대한방사선의학회지 2001;44:19 - 27

# 토끼 간에서의 단일 결절형 VX - 2 암종 모델의 개발: 초음파 유도에 의한 조직 조각 이식법[1]

양성준 · 심형진 · 곽병국 · 이종범 · 이강혁 · 유승훈 · 김기현 · 곽서현 · 이수현[2]

**목적:** VX2 암종의 간 내 이식 시 단일 결절을 만들기 위하여 주사침과 젤폼 조각을 이용한 초음파 유도하 조직 조각 이식법을 소개하고자 한다.

**대상과 방법:** 총 22마리의 뉴질랜드 산 토끼를 대상으로 하였다. 계대배양중인 VX2 암종을 잘게 잘라 주사침에 미리 넣었다. 12마리는 1군으로 하여 초음파 유도하에 18게이지 주사침으로 간을 천자한 후 밀대로 암종 조각(1 $mm^3$×3)을 밀어넣었다. 2군인 10마리의 토끼에서는 VX2 암종의 조각(3 $mm^3$×1)에 젤폼 조각을 더한 후 이식하여 천자로를 따라 복벽에 생길 수 있는 종괴의 발생을 막으려 하였다. 3주후 이중시기 나선CT를 촬영한 후 토끼를 희생시켰다. 종괴의 수, 크기와 전이 양상을 평가하였고 조직 절편을 얻어 관찰하였다.

**결과:** 1군에서는 10마리의 토끼에서 총 21개의 종괴(간: 16, 복벽: 5)가 관찰되었다. 2군에서는 총 10개의 종괴가 9마리의 토끼의 간에서만 관찰되었다. 평균 종괴의 크기는 1군에서 12±9 mm, 2군에서는 6.4±3 mm였다. CT 에서 대부분 저음영을 보였고 동맥기에 주변부 조영증강을 나타내는 경우도 있었다. CT상 발견율은 1군에서 50% 2군에서 29%였다. 종괴는 병리 조직학적으로 다양한 정도의 괴사를 보였다.

**결론:** 초음파 유도하의 젤폼 조각과 주사침을 이용한 VX2 암종 조각의 이식은 잘 국한된 단일 결절의 종괴를 만들고 지금까지 사용되어 온 종양 현탁액의 간 내 주입을 대체할 만하다고 생각된다.

VX2 암종을 이용한 실험적 연구는 간 (1 - 3), 신장 (4), 뇌 (5), 골격계 (6), 실험적 고칼슘증 (7), 폐전이 유발 (8)등 여러 분야에서 이루어지고 있다.

지금까지 실험 동물 모델을 만들기 위한 VX2 암종의 이식 방법으로 계대배양용의 토끼의 종양조직을 채취하여 종양현탁액을 만들어 주사하는 방법이 널리 사용되어 왔는데 (9) 이 경우 미만성 종양의 발현율이 크고 개복 등 시술의 번거로움이 있다(10 - 13).

미만성 종양은 방사선학적으로 발견하기 어려울 뿐만 아니라 (13, 14) 특히 암 치료효과를 판정하기 위한 실험에서는 그 변화를 관찰하기 어려워 단일 결절형의 종괴를 얻는 것이 중요하다.

저자들은 토끼의 간에 VX2 암종의 유발을 쉽고 간편하게, 종양발생율은 높게, 미만성보다는 단일 결절형이 잘 생기게 하며 타 장기로의 전이가 늦게 발생하는 방법을 개발하고자 하였다. 이에 쉽게 구할 수 있는1회용 주사침과 젤폼 등을 이용하여 종양의 조각을 초음파 유도하에 이식하는 방법을 실험하였다.

[1]중앙대학교 의과대학 방사선과학교실
[2]현대방사선과
이 논문은 2000년 8월 26일 접수하여 2000년 10월 18일에 채택되었음.

## 대상과 방법

### *실험동물*

체중 2.5 - 3 Kg의 건강한 New Zealand 토끼를 암수 구별없이 실험동물로 이용하였으며 실험 기간 중 모두 일정한 사료로 같은 환경에서 사육하였다. 실험동물은 2군으로 나누어 제1군12마리, 제2군10마리로 총22마리를 대상으로 하였다.

### *VX2암종의 배양 및 종양이식의 준비*

VX2암종은 New Zealand토끼의 다리 근육에 심어서 계대배양하여 지속시켰는데 그 방법은 대퇴부 외측에 털을 제거하고 소독한 후 종양세포 현탁액을 배양액 RMPI - 1640 (Rosewell Park Memorial Institute, Roswell Park, New York)에 섞어 근육에 주사하였다. 이식3 - 4주후 종양의 직경이 3 - 4 cm에 도달하면 종양만을 분리하여 새로운 토끼의 다리 근육에 주사하는 방법으로 계대배양하며 보존하였다.

종양이식 실험을 위한 종양조직의 준비는 계대배양 토끼의 다리 근육에서 이식4주후 종양이 충분히 자란 것을 확인한 후 무균적으로 적출하여 중심 괴사부위는 제거하고 남는 피막부위의 신선한 고형 종양 조직을 채취하여 DMEM - F10 (Gibco Laboratories, Life Technology Inc., Grand island, New York) 세포배양 용액 속에서 작게 조직절편을 만들었다.

***조직조각 이식방법***

**제1군: 18G주사침 - VX2조직 조각 이식법**

총12마리의 토끼를 대상으로 하였으며 18 G주사침 속에 1×1×1 mm (1 $mm^3$) 크기의 조직 3조각을 베벨 쪽에서 거꾸로 넣은 후 초음파 유도하에 가토의 간 좌엽 실질 내에 주사침이 위치한 것을 확인하고 0.035인치 와이어(guide wire)를 밀대(pusher)로 사용하여 밀어 넣어 이식하였다.

**i) 주사침 내 종양조직 장착 방법**

DMEM - F10 세포배양 용액 속에서 크기 약 1×1×1 mm(1 $mm^3$)의 조각으로 잘라 놓은 VX2종양 조직절편을18 G주사침의 베벨 쪽에서 주사침 안으로 이 조각 3개(3 $mm^3$)를 밀어 넣었는데 이 때 다른 18 G주사침 끝을 사용하였으며 비교적 쉽게 주사침 안으로 들어갔다. 밀대를 이용하여 종양 조각이 들어 있는 주사침 끝의 베벨면에서 종양 조각이 보이지 않도록 약 1 - 2 mm 안으로 더 밀어 넣었다. 토끼 간 내에서 주사침 밖으로 VX2조직 조각을 밀어내는 용도의 밀대는 0.035인치 혈관 조영용의 가이드 와이어를 주사침의 전체 길이와 같게 구부려 놓았다. 이후 주사침의 주입구쪽에서 밀대용 와이어를 주사침 속으로 넣어 종양 조각에 의해 저항이 느껴지는 곳까지 전진 시켰으며 주사침의 베벨 끝쪽으로 종양 조각이 나오지 않은 것을 확인하였다.

