

듀크스 병기 A, B 대장암에서 림프절 미세전이의 임상적 중요성

인하대학교 의과대학 외과학교실 및 ¹해부병리학교실

김태수 · 황재관 · 배선영 · 김양희 · 홍기천
안승익 · 허윤석 · 한혜승¹ · 우제홍

= Abstract =

Clinical Significance of Lymph Node Micrometastasis in Dukes' Stage A&B Colorectal Cancer: An Immunohistochemical Study

Tae Soo Kim, M.D., Jae Kwan Hwang, M.D., Sun Young Bae, M.D.
Yang Hee Kim, M.D., Kee Chun Hong, M.D., Seung Ik Ahn, M.D.
Yoon Seok Hur, M.D., Hye Seung Han, M.D.¹ and Ze Hong Woo, M.D.

Departments of Surgery and ¹Pathology, Inha University College of Medicine, Incheon, Korea

Purpose: Lymph node metastasis is the most important prognostic factor in colorectal cancer. However, 20~30% of patients with lymph node negative colorectal cancer die of recurrent disease. We investigated whether the detection of micrometastasis is of any clinical significance in Dukes' stage A & B colorectal cancer. **Methods:** Ninety patients who underwent curative resection of colorectal cancer from Aug. of 1996 to Jan. of 1999 were entered the study. For examination, we used paraffin blocks of lymph nodes which were metastasis-free by conventional histopathology. After preparation of tissue blocks using the serial sectioning technique, the specimens were stained with immunohistochemical method using anticytokeratin antibody. And the hematoxylin-eosin staining was repeated. **Results:** We disclosed micrometastases in 15 of 90 cases, mostly located in subcapsular sinuses. And in 8 of 15 cases, we also found metastases in repeated H&E staining. There were no significant relationship between the detection of micrometastases and the depth of wall invasion, the histological grade and the status of lymphovascular invasion. With median follow-up of 15 months, we found no significant difference in recurrence between the micrometastasis positive and negative groups. **Conclusions:** The result showed that the micrometastasis of lymph node in colorectal cancer might increase the risk for development of tumor recurrence. But because of small numbers of recurrent cases and relatively short follow-up period, there was no statistically significant relationship between micrometastasis negative and positive groups.

Key Words: Micrometastasis, Cytokeratin, Immunohistochemistry, Colorectal cancer

서 론

현재까지 대장암의 주치료방법은 근치적 수술이며 보조적으로 방사선치료와 항암화학요법 등이 이용되고 있다. 수술 후 대장암 환자의 예후에는 원발암의 장관벽 침윤의 정도, 림프절 전이여부, 원격전이, 조직학적 분화도 및 혈관-림프관 침습여부 등이 중요한 영향을 미친다고 알려져 있으며, 그 중에서 림프절의 전이 유무는 장관벽 침윤의 정도와 함께 듀크스 병기, TNM 분류를 구성하는 중요한 인자이다.^{1,3} 그러나 이러한 림프절 전이를 확인하기 위해 시행하는 통상적 병리조직 검사에서는 크기가 작은 전이 림프절을 놓치는 경우가 많고 또한 헤마톡실린-에오신 염색을 이용하기 때문에 미세전이는 발견할 수 없다.⁴ 이에 따라 암병기가 저평가될 수 있으며 이는 림프절 전이가 없었던 대장암 환자의 20~30%가 5년 이내에 재발하여 사망에 이르게 된다는 보고와 무관하지 않다.^{5,6}

Table 1. Clinical summary of 90 cases

Age (years)	34~78 (60.8±11.0)
Sex (Male : Female)	46 : 44 (1 : 0.96)
Stage (Astler-Coller)	
A	9 (10.0%)
B1	15 (16.7%)
B2	66 (73.3%)
Location of tumor (cases)	
Rectum	54 (60.0%)
Sigmoid colon	17 (18.9%)
Ascending colon	15 (16.7%)
Descending colon	3 (3.3%)
Transverse colon	1 (1.0%)
Types of operation (cases)	
Low anterior resection	25 (27.8%)
Anterior resection	24 (26.7%)
Abdomino-perineal resection	18 (20.0%)
Rt. hemicolectomy	18 (20.0%)
Hartmann's operation	2 (2.2%)
Lt. hemicolectomy	2 (2.2%)
Transverse colectomy	1 (1.1%)

그러나 최근에 이르러서는 역전사효소-중합효소연쇄반응(RT-PCR: Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction) 등을 이용하는 분자 생물학적인 방법과⁷⁻¹⁰ 항cytokeratin 항체를 이용하는 면역조직화학 염색법의 발달로 헤마톡실린-에오신 염색법으로 발견할 수 없었던 미세전이를 발견할 수 있게 되었으며 이러한 미세전이가 수술 후 환자의 생존율에 미치는 영향에 대하여 많은 연구가 보고되고 있다.^{1,2,11-16}

본 논문에서는 근치적 절제술을 시행하였던 듀크스병기 A, B 환자 90예의 조직에서 항cytokeratin 항체를 이용한 면역조직화학 염색법으로 미세전이를 발견하고, 나아가 이러한 미세전이가 수술 후 재발을 예측할 수 있는 인자로서 가치가 있는지를 후향적인 방법으로 알아보려고 하였다.

