

Flow Cytometry를 이용한 DNA분석과 고형종양의 예후

고신의학대 외과학 교실

백승언, 신연명, 이승도

Prognostic Significance of Flow Cytometric DNA Analysis in Solid Tumors

Sung Uhn Baek, Yeon Myung Shin, Sung Do Lee

Department of Surgery,

Kosin Medical College, Pusan 602-702, Korea.

Flow cytometric DNA content analysis is a rapid, quantitative method of determining the DNA ploidy status and proliferative index of a given tumor. Aneuploidy is present in 60–70% of solid tumors and has been recognized as a marker of malignancy and unfavorable prognosis.

Also, high S–phase fraction has been recognized as an expression of biological aggressiveness and poor prognosis. This method has been applied widely to many kinds of malignant tumors to evaluate its prognostic significance and possibility of clinical application. But the results are still controversial according to the examiners and kinds of tumors.

To evaluate prognostic significance of this method in gastric carcinoma we examined DNA ploidy and survival time of 235 gastric cancer patients who underwent operations at the Department of Surgery, Kosin Medical College between January 1979 and June 1981, and the results were compared with other prognostic factors such as TNM stage, histologic grade, Lauren's classification and patients' age along with a collective review of recent literatures.

Key word : DNA ploidy, prognosis, gastric carcinoma, collective review

악성 종양의 진단과 치료에 있어 예후의 결정은 지극히 중요한 문제로서, 일반적인 예후 인자로는 원발장기, 조직학적 분화도, 암의 병기, 전이 잠재력, 숙주의 연령 및 성, 면역기능, performance status등이 중요하게 사용되고 있으나, 최근에는 세포수준으로 내려가서, 분화도뿐만 아니라, hormone receptor expression, oncogene 분석 등 분자 생물학적인 영역까지 확대되고 있는 한편, 세포 분열의 속도, growth kinetics 등의 역동적인 생물학적 행태(biologic behaviour)에 대한 관심도 고조되고 있다.

현재까지 진단과 예후 판단에는 조직학적 소견이 가장 중요하지만 이는 악성 종양세포의 구조나 세포간의 관계에 질적인 변화가 올 경우에는 특수 염색등으로 용이하게 알 수 있으나, 세포내의 미세한 구조의 변화나 염색체의 정량적인 변화 등에 대해서는 정확한 측정이 힘들다. Flow cytometry는 유용한 정량분석의 도구로서 최근 기법이 크게 발전되어^{17,30,62,82)} 각 세포의 DNA 함량을 측정함으로써, 세포 주기 분포와 ploidy 양상을 추정할 수 있게 되어, 종양의 진단 및 생물학적 특성을 구명하는데 이용되며, 예후 인자로서 가능성을 보여서, 이에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다^{4,8,9,22,51)}. 구미지역에서는 주로 유방암, 대장암, 폐암에 대한 연구가 많고, 동양지역에서는 위암, 간암에 대한 연구가 많이 발표되며, 최근 국내보고도 늘고 있다.

이에 저자는 먼저 flow cytometry의 방법론을 간략히 설명하고, 각 장기별로 알려진 예후 인자들과 flow cytometry의 예후 인자를 비교, 검토하고, 마지막으로 본교실에서 행한 위암에 대한 연구결과를 소개하려 한다.

방법론

Flow cytometry의 원리는 세포들을 한줄로 통과시키면서, 측면에서 각각의 세포에 일정한 파장의 빛을 비출때 생기는 음영, 형광, 산란광을 분석하여 세포의 크기와 종류

를 감별하는 것으로 시작하였으나, 최근 컴퓨터를 사용한 세포 분석기기의 발달과, 원하는 세포의 구성요소와 선택적으로 결합하는 형광물질이나 단크론항체등의 개발로 인해 정확하고 신속하게(현재 매초 10만개정도 분석가능)원하는 종류의 세포를 분리해낼 수 있게 되어 응용범위가 크게 넓어져서 수십종의 림프구도 신속히 분류할 수 있고, DNA, RNA, Mitochondria, plasma membrane, enzyme activity, 세포질막에 있는 oncoprotein등도 한꺼번에 정성 및 정량분석이 가능하게 되었으며 향후 응용이 계속 확대될 전망이다^{56, 78)}.

종양의 연구에서 주로 이용되는 두 파라미터는 DNA ploidy와 세포 주기 분석이다. 정상 세포들의 세포 주기에 따른 DNA 양을 보면 GO/G1 phase의 세포들은 DNA 함량이 모두 2N(2C or diploid)이며, DNA synthesis가 끝난 G2/M phase의 세포들은 DNA 함량이 배가되어 4N(4C or tetraploid)이며, DNA synthesis 중인 S-phase의 세포들은 2N에서 4N사이의 DNA 함량을 나타내게 되며, 각각의 phase간의 세포수의 비율도 일정 범위내에 있게 된다.

악성 종양의 발생에 관한 연구에서 세포 유전학적인 이상이 중요시 되고 있는데, 이 경우 염색체의 수나 구조의 변화를 초래할 가능성이 높다고 하며, 실제로 대부분의 악성 종양에서 염색체의 이상이 증명되었고, 이는 DNA 함량의 변화로 나타나고, 비악성에서도 일부 나타날 수 있으나^{79,80)} 악성의 유용한 지표로 간주되어 왔다^{8,9,53,71)}.

한때는 악성 종양은 정상 세포보다 많은 DNA 함량을 가진다고 생각되기도 했으나^{5,11, 47)} 실제로는 대부분의 악성 종양이 diploid DNA 함량을 나타낸다. 일부 악성 종양에서는 정상 diploid GO/G1과 다른 DNA 함량을 가진 GO/G1 세포군(an euploid GO/G1)과 그 배수되는 곳에 G2/M 세포군(an euploid G2/M)이 관찰되는데 이를 DNA an euploidy 또는 an euploidy를 나타낸다고 말하며, an euploidy

loid G0/G1과 정상 diploid G0/G1의 DNA 함량비를 DNA index라고 한다. Diploid 종양의 DNA index는 1.0이 되고 그 이상이면 hyperdiploid, 이하를 hypodiploid라고 한다. Aneuploid빈도는 종양의 종류에 따라 차이가 많고 Barlogie등⁹⁾은 4941예의 각종 악성 종양 분석에서 평균 67%라 하였다.

DNA함량에 따른 각각의 phase간의 세포수의 비율도 중요한 파라미터로서 S-phase fraction(S-phase에 있는 세포수/전체세포수) 또는 proliferative index는 종양의 성장속도의 지표가 될 수 있으며, 정상에서는 대체로 10% 이하라고 한다⁸¹⁾. 최근에는 수술 전에 bromodeoxyuridine(BrdU)을 주입한 후 술후 표본에서 DNA에 함입(incorporation)된 양을 조사하여 보다 역동적으로 S-phase fraction을 알 수 있는 방법이 개발되어^{17,82)} 임상적용이 늘고있다. 과거에는 ³H-thymidine을 사용했으나 시간이 걸리고, 해로운 단점이 있었다.

