

난소 악성 배아세포종양에서의 DNA배수체 분석*

가톨릭대학교 의과대학 산부인과학교실
이준모

= Abstract =

DNA Ploidy Analysis in Malignant Germ Cell Tumors of Ovary

Joon Mo Lee

*Department of Obstetrics and Gynecology, Catholic University Medical College,
Seoul, Korea*

The ovarian specimens obtained from the patients with 27 malignant germ cell tumors were analyzed in order to study DNA and form factor using flow cytometry and image analyzer. The malignant germ cell tumors consisted of six dysgerminomas, six endodermal sinus tumors, seven immature teratomas, three teratomas associated with squamous cell carcinoma, two embryonal carcinomas one mixed germ cell tumor and one malignant struma ovarii. Five normal ovaries were used as control group. Various prognostic factors such as DNA ploidy, S-phase and measurements of form were evaluated by flow cytometry and image analyzer. Mitotic index, histological grade, nuclear grade and tumor necrosis were assessed with microscope. These prognostic factors of DNA ploidy, S-phase, form factor and histological variables were compared with tumor recurrence and clinical stage in this study.

The results were as follows :

1. Sixteen(59%) out of 27 were aneuploidy and 11(41%) diploidy. All six dysgerminomas and six endodermal sinus tumors were aneuploidy, while six immature teratomas were diploidy.

2. S-phase fractions of malignant germ cell tumors related significantly with those mitotic index($P=0.0201$). S-phase fractions significantly increased in mitotic index grade III compared with grade I ($P<0.01$). There was no significant different between grade I and II, and between grade II and III. There was no difference between S-phase fractions and the remaining histological variables.

3. The incidence of aneuploidy was higher in the high S-phase fractions($P=0.0041$). However, there was no difference between S-phase fractions and tumor recurrence.

4. The incidence of aneuploidy significantly increased in clinical stage III and IV compared with stage I and II ($P=0.0368$). However, the difference between clinical stage histological variables was not significant.

5. The difference between form factor and histological variables, between form and tumor recurrence ($P=0.3698$), and between form factor and S-phase fractions ($r=0.076$) could not reach statistical significance.

These results suggest that ploidy can give significant value for routine clinical prognostic prediction, whereas histologic variables and form factor are poorly suitable for the prognostic evaluation.

I. 서 론

난소의 악성 배아세포종양(malignant germ cell tumor)은 부인과 종양학 분야에서 매우 드문 종양으로 난소의 악성종양의 4-5%를 차지하며 젊은 여성에서 주로 발생하는 특징을 가지고 있다.¹⁾ 난소 악성 배아세포종양의 전이성 및 악성정도는 임상적으로 특징적인 소견을 보여 수술요법이나 항암화학요법으로써 높은 치료율을 나타낼 수 있는 점이 다른 난소 악성종양과 다른 점이다.²⁾

수술요법을 포함한 항암요법으로 진행된 난소암 환자에서도 40%의 높은 완전 치료율을 보여준다.³⁾ 그러나 초기암에서 적절한 수술요법이 충분히 시행된 후에 다른 장기 및 수술부위에 전이와 재발이 흔히 발생하기도 하므로⁴⁾ 치료과정에 있어서 그 종양의 적합하고 특이성이 있는 치료를 하기 위하여는 종양의 예후를 예측할 수 있는 예후인자를 찾아내는 것이 중요하다고 생각된다. 이러한 예후인자로는 환자 나이, FIGO시기, 조직학적 분화도, 종양의 크기, 최초 치료요법의 종류 및 종양세포의 염색체 배수성(ploidy)을 들 수 있다.⁵⁻⁷⁾ 이 중에서도 종양의 크기, FIGO시기, 종양의 치료반응과 생존율의 예후인자로서 보고되었으나^{8,9)} 종양세포의 배수성은 난소 악성종양을 포함한 모든 악성종양의 생존율에 미치는 영향이 아주 큰 것으로 점차 밝혀지고 있으며^{10,11)} 조직학적 분화도나 세포 내의 유사분열 양상도 각 난소 악성종양의 예후 및 생존율에 관계가 있다는 보고가 있다.^{12,13)}

영상분석(image analyzer)을 이용한 형태 계측학적 분석은 컴퓨터로 종양세포핵의 형태학적 변화를

볼 수 있는데 이 방법은 조직학적 분화도 보다 객관성이 있고 재현성이 있는 방법이라고 주장하는 학자들도 있다.¹⁴⁾ 그러나 난소 악성 배아세포종양에서 조직학적 분류에 따른 특성 및 예후에 미치는 영향은 아직 자세히 규명되지 않았고 국내의 연구 보고도 되지 않은 실정이다.