**ii) 이식 방법**

가토의 마취는 염산 케타민(케타라, 유한양행, 서울) 75 - 100 mg의 근육주사만 하였으며 상복부의 털은 초음파 영상을 깨끗이 얻기 위하여 제거하였다. 이 상태로 초음파 유도하에 종양 조각이 들어 있는 18 G주사침을 손기법(free - hand technique)으로 가토의 간 좌엽을 천자하였으며 초음파상 천자로를 따라 원하는 위치에 18 G주사침 끝이 위치하면 밀대용 와이어를 끝까지 넣어 종양 조직 조각을 주사침 밖 간 실질 내로 밀어 내었다. 주사침 밖으로 밀려나 간 내에 위치한 종양 조각이 간 실질 내에서 고에코로 관찰되었다.

**iii) 이중시기 나선식 Computed Tomography (이하 CT)**

이식 3주후 12마리의 토끼 모두에서 이중시기 나선식 CT를 시행하였다. 염산 케타민 75 - 100 mg을 근육 주사한 후 귀정맥에 23게이지 나비 주사침을 삽입하고 펜토탈소디움(치오펜톤 나트륨, 중외제약, 화성) 500 mg을 40 ml 생리식염수에 희석하여 이 혼합액 15 - 30 mg을 천천히 주입하여 마취시켰다.

가토를 우측 옆으로 뉘여 고정하고 귀정맥에 유지된 나비침과 연결선 내강을 조영제 0.8 ml로 채운 후 자동 주입기에 연결하였다. 사용한 조영제는 Omnipaque (Iohexol, Nycomed, Oslo, Norway) 350 mgI/ml이었고, 각 토끼의 체중에 따라 동일량(700 mgI/Kg)을 사용하여 체중에 따라5 - 6 ml를 0.3 ml/sec의 속도로 주입하였다. 사용한 CT기기는 SCT - 7000TH(Shimadzu, Kyoto, Japan)이었고, 조건은 100 mA, 80 kVp, 폭조절 3 mm, 영상범위 110 mm 이었다. 동맥강조기를 위하여는 조영제주입 약 12초후 부터 10초간, 문맥강조기를 위하여는 조영제주입 약 30초 후부터 영상을 얻었다.

**iv) 병리학적 소견의 관찰**

이후 귀정맥을 통하여 펜토탈소디움을 과량 주입하여 토끼를 희생시킨 후 개복하여 복강과 흉곽내의 장기에서 육안적으로 종양 발생 여부를 확인하였다. 종양이 발생한 각 장기를 떼어 2 - 3 mm의 절편으로 잘라 장기 내부의 종양 발생 유무를 확인하였다. 종양 발생 조직과 정상 간 조직 일부를 10% 중성 포르말린액에 고정하였고 파라핀 포매 후5 μm로 절편하여 H&E염색을 시행하고 조직병리학적 소견을 관찰하였다.

**제2군: VX2조직 젤폼조각 이식법**

총10마리에서 시행하였다. 18G주사침 베벨쪽에서 안쪽으로 젤폼 조각 (1×1×2 mm)을 먼저 넣은 후 VX2조직1x1x3mm 한 개의 조각(3 $mm^3$)을 다시 주사침 속에 밀어 넣었다. 제1군과 같이 초음파 유도하에 천자하여 토끼 간내에서 밀대로 밀어 주사침 밖으로 종양 조직이 나온 후 젤폼이 빠져 나와 주사침 천자 경로를 따라서 이식 종양 조직이 딸려나오거나 이동되지 않게 하였다.

**i) 주사침 내 종양조직 장착 방법**

계대배양용의 토끼의 다리에서 VX2종양을 떼어서 DMEM - F10 세포배양 용액 속에서 잘게 잘라 크기 약 1×1×3 mm(3 $mm^3$)의 조각으로 만들었다. 젤폼을 잘라 원통형으로 뭉쳐(pellet) 1×1×2 mm크기의 조각으로 만들어 18 G 주사침 속에 들어갈 수 있게 만들었다.

먼저 준비된 젤폼 조각을 DMEM - F10 세포배양 용액에 약간 적신 후 18G주사침 베벨쪽에서 주사침 안으로 밀어 넣었다(Fig. 1A). 이때 다른 18G주사침 끝을 사용하여 밀어 넣었으며 약간 젖은 젤폼은 쉽게 주사침 안으로 들어갔다. 이후 0.035인치 굵기의 밀대용의 와이어로 약 5 mm안쪽으로 젤폼을 더 밀어 넣은 후 VX2조직 조각 한 개(3 $mm^3$)를 다시 주사침 끝 베벨 쪽에서 안으로 밀어 넣었다. 이때에도 다른 18G 주사침 끝을 이용하여 밀어 넣었으며 주사침 끝의 날카로운 부분을 이용하여 DMEM - F10 세포배양 용액 내에서 종양 조직의 조각을 눌러 다지면서 밀어 넣었다. 이후 종양 조직이 들어간 주사침 끝의 베벨 면에서 종양조직이 보이지 않도록 다시0.035인치 밀대용의 와이어로 약 1 - 2 mm 안으로 더 밀어 넣었다. 이후 주사침의 전체 길이와 같게 제작한 0.035인치 밀대용 와이어를 주사침 주입구쪽으로 넣어 젤폼에 밀대용 와이

어가 닿아 저항이 느껴지는 곳까지 전진시켰으며 주사침의 베벨 끝 쪽으로 종양 조각이 나오지 않은 것을 확인하였다 (Fig. 1B).

**ii) 이식 방법**

가토의 마취는 염산 케타민 75 - 100 mg의 근육주사만 하였으며 상복부의 털을 깎아 초음파 영상을 깨끗이 얻을 수 있도록 하였다. 이 상태로 종양 조각과 젤폼이 들어 있는 18 G 주사침으로 초음파 유도하 손기법으로 가토의 간 좌엽을 천자하였으며 초음파상 천자로를 따라 주사침이 매우 뚜렷이 관찰되었다 (Fig. 2A). 이후 원하는 위치에 주사침의 끝이 위치하면 밀대용 와이어를 끝까지 밀어 넣어 종양 조직 조각과 젤폼을 주사침 밖 간 실질내로 밀어 넣었으며 종양 조직 조각과 젤폼이 간 실질 내에서 고에코로 관찰되었다 (Fig. 2B).

