

마우스 피하에 이식시킨 간세포암(SK-HEP1)에 대한 Holmium -166의 효과¹

이연희 · 이종태² · 유형식² · 문영명³ · 김병로⁴ · 박찬일⁵ · 이종두² · 김명진²
 김승철 · 김재승 · 김태훈 · 김상준 · 최영희 · 이영석

목 적 : Holmium-166(Ho-166)은 고 에너지의 베타선(최대 1.85MeV)과 짧은 반감기(26.83 시간)를 가진 동위원소로 유방암세포를 괴사시키는 효과가 증명된 바 있으며 이는 절제가 불가능한 간세포암에 대한 체내 방사선 치료에 이용될 수 있을 것이다. 이 연구의 목적은 동물실험을 통하여 간세포암의 Ho-166으로 인한 괴사의 유무 및 범위와 종양크기에 따른 적절한 주입 용량을 산출하여 Ho-166의 간세포암에 대한 효과를 조직학적으로 증명하고 임상적용 가능성에 관하여 객관적으로 평가하기 위한 것이다.

대상 및 방법 : 71마리의 누드 마우스의 피하에 SK-HEP1세포를 이종이식하여 총 71개의 간세포암이 발생하였으며, 암종의 크기는 모두 2cm미만이였다. 0.5mCi(18.5MBq)에서 3 mCi(111MBq)용량의 Ho-166 용액을 종양에 직접 주사한 후, 감마카메라로 종양내 방사선량을 측정하였고 영상을 촬영하였다. 대조군으로 생리 식염수와 chitosan 용액 0.025ml를 각각 10마리의 누드 마우스의 간세포암에 주입하여 관찰하였다. 간세포암의 괴사 유무를 병리조직학적으로 검색하였고, 영상 분석기로 괴사 범위를 측정하였다.

결 과 : Ho-166을 주입한 모든 예에서 방사선 조사에 의한 종양괴사의 소견을 보였으나 대조군에서는 간세포암의 괴사 현상은 관찰되지 않았다. Ho-166의 주입용량 증가에 비례하여 괴사범위는 증가하였고 이를 근거로 암종의 완전괴사를 얻을 수 있는 Ho-166의 방사능량을 산출할 수 있었다. 감마 카메라 영상과 방사선량 측정 결과 주입한 Ho-166은 종양내에만 집적되었고 종양의 장기에 확산되지 않았으며, 측정된 방사선량계수로서 주입한 Ho-166의 양을 추정할 수 있었다.

결 론 : Ho-166은 강력한 베타 에너지로 간세포암을 방사선으로 괴사시키며, 종양 외의 장기나 조직에 직접 장애나 해리에 의한 부작용이 거의 없어, 간세포암의 새롭고 안전한 체내방사선 치료제로 유용하게 이용할 수 있을 것으로 생각된다.

간세포암의 치료방법 중 체내 방사선치료(internal radiation therapy)는 주위의 정상 조직에 최소의 방사선을 조사하면서 특정 종양에는 세포독성(cytotoxic) 용량의 방사능을 조사하여 괴사시키는 것이다. 특히 고 에너지의 베타 선을 방출하는 동위원소의 연부조직 침투 두께는 평균 2.5mm, 최대 10.3 mm로 종양의 체내 방사선치료를 적합하다. 현재까지 임상적으로 간세포암 치료에 사용되었던 동위원소로는 Iodine-131(I-131)과 Yttrium-90(Y-90)이 있다. Y-90은 순수한 베타선만을 방출하는 동위원소로 간동맥을 통하여 종양내에 주입하는 방법으로 전이성 간종양과 원발성 간세포암에서 치료효과가 보

고되었다(1, 2). I-131은 임파선 조영시 사용되는 유성 조영제인 lipiodol 자체에 함유되어있는 I-127성분을 I-131로 치환시켜 I-131의 베타선 방사능에 의한 암세포 파괴와 lipiodol 자체의 선택적으로 혈관과다의 간암종에 집적되는 기전에 따라 간세포암에 치료효과가 있음을 보고하였다(3, 4). 그러나, 이들 동위원소들은 종양의 혈관 분포에 따라 그 집적 여부가 결정되므로, 혈관의 발달이 부적절한 경우와 동정맥단락(arteriovenous shunt)이 존재하는 경우, 종양에 분포하는 혈관으로의 정확한 도관삽입(catheterization)이 되지않는 경우에는 정상 간조직, 폐, 위장 등 전신 장기에 방사선이 조사되는 심각한 부작용을 일으킬 수 있다.

Holmium-166(Ho-166)은 Holmium-165(Ho-165)의 활성화(activation)에 의해 생성되며, 반감기는 26.83시간으로 짧고, 94%의 베타 선(평균 0.61MeV, 최대 1.766MeV(48%), 1.855MeV(51%))과 6%의 감마선(0.081MeV(6.24%), 1.379

¹ 단국대학교 의과대학 진단방사선과학교실

² 연세대학교 의과대학 진단방사선과학교실

³ 연세대학교 의과대학 내과학교실

⁴ 연세대학교 의과대학 외과학교실

⁵ 연세대학교 의과대학 병리학교실

이 논문은 1997년 6월 2일 접수하여 1997년 10월 6일에 채택되었음.

MeV(0.93%))을 방출하여, Y-90(평균 0.93MeV, 최대 2 MeV)에 상응할 만한 높은 에너지를 가지며, 감마 카메라에서 정량적인 영상을 만들 수 있는 장점이 있다(5). Ho-166의 연부 조직의 투과두께는 1.23mm, 최대 8.4mm로 종양내부에 주입 될 경우 종양내에만 집중적으로 조사되며, 주위의 정상조직에는 거의 영향을 미치지 않으므로 체내 방사선치료의 동물실험에 이용된 바 있다(6). Brown 등(1991)은 유방암세포와 Ho-166의 배양(incubation)실험 결과, DNA(deoxyribonucleic acid) 복제(replication)를 방해하며, 누드마우스에 이종 이식시킨 인간 유방암종(human mammary carcinoma)에 Ho-166을 직접 주사하여, 매우 현저한 암종 크기의 감소를 보고하였다(7). 따라서, 간세포암에서도 이를 국소적으로 주입하면 치료효과와 함께 감마 카메라에 의한 종양의 영상을 얻을 수 있을 것으로 생각되며, 이 동위원소 제재를 임상적으로 간세포암 치료에 이용하기 위해서는 Ho-166에 의한 종양 괴사 유무 및 범위와 종양의 크기에 따른 적절한 주입용량의 산출이 필요하다. 따라서 이 연구의 목적은 동물실험을 통하여 Ho-166을 간세포암에 주사한 후 그 효과를 조직학적으로 증명하고, 감마 카메라에 의한 정량적 영상을 통해 임상적용 가능성에 관하여 객관적으로 평가하는 데 있다.