이에 저자들은 유식세포측정기를 이용하여 종양세포의 배수성, DNA 중식기 분획(S-phase)을 알아 보고 영상분석을 이용한 형태계측학적 핵형태 변화 및 조직학적 소견간의 상관관계를 알아본 다음 상기 소견들과의 난소 악성배아세포종양의 생물학적 특성을 알아내어 다양한 예후인자와 종양의 상관관계를 보고자 본 연구를 계획하였다.

II. 재료 및 방법

1. 재료

1980년 1월부터 1991년 12월까지 가톨릭의과대학 부속병원 산부인과에서 난소 악성 배아세포종양으로 진단받은 27예를 대상으로 하여 파라핀에 포매된 난소암종 조직을 사용하였다. Scully¹⁵⁾에 의한 진단별 분류에 따라 미분화배세포종(dysgerminoma) 6예, 난황낭종양(endodermal sinus tumor) 6예, 미성숙 기형종(immature teratoma) 7예, 편평상피암종을 동반한 기형종(immature teratoma) 7예, 편평상피암종을 동반한 기형종(teratoma associated with squamous cell carcinoma) 3예, 배아암종(embryonal carcinoma) 2예, 융모상피암(choriocarcinoma) 1예, 혼합배아세포 종양(mixed germ cell tumor) 1

예, 악성난소 갑상선종(malignant struma ovarii) 1예였다. 나이는 8세에서 73세 사이로 중앙값이 38세였다.

DNA함량 측정의 대조군은 난 이유로 수술을 받을 때 제거된 35세에서 40세사이의 부인 정상 난소 5예의 파라핀 포매조직을 각각 이용하였다.

2. 방법

1) 유식세포 측정기에 의한 DNA분석

난소의 악성 배아세포종양 파라핀 포매 조직에서 얻은 70 μ m 두께의 절편 2매를 histo-clear(National Diagnostics, Somerville, NJ, USA)로 처리하여 파라핀을 제거하였다. 100% 에탄올에 2회 처리한 후 95%와 70% 에탄올에 차례로 1회씩 방치하였다. 종류수에 1회 처리 후 다시 종류수를 넣어 4 $^{\circ}$ C에서 1일 방치하여 함수화시켰다. 함수화과정을 마친 조직절편을 펄스용액에 넣어 37 $^{\circ}$ C 항온조에 2시간 이상 방치한 후 세공크기(poresize) 45 μ m인 나일론망으로 여과시켰다. 여과액에서 2.5×10^6 개의 세포부유액을 취하여 7분간 실온에서 4000rpm으로 원심 분리하여 세포 침전물을 얻었다. 세포침전물에 100 μ l의 구연산염완충액, 트립신액 900 μ l, 라이보뉴클리에이스액 750 μ l를 첨가한 후 나일론망으로 여과한 다음 DNA함량을 측정하였다. 단일세포부유액의 분석을 위하여 에픽스 정량 II 유식세포 측정기(Coulter electronics, INC, USA)를 이용하였다.

2) 영상분석

헤마톡실린-에오진 염색을 한 악성 배아세포종양 조직 슬라이드를 광학현미경으로 검색한 후 증식된 종양세포에 의해 고형성 종양을 형성한 부위를 선택하여 핵막의 형태와 경계가 명확한 세포들 20개 내외를 1,000배로 사진을 촬영 현상한 후 핵막을 그렸다. 영상분석기(Kontron Bildanalyse GMBH, W. Germany)를 사용하여 핵의 면적과 핵막의 둘레를 측정하여 from factor를 산출하였다. 핵의 형태가 완벽한 원형을 형성할 때는 from factor 치는 1.0이 되며, 다형성(pleomorphism)이 심할수록 1.0보다 더욱 커지게 된다. from factor 산출은 Diamond 등¹⁶⁾의 방법을 이용하였다.

3) 통계학적 분석방법

① 악성 배아세포종양의 DNA증식기 분획 및 form factor와 각 병리학적 변수들간의 통계학적

유의성을 보기 위해서 분산분석법 중 일원배치법(ANOVA, one-way analysis of variance)을 이용하였다.

