

대장암에서 Adenosine Triphosphate Based Chemotherapy Response Assay (ATP-CRA)를 이용한 In Vitro 항암제 감수성 검사

연세대학교 의과대학 영동세브란스병원 외과학교실, ¹이수 앵시스 주식회사

허정욱 · 박윤아 · 손승국 · 최성호¹

In-vitro Chemosensitivity Test for Colorectal Cancer using an Adenosine-triphosphate-based Chemotherapy Response Assay (ATP-CRA)

Jung Wook Huh, M.D., Yoon Ah Park, M.D., Seung Kook Sohn, M.D., Sung Ho Choi, Ph.D.¹

Department of Surgery, Yongdong Severance Hospital, Yonsei University College of Medicine, ¹ISU ABXIS CO., LTD, Seoul, Korea

Purpose: The adenosine-triphosphate-based chemotherapy response assay (ATP-CRA) is a well-documented and validated technology for individualizing chemotherapy in cancer patients. We evaluate the feasibility of ATP-CRA in colorectal cancer patients. This study will illustrate the assay's success rate, the mean coefficient of variation, and the turnaround time as a validation tool for a chemosensitivity test. **Methods:** A total of 118 patients, treated by surgery between June 2004 and September 2005 were evaluated for chemosensitivity to seven anticancer agents (5-fluorouracil (5-FU), oxaliplatin, irinotecan, epirubicin, etoposide, gemcitabine, and paclitaxel) by using an ATP-CRA. To allow a comparison between samples, we calculated the chemosensitivity index (CI) based on the percentage cell death rate (CDR, %) at each test drug concentration. **Results:** The assay success rate was 85.5% (118/138), and the mean coefficient of variation, indicating intra-assay error level, was 9.2%. CDR measured at a therapeutic peak plasma concentration ranged from 0% to 93.6% with a median of 31.0% for 5-FU, 28.5% for oxaliplatin, 34.0% for irinotecan, 25.0% for epirubicin, 21.0% for etoposide, 22.0% for gemcitabine, and 25.2% for paclitaxel. According to the CI, the most sensitive drug

varied from patient to patients 10.9% for 5-FU, 10.9% for oxaliplatin, 24.7% for irinotecan, 11.8% for epirubicin, 22.4% for etoposide, 1.1% for gemcitabine, and 23.3% for paclitaxel. **Conclusions:** Our data suggest that the ATP-CRA is a feasible in-vitro chemosensitivity test in colorectal cancer and that patients show heterogeneous chemosensitivity. A study evaluating the predictive value of ATP-CRA directed therapy is needed to determine the clinical usefulness of the test. **J Korean Soc Coloproctol 2007;23:172-179**

Key Words: Chemosensitivity test, ATP-CRA, Colorectal cancer
항암제 감수성 검사, ATP 반응성 검사, 대장암

서 론

대장암은 전 세계 암 관련 사망원인 중 두 번째를 차지하며,¹ 국내 암으로 인한 사망 빈도에서도 폐, 위, 간에 이어 네 번째를 차지하고 있다.² 2003년 국립건강보험공단의 보고에 의하면 국내 암 발생 중 남자가 9.7%, 여자가 11.6%로 이는 각각 전체 암 발생 빈도의 네 번째와 세 번째를 차지하고 있고, 1995년에 비해 약 418%가 증가하여 국내 암 중 가장 빠른 증가 추세를 보이고 있다.² 대장암으로 진단받은 환자의 약 70%가 근치수술을 받지만 절반 정도의 환자에서 국소 또는 원격 전이가 발견되며, 전이성 대장암은 항암치료를 받더라도 평균 생존기간이 수개월(6~15개월)에 지나

접수: 2006년 9월 22일, 승인: 2007년 3월 15일
책임저자: 손승국, 135-720, 서울시 강남구 도곡동 146-92번지 영동세브란스병원 외과
Tel: 02-2019-3370, Fax: 02-3462-5994
E-mail: sksohn@yumc.yonsei.ac.kr

본 논문의 요지는 2005년 대한대장항문학회 추계학술대회에서 구연발표되었음.

Received September 22, 2006, Accepted March 15, 2007
Correspondence to: Seung Kook Sohn, Department of Surgery, Yongdong Severance Hospital, Yonsei University College of Medicine, 146-92, Dogock-dong, Gangnam-gu, Seoul 135-720, Korea.
Tel: +82-2-2019-3370, Fax: +82-2-3462-5994
E-mail: sksohn@yumc.yonsei.ac.kr

지 않는다.³ 그러므로 적절한 항암제의 선택은 환자의 치료 방침 결정에 있어서 중요한 문제이며 이에 따라 최근 항암제 감수성 검사(chemosensitivity test)의 필요성이 대두되고 있다.

