대한대장항문학회지 제 17 권 제 3 호
JKSCP Vol. 17, No. 3, 2001

□ 원 저 □

Dukes' B 대장암 환자에서 림프절의 미세전이와 예후와의 상관관계에 대한 연구

동아대학교 의과대학 외과학교실 및 [1]해부병리학교실

최윤영 · 최홍조 · 정갑중 · 김상순 · 홍숙희[1]

Occurrence and Prognostic Implications of Lymph Node Micrometastases in Patients with Dukes' B Colorectal Carcinoma

Yun Young Choi, M.D., **Hong Jo Choi**, M.D., **Chap Joon Jung**, M.D., **Sang Soon Kim**, M.D., **Sook Hee Hong** M.D.[1]

Departments of Surgery and [1]Pathology, Dong-A University Co of Medicine, Busan, Korea

Purpose: Whereas lymph node metastases in colore carcinoma are important prognostic factor, the pro relevance of occult tumor cells in lymph nodes has no elucidated yet. Aims of this study were to assess t dence of micrometastases of lymph nodes in patients Dukes' B colorectal carcinoma and to investigat correlation between nodal micrometastases and mali potential to determine whether micrometastases of l nodes have prognostic significance, using an anti-cy immunohistochemical technique.
Methods: To evaluate the incidence of lymph node crometastases in patients with Dukes' B colorectal noma, 1160 lymph nodes taken from 65 patients (17.9 case) were assessed by immunohistochemical techn using a monoclonal anti-human cytokeratin (MNF 1 Clinicopathologic parameters and survival rate wer pared between patients with and without micrometasta
Results: The incidence of nodal involvement by tumor in 65 patients with Dukes' B colorectal carcinoma (41 22 rectum, 2 synchronous cancer) was 30.8% (20 cas and nodal positivity 3.2% (33/1423 nodes) by the imm staining. No correlations were observed between th cidence of cytokeratin positivity and various cli ologic parameters, including preoperative CEA level site and size, histologic differentiation, pT stag invasion and lymphatic invasion and rate of recu There was no difference in five-year survival estim Kaplan-Meier lifetable method between the micrometas negative and positive groups (94.8% and 94.1%, res tively).
Conclusions: The presence of nodal micrometastases detected by anti-cytokeratin immunohistochemistry is an interesting phenomenon but clinically seems to be of little prognostic value in patients with Dukes' B colorectal carcinoma. Thus, this immunostaining technique does not offer a significant benefit over conventional pathologic staging using hematoxylin-eosin staining. **JKSCP 2001;17:141-147**

Key Words: Colorectal cancer, Micrometastasis, L node
결직장암, 미세전이, 림프절

책임저자: 최홍조, 부산시 서구 동대신동 3가
동아대학교병원 외과학교실(우편번호: 602-715)
Tel: 051-240-5146, Fax: 051-247-9316

본 논문의 요지는 2001년 춘계외과학술대회에서 구연 발표하였음.

서 론

대장암 즉 결장암과 직장암은 미국의 통계에 의하면 전체 악성종양의 발생빈도가 높고 사망 원인 중 폐암에 이어 두번째를 차지하고 있으며,[1] 우리나라에서 결장직장암의 발생빈도는 네번째로서 전체 악성종양의 8.8%를 차지한다고 한다.[2] 대장암 환자의 예후를 예측하는 인자로서는 Dukes 병기, 종양세포의 분화도, 림프관 혹은 혈관의 침습 유무, 종양의 육안적 형태 등이 있으며,[3-6] 최근에는 DNA 배수성, proliferating cell nuclear antigen (PCNA) 발현 정도, 그리고 종양의 맥관 신생 등이 중요한 예후인자로 밝혀져 있다.[7-13] 그러나 현재까지 대장암 환자에서 예후를 판단하는 가장 중요한 임상적 기준은 영역 림프절의 전이 유무다.[4,14] 병리학적 검사로 림프절 전이가 없었던 환자에서 국소 재발이나 원격 전이가 일어나는 이유 중의 하나는 통상적인 hematoxylin-eosin 염색(이하 H-E 염색)으로는 진단하기 어려운 미세전이현상이 원인이 될 수 있다.[15] 즉 대장암 수술 후 림프절에 대한 정확한 평가는 재발에 대한 고위험군의 결정 및 보조요법의 사용을 위한 중요한 임상적 근거가 될 수 있는데, 통상적인 H-E 염색법을 이용하여 한 세포단위의 미세전이, 작은 세포 군집형태의 미세

