

2012년 2월

2012년 2월
석사학위논문

석사학위논문

상피이형성 발생 마우스
모델에서의 Velscope를 이용한
진단의 유용성 평가

상피이형성 발생 마우스 모델에서의 Velscope를 이용한 진단의 유용성 평가

조선대학교 대학원

치 의 학 과

김 문 섭

김문섭

상피이형성 발생 마우스 모델에서의 Velscope를 이용한 진단의 유용성 평가

Evaluation of diagnosis using Velscope in mouse model
for oral dysplasia

2012년 2월

조선대학교 대학원

치 의 학 과

김 문 섭

상피이형성 발생 마우스 모델에서의 Velscope를 이용한 진단의 유용성 평가

지도교수 문 성 용

이 논문을 치의학 석사학위신청 논문으로 제출함.

2011년 10월

조선대학교 대학원

치 의 학 과

김 문 섭

김문섭의 석사학위 논문을 인준함

위원장 조선대학교 교수 김 수 관 인

위 원 조선대학교 교수 임 성 철 인

위 원 조선대학교 교수 문 성 용 인

2011년 12월

조선대학교 대학원

목 차

ABSTRACT	
I. 서 론	1
II. 실험 재료 및 방법	2
1. 실험재료	2
2. 실험방법	2
3. 조직학적 분석을 위한 표본 제작	2
III. 연구 결과	3
IV. 고 찰	4
V. 결 론	6
VI. 참고문헌	7
VII. 사진 부도 설명	9
VIII. 사진부도	10
IX. 표	13

도 목 차

Fig. 1. Chemical structure of 4-nitroquinoline 1-oxide(4NQO) ·	10
Fig. 2. Normal tongue	10
Fig. 3. Moderate dysplasia	10
Fig. 4. Severe dysplasia	11
Fig. 5. Velscope revealed that non-dysplasia tongue showed no obvious changes	11
Fig. 6. Velscope revealed that dysplasia tongue showed obvious changes	12

ABSTRACT

Evaluation of diagnosis using Velscope in mouse model for oral dysplasia

Kim, Moon-Seob

Advisor : Prof. Moon, Seong-Yong Ph.D.

Department of Oral and Maxillofacial Surgery

1.Introduction

There are various methods to diagnose oral cancer traditionally including medical records, monitoring smoking or drinking habits, intra and extraoral observation clinically. However dysplasia, microinvasive carcinoma can be seen as normal oral condition, so there are many difficulties for diagnosing as precancerous lesion. The words like leukoplakia or erythroplakia are used only clinically. These words do not explain the grade of dysplasia without biopsy. Only 25% of leukoplakia is diagnosed as dysplasia having precancerous lesion practically.

2.Purpose

If intraoral precancerous lesion can be diagnosed early through noninvasive and fast diagnosis using an auto fluorescent material, survival rate of many patients will be raised and medical cost will be down. Thus, the purpose of this study is to evaluate the usefulness of Velscope, diagnosing instrument of oral cancer using an auto fluorescent material.

3. Method and Material

In this study, 24 six-weeks-old mice were divided into two groups: 6 are control group and 18 are experimental group. Conditions of the mice's tongue were evaluated after inducing dysplasia of the tongue using 4NQO solution. Photographing was taken with velscope which diagnoses oral cancer by an auto fluorescent material. Histologic analysis was conducted every 4, 8, 12 weeks for the purpose of evaluating the change tendency.

4. Result

1. Histopathological observation

Dysplasia was observed in tongue tissue treated by 4NQO solution during 8 weeks. As time goes by, dysplasia was progressed and carcinogenesis was observed. The developed level of dysplasia was moderate grade.

2. observation using the velscope.

Nothing significant to be observed when the dysplasia wasn't developed. However, when the dysplasia was developed, the lesion was detected by the velscope.

