에 관해서는 stemline linear 가설이 지지를 받고 있는 바, 1) 종양은 살아있는 완전한 종양 세포의 이식에 의해 전파되고 2) 새로운 종양은 이식된 세포의 증식에 의해서만 형성되며 3) 핵형(karyotype)이 세계적으로 단일하게 나타난다(Nielson and Kennedy, 1990; Richardson, 1981). 실제적으로 개의 정상 세포의 염색체는 78 개인데 그 중 둘만을 제외하고는 모두 말단동원염색체인 반면 TVT의 염색체는 대개 58~59 개인데 이 중 13~17 개가 중부동원염색체이고 나머지 42 개가 말단동원염색체이다(Nielson and Kennedy, 1990; Richardson, 1981; Katzir 등, 1985; Barski and Cornefert, 1966; Makino, 1963; Murray 등, 1969; Weber 등, 1965). TVT는 인위적으로 피하에 이식했을 때 이식후 2~3 주경에 직경 3~6mm 크기가 되고 5~7 주경에는 최대 크기에 도달한 뒤 자연적으로 퇴축하기 시작하여 6 개월내에 완전히 퇴축하는 것으로 알려져 있다(Nielson and Kennedy, 1990; Yang and Jones, 1973). 조직학적으로 TVT는 그 진행 단계에 따라 성장기(progressor), 성숙기(steady-state), 퇴축기

(regressor)로 분류할 수 있는 바(Hill 등, 1984; 박과 조, 1984), 성장기에는 원형의 종양 세포가 주를 이루지만 성숙기에 도달한 후에는 방추형 세포의 수가 증가하고 염증 세포가 점진적으로 증가하다가 퇴축기에는 교원 섬유증의 증식이 진행된다(Hill 등, 1984; 박과 조, 1984; Kennedy 등, 1977). TVT의 종양 세포를 세포 배양할 경우, 처음에는 대부분의 종양 세포와 소수의 섬유아세포로 배양되다가 점차적으로 종양 세포가 사라지고 나중에는 섬유아세포로 모두 대체되는 것으로 보고되었다(Okamoto 등, 1988).

최근에 종양의 악성도 및 예후를 판정하는 방법으로서 종양 세포 핵의 DNA 함량의 분포, DNA ploidy 패턴을 분석 이용하고자 하는 연구가 활발히 진행되고 있다. 이러한 DNA 배수성의 측정법으로는 유식세포 분석법(정과 유, 1990; 남, 1991; Reagan 등, 1992; Aly 등, 1992) 화상 분석법(Danque 등, 1993; 김, 1990; 윤, 1990)이 보편화되고 있는 바, 이 중 유식세포 분석법에 의한 측정은 다수의 세포를 신속하게 처리할 수 있고 핵의 크기, 세포의 다른 phenotype을 동시에 측정할 수 있는 장점을 가지고 있다(Barlogie, 1983; Frazier 등, 1993). 한편, 최근에는 신선한 조직뿐만 아니라 포매된 조직에서의 DNA 배수성 측정이 가능해짐에 따라 이미 알고 있는 임상 및 조직 병리학적 정보를 토대로 종양의 배수성과 종양의 악성도 및 조직학적 소견과의 관계를 비교할 수 있게 되었다(Hedley 등, 1983; Hedley 등, 1985; Hedley, 1989).

이에 본 연구에서는 TVT를 임상 및 조직학적으로 발육기, 성숙기, 퇴축기의 진행 단계별로 분류하고 이들과 DNA 배수성과의 상관 관계를 알아보려고 시도하게 되었다.

재 료 및 방 법

연구 대상

최근 3년간 전남대학교 수의과대학 수의 병리학교실에 의뢰해 들어와 병리 조직학적으로 개의 TVT로 진단된 예 중 발생 숙주 동물의 품종이 진도견이고 또 전체 병변을 대표할 수 있는 10예를 연구 대상으로 하였다. 성별을 살펴보면 8 마리가 암컷이고 2 마리가 수컷이었으며, 연령 분포는 1.5~7 년령이었다(Table 1). 종양은 외과적으로 적출하여 그 크기와 출혈 및 괴사 여부를 검사하였고 가장 상태가 양호한 부위를 택하여 병리 조직학적 검사를 위한 시료를 채취하였고, 유식세포 분석법을 위해 신선한 조직을 냉동 보관하였다.

광학 현미경적 관찰

조직 검사를 위한 종양 조직의 채취는 신선한 조직의 유식세포 분석을 위한 부분과 접하도록 절단한 단면부를 이용하였다. 채취한 조직은 10% 중성 포르말린액에 고정한 후 탈수하여 파라프라스트에 포매하였고,

3~4um의 절편을 제작하여 H-E 염색을 실시, 광학 현미경으로 관찰하였다.

조직학적 유형에 따른 분류. 본 종양의 조직학적 분류는 주로 Hill 등(1984)이 보고한 분류법을 기준으로 하여 이를 변형 보완한 분류법을 이용하였으며 Table 2와 같다.