대상 및 방법

1) 대상

1996년 8월부터 1999년 1월까지 30개월 동안 인하대학교병원 일반외과에서 대장암 진단하에 근치적 절제술을 시행받았던 환자들 중 림프절 전이가 없었던 듀크스 병기(Astler-coller criteria) A와 B 환자 90예를 대상으로 하였다. 이 중 남자가 46명(51.1%), 여자는 44명(48.9)이었으며 나이는 34세부터 78세까지였다(평균 60세).

원발암의 위치를 보면, 직장이 54예(60.0%), 에스상결장이 17예(18.9%), 상행결장이 15예(16.7%), 하행결장이 3예(3.3%), 횡행결장이 1예(1.0%)였다. 수술 방법으로는 저위전방절제술이 25예(27.8%)로 제일 많았으며 전방절제술이 24예(26.7%), 복회음절제술 18예(20.0%), 우반결장절제술 18예(20.0%), 하트만씨 수술 2예(2.2%) 좌반결장절제술 2예(2.2%), 횡행결장절제술 1예(1.1%)순이었다(Table 1).

2) 방법

(1) 임상적 관찰: 각 대상환자의 입원 및 외래 의무기록지를 기초자료로 하였으며 외래 추적관찰이 미흡했던 환자들은 개별 전화면담을 통하여

확인하고자 노력하였다. 총 90예 중 86예는 관찰 기간 종료일(1999. 4)까지 추적관찰이 가능하였으며 평균 관찰기간은 14±8.9개월이었다.

(2) 면역조직화학염색방법: 90예의 검체에서 1369개의 림프절조직을 얻었으며(1예당 평균 15.7개), 이 포매된 파라핀 블록을 이용하여 연속적인 절편을 만든 뒤 헤마톡실린-에오신 염색과 면역조직화학적 염색을 시행하였다. 먼저 4 μm의 두께로 박절한 파라핀 포매 조직을 poly-L-lysine을 덮은 슬라이드에 놓고 섭씨 60도 항온조에서 60분 동안 건조시켰다 통상의 방법으로 파라핀을 제거한 후 증류수로 씻고 섭씨 37도 항온조에서 랩신으로 10분간 처리 후 3% 과산화수소로 10분 동안 처리하고 PBS (phosphate buffered saline) 용액으로 세척하였다. 여기에 1차항체 low molecular weight cytokeratin (35bH11, DAKO, 1 : 50, carpinteria, CA, USA, CK No 8)을 떨어뜨린 후 상온에서 한시간 동안 반응시켰다. PBS용액으로 1차 항체와의 반응을 중지시키고 연결항체(linked antibody: biotiny-

lated horse anti-mouse serum)으로 처리하여 10분간 상온에서 반응시켰다. PBS 용액으로 세척한 후 표지항체(labeled antibody: avidine-biotinylated peroxidase complex)로 15분간 반응시켰다. 발색을 위하여 Tris완충액 10 ml에 diaminobenzene stock 8 mg과 34% 과산화수소 7 μl를 혼합하여 사용하였으며 증류수로 10분간 세척한 후 hematoxylin으로 3분 동안 대조염색하였다. 1차항체와 이후의 과정은 Immunotech사의 streptavidine biotin universal detection system을 사용하였다.

(3) 통계적 처리방법: 미세전이와 다른 예후인자와의 관계, 예후인자들이 재발에 미치는 영향에 대한 분석을 시행하였으며, 통계처리는 PC-SAS (ver. 6.12)를 이용하였다. Chi-square test, Fisher's exact test와 Mantel-Haenszel trend test를 이용하였고 P값이 0.05 이하인 경우에 통계적으로 유의한 차이가 있다고 정하였다.

결 과

1) 면역조직화학염색 결과

헤마톡실린-에오신 염색 결과 90예 중 8예에서 10개의 림프절 전이가 확인되었으며, 면역조직화학 염색 결과 90예 중 15예에서 31개의 cytokeratin 염색 양성인 미세 림프절 전이가 발견되었다(1예당 평균 2.07개). 이 중 헤마톡실린-에오신 재염색에서도 림프절 전이가 확인된 8예를 제외하고 난 7예에서는 16개의 cytokeratin 염색 양성인 림프절 전이가 있었다(1예당 평균 2.29개)(Table 2). 발견된 전이 암세포는 주로 림프절의 subcapsular sinus에 위치하고 있었다(Fig. 1).