1980년대 초반에 subrenal capsule assay라는 항암제 감수성 검사가 있었지만 효율성이 떨어지고 가격이 비싸며 많은 시간이 소요되는 단점 때문에 실용화되지는 못했다.⁴ 이후부터 the human tumor clonogenic assay (HTCA),⁵ thymidine incorporation assay (TIA),⁶ succinic dehydrogenase inhibition (SDI) assay,⁷ methylthiazoletetrazolium (MTT) assay,⁸ histoculture drug response assay (HDRA)^{9,10} 등 여러 가지 in vitro 항암제 감수성 검사가 개발되었으나 이 방법들은 몇 가지 문제점으로 널리 실용화되진 못했다. 예를 들어 HTCA와 TIA는 상대적으로 큰 검체가 필요했고 검체 배양성공률이 높지 못했으며, SDI와 MTT assay는 역시 성공률이 낮았고 섬유아세포 등으로 인한 오염의 문제가 있었다. 또한 HDRA는 임상적으로 쓰이는 항암제의 농도보다 많은 농도의 항암제가 검사에 쓰였으며 작용기전도 틀렸다.¹⁰ Adenosine Triphosphate based Chemotherapy Response Assay (ATP-CRA)는 다른 항암제 감수성 검사와 비교하여 여러 가지 장점이 있는데 세포 생존을 예측하는데 더욱 예민하며, 암세포와 정상세포의 구별이 쉽고, 적은 양의 검체로도 실험이 가능한 점 등이다.¹¹ 이 검사는 많은 종류의 항암제가 개발되어 있는 현 상황에서 약제를 선택할 때 환자에 따른 약제에 대한 감수성의 개인별 차이를 반영할 수 있는 방법으로서 흑색종, 유방암, 난소암, 위암 등에서 임상 적용을 하고 있으나,¹²⁻¹⁵ 국내에는 대장암에 대한 ATP assay의 보고가 거의 없는 실정이다. 본 연구에서는 ATP-CRA를 이용하여 아직까지 국내에서 시행 사례가 없는 대장암 환자들을 대상으로 검사 성공률, 실험오차 수준(mean coefficient of variation), 결과 확인까지의 소요 기간(turnaround time) 등을 평가함으로써 ATP-CRA가 대장암 환자의 일상 진료에 적용 가능한 항암제 감수성 검사인지 여부를 평가하고자 하였다.

방 법

1) 연구 대상

2004년 6월부터 2005년 10월까지 영동세브란스병원 외과에서 대장암으로 진단받고 수술 받은 환자들 중 감수성 검사에 동의한 138명의 환자의 암조직에서 세포를 배양하였으며 세포 배양에 성공한 118명을 대상

으로 하였다.

2) 항암제 종류

5-fluorouracil (5-FU), oxaliplatin, irinotecan, epirubicin, etoposide, gemcitabine, paclitaxel 등 총 7가지의 항암제를 이용하였다.

3) 암세포의 분리와 정상세포 제거

수술 직후 얻은 암조직에서 주위의 정상조직, 피사된 부위 등을 최대한 제외하여 약 0.5cm³ 정도의 크기로 채취된 암조직은 100 U/ml penicillin (Sigma, St Louis, MO), 100µg/ml Streptomycin (Sigma, St Louis, MO), 100µg/ml gentamycin (GIBCO BRL, Rockville, MD), 2.5µg/ml amphotericin B (GIBCO BRL, Rockville, MD), 5% fetal bovine serum (FBS, GIBCO BRL, Rockville, MD)이 포함된 HBSS (GIBCO BRL, Rockville, MD) media에 넣어 즉시 실험실로 이송하였다. 이송된 암조직은 70% 에탄올을 이용한 암조직 표면 세척과 정량 과정을 거친 후 외과 수술용 칼과 가위를 사용하여 1 mm 이하로 작게 분쇄(mechanical disaggregation)하였으며, 이후 dispase (Sigma, St Louis, MO), pronase (Sigma, St Louis, MO) 등의 분해 효소와 DNase (Sigma, St Louis, MO) 등의 제한 효소를 처리하여 효소학적 분해(enzymatic disaggregation) 과정을 12 시간에서 16시간 동안 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 수행하였다. 위 과정을 거친 검체는 cell strainer (BD Falcon, Bedford, MA)를 이용하여 분해되지 않은 조직으로부터 세포를 분리하여 수거하였다. 분리된 세포는 ficoll (Histopaque-1077, 1.077 g/ml, Sigma, St Louis, MO) gradient centrifugation (400 g, 15 min)을 통해 죽은 세포와 적혈구를 제거하였다. 분리된 암세포가 충분한 경우는 anti-CD45 antibody에 부착된 magnetic bead (Miltenyi Biotech, Auburn, CA)를 이용하여 혈액에서 유래한 정상세포를 제거하였으며 매 단계마다 trypan blue exclusion으로 살아있는 세포수를 측정하였다.¹⁶