Flow cytometry에 의한 DNA ploidy 측정

파라핀 포매 조직. 광학 현미경 관찰을 위해 3~4um의 절편을 제작하고 남은 바로 다음의 파라핀 조직을 유식세포 분석에 이용하는데 Hedley 등(1983; Hedley 등, 1985; Hedley, 1989).과 Jacobson(1988)의 방법을 다소 변형시켜 파라핀 조직괴로부터 세포 부유액을 만들었다. 먼저 파라핀 포매 조직괴를 70um의 두께로 절편을 만든 다음 이를 xylene으로 30분간 2회 실온에서 처리하여 파라핀을 제거하였고 무수 및 단계적 ethanol 용액과 증류수를 거쳐 함수시켜 citrate buffer(NP-40함유)에 1시간 반응시켰다. 조직내 citrate buffer를 완전히 제거한 후 큰 조직은 가위로 마쇄하고 각각의 tube에 2.0ml의 0.25% trypsin을 가하고 인큐베

Table 1. Summary of clinical, histological and flow cytometric data of canine transmissible venereal tumor in Jindo dogs.

Number of case	Age (yr)	sex	First detection of clinical signs (before surgery)	Tumor size(cm)	Necrosis & Hemorrhage	Histological classification	Mitotic figure (x/5000)	Lymphocyte infiltration	DNA ploidy	C.V (%)
1	3	F	2 Months	5	-	P	61	-	A	
2	2	F	10 Days	3	-	P	115	-	D	10.3
3	7	F	2 Years	15	+	S.S	49	+	A	
4	5	F	3 Months	7	+	S.S	42	+	D	10.0
5	2	M	15 Days	4	+	R	30	++	D	6.8
6	10	F	6 Months	5	+	R	27	+	D	4.8
7	1.5	F	2 Months	3	-	P	70	-	A	
8	4	F	1.1 Years	10	+	S.S	55	+	A	4.7
9	3	M	1 Months	5	+	P	98	+	D	5.8
10	3	F	2 Months	6	-	P	107	-	D	6.6

F : Female, M : Male, - : Negative, + : Mild, ++ : Severe
 P : Progressor, S.S : steady-state tumor, R : regressor,
 A : aneuploidy, D : diploidy

이터에서 overnight로 부치한다. 이 때 overnight 전, 중, 후에 23~24G syringe로 syringing하도록 하며 incubation이 끝난 후에는 2시간 동안 aliquot mixer를 이용해 세포가 잘 유리되도록 하였다. 이어 각각의 tube를 1000rpm에서 10분간 원심 분리하여 상층액을 완전 제거한 후 각각의 tube에 citrate buffer를 0.5ml 가하여 vortex mixing을 하였다. 세포 부유액을 60 μ m 구경의 nylon mesh를 통해 여과시켜 여과액내의 유리세포가 $2 \times 10^6/ml$ 가 되도록 조정하여 최종 부유액을 만든 후 trypsin으로 10분간 실온에서 부치시키고 trypsin inhibitor와 RNase로 10분간 부치시켰으며 0.416% propidium iodide와 spermine tetrahydrochloride로 20분간 40 $^{\circ}$ C 암실에서 부치시켜서 Jindelv 염색을 실시하였다. 염색된 세포 부유액을 15

milliwatt argon-ion laser에 부착된 FACSCAN(Becton Dickison) Flow cytometry를 이용하여 DNA ploidy를 측정하였다. 측정시의 excitating wave length는 488nm이었고 초 당 100 ~ 500개의 세포가 측정되도록 유속을 조정하여 최소 10,000개의 세포가 측정되도록 하였으며 내부 기준은 diploid G0/G1 peak를 이용하였다. 평균 변이 계수 (coefficient of variation:CV)는 표준 편차를 평균치로 나눈 값으로 산정하였다.

신선한 동결 조직. 광학 현미경 관찰을 위해 절단된 단면부에 접한 부위를 유식세포 분석법에 이용하였다. 채취한 신선 조직은 일단 보관을 위해 -70 $^{\circ}$ C에 냉동 보관하였다. 냉동된 조직은 실온에서 해동시킨 후 PBS(phosphate-buffered saline)을 가지고

Table 2. Histological classification of transmissible venereal tumor(Hill 등, 1984)

가. 성장기(Progressor)

- 1) Round cell 대 spindle-shaped cell의 비는 95% 이상이다.
- 2) Mitotic activity는 400배 시야당 5개까지 출현한다. 여기서 MI (mitotic index)는 임의로 측정한 5000개의 세포 중 핵 분열 세포 수의 합을 계산한 것으로
 - a) Low : < 30 / 15000
 - b) Intermediate: 30~60 / 5000
 - c) High: > 60 / 15000 로 나누었고 60 / 15000 이상의 것은 progressor로 간주하였다.
- 3) 종피내 교원 섬유소의 비율이 1% 이하이다.
- 4) 림프구, 형질 세포, 호중구, 호산구, 대식구 및 섬유아세포의 침윤이 거의 드물다.

나. 성숙기(Steady-state)

- 1) Round cell대 spindle-shaped cell의 비가 70~90%이다.
- 2) Mitotic activity는 mitotic figure가 "healthy" round cell의 세포소에서 1개 정도 출현한다.
- 3) 종피내에서 교원 섬유소의 비율은 8~10%이다.
- 4) 림프구, 형질 세포, 호중구, 호산구, 대식구 및 섬유아세포양 세포가 progressor에서 보다 약간 빈번하다.