가 실제보다 낮게 결정이 되어 치료가 불완전하게 되는 위험이 있다.[16] 이를 보안하기 위해 최근에 림프절의 미세전이 유무에 대한 검사가 면역조직화학적 방법과 분자생물학적 방법을 포함한 여러 기법을 통해 이루어지고 있다.[17-23] Cytokeratin에 대한 항체를 이용한 면역조직화학적 검사는 림프절의 미세전이를 파악하는 데 예민도과 특이도가 우수한 방법으로 알려져 있으며,[18,20,21] 분자생물학적 분석법에 비하여 용이하게 임상에서 이용될 수 있다.

미세전이의 임상적 의의는 이 인자가 종양의 재발이나 생존율과 상관관계를 가지는 위험인자로 분류되어야 하는가하는 점으로서, 이를 토대로 술후 보조요법의 적응 범위의 확장 여부를 결정할 수 있을 것이다. 그러나 현재까지 대장암에서 미세전이와 예후와의 상관관계는 뚜렷한 결론을 내리지 못하고 있다.

저자는 술후 Dukes' B로 진단된 대장암 환자를 대상으로 면역조직화학적 염색을 통한 림프절의 미세전이의 빈도를 알아보고 미세전이와 예후와의 상관관계를 규명함으로써 결장직장암 환자에서 미세전이의 유무에 따라 보조요법의 사용을 결정할 수 있는지, 또는 통상의 H-E 염색을 근거로 결정된 병기를 보완할 수 있는지를 알아보고자 연구를 시행하였다.

방 법

1) 연구 대상

1992년에서 1995년까지 대장암으로 진단되어 동아대학교병원 일반외과에서 근치적 절제술이 시행된 환자 중 술후 병리조직 검사상 Dukes' B로 확진된 환자를 대상으로 하였다. 이 중 술전 화학요법 또는 방사선 요법이 시행된 환자와 신체의 타부위에 악성종양이 동반되었던 환자 혹은 술후 대장암과는 무관한 원인으로 사망하였던 경우 그리고 추적조사에서 소실된 환자는 대상에서 제외되었다.

위의 요건이 포함된 환자를 제외하고 최종적으로 연구대상에 포함된 환자는 모두 65명이었다.

2) 연구 방법

(1) 임상 및 병리학적 분석: 환자의 임상 기록지와 병리 조직 검사 결과지로부터 환자의 나이, 성별, 종양의 발생 부위, 종양의 크기, 장벽의 침습 정도, 조직학적 분화도, 림프관 및 혈관의 침습 유무, 술전 혈중 CEA치 등을 조사하였다. 원격전이, 재발 및 사망에 대한 추적조사는 병록지, 전화 추적을 이용하였다. 대상환자 65예 병리조직표본은 병리 의사에 의해 재검사되었으며, 혈관 및 림프관의 침습 여부를 다시 조사하였다. 조직학적 분화도는 세계보건기구의 기준에 의해,[24] 그리고 종양의 장벽 침투 정도(T 병기)는 미국 암위원회(American Joint Committee on Cancer) 기준에 의해 기록되었다.[25]

(2) 면역조직학적 염색 방법: paraffin 포매조직을 4 μm 두께로 잘라 슬라이드에 부착시키고 실렌에서 paraffin을 제거한 후 일련의 알코올을 거쳐 함수시켰다. 종양 조직 내 항원 단백을 회복하기 위하여 전처치 과정으로 표본을 pepsin 용액에 담근 후 phosphate-buffered saline (PBS) 완충액으로 세척하였다. 다음으로 내인성 peroxidase의 활성을 억제하기 위하여 3% H_2O_2에 10분간 반응시켰으며, 비특이적 항체 결합을 억제하기 위해 표본을 non-immune serum에 실온에서 20분간 반응시킨 후 TBS 완충액으로 20분간 세척하였다. 일차 항체인 monoclonal anti-human cytokeratin (Dako-CK MNF 116, Dako, USA)에 실온에서 한시간 반응시킨 후 TBS 완충액으로 10분간 세척하였다. 표본을 다시 이차 항체인 biotinylated polyvalent antibody (Histostain-plus, Zymed, South San Francisco, CA, USA)와 10분간 반응시킨 다음 TBS 완충액으로 세척한 후 HRP-streptavidine으로 10분간 반응시켰다. 다시 표본을 PBS 완충액으로 세척하고 AEC 발색시약으로 10분간 염색한 후 물로 세척하였다. Hematoxylin으로 3분간 대조 염색을 한 후 물로 씻고 crystal mount로 봉입하여 현미경으로 검경하였다.