② 악성 배아세포종양의 DNA 증식기 분획이 각 병리학적 변수들 중 각 아등급간에서 통계학적으로 유의한 차이를 보이는 세포분열지수는 Scheffe의 다중비교법으로 검정하였다.

③ DNA 증식기 분획 및 from factor와 비배수성간의 차이점과 악성 배아세포종양 재발률과 DNA 증식기 분획, from factor, 비배수성간의 차이점은 Student's t-test를 사용해서 검정하였다.

④ 악성 배아세포종양 재발률과 비배수성간의 차이점은 카이제곱 검정(Chi-Square test)법을 사용하였다.

⑤ 임상시기와 각 변수간에는 Fisher's exact test를 사용하였다.

III. 성 적

1. 정상 난소 및 악성 배아세포종양의 DNA 함량 분석

정상난소 세포의 DNA 증식기 분획의 범위는 9.16-16.80%, 평균치는 12.50%, 중앙값은 11.53%, 표준편차는 2.93%, CV(coefficient variance)의 범위는 4.95-6.85%, CV평균치는 5.63% 였다(Table 1).

Table 1. DNA analysis of normal ovaries

No.	GoG1(%)	S-phase(%)	G2M(%)	CV(%)
1	76.30	11.53	12.10	5.31
2	80.50	11.14	8.40	5.55
3	81.80	13.86	4.30	6.85
4	67.30	16.80	15.90	4.95
5	82.10	9.16	8.80	5.51
mean \pm SD	77.60 \pm 6.20	12.50 \pm 2.93	9.9 \pm 4.34	5.63 \pm 0.72

악성 배아세포의 DNA 증식기 분획의 범위는 5.43-37.68%, 평균치는 17.51%, 중앙값은 17.72%, 표준편차는 7.68%이었고, 악성 배아세포의 DNA 주상도의 CV 범위는 2.41-7.95%, CV평균치는 4.64%이었다.

악성 배아세포종양의 DNA 함량분석은 27예에서 시행하였는데, 16예(59%)가 비배수성(aneploidy)이고, 나머지 11예(41%)는 정배수성(diploidy)을 보였다(Fig. 1). 미분화배세포종 6예와 난황낭종 6예는 각각 전 예에서 모두 비배수성을 보였고, 미성숙기형종 7예는 전 예에서 모두 정배수성을 보였다(Table 2).

2. 악성 배아세포의 DNA 증식기 분획과 병리학적 변수들 간의 상관관계

DNA 증식기 분획과 조직학적 등급간(histologic grade)($P=0.1328$), DNA 증식기 분획과 핵 등급간(nuclear grade)($P=0.1519$), DNA 증식기 분획과 종양괴사(tumor necrosis)($P=0.3334$)에는 유의한 차이가 없지만, DNA 증식기 분획과 세포분열 지수간(mitotic index)에는 유의한 차이가 있었다($P=0.0201$)(Table 2). 다중비교에서 세포 분열지수 아 등급간의 차이를 보면 등급 I에 비해 등급 III에서 DNA 증식기 분획이 유의하게 증가($P<0.01$)하였으나, 등급 I과 II간, 등급 III간에는 유의한 차이가 없었다(Fig. 2).

3. 악성배아세포의 From factor의 조직학적 분화도와와의 상관관계

from factor와 조직학적 등급간($P=0.5795$), from factor와 핵 등급간($P=0.2910$), from factor와 종양괴사간($P=0.2655$)에는 모두 유의한 차이가 없었다.

4. 악성 배아세포의 DNA 증식기 분획 및 from factor와 비배수성과의 상관관계

DNA 증식기 분획이 높을수록 비배수성의 빈도는 유의하게 증가하였다($P=0.0041$)(Fig. 3). 그러나 from factor와 비배수성간에는 유의한 차이가 없었으며($P=0.9221$), DNA 증식기 분획과 from factor 간에도 유의한 상관성이 없었다($r=0.076$)(Table 2).

5. 악성 배아세포종양 재발률과 DNA 증식기 분획, from factor, 비배수성간의 상관관계

악성 배아세포종양 재발률과 DNA 증식기 분획간($P=0.3832$), 악성 배아세포종양 재발률과 from factor간($P=0.3698$), 악성 배아세포종양 재발률과 비배수성간($P=0.952$)에 모두 유의한 차이가 없었다(Table 2).