다. 퇴축기(Regressor)

- 1) Round cell 대 spindle-shaped cell의 비는 10%이다.
- 2) Mitotic activity는 400배 시야당 관찰되지 않는다. 통상 30 / 5000 이하의 것은 regressor로 간주한다.
- 3) 종피내 콜라겐 섬유소의 비율이 85~99%이다.
- 4) 림프구, 형질 세포, 호중구, 호산구, 대식구 및 섬유아세포양 세포의 침윤이 많다.

4°C에서 30분 간격으로 3번 세척하였고 조직에 남아있는 PBS를 제거하기 위해 거즈로 흡수시켰다. 멸균된 petri dish에 citrate buffer를 넣고 그 곳에 조직을 담근 다음, 날카로운 외과용 칼날이나 가위를 이용하여 조직을 잘게 잘라 현탁액을 만들었으며 이를 15ml용 falcon tube에 넣고 실온에서 30분 동안 계속 흔들어서 잘 섞이도록 혼합하였다. 이 세포부유액을 60um 구경의 nylon mesh를 통해 여과시켜 여과액 내의 유리 세포수가 $2 \times 10^6/\text{ml}$ 가 되도록 조정하여 최종 부유액을 만들었고 이 후의 진행은 파라핀 포매 조직의 경우와 동일한 방법에 준해 수행하였다.

결 과

임상 및 조직학적 소견

TVT에 이환된 진도건의 연령은 1.5세부터 7세까지 다양하게 나타났으며 2~5세가 7예로서 대부분을 차지했다(Table 1). 10예 중 8예가 암컷이었고 나머지 2예가 수컷이었다. 종양 발생의 첫 징후는 외음부 출혈, 교미시 종양 발생부의 외부 노출(수컷), 발정기 동안의 노출(암컷), 촉진 등으로서 축주의 관찰이나 수의사의 검진 중에 발견 또는 확인되었다. 따라서 종양의 형성은 처음 확인된 날짜 훨씬 이전에 발생되었을 가능성이 컸으며, 한편 종양 발생 날짜가 6개월 이상으로 확인된 예도 3예가 있었다. 종양의 크기는 직경 3cm부터 15cm에 이르기까지 다양하게 나타났으며 발생 부위는 수컷의 경우 음경 후부(caudal part)에 발생하였고 암컷의 경우는 질부가 가장 많았고 질 전정부에서도 발생하였다. 종양은 꽃 양배추 모양(cauliflower-like)이나 결절상 혹은 유두상으로 나타났으며 분엽화된 것도 관찰되었다. 또, 종양에 따라 표층부가 출혈, 괴사 소견을 나타냈으며 염증

및 괴양 소견을 보인 것도 있었다.

본 TVT에 대한 조직학적 검색 결과 10예 중 발육기 종양(progressor)은 5예였고 성숙기 종양(steady-state tumor)은 3예였으며 나머지 2예는 퇴축기 종양(regressor)으로 분류되었다(Table 1).

발육기 종양은 큰 핵과 핵인을 가진 치밀 배열의 원형 종양 세포로 구성되어 있고 그 밖에 소수의 방추형 세포(spindle-shaped cell) 및 소수의 림프구, 호중구, 호산구, 대식구 등도 관찰되었다. 핵 분열 상은 고배율의 한 시야당(x400) 1~5개 관찰되어 임의로 5,000개의 세포를 검사했을 때 60개 이상의 세포가 핵분열 상을 보였다. 혈관 분포는 잘 발달되어 있지 않았고 교원질 섬유의 침윤은 미약하였으며 괴사 및 괴양 소견은 거의 관찰되지 않았다.

성숙기 종양은 발육기 종양보다 원형 세포가 약간 감소하고 방추형 세포가 약간 증가한 소견을 보였다. 또한 원형 세포 이외에 핵과 세포체가 다소 장방형을 갖는 세포도 다수가 발견되었다. 림프구와 다형핵 백혈구를 비롯한 염증 세포의 침윤이 발육기 종양보다 증가했으며 괴사소 및 출혈소도 보다 빈번히 관찰되었다. 교원 섬유도 발육기 종양에 비해 증가된 소견을 보였다. 그러나 핵분열상은 감소되어 5,000개 세포당 30~60개 정도가 관찰되었다.

퇴축기 종양은 원형의 종양세포가 크게 감소하고 방추형 세포가 증가된 소견을 보였다. 또한 핵과 세포체가 장방형으로 늘어난 세포도 다수 관찰할 수 있었다. 섬유아세포와 교원 섬유는 매우 증가했으며 주로 림프구와 다형핵 백혈구를 비롯한 염증 세포 침윤 및 괴사와 출혈 소견이 많이 관찰되었다. 부분적으로 건강한 종양 세포 및 분열 세포가 모여있는 소견이 드물게 관찰되었으나 다

수의 원형 종양 세포들은 공포상의 소견을 나타내고 있었다. 때로는 림프구가 소상으로 무수히 침윤하고 있는 소견이 보였으며 그 밖에 드물지만 형질 세포 및 대식 세포도 관찰되었다.