그 외 중요한 기술적인 진보를 보면, 초기의 flow cytometry는 방법상 세포를 한줄로 쏘아보내기 위하여 세포의 균질부유액을 만들어야 하므로, 주로 혈액 계통의 종양에서 응용되어져 왔으나, 1983년 Hedley등³⁰⁾에 의해서 paraffin-embedded pathologic specimen에서도 세포를 분리할 수 있는 방법이 개발되어 고형종양의 후향적 연구가 가능하게 되었다. Park등은⁶²⁾ 모든 lymphohematopoietic cell에 반응하는 항체(HLe-1)를 사용하여 이들을 제거하여 종양세포의 밀도를 높였으며 이러한 유형의 연구는 계속되고 있다.

이상의 방법들을 여러 종류의 종양에 대해 적용하여 수많은 임상연구가 발표되었으며, 주된 관심은 두가지로 요약되는데, 첫번째는 현재까지 예후인자로서의 가능성을 보이는 DNA index 또는 DNA ploidy양상과, 종양의 성장속도의 지표가 될 수 있다고 하는 S-phase fraction 또는 proliferative index가 실제로 어느 정도 환자의 생존율이나 재발에

영향을 미치는가 하는 문제와 두번째는 더 중요한 의문점으로 상기 지표들이 과연 독립적인 예후 인자가 될 수 있는가 하는 문제로서, 다른 예후 인자들과 종속이나 관련성을 조사하고 있으나 종양의 종류나 연구자들에 따라 아직 많은 논란이 있다^{34,36,66,74)}. 저자의 위암 연구나 다른 많은 연구에서 aneuploidy빈도는 병기가 진행될수록 높았는데, 이를 해석함에 있어 실제로 aneuploidy가 원인이 되어 병이 진행된 건지, 병이 진행된 결과로 aneuploidy가 나타났는지 명확히 구분짓기 어려워 예후 인자로서의 가치를 떨어뜨리고 있다. 또 다른 문제점으로 aneuploid의 기준이 연구자에 따라 DNA index나 coefficient of variation의 범위에 차이가 있고, 세포 주기의 분석 결과를 분류하는 통일된 기준이 없이 자의적이므로 결과를 비교하는데 어려움이 있다.

유방암

유방암의 예후 인자로서 가장 중요한 것은 액과 림프절 전이여부 및 전이숫자이며, 그 외에도 steroid receptor존재여부, 종양크기, 환자의 폐경여부, 종양세포의 분화정도등이 관여한다.

Aneuploid빈도는 50-92%로 보고되고^{25, 29,32,35,50,59,75)}, Aneuploidy군에서 무병 생존율(disease-free survival)이 짧고 전체 생존율(overall survival)이 나쁘다는 연구결과가 많다^{6,14,15,18,19,29,35)}. Dressler등¹⁹⁾은 346예의 node-negative 환자군의 연구에서, Hedley등²⁹⁾은 490예의 Node-positive 초기 유방암 환자군의 연구에서 aneuploid군의 무병 생존율이 짧았다고 하였으며, Kallioniemi등³⁵⁾은 림프절 전이에 상관없이 독립적인 예후인자로 규정하였으나 Keyhani-Rofagha등³⁶⁾은 165예의 node-negative환자군의 5년 및 10년 생존율에서 차이가 없어 독립적인 예후인자로서 의미가 없다고 하였다.

한편 S-phase fraction과 예후의 관계를 보

면, Hedley등²⁹⁾은 S-phase fraction이 10% 이상일 경우 무병 생존율이 짧았으며, aneuploidy 및 high grade와 강한 상관관계를 보였다고 하였으며, 다변량 분석 결과 S-phase fraction의 예후적 의미는 종양의 grade와 관련됨을 시사하였으나, Kallioniemi등³⁵⁾은 각기 독립적이라 하였다.

다른 예후 인자들과 관련성을 보면, 림프절 전이는 일반적으로 aneuploid군에서 흔하고 심하게 침범된다고 하며^{21,29,35)} S-phase fraction에 따른 차이는 없다고 한다. Estrogen receptor나 progesterone receptor도 diploid군에서 양성율이 높았다^{15,21,29)}.

간암

간암에서 flow cytometry는 주로 세포 분리 능력을 이용해서 암의 성인, 진단, 치료법 등의 기초연구에 널리 이용되고 있으나 예후 인자로서 연구는 근래에 보고되고 있고 역시 aneuploid^{13,60,88)}와 S-phase fraction¹³⁾이 지표로 사용되고 있다.

Aneuploid빈도는 35%에서 90%까지 보고되며^{12,13,60,88)} 나타날 경우는 병기가 진행된 경우가 많고, 전체 생존율이나 무병 생존율이 짧으며^{13,60)}, 간문맥 침범이나⁸⁸⁾ 혈청 alpha-feto protein(AFP)과 관련^{12,60)}도 보고되고 있다.

Chiu등¹³⁾은 절제 간세포암 130예의 다변량 분석에서, 종양의 크기(5cm)와 DNA ploidy가 전체 및 무병 생존율을 예측할 수 있는 예후 인자였고 S-phase fraction도 pattern II (aneuploid tumors with single G0/G1 peak)에서 전체 생존율에 유의한 영향을 끼쳤다고 하였다. Omagari등⁶⁰⁾은 41예의 간세포암 연구에서 aneuploid빈도는 61%였고, diploid군에 비해 병기가 진행되어 있고, AFP이 높았으며, 예후가 불량하여 독립적인 예후인자라 하였다. Yumori등⁸⁾은 34예의 간세포암 신선표본 연구에서 aneuploid군은 53%였고 병기가 진행된 경우가 많고, 간문

맥 침범이 유의하게 많다고 하였다(61% vs 6%, $P<0.01$). Chen등¹²⁾은 절제군 50예의 연구에서 Aneuploid군은 78%였고 혈청 AFP이 40ng/ml 이상이 86.1%로서 diploid군의 13.9%와 유의한 차이를 보였으나 HBsAg양성율, 간경화의 동반, 종양크기, 생존율과는 무관했다.

다른 각도의 응용으로 Gu²⁴⁾는 절제 간세포암 22예의 조사에서 간암세포의 90%가 aneuploid였고, 병리학적으로 음성인 절단면에서 61.9%의 aneuploid가 증명되어 중요한 재발요소가 되며 이경우 수술이 불충분하므로 보조요법이 필요하다고 하였다.

Hata등²⁷⁾은 15예의 hepatoblastoma 파라핀 표본연구에서 aneuploid종양이 혈관 침범이 많고, 생존율이 불량하다고 하였다.

대장암

대장암에서 가장 예후적 가치가 높은 것은 병리소견을 바탕으로 한 Dukes' stage이며, 그 외 환자의 연령, 혈청 carcinoembryonic antigen(CEA)치, 종양의 크기 및 부위등이 알려져 있다.

Aneuploid빈도는 36-82%로 넓은 범위를 보여, heterogeneity와 무관하지 않다고 하나 대체로 65% 정도이다^{31,34,41,64,66,69,74)}. Aneuploidy가 불량한 예후를 보인다는 논문이 많은데^{3,31,41,64,69,83)}, Kokal등⁴¹⁾은 절제가능한 결직장암 147예의 연구에서, aneuploid군은 분화가 나쁘고, 장막침범이나, 림프절 전이가 많았고 재발율이 46.7% (diploid군 : 4.8%, $P<0.001$)로서 Cox 회귀분석에서 재발과 생존을 추정의 가장 중요한 예후 인자라 하였다. Scott등⁶⁹⁾은 결직장암 264예의 예후인자의 분석 결과 aneuploid는 좌측암에 많고, 예후가 불량하며, 특히 Dukes' stage B2와 C군에서 저명하였고, Cox 다변량 분석 결과 독립적인 예후인자라 하였다. Heimann등³¹⁾은 3cm이하의 직장암 39예의 분석결과 역시 독립적인 예후인자라 하였다.

