대한세포병리학회지 제6권 제2호
Korean J. Cytopathol. pp 99~105
Vol. 6, No. 2, December, 1995

전립선 선암의 화상 계측에 관한 연구

한림대학교 의과대학 병리학교실

박 혜 림 · 채 승 완 · 손 진 희 · 박 영 의

= **Abstract** =

Morphometry of Nuclei in Adenocarcinoma of Prostate

Hye Rim Park, M.D., Seung Wan Chae, M.D.,
Jin Hee Sohn, M.D., and Young Euy Park, M.D.

Department of Pathology, College of Medicine, Hallym University

Morphometry of nuclei of the benign and malignant prostatic lesions was performed to study the relationship between nuclear size and shape and the prognosis of prostatic adenocarcinoma. Fifty one cases of prostatic adenocarcinoma and 13 cases of benign prostatic hyperplasia were included to evaluate area, perimeter, Dmax, Dmin, and 5 form factors of the nuclei by image analyzer(Zeiss Ibas 2000) using hematoxylin-eosin stained slides. All analytic factors of nuclear size and shape were significantly different between benign lesions and adenocarcinomas. Increased nuclear size was associated with nuclear irregularity, presence of metastasis, advanced clinical stage, and high Gleason's grade and score of prostatic adenocarcinoma. On Kaplan-Meier method, survival was decreased with older age, no hormonal treatment, stage D, high Gleason's grade and stage as well as with larger size and irregular shape of the nuclei. In conclusion, morphometry of nuclei of the prostate can be a helpful tool to differentiate between benign and malignant lesions. Nuclear morphology is thought to be associated with prognosis of prostatic adenocarcinoma.

Key words: Morphometry, Nucleus, Prostate

서 론

전립선 선암은 남자에서 가장 흔한 암종의 하나로, 경직장 초음파검사 등 조기 진단법이 강조되면서 조기 병변에 대한 세침 흡인 혹은 생검의 빈도가 증가되고 있다. 이러한 진단 방법은 비침윤성 방법으로 선호되지만 병리의사 입장에서는 검체의 양이 소량이고 조직학적 구

조형태가 뚜렷하지 않아 진단에 어려움을 겪게 된다. 따라서 이러한 경우에는 세포학적 특징을 기준으로 진단해야 하는데 통상적으로 전립선 선암의 진단과 조직학적 등급은 선의 구조적 배열과 형태를 기준으로 기술되어 있어 적용이 어렵다[1].

한편 전립선 선암의 생물학적 경과는 다양하고 예후에 대한 예측이 어려워 어떤 환자들은 전이되어 일찍 사망하는가 하면 일부의 환자는 수년동안 병변이 국소부위에 국한되어 정상 수명을 누릴 수 있다. 따라서 치료 원칙을 결정하는데 있어 종양의 악성도를 추정하는 것이 중요한데, 조직학적 분화도와 임상 병기가 가장 중요한 예후 인자로 알려져 있다. 그러나 최근 혈청 전립선 특이 항원(prostatic specific antigen)치와 DNA 배수성 뿐아니라 핵의 크기와 모양이 예후에 관계된다고 제시되고 있다[2].

저자들은 핵의 크기와 모양이 전립선 선암의 진단과 예후에 미치는 영향을 알아보기 위해 51예의 전립선 선암과 13예의 양성 전립선 비대증에서 화상 분석기를 이용한 핵의 계측을 시행하였고, 임상적 혹은 병리학적 인자들간의 차이와 생존 곡선의 비교를 시도하였다.

재료 및 방법

증례는 1987년부터 1995년까지 한림의대 한강성심병원 해부병리과에 경요도 절제술 혹은 치골상 전립선절제술로 의뢰된 검체 중 hematoxylin-eosin(H&E) 슬라이드의 보전 상태가 양호하고 임상적으로 추적 관찰이 가능했던 51예의 전립선 선암과 대조군으로 양성 전립선 비대증 13예를 대상으로 하였다. 병록지를 검토하여 환자의 연령, 수술 방법, 홀몬 치료 여부, 혈청 전립선 특이항원과 전립선 산성포스파타제(prostatic acid phosphatase)치, 타 장기로의 전이여부, 임상병기, 추적 검사 기간과 생존 여부 등의 임상적 특징을 조사하였고, H&E 슬라이드를 재검토하여 선암의 침윤 양상, 분화정도, Gleason 등급과 점수 등을 결정하였다.