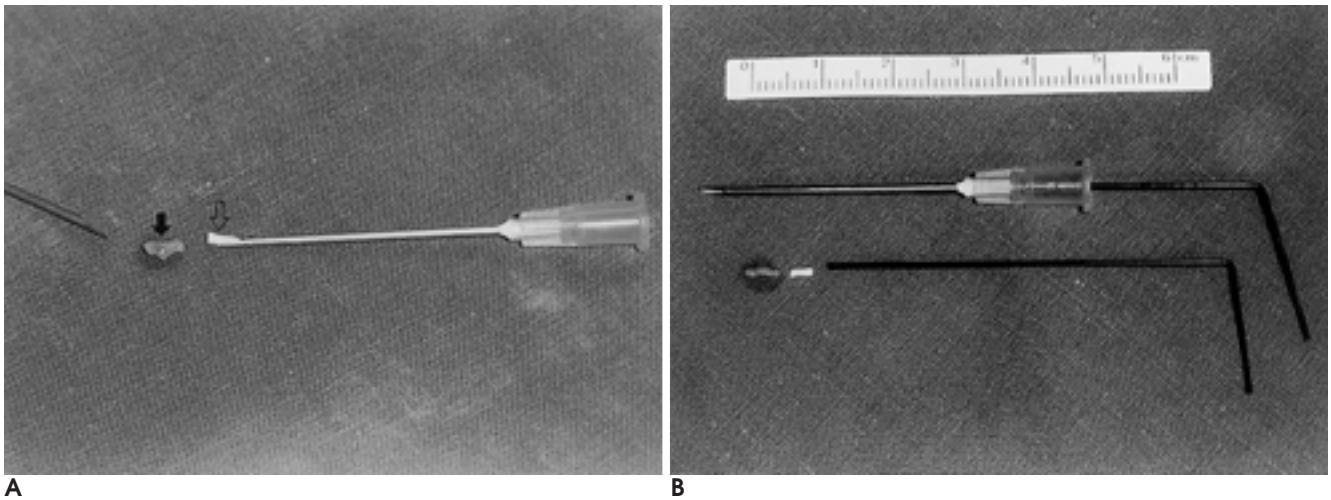
3주후 제1군과 같은 방법으로 이중시기 나선식 CT를 시행한 후 희생시켜 조직병리학적 소견을 관찰하였다.

## 결 과

***제1군: 18G주사침 - VX2조직 조각 이식법***

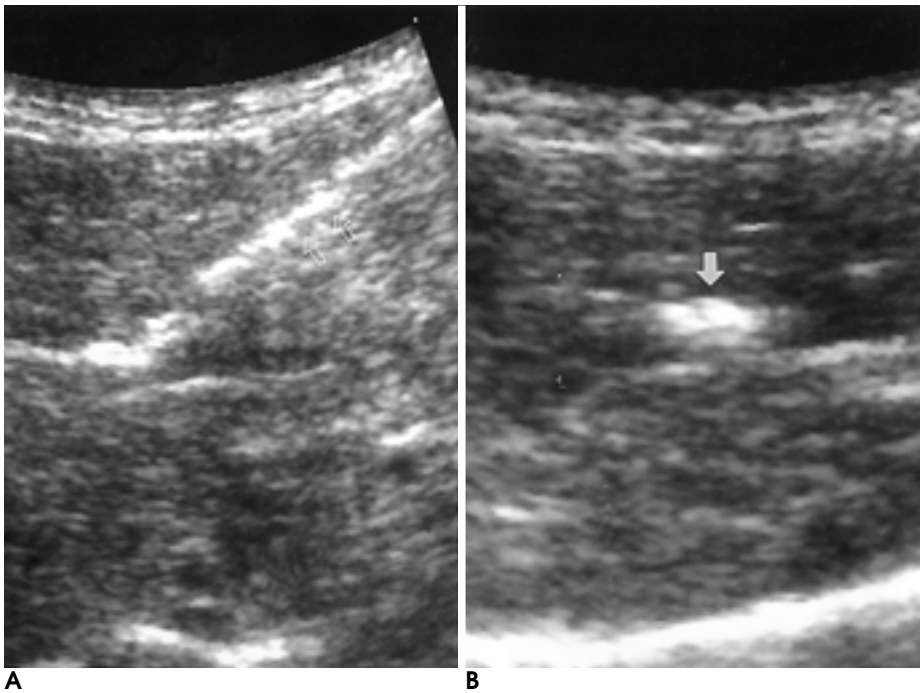
**1) 이식종양의 발생빈도**

총12마리 중 9마리(75%)에선 간 내부에, 5마리(41%)에서 18G주사침 경로인 좌측 복벽에 종양이 발생하였다. 종양은 총



A B

**Fig. 1. A.** A gelfoam pellet(open arrow) is loaded into bevel side of the 18 gauge needle prior to VX2 tissue chip (arrow) loading.
**B.** Completely loaded state of gelfoam and tissue chip in the 18 gauge needle with pusher (above). The VX2 tissue chip and gelfoam were pushed out from the needle by pusher (below).



A B

**Fig. 2. A.** Ultrasonogram shows echogenic needle (arrows) within rabbit liver.
**B.** Implanted VX2 tissue chip with gelfoam pellet is seen as hyperechoic spot (arrow).

10마리(83%)에서 발생하였으며 2마리에서는 어느 곳에서도 종양이 관찰되지 않았다. 종양의 평균 크기는 직경 12±9 mm 이었다. 결절형 종양의 숫자는 무수한 작은 결절(2마리)을 제외하고 총21개(간내 16개, 좌복벽5개)가 발생하여 평균2.1개였다. 폐 전이는 2마리 (16%)에서 관찰 되었으며 이중시기 나선식 CT에서의 발견율은 50% (5마리)이었다 (Table 1).

**2) 이식종양의 육안적 및CT 소견**

이식 3주후 각 토끼의 개복 후 육안적 및 CT상의 소견은 다음과 같다.

1번 토끼는 결절형의 주 종양 종괴는 형성하고 있지 않고 직경 약 5 mm 정도의 결절이 20개 이상 무수히 간 실질 전체에 퍼져 있었으며 이는 CT상 동맥기, 문맥기의 영상에서 모두 저음영인 작은 결절들로 관찰되었다.

2번 토끼는 간 좌엽의 밑면(liver bed)에서 10 mm와 3 mm의 돌출된 종괴가 1 cm의 거리를 두고 관찰되었고 절단면상 12×12 mm, 3×3 mm의 결절형 종괴를 관찰 할 수 있었으나 CT상으로는 관찰 되지 않았다.

