

## 백서 방광내 BCG주입후 병리조직학적 변화에 관한 실험적 연구

이화여자대학교 의과대학 비뇨기과학교실

심 봉 석

= Abstract =

### An Experimental Study for Histopathologic Changes of Rat Urinary Bladder Due to Intravesical Bacillus Calmette-Guerin Instillation

Bong Suck Shim

*Department of Urology, College Medicine, Ewha Womans University*

The Bacillus Calmette-Guerin(BCG) instillation of urinary bladder as a treatment of superficial bladder tumor can cause inflammatory changes in non-neoplastic area, which occasionally gives difficulty in differentiation from recurrent tumor on follow-up cystoscopy. This study was performed to see the changes of non-neoplastic bladder wall according to the dosage of BCG and time intervals. Low dose( $8 \times 10^6$  CFU/ml) and high dose( $12 \times 10^6$  CFU/ml) as well as normal saline were instilled into bladder of female Wister rats. The histopathological examination was performed on 1, 2, 4 and 8 weeks, respectively.

The following results were obtained ;

- 1) On 2 weeks after intravesical BCG instillation, chronic inflammation with lymphocytes infiltration was noted on the bladder mucous and muscular layer, but tuberculous granuloma was not observed. There was not significant difference between Group I and Group II.
- 2) Chronic inflammatory changes were continuously progressed till 8 weeks, and more severe in Group II than Group I.
- 3) The denudation of ulcerative epithelial cell was noted in only one case of Group II.

The above results suggest that histopathologic change after BCG instillation on non-neoplastic area was remained upto 8 weeks and need further evaluation for long term effects.

### 서 론

표재성 방광암은 경요도 전기 절제술후에도 재발빈도가 50~70%로 높고 10~15%에서 침윤성 방광암으로의 진전이 있기때문에 술후 재발방지를 위해 방광내 항암제의 주입이 널리 사용되어 왔다.

방광내 항암제주입의 효과는 경요도 절제술로 인한 부유 암세포의 이식방지와 원발부위 이외의, 방광경으로 관찰되지 않은 전암성 병변에 대한 항암작용이다. 이와 같은 방광내 주입 항암제로는 thiotepa, mitomycin-C, adriamycin등이 있는데, 최근 BCG의 방광내 주입 면역요법이 표재성 방광암의

재발율을 10~20%로 감소시키고, 상피내암종(carcinoma in situ) 및 술후 잔류 표재성 방광암에도 높은 치료효과를 나타내므로 많이 사용된다<sup>1)2)3)</sup>.

표재성 방광암의 예방 및 치료를 위한 방광내 BCG 주입법의 작용기전은 비특이적 염증반응과 전신 면역기전 촉진으로 생각되는데, 이때 정상 방광점막에도 비특이적 만성 염증변화를 일으켜 추적 방광경 검사시 암재발에 의한 변화와의 감별을 어렵게 하는 경우가 많다<sup>4)</sup>.

이에 저자는 백서를 이용하여 BCG주입후 시간 및 용량에 따른 정상방광에서의 병리조직학적 변화를 관찰하여 BCG가 정상 방광조직에 미치는 영향을 평가하였다.

## 연구재료 및 방법

### 1. 실험동물

생후 10주이내의 250~300gm 체중을 가진 Wistar계 암컷 백서 50마리를 실험동물로서 사용하였다. 고휘압착사료를 사용하여 실험전 1주일동안 실험동물의 적응을 위해 동일한 조건하에서 사육하였다.

### 2. BCG

BCG는 국립보건원에서 제조한 냉동처리된 분말의 Pasteur 균주로 1mg당  $4 \times 10^6$  균집락형성단위(Colony forming unit : 이하 CFU로 칭함)를 사용하였으며 BCG의 회석액은 0.9% 생리식염수로 하였다.

방광내 주입시 저농도군에서는 1ml당 2mg( $8 \times 10^6$  CFU), 고농도군에서는 3mg( $12 \times 10^6$  CFU)으로 회석하였다. 방광내 주입시 회석 BCG액 0.2ml를 1회 주입하면 저농도군에서는  $1.6 \times 10^6$  CFU, 고농도군에서는  $2.4 \times 10^6$  CFU를 방광내 주입하는 양이 된다.