5. Conclusion

In this study, epithelial dysplasia were observed in tongue of white mice injected 4NQO solution after 8 weeks, the tongue with dysplasia can be diagnosed usefully. Therefore, when diagnosing precancerous lesion, lesion misdiagnosed by ocular inspection can be diagnosed precisely with the velscope along with traditional methods.

I. 서 론

구강암은 인체에 발생하는 악성종양의 4~6%에 달하며, 해부생리학적 특성상 인접부위로의 전이가 잘 일어난다. 특히, 기능적, 심미적인 특징 때문에 치료와 재활에 있어서 문제점이 매우 크며, 악성도가 높아 예후가 불량하다. 전 세계적으로 매년 약 50만 증례가 구강암으로 진단된다¹⁾. 이 중 84%의 환자만이 진단 후 1년간 살아남게 되며, 그 중에서 40%만이 5년간 살아남게 된다²⁾.

구강암 진단의 전통적인 방법에는 의무기록, 흡연이나 음주의 습관청취, 구외 및 구내의 임상적 관찰 등이 포함된다. 그러나 이형성이나 미세침윤 암종은 임상적으로 정상적인 구내소견으로 보일 수 있기 때문에, 전암병소로 진단하는데 있어 매우 어려움이 있다^{3,4)}. 백반증이나 홍반증이라는 용어는 오직 임상적으로 기술하는 용어이다. 이 용어들은 조직의 생검 없이는 이형성의 등급에 대한 정보를 알려주지는 않는다. 오직 25%의 백반증만이 실제적으로 전암병소를 가지는 이형성으로 진단된다⁵⁾.

최근 몇 년간 구강암의 진단에 도움을 줄 수 있는 Visual Tool(시각적 진단 도구)이 발전하였다. 이것은 400-460nm 파장대의 형광을 이용하여 정상 조직과 비정상 조직을 구분하여 조기에 악성병변을 발견하고 진단하기 위한 장비이다. 세포에 자동형광물질을 조사하게 되면 형광 물질은 콜라겐을 통과하면서 변화하게 되는데, 비정상적인 세포질을 가지는 부위를 통과할 경우에, 형광의 손실이 발생하게 되고 이에 따라 푸른 빛의 영역에서는 빛의 흡수나 산란이 증가하게 되고, 녹색 빛의 영역에서는 빛의 흡수나 산란이 감소하게 되어 눈으로 보이는 형광이 감소하게 된다^{6,7)}.

구강내의 전암병소를 자동형광물질을 이용하여 비침습적이고 빠른 진단을 통해서 조기진단을 할 수 있다면 많은 환자들의 생존율을 높일수 있게 되고, 그 치료비용 또한 절감할 수 있을 것이다. 이에 자동형광물질을 이용한 구강암 진단기인 Velscope의 유용성을 평가해보고자 본 연구를 진행하였다.

II. 실험재료 및 방법

1. 실험재료

생후 6주된 체중 100g 내외의 Sprague Dawley계 수컷 쥐 24마리 중 6마리는 대조군, 18마리는 실험군으로 나누어 일정한 온도와 습도하에서 시판되는 고정사료로 사육하였다.

발암물질로 4-nitroquinoline-1-oxide(4-nitroquinoline-1-oxide, sigma aldrich, Japan)를 사용하였으며 (Fig. 1), 희석용매로는 DMSO를 사용하였다. 50ppm의 농도로 먹는물에 희석시켜 사용하였다.

희석시킨 용액은 플라스틱 병에 담아서 쥐의 사육상자에 설치하여 구강으로 섭취하게 하였다. 4NQO 용액을 섭취하여 소비하는 양상을 주 2회 점검하고, 신선한 4NQO용액으로 교체해주었다.

2. 실험방법

50ppm의 4NQO용액을 섭취하였으며, 매주 Zoletil 50(Virbac S.A., Carros, France)과 2% 럼폰 주사액(바이엘코리아(주), 한국)을 1:1로 섞은 용액을 0.2mL/Kg의 용량으로 근주하여 전신 마취를 유도한 후 쥐의 혀의 상태를 관찰하고 Velscope를 이용하여 촬영을 시행하였다. 4주와 8주, 12주에 희생을 시행하여 조직학적으로 관찰하였다.