DNA 배수성 패턴 분석

본 연구에서의 파라핀 포매 조직을 이용한 유식세포 분석은 debris fraction이 높았다. 본 실험에서 이용된 파라핀 포매 조직들은 포르말린에 상당 기간(2~5주 이상) 보존된 것들이었다. 그러나 신선한 동결 조직은 파라핀 포매 조직과는 달리 결과가 양호했다. 이 경우 DNA histogram의 평균 변이 계수(CV)는 7.02%였으며 diploid G0/G1 peak의 DNA index(channel number/mean channel number)는 1.00 ± 0.05 , G2/M peak의 DNA index는 2.0 ± 0.3 으로 측정되었다. G0/M peak와 다른 peak의 상대적 위치 및 각 peak를 구성하는 세포 수에 따라서 본 실험

의 TVT의 DNA 배수성 패턴은 DNA diploidy 예와 DNA aneuploidy 예로 구분할 수 있었다. DNA diploidy 예는 G0/G peak의 DNA index가 1.00 ± 0.05 이고 G2/M peak의 DNA index가 2.0 ± 0.3 으로서 다수의 종양 세포가 G0/G1 peak에 위치하며 종양 세포의 30% 미만이 이 peak의 2 배수 영역(2N)이나 4 배수 영역(4N)에 위치하는 경우로 10예 중 6예가 이 경우에 해당되었다. 한편, DNA aneuploidy 예는 각 peak를 구성하는 종양세포의 수와 관계없이 종양 세포가 G0/G1 peak 이 외의 영역에 광범위하게 산재하여 출현하거나 G0/G1 peak의 2 배수 위치를 벗어난 위치에 peak가 형성된 경우로서 4예가 이에 해당되었다.

임상 및 조직학적 분류와 DNA ploidy 패턴과의 관계는 Table 1과 같다. 5예의 발육기 종양 중 diploidy(Fig. 1)는 3예였고 aneuploidy(Fig. 2)가 2예였으며, 3예의 성숙기 종양에서는 diploidy(Fig. 3)가 1예였고

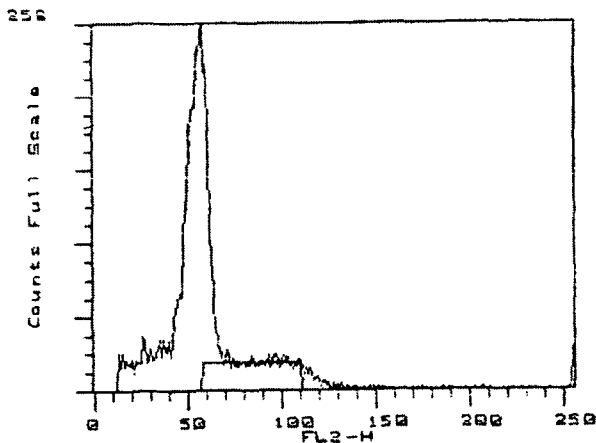


Fig. 1. DNA histogram of a diploid progressing tumor. The DNA histogram exhibits the presence of a single G0/G1 population with a corresponding G2/M population. The fraction of S/G2M is relatively large. Relative fluorescence(DNA content) per nucleus or channel number(X axis) is plotted against the relative number of nuclei (Y axis). D: diploidy

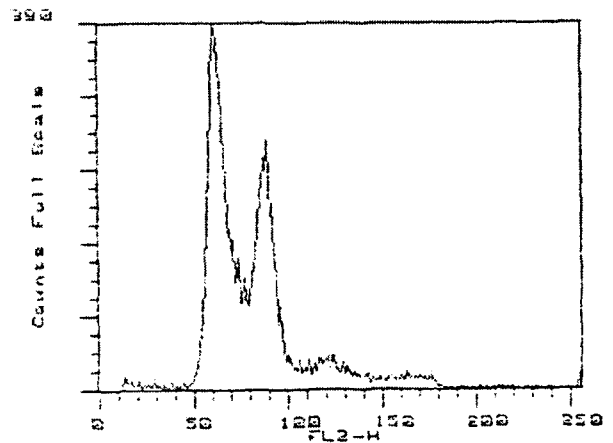


Fig. 2. DNA histogram of an aneuploid progressing tumor. The histogram contains two G0/G1 population and two G2M population at twice of the fluorescence intensity of the first and second G0/G1 populations, respectively. A: Aneuploid.

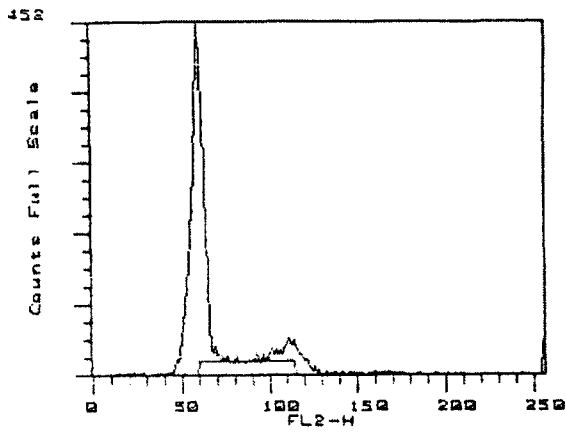


Fig. 3. DNA histogram of a diploid steady-state tumor.