2) 다른 예후인자와 미세전이와의 관계

미세전이 유무를 다른 예후인자들과 비교해 보았다. 장관벽 침윤 정도를 듀크스 A, B1, B2 (Astler-Coller Modification of Dukes' Classification)로 표시하였을 때, A에서 1예, B2에서 6예가 cytokeratin 염색 양성이었다. 조직학적 분화도에 따라 고분화, 중분화, 저분화로 나누었을 때, 각각의 양성률

Table 2. The result of immunohistochemical staining & redo H&E staining

Case	H&E staining	Redo H&E	Cytokeratin staining
1	0/11	0/11	1/11
2	0/24	1/24	1/24
3	0/26	1/28	2/28
4	0/43	1/44	1/44
5	0/19	1/20	1/20
6	0/15	0/14	2/14
7	0/16	0/17	1/16
8	0/13	0/14	2/14
9	0/29	1/28	5/25
10	0/22	0/22	7/22
11	0/26	0/25	1/26
12	0/12	1/14	1/14
13	0/19	3/20	3/20
14	0/10	1/9	1/9
15	0/9	0/15	2/9
	0/294	11/305	31/296

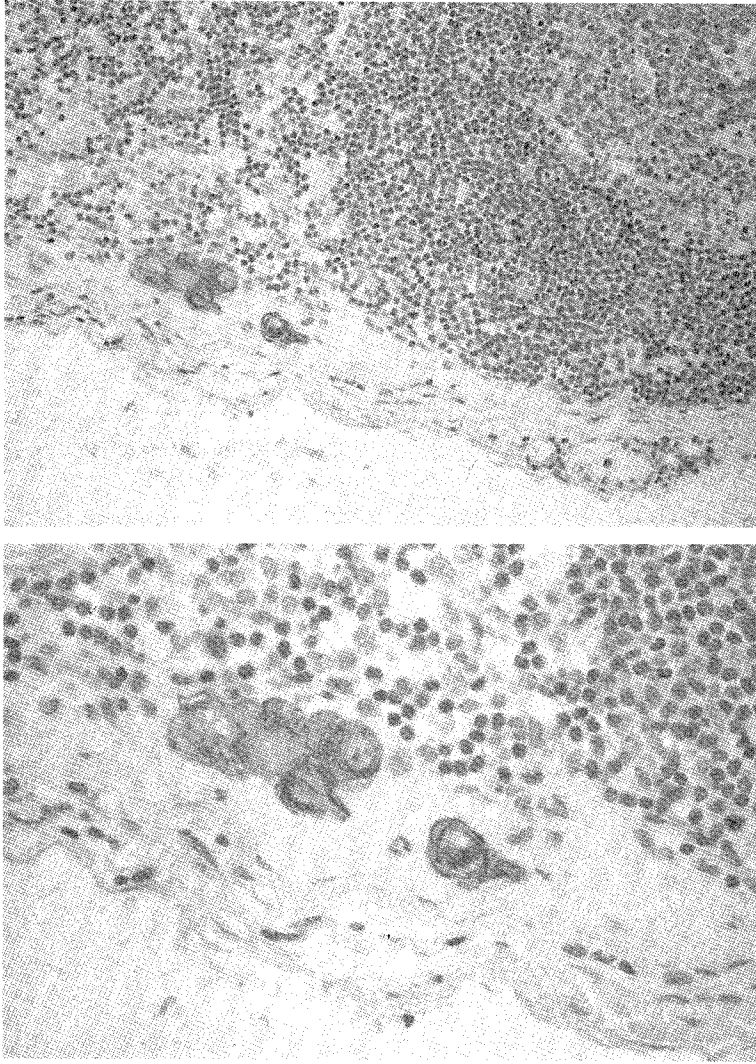


Fig. 1. (Top) Lower-power photomicrography of lymph node showing cytokeratin-positive tumor cells seen in the subcapsular sinus ($\times 200$). (Bottom) High-power view of cytokeratin-positive tumor cells in the top photo showing cytologic features of malignancy ($\times 400$).

은 7.7%, 9.8%, 0.0%로 각 군간에 유의한 차이가 없었으며, 림프관-혈관 침습이 없는 군과 있는 군을 비교해 보았을 때도 각각 8.1%, 10.0%로 두 군간에도 차이가 없었다(Table 3).

3) 미세전이와 재발과의 관계

수술 후 대부분의 환자는 외래를 통하여 정기적인 추적관찰이 진행되었으며, 수술 후 1년간은

약 2개월에 한 번씩 이학적인 검사와 혈중 CEA치를 검사하고, 그 후 1년간은 3~4개월 간격으로 이학적인 검사와 혈중 CEA 검사를 시행하였으며, 6개월 간격으로 단순흉부촬영을 시행하였다. 재발이나 원격전이가 의심되는 경우 컴퓨터단층촬영, 자기공명영상촬영, 초음파조영술 및 대장내시경 등을 시행하여 확인하였다.