### 3. 마취제

마취제는 Ketamine HCl(유한양행제조)을 쥐 무게 1gm당 0.05mg을 BCG 방광내 주입전 복강내로 주입하여 경도의 마취상태를 2시간이상 유도하였다.

### 4. 실험동물의 구분

실험동물 50마리를 3군으로 분류하였으며, I군(20마리)은 방광내로 저농도 BCG를, II군(20마리)은 고농도 BCG를 1주일 간격으로 6회 주입하였으며, III군(10마리)은 생리식염수를 동일 용량 및 횟수로 주입한 대조군이다. BCG의 방광내주입은 백서를 Ketamine 마취하에 요도삽관을 통하여 회석된 BCG를 주입하였다.

### 5. 조직관찰

조직처리는 최종 BCG 방광내 주입후 1, 2, 4, 8주째 백서를 경추탈구방법으로 도살한후 요도삽관을 통하여 10% 중성 포르말린 용액 0.3ml를 방광에 넣은후 개복하였고, 요도 및 방광을 절제하여 육안적으로 관찰한후 일반 광학현미경 표본제작을 위해 10% 중성 포르말린 용액에 24시간 고정후 alcohol로 탈수하여 Xylene 및 Paraffin 포매를 거쳐 4~5um 두께로 박절하였으며 Hematoxylin-eosin 염색후 광학현미경하에서 관찰하였다.

### 6. 실험대상의 선정

실험기간중 죽은 쥐는 모두 2례였으며 모두 마취후 24시간내에 죽는 쥐들로 마취제의 과량 투여가 그 원인으로 생각되었다. 이들을 제외한 48례를 실험대상으로 하였다.

## 결 과

### 1. 저농도 BCG 주입군(Fig. 1A)

저농도 BCG를 주입 1주후 방광내 변화로는 상피하층의 결체조직에서 중등도의 부종 및 울혈소견을 볼 수 있었고 경미한 염증세포 침윤도 관찰되었으나, 2주후에는 부종 및 울혈소견이 다소 감소되었으며, 이는 4주 및 8주후에도 2주때와 유사한 정도의 소견을 보였다(Fig. 2). 그러나 염증세포의 침윤은 2주때부터 중등도로 나타나 4주째까지 비슷한 정도를 보였고 8주째에는 조금 심해진 소견을 보였다(Fig. 3). 그러나 만성 육아종성 염증반응은 관찰되지 않았고, 섬유증변화는 4주경부터 일부분에서 경미하게 나타났으나 심한 섬유증 변화는 볼 수 없었다.

### 2. 고농도 BCG 주입군(Fig. 1B)

고농도 BCG를 주입 1주후에 상피하층의 결체

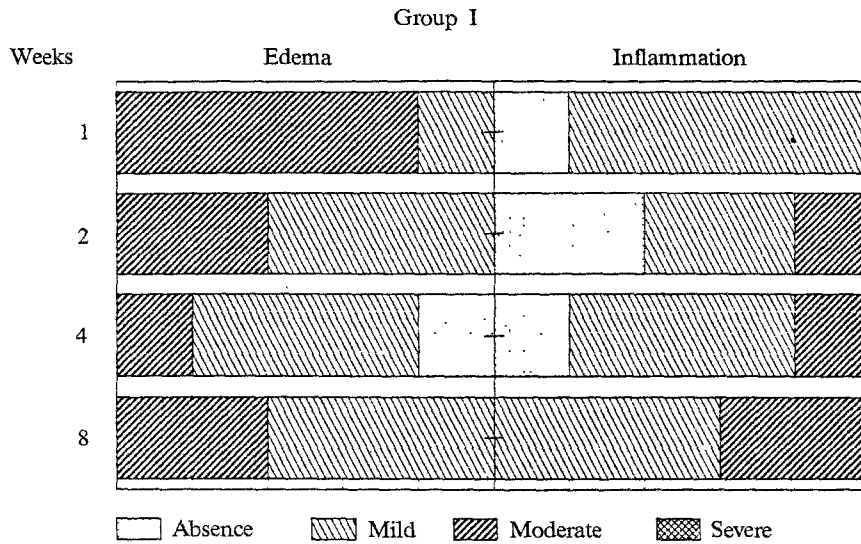


Fig. 1-A. Degree of edema and inflammation of bladder after instavesical low-dose BCG instillation.