대상 및 방법

재료

Ho-166-chitosan의 생성

중류수에 용해된 $165\text{-Ho}(\text{NO}_3)_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 을 NaOH에 용해된 NaBH_4 와 반응시키면 Ho-165입자의 대응집(macroaggregates)이 생성되며, 이를 $1 \times 10^3 \text{ n/cm}^2 \cdot \text{sec}$ 의 neutron flux의 원자로에서 활성화시키면 $166\text{-Ho}(\text{NO}_3)_3$ 용액이 된다. Chitosan은 (1-4)-linked, 2 amino-2-deoxy- β -D-glucopyranose로서 다가양이온성(polycationic), 생물분해성(biodegradable), 무독성의 자연 중합체(natural polymer)이다. chitosan용액을 PH 3.0의 용액상태에서 Ho-166과 반응시켜 생성된 Ho-166-chitosan 복합체(complex)를 초음파처리, 원심분리, 미세체처리(microsieving)하였다. 이 결과 생성된 Ho-166-chitosan은 무색의 액체로 1ml에 20mCi의 방사능을 함유하고 있다.

실험동물과 간암세포주

이 연구에 사용된 실험동물은 미국 B & K Universal Inc. 사로부터 수입한 누드 마우스로서 멸균소독된 물과 방사능조사 멸균된 사료로서 급수급식하면서 filter-top cage내에 적절한 온도습도가 조절된 동물실험실내에서 사육하였다.

실험에 사용될 인간 간암세포주는 ATCC(American Type Culture Collection)의 SK-HEP1세포주로서, 이는 간암환자의 복수로부터 배양된 세포주이다. 이 세포주는 56°C 에서 30분간 가열 후 비활성화 되어있는 10% 우태아 혈청(fetal bovine serum; GIBCO, Grand Island, NY, USA)이 함유된 RPMI 1640 배지(GIBCO, Grand Island, NY, U.S.A)와 streptomycin $100 \mu\text{g/ml}$ 을 첨가하여 5% CO_2 의 존재하에 37°C 항온

배양기에서 배양하였다.

방법

간암세포주 SK-HEP1의 이종이식

배양된 SK-HEP1 1×10^7 개의 세포를 누드 마우스의 피하에 직접 주사한 후 10일에서 14일간 사육한 후 간세포암이 피하의 종양으로 발현되어 직경이 1-2cm에 도달하였을때 실험을 하였다.

실험군

SK-HEP1 세포를 이종이식한 누드 마우스를 3군으로 나누었다.

제 1군 : 생리식염수 0.025ml 주입군

제 2군 : chitosan 0.025ml 주입군

제 3군 : Ho-166-chitosan 주입군

3-A 0.25mCi(0.013ml)의 Ho-166-chitosan 주입군

3-B 0.5mCi(0.025ml)의 Ho-166-chitosan 주입군

3-C 1.0mCi(0.05ml)의 Ho-166-chitosan 주입군

3-D 1.5mCi(0.075ml)의 Ho-166-chitosan 주입군

3-E 3.0mCi(0.15ml)의 Ho-166-chitosan 주입군

1, 2, 3군 모두 주사후 1, 3, 7, 11일에 2마리, 14, 17일에 각 1마리씩 도살하였고, 3군에서는 21일에도 1마리를 도살하여 조직표본을 얻었으며, 1, 2군에는 각 10마리, 3군에는 51마리의 누드마우스로 실험하였고, 실험기간중 사망한 경우로 추가한 것을 포함하여 총 83마리가 소요되었다.

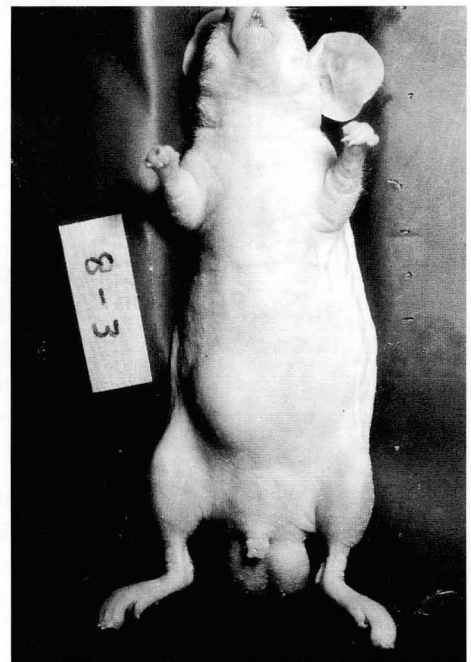


Fig. 1. Photogram of a mouse showing a 1.8cm sized hepatoma as a subcutaneous nodule 10 days after injection of 1×10^7 SK-HEP1 cells.

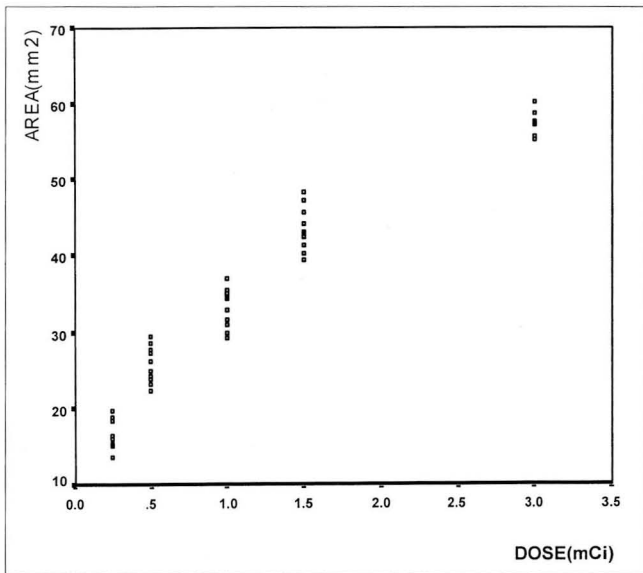


Fig. 2. Results of necrotic area of hepatocellular carcinoma according to the dosage of Ho-166 injected. As the dosage of Ho-166 increases, the necrotic area of hepatocellular carcinoma increases.

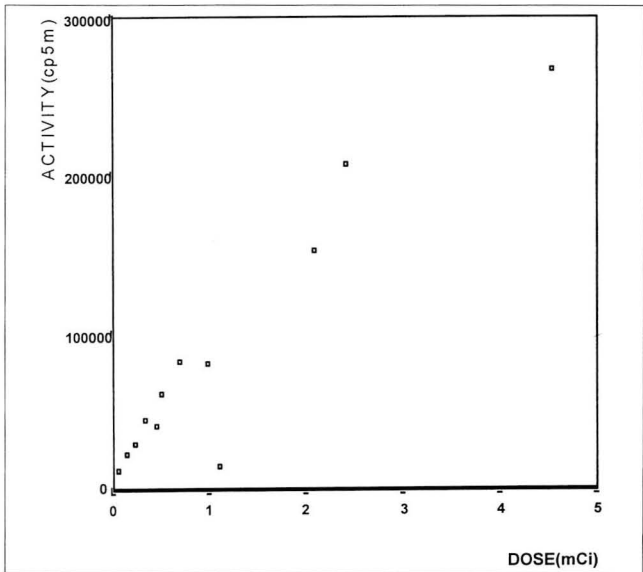


Fig. 3. Results of radioactivity measured according to the dosage of Ho-166 in gamma camera. As the dosage of Ho-166 increases, the radioactivity measured by gamma camera increases and is well correlated (correlation coefficient 0.94) with each other.