반면 Jones등³⁴⁾은 39예의 결직장암의 전향성 조사결과 전체적으로 aneuploid군의 예후가 나빴으나 Dukes' B군 때문이었고, Cox다변량분석에서, 생존 예측의 가장 중요한 인자는 외과의의 operability평가였고, 다음은 pathologic classification, 환자의 연령등이었으며, DNA ploidy는 독립적인 의미가 없다고 하였으며, Rognum등⁶⁶⁾은 대장암 100예의 연구결과 5년 생존율에서 의미있는 차이가 없었다고 하였다. Suzuki등⁷⁴⁾은 51예의 결직장암과 종래의 임상병리 소견, 분화도, 병기, 림프절 전이, 침습도들과 상관성이 없다고 하였다.

다른 각도의 응용으로 Banner등⁷⁾은 76예의 결장 polyp연구에서, 악성화 경향이 높을수록 aneuploid빈도가 높아 조기진단, 치료의 가능성을 시사하였다. Lofberg등⁴⁸⁾도 장기간의 궤양성 대장염 53예의 연구에서 악성화 경향을 찾는데 유용할 수 있다고 하였다. Rognum등⁶⁵⁾은 38예의 aneuploid군에서 재발한 15예중 12예에서 혈중 CEA가 증가하였고, diploid군은 재발한 8예중 1예에서만 증가하여, 진단시 aneuploid가 있으면 혈중 CEA를 정기적으로 검사해야 한다고 하였다. Ngoi등⁵⁴⁾은 37예의 결직장암에서 aneuploid종양과 10cm떨어진 곳의 점막에서도 S-phase fraction이 높고, 21%의 aneuploid를 나타내므로, 결직장암의 생성(carcinogenesis)과정에서 점막은 하나의 unit로 작용한다는 가설을 뒷받침할 수 있다고 하였으며, 이런 방법은 동시성암에서 heterogeneity의 증명에 응용될 수도 있다.

위암

위암의 예후인자는 일반적으로 병리조직학적 소견을 기준으로 한 TNM병기가 가장 중요하며, 그중에서도 림프절 전이와 종양의 침습도가 중요하며 그외 조직학적 분화도, Lauren씨 분류⁴⁶⁾등이 어느정도 관계하며, 연령에 대해서는 논란이 있다⁷⁰⁾. 주로 일본

에서 행해진 DNA분석의 예후적 가치에 대해서는 대체로 의미가 있다고 하나 아직 통일된 견해가 없는 실정이며, 다른 인자들과 연관성도 논란이 많다. DNA histogram의 분류 방법이나, 사용하는 지표, 관련 인자들이 연구자들에 따라 각기 자의적으로 제시되고 있어 그 결과를 직접 비교하기 어렵다.

DNA histogram의 분류방법은 분류 기준에 따라 필자가 역시 자의적으로, 크게 두부류로 나누어 보았다. 첫번째 부류는 DNA함량(channel number)에 따른 세포의 분포량을 분류기준으로 하였다. Inoguchi등³³⁾은 DNA분포가 6C(hexaploid)영역내에 있고, 90%이상의 세포가 4C미만의 DNA를 가질 때를 I형, 10%이상의 세포가 6C이상의 DNA를 가질 때를 III형, 기타를 II형으로 분류하였으며, Haraguchi등²¹⁾, Okamura등⁵⁸⁾, Korenaga등^{43,45)}이 이를 준용하였다. Korenaga등⁴²⁾은 III형을 high ploidy, 나머지를 low ploidy로 양분하기도 하였다. 두번째 부류는 stem line의 수와 위치를 기준으로 하였는데 Hattori등²⁸⁾은 diploid형을 1형, hyperdiploid(heteroploid)형을 2형, 1형과 2형의 mosaic형을 3형, 두개 이상의 heteroploid stem line의 mosaic형을 4형으로 분류하였고 Sowa등⁷³⁾, Sasaki등⁶⁷⁾, Yonemura등^{85,86,87)}, Oda등⁵⁵⁾, 김등³⁷⁾이 이를 준용하였으나, 이런 방법은 정확한 분류가 어려운 경우가 많고, 결과 분석도 복잡해져서, 필자의 위암 연구에서는 판독에 있어 비교적 객관성과 반복성이 좋은 DNA index만을 기준으로 단순히 diploid와 aneuploid군으로 대별하였는데 Czerniak등¹⁶⁾, Kimura등³⁸⁾, Sasaki등⁶⁸⁾, Tosi등⁷⁷⁾, Yonemura등⁸⁷⁾도 같은 입장이며, 구미지역에서는 가장 흔히 사용되는 분류법이다. Kimura등³⁹⁾은 Aneuploid군에서 DNA index를 기준으로 다시 3군으로 나누기도 하였다.

분류방법의 차이로 인해, 첫번째 부류에서는 DNA분석의 예후적 가치를 나타내는 파라미터로 aneuploidy, S-phase fraction외에

high ploidy란 개념을 추가하였고, 두번째 부류는 자의성이 많아서 예후적 의미를 서로 비교하기가 어렵다.

High ploidy에 대해서 Korenaga등⁴²⁾은 점막암 74예의 연구 결과 high ploidy군의 비율은 암의 크기와 무관하고 5mm이하의 크기에서도 aneuploid가 나타날 수 있다고 하였으며, 254예의 위암 연구에서⁴⁵⁾ high ploidy군은 침습이 더 깊고, 림프절 전이가 많고, 생존율이 불량하며, 다변량 분석에서 독립된 주된 예후 인자라 하였다. Inokuchi등³³⁾, Okamura등⁵⁸⁾, Aretxabala등²⁾은 조기위암에서 예후 인자로서 high ploidy에 growth pattern의 중요성을 언급하였다. Kimura등³⁸⁾은 143예의 위암 연구에서, high ploidy는 정맥 침범과 간 전이와 밀접하게 연관되어 있고, 간 전이를 예측할 수 있는 소견이라고 하였다.

Aneuploidy도 high ploidy와 유사하게 침습도가 깊고, 림프절 전이가 많으며, 재발율이 높다고 한다^{1,38,39,77,85,86,87)}. 위암의 Aneuploid빈도는 32.6%에서 80%까지 보고되며^{1,2,28,38,67,77,85,87)} 필자의 논문에서는 53.2%였다. Yonemura등⁸⁷⁾은 120예의 조기위암 연구에서 aneuploid군이 점막하조직, 혈관 및 림프절 침윤이 유의하게 많고 diploid군에는 재발이 없는데 비해, 재발율이 21%로서 중요한 예후인자가 될 수도 있다고 하였고, Tosi등⁷⁷⁾은 병기 2,3에서 multiploid군의 예후가 나쁘다고 하였으며, Aretxabala등¹⁾은 aneuploid군이 이질성이 높고, 간 전이가 많다고 하며, Kimura등^{38,39)}은 aneuploid와 함께 high DNA index군이 검할때 예후가 나쁘다고 하였다. 그외 조직학적 분화도와 DNA ploidy의 분포는 분화가 잘 될수록 aneuploid빈도가 높아 생존율과 비교할 때, 역설적으로 보이나 Petrova등⁶³⁾, Korenaga등⁴²⁾, Sasaki등⁶⁸⁾, Oda등⁵⁵⁾도 같은 결과를 얻었으며 Yonemura등⁶³⁾, Kim등³⁷⁾, Tosi등⁷⁷⁾은 분화도와 무관하다 하였다. Korenaga등⁴²⁾은 분화된 선암에서 aneuploid 병소는

점막하조직에 국한된 경우에도 림프절 전이와 혈행성 재발이 많고, 미분화형에서는 초기에는 aneuploid병소가 거의 없고, 침습도가 깊어지면 급격히 빈도가 증가한다고 하였다. Czerniak등¹⁶⁾은 미만형에는 diploid가 많고 장형에는 aneuploid가 많다고 하였다.