총 90예 중 86예에서 1999년 4월까지 추적이 가

Table 3. Relationship between micrometastasis (cytokeratin-positive) and other prognostic variables

Variable	Cytokeratin-positive	P-value*
Stage (Astler-Coller)		
A	1/9 (11.1%)	0.453
B1	0/14 (0.0%)	
B2	6/59 (10.2%)	
Histologic grade		
Well differentiated	2/26 (7.7%)	0.743
Moderately differentiated	5/51 (9.8%)	
Poorly differentiated	0/5 (0.0%)	
Lympho-vascular invasion		
Negative	5/62 (8.1%)	0.788
Positive	2/20 (10.0%)	

*Chi-square test

Table 4. Recurrence according to prognostic variables

Variable	Recurrence	P-value
Cytokeratin		
Negative	7/75 (9.3%)	0.168*
Positive	2/7 (28.6%)	
Stage (Astler-Coller)		
A	0/0 (0.0%)	0.068 [†]
B1	0/14 (0.0%)	
B2	9/59 (15.3%)	
Histologic grade		
Well differentiated	3/26 (11.5%)	0.848 [†]
Moderately differentiated	5/51 (9.8%)	
Poorly differentiated	1/5 (20.0%)	
Lympho-vascular invasion		
Negative	5/62 (8.1%)	0.211*
Positive	4/20 (20.0%)	

*Fisher's exact test, [†]Mantel-Haenszel trend test

능하였으며, 1예의 사망 환자를 포함하여 총 11예에서 재발이 확인되었다. 사망환자의 경우 술 후 4개월에 국소재발이 확인되었으나 더 이상의 치료를 받지 않고 5개월 뒤 사망하였으며, 11예의 재발 중 간으로 원격전이된 예가 5예였고 나머지는 국소 재발이었다.

Cytokeratin 염색 양성이었던 15예 중 4예(26.7%)에서 재발하였으며 헤마톡실린-에오신 재염색에서도 전이가 발견된 8예를 제외한 7예 중 2예(28.6%)에서 재발이 있었으며 나머지 75예 중 7명(9.3%)에서 재발하였으며 두 군간 재발률을 비교하였을 때 유의한 차이는 없었다(Table 4).

고 찰

대장암의 주된 치료법은 근치적 수술이며 수술 후 환자의 예후를 결정하는 가장 중요한 인자는 원발암의 장관벽 침윤 정도와 림프절 전이 여부이다.^{1,3} 그러나 근치적 수술 후 림프절 전이가 없는 경우에도 약 20~30%에서 5년 이내 재발하여 사망하게 된다.^{5,6} 대장암에서 림프절 전이 여부가 예후에 미치는 중요성을 고려해 볼 때, 헤마톡실린-에오신염색법을 이용하는 통상적 병리 검사에

서 림프절 전이가 발견되지 않아 병기가 저평가(down staging)되거나, 헤마톡실린-에오신 염색 방법으로는 발견할 수 없는 미세전이가 수술 후에 증식하여 국소재발과 원격전이에 커다란 영향을 미친다고 볼 수 있다.

술 후 일반적인 병리조직검사에서는 림프절조직을 발견하기 위하여 보고, 만지고, 잘라보는 방법을 사용하고 있으며 이러한 방법으로는 5 mm 이하의 작은 림프절을 발견하는 데 제한이 있다.⁴ 일반적으로 림프절이 클수록 전이의 가능성이 크다고 생각할 수 있으나 림프절 크기가 5 mm 이하인 경우에도 상당수에서 전이가 발견되었다는 결과^{17,26}를 고려할 때 작은 림프절까지 포함하여 가능한 많은 림프절조직을 획득해야 전이 림프절을 발견하지 못해 병기가 저평가되는 결과를 피할 수 있을 것이다.^{4,18} 전이 림프절을 발견하지 못해 병기가 절하되는 것을 막기 위해 Maurel등¹⁹은 최소한 8개 이상의 림프절을 획득하여야 한다고 하였으며, Tang등²⁰은 최소한 10개 이상을, Scotte와 Grace²¹는 13개 이상을 조사해야 한다고 주장하였다. 또한 Calpin등²²의 연구에서는 술 후 조직검사 에서 6개 이하의 림프절 만을 발견할 수 있었던

군에서 그보다 많은 수의 림프절을 검사하였던 군에 비해 술 후 예후가 좋지 않았으며, 따라서 몇 개의 림프절을 검사하였는가를 반드시 표기하여야 한다고 하였다.