6. 임상시기와 DNA 비배수성, 조직학적 등급, 핵 등급, 세포 분열지수간의 상관관계

임상시기와 DNA 비배수성 간에는 임상시기 I, II에 비해 III, IV에서 비배수성이 유의하게 증가하였고($P=0.0368$)(Fig. 4), 임상시기와 조직학적 등급($P=0.0677$), 핵 등급($P=0.109$), 세포 분열지수간($P=0.125$)에는 유의한 차이가 없었다(Table 2).

IV. 고 찰

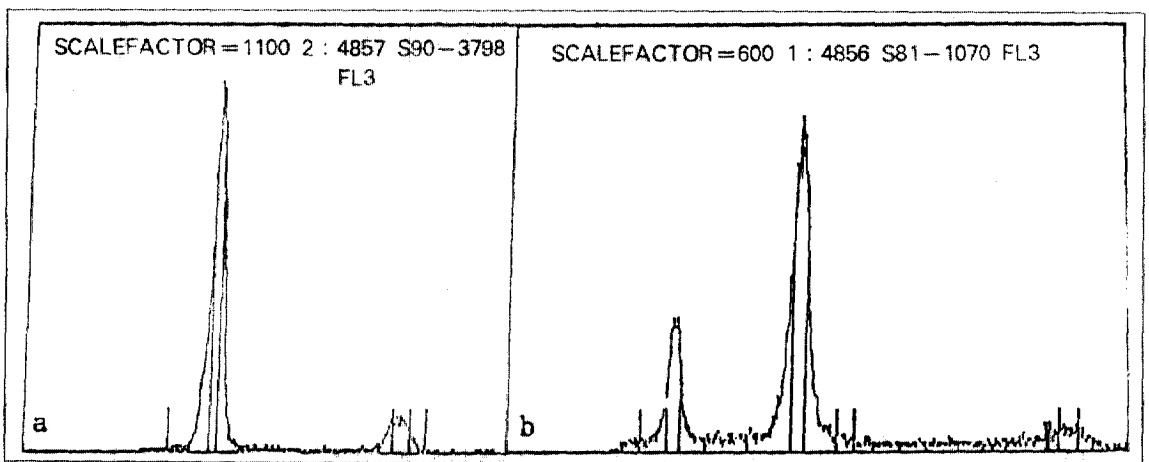


Fig. 1. DNA ploidy analysis of malignant germ cell tumors.

a : Diploidy, b : Aneuploidy

Table 2. Grads of pathological variables, DNA analysis and form factors in malignant germ cell tumors of ovary

	No.	HG	NG	MI	TN	S-phase(%)	Ploidy	CV(%)	FF	R	Stage
Dysgerminoma	1	III	II	III	I	27.32	A	2.62	1.125	R	IV
	2	III	III	III	I	28.05	A	4.55	1.090	N	Ic
	3	II	II	II	I	16.67	A	4.86	1.096	N	Ic
	4	II	III	III	I	21.70	A	2.81	1.085	N	I
	5	III	III	III	III	21.77	A	2.81	1.152	N	III
	6	III	II	II	I	23.47	A	2.41	1.090	N	III
Endodermal sinus tumor	1	II	II	II	III	24.50	A	7.65	1.192	R	III
	2	II	III	II	III	24.37	A	7.95	1.063	N	III
	3	II	III	III	I	18.80	A	6.40	1.214	N	Ic
	4	I	I	I	I	11.62	A	6.24	1.091	N	III
	5	II	II	III	II	37.68	A	7.32	1.125	R	III
	6	I	II	II	II	11.22	A	4.86	1.092	N	II
Immature teratoma	1	II	I	I	I	5.43	D	4.60	1.099	N	Ia
	2	II	I	I	I	12.96	D	6.49	1.092	N	Ic
	3	I	I	I	I	11.80	D	3.73	1.182	N	I
	4	II	I	I	III	9.94	D	4.08	1.142	N	I
	5	II	I	I	I	19.38	D	3.42	1.185	R	III
	6	II	I	I	I	21.20	D	3.25	1.119	N	Ib
	7	II	I	I	I	83.62	D	2.94	1.116	N	Ia
Teratoma with squamous cell carcinoma	1	III	III	III	I	10.18	A	5.95	1.195	R	III
	2	I	II	I	I	7.94	D	3.58	1.119	N	II
	3	II	III	II	I	6.38	D	7.36	1.109	N	Ia
Embryonal carcinoma	1	II	III	III	I	15.25	A	4.17	1.061	R	III
	2	I	II	I	I	17.72	A	3.04	1.105	N	Ic
Choriocarcinoma	1	II	II	II	II	14.85	D	3.99	1.064	N	II
Mixed germ cell tumor	1	III	III	III	III	23.20	A	4.99	1.177	R	IV
Malignant struma ovarii	1	I	I	I	I	20.68	D	3.29	1.120	N	Ic