Proliferative activity와 예후의 관계는 주로 bromodeoxyuridine(BrdU) labeling방법으로 조사한 논문이 많다. Yonemura등⁸⁵⁾은 129예의 위암연구에서 aneuploid군에서 림프관 침범, 림프절 전이 및 진행형이 많고, 생존율이 불량하였으며, BrdU labeling index는 평균 10.4%였으며, 이것은 조직형이나, 병기와 상관이 없었으며, diploid군의 평균은 6.0% aneuploid군은 11.9%로서 DNA ploidy와 밀접한 상관관계를 보여 역시 예후적 의미가 있다고 하였고, 120예의 조기암 연구⁸⁷⁾에서도 역시 aneuploid군에서 점막하조직 침습, 혈관침습, 림프절전이가 많고, BrdU labeling으로 조사한 S-phase fraction이 유의하게 높았고 재발율이 높았다(21% vs 0). 493예의 다변량분석⁸⁴⁾에서도 독립적인 예후 인자는 DNA ploidy, 간 전이, 복막 전이, 림프절 전이 및 BrdU labeling index였으며, DNA ploidy와 BrdU labeling을 겹치면 더 정확히 예후를 추정할 수 있었다고 하였다. Ohyama등⁵⁷⁾도 BrdU labeling과 DNA ploidy pattern이 긴밀히 연관되며, 각기 독립적인 예후인자라 하였다.

그외 Sowa등⁷²⁾은 병기가 진행된 암은 88.2%가 III형(2 or more peak)이고, 이 경우 간, 복막 및 림프절 전이가 흔하다고 하였다.

최근 DNA ploidy의 이질성에 대한 논란이 있는데 Haraguchi등²¹⁾은 장막 침범이 된 미분화암에서 위벽 각층의 DNA ploidy를 조사한 결과, 30%에서 DNA ploidy의 이질성이 증명되었는데, 점막에서 low ploidy가 더 깊은 층에서는 high ploidy를 나타냈고 이경우 림프절 및 복막 전이가 흔하여 위벽의 침윤 정도에 따라 미분화 위암의 특성이 달라질 수도 있다고 시사하였다. Sasaki등⁶⁷⁾은 동일

Table 1. Basic Clinical Data

Total cases	235(79.1-81.6)
Mean age	52.3Y
Sex(M:F)	1.5:1(141:94)
Location	Upper(18), Middle(46), Lower(163) Whole stomach(8)
Histologic grade	Well(38), Moderate(79), Poor(89), Mucinous(25)
Lauren's type	Intestinal(89), Diffuse(83), Unclassified(58)
TNM staging	Stage I, II, III, IV(11, 29, 130, 65)
Survival	1Y(65.1/87.2), 3Y(34.9/51.4)
(Overall/Radical)	5Y(31.0/45.9)
Op. mortality	2.6%(6/235) Radical group: 1.3%(2/150)
Aneuploid	53.2%(125/235)

Table 2. Depth of invasion, Nodal involvement and DNA ploidy

	N0	N1	N2	N3	Total
T1	5/6*	1/1	1/0		7/7
T2	14/6	4/5	9/11	2/1	29/23
T3	6/4	4/2	37/41	1/10	49/58
T4	2/3	0/1	18/19	1/10	21/33
Total	27/19	9/9	65/71	5/22	106/121

Mo(no distant metastasis): 91/95

M1(distant metastasis): 16/28

*Diploid/Aneuploid

한 위암에서 여러개의 표본을 채취할 때, 서로 다른 DNA ploidy를 보이는 경우가 40%, 대장암에서는 7.4%로서, 특히 위암에서는 정확한 DNA ploidy를 결정하기 위해 여러개의 표본을 채취해야 한다고 하였다. 다른 각도이긴 하지만, 이와 대조적으로 Korenaga 등⁴³⁾은 원발암과, 재발암의 DNA분포가 거의 변하지 않는다고 하였으며, Korenaga 등⁴⁴⁾은 직경 5mm미만의 조기위암과 직경이 더 크고 진행된 암의 비교연구에서, high ploidy군은 병리조직학적으로 분화가 잘 되어있고 병소가 주로 하부이며 크기에 따른 빈도 차이가 없다고 하며 5mm미만의 점막에 국한된 암에서도 aneuploid가 나타날 수 있다고 하였다.

이상에서 본 바와 같이 flow cytometry를 이용한 위암의 연구는 주로 일본에서 이루어지고 있으며, 국내에서는 다수의 증례로, 장기 생존율을 비교검토했거나, 다른 예후인자들과 비교분석한 논문은 아직 발표된 바 없다. 이에 필자들은 1979년 1월부터 1981년 6월까지, 본대학 부속 부산 복음병원 외과에서 수술치험한 위암환자중 paraffin-embedded pathologic specimen으로, DNA분석이 가능하고 임상적인 추적조사가 완료된 235예를 대상으로(Table 1) DNA ploidy양상을 diploid군과 aneuploid군으로 대별하고, 이미 알려진 다른 예후인자들과 DNA ploidy의 분포를 조사한 결과 몇가지 새로운 측면이 관찰되었는데 첫째로 TNM병기(19

Table 3. Significance of various Prognostic factors in Radical resection cases

Prognostic factors	No. of patients	Survival rate(%)		
		1 Y	3 Y	5 Y
DNA ploidy				
Diploid	78	92.3(72)	56.4(44)	50.0(39)
Aneuploid	70	81.4(57)	45.1(32)	41.4(29)
Pathologic grade				
Well D.	26	84.6(22)	57.7(15)	53.8(14)
Moderately D.	48	85.4(41)	52.1(25)	50.0(24)
Poorly D.	57	89.4(51)	49.1(28)	40.4(23)
Mucinous	16	87.5(14)	43.8(7)	37.5(6)
Lauren's type				
Intestinal	54	83.4(45)	55.6(30)	55.6(30) *
Diffuse	54	87.0(47)	40.7(22)	33.3(18)
Unclassified	37	91.9(34)	59.5(22)	51.4(19)
TNM stage				
Stage I	11	100(11)	90.9(10)	90.9(10)
Stage II	28	92.9(26)	67.9(19)	67.9(19) **
Stage III	109	84.4(92)	43.1(47)	35.8(39) ***
Stage IV	0	0(0)	0(0)	0(0)