가능한 한 많은 수의 림프절을 획득하기 위해 여러 방법들이 시도되어 왔으며 그 중 화학적 처리를 통해 검체에서 지방을 제거하는 방법이 많이 이용되어 왔다.^{21,23-25} Collier²⁵은 이 방법을 이용하여 모든 듀크스 병기 환자들 중 60.9%에서 전이 림프절을 발견할 수 있었다고 했으며, Cawson²³ Scott²¹은 통상적 방법에 비해 더 많은 전이 림프절을 발견할 수 있었다고 보고하였다. Hyder²⁴은 지방제거 방법을 통하여 듀크스 병기 C 환자 244명 중 28.2%의 환자에서 림프절 전이를 발견하였고 1예당 평균 27개 림프절 중 4.5개에서 전이가 있었다고 하였다. 또한 Herrera²⁶은 결장암에서의 림프절 전이는 5 mm 이하의 작은 림프절에서 자주 일어나며 지방제거 방법을 통하여 이렇게 작은 림프절 발견율이 높아졌다고 보고하였다. 그러나 이러한 지방제거를 시행하는 방법이 시간과 노력이 많이 소요되어 일반병원에서 모든 경우에 적용하기에는 어렵다. 이에 병리조직 검사 시 검체를 처리하는 과정에서 간단한 조작만으로도 림프절 발견율을 높힐 수 있는 방법이 연구되고 있다 Ratto¹⁵은 검체조직 전체를 함께 고정하지 말고 암이 있는 대장부위에서 장간막을 분리한 뒤 잘 펴서 고정하였을 때 더 많은 수의 전이 림프절을 발견할 수 있었다고 보고하였다. 또한 일반적으로 한두 개의 절편만을 검사하는 통상적인 술후 병리조직검사에서 림프절 전이가 없었던 경우에 연속적인 추가 조직절편을 만들면 보다 많은 림프절 전이가 발견될 수 있다고 알려져 있으며 Gusterson¹³은 이 방법을 통하여 통상적 병리조직검사에서 림프절 전이가 없었던 환자 중 20%에서 전이 림프절을 발견할 수 있었다고 보고하였다. 본 연구에서도 면역조직화학 염색을 위하여 연속적인 조직 절편을 만들어 헤마톡실린-에오신 염색을 재시행한 결과 림프절 전이가 없었던 90예 중 8예(8.9%)에서 림프절 전이를 추가로

확인할 수 있었으며 이들 8예 모두 cytokeratin 염색에서도 양성으로 나타났다.

림프절 전이가 없었던 환자들 중에서 예후가 좋지 않을 것으로 예상되는 환자들을 미리 알아 내 항암화학요법이나 방사선치료 등의 보조치료를 시행하는 것이 환자의 생존을 향상에 도움이 된다고 생각할 때,²⁷⁻²⁹ 림프절 미세전이 여부를 확인하여 이러한 미세전이가 예후에 미치는 영향을 알아보는 것이 큰 의의가 있을 것이다. 최근에 와서 이러한 미세전이를 발견하기 위하여 유전자적 방법과 면역조직화학 염색법을 이용하는 방법들이 많이 연구되고 있다. 유전자적 방법으로는 RT-PCR (reverse transcriptase-polymerase chain reaction) 을 이용한 방법이 많이 쓰고 있으며,⁷ Hayashi⁸은 림프절에서 K-ras and/or P53 변이세포를 찾기 위해 이 방법을 사용하였으며, Mori¹⁰, Liefers⁹은 CEA-mRNA를 통해 미세전이를 확인하고자 하였고 이러한 방법을 통하여 확인된 미세전이가 환자의 예후와 밀접한 관계가 있다고 하였다. 면역조직화학염색을 통해 림프절에 있는 전이 암세포를 발견하기 위해서는 신뢰할 수 있는 상피세포의 표지자가 필요하게 되는데, cytokeratin은 세포질내 intermediate filament로 세포의 골격을 구성하는 주요 물질이며 상피세포 분화를 보이는 세포에만 존재하고 원발암 세포뿐만 아니라 전이 암 세포에서도 그 원형이 보존되는 특성이 있어 상피세포 표지자로서의 조건을 충족시켜 주고 있다.⁶ 또한 항cytokeratin 항체를 이용한 면역조직화학 염색방법은 유전자적 분석방법에 비해 시행방법이 간편하여 이를 이용한 많은 연구들이 보고되고 있으며^{5,7,9,11-17} Sasaki³⁰은 항cytokeratin항체를 이용한 면역조직화학 염색법과 K-ras를 이용하는 유전자 분석법을 비교하였을 때 항cytokeratin 항체를 이용하는 방법이 보다 예민하고 특이적인 결과를 보였다고 보고하였다.

본 연구에서는 항cytokeratin항체를 이용한 조직면역화학 염색법으로 듀크스 병기 A, B 환자 90예 중 15예(16.7%)에서 미세전이를 확인하였는데 이 수치는 다른 연구들^{11,12}에 비해서는 약간 낮은

수치를 보여 주고 있으며 이는 이들 연구에서 복합항체를 사용하였기 때문에 검출률이 높아졌을 것으로 생각된다.