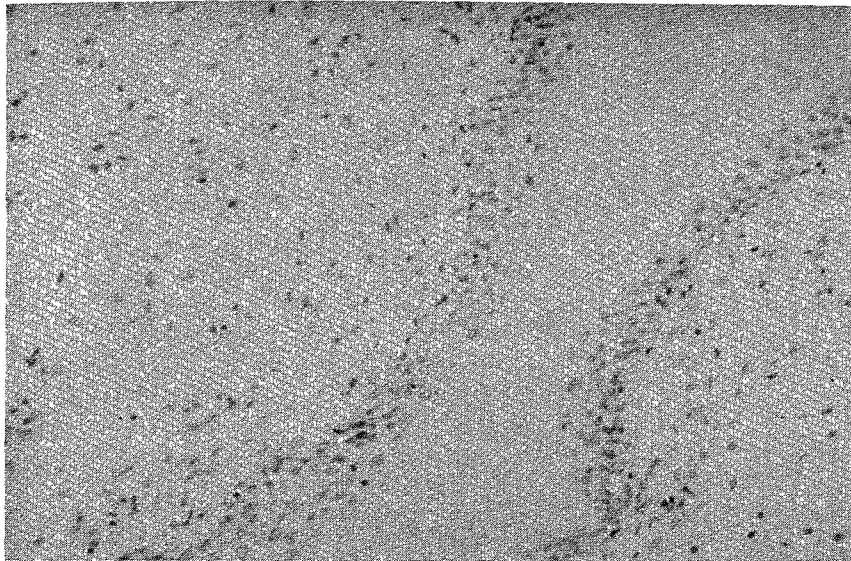


Fig. 2. BCG, low dose, on 4 weeks(H-E stain, ×100)  
: Moderate edema and mild congestion are noted.

조직내에 심한 부종 및 울혈소견이 관찰되었으며 경미한 염증세포 침윤 및 섬유증소견도 나타났다. 이와같은 소견은 2주후에도 관찰되다가 4주후부터는 부종 및 울혈소견이 중등도로 감소되었으나 염증세포 침윤 및 섬유증소견은 좀더 증가되는 소견을 나타냈다(Fig. 4). 8주경에는 중등도의 염증소견이 좀더 증가되어있는 소견을 볼 수 있었다

(Fig. 5). 또한 1례에서 괴양성 상피 세포의 탈락이 관찰되었으나 저농도 주입군에서와 같이 만성 육아종성 염증변화는 관찰되지 않았다.

### 3. 생리식염수 주입 대조군(Fig. 1C)

생리식염수를 방광내 주입 1주 2주 4주 및 8주 후에 관찰한 결과, 2주째에서 경한 부종 및 울혈 소견과, 8주째에 중등도의 부종 및 울혈, 경도의