3번 토끼는 간 표면의 앞(ventral)쪽으로 주사침이 천자되었던 반흔이 2×2 mm의 크기로 관찰되었으며 간 표면에서의 육안 관찰에서는 종양 결절을 관찰할 수 없었으나 절단면상 간 좌엽 실질 내에서 3×2 mm의 결절4개가 관찰 되었으며 CT상으로는 관찰되지 않았다.

4번 토끼는 육안 소견상 간 표면에서는 종괴가 관찰되지 않았고 좌 복벽에 10 mm크기의 결절이 있었고, 절단면상 간 좌엽 실질 내에 4×3 mm크기의 결절4개가 관찰 되었다. CT상으로는 종괴가 관찰되지 않았다.

5번 토끼는 간 좌엽 밑에 육안상 15×10 mm크기의 약간 돌출하는 종괴가 비쳐 보였고 두개의 종괴가 서로 융합된 모양이었다. 또한 좌측 복벽에도 15 mm크기의 단일 종괴가 발생하여 있으면서 폐에도 2 - 3 mm크기의 결절이 2개 발견되었다. 절단면상 간 실질에서의 종괴는 25×10 mm 였으며 종괴 내부는 중심성 괴사를 보였다. CT상 25×13 mm크기의 저음영 종괴를 관찰할 수 있었다.

6번 토끼(#7)는 육안상으로 어느 장기에도 종괴를 관찰할 수 없었고 절단면상으로도 종양이 발생한 흔적을 찾을 수 없었고 CT상으로도 종괴를 발견할 수 없었다.

7번 토끼(#8)는 간에서는 종양이 관찰되지 않았지만 좌측 복벽에 크기 8×5 mm의 종괴가 관찰되었으며 이 종괴는 두개의 결절이 서로 융합되어 있는 소견이었다.

8번 토끼(#9)에서 종양은 간 좌엽에서 담낭 쪽으로 돌출되어 있는 30×20 mm의 단일 종괴로 자라 있었다. 절단면상 그 크기는 30×20 mm 이었으며 간의 다른 부위에서는 종괴가 관찰 되지 않았으나 좌 복벽에 15×10 mm의 종괴가 동반되었다 (Fig. 3). 폐에서도 직경 2 - 3 mm 크기의 전이 종괴3개가 관찰되었다. CT상 28×19 mm크기의 동맥기, 문맥기에서 저음영인 종괴가 관찰되었고 동맥기에서는 테두리 조영증강(rim enhancement)을 보였다 (Fig. 4).

9번 토끼(#10)는 간좌엽 표면에서 4×3 mm크기의 결절이 3개 관찰되고 서로 2 - 3 cm 가량 떨어져 있었고 좌측 복벽에

**Fig. 3.** Single nodular VX2 carcinoma (30× 20 mm) develops in the left lobe. Another nodule (15×10 mm) is seen in the left peritoneal wall (arrow).

**Table 1.** Results of 18 Gauge Needle-VX2 Tissue Chip Implantation Method in the Rabbit Liver. (Group 1)

| N = 12 | Cut Section | Spiral CT | Peritoneal Wall | Lung Metastases |
|---|---|---|---|---|
| 1) #1 | 5×5 (over 20) | Multiple small nodules (hypo-hypo)* | ( - ) | ( - ) |
| 2) #2 | 12×12(1), 3×3(1) | ( - ) | ( - ) | ( - ) |
| 3) #3 | 3×2(4) | ( - ) | ( - ) | ( - ) |
| 4) #4 | 4×3(4) | ( - ) | 10×10(1) | ( - ) |
| 5) #5 | 25×20(1) | 25×13, (hypo-hypo)* | 15×15(1) | 2 - 3(2) |
| 6) #7 | ( - ) | ( - ) | ( - ) | ( - ) |
| 7) #8 | ( - ) | ( - ) | 8×5(1) | ( - ) |
| 8) #9 | 30×20(1) | 28×19, (hypo-hypo)* | 15×10(1) | 2 - 3(3) |
| 9) #10 | 15×15(1), multiple 3 - 4mm | 15×11 (hyper-hypo)*, multiple (hypo-hypo)* | 15×10(1) | ( - ) |
| 10) #11 | ( - ) | ( - ) | ( - ) | ( - ) |
| 11) #12 | 15×10(1), 5×5(1) | 13×11 (hypo-hypo)*, ( - ) | ( - ) | ( - ) |
| 12) #13 | 3×2(1) | (v) | ( - ) | ( - ) |

dimension(mm)
parenthesis: number of tumor nodules
* : arterial-portal enhancement pattern at spiral CT

15×10 mm크기의 단일 결절이 복벽에서 복강내측으로 돌출하는 종괴로 자라 있었다. 절단면에서 간 좌엽 실질에 15×15 mm의 결절이 있었으며 그 외에도 2 - 4 mm의 무수히 많은 결절이 있었다. CT상 15×11 mm의 종괴는 동맥기에서 고음영, 문맥기에서 저음영이었고 작은 무수한 결절들은 동맥기와 문맥기에서 모두 저음영을 보였다.

10번 토끼(#11)에서는 종양을 관찰할 수 없었고, 11번 토끼(#12)는 간 좌엽의 표면에서 10×8 mm와 5×5 mm의 두 개의 종괴를 관찰할 수 있었는데 절단면 소견으로는 그 크기가 15×10 mm, 5×5 mm로 측정되었고 큰 종괴는 가운데가 격벽에 의해 나뉘어 있어 두개의 종괴가 자라면서 서로 융합된 것임을 알 수 있었다.

12번 토끼(#13)는 간 표면 및 기타 장기에서 육안상 종괴를 관찰 할 수 없었으나 절단면상 3×2 mm의 단일 종괴를 간 좌엽 실질 내에서 관찰할 수 있었고 CT상으로는 관찰되지 않았다.

**3) 이식종양의 조직병리학적 소견**

간 내에 종양이 발생한 9마리 중 2마리(#2, #13)에서는 종양조직 부위의 병리조직 확인 과정에 문제가 발생하여 조직소견을 얻지 못하였고 나머지 7마리에서는 종양 이식 부위에 종양 결절을 관찰할 수 있었다.

종양은 세포질의 각질화나 각질 진주를 형성하지 않는 저분화형의 암종으로서 그 내부에는 종양세포의 핵이 응축(pyknosis)되지 않고 세포질이 호산성 변화를 보이는 초기단계의 허혈성 괴사 소견에서부터 완전괴사까지 다양하게 나타났다. 종양 조직의 괴사가 10% 미만인 경우가6마리(#1, 4, 5, 8, 9, 12)였고 1마리(#3)에서는 섬유화로만 구성된 결절을 관찰하였다. 종양 주변부에는 호산구, 단핵구의 출현과 함께 주변부 섬유화 소견이 일부에서 관찰되었다. 정상 간 조직에서는 문맥역(portal zone)에 단핵구의 침윤, 문정맥 분지와 정맥동의 확장 소견이 보였으며 간 실질에 염증 소견이 있는 경우가 3마리 (#1, 4, 7) 있었다.

