

유방의 침윤성 관암중에서 핵등급 기준으로서 핵크기의 의의

영남대학교 의과대학 병리학교실, 외과학교실* 및 영남대학교 이과대학 통계학과†

배 영 경 · 김 동 석 · 최 혜 정 · 구 미 진 · 이 수 정* · 이 제 영†

= Abstract =

The Significance of Nuclear Size in Nuclear Grade of Invasive Ductal Carcinoma of the Breast

Young Kyung Bae, M.D., Dong Sug Kim, M.D., Hye Jung Choi, M.D.,
Mi Jin Gu, M.D., Soo Jung Lee, M.D.* , and Jea Young Lee, Ph.D.†

Department of Pathology and General Surgery*, Yeungnam University College of Medicine and
Department of Statistics, Yeungnam University College of Science

To make the objective standard of nuclear size in grading nuclear pleomorphism of invasive ductal carcinoma of the breast, we measured maximal nuclear diameter of tumor cells on imprint cytology slides and histologic sections from 65 cases by using computer-based image analysis system(Optimas 6.0). The maximal diameter of red blood cells were also measured to evaluate the ratio of maximal nuclear diameter of tumor cells to maximal diameter of red blood cells. The mean values of maximal nuclear diameter of tumor cells on imprint cytology slides and histologic sections were $7.56 \mu\text{m}$, $7.53 \mu\text{m}$ in nuclear grade 1, $8.92 \pm 0.98 \mu\text{m}$, $9.02 \pm 0.74 \mu\text{m}$ in nuclear grade 2, and $12.90 \pm 1.47 \mu\text{m}$, $12.44 \pm 1.41 \mu\text{m}$ in nuclear grade 3, respectively. There were no significant differences between values of imprint cytology and histologic section. The ratio of maximal nuclear diameter of tumor cells to maximal diameter of red blood cells were 1.3-1.4:1 in nuclear grade 1, 1.6-1.7:1 in nuclear grade 2, and 2.2-2.3:1 in nuclear grade 3. These values would be guidelines for grading nuclear pleomorphism of invasive ductal carcinoma of the breast on routine surgical pathology work.

Key words: Breast, Invasive ductal carcinoma, Imprint cytology, Nuclear size, Morphometric study

서 론

유방의 침윤성 관암종의 조직학적 소견 중에 예후와 관련이 있는 소견에는 구조적인 분화도와 핵등급, 유사분열의 수 등이 있다^{1, 2)}. 이러한 조직학적 소견 가운데에서도 핵등급은 예후와 밀접한 관련이 있다고 알려져 있다^{3~7)}. 조직학적 등급 부여에 있어서 자주 이용하는 변형한 Bloom and Richardson의 체계¹⁾에서는 핵등급을 부여하기 위하여 핵의 다형성 정도를 평가한다. 이 때 이용하는 소견은 핵크기의 다양성, 핵의 크기, 핵소체의 분명한 정도와 수, 염색질의 거친 정도 등으로서 이러한 소견을 참조하여 핵의 다형성 정도를 1, 2 및 3의 세 등급으로 나눈다. 그러나 실제적으로는 핵등급 부여에 있어서 주관적인 경우가 있고 재현성이 문제가 될 수 있다^{8, 9)}.

따라서 저자들은 핵등급을 정하는데 사용하는 여러 가지 소견 가운데 종양세포의 핵크기에 대한 객관적인 기준을 마련해 보고자 본 연구를 시행하였다.

대상 및 방법

1. 연구대상

1995년 9월부터 1997년 4월까지 20개월동안 영남대학교 의과대학 병리학교실에서 진단한 유방의 침윤성 관암종 가운데 신전한 상태에서 압착도말 표본을 얻을 수 있었던 65예를 대상으로 하였다.