Ho-166-chitosan의 주입방법

Ho-166-chitosan을 각 용량에 맞도록 주사기에 넣은 후, 간세포암의 중심부위에 직접 손으로 주사하였다. 대조군으로, 생리식염수와 chitosan을 각각 0.025ml를 간세포암의 중심부에 동일한 방법으로 주사하였다.

감마 카메라에 의한 방사선량 계수 측정 및 영상

각기 용량이 다른 3군의 누드 마우스 각 1마리씩 모두 5마리

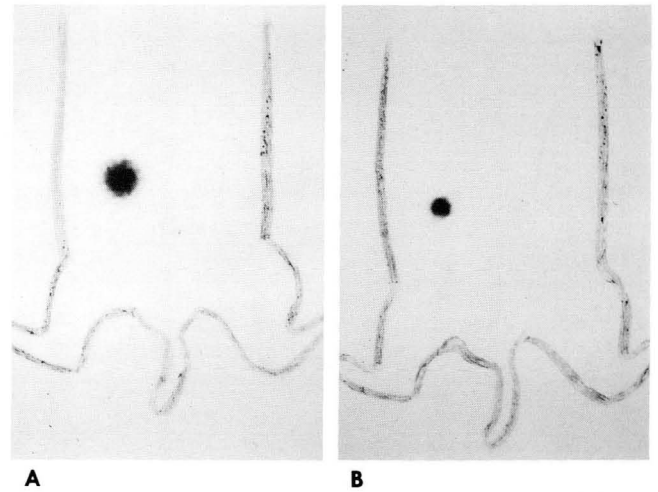


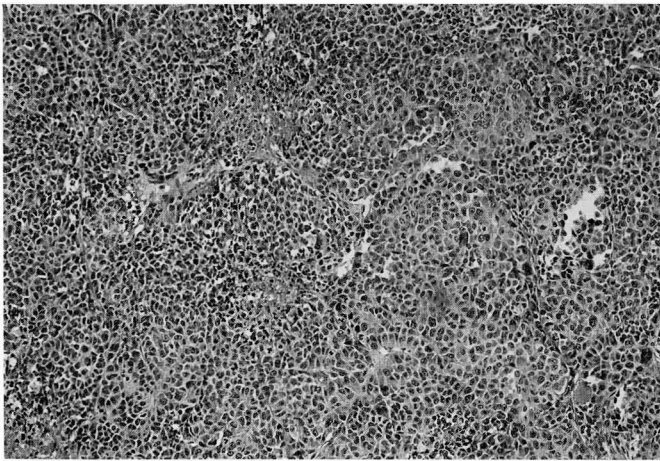
Fig. 4. Gamma camera images obtained at the first(A) and third day(B) after injection of 1.0mCi of Ho-166 on hepatoma nodule in right abdominal wall of nude mouse. Increased activity is clearly noted at injection site without diffusion throughout the body(A). The radioactivity became faint after 3 days(B).

는 1일, 3일, 7일 도살 직후에 감마 카메라(Prism 2000, Picker, U.S.A.)를 이용하여 누드 마우스와 5cm의 거리를 두고 5분간 방사선량을 측정하고 영상화하였다.

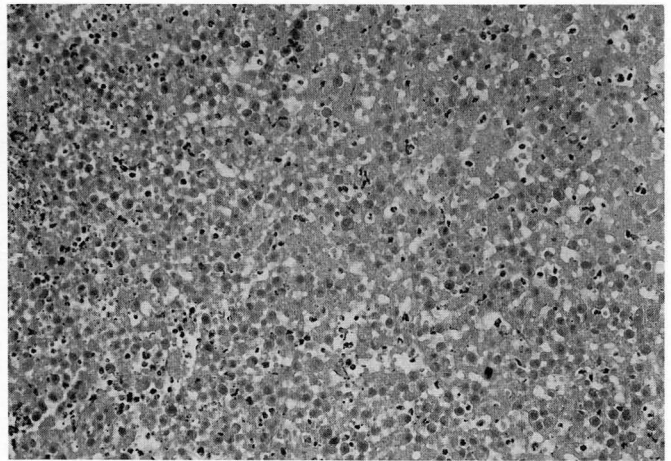
4.55mCi, 2.09mCi, 0.98mCi, 0.45mCi의 용량으로 검량기 (dose calibrator)에서 측정한 Ho-166을 감마 카메라를 이용하여 상기와 동일한 조건으로 5cm의 거리를 두고 5분간 방사선량을 측정하고 이를 1일, 3일이 지난 후 반복 측정하여, 이를 근거로 Ho-166의 용량과 방사선량계수 사이의 상관관계를 회귀분석하여, 방사선량계수를 Ho-166의 용량으로 환산하였다.

병리조직학적 검색

각기 다른 용량의 Ho-166을 주사한 누드 마우스는 1, 3, 7, 11, 14, 17, 21일에 각각 도살하여 간세포암 조직표본을 얻어, 시간에 따른 괴사 면적의 차이가 있는지와 시간에 따른 병리조직학적인 차이점이 있는지를 분석하였다. 즉, 각각의 시기에 도살된 동물의 간세포암 조직은 가장 큰 단면을 얻도록 절편하여, Hematoxyline-Eosine(H & E) 염색한 후 광학 현미경하에서 영상분석기(image analyzer: CAS 200, Becton-Dickenson, U.S.A.)의 micrometer 프로그램을 이용하여 괴사된 세포 면적을 손으로 직접 그려 측정하였다. 각각 3번을 측정한 후 평균값을 얻었으며, 주입한 Ho-166의 용량과 괴사면적과의 상관관계를 회귀분석하였다. 주입한 Ho-166의 방사능 양에 따른 괴사 세포 면적의 변화 및 주입후 경과한 시간에 따른 괴사 면적의 변화를 비교분석하였고, 최장 21일 동안의 시간 변화에 따른 종양괴사 및 주위조직의 병리조직학적 소견을 관찰하였다.