***제2군: VX2조직 젤폼 조각 이식법***

**1) 이식종양의 발생빈도**

총10마리 중 이식3일 후 사망한1마리는 대상에서 제외하였고 나머지 9마리 모두(100%)에서 결절형의 종괴가 관찰되었다. 단일 결절이 8마리 (89%)였고 두개의 독립된 결절이 발생한 경우가 1마리(11%)에서 있어 평균 결절 수는 1.1개 였다. 젤폼의 흔적은 육안상 관찰되지 않았다. 제1군에서와 같이 좌측 복벽에 종양이 발생한 경우는 전혀 없었으며(0%) 폐, 횡격막, 복강내의 전이 소견도 관찰할 수 없었다 (Table 2).

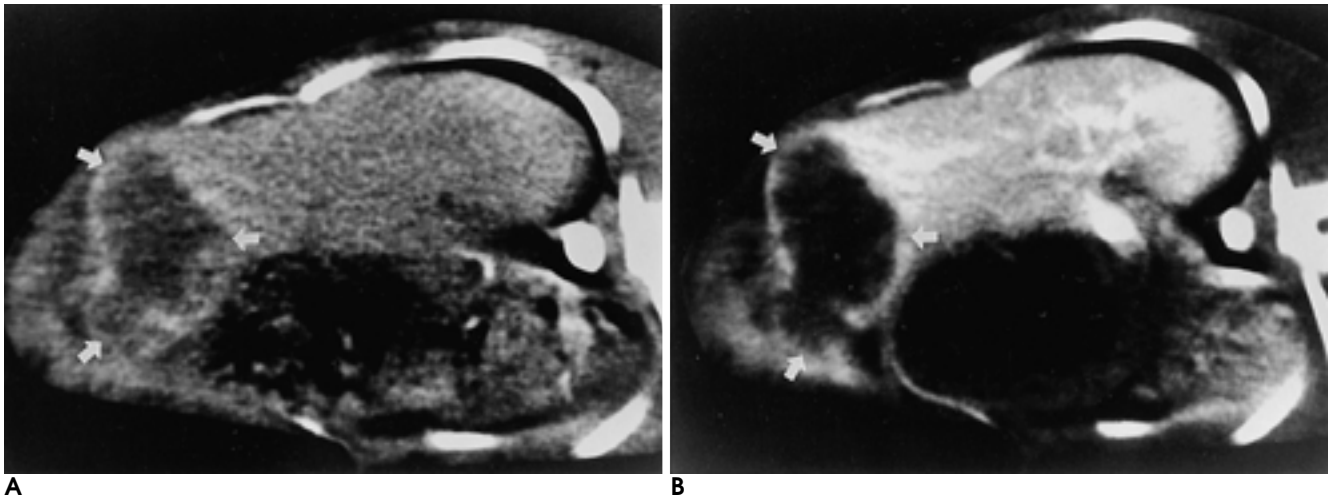
종양은 전체 9마리 모두(100%)에서 결절형태로 간 조직 내에서 발생하였으며 전이는 한 마리에서도 발생하지 않았고 (0%) 종양의 평균 크기는 직경 6.4±3 mm이었으며 종양의 개수는 10개로 평균1.1개였다.

CT는 전체 9마리 실험대상 중3주 이전에 사망한 2마리를

**Table 2.** Results of 18 Gauge Needle-VX2 Tissue Chip-gelfoam Implantation Method in the Rabbit Liver. (Group 2)

| N=9 | Cut Section | Spiral CT | Metastasis |
|---|---|---|---|
| 1) #1 | 4×3 (1) | N/A | ( - ) |
| 2) #2 | 8×6 (1) | ( - ) | ( - ) |
| 3) #3 | 2×1 (1) | ( - ) | ( - ) |
| 4) #4 | 6×5 (1) | N/A | ( - ) |
| 5) #5 | 6×5 (1) | ( - ) | ( - ) |
| 6) #6 | 10×7 (1) | ( - ) | ( - ) |
| 7) #7 | 12×10: parenchyma (1), 12×10: protruding (1) | 6×5: (hypo-iso)*, 7×5: (iso-hypo)* | ( - ) |
| 8) #9 | 8×2 (1) | 8×2 (hypo-hypo)* | ( - ) |
| 9) #10 | 2×1 (1) | ( - ) | ( - ) |

dimension(mm)
parenthesis: number of tumor nodules
* : Spiral CT arterial-portal enhancement pattern



A B

**Fig. 4.** Spiral CT features of single nodular VX2 tumor: Axial scan reveals well defined, low-density tumor (arrows) in arterial (**A**) and portal (**B**) phase. Peripheral rim enhancement is seen in arterial phase.

제외하고3주째 7마리에 대하여 시행하였으며 이 중 2마리(29%)에서만 종괴를 확인할 수 있었다.

각 실험 토끼에서의 소견은 다음과 같다.

1번 토끼는 종양 이식 후 17일째 사망하였는데 간 좌엽에 직경 4×3 mm 단일 결절의 종괴가 발생하였으나 사망으로 인하여 CT는 시행하지 못하였다.

2번 토끼에서는 3주후 개복에서 간 좌엽 밑면(liver bed)에 8×6 mm의 단일 결절이 관찰되었다. CT상 종괴를 관찰할 수 없었다.

3번 토끼는 3주후 개복에서 간 표면에서 종괴가 관찰되지 않았으나 절단면상 2×1 mm의 단일 결절 종괴가 있었고 CT상 관찰할 수 없었다.

4번 토끼는 14일 후 사망하였는데 간 좌엽의 실질 내 6×5 mm의 단일 결절 종괴가 있었다.

5번 토끼는 3주후 개복에서 간 좌엽의 밑면에서 3×2 mm의 종괴가 보였으며 절단면상 6×5 mm 크기의 단일 결절 종괴였다.

6번 토끼는 3주후 개복에서 간 우엽의 밑면에서 돌출하여 간위인대(hepatogastric ligament) 부위에 걸쳐 있는 10×7 mm의 단일 결절 종괴가 관찰되었으나 CT상 관찰되지 않았다.