화상 계측은 Zeiss Ibas 2000 화상 분석기와 Sony 3CCD camera를 이용하여 기존의 H&E 슬라이드를 0-570 red filter로 증례당 200개 이상의 핵을 계측하였다. 핵의 크기를 표시하는 area, perimeter, Dmax(maximal diameter), Dmin(minimal diameter)를 측정하고 핵의 모양을 표시하는 form factor로 PE, ELL, AR, CO, CI를 측정하였다. Form factor PE($4 \cdot \pi \cdot$ area/perimeter^2)는 원형인 경우 1.00이고 타원형 혹은 불규칙형인 경우 1.00 이하이다. Form factor ELL(minimal diameter/maximal diameter)는 원형인 경우 1.00이고 타원형인 경우 1.00 이하이다. Form factor AR(area/$(\pi/4) \cdot$ maximal diameter $\cdot$ minimal diameter)은 원형과 타원형인 경우 1.00이고 불규칙형인 경우 1.00 이하이다. Form factor CO(perimeter/(area)$^{1/2}$)는 원형의 최소치가 3.54이다. Form factor CI(perimeter/($\pi \cdot$ equivalent circle diameter)는 완전한 원형인 경우 1.00이고 불규칙형인 경우 1.00 이상이다[3].

이상의 계측치는 SAS 통계 프로그램을 이용하여 임상적 혹은 병리학적 인자들에 따라 t-test와 ANOVA(Wilcoxon)에 의한 차이를 검정하여 p값 0.05이하를 의미있는 차이로 인정하였고, 상관계수의 산정과 Kaplan-Meier법에 의한 생존분석을 시행하였고 log-rank법에 의해 생존곡선을 비교하였다.

결 과

1. 양성 전립선 비대증과 선암간의 계측치 비교

전립선 선암의 핵 area는 45.25±15.38 μm^2로 양성 42.13±5.16 μm^2에 비해 증가되어 있었고 (Fig. 1, 2), perimeter도 선암의 경우 26.55±4.

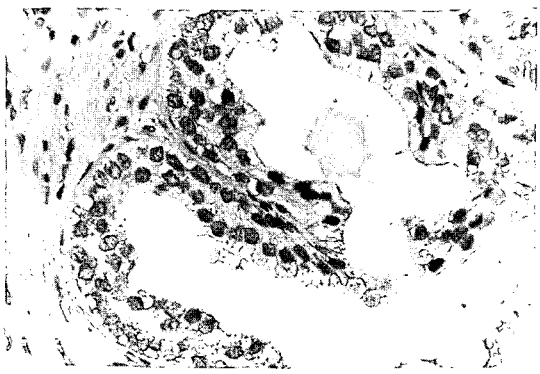

Fig. 1. Example of benign nodular hyperplasia. Average nuclear area is 34.27 μm^2(H & E, ×400).

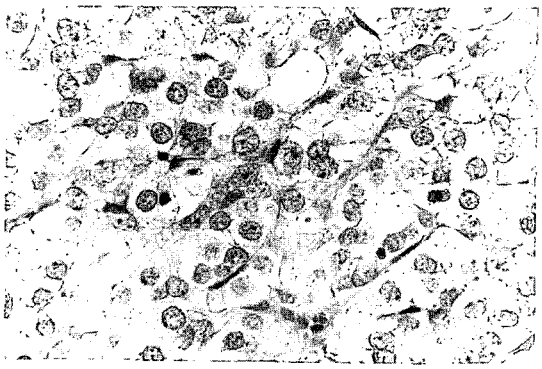

Fig. 2. Example of prostatic adenocarcinoma. Average nuclear area is 73.82 μm^2(H & E, ×400).

69 μm^2로 양성 25.48±1.59 μm^2에 비해 증가되었다. Dmax는 9.00±1.54 μm^2로 양성에 비해 증가되었고, Dmin는 6.64±1.12 μm^2로 감소되었는데 특히 Dmax의 차이는 통계학적으로 유의한 차이였다. Form factor는 PE, ELL, AR, CO, CI 모두 양성에 비해 선암의 경우 타원형과 불규칙형의 특성을 보였고 통계학적으로 유의하였다(Table 1).