4) 항암제 처리와 ATP assay

분리된 암세포는 10% FBS (GIBCO BRL, Rockville, MD)와 100 U/ml penicillin (Sigma, St Louis, MO), 100 µg/ml streptomycin (Sigma, St Louis, MO), 100µg/ml gentamycin (GIBCO BRL, Rockville, MD), 2.5µg/ml amphotericin B (GIBCO BRL, Rockville, MD)가 포함된 IMDM (GIBCO BRL, Rockville, MD)배지를 이용하여

well당 2,000~20,000 cells/100 μ l로 희석하여 triplicate로 분주하였다. 이때 사용한 배양 용기는 섬유아세포 등의 부착과 증식을 억제할 수 있는 96 well ultra low attachment (ULA) micro-plate (Costar, Cambridge, MA)를 사용하였다. 이후 검사할 항암제를 100 μ l씩 첨가하여 48시간동안 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 배양하였다. 처리한 항암제의 최종 농도는 문헌 조사를 통해 얻은 혈중 최고 농도를 바탕으로 미리 실시한 예비 실험 (data not shown)을 통해 결정하였으며^{17,18} epirubicin 1.2 μ g/ml, etoposide 3.6 μ g/ml, 5-FU 10.0 μ g/ml, gemcitabine 16.9 μ g/ml, irinotecan 4.7 μ g/ml, oxaliplatin 2.9 μ g/ml, paclitaxel 8.5 μ g/ml이다. 세포 수가 충분한 경우에는 최종 항암제 처리 농도(test drug concentration, TDC)를 중심으로 세 개의 농도로 희석하여(0.2배, 1배, 5배) 항암제를 처리하였으며 여러 농도에서 암세포 사멸 효과를 누적해서 상대적인 항암효과를 비교하는 chemosensitivity index (CI)를 다음과 같이 계산하였다.¹⁹

$$CI = 300 - \text{sum} (\% \text{ cell suppression } 0.2 \times \sim 5 \times)$$

매 실험마다 암세포 없이 배지만 분주한 well을 음성 대조군으로, 암조직에서 분리한 세포 1,000개에서 측정되는 ATP함량의 최소값과 평균값에 해당하는 105 pg 및 280 pg의 ATP를 각각 양성 대조군으로 포함하였다.

48시간 동안 배양이 끝난 후에는 trypan blue exclusion으로 암세포의 생존율을 측정하였으며, 세포를 용해시키고, 세포용해액 속에 존재하는 ATP를 luciferin 및 과량의 luciferase (Roche, Mannheim, Germany)와 반응시켜 생성되는 flash type luminescence를 luminometer (Perkin Elmer, Boston, MA)로 측정하였다. 각 항암제의 암세포 사멸률(cell death rate, CDR)은 측정된 luminescence값을 통해 아래와 같이 계산하였다.

$$CDR (\%) = \left(1 - \frac{\text{Mean luminescence in treated cells}}{\text{Mean luminescence in untreated control}}\right) \times 100$$

매 실험마다 정도 관리를 위해 intra assay mean coefficient of variation (CV)을 계산하였으며 intra assay mean CV가 30 이상이거나, 양성 대조군의 측정값을 확인하여 항암제 미처리 대조군의 측정값이 양성 대조군인 105 pg ATP보다 작은 경우 검사 실패로 간주하였다.

Table 1. Patient profiles (n=118)

	Characteristics	No. of patients (%)
Sex	Male	76 (64.4)
	Female	42 (35.6)
Age	Mean	60.1
	Range	26~83
Site	Ascending colon	25 (21.2)
	Transverse colon	9 (7.7)
	Descending colon	3 (2.5)
	Sigmoid colon	25 (21.2)
TNM	Rectum	56 (47.4)
	Stage I	19 (16.1)
	Stage II	49 (41.5)
	Stage III	33 (28.0)
Histology	Stage IV	17 (14.4)
	Well	15 (12.7)
	Moderately	82 (69.5)
	Poorly	2 (1.7)
	Mucinous	16 (13.6)
	Other	3 (2.5)

결 과

1) 임상 병리학적 특징

세포 배양에 성공한 118예 중 남자 76예, 여자 42예로 남녀 비는 약 1.8대 1이었고, 평균 연령은 60.1세(26~83세)였다. 원발부위는 상행결장이 25예(21.2%), 횡행결장이 9예(7.7%), 하행결장이 3예(2.5%), 에스자결장이 25예(21.2%), 직장이 56예(47.4%)였다. TNM 병기로는 1기가 19예, 2기가 49예, 3기가 33예, 4기가 17예였다. 조직형은 중등 분화도가 82예(69.5%)로 가장 많았으며 점액상 16예(13.6%), 고분화도 15예(12.7%), 저분화도 2예(1.7%), 기타 3예였다(Table 1).

2) 체외 항암제 감수성 검사 결과

모든 환자의 실험에서 7일 내에 결과를 얻을 수 있었고, 전체 환자 138명 중 118명에서 실험에 성공하여 성공률은 85.5%였으며 intra assay mean coefficient of variation (CV)는 9.2%였다. 실험에 실패한 20예 중 18예가 세균에 의한 오염이 원인이었고, 나머지 2예는 검체의 양이 불충분했기 때문이었다. 실험에서 성공하기 위한 최소한의 검체의 양은 20 mg이었다. 검체의 양이 부족하거나 특정 항암제에 대한 실험오차 수준이 과다하여 7개 약제에 대한 결과를 모두 분석하지 못한 경우는 각각 CDR을 기준하였을 때 21.1%

Table 2. Cell death rate at 1×TDC*

	FU	OX	IR	EP	ET	GE	PA
Tested No.	111	115	117	107	109	116	111
Mean±SD [†] (%)	28.8±13.1	26.3±16.2	33.6±18.0	28.8±20.2	26.0±20.0	21.6±15.6	27.8±20.1
Median [†] (%)	31.0	28.5	34.0	25.3	21.0	22.0	25.2
Range [†] (%)	0~56.8	0~59.1	0~85.1	0~93.6	0~79.9	0~64.5	0~86.7

*TDC (test drug concentration) = drug concentration at which tumors show most heterogeneous inhibition rate; FU = 5-FU; OX = oxaliplatin; IR = irinotecan; EP = epirubicin; ET = etoposide; GE = gemcitabine; PA = paclitaxel; [†] Unit = cell death rate; SD = standard deviation.