7번 토끼는 3주후 개복에서 간 좌엽의 밑면에 12×10 mm 단일 결절이 관찰되었으나 (Fig. 5A) 절단면상 다른 또 하나의 결절이 간 실질 속에 약 5 mm 거리를 두고 관찰되었다. 그 크기는 직경 12×10 mm였다 (Fig. 5B). CT 상 간 밑면의 종괴는 7×5 mm 크기이며 동,문맥기에서 고음영 - 저음영으로, 간 실질내의 종괴는 테두리 조영증강을 보이며 6×5 mm 크기, 고음영 - 등음영으로 관찰되었다.

실험 토끼 #8은 이식3일 후 사망하여 실험대상에서 제외하였고 개복하여 확인하지 않았다. 8번 토끼(#9)는 3주후 개복에서 간 표면에서 종양은 관찰되지 않았으나 절단면상 8×2 mm 종양이 발생하여 있었다. CT상 종괴는 8×2 mm 크기(저 - 저음영)로 관찰되었다.

9번 토끼(#10)는 3주후 개복에서 간 좌엽에 절단면상 2×1 mm 크기의 단일 결절이 관찰되었다. 2군의 모든 예에서 타 장기로의 전이 소견은 없었다.

**2) 이식종양의 조직병리학적 소견**

VX2 암종의 이식 부위에 50% 이상 살아 있는 종양 형성은 1마리(#2) (Fig. 6), 살아있는 종양 세포가 10%미만이고 대부분 괴사로 되어있는 것이1마리(#5), 종양 세포의 괴사로만 이루어져 있는 것이2마리(#4, 6), 종양 세포 괴사 후 섬유화 결절 형성이 5마리(#1, 3, 7, 9, 10)이었다. 이상의 9마리 모두에서 이식 종양의 주변부에 호산구, 단핵구 그리고 조직구의 침윤이 동반되었고 경도에서 중등도의 종양 주변부 섬유화가 관찰되었다. 2마리(#1, 3)는 문맥역에 젤폼으로 인한 것으로 생각되는 호산구 침윤과 이물반응도 함께 관찰되었다. 정

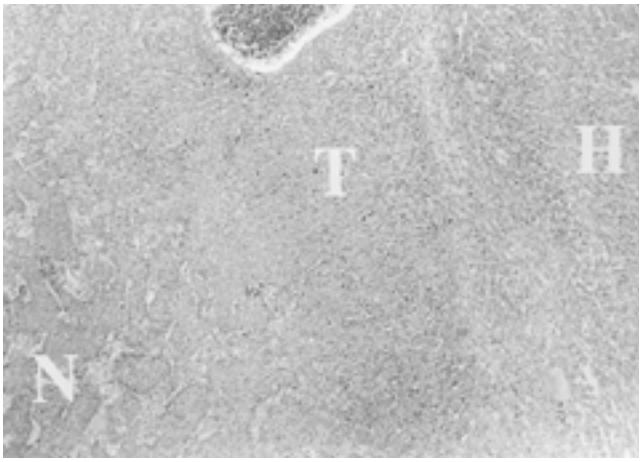
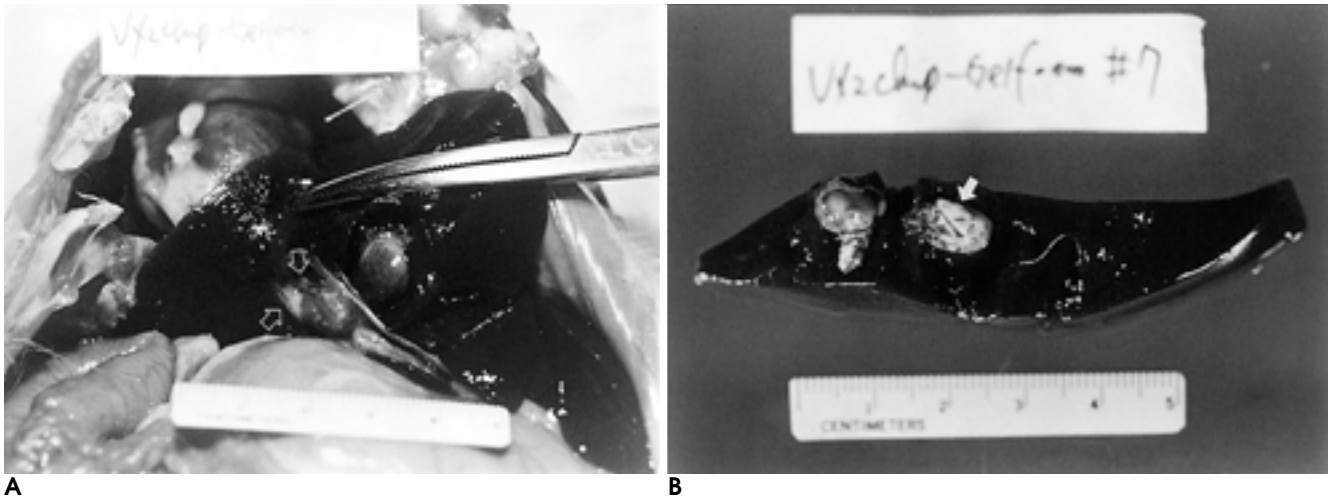



**Fig. 6.** Photomicrograph of histologic specimen shows well-defined tumor nodule (T). H: normal hepatocytes of liver parenchyma. N: necrosis (H&E×40)



A B

**Fig. 5. A.** A protruding VX2 carcinoma nodule (12×10 mm) (open arrow) on the rabbit liver surface.
**B.** Another tumor nodule (12×10 mm, arrow) which developed separately within the liver parenchyma is noted on cut section specimen.

상 부위의 간 조직에서는 대부분 문맥역에 경도의 단핵구 침윤과 섬유화 그리고 간 문정맥 분지의 확장 소견이 부분적으로 관찰되었다.

## 고 찰

지금까지 토끼에 이식한 VX2암종을 이용하여 많은 종양학적, 방사선학적 연구가 이루어지고 있으나 이상적인 모델인 단일 종양결절을 얻는 데는 많은 어려움이 있다.

일반적인 VX2암종의 이식법은 종양세포 현탁액을 원하는 장기에 주입하며 간에 이식할 때는 외과적 방법으로 개복하여 이식하는 것이다 (9, 10, 14). Kunieda (12)의 경우 가토의 복부 정중 절개 후 26G주사침으로8×107 cells/ml농도의 세포현탁액 0.1 ml를 간 실질 내에 주입한 후 봉합하였다. 이 방법은 단일 결절 보다는 세포현탁액이 간 실질 내에서 혈관이나 담도를 따라서도 퍼지게 되어 미만성의 종양이 많고 또한 폐나 횡격막, 장간막을 따라서 복강 등으로의 전이가 쉽게 일어나는 단점이 있었다.