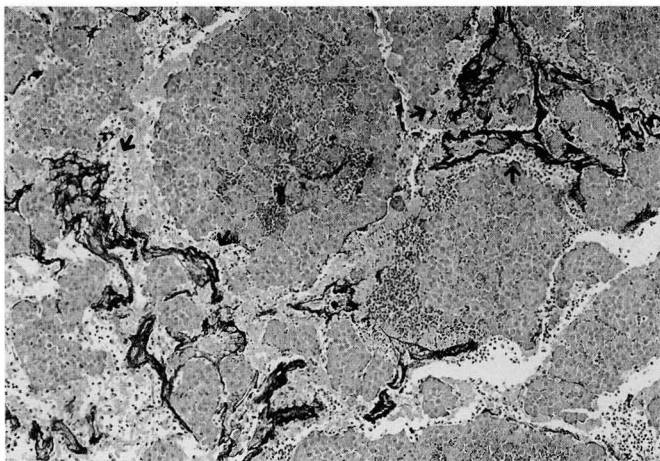


A

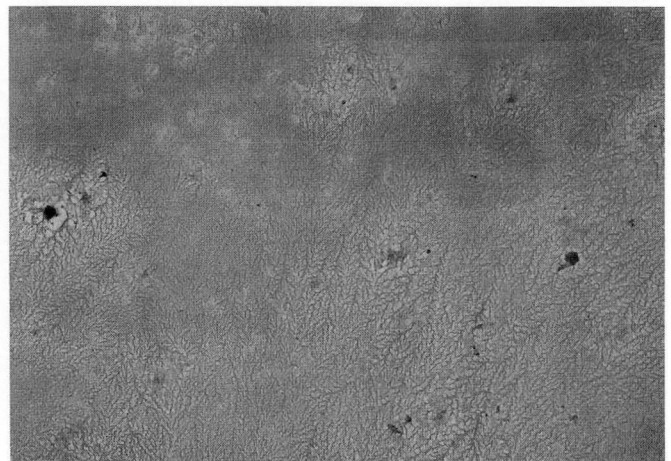


B

Fig. 5. Microphotograph of hepatoma after injection of 0.025ml of normal saline(A) and 1.0mCi of Ho-166(B) on nude mice (H & E stain, $\times 4$). There was no evidence of cell death in saline injected hepatoma specimen(A). Ho-166 injected hepatoma showed central coagulation necrosis(B).



A



B

Fig. 6. Microphotograph of Ho-166-chitosan in injected hepatoma specimen(A) and direct slide smear(B)(H & E stain $\times 4$). In hepatoma specimen, violet colored multiple thread-like material(arrows) is noted and this may represent injected Ho-166-chitosan(A). No definite staining materials were seen in direct slide smear(B).

결 과

실험 동물의 관찰

누드 마우스에 SK-HEP1 간암세포를 주사 한 후 10일에서 14일 후에 1-2cm의 지름을 가진 피하조직의 종괴가 관찰되었다(Fig. 1). 3-E군의 1예에서 3일 후 종양의 완전 괴사 및 피부 괴사의 소견을 볼 수 있었으나, 나머지 3군과 1, 2군 모두에서 시간의 경과에 따른 종양 크기의 변화는 없었다.

Ho-166의 용량에 따른 간세포암의 괴사 면적의 변화

Ho-166의 용량을 0.25mCi, 0.5mCi, 1.0mCi, 1.5mCi, 3.0 mCi로 점차 늘려 주사한 후 시간과 용량에 따른 간세포암의 괴사 면적을 측정 한 결과, Ho-166의 용량이 0.25mCi일 때의 평균 괴사면적은 $16.81 \pm 1.90\text{mm}^2$, 0.5mCi인 경우는 $26.26 \pm$

2.36mm^2 , 1.0mCi는 $33.70 \pm 2.86\text{mm}^2$, 1.5mCi는 $44.03 \pm 3.01\text{mm}^2$, 3.0mCi는 $57.55 \pm 1.68\text{mm}^2$ 로, 용량이 증가함에 따라 괴사면적도 증가하는 소견을 보였다(Fig. 2). 이를 회귀분석 하여 본 결과

$$N = 14.62 \times D + 17.64$$

N(Necrosis) : 간세포암의 괴사면적(mm^2)

D(Dosage) : 주사한 Ho-166의 용량(mCi)

이라는 공식이 산출되었으며(상관계수 0.95), 이를 임상에 적용하기 편리한 직경으로 환산하기 위해, 괴사된 면적을 원이라 가정 한 후 회귀분석 한 결과,

$$R = 0.69 \times D + 2.45$$

R(Radius) : 종양의 반경(mm)

D(Dosage) : 주입한 Ho-166의 용량(mCi)

의 공식이 산출되었으며, 직선적인 상관관계를 보였다.

$$\text{이는 } D = (R - 2.45) / 0.69$$

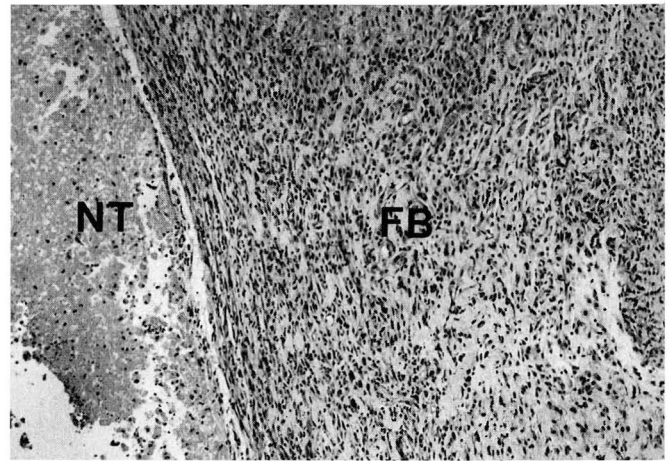
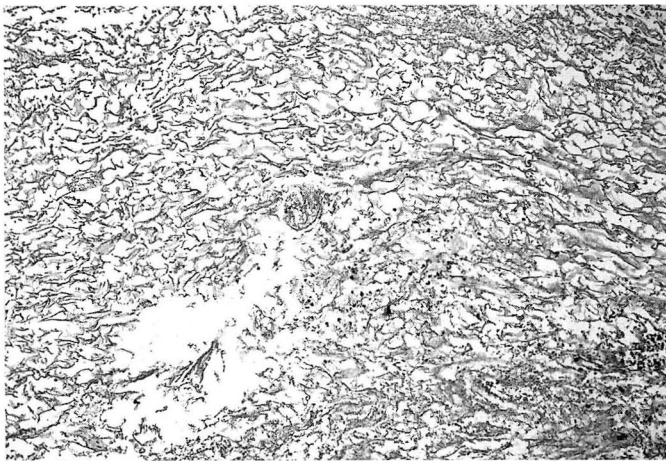


Fig. 7. Microphotograph of central cell necrosis(A) and peritumoral fibrosis(B) of hepatoma at 14 days after injection of 1.0mCi Ho-166(H&E stain, X4). At 14 days after injection of Ho-166, necrotic cells lose their configurations(A). Many inflammatory cell infiltration and fibroblasts proliferations(FB) are noted around the necrotic tumor(NT)(B).

의 공식으로 전환 할 수 있으며, 이를 이용하면 전산화 단층촬영이나 초음파로 쉽게 측정 할 수 있는 직경에 따라 종양을 완전 괴사시킬 수 있는 Ho-166의 양을 구할 수 있다. 따라서 임상적으로 1cm의 직경을 가진 종양의 경우는 3.70mCi, 2cm의 경우 10.94mCi, 3cm는 18.19mCi, 4cm는 25.41mCi, 5cm는 32.68mCi, 6cm는 40.00mCi, 7cm는 47.17mCi, 8cm는 54.42mCi, 9cm는 61.67mCi의 Ho-166을 종양내에 주입하면 간세포암은 완전 괴사될 것으로 기대된다.