3. 조직학적 분석을 위한 표본 제작

매 4주, 8주, 12주에 희생을 시행하여 혀의 변화 양상을 평가하기 위해 조직학적 분석을 시행하였다. 희생시킨 쥐의 혀를 기저부를 포함시켜 채득하여 즉시 10% 포르말린 용액에 넣어 고정하였다. 병리조직학적 관찰을 위해 파라핀에 포매하여 4 μ m로 박절한 후 통법에 따라 H&E 염색을 시행하였다.

Ⅲ. 연구결과

1. 병리조직학적 관찰

실험군 18마리를 4주, 8주, 12주에 6마리씩 희생하여 관찰하였다. 4주군에서는 허의 췌양이 관찰되었으며 조직학적인 이형성은 관찰되지 않았다(Fig. 2.). 8주군에서는 쥐의 허에서 췌양이 모두 관찰되지 않았으며 한 마리의 쥐에서 moderate grade의 이형성이 관찰되었다(Fig. 3.). 12주군에서는 역시 쥐의 허에서 췌양이 보이지 않았으며 조직학적으로 6마리 중 4마리에서 이형성이 관찰되었다. 이 중 한 마리는 국소적으로 severe grade의 이형성이 관찰되었으며(Fig. 4.), 두 마리에서는 국소적으로 moderate grade의 이형성이 관찰되었고, 나머지 한 마리에서는 매우 국소적으로 이형성이 관찰되었다.

2. Velscope를 이용한 관찰

Fig. 5. 에서와 같이 이형성이 발생하지 않았을 경우에는 Velscope로 관찰시 특별한 이상이 관찰되지 않았으나, 이형성이 발생하였을 경우에는 Fig. 6. 에서와 같이 이상병변을 관찰할 수 있었다.

Table1.을 통해 실험 주수별 조직학적 소견 및 Velscope 소견을 정리하였다.

IV. 고찰

구강암의 90% 이상은 편평세포암종이며 환자의 치료와 예후는 암종의 진행단계에 따라 크게 좌우된다. 구강암의 발생 과정을 살펴보면 암종 형성 과정에서 전암병소인 백반증을 관찰 할 수 있으며 수술을 통하여 완전하게 절제를 시행하였다 하더라도, 주변 정상 점막이나 다른 상기 식도부위에서 이차 원발성 암종의 형성이 높은 빈도로 관찰된다⁸⁾. 이는 광범위하고 지속적으로 화학적, 생물학적, 물리적 발암 인자의 노출에 의한 다단계 발암과정을 거치는 “영역 암화” 개념으로 설명되고 있다^{9,10)}.

전세계적으로 매년 약 50만 증례가 구강암으로 진단되고 있고, 이 중 84%만이 진단 후 1년간 살아남으며, 그 중에서 40%만이 5년간 생존하게 된다²⁾. 이에 전암병소에 대한 조기진단이 매우 중요하다 하겠다.

구강암의 발생기전 및 진행과정에 대한 연구는 암의 본태구명, 예방과 조기진단 그리고 치료면에 있어서 매우 의의가 크나 구강의 실험종양유도가 타액의 회석 및 청정작용, 피부와는 달리 점막하 조직내로의 발암제의 침투 곤란, 발음과 저작 등의 기능상 국소 도포의 어려움 등으로 용이하지 않았다. 이러한 저해요소들에도 불구하고 실험종양유도에 대하여 많은 연구들이 진행되었다. Keys와 Dale의 햄스터 협낭의 해부생리적 특성이 발표된 후, 1954년 Sally가 지용성 발암제인 9,10-dimethyl-1,2-benzanthracene(DMBA)로 최초의 햄스터 협낭암을 유발시켰다¹¹⁾. Fujino 등은 수용성 발암제인 4-nitroquinoline 1-oxide(4NQO)의 발암가능성을 제시하였다¹²⁾. Wallenius와 Lekholm은 최초로 4NQO를 이용하여 흰쥐에 구개암을 유발시켰다¹³⁾. Everson은 구강의 실험종양 유발에, 햄스터 협낭점막의 DMBA 유도상피암과 흰쥐 구개점막의 4NQO 유도상피암의 모형을 권장하였다¹⁴⁾. 구강암은 정상조직에서 과각화, 상피증식, 상피 이행성이 점진적으로 증가하여 악성종양으로 진행되는 다단계 발암과정을 거치는데, 구강점막에 발생시키는 이와 같은 구강암 발생 모델은 육안으로 쉽게 확인할 수 있기 때문에 다단계 발암과정을 연구할 수 있다.