Table 3. Heterogeneity of chemosensitivity index (CI)*

	FU	OX	IR	EP	ET	GE	PA
Tested No.	92	92	93	85	85	92	86
1 st rank	10	10	23	10	19	1	20
2 nd rank	11	17	20	11	14	1	20
Subtotal (%)	21 (22.8)	27 (29.3)	43 (46.2)	21 (24.7)	33 (38.8)	2 (2.2)	40 (46.5)

*Chemosensitivity index (CI) = 300-SUM (% cell suppression 0.2×~5×); FU = 5-FU; OX = oxaliplatin; IR = irinotecan; EP = epirubicin; ET = etoposide; GE = gemcitabine; PA = paclitaxel.

(25/118), CI를 기준하였을 때 39.4% (45/118)이었으며 각 항암제에 대해 분석된 검체의 수는 Table 2에 별도로 표시하였다.

각 항암제에 대해서 최종 항암제 처리 농도를 기준으로 하여 구한 암세포 사멸률의 범위는 0%에서 93.6%의 값을 보였다(Table 2). 각 항암제에서의 중앙값(median)은 5-FU 31.0%, oxaliplatin 28.5%, irinotecan 34.0%, epirubicin 25.0%, etoposide 21.0%, gemcitabine 22.0%, paclitaxel 25.2%였다. 암세포 사멸률이 가장 높은 약제는 irinotecan (34.0%)이었으며 가장 넓은 사멸 범위를 보인 약제는 epirubicin (0~93.6%)이었다. 반면에 암세포 사멸률이 가장 낮았던 약제는 etoposide (21.0%)였고, 사멸 범위가 가장 좁았던 약제는 5-FU (0~56.8%)였다.

Table 3은 각 항암제의 최종 항암제 처리 농도를 0.2 배, 1배, 5배로 나누어 환자들마다 실시하여 나온 CI값을 구한 것이다. CI값에 따른 반응성은 환자들마다 상이했으며 가장 반응성이 높게 나왔던 빈도(전체 중 1 위 비율)는 5-FU 10/92 (10.9%), oxaliplatin 10/92 (10.9%), irinotecan 23/93 (24.7%), epirubicin 10/85 (11.8%), etoposide 19/85 (22.4%), gemcitabine 1/92 (1.1%), paclitaxel 20/86 (23.3%)로 irinotecan이 가장 높

았다.

고 찰

대장암에서 사용되는 대표적인 보조 항암치료는 5-FU와 leucovorin 복합 요법으로 이는 장기간에 걸친 대량 임상 실험에 의해 평가를 거친 결론이며 최근 대장암의 병기에 따라 oxaliplatin이나 irinotecan 등 2군 항암제의 보조 항암 치료의 적응증이 확대되고 있다. 그러나 동일한 병기의 환자에서 동일한 요법의 항암 치료를 시행하여도 재발률이나 재발 양상은 환자마다 차이가 있으며 환자 개인의 치료의 반응도를 정확하게 예측하기는 매우 어렵다. 이런 문제점을 해결하기 위해 항암제 감수성 검사에 대한 필요성이 대두되었고 현재 여러 가지 항암제 감수성 검사 방법들에 대한 연구가 진행되고 있는 실정이다.

ATP assay를 이용한 항암제 감수성 검사의 성공률은 대략 85~91% 정도로 보고되고 있지만,^{12-15,20} 이는 대장암이 아닌 폐암, 흑색종, 위암, 유방암, 난소암 등을 대상으로 한 실험이었다. 조직 배양이 어려운 대장 조직을 이용한 본 실험 결과의 성공률은 85.5%로 기존 보고와 거의 유사한 결과를 보였으며¹³⁻¹⁵ intra assay

mean CV 값은 9.2%로 기존의 보고보다 우수하였다 (10.5~13.0%).^{21,22} 또한 조직을 떼어내서 실험실로 이송한 후 7일 이내에 결과를 알 수 있었으므로 일상적인 대장암 환자의 진료에 지장 없이 항암제의 선택 및 투여가 가능하였다. 7가지 항암제 중에서 각 환자당 CDR값을 확인할 수 있었던 항암제의 평균 개수는 6.7 개로서, 이 중에서 5-FU, oxaliplatin, irinotecan 등 현재 대장암의 항암요법에 사용되는 세가지 약제들의 CDR 값은 전체 환자의 94.1% (111/118)에서 동시에 알아볼 수 있었다.