광학현미경으로 림프절내에 세포질이 적갈색으로 염색되는 세포가 나타나면(Fig. 1) 고배율에서 종양세

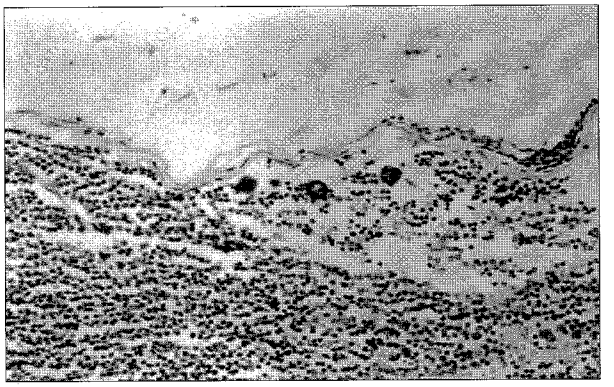

Fig. 1. Immunohistochemical status of cytokeratin. A few cytokeratin-positive tumor cells are seen in subcapsular sinus of the lymph node (Immunohistochemical stain for cytokeratin, ×200).

포인지를 확인하여 양성 림프절의 개수를 헤아렸다.

(3) 통계학적 분석: 미세전이의 유무와 임상 및 병리학적 인자 사이의 관계는 두 척도간의 환자 수의 분포별 분석에서는 Fisher's exact test (two-sided)를 그리고 셋 이상 척도간에서의 환자의 분포별 분석에서는 chi-squared test를 이용하여 유의성을 검정하였으며, 두 척도간의 평균값의 비교는 unpaired t-test를 이용하여 검정하였다. 생존곡선은 Kaplan-Meier법을 이용하여 계산하여 log rank test로써 분석하였다. 통계 처리는 GraphPad InStat 3.00을 이용하여 시행되었으며 P값이 0.05 이하인 경우를 통계학적 유의성이 있는 것으로 간주하였다.

결 과

1) 임상 및 병리학적 분석

총 65예의 대상 환자 중 남자는 29예(44.6%) 여자는 36예(55.4%)로서, 평균연령은 59세(범위: 37~79세)였다. 종양의 발생부위별 분포는 결장이 41예(63.1%) 그리고 직장이 22예(33.8%)이었으며, 나머지 2예(3.1%)는 동시성 암으로 에스상결장과 맹장이 1예 그리고 하행결장과 맹장이 1예였다. 장벽의 침투 정도는 AJCC의 분류상 T2가 9예(13.8%) 그리고 T3가 56예(86.2%)이었으며, 종양세포의 분화도는 고분화형이 47예(72.3%), 중등도 분화형 9예(13.8%) 그리고 저분화 및 점액성 종양이 각각 4예(6.2%) 및 5예(7.7%)였다(Table 1).

2) 미세전이의 양상과 빈도

전체 65예 환자의 절제 조직에서 면역조직학적 염색으로 검색한 림프절 수는 모두 1,160개로서 한 환자에서 평균 17.8개를 검색하였다(Fig. 2). 미세전이는 20예(30.8%)에서 37개(3.2%)의 림프절에서 관찰되었다. 미세전이 양성 환자에서 양성림프절 수는 53개 중 한 개(1.9%)에서 13개 중 5개(38.5%)까지였다(Table 2, 3).

3) 미세전이와 임상 및 병리학적 인자와의 관계

미세전이의 유무에 따라 환자를 미세전이 양성군과 음성군의 두 군으로 나누어 이들 두 군간에서 여러 임상 및 병리학적 인자들의 크기 및 분포의 차이가 통계학적 유의성이 있는지를 분석하였다. 미세전이 음성군의 평균연령은 60세(범위: 37~79), 양성군은 58세(범위: 37~70)로서 두 군간에 유의한 차이는 없었다(P>0.05). 성별 분포도 두 군간에 유의한 차이는 없었으며(P>0.05), 병리학적 인자들로서 종양의 크기, 조직학적 분화도, 장벽의 침습 정도, 림프관 및 혈관 침습 유무의 빈도를 두 군에서 비교하였는데 림프절 미세전이 양성군과 음성군의 사이에 유의한 차이를 관찰할 수 없었다(P>0.05). 술전 검사한 혈청 CEA치도 두 군간에는 차이가 없었다(P>0.05). 환자의 추적조사에서 재발률도 두 군간에 유의한 차이는 없었다(P>0.05)(Table 4).