*P<0.05 ** *** P<0.005

83년 AJCC분류안 채택)와의 관계로 병기가 증가할수록, aneuploid빈도가 증가하였고, T 인자와 N인자가 각기 의미를 가지며 N인자가 더 현저하였다(Table 2). 이 결과는 aneuploid가 독립된 예후인자가 아니라, TNM병기가 진행된 결과로 나타난 현상일 가능성을 배제할 수 없으며, 예후적 가치를 정확히 평가하기 위해서는 전향성 연구로서 동일한 T, N, M에서 생존율을 비교해야 하며, T, N, M인자들로 표준화 않은 논문에서는 예후적 가치를 신중히 해석해야 할 것으로 생각한다. 조기위암에 관한 연구들도^{2,16, 33,58,85,87)} T인자, N인자가 다를 수 있어 해석에 주의를 요한다. 실제로 전체 229예(수술사망 6예 제외됨)의 생존곡선 분석에서

diploid군의 생존율이 유의하게 높았으나(P=0.004)근치 절제군에 국한시키면, 통계적 유의성이 없어졌다(P=0.09)(Fig. 1, 2). 둘째, 연령에 따른 차이로서, 40대 미만의 약년층과 50대 이상의 노년층으로 분류한 결과 예후인자들의 집단적인 차이를 발견하였는데 약년층은 diploid가 57.7%(45/79)로서, 노년층의 41.4%(60/145)에 비해 많았고, Lauren씨 분류상 미만형이 61.5%(16/26), 장형은 23.1%로서 미만형이 훨씬 많았고, 저분화형이 73%(19/26)로서 대부분을 차지하였다. 연령별 분류는 종래의 DNA 분석 연구에는 시도되지 않았던 것으로 계속적인 연구관찰이 필요할 것으로 생각된다. 필자들의 연구결과를 요약하면 diploid군이

aneuploid군보다 좋은 예후를 보이고 있으나 DNA ploidy만 가지고는 임상병기나 병리조직학적 소견보다 예후적 가치가 더 우월하지는 않다고 판단되며(Table 3) 다른 지표와 조합해서 예후를 추정하거나, 암의 이질성의 연구에는 중요한 가치가 있을 것으로 생각된다.

요약 및 전망

Flow cytometry는 신속한 정량분석의 도구로서, 단클론 항체등 선택성이 높은 형광 염색물질의 개발로 응용범위가 넓어지고 있으며, 그중 세포내 DNA함량의 분석으로 알 수 있는 aneuploidy는 악성종양의 약 60-70%에서 나타나며, 나타날 경우는 악성의 지

표로 간주되며, 생존율이 불량하고, 재발율이 높은 경우가 많아 예후가 불량하다고 하며, S-phase fraction도 biological aggressiveness의 표현으로 간주되고 있다. Merkel과 McGuire⁵²⁾는 국소 유방암, 비소세포성 폐암, 결직장암, 난소암에서는 양자가 모두 불량한 예후의 지표가 되고 신장, 방광, 전립선, 자궁내막등의 암에서는 aneuploid가 지표가 된다고 하였으며 Williams와 Daly⁸¹⁾는 유방암(1병기 및 2병기), 결직장암, 표층 방광암, 악성 흑색종에서 예후적 의미가 있다고 하였다.

그러나 Aneuploid의 정확한 원인기전이 단일하지 않으므로 해석에는 논란이 많고, 방법차이로 인한 오차나 분류기준의 차이로 결과의 직접 비교가 어렵고, 예후적 가치에

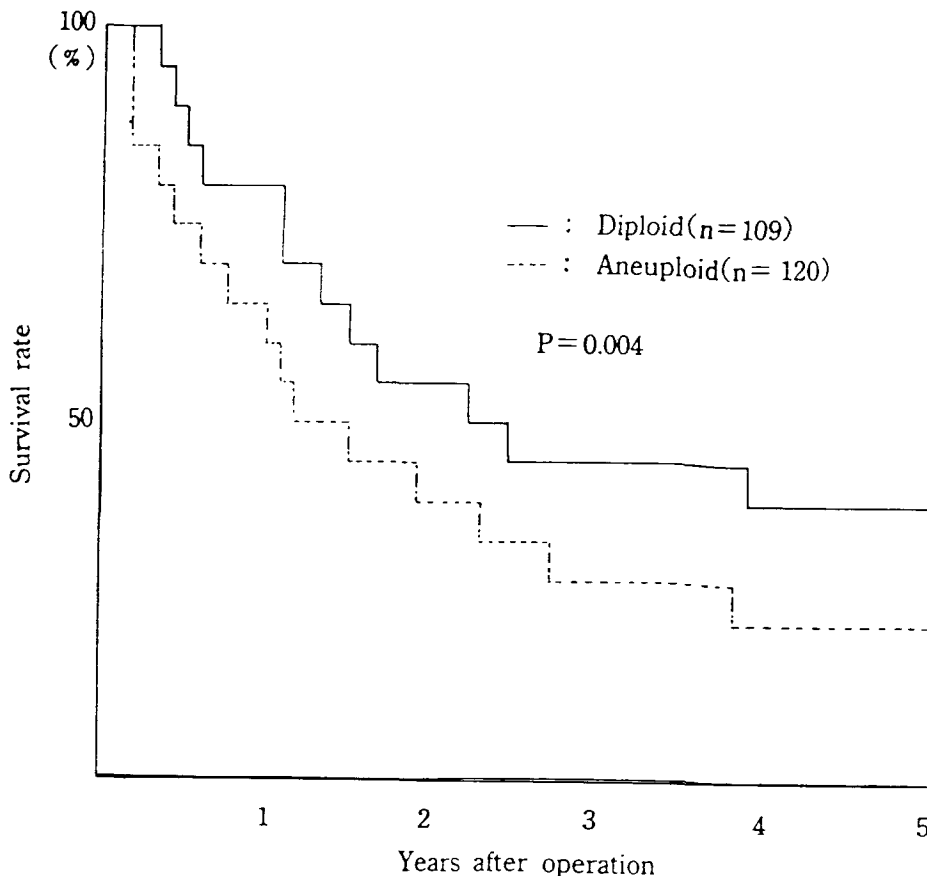


Fig. 1. DNA ploidy and survival in all cases

대해서도 상이한 결론을 내는 수도 있어 아직 단일예후 인자로 규정하기는 어려우며, 현재는 병리 조직소견등 다른 인자들과 결합하여, 치료방침 결정에 응용되고 있는 추세이다.

Flow cytometry의 방법은 계속 발전할 것이며, 더 정확한 예후판정을 위해 종양 표지자, oncogene등과 조합하여 연구가 진행되고 있으며, 종양의 세분화와 이질성의 증명에 기여할 것으로 전망된다.