Table 1. Comparison of morphometric variables between benign prostatic hyperplasia(BPH) and prostatic adenocarcinoma

Variables	BPH (n=13)	Adenocarcinoma (n=51)
Area(μm^2)	42.13±5.16	45.25±15.38
Perim(μm)	25.48±1.59	26.55± 4.69
Dmax(μm)*	8.44±0.42	9.00± 1.54
Dmin(μm)	6.72±0.51	6.64± 1.12
*PE**	*0.80±0.00*	*0.77± 0.02*
ELL*	0.79±0.02	0.74± 0.03
AR*	0.93±0.00	0.92± 0.01
CO*	3.95±0.01	4.02± 0.07
CI*	2.23±0.00	2.27± 0.03

Values are given as mean ± SD.
*: Statistically significant($p < 0.05$).

2. 선암의 각 인자별 계측치 비교

선암 중 전이가 동반된 군은 전이가 없는 군에 비해 area, perimeter, Dmax, Dmin 모두 증가되었고, form factor 중 PE, AR, CI가 불규칙형의 특성을 나타내었다. Stage D인 경우는 stage A나 B에 비해 area, perimeter, Dmax, Dmin 모두 증가되었고 form factor PE, ELL, AR, CI가 불규칙형을 나타내었다. 조직학적으로 미분화 선암의 경우는 고도 혹은 중등도 분화의 경우에 비해 area, perimeter, Dmax, Dmin 모두 증가하였고 이 중 특히 perimeter와 Dmax의 차이는 통계학적으로 유의하였다. Form factor는 PE, AR, CI가 불규칙형을 나타내었고 AR이 통계학적으로 유의하였다. Gleason 5등급의 경우는 3, 4등급에 비해 area, perimeter, Dmax, Dmin 모두 증가되었고 form factor PE, AR, CI가 불규칙형을 나타내었으나, 3등급과 4등급간에는 차이가 뚜렷하지 않았다. Gleason 점수 9점인 경우는 9점 미만인 군에 비해 area, perimeter, Dmax, Dmin가 모두 증

Table 2. Comparison of morphometric variables according to the prognostic factors of prostatic adenocarcinoma

Variables	Area(μm^2)	Perim(μm)	Dmax(μm)	Dmin(μm)	PE	ELL	AR	CO	CI
Metastasis									
yes(n=18)	50.56	28.90	9.47	8.05	0.77	0.75	0.92	4.02	2.26
no (n=33)	42.36	25.69	8.70	6.45	0.77	0.74	0.92	4.01	2.26
Stage									
A(n= 6)	42.69	25.80	8.73	6.54	0.78	0.75	0.92	3.99	2.25
B(n=25)	42.74	25.82	8.73	6.49	0.77	0.74	0.92	4.01	2.26
C(n= 2)	27.86	20.79	7.29	5.15	0.80	0.71	0.93	3.95	2.23
D(n=21)	51.27	28.31	9.56	7.08	0.77	0.74	0.92	4.02	2.27
Differentiation									
well(n= 6)	41.10	25.28	8.55	6.43	0.78	0.75	0.92	3.98	2.24
mod(n=24)	40.69	25.10	8.54	6.28	0.77	0.74	0.92	4.00	2.25
poor(n=21)	51.52	28.45*	9.59*	7.12	0.76	0.74	0.91*	4.04	2.27
Gleason's grade									
1(n= 4)	36.07	23.67	7.99	6.07	0.79	0.76	0.93	3.97	2.23
2(n= 4)	48.21	27.69	9.43	6.88	0.77	0.73	0.92	4.02	2.27
3(n=13)	43.34	25.89	8.81	6.45	0.77	0.73	0.92	4.01	2.26
4(n=12)	37.81	24.32	8.29	6.08	0.78	0.74	0.92	4.00	2.25
5(n=18)	52.82	28.76	9.66	7.23	0.76	0.75	0.92	4.03	2.27
Gleason's score									
2(n= 1)	30.47	21.98	7.64	5.39	0.78	0.71	0.93	4.00	2.26
3(n= 5)	43.23	25.94	8.73	6.64	0.78	0.76	0.92	3.98	2.24
5(n= 6)	42.80	25.99	8.79	6.53	0.77	0.74	0.92	4.01	2.26
6(n= 3)	33.11	22.50	7.50	5.92	0.80	0.79	0.93	3.94	2.22
7(n=16)	42.17	25.59	8.74	6.32	0.77	0.73	0.92	4.02	2.26
8(n= 2)	32.31	22.82	7.95	5.59	0.76	0.71	0.91	4.03	2.27
9(n=18)	53.50	28.97	9.73	7.28**	0.76	0.75	0.92	4.03	2.27

Values are given as mean.