Table 1. Clinical and pathologic feature of 65 Dukes' B colorectal carcinoma

Feature	No. of cases (%)
Sex	
Male	29 (44.6)
Female	36 (55.4)
Mean age (range, years)	59 (37~79)
Tumor	
Colon	41 (63.1)
Rectum	22 (33.8)
Synchronous	2 (3.1)
pT stage	
T2	9 (13.8)
T3	56 (86.2)
Histologic grade	
Well	47 (72.3)
Moderate	9 (13.8)
Poor	4 (6.2)
Mucinous	5 (7.7)
Total	65 (100)

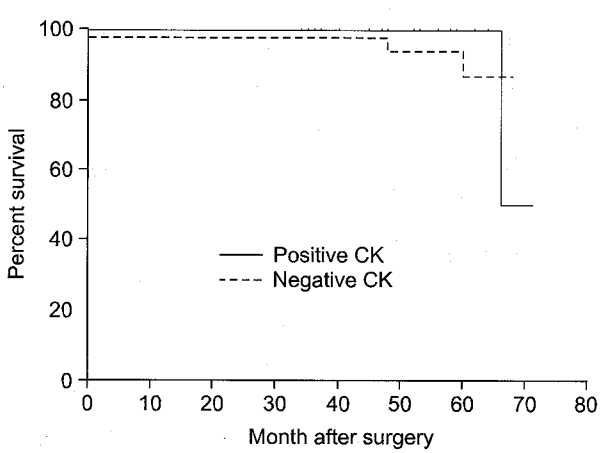

Fig. 2. Survival curve of patients with positive and negative micrometastasis.

Table 2. Comparision of clinicopathologic variables between micrometastases; positive and negative Dukes' B colorectal carcinomas

Variables	Micrometastasis		P value
	Negative	Positive	
Mean age (range, yr)	60 (37 79)	58 (37 70)	0.46
Sex			
Male	20	9	1.00
Female	25	11	
Tumor site			
Colon	30	11	0.27
Rectum	13	9	
Synchronous	2		
Tumor size (range, cm)	6.1 (1 11)	5.4 (1.5 10)	0.28
Histologic grade			
Well	29	8	0.14
Moderately	7	2	
Poor	4		
Mucinous	5		
pT category			
T2	7	2	0.71
T3	38	18	
Vessel invasion			
Positive	9	5	0.66
Negative	36	15	
Lymph node invasion			
Positive	7	2	0.71
Negative	38	18	
Preoperative CEA (ng/ml)			
＜5	33	15	1.00
≥5	12	5	
Recurrence			
Positive	1	0	1.00
Negative	44	20	
Total	45	20	

Table 3. Number of total lymph nodes investigated in each patient

Total No. of lymph nodes	No. of cases (%)
1 10	17 (26.2)
11 20	29 (44.6)
21 30	11 (16.9)
31 40	3 (4.6)
41 50	4 (6.2)
＞50	1 (1.5)
Total	65 (100)

Table 4. Number of positive lymph nodes in each micrometastasis positive patients

No. of positive lymph nodes	No. of cases (%)
1	11 (55.0)
2	5 (25.0)
3	2 (10.0)
4	0 (0.0)
5	2 (10.0)
Total	20 (100)

4) 미세전이와 생존율과의 관계

미세전이 유무에 따른 두 군의 Kaplan-Meier 생존곡선에서 5년 생존율은 미세전이 음성군은 86%, 미세전이 양성군은 100%로 두 군간에 유의한 차이가 없었다(P＞0.05)(Fig. 2).