본 연구에서 사용된 4NQO는 대사과정에 있어 강력하게 작용하는 발암물질로써, DNA의 염기 안정 부위에 손상을 가하게 된다. 또한, 4NQO는 세포 안에 활성 산소를 만들어 냄으로써 손상을 가하게 된다. 이러한 결과로 DNA 한가닥 사슬을 만들게 됨으로써 세포에 손상을 주게 된다¹⁵⁾.

본 연구에서 이형성이 발생한 부위는 혀부위에 국한되었다. 흥미롭게도 상부 소화 기관을 비롯한 다른 주요 장기에는 특별한 이상이 발견되지 않았는데, 왜 혀부위에만 국한되어 나타나는지는 아직 밝혀지지 않았다. 아마도 50ppm의 아주 작은 농도의 4NQO만이 작용하기 때문에 그러한 결과가 나온 것 같다. 반면에 비교적 높은 농도인 0.25%의 4NQO를 쥐의 혀에 직접 바른다면 0.5%의 DMBA를 햄스터의 혀에 직접 바른 실험의 결과를 보면 식도나 위의 상부에 암종이 발생한다고 보고하였다¹⁶⁾.

또한 사람에게 발생하는 구강암은 혀의 측면이나 복측면에 많이 발생한다. 그러나 본 연구에서는 이형성의 부위가 배면부위로 국한되었다. 이것은 쥐가 4NQO가 녹은 물을 마실 때, 가장 먼저 닿는 부위가 혀 배면부위의 점막이기 때문에 직접적으로 작용해서 그럴 것 이다.

외상을 통한 자극과 암종의 발생의 관계는 논란거리이다. Fujita¹⁷⁾ 등은 0.5%의 DMBA 용액을 햄스터의 혀에 적용했는데 이때 혀의 측면을 barbed broach로 긁어서 외상을 준 후 적용했다. 이렇게 했을 경우 100%의 햄스터에서 암종이 발생했다고 보고 하였다. 이것은 지속적인 기계적인 자극이 암종의 발생률을 높였다고 볼 수 있다고 하였다.

그러나 Marefat P¹⁸⁾ 등은 외상이 암종의 발생을 가속화 시킬 수는 있지만 DMBA 용액 만으로도 암종의 발생이 시기적으로 늦을 뿐이지 발생한다고 하였다. 따라서 외상이 혀의 암종을 만들어내는 모델에 있어 좋은 요소는 아니라고 하였다.

본 연구에서는 쥐의 혀에 4NQO 용액을 이용하여 이형성을 유발시킨 후 자동 형광물질을 이용하여 구강암을 진단하는 Velscope를 사용하여 이형성에 대하여 진단하였다. Velscope를 이용하면 진료실에서 인지하지 못하고 넘어갈 수 있는 어떠한 병소에 있어서 진단을 성공할 수 있고, 이렇게 구강암으로 될 수 있는 병소를 조기에 진단하게 되면 환자의 생존율을 크게 높일

수 있으며, 치료 비용 절감의 효과도 얻을 수 있다.