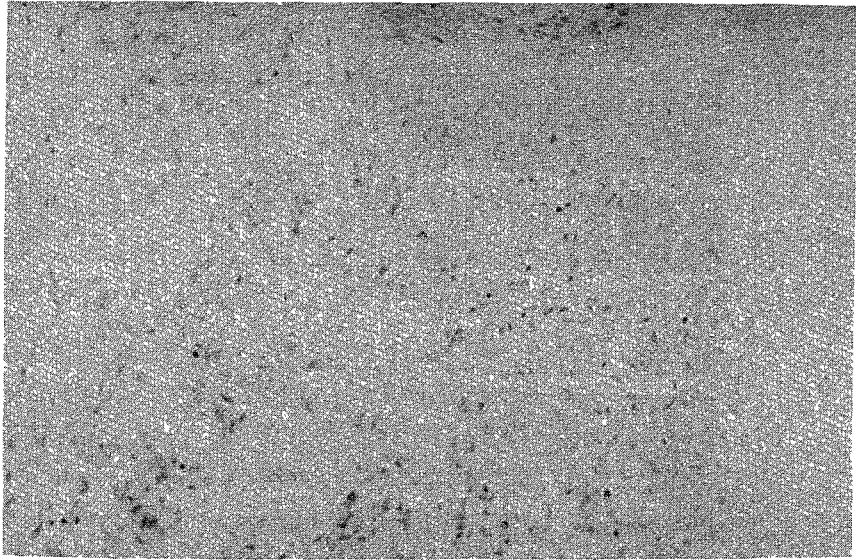


Fig. 3. BCG, low dose, on 8 weeks(H-E stain,  $\times 100$ )  
: Mild inflammation and mild fibrosis are noted.

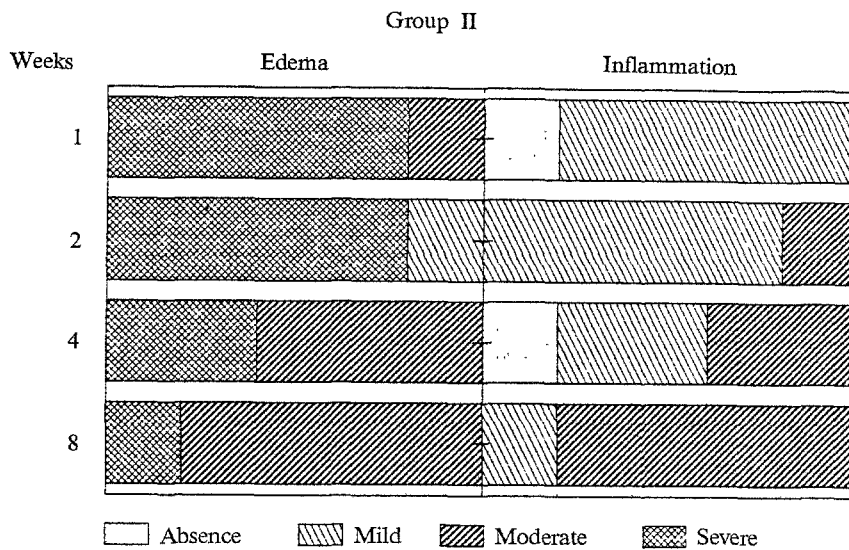


Fig. 1-B. Degree of edema and inflammation of bladder after instavesical high-dose BCG instillation.

염증세포 침윤이 관찰된 것외에는 특이한 변화가 없었다(Fig. 6)

## 고 안

BCG는 Calmette와 Guerin이 결핵균을 소의 담즙에서 계대배양하여 그 독성을 감소시킨 백신

개발에 성공한 후, 1921년 처음으로 임상에서 결핵감염 방지에 이용하였다<sup>3)</sup>. 그후 BCG가 생체의 면역기능을 높이는데도 탁월한 효과가 있고, 암에는 면역반응을 일으킬 수 있는 항원이 존재한다는 것이 알려져 BCG가 암을 방지할 수 있는 면역치료제라는 것이 밝혀졌다.