*: Significantly different compared to well and moderately differentiated group

**: Significantly different compared to other Gleason's score groups(less than 9)

mod: moderate

가되었고 form factor PE, AR, CI가 불규칙형을 나타내었으나 9점 미만인 군간에는 서로 차이가 인정되지 않았다(Table 2).

화상 계측치와 분석 인자들간의 연관성을 살펴보면 혈청 전립선 특이 항원과 전립선 산성 포스파타레치와 화상 계측치간에는 연관성이 없었고, 임상 병기, 조직학적 분화도, Gleason 등급과 점수는 area, perimeter, Dmax, Dmin 등 핵의 크기를 표시하는 계측치와 연관되는 경향이 있었다. 또한 조직학적 분화도, Gleason 등급 및 점수는 form factor 중 PE, AR, CO, CI와 연관되는 경향이었다.

3. 생존 분석

환자들의 추적 기간은 1개월에서 73개월까지로 환자의 연령이 70세 이하인 군은 평균 생

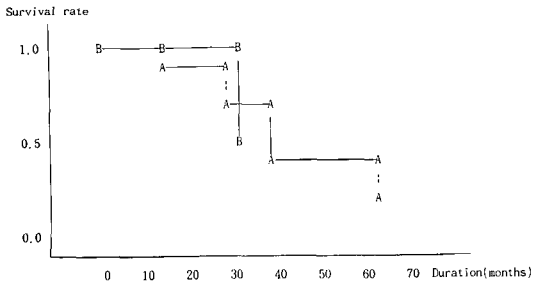

Fig. 3. Product limit survival function estimates according to the average nuclear area. A: below area 41.78μm^2, B: over area 41.78μm^2

존기간이 63개월로 70세 이상의 32.72개월에 비해 증가되어 있었다. 홀몬 치료를 병행한 군은 평균 46.6개월로 홀몬 치료를 하지 않은 군의 28.33개월에 비해 증가되었고, 전이가 동반되지 않은 임상병기 B의 경우는 평균 51.36개월로 전이가 동반된 병기 D의 30.33개월에 비해 증가되었다. 그러나 조직학적 분화도, Gleason 등급과 점수에 따라 생존 곡선의 차이는 뚜렷하지 않았다.

화상 계측치에 따르면 area 41.78 μm^2 이하, perimeter 25. 63 μm 이하, Dmax 8.70 μm 이하, Dmin 6.52 μm 이하군이 평균 44.77개월의 생존을 나타내어 각 계측치의 이상군 31.00개월에 비해 증가되어 있었다(Fig. 3). Form factor 중 PE 0.78이상, ELL 0.75이상, AR 0.92이상인 군은 52.33개월의 평균 생존을 보여 각 계측치 이하군의 32.71개월에 비해 증가되었고, CO 4.0이하, CI 2.26이하인 군은 42.72개월의 평균 생존으로 31.00개월의 평균 생존을 보인 각 계측치의 이상군에 비해 증가되었다.

고 안

본 연구에서는 51예의 전립선 선암과 13예의 양성 전립선 비대증에서 화상 분석기로 핵의 크기와 모양에 대한 계측을 시행하였다. Feulgen 염색 등 특별한 처리 없이 기존의 H&E 슬라이드로 핵의 화상 분석이 가능했는데 따라서 향후 통상적인 생검이나 세침흡인에 의한 세포학적 검체에도 적용이 가능할 것으로 생각된다.

계측치 중 핵의 크기가 양성과 선암간에 차이가 있음을 알 수 있는데 이는 DNA 배수성이나 염색체 양 혹은 핵단백 양의 변화로 설명할 수 있다[2]. 핵 면적의 절대치에 대해서는 연구 보고에 따라 차이가 많은데 양성 세포의 경우 본 연구에서는 평균 42.13 μm^2으로 보고자에 따라 29 μm^2[2]에서 84 μm^2[2]까지 다양한 결과[4,5]는 고정과 염색 방법의 차이에 의해 결정된다. 특히 공기에 건조시킨 세포학적 검체에서는 차이가 많이 나므로 림프구를 내적 기준으로 삼아 표준화된 방법을 사용함이 권장된다[2]. 선암의 경우는 핵의 면적이 평균 45.25 μm^2로 양성에 비해 증가되어 있었고, 전이가 동반되어 임상병기가 D인 경우와 조직학적 미분화군 즉 Gleason 등급이 5이거나 점수가 9인 경우에 핵의 크기가 증가되어 핵의 크기 증가가 예후 불량군과 연관됨을 알 수 있었다. 또한 핵 크기의 지표로 사용한 area, perimeter, Dmax, Dmin가 모두 비슷한 변화를 보이는 지표임을 알 수 있었다. 핵의 단순한 크기 뿐만 아니라 핵 크기의 변이정도가 악성을 진단하는 좋은 기준이 되는데 양성에서 고도분화, 미분화 선암으로 진행할수록 변이정도가 증가한다고 알려져 있고[2] 본 연구에서는 이를 함께 분석하지는 못하였다.