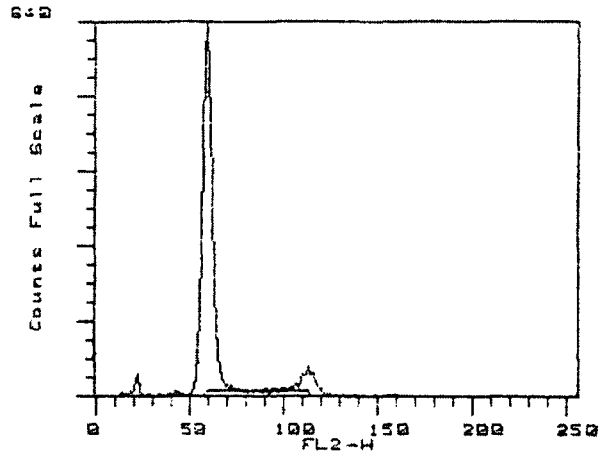


Fig. 5. DNA histogram of a diploid regressing tumor. The fraction of S/G2M is very small.

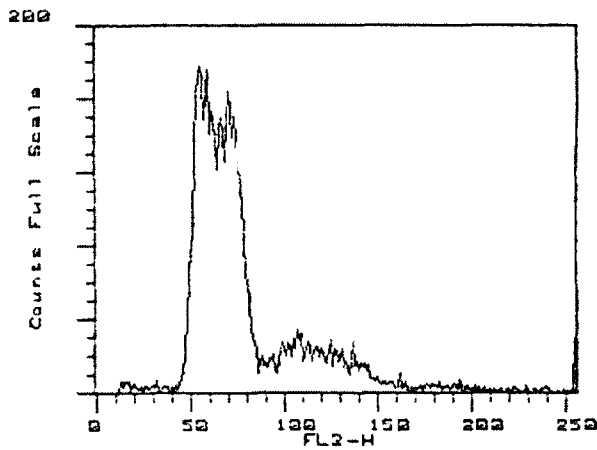


Fig. 4. DNA histogram of an aneuploid steady state tumor.

aneuploidy(Fig. 4)는 2예였다. 발육 성숙기 종양과 퇴축기 종양의 S/G2M 분획 및 핵분열상 빈도 수를 비교했을 때 발육 성숙기 종양이 퇴축기 종양에 비해 S/G2M 분획이 보다 크게 나타났으며 핵분열상도 보다 빈번하게 관찰되었다(Fig. 5). 한편, 종양이 발생한 지 최소한 1년 이상 경과된 두 마리의 진도견(case No's 3 and 8)에서는 모두 aneuploidy 패턴을 보였다.

고 찰

TVT는 교미행위등을 통한 직접적인 접촉을 통해 전파되는 전염성 종양성 질환이며 특히 살아있는 종양 세포를 다른 개에 이식시켰을 때에도 실험적으로 종양이 유발되는 이식 가능한 종양으로서 잘 알려져 있다(Nielson and Kennedy, 1990; O. Hess 등, 1977). 개의 피하 이식 실험의 경우 이식후 2~3주 경에 직경 3~6mm 크기가 되고 5~7 주경에는 최대 크기에 이르러 그 후에는 자연적으로 퇴축하기 시작하여 6개월내에 완전히 퇴축하는 것으로 보고되고 있다(Nielson and Kennedy, 1990; Richardson, 1981; Bostock and Owen, 1975; Cheville, 1983; Theilen and Madewell, 1987; Yang and Jones, 1973). 이러한 발육기, 성장기, 퇴축기로의 진행은 이식 종양에서만 나타나는 것이 아니며 자연 발생종양도 마찬가지로 진행과정을 경과한다. 그러나 TVT의 진행과정은 숙주의 면역 능력과 큰 관계가 있어서(Hording and Yang, 1981; Trail and Yang, 1985; Fenton and Yang, 1988, Yang 등, 1987) 이와 같은 변화들은 모든 TVT에서 일관성 있게 나타나지는 않으며 면역이 억제된 이환 동물에서

는 퇴축 단계로 이행되지 않고 오히려 발육 및 성장기로 계속 경과하여 다른 부위로 전이하기도 한다(Nielson and Kennedy, 1990). 본 연구의 2예에서는 종양이 발생한 지 1 년이 경과했음에도 퇴행되지 않고 성장기 과정을 나타냈다.

본 종양의 유래는 아직 불분명하다. 그러나 완전히 살아있는 종양 세포의 이식을 통해 종양이 전파되고 신생 종양의 형성은 이식된 종양 세포의 증식에 의해서만 이루어지며 핵형(종양의 염색체 수는 58~59개: 정상 개의 염색체 수는 78 개임)이 세계적으로 비교적 단일하다는 점에서 stemline linear 가설이 지지를 받고 있다(Nielson and Kennedy, 1990). 하지만 이식된 종양 세포가 어떻게 조직적합반응장벽(histocompatibility barrier)을 회피할 수 있는지에 대해서는 아직 확실하게 밝혀지지 않았다(Friedlander 등, 1984). 조직적합반응장벽을 제외한 TVT의 종양 세포들은 숙주에 대해서 non-self임에도 불구하고 곧바로 퇴행되지 아니하며 교미 행위 등의 직접적인 접촉 수단을 통해 마치 기생충처럼 다른 동물로 전파된다(Nielson and Kennedy, 1990). TVT는 개에 발생하는 종양이지만 개와 유전학적으로 관계가 없는 코요테, 늑대, 자칼 및 붉은 여우 등에 실험적으로 이식될 수 있으며 누드 마우스에 그리고 햄스터의 cheek pouch에도 이식될 수 있다(Nielson and Kennedy, 1990).