2. 연구방법

종괴 적출술이나 유방 적출술로 제거한 종괴를 신전 상태에서 절단하여 그 절단면에 미리 제작해 둔 2% APES(3-aminopropyl-triethoxy-

silane)로 처리한 유리 슬라이드를 가볍게 압착한 다음 95% 에탄올에 즉시 고정하였다. 고정 후 hematoxylin-eosin 염색을 시행하였고, 한 증례당 여러 장의 슬라이드를 제작하여 그 중 세포의 찌그러짐과 중첩이 없으면서 많은 수의 종양세포가 압착 도말된 부위를 선택하였다. 조직 표본의 핵등급은 모르는 상태에서 변형한 Bloom and Richardson 등급체계¹⁾에 따라 압착도말 표본의 핵등급을 정하였다. 조직 표본에서도 압착도말 표본과 동일한 기준으로 핵등급을 정하였고 압착도말 표본의 핵등급과 서로 비교하였다. 영상분석장치(Image Analysis System)를 이용하여 종양세포의 핵장경(maximal diameter)을 측정하였다. 광학현미경(Olympus BX50, Japan)에 CCD 카메라(Hitachi, Japan)를 부착시켜 영상획득장치(Coreco Frame Grabber, USA)를 통해 영상을 획득한 후 영상분석프로그램(Optimas 6.0, USA)을 이용하여 각 증례당 30개 이상의 핵을 측정하였다. 인접 적혈구의 장경도 함께 측정하였으며 종양세포의 핵장경과 적혈구 장경과의 비를 구하였다. 그리고 이를 동일 증례의 조직 표본에서도 시행하였다.

3. 자료 분석

압착도말 표본과 조직 표본에서 측정한 값의 차이는 SAS(SAS Institute, Release 6.12) 통계프로그램을 이용하여 상관계수의 산정과 paired t-test에 의해 분석하였고 p<0.05를 의미 있는 차이로 인정하였다. 핵등급간의 차이는 t-test를 이용하여 분석하였고 역시 유의수준은 p<0.05로 하였다.

결 과

1. 종양세포의 핵등급

압착도말 표본에서 종양세포의 핵등급은 1

Table 1. Maximal nuclear diameter of tumor cells in 65 cases of invasive ductal carcinomas of the breast

Nuclear Grade	No. of case(%)	Maximal diameter(mean ± SD μm)		p value
		Imprint	Tissue	
1	1(1.5)	7.56	7.53	NS*
2	14(21.5)	8.92 ± 0.98	9.02 ± 0.74	
3	50(77.0)	12.90 ± 1.47	12.44 ± 1.41	
Total	65	11.96 ± 2.20	11.65 ± 1.94	

*: not specific by paired t-test

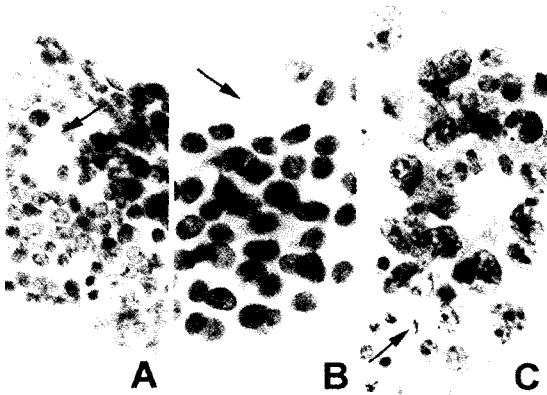


Fig. 1. Nuclear grading: A) Score 1: Tumor cells are small, regular and uniform (arrow indicates RBC) (H-E, ×400). B) Score 2: Tumor cells show moderate increase in nuclear size and small distinct nucleoli (arrow indicates RBC) (H-E, ×400). C) Score 3: Tumor cells have large nuclei and prominent multiple nucleoli and show marked variation in size (arrow indicates RBC) (H-E, ×400).