환자의 예후에 미치는 영향에 대한 여러 보고들에 의하면 유방암, 악성흑색종, 위암 등에서 미세전이가 있는 경우 술 후 장기 생존율이 낮아졌다고 보고되었다.³¹⁻³⁴ 대장암의 경우에 있어서 미세전이가 술 후 생존율에 미치는 영향에 대한 연구들을 살펴보면 연구자들에 따라 다른 결과를 보고하였다. Cutait 등¹¹은 듀크스 A, B 대장암환자의 5년 추적 관찰 결과, 미세전이의 유무에 따른 생존율의 차이가 없다고 보고하였으며, Jeffers 등¹⁴의 연구에서도 미세전이는 환자의 나이, 성, 원발암의 위치, 크기, 조직학적 분화도 등과 상관관계가 없었으며 미세전이 유무에 따른 10년 생존율에도 차이가 없었다고 하였다. Broll 등⁵은 미세전이 여부와 TNM암병기, 암의 조직학적 분화도 사이에 상관관계가 있었으나 미세전이 유무에 따른 무재발 생존율(disease-free survival)에는 차이가 없었다고 보고하였다. Adell 등⁶도 미세전이 여부에 따른 예후는 임상적으로 큰 차이가 없었다고 보고하였다. 반면 Greenson 등¹²은 50예의 듀크스 B 대장암 환자 연구에서 림프절 미세전이가 있는 경우 예후가 좋지 않았으며, cytokeratin 염색 양성인 듀크스 B 환자의 5년 생존율은 전체적으로 듀크스 C 환자의 생존율에 더 가깝고 cytokeratin 음성인 듀크스 B 환자의 생존율은 듀크스 A 환자의 생존율과 유사하다고 하였다. Sasaki 등³⁰은 림프절 전이가 없었던 대장암에서 재발군과 비재발군으로 나누어 각각의 미세전이 여부를 확인하였을 때 재발군에서 더 많은 수의 미세전이를 발견할 수 있었다고 하였다.

본 연구에서는 cytokeratin 양성인 환자 15명 중 4명(26.7%)에서 재발하였고 cytokeratin 음성인 환자 75명 중 7명(9.3%)에서 재발하였다. 이 중 헤마톡실린-에오신 재염색에서도 양성이었던 8예를 제외하면, cytokeratin 양성인 7예 중 2(28.6%)예가 재발하여, cytokeratin 음성인 환자에서의 재발률에 비해 높게 나타났으나 통계적인 유의성은 없

었다.

림프절에서 전이 세포가 발견되는 것은 원발병소에서 림프절로 암세포가 이동하고 있다는 것이며 이는 곧 병의 진행을 의미한다. 이러한 림프절 전이를 조기에 발견할 수 있다면 술 후 환자의 예후에 대한 예측과 이에 따른 보조치료시행의 결정에도 많은 도움이 될 것이다. 이점에서 항cytokeratin 항체 등을 이용한 림프절 미세전이 발견이 큰 의의가 있다. 본 연구에서는 cytokeratin 염색 양성인 경우에 재발률이 높게 나타나긴 했지만, 전체 증례 수에 비해 cytokeratin 염색 양성인 예와 재발의 빈도가 적고 관찰기간이 비교적 짧아서 통계적으로 유의한 결과가 나오지 못한 것으로 생각된다. 향후 림프절 미세전이가 대장암 환자의 예후에 미치는 영향에 대하여 많은 환자들을 대상으로 하는 전향적인 연구가 필요할 것으로 생각된다.

결 론

저자 등은 1996년 8월부터 1999 1월까지 인하대병원에서 대장암 진단하에 근치적 절제술을 시행받았던 환자 중 림프절 전이가 없었던 90예의 검체를 이용하여 헤마톡실린-에오신 염색을 재시행하고 항cytokeratin 항체를 이용한 조직면역화학 염색법을 시행하여 림프절 미세전이를 확인하였으며, 미세전이가 환자의 재발에 미치는 영향에 대한 분석을 통하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1) 전체 90예 중 15예에서 cytokeratin 염색 양성으로 나타나 미세전이가 확인되었으며, 15예 중 8예에서는 림프절 조직의 연속적인 절제를 통해 재시행한 헤마톡실린-에오신 재염색에서도 전이가 확인되었다.

2) 미세전이 여부와 다른 예후인자들과의 연관성을 조사하였다. 장관벽 침윤 정도에 따른 cytokeratin 염색 양성률은, 듀크스 A, B1, B2에서 각각 11.1%, 0.0%, 10.2%로 차이가 없었고(P=0.453), 조직학적 분화도에 따라 고분화, 중분화, 저분화로 나누었을 때, 각각의 양성률은 7.7%, 9.8%, 0.0%

로 각 군간에 차이가 없었으며($P=0.743$), 림프-혈관계 침습이 없는 군과 있는 군을 비교해 보았을 때도 각각 8.1%, 10.0%로 차이가 없었다($P=0.788$).