Poh 등¹⁹⁾은 Velscope를 이용하여 환자들을 대상으로 암종을 진단하고 그 암종의 경계부또한 관찰하였다. 예전에 암종을 제거했던 환자를 Velscope를 이용하여 재평가하고 경계부를 다시 설정하여 제거하였다. Velscope상 이상병변이 있는 부위를 제거하고 조직병리학적 검사를 시행하였다. 한 개의 케이스만 제외하고 Velscope상 정상으로 보이는 부위는 모두 정상 조직이었다고 보고하였다. 보통 암종을 절제할 때 10mm의 안전한 경계를 더 주고 절제하게 되는데, Velscope는 이러한 절제시 가시광선 상에서 정상으로 보이는 병변부 중 이상병변이 있는 조직을 감별하는데 유용하다고 할 수 있다.

Lane 등²⁰⁾은 조직검사상 이미 이형성이나 암종이 진단된 환자 44명을 대상으로 연구를 진행하였다. 50개의 조직을 검사했을 때 98%의 감수성과 100%의 특이성을 보였다고 보고하였다.

V. 결 론

본 연구에서는 4NQO 용액을 음수한 흰쥐의 혀에서 8주이상인 된 쥐의 일부에서 부터 조직학적으로 상피이형성을 관찰할 수 있었으며, 이형성이 발생한 혀에 대해서 Velscope를 이용해서 진단을 시행하였다. Velscope를 이용하여 이형성이 일어난 쥐의 혀를 관찰하였을 때, 육안으로 관찰되지 않는 병변을 관찰할 수 있었다. 따라서 전암병소를 진단할 때, 전통적인 방법에만 부가적으로 Velscope를 이용하여 진단을 한다면, 눈으로 보고 놓칠 수도 있는 병변을 진단하는데 유용하게 사용할 수 있을 것으로 보인다. 다만, 샘플 수가 매우 제한적이었으며 아주 작은 병소에 국한되었기 때문에 더 많은 연구가 필요할 것으로 생각된다.

참 고 문 헌

1. Parkin DM. Global cancer statistics in the year 2000. *Lancet Oncol* 2001; 2:533-543.
2. Mignogna MD, Fedele S. Oral cancer screening: 5 minutes to save a life. *Lancet* 2005; 365: 1905 - 1906.
3. Thomson PJ. Field change and oral cancer: new evidence for widespread carcinogenesis? *Int J Oral Maxillofac Surg* 2002;31:262-6.
4. Silverman S Jr. Early diagnosis of oral cancer. *Cancer* 1988;62:1796-9.
5. Napier SS, Speight PM. Natural history of potentially malignant oral lesions and conditions: an overview of the literature. *J Oral Pathol Med* 2008;37:1-10.
6. Pavlova I, Williams M, El-Naggar A, Richards-Kortum R, Gillenwater A. Understanding the biological basis of autofluorescence imaging for oral cancer detection: high-resolution fluorescence microscopy in viable tissue. *Clin Cancer Res* 2008; 14: 2396.
7. Westra WH, Sidransky D. Fluorescence visualization in oral neoplasia: shedding light on an old problem. *Clin Cancer Res* 2006; 12: 6594 - 6597.
8. Schantz SP, Spitz MR, Hsu TC: Mutagen sensitivity in patients with head and neck cancers: A biologic marker for risk of multiple primary cancer. *J Natl Cancer Inst* 1990;82:1773-1779.
9. Slaughter DL, Southwick HW, Smejkw W: Field cancerization in oral stratified squamous epithelium: clinical implication of multicentric origin. *Cancer* 1953;6:963-968.
10. Farber E: The multistep nature of cancer development. *Cancer Res* 1984;44:4217-4223.
11. SALLEY JJ. Experimental carcinogenesis in the cheek