개복하 종양세포 주입법의 번거로움을 피하기 위하여 초음파 유도하에서 종양현탁액을 주입하는 방법도 시도된 바 있었으나 결과적으로는 단일결절보다는 무수한 종양결절과 주위 장기로의 전이 및VX2종양의 주위 장기와의 유착이 발현되었다 (15).

그러므로 본 실험과 같이 단일 결절의 종양을 발생시키며 이식 방법이 복잡한 종양 세포현탁액을 만들지 않아도 되는 방법이 필요하다고 생각된다.

Nishizaki등 (10)은 토끼의 간에 단일 결절형의 종양 발생 모델을 만들어 방사선학적 추적도 가능하게 하고자 기존의 종양 세포현탁액 이식 방법의 변형으로 VX2종양 조각을 가토의 간 실질 내에 이식하는 방법을 시도한 바 있다. 이들은 토끼의 복부를 정중 개복 후 간 좌엽의 피막하 간 실질에 투관침(trocar)을 이용하여 1 $mm^3$의 VX2암종 조각을 주입하였다. 이 실험에서도 VX2 암종 세포가 혈관과 담도내로 퍼지면서 전이가 일어나는 빈도가 높았으며 간 내에서도 이식부위에만 국소적으로 생기지 않고 다발성의 형태를 보였다. Thorstensen 등(13)은 특별히 고안된 자동생검총(automated core biopsy) 주사침을 이용하여 계대배양 토끼에서 종양 조각을 채취하고 다시 이 조직을 가토의 간 실질내에 복부 절개 없이 초음파 유도하에 이식하였다. 이들은 7마리의 토끼에서 모두 종양 발생을 확인하였으며 Magnetic Resonance Imaging상 (이하 MRI) 6마리에서 약2주후 평균 직경 5.9 mm 크기의 종괴를, 한 마리에서는 9일째에 4 mm 크기의 종괴를 관찰할 수 있었다. 이 방법은 단일 결절형의 종괴를 만들 수 있었으며 타 장기로의 전이가 늦게 나타나는 장점이 있었으나 실제 적용하기에는 몇 가지 문제점이 있다.

우선 자동생검총으로 계대배양 토끼의 다리에 있는 종괴를 초음파로 관찰하면서 중심성 괴사부위를 피하여 종괴가 살아있는 피막부위 조직만을 정확히 채취해야 하는 어려움이 있다. 이들은 또한 토끼의 간 실질을 초음파 유도하에 자동생검총으로 천자한 후 탐침(stylet)을 간 실질 내에 밀어 넣고 180도 돌려서 탐침 홈내에 있는 종양 조직이 탐침 등쪽으로 오게 한 후 자동생검총 바늘만을 빼는 방법으로 이식하였다. 그러나 자동생검총은 부피가 크고 무거우며, 일반적인 생검총의 경우 주사침의 조직 채취용 홈 길이가 1.5 - 2 cm 정도로 가토 간 실질의 두께보다 더 길다. 이러한 기술적 문제점이 토끼의 작은 간 실질내에 정확히 천자해 이식하는데 제한점이 될 수 있다.

본 실험 제1군의 경우 결절형 종양의 숫자는 무수한 작은 결절(2마리)을 제외하고 총21개(간내 16개, 좌복벽5개)가 발생하여 평균 2.1개였다. 간 내에 발생한 종양 외에 좌 복벽에 발생한 종양 들은 18 G주사침 속에 1 $mm^3$ 크기의 종양 조각 3개를 넣은 것 중 일부가 주사침을 뺄 때 천자로를 따라 밖으로 빠져 나오다가 좌 복벽에 걸리면서 종양이 발생한 것으로 보인다. 그러므로 젤폼을 이용하여 간실질에 이식한 종양 조각이 천자로를 따라 이탈하지 않게 한다면 좌복벽의 종양 발생을 막을 수 있을 것이라는 가정하에 제2군의 실험을 시행하였다. 제2군의 경우는 9마리 모두(100%)에서 결절형의 종괴가 관찰되었으며 전예에서 종양이 복막이나 좌 복벽에 발생하지 않았고 전이도 관찰되지 않았다. 그러나 전체적인 종양의 크기가 제1군보다 작으며 조직 소견상 중심부 괴사가 많이 동반되며 종양 주변부의 섬유화 변화가 제1군 보다 뚜렷하였다. 종양 주변부 섬유화 변화는 VX2 암종에서 일반적으로 관찰되는 소견이나 젤폼에 의한 이물반응의 결과로 좀 더 뚜렷이 나타난 것으로 해석된다. 그러나 종양 중심부 괴사가 제1군보다 더 진행되어 나타난 것이 젤폼에 의한 이물반응과 관계가 있는지는 명확하지 않다. 종양 조직의 괴사 정도는 조직 슬라이드가 한 단면 만을 관찰하는 것이므로 종양 전체를 모두 대변할 수 없어 비교하기가 어려운 점도 있다. 앞으로 섬유소, 자가혈전(autologous blood clot) 등 젤폼 보다 조직이물반응이 적게 일어나는 재료를 이용한 실험이 필요하다고 생각한다.

한편 제1군과 제2군의 실험 기간이6개월 정도 차이가 나서 사용한 VX2 암종의 성장 속도가 감소하여 제2군의 종양이 크게 자라지 못했을 가능성도 있으며 (11) 이식용으로 채취한 VX2암종의 조직이 불완전하거나 성장이 잘 되지 못하는 부분이 섞였을 가능성도 배제할 수가 없다. 그러나 제2군의 젤폼을 이용한 방법으로 단일 결절의 VX2 암종이 간 내에만 발생하게 하였다는 것은 의미가 있다고 본다.

본 실험의 결과 VX2종양의 CT발견율은 1군50%, 2군29%로 낮았는데 이것은 종양의 크기가 평균 12 mm(1군), 6.4 mm(2군)로 작았기 때문으로 생각된다. 최 등 (14)의 경우 방사선 검사상의 발견율은 초음파 54%, CT 61%, MRI 87%이었는데 이 경우 조영제 주입 직후 가토를 희생시켜 호흡을 멈추게 한 후 CT를 촬영하여 다소 차이가 나타났다고 생각한다. 이들의 논문에서도 3 - 5 mm 크기의 작은 종양들에서는 초음파 27%, CT 41%의 발견율을 보여 크기가 작으면 종양 발견율이 낮았다.

결론적으로 가토간에서 18 G주사침을 이용한, 초음파 유도에 의한 VX2종양 조각 이식법은 종양 세포현탁액을 만드는 번거로움을 피할 수 있을 뿐만 아니라 복부 절개를 하지 않는

비침습적 방법으로 타 장기로의 전이가 적은, 단일 결절형의 종양을 만들 수 있었다.