3) 평균 15개월간의 관찰기간 동안 90예 중 11예에서 재발이 확인되었으며 cytokeratin 양성이었다. 15예 중 4예에서 재발하였으며(26.7%) 15예 중 헤마톡실린-에오신 재염색에서도 전이가 발견된 8예를 제외한 7예 가운데 2예(28.6%)에서 재발이 있었으며 나머지 75예 중 7명(9.3%)에서 재발하여 미세전이가 있는 군에서 재발이 많은 경향을 보였으나 유의한 차이는 없었다($P=0.168$).

이와같은 결과에 따라 술 후 시행한 통상적 조직검사에서 림프절 전이가 없었던 환자들 중 연속적 추가절편을 이용한 헤마톡실린-에오신 염색을 시행하였을 때 추가로 림프절 전이를 찾을 수 있었고, 항cytokeratin항체를 이용한 면역조직화학염색법을 통하여 미세전이를 확인할 수 있었으며 이러한 미세전이가 있는 경우 환자의 재발률이 높아질 수 있을 것으로 예상되나 본 연구에서는 비교적 짧은 관찰기간과 적은 수의 재발로 인하여 통계적인 유의성은 없었다. 향후 더 많은 환자들을 대상으로 하는 전향적인 연구가 필요할 것으로 생각된다.

REFERENCES

1. Dukes CE, Bussey HJ. The spread of rectal cancer and its effect on prognosis. *Br J Surg* 1958;12:309-20.
2. Astler VB, Coller FA. The prognostic significance of direct invasion of carcinoma of the colon and rectum. *Ann Surg* 1954;139:846-52.
3. Cohen AM, Tremitera S, Candela F, Thaler HT, Sigurdson ER. Prognosis of hode-positive colon cancer. *Cancer* 1991;67:1859-61.
4. Crucitti F, Doglietto GB, Bellantone R, Sofo L, Bossola M, Ratto C, et al. Accurate specimen preparation and examination is mandatory to detect lymph nodes and avoid understaging in colorectal cancer. *J Surg Oncol* 1992;51(3):152-7.
5. Bröll R, Schauer V, Schimmelpenning H, Strik M, Woltmann A, Bruch HP, et al. Prognostic relevance of occult tumor cells in lymph nodes of colorectal carcinomas: an immunohistochemical study. *Dis Colon Rectum* 1997;40(12):1465-71.
6. Adell G, Boeryd B, Franlund B, Sjudahl R, Hakansson L. Occurrence and prognostic importance of micrometases in regional lymph nodes in Dukes' B colorectal carcinoma: an immunohistochemical study. *Eur J Surg* 1996;162(8):637-42.
7. Futumura M, Tagkagi Y, Koumura H, Kida H, Tanemura H, Shimokaya K. Spread of colorectal cancer micrometastases in regional lymph nodes by reverse transcriptase-polymerase chain reactions for carcinoembryonic antigen and cytokeratin 20. *J Surg Oncol* 1998;68:34-40.
8. Hayashi N, Arakawa H, Nagase H, Yanagisawa A, Kato Y, Ohta H, et al. Genetic diagnosis identifies occult lymph node metastases undetectable by the histopathological method. *Cancer Res* 1994;54:3853-6.
9. Liefers GJ, Clenton-Jansen AM, van de Velde CJ, Hermans Jo, van Krieken JHJM, Cornelisse CJ, et al. Micrometastasis and survival in stage II colorectal cancer. *N Engl J Med* 1998;339:223-8.
10. Mori M, Minori K, inoue H, Barnard GF, Tsuji K, Nanbara S, et al. Detection of cancer micrometastasis in lymph node by reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *Cancer Res* 1995;55:3417-20.
11. Cutait R, Alves VAF, Lopes LC, Cutait DE, Borges JLA, Singer J, et al. Restaging of colorectal cancer based on the identification of lymph node micrometastasis through immunoperoxidase staining of CEA and cytokeratins. *Dis Colon Rectum* 1991;34:917-20.
12. Greenson JK, Isenhardt CE, Rice R, Mojzisek C, Houchens D, Martin EW. Identification of occult micrometastasis in pericolic lymph nodes of Dukes' B colorectal cancer patients using monoclonal antibodies against cytokeratin and CC49. *Cancer* 1994;73:563-9.
13. Gusterson B. Are micrometastasis clinically relevant? *Br J Hosp Med* 1992;47:247-8.
14. Jeffers MD, O'Dowd GM, Mulcahy H, Stagg M, O'Donoghue DP, Toner M. The prognostic significance of immunohistochemically detected lymph node micrometastases in colorectal carcinoma. *J Pathol* 1994;172(2):183-7.
15. Ratto C, Sofo L, Ippoliti M, Merico M, Vecchio FM, Doglietto GB, et al. Accurate lymph-node detection in colorectal specimens resected for cancer is of prognostic significance. *Dis Colon Rectum* 1999;42(2):143-54.
16. Sasaki M, Watanabe H, Jass JR, Ajioka Y, Kobayashi M, Matsuda K, et al. Occult lymph node metastases