REFERENCES

1. Aretxabala X, Yonemura Y, Sugiyama K, Kamata T, Konishi K, Miwa K, Miyazaki I : DNA ploidy pattern and tumor spread in gastric cancer. *Br J Surg* 75 : 770-73, 1988
2. Aretxabala X, Yonemura Y, Sugiyama K, Kamata T, Konishi K, Miwa K, Miyazaki I : DNA ploidy in early gastric cancer and its relationship to prognosis. *Br J Cancer* 58 : 81-4, 1988
3. Armitage NC, Robins RA, Evans DF, et al : Tumor cell DNA content in colorectal cancer and its relationship to survival. *Br J Surg* 72 : 828-30, 1985
4. Atkin MB, Kay R : Prognostic significance of modal DNA value and other factors in malignant tumours, based on

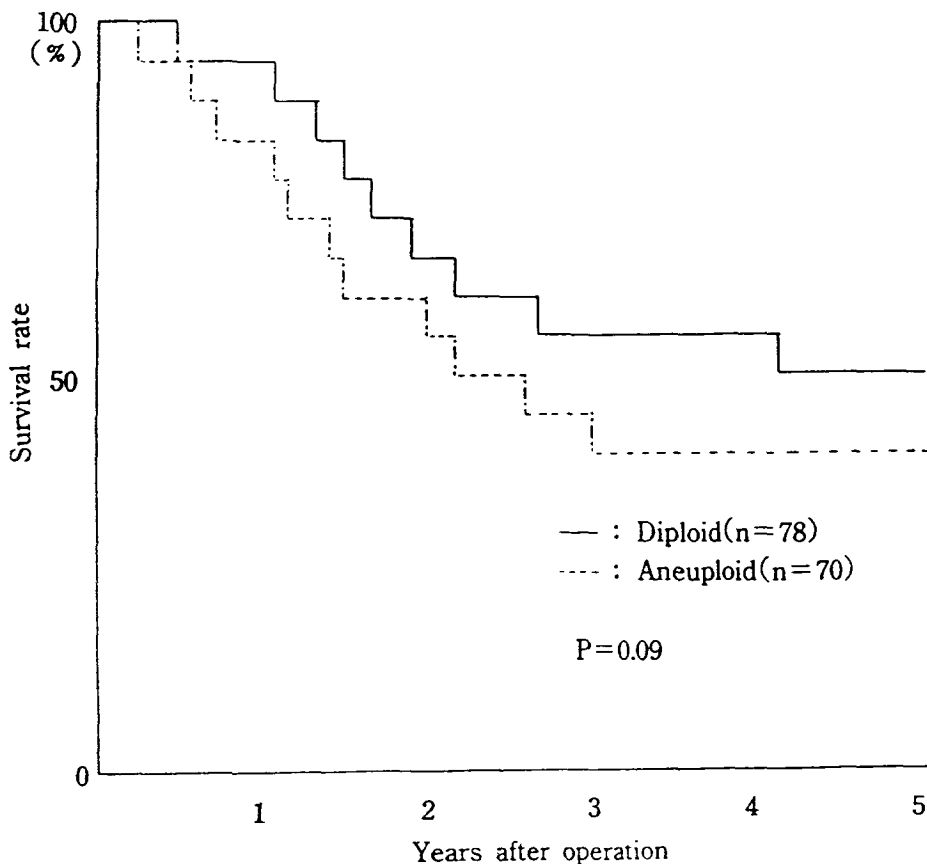


Fig. 2. DNA ploidy and survival in radical resection cases

- 1465 cases. Br J Cancer 40 : 210-21, 1979
5. Atkin NB, Richards BM : Deoxyribonucleic acid in human tumors as measured by microspectrophotometry of feulgen stain : A comparison of tumors arising in different sites. Br J Cancer 10 : 769-86, 1956
6. Auer G, Erikson E, Azevedo E, Caspersson T, Wallgren A : Prognostic significance of nuclear DNA content in mammary adenocarcinoma in humans. Cancer Research 44 : 494-6, 1984
7. Banner BF, Chacho MS, Roseman DL, Coon JS : Multiparametric flow cytometric analysis of colon polyps. Am J Clin Pathol 87 : 313-8, 1987
8. Barlogie B, Drewinko B, Schumann J, Goede W, Dosik G, Latreille J, Johnston DA, Freireich EJ : Cellular DNA content as a maker of neoplasia in man. Am J Med 69 : 195-203, 1980
9. Barlogie B, Raber MN, Schumann J, Johnson TS, Drewinko B, Swartzendruber DE, Gohde W, Andreeff M, Freireich EJ : Flow cytometry in clinical cancer research. Cancer Research 43 : 3982-97, 1983
10. Baisch H, Klöppel G, Reinke B : DNA ploidy and cell-cycle analysis in pancreatic and ampullary carcinoma : flow cytometric study of formalin-fixed paraffin-embedded tissue. Virchows Archiv A Pathol Anat 417 : 145-50, 1990
11. Caspersson TO : Quantitative tumor cytochemistry. Cancer Res 39 : 2341-55, 1977
12. Chen MF, Hwang TL, Tsao KC, Sun CF, Chen TJ : Flow cytometric DNA analysis of hepatocellular carcinoma : preliminary report. Surgery 109(4) : 455-8, 1991
13. Chiu JH, Kao HL, Wu LH, Chang HM, Lui Wy : Prediction of relapse or survival after resection in human hepatomas by DNA flow cytometry. J Clin Invest 89(2) : 539-45, 1992
14. Cornelisse CZ, Van de Valde CHJ, Caspers RJC, Moolenaar AJ, Hermans J : DNA ploidy and survival in breast cancer patients. Cytometry 8 : 225, 1987
15. Coulson PB, Thornthwaite JT, Woolley TW, Sugarbaker EV, Seckinger D : Prognostic indicators including DNA histogram type, receptor content and staging related to human breast cancer survival. Cancer Res 44 : 4187, 1984
16. Czerniak B, Herz F, Koss LG : DNA distribution patterns in early gastric carcinomas. A Feulgen cytometric study of gastric brush smears. Cancer 59 : 113-17, 1987
17. Dolbeare FA, Gartzner HG, Pallavicini MG, Gray JW : Flow cytometric measurement of total DNA content and incorporated bromodeoxyuridine. Proc Natl Acad Sci 80 : 5573
18. Dowle CS, Owainati A, Robins A et al : Prognostic significance of the DNA content of human breast cancer. Br J Surg 74 : 133, 1987
19. Dressler LG, Clarke G, Owens MA et al : DNA flow cytometry predicts for relapse in node negative breast cancer specimens, abstract. Proc Am Soc Clin Oncol 6 : 57, 1987
20. Ewers SB, Langstrom E, Baldtorp B, Killander DW : Flow cytometric DNA analysis in primary breast carcinoma