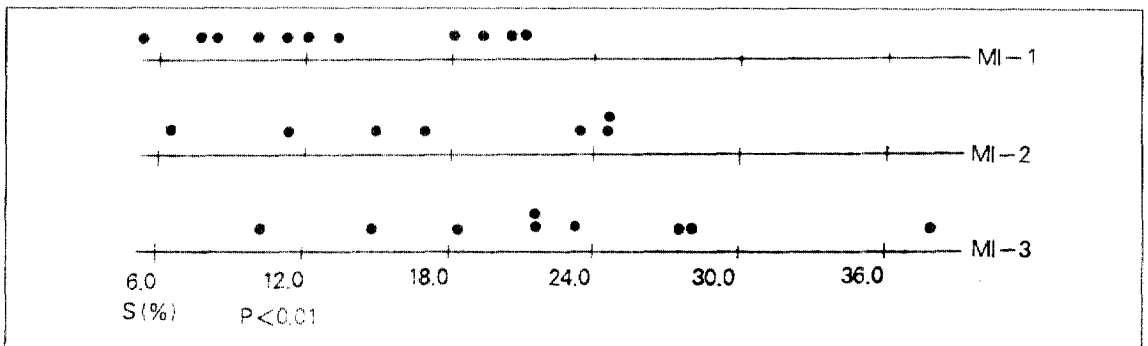


Fig. 2 S-phase score and mitotic index

난소종양 중에서 난소 배아세포종양은 20%에 해당되며 난소 악성종양의 4%-5% 만이 악성배아세포종양이라고 한다.¹⁾ 난소 악성배아세포종양은 배

아세포에서 발생하므로 소아나 젊은 임신 연령층에서 흔히 나타나며 최근 그 예후가 많은 진전을 보아왔고, 그 중 악성 육포성종양은 완전치유율에 가

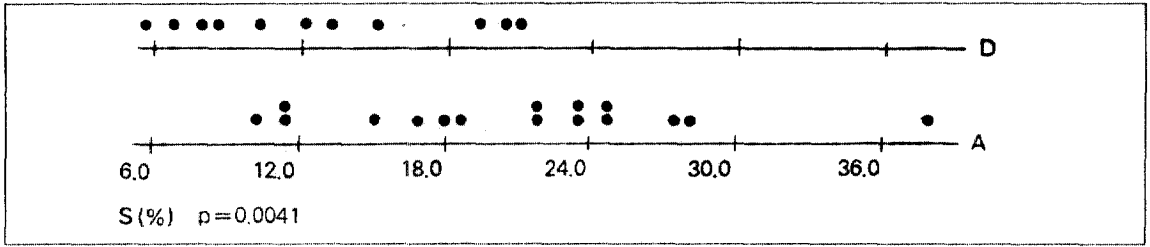


Fig. 3. S-phase score and ploidy

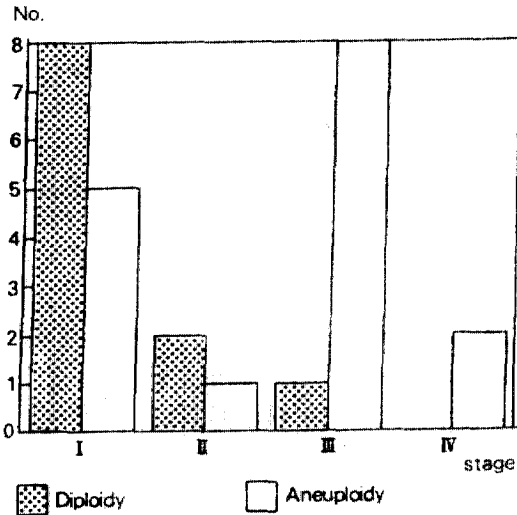


Fig. 4. Histogram of ploidy in clinical stages

까운 예후를 보이지만 전체 악성배아세포종양은 80%의 5년 생존율을 나타낸다고 한다.¹⁷⁾ 난소의 원발성 악성종양에서 환자의 연령,⁷⁾ 종양의 크기 (Bjorkholm & Silversward, 1981),^{13,18)} 종양의 피막이나 임파전이,¹⁹⁾ 유사분열의 활성도,¹²⁾ 종양세포의 배수성과 조직학적 분화도 및 임상시기⁵⁻⁷⁾와 같은 예후 인자들은 난소 악성종양의 재발률에 큰 영향을 미친다고 주장하는 학자들도 있다. 그러나 저자들이 사용한 예후 인자들은 조직학적 분화도, DNA 분석법을 이용한 종양세포 증식기 및 배수성, 화학 분석기로 산출한 from factor이며, 이러한 예후 인자들은 재발률과 환자 생존에 미치는 영향에 대하여 아직 의견의 일치를 보지 못하고 논란의 대상이 되고 있는 지표들이다.²⁰⁾ 더구나 난소 악성종양중 악성 배아세포종양에서 이러한 인자들과 임상예후와의 연관성을 체계적으로 연구한 문헌은 찾아 볼 수 없다.

저자들이 시행한 정상 난소세포의 DNA 증식기

분획 CV(평균치 5.63%)보다 악성 배아세포 증식기 분획 CV(평균치 4.64%)는 낮은 편이었는데 이러한 결과는 악성 배아세포종양이 일반적으로 고형성 종양들로 구성되어 있기 때문인 것으로 생각된다. 악성 배아세포종양의 59%가 비배수성을 보였는데 악성 배아세포종양의 배수성을 연구한 문헌이 국내에는 아직 없었으며, 저자들의 난소 악성 배아세포종양의 비배수성이 외국의 악성 암종의 59.0%에서 관찰됐다는 Kallioniemi 등²⁰⁾과 61%라는 Rodenburg 등⁷⁾의 성적과 매우 유사하지만 69%라는 Friedlander 등¹¹⁾의 성적과는 다소 차이가 있었다.