방광에서의 BCG에 의한 효과는 Coe등<sup>5)</sup>이 동물

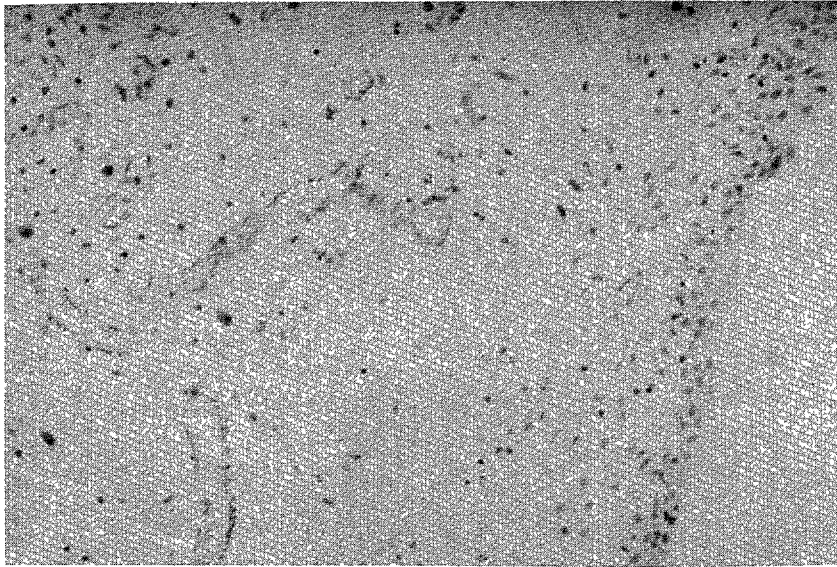


Fig. 4. BCG, high dose, on 4 weeks(H-E stain,  $\times 100$ )  
: Severe edema, severe congestion and mild inflammation are noted.



Fig. 5. BCG, high dose, on 8 weeks(H-E stain,  $\times 100$ )  
: Moderate inflammation and fibrosis are noted

실험을 통해 방광조직에서 지연성 과민반응이 나타남을 관찰하였고, Taranger<sup>6)</sup>과 Hakala<sup>7)</sup>은 방광종양에서의 면역반응을 관찰하므로써 방광암에서 BCG 사용의 이론적 기초를 확립하였다.

BCG 방광내 주입요법은 1976년 Morales<sup>8)</sup>가 처음으로 방광암환자에서 재발방지를 위해 방광에

BCG를 주입하는 면역요법을 시행하여 효과가 있음을 보고하였다. 그후 많은 임상적 관찰이 시행되었는데 표재성 방광암환자에서 BCG의 방광내 주입요법시 투베르쿨린반응이 음성에서 양성으로 전환시, 방광조직에 육아종 형성시 더 효과가 있는 것으로 미루어 BCG로 인한 생체내 세망내피계(re-

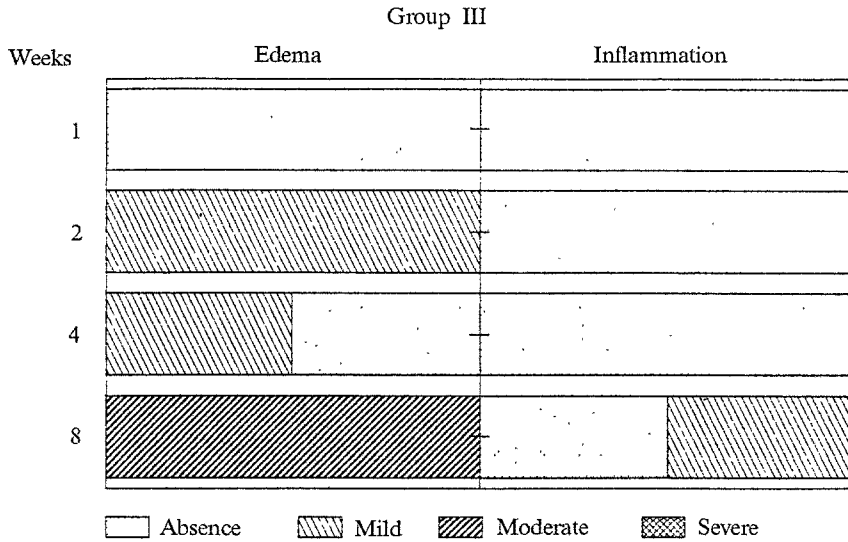


Fig. 1-C. Degree of edema and inflammation of bladder after instavesical normal saline instillation.