감마 카메라로 측정된 방사선량 계수 및 영상

검량기에서 측정된 Ho-166의 용량에 따른 방사선량 계수의 측정결과는 4.55mCi 일 때 267,649 counts/5minutes(이하 cp5m), 2.43mCi는 207,997 cp5m, 2.09mCi는 152,813 cp5m, 1.12mCi는 115,367 cp5m, 0.98 mCi는 80,575 cp5m, 0.70mCi는 82,554 cp5m, 0.52mCi는 61,892 cp5m, 0.45mCi는 41,259 cp5m, 0.33mCi는 45,802 cp5m, 0.24mCi는 30,408 cp5m, 0.15mCi는 24,134 cp5m, 0.07mCi는 12,802 cp5m의 결과를 얻었으며, 이를 회귀분석한 결과 높은 상관관계를 보였으며(상관계수 0.94), 다음과 같은 공식을 산출하였다(Fig. 3).

$$y = 58801.2x + 26928.6$$

y: 감마 카메라로 측정된 방사선량계수(counts/5 minutes)

x: Ho-166의 용량(mCi)

이를 이용하여 감마 카메라로 측정된 방사선량 계수를 Ho-166의 용량으로 환산한 결과는 50,000 cp5m 일 때 0.39mCi, 100,000 cp5m는 1.24mCi, 150,000 cp5m 일 때 2.09mCi, 200,000 cp5m 일 때 2.94mCi였다.

또한 누드 마우스에 Ho-166을 주입한 후 1일과 3일에 측정된 방사선량계수와 상기의 공식에 의거하여 계산한 방사선량은 Ho-166 주입후 1일째 방사선량 계수는 3.0mCi 일 때, 실측치 143,100 cp5m, 예측치 122,186 cp5m, 1.5mCi 일 때, 실측치 72,988 cp5m, 예측치 74,557 cp5m, 1.0mCi 일 때, 실측치

59,592 cp5m, 예측치 58,681 cp5m, 0.5mCi 일 때, 실측치 38,990 cp5m, 예측치 42,804 cp5m, 0.25mCi일 때, 실측치 37,216cp5m, 예측치 35,160 cp5m, 3일째 방사선량 계수는 3.0mCi 일 때, 실측치 62,065 cp5m, 예측치 54,565 cp5m, 1.5mCi 일 때, 실측치 43,748 cp5m, 예측치 41,040 cp5m, 1.0mCi 일 때, 실측치 37,200 cp5m, 예측치 36,336 cp5m, 0.5mCi 일 때, 실측치 33,270 cp5m, 예측치 29,280 cp5m로, 예측치와 실측치 사이에 커다란 차이가 없었다.

감마 카메라로 누드 마우스의 영상을 얻은 결과 주입한 Ho-166은 주입한 종양 내에만 방사능 집적을 보였으며, 주위 조직이나 폐, 골수등 전신으로의 확산 소견은 없었다. 종양내 방사선 집적은 주입후 1일에 가장 뚜렷하였으며, 3일 후에는 급격히 떨어졌으며, 7일 후에는 거의 측정되지 않았다(Fig. 4).

병리조직학적 소견

누드 마우스의 피하에 위치한 간세포암의 H-E 염색 소견은 혈관이 풍부한 악성종양의 소견을 보이고 있었으며, 종양 주변에는 다수의 염증세포 침윤이 관찰되었고, 이는 종양 내부에도 관찰되었다.

생리 식염수와 chitosan을 주입한 군에서는 종양 내에 괴사 소견이 없었으나, 역시 많은 염증세포들의 침윤이 관찰되었다(Fig. 5A).

심한 괴사의 소견을 보인 Ho-166-chitosan주입군에서는 종양의 중심에 세포의 형태는 유지되고 있으나, 염색성이 떨어지며 세포핵이 관찰되지 않는 응괴괴사된 세포들로 가득차 있었으며, 괴사된 종양 세포들은 띠(cord)모양의 배열을 하고 있었다(Fig. 5B). 이러한 괴사된 세포들 사이 사이에는 보라색으로 염색되는 비정형화된 물질들이 관찰되며, 이는 Ho-166-chitosan자체 혹은 이에 대한 세포의 반응물질이라 생각되나, 그 성분은 정확히 알 수 없었다(Fig. 6A). Ho-166-chitosan을 직접 슬라이드에 도말하여 H & E 염색한 결과는 조직표본에서와는 달리 아무것도 관찰되지 않았다(Fig. 6B). 괴사된 종양

과 주변부에 남아있는 종양과의 사이에는 분홍색으로 염색되는 부종 소견의 띠가 둘러싸는 것이 일부에서 관찰되었다. 종양의 전체가 괴사되어 생존가능한 종양세포를 찾아볼 수 없는 경우도 있었으며, 주위의 피하조직과 피부표면까지 괴사 및 괴양이 일어난 경우가 3mCi의 Ho-166-chitosan을 주입한 1예에서 관찰되었다.

시간이 지남에 따라 괴사된 세포는 점차 그 형태를 잃어 Ho-166-chitosan 주입 11일 후에는 세포의 형태를 찾아볼 수 없게 되고, 괴사된 종양의 주변조직에는 결합조직형성세포와 헤모시테린을 함유한 대식세포의 출현과 함께 섬유화가 진행되었다(Fig. 7).

고 찰

체내 방사선 치료는 종양 주위의 정상 조직에는 조사량을 최소화하고 특정한 종양에 세포독성용량의 방사선을 집중 조사하여 악성종양을 괴사시키는 치료법이다. 이 치료방법은 간동맥에 의해 풍부한 혈관공급을 받고 있는 종양에 도관 근접이 비교적 쉬운 간세포암의 경우 매우 유용하게 사용할 수 있는 치료법이라 생각되며, 사용되고 있는 동위원소로는 I-131, Y-90, Rhenium-186, Phosphorus-32(P-32) 등이 있다. I-131-lipiodol의 경우는 lipiodol이 간종양에 선택적으로 장기간 섭취되는 특성을 이용한 것으로, 방사능에 의한 간세포암 괴사를 일으켜 치료 효과를 보고 있으나, 반감기가 길어(8일) 최장 32일까지도 간조직에 그 방사능이 검출되어, 주위 정상조직으로의 불필요한 조사 및 시술자와 간호자가 받는 피폭이 단점이었다(3). Y-90, Re-186, Ho-166의 공통된 특징은 짧은 반감기를 가지고 고 에너지의 베타 선을 방출하며, 안정된 산물(daughter product)로 붕괴한다는 점이다(8, 9).

Ho-166은 순수한 베타선만 방출하는 Y-90과 비교하여 단면적이 더욱 넓어 쉽게 활성화되며, 소량의 감마선을 방출하므로, 감마 카메라를 이용한 영상과 방사선량을 정량적으로 측정할 수 있는 장점이 있다. Ho-166-microsphere의 생체외 분석과 생체내에서의 생리분포(biodistribution)에 대한 실험 결과, 토끼의 간문맥을 통한 Ho-166-microsphere의 주입후 조직표본 검사상 최장 6일까지 microsphere의 94.5%가 간조직에 남아 있는 것을 관찰하였고, 간의 장기 특히 폐, 신장 및 연부조직에서 검출되지 않아 간종양 치료에 적합할 것으로 생각된다(5). Ho-166은 Y-90과 같이 glass microsphere나 poly(L-lactic acid) microsphere형태로 실험하기도 하였으나(6, 7), 이 연구에서는 Ho-166-chitosan 복합체로 실험하였다. Chitosan물질은 (1-4)-linked, 2 amino-2-deoxy- β -D-glucopyranose 로서 다가양이온성(polycationic), 생물분해성(biodegradable), 무독성의 자연 중합체(natural polymer)로서 항응고성이 있으며, 상처치유를 촉진시키고, 치유의 초기에 섬유모세포를 창상 주변에 모이게 하며, 항바이러스성 효과가 있고, 인간 단핵세포(monocyte)로부터 종양괴사인자(TNF: tumor necrosis factor)를 합성하도록 유도하는 것으로 알려져 있다(10).