종양조각만을 이식한 경우에는 천자로를 따라 좌측 복벽에 종양 결절이 발생하는 단점이 있었으나 젤폼을 사용하면 좌측 복벽의 종양 발생을 방지할 수 있었으며 비록 종양조각만을 이식한 경우보다 크기가 작기는 하지만 단일 결절 형태의 VX2 암종 모델을 만들 수 있었다.

## 참 고 문 헌


1. Burgener FA, Violante MR. Comparison of hepatic VX-2 carcinomas after intra-arterial, intraportal and intraparenchymal tumor cell injection: An angiographic and computed tomographic study in the rabbit. *Invest Radiol* 1997;14:410-414
2. Izumi B, Tashiro S, Myauchi Y. Anticancer effects of local administration of mitomycin C via the hepatic artery or portal vein on implantation and growth of VX2 cancer injected into rabbit liver. *Cancer Re*s 1986;46:4167-4170
3. Eda I, Soga H, Ueoka M, Okada A, Yamashita K, Shimizu N. The suppression of postoperative liver metastasis caused by the continuous intraportal infusion of angiogenesis inhibitor FR-118487 in a rabbit colon cancer model. *Jpn J Surg* 1998;28:273-278
4. Imai S, Kajihara Y, Nishishita S, Hayashi T. Effect of ethanol induced occlusion of the renal artery in rabbit kidney implanted with VX2 carcinoma. *Acta Radiol* 1989;30:535-539
5. Carson BS, Anderson JH, Grossman SA, et al. Improved rabbit brain tumor model amendable to diagnostic radiographic procedure. *Neurosurgery* 1982;11:603-608
6. Wolfe HJ, Bitman WR, Voelkel EF, Griffiths HJ, Tashjian AH . Systemic effects of the VX-2 carcinoma on the osseous skeleton: A quantitative study trabecular bone. *Lab Invest* 1978;38: 208-215
7. Young DM, Fioravanti JL, Prieur DJ, Ward JM . Hypercalcemic VX-2 Carcinoma in rabbits: A clinicopathologic study. *Lab Invest* 1976;35: 30-46
8. 임정기, 정은철, 한문희, 한만청, 함의근. 혈행성 전이 폐암: 가토 VX-2 Carcinoma를 이용한 실험 방사선학적 연구. *대한방사선의학회지* 1990;26: 223-229
9. Nakamura K, Tashiro S, Jiraoka T, Ogata K, Ootsuka K. Hepatocellular carcinoma and metastatic cancer detected by iodized oil. *Radiology* 1985:154;15-17
10. Nishizaki T, Matsumata T, Kanematsu T, Yasunaga C, Sugimachi K. Surgical manipulation of VX2 carcinoma in the rabbit liver evokes enhancement of metastasis. *J Surg Res* 1990;49:92-97
11. Volpe JPG, Milas L. Influence of tumor transplantation methods on tumor growth rate and metastatic potential of solitary tumors derived from metastases. *Clin Exp Metastasis* 1990;8: 381-389
12. Kunieda K, Seki T, Nakatani S, Wakabayashi M. et al. Implantation treatment method of slow release anticanccer doxorubicin containing hydroxyapatite (DOX-HAP) complex. *Br J Cancer* 1993;67:668-673
13. Thorstensen O, Isberg B, Svahn U, Jorulf H, Veniselos N, Jaremko G. Experimental tissue transplantation using a biopsy instrument and radiologic method. *Invest Radiol* 1994;29:469-471
14. 최병인, 임효근, 주성욱 등. 가토 간의 VX-2 암종:초음파검사, 전산화단층촬영 및 자기공명영상의 발견율에 대한 비교. *대한방사선의학회지* 1994;30:521-529
15. Shim HJ, Kwak BK, Moon WC, Yang SJ, Kim SH, Lee CJ. An Experimental Study on Transarterial Cationic Polyliposome-Mediated p53 Gene Therapy in Rabbit Liver: Antitumor Efficacy on VX2 carcinoma. *J Vasc Interv Radiol* 1999:10:208-209

대한방사선의학회지 2001;44:19 - 27

J Korean Radiol Soc 2001;44:19 - 27

# Development of the Single Nodular VX-2 Carcinoma Model in Rabbit Liver: Tissue Chip Implantation under Ultrasonographic Guidance[1]

Seong Jun Yang, M.D., Hyung Jin Shim, M.D., Byung Kook Kwak, M.D., Jong Beum Lee, M.D., Kang Hyuk Lee, M.D,. Seung Hun Ryu, M.D., Ki Hyun Kim, M.D., Seo Hyun Kwak, M.D., Soo Hyun Lee, M.D.[2]

[1]*Department of Radiology, College of Medicine, Chung-Ang University*
[2]*Hyun-Dai Radiology Clinic*

**Purpose:** To implant tissue chips in New Zealand rabbits, and thus redurce the frequency with which scattered VX2 carcinoma nodules and early metastasis develop in these animals.

**Materials and Methods:** VX2-carcinoma tissue chips of two different sizes were implanted under ultrasonographic guidance. In each of 12 New Zealand rabbits (group 1), there 1-$mm^3$ tissue chips were implanted in the liver using an 18-gauge needle, and in the same way, one 3-$mm^3$ chip with an added gelfoam pellet was implanted in the proximal lumen of the liver of each of ten other New Zealand rabbits (group 2).

Three weeks after implantation, the animals underwent dval-phase CT scanning and were sacrificed, and the Number and size of tumor nodules, and metastasis were evaluated either macro-or microscopically.

**Results:** In ten rabbits in group I, a total of 21 nodules (16 in the liver, 5 in the peritoneal wall) were observed, which in nine rabbits in group 2, a total of ten nodules-all in the liver-were present. CT scans depicted tumor nodules in 50% of group-I rabbits, and in 29% those in group 2. Mean tumor diameter was 12±9 mm in group 1 and 6.4±3 mm in group 2. Histologic examination indicated the presence of nodular VX2 carcinoma, with varying degrees of central necrosis, a feature more prominent in group 2.

**Conclusion:** To provide a well-localized tumor nodule in rabbit liver, tissue chip implantation of VX2 carcinoma, especially with added gelfoam, is a good alternative to intraparenchymal injection of tumor suspension.

**Index words :** Neoplasms
Animals
Computed tomography (CT)

Address reprint requests to : Hyung Jin Shim, M.D., Department of Radiology, Chung-Ang University, 5-207, Hangangro 3-ga, Yongsan-gu,140-757, Seoul, Korea.
Tel. 82-2-748-9682 E-mail: shimhj@cau.ac.kr