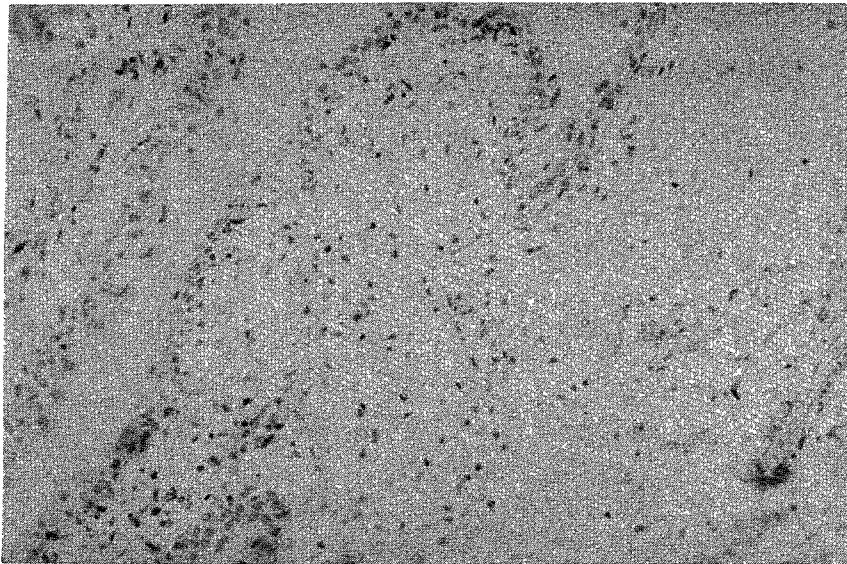


Fig. 6. Normal saline, on 8 weeks(H-E stain,  $\times 100$ )  
: Moderate edema and mild inflammation are noted.

ticuloendothelial system)의 활성화로 인한 항암면역반응의 증가가 주된 역할을 하는 것으로 알려졌다<sup>9)</sup>. 따라서 BCG의 항암효과를 위하여는 적절한 수이상의 결핵생균이 필요하고 숙주가 항원에 면역반응을 나타낼 수 있는 능력이 있어야 하며 종양과 BCG가 직접 접촉되어지고 종양의 크기가 작아야 한다<sup>10)</sup>.

BCG의 방광내 주입시 일어나는 항암기전으로는 첫째, BCG 생균이 대식세포를 활성화하여 일어나는 직접적인 염증반응, 둘째, BCG를 식작용한 대식세포가 BCG에 감염된 T 림파구를 자극하여 lymphokines을 분비하게 하는 지연성 면역반응, 셋째, BCG에 자극되어 증식되어진 T 림파구와 BCG 및 암세포 파편을 식작용하여 세포내에 갖고 있는

대식세포 사이의 상호작용에 의하여 일어나는 압조직 특이 면역등으로 이루어진다<sup>11)</sup>. 또한 BCG의 방광내 주입시 괴사성 병변에 의한 상피세포층의 탈락, 호중구의 암세포주위 침윤, 호중구를 둘러싼 암세포의 퇴행변성, 점막층과 점막하층에서의 임파구 증가, 대식세포의 출현등이 항암작용에 기여한다<sup>12)</sup>.

Coe등<sup>5)</sup>은 guinea pig의 방광조직에서 지연성 과민반응이 일어남을 관찰하였는데 임파구를 주로 하는 단핵세포의 침윤이 점막층에 주로 존재하고 호중구는 드물게 관찰되었다고 하였다. 본 실험에서도 점막층과 점막하층에 임파구의 증식과 함께 염증성 소견이 관찰되었으며 이는 BCG 주입자체에 의한 BCG염 내지 관련 염증성 반응 이외에도 지연성 과민반응, 압조직자체에 대한 생체반응등 여러인자가 작용하였으리라 생각된다.

Bast등<sup>13)</sup>은 BCG에 의해 유발되는 염증반응과 결핵균 항원작용으로 임파구 및 대식세포의 증가를 유발할 수 있으며 이는 직접 혹은 간접적으로 종양세포를 파괴 혹은 탐식할 수 있다고 하였다.

그러나 방광암에 대한 항암기전의 하나인 비특이적 염증반응이 종양 자체뿐만 아니라 비병변 부위에서도 만성 비특이적 염증성 변화를 일으킴으로 통상의 방광내 BCG주입으로 종양의 관해유도후의 추적 방광경 검사상에서 암종의 재발과 감별을 어렵게 하는 경우가 많다<sup>9)</sup>.