여러가지 항암제 감수성 검사 중 MTT assay나 HDRA 등 다른 검사도 성공률에 있어서는 큰 차이가 없지만,²³ ATP-CRA는 민감도가 더 높고 기술적인 면에 있어서 여러 가지 이점이 있다.¹¹ 모든 항암제 감수성 검사는 항암제 처리 후 살아있는 세포 수를 간접적으로 측정하는데 항암제 감수성 검사의 개념이 도입된 초기에는 형성된 colony의 숫자나 isotope-labeled thymidine uptake양으로 측정하는 세포 증식 측정법이 주로 사용되었으나 최근에는 세포 고사로 대변되는 항암제의 작용기전을 검사에 반영할 수 있을 뿐만 아니라 실험 시간을 단축시키고 성공률을 높이기 위해 ATP의 양, dehydrogenase enzyme activity (MTT, HDRA) 그리고 세포막의 integrity (differential staining cytotoxicity, DiSC assay)²⁴를 측정하는 세포 사멸 측정법이 주로 사용되고 있다. 항암제 감수성 검사에서는 암조직 내의 정상세포에 의한 영향을 배제하고 암세포의 사멸효과를 선택적으로 분석하는 것이 중요한데 DiSC assay는 암세포와 정상세포의 사멸여부를 육안적으로 감별 계수하는 반면, ATP-CRA는 ficoll gradient centrifugation과 CD45 immunomagnetic separation을 이용하여 정상세포를 제거하거나 정상세포가 살아가지 못하는 특별한 배양 조건을 만들어 항암제를 처리한다.²¹ 최근에는 이같이 암조직 내에서 정상세포를 제거하고 항암제 감수성 검사를 시행하는 것이 위암에서 환자 치료 성과를 높이는데 기여할 수 있다는 내용이 보고된바 있다.²⁵

세포 내 ATP는 모든 세포들의 에너지원으로서 세포가 죽으면 즉시 사라지며 항암제 치료 후 세포 내 ATP가 감소했다는 것은 세포가 생존능력을 잃었다는 것을 의미한다. 그러므로 ATP assay는 ATP의 양을 측정함으로써 항암제의 세포 파괴 정도를 파악할 수 있는 것이다. 본 실험에서는 항암제를 처리했을 때 항암 효과가 높을수록 암세포 사멸률이 증가하며 또한 암세포 내의 ATP의 양이 줄어들음을 알 수 있었다. 세포 배양

과정에서 기술적으로 가장 어려웠던 점은 세균에 의한 오염이었으며 항암제 감수성 결과에 영향을 미치지 않는 범위 내에서 여러 가지 항생제를 포함시킨 배양액을 사용하였지만,³ 실험 실패 원인의 대부분은 세균에 의한 오염이었다. 앞으로는 감염으로 인한 실패 빈도를 줄여서 성공률을 높일 수 있는 항생제의 도입이나 실험 과정의 개선이 필요할 것으로 생각한다.

배지에 포함된 항 진균제인 amphotericin B는 in vitro 실험에서 oxaliplatin 및 같은 계열 항암제의 세포 내 축적을 증가시켜 세포 독성 효과를 증강시키는 것으로 알려져 있지만²⁶ 본 실험에서와 같이 소량(2.5µg/ml)을 사용한 경우 결과에 중대한 영향을 미치지 않았다.³ 대장 조직은 매우 섬유질화되어서 일반적인 효소에 의한 분해가 쉽지 않다.³ 더욱이 술 전 화학방사선요법을 받았던 환자의 조직에서는 암세포의 관찰이 용이하지 않기 때문에 본 실험에서는 술 전 방사선요법을 받았던 환자는 제외하였다. ATP-CRA 검사에 필요한 조직을 얻는 방법은 수술을 통한 방법, 내시경을 통한 방법과 전이성 병변의 경우 복막액이나 흉막액을 통한 방법 등이 있는데^{3,21} 본 실험에서는 수술 직후 얻은 암조직의 일부를 직접 떼어내었기 때문에 충분한 양의 조직을 구할 수 있었으며 최소 검체량은 20 mg으로 1 mg당 평균 32,196개의 세포가 존재하였다. 본 연구는 각 검체마다 7개의 항암제를 3가지 다른 농도로 처리하여 얻은 결과를 분석하고자 하였으나 각 검체에서 분리한 세포수의 상이, 각 환자의 검사 결과 중 특정 약제의 CV과다(방법, 항암제처리와 ATP assay 참조) 등으로 인하여 매번 7개 약제에 대한 모든 농도에서 처리한 결과를 얻을 수 없었으며, 향후 이와 같은 검사 방법상의 오차를 줄이기 위한 노력이 필요하다고 생각한다.