Ho-166을 악성 종양의 치료에 이용한 예로서는 Brown등

(1991)이 유방암 세포에서 Ho-166이 DNA복제를 방해하여 종양의 크기를 감소시키고 자가방사기록법(autoradiography)에 의하여 주변 0.7mm까지의 암세포 괴사를 관찰하였다고 보고하였다. 이 연구에서는 누드 마우스의 간세포암에 Ho-166-chitosan을 주입하여 용량에 따른 방사선 흡수량을 Wollner 등(1988)의 베타선에 의한 흡수선량 공식, 흡수선량(rad) = $73.8 \times \text{Teff} \times C \times E$ (73.8: conversion factor, Teff: 반감기(26.83시간), C: Ho-166의 $\mu\text{Ci/g}$, E: Ho-166의 평균 베타 에너지(0.61MeV))에 의하여 산출하여(11), 18.5MBq(0.5mCi) 일 때 252Gy, 37MBq(1.0mCi)에서 504Gy, 및 55.5MBq(1.5mCi)이면 765.3Gy로 소량의 Ho-166으로 현저히 많은 양의 방사선이 조사되었음을 알 수 있었고 충분한 종양괴사 효과를 기대할 수 있었다. 이를 근거로 Ho-166 주입 용량과 완전 괴사를 일으킬 수 있는 종양의 면적을 산출할 수 있었으며, 직경이 1cm인 종양에서 136.9MBq(3.70mCi), 2cm이면 404.78MBq(10.94mCi), 3cm 종양이면 940.17MBq(25.41mCi)의 용량이면 완전 괴사를 일으킬 수 있다고 생각된다. 베타 선의 침투깊이가 평균 1.23mm이며, Ho-166-chitosan의 치료영역이 반경 1mm 이내로 보고된 바 있으므로(7), 주위의 간종양에 조사되는 방사선량이 일정하도록 하기 위해서, 종양의 중앙에 용량의 반을 주사하고 그 주변부위로 되도록 일정한 비율로 주사하려 노력하였고, Ho-166-chitosan이 점도가 낮은 액체상태라는 점, Ho-166-chitosan을 주입한 군의 조직 검사상 3mCi를 주사하여 피부까지 괴사된 1예를 제외하고는 모두 종양내에만 괴사 소견이 국한되어 있는 점등으로 미루어, 괴사 면적을 분석하는데 큰 오차를 일으키지 않는다고 생각하였으며, 종양내에 주입한 Ho-166-chitosan이 골고루 분포된다는 가정하에 산출한 것이다. 한편 종양괴사는 전 예에서, 실험 결과 주입 후 1일째부터 급격히 초래되었으며 Ho-166의 용량이 증가할수록 괴사면적이 증가하여, 용량과 면적과는 밀접한 상관관계가 있었다(상관계수 0.95). 괴사면적은 시간의 경과에도 큰 변화는 없어 Ho-166의 방사선 효과는 짧은 시간 동안 강한 베타 에너지에 대한 종양의 급격한 조직반응으로 설명할 수 있겠다. 이러한 현상은 Tian 등(1996)이 Y-90-microsphere를 간세포암에 직접 주사하여 종양괴사에 의한 종양 크기 감소가 90.6%에서 있었다고 보고한 것과 비교하여 Y-90과 Ho-166의 방사선 괴사 효과가 동일할 것으로 사료된다(12). 따라서 간세포암의 치료 시에는 이 논문의 결과로 얻은 간세포암의 크기에 따른 Ho-166-chitosan의 치료용량을 지표로 삼을 수 있을 것이다.

이 연구의 결과, 대조군으로 생리식염수와 chitosan을 주입한 종양에서는 괴사 소견이 관찰되지 않았으므로, 종양의 괴사 효과는 모두 강력한 Ho-166의 방사선괴사로 생각된다. 그러나, chitosan을 0.025ml로 매우 소량 주입하였고, SK-HEP1 간세포암만을 대상으로 하였으므로, 다량의 chitosan을 주입할 경우, 종양괴사인자의 합성을 유도하여 암종의 괴사를 유발시키거나, 함께 주입한 동위원소의 괴사효과를 더욱 상승시킬 가능성을 완전히 배제할 수 없으므로, 향후 다량의 chitosan의 암종에 대한 치료효과는 연구가 계속 필요할 것으로 생각된다.

I-131-lipiodol은 lipiodol이 방사선에 비투과성이므로 도관

삽입 후 시술하는 동안 투시화면을 통해, 단순복부촬영이나 복부전산화단층촬영에서 종양내 집적을 쉽게 알 수 있으며, 폐나 위장등 장기로의 주입여부도 알 수 있다. Y-90의 경우는 주입 전에 이와 유사한 Tc-99m-MAA (Technitium-99m-macroaggregated albumin)를 이용한 스캔으로 간접적으로 체내에서의 분포, 특히 동정맥 단락여부를 사전에 관찰하는 방법이 있으나, 주입한 Y-90 용량의 정량적인 정보는 주지 못한다. 이 연구에서는 Ho-166의 감마선을 방출하는 특성을 이용하여 감마카메라로 영상을 찍고 방사선량을 측정하여, 주입 위치와 그 용량을 알 수 있었다. Ho-166을 각기 다른 용량으로 5분간 감마 카메라로 방사선량 계수를 측정하여, Ho-166용량과 방사선량계수 사이에는 밀접한 관계가 있음을 알 수 있었고(상관계수 0.94), 이를 역으로 환산하여, 감마 카메라의 방사선량계수에 의해 종양에 주입한 Ho-166의 용량을 산출할 수 있게 되었다. 따라서 5분간 측정된 방사선량계수(counts/5minutes)가 50,000인 경우 14.43MBq(0.39 mCi), 100,000인 경우 45.88MBq(1.24 mCi), 150,000인 경우 77.33MBq(2.09 mCi)의 Ho-166 용량이 주입되었음을 알 수 있으므로, 주입용량의 확인과 반복치료의 필요성에 대한 정보를 얻을 수 있을 것으로 생각된다.