BCG주입후 방광의 특징적 조직학적 소견은 비특이적 염증반응 및 육아종의 형성이 가장 흔한 것으로 알려져 있는데, 보통 30일에서 40일후에 비병변 부위에서 100%의 염증성 변화와 23~59%의 육아종이 형성된다<sup>14)15)</sup>. 또한 Lage등<sup>12)</sup>은 마지막 치료 6개월후 거의 모든 환자에서 육아종이 형성됨을 보고하기도 하였다. Lamm등<sup>16)</sup>은 BCG에 의한 염증성 변화는 항암효과에 의해 수반되는 것으로 추측하였고, 거의 대부분인 94%에서 경한 방광염의 발생을 보고하였다. 하지만 이러한 정도의 차이는 사용된 BCG의 용량과 관련이 있는 것으로 추정된다<sup>1)</sup>.

본 실험에서는 저농도 및 고농도 BCG 주입군에서 마지막 BCG 주입 1주일 및 2주일후에는 부종 및 울혈소견이 주로 관찰되었으며, 4주후에는 방광점막 및 근육층에 임파구증식과 함께 만성 염

증소견이 나타났으나 양군에서 유의있는 차이는 없었고, 전형적인 결핵성 육아종의 형성은 전례에서 관찰되지 않았다. 하지만 염증소견은 8주째까지 점차 진행되는 양상을 보였고 이러한 염증의 정도는 저농도군에서보다는 고농도군에서 더 심했으며, 이로 추정하여 볼 때 염증소견을 보이는 기간도 더 오래 지속되리라 생각된다. 본 실험에서 결핵성 육아종이 전혀 관찰되지 않은 것은 추적 관찰기간이 짧은 점과 방광암을 가지지 않은 정상 백서의 방광을 대상으로 한 실험이기때문인 것으로 생각된다.

반복적인 방광내 BCG주입후에는 만성 염증반응으로 인해 방광 점막 이행상피세포의 증식이나 탈락현상이 오는데<sup>14)</sup>, 본 실험에서는 단기간의 추적 관찰때문인지 이행상피의 증식소견은 볼 수 없었고, 4주째 도살한 고농도군 1례에서만 상피세포의 탈락이 관찰되었다. 이러한 괴양성 상피세포의 탈락현상은 방광내 BCG 주입시의 항암기전중 하나라고 생각되어진다.

방광암 환자가 아닌 정상 백서 방광을 모델로 한 실험이지만 방광내 BCG 주입후 방광의 병리조직학적 변화중 염증소견은 8주경까지 지속적으로 진행되지만 방광암과의 혼돈을 주는 육아종 형성이나 괴양성 변화는 보이지 않으므로, 본 실험의 결과만 가지고 생각한다면 표재성 방광암환자에서 방광내 BCG 주입요법후에는 추적 방광경검사를 적어도 8주이후에 시행하는 것이 보다 혼돈을 피할 수 있으리라 생각되어진다.

## 결 론

표재성 방광암의 재발방지 및 치료를 위해 방광내 주입하는 BCG는 비병변 부위에 염증성변화를 일으켜 추적 방광경검사시 암재발과의 감별을 어렵게 하는 경우가 많다.

이에 저자는 Wister계 암컷 백서 40마리를 두군으로 나누어, 각각 Pasteure strain BCG를  $8 \times 10^6$  CFU/ml(I군)와  $12 \times 10^6$  CFU/ml(II군)로 희석하여, 0.2ml씩 1주일 간격으로 6회 방광내 주입하였고, 생리식염수를 동일 용량 및 횟수로 주입한 10마리를 대조군으로 하여, 마지막 BCG 주입후 1, 2, 4, 8주째 백서를 도살하여 방광을 적출한 후, BCG주입후 시간 및 용량에 따른 정상 방광조직의 병리

조직학적 변화를 관찰하였다.