점(Fig. 1A)이 1예, 2점(Fig. 1B)이 14예 그리고 3점(Fig. 1C)이 50예였으며, 조직 표본에서는 각각 2예, 14예 및 49예였다. 총 65예 가운데 2예에서 압착도말 표본과 조직 표본에서 핵등급이 서로 달랐는데 이 중 한 예는 압착도말 표본에서는 2점, 조직 표본에서는 1점으로 판독한 예로 압착도말 표본을 판독한 후 조직 표본에서의 핵등급을 2점으로 조정하였다. 또 다른 한 예는 압착도말 표본에서는 3점, 조직 표본에서는 2점으로 판독한 것으로 이 증례도

Table 2. Ratio of maximal nuclear diameter of tumor cells to maximal diameter of RBCs

	Imprint	Tissue	p value
DmxRBC* (mean ± SD μm)	5.76 ± 0.53	5.42 ± 0.47	NS [†]
DmxT [‡] /DmxRBC			
[‡] 1	1.3	1.4	
2	1.6	1.7	
3	2.2	2.3	p < 0.05 [§]

*: maximal diameter of red blood cells

†: maximal nuclear diameter of tumor cells

‡: not specific by paired t-test

§: DmxT/DmxRBC of nuclear grade is significant on both imprint and tissue.

[‡]: nuclear grade

조직 표본에서의 핵등급을 3점으로 조정하였다.

2. 종양세포의 핵장경

압착도말 표본과 조직 표본에서의 종양세포의 평균 핵장경은 각각 11.96 ± 2.20 μm와 11.65 ± 1.94 μm로 두 방법으로 측정된 값 사이에는 서로 유의한 차이가 없었다(p>0.05)(Table 1). 압착도말 표본에서 핵등급이 1점인 예는 1예 뿐으로 핵장경이 7.56 μm였으며 2점인 14예와 3점인 50예의 평균 핵장경은 각각 8.92 ± 0.98 μm와 12.90 ± 1.47 μm였다(p<0.05). 조직 표본에서 핵등급이 1, 2 및 3점인 예의 평균 핵장경은 7.53 μm, 9.02 ± 0.74 μm 및 12.44 ± 1.41 μm였다(p<0.05).

3. 종양세포의 핵장경과 적혈구 장경과의 비

압착도말 표본에서 적혈구의 평균 장경은 $5.76 \pm 0.53 \mu\text{m}$ 였으며, 각 종양세포의 핵장경과 적혈구 장경과의 비는 각각 1.3 대 1, 1.6 대 1 및 2.2 대 1이었다($p < 0.05$) (Table 2). 조직 표본에서 적혈구의 평균 장경은 $5.42 \pm 0.47 \mu\text{m}$ 로 압착도말 표본과 유의한 차이가 없었으며 각 종양세포의 핵장경과 적혈구 장경과의 비는 각각 1.4 대 1, 1.7 대 1 및 2.3 대 1이었다 ($p < 0.05$).

고 찰

1992년도 암 환자 조사보고서¹⁰⁾에 따르면 우리 나라에서 유방암은 여성 암 환자 중 자궁암, 위암에 이어 세번째로 높은 발생빈도를 보이고 있으며 그 발생 빈도는 꾸준히 증가하고 있다. 유방암으로 인한 사망률을 줄이기 위해 조기발견, 조기진단이 중요하지만, 최근에는 수술 후 보다 적극적인 치료를 위해 재발의 가능성이 있는 고위험군을 선별하는데 지침이 되는 예후인자의 발견과 그 의의를 규명하는데 많은 노력을 기울이고 있다. 이 중 유방암의 조직학적 등급은 액와부 림프절 전이가 없는 유방암 환자에서 유용한 예후인자로 알려져 있으며^{6, 11, 12)}, 조직학적 등급부여에 있어서는 변형한 Bloom and Richardson 등급체계¹⁾를 많이 사용하고 있다. 핵의 다형성, 즉 핵등급은 핵의 크기, 핵 모양과 크기의 다양성, 핵염색질의 분포, 핵소체의 분명한 정도와 수 등을 참조하여 1, 2 및 3점으로 분류하며, 판형성 정도나 유사분열지수보다 더 의의 있는 예후인자로 알려져 있다⁴⁻⁷⁾. 조직학적 등급이 다소 주관적일 수 있다는 점에서 주로 종양세포 핵에 대하여 컴퓨터를 이용한 분석을 여러 연구