동위원소의 치료에 의한 부작용으로는 합성 물질과의 해리로 방사능이 주입한 곳에 머무르지 않고 다른 장기에 확산되어 생기는 경우와 과도한 양을 주입하여 발생하는 경우로 크게 구분되며(11, 13), 이의 발생 빈도는 주입 방법에 따라 차이가 있다. 뇌의 낭성종양에 사용되는 P(chromic phosphate)-32는 복강내 주입 후 혈액과 골수에 소량의 방사선량이 발견되었으며(14), 골수의 파괴로 인한 빈혈, 백혈구 감소증, 혈소판 감소증 등의 합병증이 예상된다고 하였으나, 낭성종양 안으로 주입할 때에는 전신으로의 확산 소견이 없다고 보고하였다(15). Y-90-microsphere는 15-30 μ m의 크기로, 간동맥 주입 후에는 종양의 모세혈관에 걸려 빠져나가지 못하므로 종양 내부에 충분한 양의 방사선을 조사할 수 있다고 하였으나, 동정맥 단락이 있는 경우는 주입한 방사선이 이를 통해 폐로 흘러들어가 심각한 폐섬유화를 일으킬 수 있으므로 주입 전에 Tc-99m-MAA 스캔을 통하여 동정맥 단락의 유무를 확인하여야 한다(8). Y-90-microsphere를 간동맥에 직접 주입한 후 조직검사상 십이지장과 췌장에서 microsphere가 발견되었다는 보고도 있다(11). Ho-166-PLA(poly-lactic acid)-microsphere를 이용한 연구 결과 약 5.5%가 해리되어 그 중 76.9%가 신장을 통해 배설되고, 나머지는 장관, 골수, 비장에 그 방사선량이 관찰되었으므로, 해리에 의한 부작용이 예상되었다(5). 직접 주입의 경우는 해리에 의한 부작용이 문제가 될 것이며, Y-90-microsphere를 직접 간세포암에 주사한 결과, 양폐야, 특히 좌폐에 소량의 방사선 집적 소견을 보여 해리에 의한 폐섬유화의 우려를 보고하였다(12). 그러나 Ho-166-chitosan은 직접 주사한 간세포암 외에는 어느 곳에서도 방사능 집적이 전혀 나타나지 않아, 해리에 의한 부작용이 없는 매우 안전한 방사성 동위원소임을 알 수 있었다.

Y-90을 주입하여 실험한 개의 간조직표본에서는 간문맥주위의 혈관에 미세경색(microinfarct), 문맥의 만성 염증성 섬유

화의 소견을 나타내며, 작은 혈관내에 microsphere가 결정체로 관찰된다(11). I-131-lipiodol의 경우는 lipiodol로 추정되는 물질들이 간암 신생 혈관 내 및 sinusoid, 간암세포 내에서 발견되어, 간암세포의 방사선 조사 및 미세혈관 색전효과가 있을 것으로 생각하고 있다(4, 16). 위의 동위원소들은 모두 조직표본상 microsphere와 lipiodol을 직접 관찰할 수 있으나, chitosan은 염색성이 없고 결정체도 아니므로, 조직학소견에서는 관찰할 수 없을 것으로 생각되었고, 본 연구결과도 Ho-166-chitosan염색을 슬라이드에 직접 도말하여 H & E 염색한 결과 관찰되는 것이 없었다. 그러나 chitosan을 주입한 누드 마우스의 간종양 표본 전 예에서 비정형화 된, 보라색으로 진하게 염색되는 실뭉치 모양의 물질들을 관찰할 수 있었으며, 도말 염색표본에서는 이런 물질이 전혀 관찰되지 않는 것으로 미루어, 이 물질이 chitosan 자체라기 보다는 chitosan에 대한 세포의 반응물질 혹은 chitosan이 체내에서 변화된 물질이라는 추정을 할 수 있겠다. 그러나, 그 물질의 본질과는 무관하게 이러한 조직학적인 소견을 보이는 곳은 chitosan이 주입된 곳이라는 것을 확실히 알 수 있는 지표가 된다하겠다.

Chitosan 단독 투여군 및 Ho-166-chitosan 주입군 조직표본의 H & E 염색소견상 종양 주변 조직과 종양 내부에 심한 염증세포의 침윤을 관찰할 수 있었다. 이는 세포독성 대식세포(cytotoxic macrophage)를 유도하고 T 임파구의 기능을 활성화시키는 chitosan의 성질에 의해 염증세포가 유입되었을 것으로 생각되며, 14일 후부터 관찰되는 섬유모세포 및 결합조직형성세포의 출현 및 섬유화도 이러한 chitosan의 특성 중 하나로 생각된다(10). 특히 완전 괴사된 조직 주위를 둘러싸는 섬유화는 임상적으로 의의가 있다. 간암 환자의 치료 후 추적 검사중 종양의 크기 변화와 재발 여부를 알아보기 위해 시행하는 복부 단층촬영상, Ho-166-chitosan의 주입 후 14일부터는 섬유성 조직에 의한 종양주변부의 환상의 조영증강소견이 조영증강되지 않는 중심부의 괴사된 종양과 대비되어 나타날 수 있을 것이다. 이때, 환상의 조영증강이 괴사되지 않고 남아있는 종양 세포에 의한 조영증강 소견에 의한 것이 아니라, 종양의 완전 괴사 후의 주변조직 섬유화에 의한 것일 수 있다는 것을 시사하는 소견으로 이는 임상에서 환자의 예후와 반복 치료를 결정하는 데 중요한 소견이다.

Brown 등(1991)은 인간의 유방암을 누드 마우스에 이종이식시킨 후 20 μ Ci의 Ho-166-glass fiber를 주입한 12일 후, 종양의 성장이 억제되거나 종양의 크기가 감소한다는 보고를 한 바 있다(7). 이 연구에서는 최장 21일 간 추적하였으나, 유사한 세포 괴사의 소견을 보일 뿐 종괴 자체의 크기의 감소는 관찰되지 않았다. 이것은 실험한 종양이 유방암이 아닌 간세포암으로 치료에 대한 반응이 다를 수 있다는 점과, Brown 등이 20 μ Ci의 소량으로 치료효과를 본 것으로 미루어 매우 작은 종양이었을 것으로 판단되는 점으로 미루어, 좀 더 일찍 종괴 크기 감소의 효과를 볼 수 있었을 것이라는 추정을 할 수 있겠다. 이 연구에서도 세포 괴사의 주변부에서는 종양의 재발을 시사하는 소견도 없었고, 괴사된 세포는 점차 그 형태를 잃어가는 것을 관찰하였으므로, 추후에는 좀더 오랜 기간동안의 추적 검사를 통해

종양 크기의 감소를 확인 할 수 있는 연구가 뒤따라야 할 것으로 생각된다.

이 연구의 결과를 통하여, Ho-166-chitosan은 종양외의 장기에 해리에 의한 방사선 집적이 없으므로, 부작용의 가능성이 없는 안전한 동위원소임을 알 수 있었을 뿐 아니라, 감마 카메라를 이용하여 주입한 Ho-166의 용량을 간접적으로 추정 할 수 있는 자료를 얻었다. Ho-166의 강력한 베타 에너지가 간세포암을 괴사시킴을 증명하였고, 임상적용에 필수적인 종양 크기에 따라 완전괴사를 일으키는 Ho-166의 치료용량을 산출하였으므로 간암종 환자의 체내 방사선 치료에 적용할 수 있을 것으로 기대된다. 앞으로 Ho-166-chitosan을 주입한 표본에서 관찰되는 보라색으로 염색되는 비정형화된 물질의 성분에 대한 분석에 대한 연구와 직접 주입법이 아닌 간동맥도관을 이용한 색전법을 통한 간암종의 효과에 대한 연구가 계속되어야 할 것으로 생각된다.