각 항암제를 한가지 농도로 처리한 경우 항암제마다 상대적인 암세포 사멸 정도를 비교하여 항암제 효과를 나타내며 각각의 항암제에서 처리 농도에 따른 반응 양상을 확인 할 수 있었다. CI는 여러 농도(0.2배, 1배, 5배)에서 암세포가 사멸한 정도를 모두 반영하게 되므로 실제환자에서 가장 낮은 용량 또는 가장 높은 용량이 투약되었을 때의 항암제 감수성에 관한 가능성을 모두 내포할 수 있어 다른 관정방법보다 우수하다고 알려져 있다.¹⁹ 특정 항암제가 낮은 농도에서 다른 항암제에 비해 높은 암세포 사멸 효과를 보인다면 그 항암제에 대해 반응성이 크다고 고려해 볼 수 있으므로 CI값이 낮을수록 상대적으로 항암제에 대한 효과가 큰 것을 의미하며, irinotecan의 암세포 사멸 효과

가 가장 좋음을 알 수 있었다(Table 3). 그러나 대장암에 대한 항암 약물 선택의 기준에 있어서 CDR 또는 CI 중에서 어느 것이 더욱 정확한 기준이 되는가에 대한 이론적 근거는 아직 정립되어 있지 않은 것으로 알려져 있으며 이에 대한 추가적인 연구도 필요할 것으로 생각한다. 본 실험에서 항암제를 사용할 때 기준이 되는 최종 항암제 처리 농도(TDC)란 암세포 사멸률이 가장 상이하게 측정되는 항암제의 농도를 말하는 것으로 문헌 조사를 통해 얻은 혈중 최고 농도를 바탕으로 한 예비실험을 통하여 결정하였다.^{17,18} 본 실험에 사용된 7가지의 항암제 중에서 비교적 암세포 사멸률이 높은 약제는 irinotecan, 5-FU, oxaliplatin 등이었고, 이 중에서 irinotecan이 가장 높은 평균 사멸률 및 가장 넓은 사멸 범위를 보였다. 기존의 5-FU는 irinotecan에 비해 상대적으로 사멸 범위가 넓지 못했지만 비교적 높은 암세포 사멸률을 보였고, 이미 알려진 대로 irinotecan 및 oxaliplatin 등과의 병용 요법을 했을 때 암세포 사멸 효과가 더욱 증대될 것이라 예상된다. 하지만 본 실험에서는 약제의 병용 요법이 포함되어 있지 않기 때문에 향후 이에 대한 연구도 진행되어야 하며, 또한 환자들마다 최선의 약제 조합에 따른 반응 정도의 차이를 비교해 보는 연구도 진행되어야 할 것이다.

현재 임상 실험 결과를 토대로 1군 항암제인 5-FU와 leucovorin 병용 요법을 제외하고, 2군 항암제인 oxaliplatin, irinotecan 등은 보조 요법으로 인정받고 있는 적용 기준이 대장암 병기에 따라 다른데, 일부 환자에서 ATP-CRA결과 인정된 약제 외의 다른 약제에 대한 감수성이 높은 경우 임상 실험에서 통계적으로 그 효율성이 입증되지 않은 다른 감수성이 높은 약제로 대체하는 것이 실제 임상에서 가능할지에 대해서는 매우 의문스럽다.

ATP-CRA는 항암제 선택에 많은 정보를 제공하고 있고^{27,28} 대장암에 있어서 항암제마다 각각 상이한 반응을 보이고 있다. 향후 *in vitro* 실험 결과를 토대로 하여 항암제 감수성 검사 결과와 환자의 예후와의 상관 관계 등 실제 환자에게 적용하여 얻은 임상 결과를 prospective하게 비교하는 연구가 진행되어야 할 것이다. 본 실험은 대장암으로 진단받고 술 전 화학방사선 요법 없이 수술을 받은 환자를 대상으로 한 실험으로서 향후 기존의 항암제를 투여 받고 있던 환자에서 새로이 발견된 병변에 대한 항암제의 변경 및 선택의 문제 등에 대한 연구도 필요할 것으로 생각한다.

결 론

ATP-CRA는 대장암에 있어서 비교적 적은 양의 검체와 짧은 시간으로 정확한 결과를 알 수 있는 항암제 감수성 검사로 항암제에 따라 heterogeneous한 결과를 보이고 있다. 또한 실제 감수성이 있는 항암제의 임상 적용에 있어서 현실적인 의료 보험상의 제약이 있지만 향후 ATP-CRA결과를 통해 많은 환자군과 긴 추적 관찰 기간을 갖고 보다 지속적인 연구를 통한 임상 실험 결과가 나올 수 있을 것이라고 생각된다.