- pouch of the Syrian hamster. J Dent Res. 1954;33:253-62.
12. Fujino H, Chino T, Imai T. Experimental production of labial and lingual carcinoma by local application of 4-nitroquinoline N-oxide. J Natl Cancer Inst. 1965 ;35:907-18.
 13. Wallenius K, Lekholm U. Oral cancer in rats induced by the water-soluble carcinogen 4-nitroquinoline N-oxide. Odontol Revy. 1973;24:39-48.
 14. Eveson, JW: Animal models of intra-oral chemical carcinogenesis: A review. J. Oral Path., 1981;10:129-146.
 15. Mirzayans R, Bashir S, Murray D, Paterson MC. Inverse correlation between p53 protein levels and DNA repair efficiency in human fibroblast strains treated with 4-nitroquinoline 1-oxide: evidence that lesions other than DNA strand breaks trigger the p53 response. Carcinogenesis. 1999;20:941-6.
 16. Fujita K, Kaku T, Sasaki M, Onoé T. Experimental production of lingual carcinomas in hamsters: tumor characteristics and site of formation. J Dent Res. 1973;52:1176-85.
 17. Fujita K, Kaku T, Sasaki M, Onoe T. Experimental production of lingual carcinomas in hamsters by local application of 9, 10-dimethyl-1, 2-benzanthracene. J Dent Res. 1973 Mar-Apr;52(2):327-32.
 18. Marefat P, Shklar G. Experimental production of lingual leukoplakia and carcinoma. Oral Surg Oral Med Oral Pathol. 1977 Oct;44(4):578-86.
 19. Poh CF, Zhang L, Anderson DW et al. Fluorescence visualization detection of field alterations in tumor margins of oral cancer patients. Clin Cancer Res 2006; 12: 6716 - 6722.
 20. Lane PM, Gilhuly T, Whitehead P et al. Simple device for the direct visualization of oral-cavity tissue fluorescence. J Biomed Opt 2006; 11: 024006.

사진부도 설명

Fig 1. Chemical structure of 4-nitroquinoline 1-oxide(4NQO).

Fig 2. Normal tongue.

Fig 3. Moderate dysplasia.

Fig 4. Severe dysplasia

Fig 5. Velscope revealed that non-dysplasia tongue showed no obvious changes.

Fig 6. Velscope revealed that dysplasia tongue showed obvious changes.

사 진 부 도

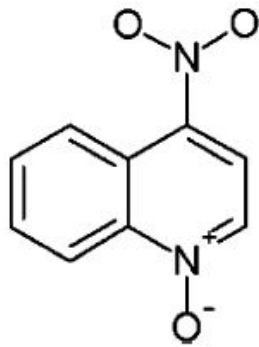


Fig. 1.

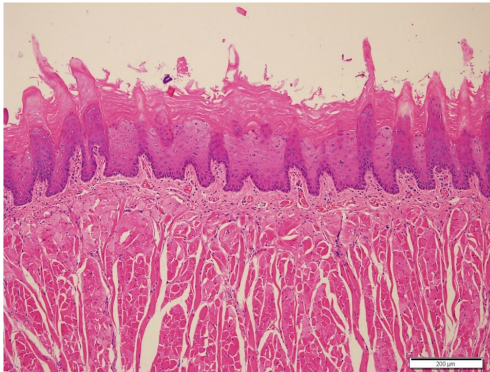


Fig. 2.

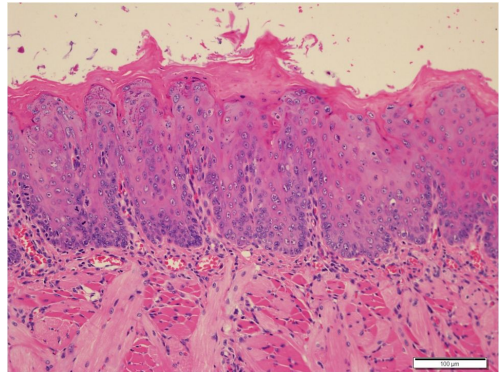


Fig. 3.