에서 시도하였다¹³⁻¹⁶⁾. 그러나 Pienta와 Coffey¹⁴⁾는 핵의 면적, 직경, 둘레와 같은 형태에 관한 지표들은 예후인자로서 의의가 없다고 하였고, Baak 등¹³⁾은 핵의 형태에 관한 지표들은 유사분열지수보다 예후인자로서의 중요성이 낮으며 핵의 면적만 예후인자로서의 의의가 있다고 하였다. 그리고 van Der Linden 등¹⁵⁾은 핵 단경과 장경의 비가 예후와 관련이 있다고 하여 저자마다 다른 의견을 제시하였다. 이와 같이 화상분석기를 이용하여 얻은 핵의 형태에 관한 자료들은 아직 객관적인 자료로 사용하기에는 부족한 점이 있다고 생각한다. 저자들은 조직에서 관찰하는 종양세포의 핵등급에 따른 실제 핵장경의 참고치를 구하고, 일상 병리업무에서 핵등급을 정하는데 쉽게 활용할 수 있는 자료를 얻는 것이 연구의 목적이었기 때문에 핵의 크기나 형태를 나타내는 다른 요소들은 측정하지 않았다.

본 연구에서는 탈수 및 파라핀 포매 등으로 인한 인위적 손상을 피하고 신선 상태의 조직을 이용하기 위해 제작이 용이한 압착도말 표본을 이용하였다. 핵등급을 정하는데 있어서 파라핀 포매조직보다 압착도말 표본이 더 우수함은 이미 김 등¹⁷⁾의 연구에서 지적한 바 있다. 김 등¹⁷⁾은 33예의 침윤성 관암중 가운데 2예에서 압착도말 표본을 판독한 후, 2점으로 판독하였던 조직표본의 핵등급을 3점으로 조정하였고, p53 단백질 발현이 파라핀 포매조직보다 압착도말 표본에서 더 많은 수의 종양세포가 더 진하게 염색되는 경향을 보여 주어 세포상태 보존 측면에서 압착도말 표본이 파라핀 포매조직보다 우수하다고 하였다.

한 증례당 측정해야 하는 종양세포의 수는 Baak 등¹³⁾의 연구 결과를 참고로 하였는데, 이들은 정확한 자료를 얻기에 충분한 종양세포의 수는 25개 이상이라고 하였다. 저자들은 각 증례당 최소한 30개의 종양세포를 측정하였으므로 측정된 종양세포 수에 따른 핵크기의 오

차를 최대한으로 줄였다고 생각한다. 조직 표본에서도 압착도말 표본과 동일한 기준에 따라 핵등급을 정하고 핵장경을 측정하여 압착도말 표본의 결과와 서로 비교함으로써 표본에 따른 결과의 차이가 있는지도 조사하였는데, 압착도말 표본과 조직 표본에서 종양세포의 평균 핵장경이 $11.96 \pm 2.20 \mu\text{m}$ 와 $11.65 \pm 1.94 \mu\text{m}$ 로 통계학적으로 서로 유의한 차이가 없었다. 이는 조직 표본의 제작에 있어 수술 검체의 적절한 취급으로 인위적 손상을 최대한 줄인 결과로 생각한다.