미분화배세포종 6예와 난황낭종 6예는 각각 전예에서 모두 비배수성을 보였고, 미성숙 기형종 7예는 모두 비배수성을 보였고, 미성숙 기형종 7예는 모두 정배수성을 보여 DNA분석을 재반복하여 시행하였으나 동일한 결과를 얻었다. 미분화 배세포종은 일반적으로 임상예후가 매우 좋은 종양으로 알려져 있는데,¹⁵⁾ 전 예에서 비배수성이 관찰된 점은 의외의 결과이다. 비배수성의 빈도가 이와 같이 높은데도 임상 생존율이 매우 좋은 것은 수술요법과 방사선치료가 효과적이라는 이유도 있겠지만, 다양한 요인들이 관여할 가능성을 배제할 수 없으므로 추후 연구에서 그 기전을 밝혀야만 할 것으로 생각된다.

난황낭종의 비배수성의 빈도가 높고 미성숙 기형종은 비배수성이 전혀 관찰되지 않은 점은 임상예후와 배수성 분석결과가 서로 연관성을 잘 보이고 있는데 난황낭종은 수술요법이나 방사선치료가 환자 생존율을 호전시키지 못하는 악성도가 높은 종양이며 미성숙기형종은 비교적 임상예후가 좋은 종양으로 알려져 있기 때문이다.¹⁵⁾ 그러나 저자들의 성적중 전체 악성종양 재발률과 비배수성 간에는 통계적으로 유의한 차이가 없었다. 암종에서는 중

식기 분석이 임상예후와 밀접한 연관성을 갖는 독자적인 지표가 된다고 하는데²⁰⁾ 저자들의 성적에서 악성배아세포종의 DNA 증식기 분석과 재발률 간에는 유의한 차이가 없었다.

악성배아세포종양의 임상시기와 DNA 비배수성 간에는 연관성을 보여 임상시기 I, II에 비해 III, IV에서 비배수성의 빈도가 유의하게 증가하였는데 이러한 결과는 난소암종에서 초기보다 말기 암종의 비배수성 빈도가 증가된다는 문헌보고와 잘 일치하고 있다.¹¹⁾ DNA 증식기 분석이 높을수록 비배수성의 빈도는 유의하게 증가하였는데, Kallioniemi 등²⁰⁾이 난소암종에서 시행한 성적과 일치되는 소견이다. 즉, 비배수성을 보이는 악성 배아세포종양에서 DNA 증식이 활발한 암종세포들의 수가 증가한다는 것을 의미한다. 이러한 결과는 DNA 분석이 객관성 있는 종양증식 측정방법을 보이는 것이라고 생각된다.