- and clinico-pathologic correlations. *Cytometry* 5 : 408-19, 1984
21. Feichter GE, Mueller A, Kaufmann M et al : Correlation of DNA cytometric results and other prognostic factors in primary breast cancer. *Int J Cancer* 41 : 823-8, 1988
 22. Friedlander ML, Hedley DW, Taylor IW, Russel P, Voates AS, Tattersall MH : Influence of cellular DNA content on survival in advanced ovarian cancer. *Cancer research* 44 : 397-400, 1984
 23. Friedlander ML, Hedley DW, Taylor IW : Clinical and biological significance of aneuploidy in human tumours. *J Clin Pathol* 37 : 961-74, 1984
 24. Gu P : DNA content measured by flow cytometry in primary hepatic carcinoma and its significance. *Chung-Hua-Wai-Ki-Tsa-Chen* 29(6) : 361-4, 397, 1991
 25. Haag Dw, Goerttler K, Tschahargane C : The proliferative index (PI) of human breast cancer as obtained by flow cytometry. *Pathol Res Pract* 178 : 315-22, 1984
 26. Haraguchi M, Okamura T, Korenaga D, Tsujitani S, Marin P, Sugimachi K : Heterogeneity of DNA ploidy in patients with undifferentiated carcinomas of the stomach. *Cancer* 59 : 922-24, 1987
 27. Hata Y, Ishizu H, Ohmori K, Hamada H, Sasaki F, Uchino J, Inoue K, Naitoh H, Fujita M, Kobayashi T et al : Flow cytometric analysis of the nuclear DNA content of hepatoblastoma. *Cancer* 68(12) : 2566-70, 1991
 28. Hattori T, Hosokawa Y, Fukuda M, Sugihara H, Hamada S, Takamitsu T : Analysis of DNA ploidy patterns of gastric carcinomas of Japanese. *Cancer* 54 : 1591-7, 1984
 29. Hedley DW, Rugg CA, Gelber RD : Association of DNA index and S-phase fraction with prognosis of node positive early breast cancer. *Cancer Research* 47 : 4729, 1987
 30. Hedley DW, Friedlander ML, Taylor IW, Rugg CA, Musgrove EA : Method for analysis of cellular DNA content of paraffin-embedded pathological material using flow cytometry. *J of Histochem & cytochemistry* 31 : 1333-5, 1983
 31. Heimann TM, Miller F, Martinelli G, Mester J, Kurtz RJ, Szporn A, Fasy T : Significance of DNA content abnormalities in small rectal cancers. *Am J Surg* 159 : 199-203, 1990
 32. Horsfall DJ, Tilley WD, Orell SR et al : Relationship between ploidy and steroid hormone receptors in primary invasive breast cancer. *Br J Cancer* 53 : 23-8, 1986
 33. Inokuchi K, Kodama Y, Sasaki O, Kamagawa T, Okamura T : Differentiation of growth patterns of early gastric carcinoma determined by cytophotometric DNA analysis. *Cancer* 51 : 1138-41, 1983
 34. Jones DJ, Moore M, Schofield PF : Prognostic significance of DNA ploidy in colorectal cancer : a prospective flow cytometric study. *Br J Surg* 75 : 28-33, 1988
 35. Kallioniemi OP, Blance G, Alavaikko M, Hietanen T, Mattila J, Lauslahti K, Koivula T : Tumour DNA ploidy as an independent prognostic factor in breast cancer. *Br J Cancer* 56 : 637-42, 1987

36. Keyhani-Rofagha S, O'Toole RV, Farar WB, Sickie-Santanello B, DeCenzo J, Young D : Is DNA ploidy an Independent Prognostic indicator in infiltrative Node-Negative Breast Adenocarcinoma. *Cancer* 65 : 1577-82, 1990
37. Kim TJ, Chung HT, Cho CK, Cho YK : An analysis of the DNA ploidy patterns of gastric cancer. *JKSS* 37 : 703-10, 1989
38. Kimura O, Kaibara N, Makino M, Nishidoi H : DNA ploidy in gastric cancer with metastasis to the liver. *J Surg Oncol* 44 : 69-72, 1990
39. Kimura H, Yonemura Y : Flow cytometric analysis of nuclear DNA content in advanced gastric cancer and its relationship with prognosis. *Cancer* 67 : 2588-93, 1991
40. Kodama Y, Inokuchi K, Soejima K, Matsusaka T, Okamura T : Growth pattern and prognosis in early gastric carcinoma : Superficially spreading and penetrating growth types. *Cancer* 51 : 320-6, 1983
41. Kokal WA, Gardin RL, Sheibani K, Morris PL, Prager E, Zak IW, Terz JJ : Tumor DNA content in resectable, primary colorectal carcinoma. *Ann Surg* 209 : 188-93, 1989
42. Korenaga D, Haraguchi M, Okamura T, Sugimachi K : DNA ploidy and tumor invasion in human gastric cancer : histopathologic differentiation. *Arch Surg* 124 : 314-8, 1989
43. Korenaga D, Haraguchi M, Okamura T, Sugimachi K, Kaibara N, Koka S, Inoguchi K : Consistency of DNA ploidy between primary and recurrent gastric carcinomas. *Cancer Research* 46 : 1544-46, 1986
44. Korenaga D, Haraguchi M, Okamura T, Sugimachi K, Rnjoji M : DNA ploidy in clinical malignant gastric lesions less than 5mm in diameter. *Cancer* 58 (11) : 2542-5, 1986
45. Korenaga D, Okamura T, Saito A, Baba H, Sugimachi K : DNA ploidy is closely linked to tumor invasion, lymph node metastasis and prognosis in clinical gastric cancer. *Cancer* 62 : 309, 1988
46. Lauren P : The two histological main types of gastric carcinoma. Diffuse and so-called intestinal type carcinoma. *Acta Pathol Microbiol Scand* 1965, 63 : 31-39.
47. Leuchtenberger C, Leuchtenberger R, Davis AMA : A microspectrophotometric study of the deoxyribose nucleic acid(DNA) content in cells of normal and malignant human tissue. *Am J Pathol* 30 : 65-85, 1954
48. Korenaga D, Lofberg R, Tribukait B, Ost A et al : Flow cytometric analysis in longstanding ulcerative colitis : A method of prediction of dysplasia and carcinoma development. *Gut* 28 : 1100-6, 1987
49. Matsusaka T, Kodama Y, Sojima K et al. Recurrence in early gastric cancer : a pathologic evaluation. *Cancer* 46 : 168-72, 1980
50. McDivitt RW, Stone KR, Meyer JS : A method for dissociation of viable human breast cancer cells that produces flow cytometric kinetic information similar to that obtained by thymidine labelling. *Cancer Res* 44 : 2628-33, 1984
51. Merkel DE, Dressler LG, McGuire WL

- : Flow cytometry, cellular DNA content, and prognosis in human malignancy. *J. Clin. Oncol* 5 : 1690-703, 1987
52. Merkel De, McGuire WL : Ploidy, proliferative activity and prognosis. DNA flow cytometry of solid tumors. *Cancer* 65(5) : 1194-205, 1990
53. Miles C : Chromosome analysis of solid tumors I. Twenty-eight non-epithelial tumors. *Cancer* 20 : 1253-73, 1967
54. Ngoi SS, Staiano-Coico L, Godwin TA, Wong RJ, DeCosse JJ : Abnormal DNA ploidy and proliferative patterns in superficial colonic epithelium adjacent to colorectal cancer. *Cancer* 66 (5) : 953-9, 1990
55. Oda N, Tsujino T, Tsuda T, Yoshida K, Nakayama H, Yasui W, Tahara E : DNA ploidy pattern and amplification of ERBB and ERBB2 genes in human gastric carcinoma. *Virch Archiv B Cell Pathol* 58 : 273-77, 1990
56. O'Hara MF, Bedrossian CWM, Johnson TS, Barlogie B : Flow cytometry in cancer diagnosis. *Prog Clin Pathol* 9 : 135-53, 1984
57. Ohyama S, Yonemura Y, Miyazaki I : Prognostic value of S-phase fraction and DNA ploidy studied with in vivo administration of Bromodeoxyuridine on Human Gastric Cancers. *Cancer* 65 : 116-21, 1990
58. Okamura T, Korenaga D, Haraguchi M, Tsujitani S, Sugimachi K, Mori M, Enjoji M : Growth mode and DNA ploidy in mucosal carcinomas of the stomach. *Cancer* 59 : 1154-60, 1987
59. Olszewski W, Darzynkiewicz Z, Rosen PP et al : Flow cytometry of breast carcinoma-I, Relationship of DNA ploidy level to histology and estrogen receptor. *Cancer* 48 : 980-9, 1987
60. Omagari K, Imanishi T, Moriokawa S, Nishihata S, Kamiya T, Hayashika K, Tanioka H, Murata I, Makiyama S, Ashihara K et al : Prognostic implication of the ploidy pattern of the nuclear DNA in hepatocellular carcinomas. *Gan-No-Rinsho* 36(2) : 121-6, 1990
61. Owaimati AA, Robins RA, Hinton C et al : Tumor aneuploidy, prognostic parameters and survival in primary breast cancer. *Br J Cancer* 55 : 449-54, 1987
62. Park CH, Lee SH, Stephens RL, Smith TK, Park MH : Flow cytometry DNA analysis on tumor cell subpopulation of human tumor specimens by exclusion of lymphohemopoietic cells. *J Histochem Cytochemistry* 36 : 705-9, 1988
63. Petrova AS, Subrichina GN, Tschistjakova OV, Weiss H, Wildner G : Flow cytofluorometry, cytomorphology and histology in gastric carcinoma. *Oncology* 37 : 318-24, 1980
64. Quirke P, Dyson JED, Dixon MF, Bird CC, Joslin CAF : Heterogeneity of colorectal adenocarcinoma evaluated by flow cytometry and histopathology. *Br J Cancer* 51 : 99, 1985
65. Rognum TP, Heier HE, Orjasaeter H et al : Plasma CEA in large bowel carcinoma : Which patients should be followed by regular postoperative measurements? Preliminary follow-up in 100 patients with different tumor DNA-ploidy patterns. *Cancer Detect Prev* 10 : 347-52, 1987