고 찰

대부분의 악성종양에서 림프절의 전이가 가지는 의미는 국소 종양의 진행과 종양세포의 전이를 반영하는 지표로서, 전이가 없는 경우와 비교해서 예후가 보다 좋지 않을 것이라는 것을 시사한다고 할 수 있다. 대장암에서는 특히 림프절 전이 여부는 중요한 예후인자로 간주되고 있어 림프절 전이가 없는 Dukes' A와 B 환자에서의 5년 생존율은 70 80%인데 비해 림프절 전이가 확인되는 Dukes' C 환자에서는 30 40% 정도로 낮아지는 것으로 알려져 있다.[26,27] 대장암에서 림프절의 상태를 병리학적으로 결정하기 위해서는(pN) 검사된 림프절의 총 개수(≥12)에 대한 전이된 림프절의 수를 평가하여 환자의 예후에 대한 명백한 기술을 하는 것이 필요하다.[26,27]

원래 "미세전이"라는 용어는 유방암에서 2 mm 미만의 전이성 병변을 의미하는 개념으로 정의되어 왔는데,[28] 여기서는 통상의 H-E염색을 이용한 병리학적 검사방법으로는 잘 발견될 수 없는 미세한 전이 병변을 의미한다. 림프절의 미세전이를 확인하기 위한 방법으로는 형태학적 방법과 분자생물학적 방법의 두 가지로 대별될 수 있다. 분자생물학적 방법으로서 가장 많이 이용되는 방법은 역전사 중합효소 연쇄반

응법(reverse transcryptase-polymerase chain reaction; 이하 RT-PCR)이다. Hayashi 등[22]은 변이체 대립유전자 특이성 증폭(mutant-allele-specific amplification; MASA) 기법을 이용하여 림프절 전이가 없었던 환자의 약 60%에서 유전적 변이를 확인하였으며, 재발을 초래하였던 Dukes' B 환자 모두에서 림프절에 이러한 유전적 변이검출을 이용하여 미세전이가 확인되었다고 하였다. 이렇게 유전학적 검사법으로 진단된 림프절의 미세전이 여부는 대장암 환자에서 예후를 예측할 수 있는 유용한 인자로 이용될 수 있으며 이를 통해 술후 보조요법의 필요성 여부를 결정하는 데 도움이 된다. 그러나 미세전이를 찾기 위한 이러한 유전학적 접근은 매우 가치가 높을 것으로 생각되나 이들 결과에 대한 예측치는 재검토해야 할 필요가 있을 것으로 보인다. 즉 Dukes' A와 B에서의 38%라는 재발률은 예상보다 상당히 높은데 이유는 술후 통상의 H-E 염색하에 검색되는 림프절의 표본 절편 수는 대개 한 장이므로 검색범위가 너무 제한되어 림프절의 위음성률이 높기 때문으로 여겨진다. 그리고 Yamamoto 등[29]에 의하면 PCR을 이용한 유전학적 진단 방법에 의해 분석된 양성 소견은 단지 종양세포의 DNA가 존재한다는 의미로서 항상 종양 세포가 존재한다는 것은 아니다. 그리고 이 방법은 포르말린 고정 조직에서 RNA를 추출할 수는 없기 때문에 후향성 연구에서는 이 방법이 이용될 수 없으며 반드시 동결 절편을 이용하거나 조직을 바로 guanidine isothiocyanate에 담구어야 하는 단점도 있다. 형태학적으로 미세전이를 확인하는 방법으로는 clearance technique, radioimmunoguided surgery (이하 RIGS) 그리고 면역조직화학적 염색법 등이 있다. Cawthorn 등[30]은 xylene alcohol clearance technique을 이용하여 림프절의 채취 수를 극대화하여 림프절의 전이를 검사하였는데 림프절 전이를 보이는 Dukes' C 대장암의 빈도가 유의하게 증가하지는 않았다고 하였다. RIGS란 TAG-72에 대한 항체인 ^{125}I-radiolabeled CC49를 수술 예정 3주 전에 주사한 후 술중 gamma-detecting probe를 이용하여 림프절을 포함한 전이 병변을 조사하는 방법이다. 이 방법으로 얻어진 RIGS 양성, H-E 음성의 환자와 RIGS 음성, H-E 음성의 환자 사이의 예후 차이는 유의성이 없으나 위양성률이 높아 전체적인 예후 예측 인자로서의 가치는 없다고 하였다.[31] 미세전이를 찾기 위한 면역조직화학적 염색법에서는 암배아성 항원(carcinoembryonic antigen; 이하 CEA), 상피막 항원(epithelial membrane antigen; 이하 EMA) 혹은 cytokeratin에 대한 단클론 항체들이 이용되고 있다. 그러나 Davidson 등[32]은 CEA와 EMA를 이용한 면역조직화학적 염색에서 단 한 개의 림프절에서만이 미세전이가 확인되어 기존의 H-E 염색법에 비해 유의한 결과를 보이지는 못하였다고 하였다. 이러한 요인으로서는 동일한 종양내에서도 세포들의 이질성(heterogeneity)이 존재하기 때문으로 생각된다. 항cytokeratin항체를 이용한 면역조직학적 염색에서 림프절의 미세전이는 환자의 26 39%에서, 또 조사된 림프절의 4 17%에서 확인되는 것으로 보고되고 있다.[17,19,20,33,34] 저자의 연구에서는 한 개의 림프절당 H-E염색 및 cytokeratin 염색을 위한 조직절편을 각 림프절의 동일한 부위에서 각각 한 개씩 만들어 염색한 결과 30.8%의 환자에서 그리고 검사한 림프절의 3.2%에서 미세전이를 확인하여 큰 차이가 없었다. 면역조직학적 염색을 이용한 미세전이와 예후와의 상관관계에 대해서는 아직 결론을 내리지는 못한다. 몇 연구에서 림프절의 미세전이가 대장암에서 재발률과 생존율과 상관관계가 있다고 보고하였는데, Greenson 등[20]은 cytokeratin에 양성 반응을 보였던 환자군의 생존율은 대조군에 비해 유의하게 낮았으며 Sasaki 등[35]은 Dukes' A와 B 환자들 중 재발된 군에서의 림프절의 미세전이의 빈도는 약 38%로서 재발이 없었던 군에서의 13%에 비해 유의하게 높았다고 하였다. 저자의 연구에서는 항cytokeratin 항체를 이용한 림프절의 미세전이와 예후와는 서로 상관관계가 없는 것으로 분석되어, Broll 등,[15] Cutait 등,[17] Jeffers 등,[19] Davidson 등,[32] Berg 등,[33] Adell 등[34] 그리고 Nakanishi 등[36]의 결론과 동일하였다. 유방암에서의 림프절의 미세전이의 예후에 대한 의의도 마찬가지로 서로 상반된 결과를 보고하고 있다.[21,37] 미세전이가 전이의 전단계로 생각되고 먼저 림프절 피막하 동양혈관으로 유입된 종양세포들의 존재를 반영하기는 하지만, 본 연구에서 나타난 바와 같이 면역조직화학적 방법으로만 확인되는 림프절내의 미세전이가 임상적으로 예후와는 상관관계가 없는 이론적 배경은 이들 미세전이 세포들이 림프절내에서 신체의 면역체계 등에 의해 파괴되거나 비가역적으로 손상을 받아 생존이 불가능하여 모세혈관벽에 부착될 수 없거나 잠복상태로 유지되어 증식할 수 없기 때문으로 생각된다.[38]