조직학적 분화도와 DNA 증식기 분석 및 임상시기와의 상관성을 보면 세포유사분열 양상과 DNA 증식기 분석 간에만 유의한 차이가 있어서 등급 I에 비해 등급 III에서 세포분열수가 유의하게 증가하였고 등급 I과 II간, 등급 II와 III 간에는 유의한 차이가 없었다. DNA 증식기 분석과 핵등급 간, DNA 증식기 분석과 종양괴사 간에는 모두 유의한 차이가 없었고, 임상시기와 모든 조직학적 분화도 변수간에도 유의한 차이가 없었다. 이러한 성적은 조직학적 분화도가 난소암종의 중요한 예후인자라고 보고한 Sorbe 등,²¹⁾ Sigurdsson 등,²²⁾ Redman 등²³⁾의 견해들과는 달리 저자들의 악성배아세포종양에서는 조직학적 분화도가 객관성있고 재현성있는 예후 인자로는 생각되지 않았다.

Mohler 등²⁴⁾과 Lipponen 등¹⁴⁾은 화상분석기를 이용하여 종양세포 핵의 형태계측학적인 측정이 암의 진단 및 치료, 예후에 중요한 역할을 할 것이라고 보고하였었다. 따라서 저자들은 악성 배아세포종양 세포들의 from factor와 조직학적 분화도를 나타내는 변수들인 조직학적 등급, 핵 등급, 유사분열 수, 종양괴사간의 상관관계를 비교하였으나 유의한 차이가 없었고 from factor와 악성배아세포종양 재발률 간 및 from factor와 비배수성 간에도 아무런 상관성이 없었다.

V. 결 론

난소의 악성배아세포종양 27예를 대상으로 유식세포 측정기로 DNA 분석을 시행하여 종양세포의 DNA 증식기와 배수성을 측정하였고, 화상분석기를 이용하여 종양세포 핵의 from factor를 산출하여 예후인자들, 임상시기 및 종양 재발률과의 상관관계를 비교 검색하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 악성배아세포종양의 DNA 함량 분석에서 16예(59%)가 비배수성이었고, 나머지 11예(41%)는 정배수성을 보였다. 미분화배세포종 6예와 난황낭종 6예는 각각 전 예에서 모두 정배수성을 보였다.

2. 악성배아세포종양의 DNA 증식기 분석과 조직학적 분화도 간 DNA 증식기 분석과 세포분열지수 간에는 유의한 상관관계 있었고($P=0.0201$), DNA 증식기 분석과 나머지 조직학적 변수들간에는 유의한 차이가 없었다.

3. 악성배아세포종양의 DNA 증식기 분석과 악성종양 재발률간에는 유의한 상관성이 없었고($P=0.3832$), DNA 증식기 분석과 비배수성 간의 상관관계는 DNA 증식기 분석이 높을수록 비배수성의 빈도는 유의하게 증가하였다($P=0.0041$)(Fig. 3).

4. 임상시기와 DNA 비배수성 간에는 임상시기 I, II에 비해 III, IV에서 비배수성이 유의하게 증가하였고($P=0.0368$), 임상시기와 조직학적 분화도 간에는 유의한 차이가 없었다(Table 2).

5. 악성 배아세포종양의 from factor와 조직학적 분화도 간, from factor와 악성 배아세포종양 재발률간($P=0.3698$), from factor와 DNA 증식기 분석간($r=0.076$)에는 모두 유의한 차이가 없었다.

이상의 결과로 보아 조직학적 분화도와 from factor는 난소악성배아세포종양의 예후에 미치는 영향이 없는 반면, DNA 비배수성은 중요한 예후인자라고 생각된다. 악성배아세포종양 중 미분화배세포종과 난황낭종 전 예에서 비배수성을 보인 점은 추후 연구에서 그 기전을 규명해야 한다고 생각된다.