Form factor PE, ELL, AR, CO, CI 모두 양성에 비해 선암에서 타원형과 불규칙형 지수의 특징을 보였는데 이는 세포학적 검체에 비해 조직학적 검체가 핵의 모양을 잘 보전한다는 점에서 의의있는 소견으로 생각된다. 역시 선암의 임상병기가 진행되고 조직학적 분화도가 나쁠수록 form factor의 불규칙성이 증가되었다.

생존 분석상 연령, 홀몬 치료 여부, 임상 병기에 따라 평균 생존율에 차이가 있었는데 실

제로 중요한 예후 인자로 알려진 Gleason 점수에 따른 평균 생존율의 차이는 관찰되지 않았다. 화상 계측치도 핵의 크기가 증가하고 불규칙성이 증가된 환자에서 평균 생존율의 감소를 관찰하여 새로운 예후관련 인자로 향후 좀 더 많은 증례의 추적 검사로 확인될 수 있을 것으로 생각된다. Kim 등[2]과 Mohler 등[7]의 보고에 의하면 핵 모양의 분석이 임상적으로 국한된 전립선 선암에서 조직학적 등급보다 예후와의 연관성이 더 크다고 보고하고 있다.

이는 전립선 선암의 Gleason 등급과 점수가 주로 조직학적 구조에 의존하는 것과는 대조적으로 여러 종류의 종양에서 조직학적 등급을 결정할 때 핵의 특징을 강조하는 일반적인 경향과도 일치하는 소견이다[8]. 즉 대부분의 전립선 선암의 등급은 구성하는 선의 구조와 핵의 이형성을 기준으로 이루어지는데 개개인의 환자에서 장기적인 예후를 결정하는데 정확히 일치하지는 않는다. 이를 보완하기 위하여 핵의 크기와 모양, DNA 양, 염색질 분포 등을 분석하는 화상 계측이 권장되고 있다[7]. Diamond 등[9]과 Epstein 등[10]은 nuclear roundness factor (NRF)의 분석으로 이를 증명하였고, Unger등[11]도 방사선 치료후의 전립선 생검에서 선암의 재발 혹은 잔존과 방사선에 의한 단순 변화를 감별하는데 핵의 계측이 유용함을 보여주었다. Christen 등[12]은 heterogeneity, condensation, margination, run length nonuniformity, long run emphasis, gray level nonuniformity와 inertia 등 염색질 패턴의 특징으로 전립선의 양성병변과 각 분화도에 따른 선암군을 93%의 성공률로 구별할 수 있었고, area, roundness와 염색 강도도 의미있는 계측치로, H&E 슬라이드로도 Feulgen 염색 검체와 일치되는 결과를 얻을 수 있다고 보고하였다.

결론적으로 핵의 크기와 모양의 화상 계측은 세침흡인이나 생검으로 채취된 전립선 검체에서 양성과 선암을 감별하는데 도움을 줄 수 있는 한 요소로 생각되고 특히 경계성 병변이나 생검의 양이 적을때 유용할 것으로 생각된다. 선암의 경우는 예후 불량군의 한 표지자로 화상 계측치를 이용할 수 있을 것으로 생각된다.