종양세포의 핵크기는 개인의 차나 표본의 특성, 조직의 고정 및 탈수 등에 따라 다를 수 있어 종양세포의 핵크기만으로 적용하기가 곤란하므로 조직 표본에서 쉽게 발견할 수 있는 적혈구를 대조 표본으로 사용하기 위해 적혈구의 크기도 함께 측정하였다. 적혈구의 장경이 압착도말 표본과 조직 표본에서 각각 $5.76 \pm 0.53 \mu\text{m}$ 와 $5.42 \pm 0.47 \mu\text{m}$ 로 실제 직경인 $6 \sim 8 \mu\text{m}$ ¹⁸⁾보다 약간 작게 측정한 것은 에탄올과 포르말린 고정으로 인해 세포가 위축한 결과로 보았고, 이러한 현상은 종양세포에서도 동일하게 일어났을 것으로 생각하였다. 적혈구가 위축한 정도를 백분율로 환산하면 실제 크기의 77~82% 정도로 위축한 것으로 나타나는데 세포마다 위축정도가 다를 것이므로, 원래의 종양세포의 핵크기를 환산하기 위하여 이 위축정도를 종양세포에 그대로 적용할 수는 없을 것으로 생각한다. 대조군으로 적혈구 외에 종양 주변부에 있는 정상 관상피세포도 연구에 포함시키려 하였지만 정상 관상피세포라 하더라도 임신, 수유상태, 폐경의 유무 등 환자의 상태에 따라 세포 크기에 차이가 있을 수 있고, 또 다양한 정도의 관상피 증식을 동반하는 경우도 있어 대부분 환자에서 적용 가능한 적혈구 크기만을 대조 표본으로 하였다.

적혈구 장경에 대한 종양세포 핵장경의 비는 핵등급 1점인 예가 1.3~1.4 대 1, 핵등급 2

점과 3점인 예가 각각 1.6~1.7 대 1, 2.2~2.3 대 1로 나타나, 핵등급 3점인 경우는 종양세포의 핵장경이 적혈구 장경의 2배 이상이 됨을 알 수 있었다. 침윤성 관암종에서 종양세포 핵크기를 적혈구 크기와 비교한 연구는 찾을 수 없었고, 관상피내암종의 경우이긴 하지만 Silverstein 등¹⁹⁾이 정한 핵등급의 정의와 본 연구의 결과를 비교해 보았다. 이들은 종양세포의 핵등급에 따른 핵직경과 적혈구 직경의 비가 1등급에서는 1~1.5, 2등급에서는 1~2, 3등급에서는 2이상이라고 하여, 본 연구의 결과와 유사하였다.

본 연구에 포함된 증례가 핵등급이 1점인 예가 1예 뿐이고, 3점인 예가 증례의 반 이상을 차지하는 등 증례의 분포가 고르지 않아서 더 많은 증례에 대한 연구가 필요할 것으로 생각하지만, 2점과 3점인 경우는 종양세포 핵장경이 각각 적혈구 장경의 1.6~1.7배, 2.2~2.3배로 이는 일상적인 외과병리 영역에서 침윤성 관암종의 핵등급을 정하는데 있어서 유용한 지표로 사용할 수 있을 것으로 생각한다.

결 론

유방의 침윤성 관암종에서 핵등급을 정하는데 사용하는 여러 가지 소견 가운데 종양세포의 핵크기에 대한 객관적인 기준을 마련하기 위해 영상분석장치를 이용하여 압착도말 표본과 조직 표본에서 종양세포 핵장경을 측정하고 적혈구 장경에 대한 종양세포 핵장경의 비도 알아 보았다. 변형한 Bloom and Richardson 분류에 따른 각 핵등급에 속하는 종양세포의 평균 핵장경은 압착도말 표본과 조직 표본에서 각각 1점이 $7.56 \mu\text{m}$, $7.53 \mu\text{m}$, 2점이 $8.92 \pm 0.98 \mu\text{m}$, $9.02 \pm 0.74 \mu\text{m}$, 그리고 3점이 $12.90 \pm 1.47 \mu\text{m}$, $12.44 \pm 1.41 \mu\text{m}$ 였으며 표본에 따른 측정값의 유의한 차이는 없었다. 종양세포 핵장경

을 적혈구 장경과 비교하였을 때 1점인 예가 적혈구 장경의 1.3배, 1.4배였고, 2점인 예가 1.6배, 1.7배, 그리고 3점인 예가 2.2배, 2.3배로 이는 일상적인 외과병리 영역에서 유방의 침윤성 관암종의 핵등급을 정하는데 있어서 유용한 지표로 사용할 수 있을 것으로 생각한다.