본 연구에서 진도전 TVT의 조직학적 분류를 Hill 등(1984)의 분류법에 근거하여 발육기 종양(Progressing tumor, progressor), 성숙기 종양(Steady-state tumor), 퇴축기 종양(Regressing tumor, regressor)으로 분류하였다. Hill 등(1984)은 분류 기준으로서 원형 세포 대 방추형 세포의 비율(%), 400배 시야 상의 핵분열상의 수, 종피내에서의 교원질의

양 등을 논하였다(Table 2). 본 연구에서는 이들 분류 기준을 원칙으로 하고 약간의 소견을 추가하였다. 핵 분열 빈도수를 계산할 때에는 Hill 등(1984)의 방법 이외에도 임의로 5,000개의 세포를 측정하여 발육기는 60/5,000 이상으로 하고 성숙기는 30~60/5,000 으로 했으며 퇴축기는 30/5,000 미만으로 기준을 삼았다. 또한, 발육기에서 퇴축기를 향해 진행할수록 약간의 장방형을 띤 세포 수가 증가하고 출혈이나 괴사 궤양 소견도 증가하며 림프구, 형질세포, 대식구, 호중구, 섬유아세포 등의 침윤도 증가하므로 이들 소견도 참고하였다. 한편 종양의 경과 시간과 크기 등의 임상적인 정보들도 종양의 진행 단계별 분류에 참고될 것으로 생각되었으나 기대해왔던 바와는 달리 조직학적 소견과 일치하지 않는 경우가 많아서 진행 단계별 종양 분류는 병리 조직학적인 정보에 의존하는 것이 좋을 것으로 보였다. TVT는 진행 단계별로 세포 증식 즉 핵 분열 지수가 크게 달라지므로 이에 대한 정확한 정보는 TVT의 치료 및 예후 판정 그리고 종양의 진행 단계별 판정(조직학적 분류)에 매우 중요하다. TVT의 세포 증식은 조직학적인 검사를 통한 핵 분열 빈도 수의 측정으로 추정할 수 있겠으나 유식세포 분석법에 의한 S/G2 M 분획의 측정을 통해서도 가능하다. 따라서 조직학적으로 검색한 핵 분열 지수와 유식세포 분석법으로 얻은 S/G2 M 분획의 비교는 흥미로울 것으로 생각된다. 본 연구에서는 두 정보를 비교한 결과 대체적으로 일치한 소견을 보여서 핵 분열 빈도수가 높은 예는 S/G2 M 분획이 크고 핵 분열 빈도수가 낮은 예는 S/G2 M 분획이 작게 나타났다.

Hill 등(1984)과 박과 조(1984) 및 Kennedy 등(1977)은 TVT가 성장기에서 성

숙기 및 퇴축기로 진행할수록 원형 세포의 수가 감소하고 이들 원형 세포들은 점차적으로 작은 세포소로 격리되며 방추형 세포, 림프구, 호중구를 비롯한 백혈구 침윤 등이 비례적으로 증가한다고 보고하였는데 본 연구에서도 그와 같은 소견들이 확인되었다. 뿐만 아니라, 종양이 성숙기 및 퇴축기로 진행될수록 출혈 및 괴사 소견이 증가하였다. 한편 이들 저자들은 전자 현미경적 관찰을 통해 성숙기 종양에서 불규칙한 형태의 원형 세포와 방추형 세포가 증가함을 보고하였는데 이들 세포들은 적은 수의 미세 용모를 갖고 있었고 섬유아 세포가 없는데도 불구하고 교원 및 세망 섬유가 원형 세포내에서나 인접하여 존재하는 등의 소견을 보여 이들 세포가 원형 세포로부터 형질 전환된, 다시 말해 불규칙한 형태의 원형 세포(장방형 세포)는 원형 세포와 방추형 세포의 이행 세포(transitional cell)일 것으로 보고하였다(Hill 등, 1984; Kennedy 등(1977). 본 연구에서도 이행 상태의 세포들이 성숙기에 증가되는 소견을 보였다.

종양의 배수성을 측정하는 방법으로는 세포 분광 측정법(B. Blow, 1990), 유식세포 분석법(정과 유, 1990; 남, 1991; Reagan 등, 1992; Aly 등, 1992), 화상 분석법(Danque 등, 1993; 김, 1990; 윤, 1990) 등이 있는데 최근에는 유식세포 분석법과 화상 분석법이 이용되고 있다. 이들 방법을 이용한 DNA 패턴 분석은 종양의 악성도 및 예후 판단(Fukunaga 등, 1993) 그리고 종양을 이해하는데 이용되고 있다. 최근에는 파라핀 포매 조직을 이용한 DNA 함량 분석이 가능해짐에 따라 의학에서는 기지의 임상 및 병리학 적 정보를 토대로 한 역추적 연구가 가능해져서 더욱 정확하게 환자의 예후를 추정할 수 있을 뿐만 아니라 종양을 더욱 잘 이해할