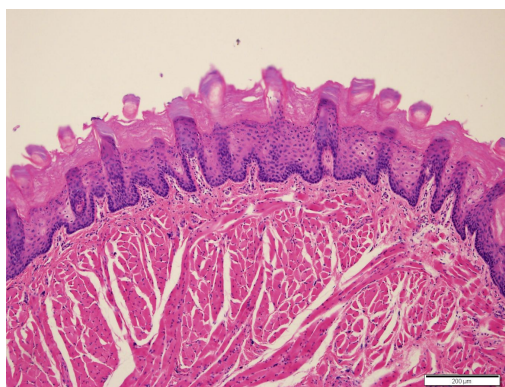


Fig. 4.

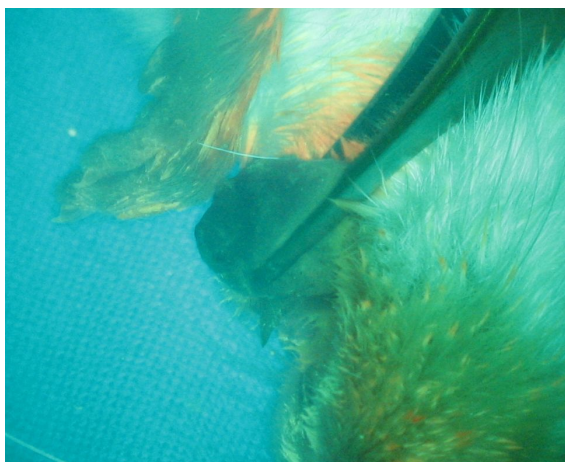


Fig. 5.

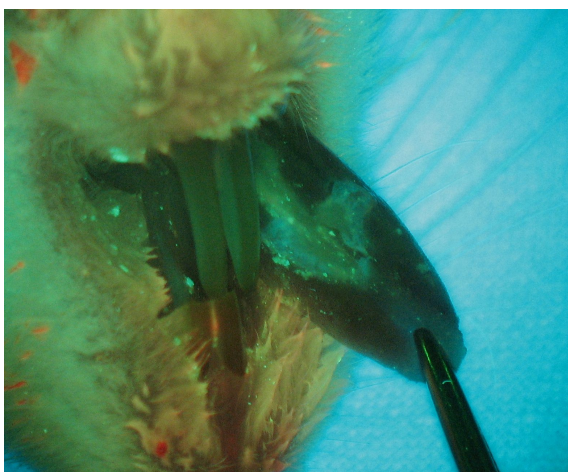
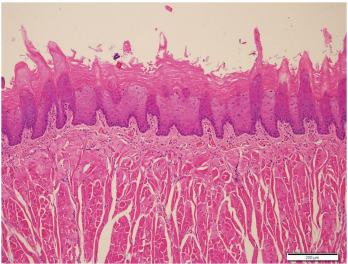
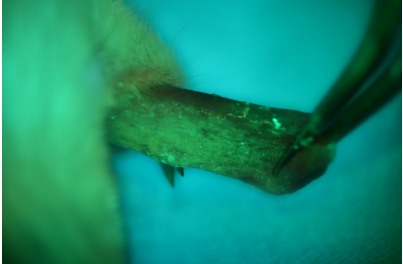
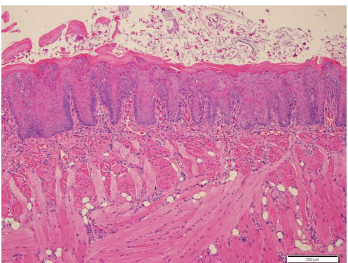
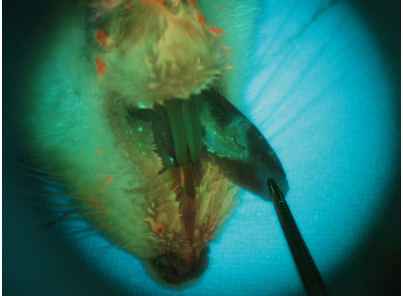


Fig. 6.

표

Table.1. 주수별 관찰 소견

주수	조직 소견	Velscope로 관찰한 소견
4주		
8주		
12주	