REFERENCES

1. Bray F, Sankila R, Ferlay J, Parkin DM. Estimates of cancer incidence and mortality in Europe in 1995. *Eur J Cancer* 2002;38:99-166.
2. Korean Cancer Registry Center, Ministry of Health & Welfare. Annual report of Korean central cancer registry (2002. 1~2002. 12). Goyang: Korean Central Cancer Registry Center, Ministry of Health & Welfare; 2003.
3. Whitehouse PA, Knight LA, Di Nicolantonio F, Mercer SJ, Sharma S, Cree IA. Heterogeneity of chemosensitivity of colorectal adenocarcinoma determined by a modified *ex vivo* ATP-tumor chemosensitivity assay (ATP-TCA). *Anti-Cancer Drugs* 2003;14:369-75.
4. Bogden AE, Griffin W, Reich SD, Costanza ME, Cobb WR. Predictive testing with the subrenal capsule assay. *Cancer Treat Rev* 1984;11(Suppl A):113-24.
5. Rozencweig M, Hofmann V, Sanders C, Rombaut W, Fruh U, Martz G. *In vitro* growth of human malignancies in a cloning assay. *Recent Results Cancer Res* 1984;94: 1-7.
6. Tanigawa N, Kern DH, Hikasa Y, Morton DL. Rapid assay for evaluating the chemosensitivity of human tumors in soft agar culture. *Cancer Res* 1982;42:2159-64.
7. Kondo T, Imamura T, Ichihashi H. *In vitro* test for sensitivity of tumor to carcinostatic agents. *Gann* 1966; 57:113-21.
8. Carmichael J, DeGraff WG, Gazdar AF, Minna JD, Mitchell JB. Evaluation of a tetrazolium-based semi-automated colorimetric assay: assessment of chemosensitivity testing. *Cancer Res* 1987;47:936-42.
9. Vescio RA, Redfern CH, Nelson TJ, Ugoretz S, Stern PH, Hoffman RM. *In vivo*-like drug responses of human tumors growing in three-dimensional gel-supported primary culture. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987;84: 5029-33.
10. Freeman AE, Hoffman RM. *In vivo*-like growth of human tumors *in vitro*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986;83:2694-8.
11. Petty RD, Sutherland LA, Hunter EM, Cree IA. Comparison of MTT and ATP-based assays for the

measurement of viable cell number. *J Biolumin Chemilumin* 1995;10:29-34.

12. Cree IA, Neale MH, Myatt NE, de Takats PG, Hall P, Grant J, et al. Heterogeneity of chemosensitivity of metastatic cutaneous melanoma. *Anticancer Drugs* 1999; 10:437-44.
13. Cree IA, Kurbacher CM, Untch M, Sutherland LA, Hunter EM, Subedi AM, et al. Correlation of the clinical response to chemotherapy in breast cancer with ex vivo chemosensitivity. *Anticancer Drugs* 1996;7:630-5.
14. Kawamura H, Ikeda K, Takiyama I, Terashima M. The usefulness of the ATP assay with serum-free culture for chemosensitivity testing of gastrointestinal cancer. *Eur J Cancer* 1997;33:960-6.
15. Konecny G, Crohns C, Pegram M, Felber M, Lude S, Kurbacher C, et al. Outcome of ATP-based tumor chemosensitivity assay directed chemotherapy in heavily pre-treated recurrent ovarian carcinoma. *BMC Cancer* 2003;3:19.
16. Bilkenroth U, Taubert H, Riemann D, Rebmann U, Heynemann H, Meyer A. Detection and enrichment of disseminated renal carcinoma cells from peripheral blood by immunomagnetic cell separation. *Int J Cancer* 2001; 92:577-82.
17. Weisenthal LM, Dill PL, Finklestein JZ, Duarte TE, Baker JA, Moran EM. Laboratory detection of primary and acquired drug resistance in human lymphatic neoplasms. *Cancer Treat Rep* 1986;70:1283-95.
18. Bird MC, Bosanquet AG, Gilby ED. In vitro determination of tumour chemosensitivity in haematological malignancies. *Hematol Oncol* 1985;3:1-10.
19. Konecny G, Crohns C, Pegram M, Felber M, Lude S, Kurbacher C, et al. Correlation of drug response with the ATP tumorchemosensitivity assay in primary FIGO stage III ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 2000;77:258-63.
20. Neale MH, Myatt N, Cree IA, Kurbacher CM, Foss AJ, Hungerford JL, et al. Combination chemotherapy for choroidal melanoma: ex vivo sensitivity to treosulfan with gemcitabine or cytosine arabinoside. *Br J Cancer* 1999;79:1487-93.
21. Kang SM, Park MS, Chang J, Kim SK, Kim HR, Shin DW, et al. A feasibility study of adenosine triphosphate-based chemotherapy response assay (ATP-CRA) as a chemosensitivity test for lung cancer. *Cancer Res Treat* 2005;37:223-7.
22. Ng TY, Ngan HY, Cheng DK, Wong LC. Clinical applicability of the ATP cell viability assay as a predictor of chemoresponse in platinum-resistant epithelial ovarian cancer using nonsurgical tumor cell samples. *Gynecol Oncol* 2000;76:405-8.
23. Furukawa T, Kubota T, Hoffman RM. Clinical applications of the histoculture drug response assay. *Clin*

Cancer Res 1995;1:305-11.