수 있게 되었다. 본 연구에서는 TVT가 발육양상에 따라 어떠한 DNA 배수성 패턴을 나타낼 것인가 알아보기 위한 목적으로 조직학적인 검색을 통해 종양을 진행 단계별로 분류하고 신선한 동결 조직을 이용한 유식세포 분석법을 실시함으로써 조직학적 소견과 이들 결과를 비교하였다. 파라핀 포매 조직을 이용한 방법은 조직이 장시간(2~5주 이상) 동안 포르말린에 고정된 관계로 debris fraction이 높았다. 그러므로 파라핀 포매 조직을 이용하여 DNA 배수성을 측정하고자 할 때에는 빠른 시간내에 고정을 한 후 곧바로 파라핀에 포매할 것이 요구된다. 한편 신선 동결 조직을 이용한 유식세포 분석법은 평균 변이 계수가 7.02%로서 결과가 비교적 양호하였다. 신선한 조직을 이용한 유식세포 분석법을 위한 시료 채취는 조직학적 검색을 위한 시료 채취 부위가 맞는 단면부를 이용하였으므로 조직학적 검색 결과 유식세포 분석 결과를 비교하는데 어려움이 없었다.

종양의 진행 단계에 따른 DNA 배수성 패턴을 보면 성장기 종양에서는 diploidy가 3예, aneuploidy가 2예, 성숙기 종양에서는 diploidy가 1예, aneuploidy가 2예, 퇴축기 종양에서는 2예 모두 diploidy로 나타나 aneuploidy는 성장기 및 성숙기 종양에서 나타날 가능성이 큰 것으로 추정된다. 퇴축기 종양에서는 2예 모두 diploidy였고 또 발생경과 시간으로 볼 때 1년 이상 경과된 2예에서는 모두 aneuploidy로 나타났다는 점은 특기할 만하지만 추후에 연구 대상 수를 늘려 비교 검토해 보아야할 것으로 생각된다. 일반적으로 aneuploidy를 나타내는 종양이 DNA diploidy 종양에 비해서 예후가 나쁘다고 하는데, TVT에서는 aneuploidy가 예후와 어떤 관계에 있는지 알려진 바 없다.

TVT는 그 진행과정(성장기, 성숙기, 퇴축

기)에 따라 종양을 구성하는 세포 및 그 구성 세포의 형태가 달라지므로 그 진행 단계 별로 종양 세포의 DNA 배수성, 핵의 면적, 둘레, 장경, 염색질 패턴, 핵의 크기, phenotype 등을 측정하여 조직학적 소견과 비교할 것이 요구된다. 이를 위해 유식세포 분석법과 화상 분석법을 이용할 수 있는데 유식세포 분석법은 DNA 배수성, 핵의 크기, 세포의 여러 phenotype 등은 신속하게 처리할 수 있으나 종양 세포와 비 종양 세포가 함께 측정되는 결점이 있는 반면, 화상 분석법은 DNA 배수성, 핵의 면적, 둘레, 장경, 염색질 패턴 등을 측정할 수 있고 종양 세포와 비 종양 세포를 선택할 수 있으므로 종양 세포만의 DNA ploidy 패턴을 구할 수 있다. 특히, TVT는 퇴축기로 진행할수록 세포의 형태가 변화되고 침윤하는 비 종양성 세포가 증가되므로 화상 분석을 통해 DNA 배수성 패턴을 분석할 필요가 있다. 단일 세포 부유액을 만드는 과정까지는 유식세포 분석법과 화상 분석법이 동일하므로 광학 및 전자 현미경으로 TVT의 조직학적 분류를 실시하고 아울러 본 연구에서와 같이 단일 세포 부유액을 만들어 각각 유식세포 분석법과 화상 분석법에 의해 DNA ploidy, 형태 조직학적 변량 및 구조학적 변량을 동시에 측정 비교해 보는 것은 매우 의의가 있을 것으로 사료된다.

참 고 문 헌

- Ayl RD, Couto CG, et al. Correlation of DNA ploidy to tumor histologic grade, clinical variables, and survival in dogs with mast cell tumors. *Vet Pathol* 27:386-390, 1992.
- Bolon B, Calderwood Mays MB, et al. Characteristics of canine melanomas and comparison of histology and DNA ploidy to their biologic behavior. *Vet Pathol* 27:96-102, 1990.
- Barlogie B, Raben MN, et al. Flow cytometry in clinical cancer research. *Cancer Res* 43:3982, 1983
- Barski G, Cornefert JF. Cytogenetic study of Sticker venereal sarcoma in european dogs. *J Natl Cancer Inst* 37:787-797, 1966.
- Bostock DE, Owen LN. A colour atlas of neoplasia in the cat, dog and horse, pp. 68-70. Wolfe medical publication, London, England, 1975.
- Cheville NF. Cell pathology, 2nd ed., pp.399-400. The Iowa state University Press, 1983.
- Danque POV, Chen HB, et al. Image analysis versus flow cytometry for DNA ploidy quantitation of Solid tumors: A Comparison of six methods of sample preparation. *Modern Pathology* 6(3):270-275, 1993.
- Fenton MA, Yang TJ. Role of humoral immunity in progressive and metastatic growth of the canine transmissible venereal sarcoma. *Oncology* 45:210-213, 1988.
- Frazier KS, Hines ME, et al. Analysis of DNA aneuploidy and C-myc oncoprotein content of canine plasma cell tumors using flow cytometry. *Vet Pathol* 30:505-511, 1993.
- Friedlander ML, Hedley DW, et al. Clinical and biological significance of aneuploidy in human tumors. *J Clin Pathol* 37:961, 1984.