66. Rognum TP, Thorud E, Lund E : Survival of large bowel carcinoma patients with different DNA ploidy. *Br J Cancer* 56, 633-6, 1987
67. Sasaki K, Hashimoto T, Kawachino K, Takahashi M : Intratumoral regional differences in DNA ploidy of gastrointestinal carcinomas. *Cancer* 62 : 25 69-75, 1988
68. Sasaki K, Takahashi M, Hashimoto T, Kawachino K : Flow Cytometric DNA Measurement of Gastric Cancers : Clinico-Pathological Implication of DNA ploidy. *Path res pract* 184 : 561-66, 1989
69. Scott NA, Wieand HS, Moertel CG, Cha SS, Beart RW, Lieber MM : Colorectal cancer-Dukes' stage, tumor site, preoperative plasma CEA level, and patient prognosis related to tumor DNA ploidy pattern. *Arch Surg* 122 : 1375-9, 1987
70. Seo KH, Lee CH, Lee SD, Seo JK, Park YH : A clinico-pathologic comparative study of gastric cancer in the young and the aged. *JKSS* 41 : 168-80, 1991
71. Sonta S, Sandberg AA : Chromosome and causation of human cancer and leukemia. XXX. banding studies of primary intestinal tumors. *Cancer* 41 : 153-63, 1978
72. Sowa M, Chung YS, Nishimura M, Yoshino H, Maekawa H, Kato Y, Umeyama K, Kawahara M : An immunohistological study of gastric cancer-with special reference to the expression of carbohydrate antigens and nuclear DNA ploidy patterns. *Euro J of Surg Oncol* 15 : 307-15, 1989
73. Sowa M, Yoshino H, Kato Y, Nishimura M, Kamino K, Umeyama K : An analysis of the DNA ploidy patterns of gastric cancer. *Cancer* 62 : 1325-30, 1988
74. Suzuki H, Matsumoto K, Masuda T, Koike H : DNA ploidy of Colorectal carcinoma ; Correlation with Conventional Prognostic Variables. *J Clin Gastroenterol* 10(2) : 176-8, 1988
75. Taylor IW, Musgrove EA, Friedlander ML et al : The influence of age on the ploidy levels of breast cancer. *Eur J Cancer Clin Oncol* 19 : 623-8, 1983
76. Tirindelli-Danese D, Teodori L, Mauro FM, Modini C, Botti C, Cicconetti F, Stipa S : Prognostic significance of flow cytometry in lung cancer. *Cancer* 60 : 844-51, 1987
77. Tosi P, Leocini L, Cintonaro m, Vindigni C, Minacci C, Nuti S, Pinto E, De Stefano A, Cevenini G : Flow cytometric analysis of DNA ploidy pattern from deparaffinized formalin-fixed gastric cancer tissue. *Int j Cancer* 42 : 868-71, 1988
78. Traganos F : Flow cytometry : Principles and applications. Part I. *Cancer Invest* 2 : 149-63, 1984
79. Tsushima K, Rainwater LM, Goellner JR, van Heerden JA, Lieber MM : Leiomyosarcomas and benign smooth muscle tumors of the stomach : Nuclear DNA patterns studied by flow cytometry. *Mayo Clin Proc* 62 : 275-80, 1987
80. Weiss H, Gütz HJ, Schröter J, Wildner GP : DNA Distribution Pattern in Chronic Gastritis. *Scand J Gastroenterol* 24 : 643-8, 1989
81. Eilliams NN, Daly JM : Collective re-

- views : Flow cytometry and Prognostic implications in patients with solid tumors. *Surg Gynec Obstet* 171 : 252-66, 1990
82. Wilson GD, McNally NJ, Dische S, Saunders MI, Rochers C, Lewis AA, Bennett MH : Measurement of cell kinetics in human tumours in vivo using bromodeoxyuridine incorporation and flow cytometry. *Br J Cancer* 58 : 423-31, 1988
83. Wooley RC, Schreiber K, Kass LG et al : DNA distribution in human colorectal carcinoma and its relationship to clinical behaviour. *JNCI* 69 : 15-22, 1982
84. Yonemura, Ooyama S, Sugiyama K, Kamata T, De Aretxabala X, Kimura H, Kosaka T, Yamaguchi A, Miwa K, Miyazaki I : Retrospective analysis of the prognostic significance of DNA ploidy patterns and S-phase fraction in gastric carcinoma. *Cancer Res* 50 (3) : 509-14, 1990
85. Yonemura Y, Sugiyama K, Fujimura T, Aretxabala X, Kamata T, Kosaka T, Yamaguchi A, Miwa K, Miyazaki I : Correlation of DNA ploidy and Proliferative activity in human gastric cancer. *Cancer* 62 : 1497-502, 1988
86. Yonemura Y, Sugiyama K, Fujimura T, Kamata T, Kosaka T, Fushida S, Yamaguchi A, Miwa K, Miyazaki I : Correlation of DNA ploidy and Clinical Outcome in Borrmann Type 4 Gastric Carcinoma. *J Surg Oncol* 42 : 1-4, 1989
87. Yonemura Y, Sugiyama K, Kamata T, Kosaka T, Yamaguchi A, Miwa K, Aretxabala X, Miyazaki I : Correlation of DNA ploidy and clinical outcome in early gastric carcinomas. *Oncology* 47 : 49-54, 1990
88. Yumori Y, Ochi J, Miura K, Ochi Y, Morioka A, Uchino H : Flow cytometric analysis of nuclear DNA contents in human hepatocellular carcinoma. *Nippon-Shokakibyo-Gakkai-Zasshi* 87 (1) : 83-9, 1990
-