1) BCG주입 2주후에는 방광점막 및 근육층에 임파구증식과 함께 만성 염증소견 및 점막하층이 두터워진 소견을 보였으며, 결핵성 육아종은 관찰되지 않았고, I군과 II군의 차이는 거의 없었다.

2) 염증소견은 8주경까지 점차 진행되었으나, I군보다 II군에서 염증의 정도가 더 심한 양상을 보였다.

3) 방광내 BCG주입의 항암기전증 하나라고 생각되는 괴양성 상피세포의 탈락은 4주째 도달한 II군의 1례에서만 관찰되었다.

이상으로 BCG 주입후 정상 방광의 병리조직학적 변화는 8주경까지 지속되는 것으로 생각되고, 장기적 변화에 대한 연구가 필요할 것으로 생각된다.

## References

- 1) Brosman SA : *Experience with Bacillus Calmette-Guerin in patients with superficial bladder carcinoma.* J Urol 1982 : 128 : 27-30
- 2) Dekernion JB, Huang MY, Linder A, Smith RB, Kaufman JJ : *The management of superficial bladder tumors and carcinoma in situ with intravesical Bacillus Calmette-Guerin.* J Urol 1985 : 133 : 598-601
- 3) Morales A, Ottenhof P, Emerson L : *Treatment of residual non-infiltrating bladder cancer with Bacillus Calmette-Guerin.* J Urol 1981 : 125 : 649-651
- 4) Lamm DL, Stogdill VD, STogdill BJ, Crispin RG : *Complications of Bacillus Calmette Guerin immunotherapy in 1,278 patients with bladder cancer.* J Urol 1986 : 135 : 272-274
- 5) Coe JE, Feldman JD : *Extracutaneous delayed hypersensitivity, particularly in the guinea pig bladder.* Immunology 1966 : 10 : 127-135
- 6) Taranger LA, Chapman WH, Hellstrom I, Hellstrom KE : *Immunological studies on urinary bladder tumors of rats and mice.* Science 1972 : 176 : 1337-1340
- 7) Hakala TR, Lange PH, Castro AE, Elliott AY, Fraley EE : *Antibody induction of lymphocyte mediated cytotoxicity against human transitional cell carcinoma of the urinary tract.* N Engl J Med 1974 : 291 : 637-641
- 8) Morales A, Eidinger D, Bruce AW : *Intracavitary Bacillus Calmette-Guerin in the treatment of superficial bladder tumors.* J Urol 1976 : 116 : 180-183
- 9) Kelley DR, Haaff EO, Becich M, Lage J, Bauer WC, Dresner SM, Catalona WJ, Ratliff TL : *Prognostic value of purified protein derivate skin test and granuloma formation in patients treated with intravesical Bacillus Calmette-Guerin.* J Urol 1986 : 135 : 268-271
- 10) Zbar B, Rapp HJ : *Immunotherapy of guinea pig cancer with BCG.* Cancer 1974 : 34 : 1532-1540
- 11) Merguerin PA, Donahue L, Cockett ATK : *Intraluminal interleukin 2 and Bacillus Calmette-Guerin for treatment of bladder cancer : A preliminary report.* J Urol 1987 : 137 : 216-219
- 12) Lage JM, Bauer WC, Kelley DR, Ratliff TL, Catalona WJ : *Histological parameters and pitfalls in the interpretation of bladder biopsies in Bacillus Calmette-Guerin treatment of superficial bladder cancer.* J Urol 1986 : 135 : 916-919
- 13) Bast RC, Zbar B, Brosos T, Rapp HJ : *BCG and cancer.* N Engl J Med 1974 : 290 : 1413-1420
- 14) Denkernion JB : *Imunotherapy of urological tumors.* London, Churchill Livingstone, 1990 : pp69-81
- 15) Torrence RJ, Kavoussi LR, Catalona WJ : *Prognostic factors in patients treated with intravesical Bacillus Calmette Guerin for superficial bladder cancer.* J Urol 1988 : 139 : 941-945
- 16) Lamm DL, Thor DE, Winters WD : *BCG immunotherapy of bladder cancer : inhibition of tumor recurrence and associated immune response.* Cancer 1981 : 82 : 1450-1454