참 고 문 헌

1. Elston CW, Ellis IO: Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up. *Histopathology* 19: 403-410, 1991
2. Dalton LW, Page DL, Dupont WD: Histologic grading of breast carcinoma: A reproducibility study. *Cancer* 73:2765-2770, 1994
3. Black MM, Barclay TH, Hankey BF: Prognosis in breast cancer utilizing histologic characteristics of the primary tumor. *Cancer* 36: 2048-2055, 1975
4. Rank F, Dombernowsky P, Jespersen NCB, Pedersen BV, Keiding N: Histologic malignancy grading of invasive ductal breast carcinoma: A regression analysis of prognostic factors in low-risk carcinomas from a multicenter trial. *Cancer* 60: 1299-1305, 1987
5. Stierer M, Rosen H, Weber R: Nuclear pleomorphism, a strong prognostic factor in axillary node-negative small invasive breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 20:109-116, 1991
6. Fisher ER, Redmond C, Fisher B, Bass G: Pathologic findings from the National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Projects (NSABP): Prognostic discriminants for 8-year-survival for node-negative invasive breast cancer patients. *Cancer* 65(suppl):2121-2128, 1990
7. Page DL, Dupont WD: New biologic prognostic factors in breast cancer-the article reviewed. *Oncology* 3:58, 1989
8. Henson DE: End points and significance of reproducibility in pathology. *Arch Pathol Lab Med* 113: 830-831, 1989
9. Stenkvis B, Bengtsson O, Jarkrans T, Nordin B, Westman-Naeser S: Histopathological systems of breast cancer classification: Reproducibility and clinical significance. *J Clin Pathol* 36:392-398, 1983
10. 보건복지부: 1992년도 암환자 조사보고서, 보건복지부. 1996, p8
11. Le Doussal V, Tubiana-Hulin M, Friedman S, Hacene K, Spyrtos F, Brunet M: Prognostic value of histologic grade nuclear components of Scarff-Bloom-Richardson(SBR): An improved score modification based on a multivariate analysis of 1262 invasive ductal carcinomas. *Cancer* 64:1914-1921, 1989
12. Hopton DS, Thorogood J, Clayden AD, MacKinnon D: Histological grading of breast cancer: significance of grade on recurrence and mortality. *Eur J Surg Oncol* 15:25-31, 1989
13. Baak JPA, Van Dop H, Kurver PHJ, Hermans J: The value of morphometry to classic prognosticators in breast cancer. *Cancer* 56:374-382, 1985
14. Pienta KJ, Coffey DS: Correlation of nuclear morphometry with progression of breast cancer. *Cancer* 68:2012-2016, 1991
15. Van Der Linden HC, Baak JPA, Linden J, Hermans J, Meyer CJLM: Morphometry and breast cancer II. Characterisation of breast cancer cells with high malignant potential in patients with spread to lymph nodes: preliminary results. *J Clin Pathol* 39:603-609, 1986
16. Giardina C, Renzulli G, Serio G, et al.: Nuclear morphometry in node-negative breast carcinoma. *Analyt Quant Cytol Histol* 18:374-382, 1996
17. 김동석, 이은희, 김기권, 김미진, 이수정: 유방암의 Imprint 표본에서 p53 단백질 발현. *대한세포병리학회지* 6:1-9, 1995
18. Davey FR, Henry JB: Hematology, coagulation, and transfusion medicine. In: Henry JB, Clinical diagnosis and management by laboratory methods, 19th ed, Philadelphia, WB Saunders Co.1996, pp 576-577
19. Silverstein MJ, Poller DN, Waisman JR, et al.: Prognostic classification of breast ductal carcinoma-in-situ. *Lancet* 345:1154-1157, 1995