- References -

1. Norris HJ, Jensen RD : Relative frequency of ov -

- arian neoplasms in children and adolescents. *Cancer* 1972;30:713.
2. Creasman WT, Soper JT : Assessment of the contemporary management of germ cell malignancies of the ovary. *Am J Obstet Gynecol* 1985;153:828-834.
3. Rodenburg CJ, Cleton FJ : Chemotherapy in advanced ovarian cancer. *J Cancer Res Clin Oncol* 1984;107:99-105.
4. Suh KS, Silverberg SG, Rhame JG, Wilkinson DS : Granulosa cell tumor of the ovary. *Arch pathol. Lab. Med* 1990;114:496-501.
5. Ozols RF, Young RC : Chemotherapy of ovarian cancer. *Semin Oncol* 1984;11:251-263.
6. Klein B, Falkson G, Smit CF : Advanced ovarian carcinoma. *Cancer* 1985;55:1829-1834.
7. Rodenburg CJ, Cornelisse CJ, Heintz PAM, Hermans JO, Fleurne GJ : Tumor ploidy as a major prognostic factor in Advanced Ovarian Cancer. *Cancer* 1987;59:317-323.
8. Griffiths CT : Surgical resection of tumor bulk in the primary treatment of ovarian carcinoma. *Natl. Cancer Inst Monogr* 1975;42:101-104.
9. Neijt JP, Ten Bokkel Huinink WW, Van der Burg MEL : Randomised trial comparing two combination chemotherapy regimens in advanced ovarian carcinoma. *Lancet* 1984;2:594-600.
10. Auer G, Eriksson E, Azavedo E : Prognostic significance of nuclear DNA content in mammary adenocarcinoma in humans. *Cancer Res* 1984;44:394-396.
11. Friedlander ML, Hedley DW, Taylor IW : Clinical and biological significance of aneuploidy in human tumors. *J Clin Pathol* 1984;37:961-974.
12. Fox H, Agrawal K, Langley FA : A clinicopathological study of 92 cases of granulosa cell tumor of the ovary with special reference to the factors influencing prognosis. *Cancer* 1975;35:231-241.
13. Bjorkholm E, Silversward C : Prognostic factors in granulosa cell tumor. *Gynecol Oncol* 1981;11:261-274.
14. Lipponen PK, Collan Y, Eskelinen MT, Pesonen E, Sotarout M, Nordling S : Comparison of morphology and DNA flow cytometry with prognostic factors in bladder cancer. *Br J Urol* 1990;65:589-597.
15. Scully RE : Tumors of the ovary and maldeveloped glands, 2nd ed., Washington DC AFIP Press 1982; 53-151.
16. Diamond DA, Berry SJ, Jewett BJ, Egglaston JC, Coffey DS : A New method to assess metastatic potential of human prostate cancer : relative nuclear roundness. *J Urol* 1993;128:322-324.
17. Germa JR, Piera JM, Barnadas A, Badia J : Sequential combination chemotherapy for malignant germ cell tumor of the ovary. *Cancer* 1988;61:913-918.
18. Stenwig JT, Hagekamp JT, Beecham JB : Granulosa cell tumors of the ovary. A clinicopathological study of 118 cases with long term follow up. *Gynecol Oncol* 1979;7:136-152.
19. Norris HJ, Taylor HB : Prognosis of granulosa tumors of the ovary, *Cancer* 1968;21:255-263.
20. Kallioniemi OP, Punnonen R, Mattila J, Lehtinen M, Koivula T : Prognostic significance of DNA index, multiploidy and s-phase fraction in ovarian cancer. *Cancer* 1988;61:334-339.
21. Sorbe B, Frankendal B, Veress B : Importance of histologic grading in the prognosis of epithelial ovarian carcinoma. *Obstet Gynecol* 1982;59:576-582.
22. Sigurdsson K, Alm P, Gullberg B : Prognostic factors in malignant epithelial ovarian tumors. *Gynecol Oncol* 1983;15:370-380.
23. Redman JR, Petroni GR, Saigo PE, Geller NL, Hakes T : Histologic and nuclear grading and stromal reactions as indices for prognosis in ovarian cancer. *Am J Obstet Gynecol* 1986;121:975-807.
24. Mohler JL, Partin AW, Lohr WD, Coffey DS : Nuclear roundness factor measurement for assessment of prognosis of patients with prostatic carcinoma, I. Testing of a digitization system. *J Urol* 1988;139: 1080-1084.