- Fukunaga M, Ushigome S, et al. Spontaneous abortions and DNA ploidy: An application of flow cytometric DNA analysis in detection of non-diploidy in early abortions. *Modern Pathology* 6(5):619-624, 1993.
- Hedley DW, Friedlander ML, et al. Application of DNA flow cytometry to paraffin-embedded archival material for the study aneuploidy and its clinical significance. *Cytometry* 6:327-333, 1985.
- Hedley DW, Friedlander ML, et al. Method for analysis of cellular DNA content of paraffin embedded pathological tissue using flow cytometry. *Histochem cytochem* 31:1333, 1983.
- Hedley DW. Flow cytometry using paraffin-embedded tissue: five years on. *Cytometry* 10:229, 1989.
- Hess AD, Catchatourian R, et al. Intralesional Bacillus Calmette-Guerin immunotherapy of canine venereal tumors. *Cancer Research* 37:3990-3994, 1977.
- Hill DL, Yang TJ, et al. Canine transmissible venereal sarcoma: Tumor cell and infiltrating leukocyte ultrastructure at difference growth stages. *Vet Pathol* 21:39-45, 1984
- Hording MW, Yang TJ. Sequential changes in peripheral blood leukocyte adherence inhibition(LAI) reactivity during progressive growth and spontaneous regression of canine transmissible venereal sarcoma. *Int. J Cancer* 28:361-366, 1981
- Jacobsen AB, Thorud E, et al. DNA flow cytometry in metastases and a recurrency of results from fresh and paraffin-embedded material. *Virchows Archiv (B) Pathol* 54:273, 1988.
- Katzir N, Rechavi G, et al. "Retro poson" insertion into the cellular oncogene C-myc in canine transmissible venereal tumor. *Proc Acad sci USA* 82:1054-1058, 1985.
- Kennedy JR, Yang TJ, et al. Canine transmissible venereal sarcoma: Electron microscopic changes with time after transplantation. *Br. J. Cancer* 36:375-384, 1977.
- Makino S. Some epidemiological aspects of venereal tumor of dogs as revealed by chromosome and DNA studies. *Ann N Y. Acad Sci* 108:1106-1122, 1963.
- Murray M, Janes H, et al. A study of the cytology and karyotype of the transmissible venereal tumors. *Res Vet Sci* 10:565-568, 1969.
- Nielson SW, Kennedy PC. Tumors of the genital system. In: *Tumors in Domestic Animals*. 3rd ed., pp. 479-517. University of California press, USA, 1990.
- Okamoto Y, Fujinaga T, et al. Isolation and cultivation of canine transmissible sarcoma cells. *Jpn J Vet Sci* 50(1):9-13, 1988.
- Reagan WJ, Vap LM, et al. Flow cytometric analysis of feline reticulocytes. *Vet Pathol* 29:503-508, 1992
- Richardson RC. Canine transmissible

- venereal tumor. The Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian 3(11):951-955, 1981.
- Theilen GH, Madewell BR. Veterinary Cancer Medicine, pp. 299-303. Lea & Febiger, Philadelphia, USA, 1987.
- Trail PA, Yang TJ. Canine transmissible venereal sarcoma: Quantitation of T-lymphocyte subpopulations during progressive growth and spontaneous tumor regression. JNCI 74(2):461-467, 1985.
- Weber WT, Nowell PC, et al. Chromosome studies of a transplanted and a primary canine venereal sarcoma. J Natl Cancer Inst 35:537-541, 1965.
- Yang TJ, Chandler JP, et al. Growth stage dependent expression of MHC antigens on the canine transmissible venereal sarcoma. Br. J Cancer 55:131-134, 1987.
- Yang TJ, Jone JB. Canine transmissible venereal sarcoma: Transplantation studies in neonatal and adult dogs. Journal of the National Cancer Institute 51(6):1915-1918, 1973.
- 김윤미. 점액성 난소 종양에서의 DNA ploidy에 대한 화상 분석학적 연구: 전남대학교 대학원 석사학위 청구 논문 1-25, 1990.
- 남명숙. 신경아세포종의 DNA ploidy pattern에 관한 연구. 전남대학교 석사학위 청구 논문 1-27, 1991
- 박남용, 조성만. 진도견 전파성 외음부 육종 세포의 초미세구조, 대한수의학회지. 24(9):553-562, 1984
- 윤정길. 자궁경부 상피내 종양의 염색질 패턴 분석에 관한 연구. 전남대학교 대학원 의학과 박사학위 청구 논문 1-18, 1990.
- 정상우, 유주용. Flow cytometry에 의한 종양 세포의 DNA함량 분석. 전남대학교 의과대학 병리학 교실 103-110, 1990.

Request reprints from Dr. Nam-Yong Park, College of Veterinary Medicine, Chonnam National University, Kwangju, 500-757, Republic of Korea.

Tel) 062-520-6532, Fax) 062-530-2847, E-mail : nypark@chonnam.chonnam.ac.kr