24. Reinhold U, Tilgen W, editors. *Chemosensitivity Testing in Oncology*. 1st ed. Heidelberg: Springer-Verlag; 2003. p. 126-45.
25. Iwahashi M, Nakamori M, Nakamura M, Noguchi K, Ueda K, Nakatani Y, et al. Individualized adjuvant chemotherapy guided by chemosensitivity test sequential to extended surgery for advanced gastric cancer. *Anticancer Res* 2005;25:3453-9.
26. Ferguson PJ, Currie C, Vincent MD. Enhancement of platinum-drug cytotoxicity in a human head and neck squamous cell carcinoma line and its platinum-resistant variant by liposomal amphotericin B and phospholipase A2-II. *Drug Metab Dispos* 1999;27:1399-405.
27. Cree IA, Kurbacher CM. ATP-based tumor chemosensitivity testing: assisting new agent development. *Anticancer Drugs* 1999;10:431-5.
28. Di Nicolantonio F, Neale MH, knight LA, Lamont A, Skailles GE, Osborne RJ, et al. Use of an ATP-based chemosensitivity assay to design new combinations of high-concentration doxorubicin with other drugs for recurrent ovarian cancer. *Anticancer Drugs* 2002;13: 625-30.

편집인의 글

대장암 환자들의 생존율은 최근에 임상에 적용된 여러 가지 항암화학요법 제재에 의해 크게 향상되고 있다.¹ 항암제는 대부분 상당한 부작용을 수반하기 때문에 각 개인의 암에 적합한 최적의 치료 방법을 확립하기 위한 노력이 오래 전부터 진행되어 왔었으며 이러한 치료 방침의 일환으로서 약제에 대한 암세포의 감수성을 확인하려고 하는 *in vitro* predictive assay가 개발되어 왔다. 그러나 과거에 시행되었던 방법은 항암제 감수성을 검사할 수 있을 만큼 성공적으로 *in vitro*에서 배양이 되지 않으며, 검사 결과의 재현성이 일관성이 없으며, 항암제에 대한 암의 반응을 생체 내에서와 유사하게 이루어질 수 있게 하는 모델의 설정이 어렵다는 단점이 있었다. 이러한 이유로 *in vitro* predictive assay는 현재까지는 보편적으로 이용되고 있지 않으며, 실제 임상에 적용하기 위한 연구 결과는 많지 않다. 본 연구는 대장암에 대한 항암제 감수성에 대한 연구라는 면에서 매우 중요한 의미를 갖는다.

그러나 임상 적용을 위해서는 몇 가지 고려해야 할 점이 있다. 첫째, 실험에서 사용한 항암제의 농도가 고형암을 대상으로 정해진 것이 아니라 혈액암에서 정해진 것이므로 검사 결과에서 유용하다고 생각되는 항암제를 투여할 수 있는가의 문제이다. 이 부분은 임상 연구를 통해서 밝혀야 하지만 보조 항암화학요법

환자를 대상으로 하는 임상 연구는 대상 환자의 수가 많이 필요할 뿐 아니라 연구기간도 매우 길어야 결론을 얻을 수 있다. 둘째, 본 연구에서는 단독 항암제의 감수성만을 검사하였으나 실제로 임상에서는 항암제 단독요법 보다는 복합요법을 선택하는 경향이므로 항암제 감수성 검사에서 나온 결과가 항암제 간에 서로 상이할 경우 어떻게 항암제의 배합을 결정할 것인가의 문제이다. 셋째, 보조항암요법을 받은 환자의 재발은 대부분이 간이나 폐, 복막 등 전신재발을 하므로 재발병소의 항암제 감수성과 원발병소의 항암제 감수성이 동일한가의 문제이다. 만약 동일하다면 첫번째 선택한 항암제에 저항성을 지닌 세포가 재발한 것으로 간주하여야 하므로 원발 병소의 항암제 감수성 검사에 근거하여 항암화학요법을 하기 어려울 것이다.

이러한 이유들로 인해 미국임상종양학회에서는 항암제 감수성 검사 또는 저항성 검사를 임상연구의 차원에서만 허용하고 있다.² 반면 일본을 중심으로 한 임상연구에서는 항암제 감수성 검사가 임상 결과와 연관됨을 보고하고 있으므로 최종적인 판단은 유보하여야 할 것이다.^{3,4}

상기한 몇 가지 문제점에도 불구하고 이번 연구 결

과는 250 mg의 소량의 조직만으로도 항암제 감수성 검사가 가능하며 85.5%의 높은 실험 성공률을 보이므로 임상 적용 가능성에 매우 고무적인 결과를 보였다. 전향적 다기관 임상연구를 통해 항암제 감수성 검사가 실제로 유용한가를 검증하여야 할 것이다.

REFERENCES

1. Meyerhardt JA, Mayer RJ. Systemic therapy for colorectal cancer. *N Engl J Med* 2005;352:476-87.
2. Schrag D, Garewal HS, Burstein HJ, Samson DJ, Von Hoff DD, Somerfield MR. American Society of Clinical Oncology Technology Assessment: chemotherapy sensitivity and resistance assays. *J Clin Oncol* 2004;22:3631-8.
3. Kabeshima Y, Kubota T, Watanabe M, Hasegawa H, Furukawa T, Kitajima M. Clinical usefulness of chemosensitivity test for advanced colorectal cancer. *Anticancer Res* 2002;22:3033-7.
4. Yamaue H, Tanimura H, Kono N, Aoki Y, Tabuse K, Uchiyama K, et al. Clinical efficacy of doxifluridine and correlation to in vitro sensitivity of anticancer drugs in patients with colorectal cancer. *Anticancer Res* 2003;23:2559-64.

경희의대 외과학교실
이 석 환