- detected by cytokeratin immunohistochemistry predict recurrence in node negative colorectal cancer. *J Gastroenterol* 1997;32(6):758-64.
17. Haboubi NY, Abdalla SA, Amini S, Clark P, Dougal M, Dube A, et al. The novel combination of fat clearance and immunohistochemistry improves the outcomes of patients with colorectal carcinomas: a preliminary study. *Int J Colorectal Dis* 1998;13(2):99-102.
 18. Natsugoe S, Aiko T, Shimazu H. A detailed histological study on occult metastasis of the lymph nodes. *Jpn J Surg* 1991;21(5):528-32.
 19. Maurel J, Launoy G, Grosclaude P, Gignoux M, Arveux P, Mathieu-Daude H, et al. Lymph node harvest reporting in patients with carcinoma of the large bowel: a french population-based study. *Cancer* 1998;82(8):1482-6.
 20. Tang R, Wang JY, Chen JS, Chang Chien CR, Tang S, Lin SE, et al. Survival impact of lymph node metastasis in TNM stage III carcinoma of the colon & rectum. *J Am Coll Surg* 1995;180:705-12.
 21. Scott KW, Grace RH. Detection of lymph node metastasis in colorectal carcinoma before and after fat clearance. *Br T Surg* 1989;76:1165-7.
 22. Caplin S, Cerottini, Bosman FT, Constanda MT, Givel JC. For patients with Dukes' B (TNM stage II) colorectal carcinoma, examination of six or fewer lymph nodes is related to poor prognosis. *Cancer* 1998;83(4):666-72.
 23. Cawthorn SJ, Gibbs NM, Marks CG. Clearance technique for the detection of lymph nodes in colorectal cancer. *Br J Surg* 1986;73:58-60.
 24. Hyder JW, Talbott TM, Maycroft TC. A critical review of chemical lymph node clearance and staging of colon and rectal cancer at Ferguson Hospital, 1977-1982. *Dis Colon Rectum* 1990;33:923-5.
 25. Collier FA, Kay EB, MacIntire RS. Regional lymphatic metastases of carcinoma of colon (letter). *Ann Surg* 1941;114:56.
 26. Herrera-Ornelas L, Justiniano J, Castillo N, Petrelli NJ, Stulc JP, Mittelman A. Metastases in small lymph nodes from colon cancer. *Arch Surg* 1987;122(11):1253-6.
 27. Gunderson LL, Marterson JA. Postoperative adjuvant irradiation with or without chemotherapy for rectal carcinoma. *Seminars in Radiat Oncol* 1993;3:55-63.
 28. Laurie JA, Moertel CG, Fleming TR, Wieand HS, Leigh JE, Rubin J, et al. Surgical adjuvant therapy of large bowel carcinoma: An evaluation of levamisole and combination of levamisole and fluorouracil. *J Clin Oncol* 1989;7:1447-56.
 29. Willet CG, Tepper JE, Kaufman DS, Shellito PC. Adjuvant postoperative radiation therapy for colonic carcinoma. *Sem Radiat Oncol* 1993;3:64-7.
 30. Sasaki M, Watanabe H, Jass JR, Ajioka Y, Kobayashi M, Hatakeyama K. Immunoperoxidase staining for cytokeratin 8 and 18 is very sensitive for detection of occult node metastasis of colorectal cancer: a comparison with genetic analysis of K-ras. *Histopathology* 1998;32(3):199-208.
 31. Cochran AJ, Wen DR, Morton DL. Occult tumor cells in the lymph nodes of patients with pathological stage malignant melanoma. *Am J Surg Pathol* 1998;12:612.
 32. Dowlatshahi K, Fan M, Snider HC, Habib FA. Lymph node metastases from breast carcinoma: reviewing the dilemma. *Cancer* 1997;80(7):1188-97.
 33. Ishida K, Katsuyama T, Sugiyama A, Kawasaki S. Immunohistochemical evaluation of lymph node micro-metastase from gastric carcinomas. *Cancer* 1997;79(6):1069-76.
 34. Trojani M, de Mascarel I, Bonichon F, Coindre JM, Delsol G. Micrometastases to axillary lymph nodes from carcinoma of breast: Detection by immunohistochemistry and prognostic significance. *Br J Cancer* 1987;55:303-6.