결 론

저자들은 핵의 크기와 모양이 전립선 선암의 예후에 미치는 영향을 알아보기 위해 Zeiss Ibas 2000 화상 분석기를 이용하여 핵의 계측을 시행하였다. 증례는 H&E 슬라이드의 보전상태가 양호하고 임상적으로 추적 관찰이 가능했던 51예의 전립선 선암과 대조군 양성 전립선 비대증 13예를 선정하여 핵의 크기와 모양을 표시하는 9가지 특성을 계측하였다. 방법은 0-570 red filter를 사용하였고 증례당 200개 이상의 핵을 계측하여 area, perimeter, Dmax, Dmin를 측정하고 form factor로 PE, ELL, AR, CO, CI를 표시하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 양성 전립선 비대증에 비해 선암의 경우 area, perimeter, Dmax가 증가되었고 Dmin는 감소되었으며, 5가지 form factor 모두 선암에서 타원형과 불규칙형의 특성이 증가되었다.

2. 선암 중 전이가 동반되고 임상병기가 진행될수록, 미분화형 즉 Gleason 등급과 점수가 높을수록 4가지 크기 계측치가 모두 증가되었고 form factor 특히 PE, AR, CI가 불규칙형을 나타내었다.

3. Kaplan-Meier법에 의한 생존분석상 환자의 연령이 70세 이상인 경우, hormone 치료를 병행하지 않은 경우, 전이가 동반되어 임상병기가 D인 경우, Gleason 등급과 점수가 높은 경우에 생존율의 감소를 보였다.

4. 화상 계측치 중 area, perimeter, Dmax, Dmin의 크기가 증가될수록 생존률의 감소를 보였고 form factor 중 PE, ELL, AR이 감소되고 CO, CI가 증가될수록 생존율의 감소를 보였다.

이상으로 전립선 선암의 화상 계측이 양성 전립선 비대증과의 감별에 도움을 주고, 선암의 예후 불량군과 핵 크기의 증가, 모양 불규칙성의 증가가 연관됨을 알 수 있었다.

참 고 문 헌

1. Bibbo M, Xiao J, Christen R, et al: Use of computer graphic filters for the nuclear grading of hematoxylin and eosin-stained specimens from prostatic lesions. *Analyt Quant Cytol Histol* 16: 183-188, 1994
2. Wang N, Stenkvist BG, Tribukait B: Morphometry of nuclei of the normal and malignant prostate in relation to DNA ploidy. *Analyt Quant Cytol Histol* 14:210-216, 1992
3. Artacho-Perula E, Roldan-Villalobos R, Salas-Monila J, Vaamonde-Lemos R: Histomorphometry of normal and abnormal cervical samples. *Analyt Quant Cytol Histol* 15:290-297, 1993
4. Hutchinson ML, Schultz DS, Stephenson RA, Wong KL, Harry T, Zahniser DJ: Computerized microscopic analysis of prostatic fine needle aspirates; Comparison with breast aspirates. *Analyt Quant Cytol Histol* 11:105-110, 1989
5. Bocking A, Auffermann W, Schwarz H, Bammert J, Dorrjer G, Vucicuja S: Cytology of prostatic carcinoma; Quantification and validation of diagnostic criteria. *Analyt Quant Cytol Histol* 6:74-88, 1984
6. Kim D, Charlton JD, Coggins JM, Mohler JL: Semiautomated nuclear shape analysis of prostatic carcinoma and benign prostatic hyperplasia. *Analyt Quant Cytol Histol* 16:400-414, 1994
7. Mohler JL, Metts JC, Zhang X-Z, Maygarden SJ: Nuclear morphometry in automatic biopsy and radical prostatectomy specimens of prostatic carcinoma. A comparison. *Analyt Quant Cytol Histol* 16:415-420, 1994
8. Minimo C, Galera-Davidson H, Xiao J, et al: Importance of different nuclear morphologic patterns in grading prostatic adenocarcinoma. An expanded model for computer graphic filters. *Ana- lyt Quant Cytol Histol* 16:307-314, 1994
9. Diamond DA, Berry SJ, Jewett HJ, Eggleston JC, Coffey DS: A new method to assess metastatic potential of human prostate cancer; Relative nuclear roundness. *J Urol* 128:729-734, 1982
10. Epstein JI, Berry SJ, Eggleston JC: Nuclear roundness factor; A predictor of progression in untreated stage A2 prostate cancer. Cancer 54:1666-1671, 1984
11. Unger PD, Hoon V, Stone N, et al: Computerized interactive morphometry in the differential diagnosis of irradiated prostates. *Analyt Quant Cytol Histol* 17:100-108, 1995
12. Christen R, Xiao J, Minimo C: Chromatic texture features in hematoxylin and eosin-stained prostate tissue. *Analyt Quant Cytol Histol* 15:383-388, 1993