참 고 문 헌

1. Mantravadi RVP, Spigos DG, Tan WS, Felix EL. Intraarterial Yttrium 90 in the treatment of hepatic malignancy. *Radiology* 1982;142:783-786
2. Herba MJ, Illescas FF, Thirlwell MP, et al. Hepatic malignancies: improved treatment with intraarterial Y-90. *Radiology* 1988;169:311-314
3. 유형식, 이종태, 김기환 등. I-131-Lipiodol의 간동맥 주입에 의한 원발성 간암치료의 기초 및 임상적 연구. *대한방사선의학회지* 1988;24:288-299
4. Yoo HS, Lee JT, Kim KW, et al. Nodular hepatocellular carcinoma treatment with subsegmental intraarterial injection of I-131-labeled iodized oil. *Cancer* 1991;68:1878-1884
5. Mumper RJ, Ryo UY, Jay M. Neutron-activated Holmium-166-poly(L-lactic acid) microspheres: a potential agent for the internal radiation therapy of hepatic tumors. *J Nucl Med* 1991;32:2139-2143
6. Turner JH, Claringbold PG, Klemp PFB, et al. Ho-166-microsphere liver radiotherapy: a preclinical SPECT dosimetry study in the pig. *Nucl Med Commun* 1994;15:545-553
7. Brown RF, Lindesith LC, Day DE. ¹⁶⁶Holmium-containing glass for internal radiotherapy of tumors. *International Journal of Radiation Applications & Instrumentation - Part B. Nucl Med Biol* 1991;18:783-790
8. Ehrhardt GJ, Day DE. Therapeutic use of ⁹⁰Y microspheres. *Nucl Med Biol* 1987;14:233-242
9. Houle S, Yip TK, Shepherd FA, et al. Hepatocellular carcinoma: pilot trial of treatment with Y-90 microspheres. *Radiology* 1989;172:857-860
10. Otterlei M, Varum KM, Ryan L, Espevil T. Characterization of binding and TNF- α -inducing ability of chitosans on monocytes: the involvement of CD14. *Vaccine* 1993;12:825-832
11. Wollner I, Conrad K, Smith P, et al. Effects of hepatic arterial yttrium 90 glass microspheres in dogs. *Cancer* 1988;61:1336-1344
12. Tian JH, Xu BX, Zhang JM, Dong BW, Liang P, Wang XD. Ultrasound-guided internal radiotherapy using Yttrium-90-glass microspheres for liver malignancies. *J Nucl Med* 1996;37:958-963
13. Bayouth JE, Macey DJ, Boyer AL, Champlin RE. Radiation dose distribution within the bone marrow of patients receiving holmium - 166 - labeled - phosphonate for marrow ablation. *Med Phy* 1995;22:743-753
14. Boye E, Lindegaard MW, Paus E, Skretting A, Davy M, Jakobsen E. Whole-body distribution of radioactivity after intraperitoneal administration of P32 colloid. *Br J Radiol* 1984;57:395-402
15. Taasan V, Shapiro B, Taren JA, et al. Phosphorus-32 therapy of cystic grade IV astrocytomas: technique and preliminary application. *J Nucl Med* 1985;26:1335-1338
16. Park CI, Choi SI, Kim HG, Yoo HS, Lee YB. Distribution of lipiodol in hepatocellular carcinoma. *Liver* 1990;10:72-78

Effect of Holmium-166 Injection into Hepatocellular Carcinomas (SK-HEP1) Heterotransplanted in Mice¹

Yeon Hee Lee, M.D., Jong Tae Lee, M.D.², Hyung Sik Yoo, M.D.², Yung Myung Moon, M.D.³,
Byong Ro Kim, M.D.⁴, Chan Il Park, M.D.⁵, Jong Doo Lee, M.D.², Myeong Jin Kim, M.D.²,
Seung Cheol Kim, M.D., Jae Seung Kim, M.D., Tae Hoon Kim, M.D.,
Sang Joon Kim, M.D., Young Hi Choi, M.D., Young Seok Lee, M.D.

¹Department of Diagnostic Radiology, College of Medicine, Dankook University

²Department of Diagnostic Radiology, College of Medicine, Yonsei University

³Department of Internal Medicine, College of Medicine, Yonsei University

⁴Department of General Surgery, College of Medicine, Yonsei University

⁵Department of Pathology, College of Medicine, Yonsei University

Purpose: Holmium-166 (Ho-166) is a potent beta-emitter with a short half-life (26.83 hours) and high beta energy (1.85 MeV), and its necrotic effect on breast carcinoma has been proved. In cases of hepatocellular carcinoma, Ho-166 can therefore be used for internal radiation therapy. The purpose of this study is to evaluate the therapeutic effect of Ho-166 on hepatocellular carcinomas and to estimate the required dosage, according to their size.

Materials and Methods: Tumor cells of hepatocellular carcinomas (SK-HEP1) were subcutaneously heterotransplanted into 71 nude mice. The tumors were grown. Ho-166 was directly injected into the tumors at dosages of between 0.5 mCi (18.5 MBq) and 3.0 mCi (111 MBq). After injection, the tumor size was measured. Tumor uptake and radioactivity were measured by gamma camera scan. The results were compared with a control group of 20 mice were injected with 0.025 ml of normal saline. Pathologic examination was performed and the necrotic tumor size was measured by image analyzer.

Results: All specimens of Ho-166 injected tumors showed coagulation necrosis consistent with radiation effect, which was more pronounced as the injected dosage of Ho-166 was increased. The necrotic tumor size was measured by image analyzer. As the injected dosage of Ho-166 was increased, the total necrosis was calculated according to the image analyzer. The gamma camera scan showed that injected Ho-166 had accumulated within the tumors. The required dosage could be determined by gamma camera scan.

Conclusion: High-energy beta radiation of Ho-166 is sufficient to kill tumor tissue without associated radiation damage to normal tissue. Intratumoral injection is thought to be a promising therapeutic approach and a new method for the treatment of hepatocellular carcinoma.

Index words: Liver neoplasms, therapy

Liver neoplasms, chemotherapeutic infusion

Radionuclide imaging, experimental

Radiations, injurious effects

Address reprint requests to: Yeon Hee Lee, M.D., Department of Diagnostic Radiology, Dankook University Hospital,

29 Anseo-dong Chonan Choongnam 330-715, Korea. Tel. 82-417-550-6921 Fax. 82-417-552-9674



제목 : 방사선과의사가 미스코리아
심사위원이 된다면! : 2편

참고: 대한방사선의학회지 1995;32(5):762의 쉼
터 편을 참고하시기 바랍니다.

Digital Infrared Thermographic Imaging
(DITI)으로 전신을 촬영하면 체온의 분포와
균형을 알 수 있을 뿐 아니라 신체의 아름다
움도 한눈에 알 수 있습니다.

제공 : 연세의대 영동세브란스병원 진단방사선과
정 태 섭