결 론

65예의 Dukes' B 병기의 대장암 환자에서 절제된

림프절을 cytokeratin에 대한 면역조직학적 염색으로 림프절의 미세전이를 검색하였다. 총 65예의 환자 중 20예(30.8%)에서 그리고 총 1160개의 림프절 중 37개(3.2%)에서 cytokeratin 양성 선암종 세포가 관찰되었다. 미세전이 양성 환자군과 미세전이 음성 환자군에서 임상 및 병리조직학적 소견을 비교하고 예후 인자와의 상관관계를 조사하였으나, 두 군 사이에서 유의한 차이가 없었으며, 이 두 환자군의 재발률과 5년 생존율에서도 유의한 차이를 볼 수 없었다. 그러므로 림프절 전이 여부를 병리학적으로 진단하기 위해 통상적으로 이용되고 있는 H-E 염색 외 면역조직화학적 검사로 미세전이를 찾아내어 환자의 예후를 예측할 수 있는 림프절 전이 지표로 이용되기 위해서는 더 자세한 연구가 필요할 것으로 본다.

REFERENCES

1. Landis SH, Murray T, Bolden S, Wingo PA. Cancer statistics, 1998. CA Cancer J Clin 1998;48:6-29.
2. 1997년 암등록 사업 연례 보고서, 보건복지부.
3. Dukes CE. The classification of cancer of the rectum. J Pathol 1932;35:323-32.
4. Chapuis PH, Dent OF, Fisher R, et al. A multivariate analysis of clinical and pathological variables in prognosis after resection of large bowel cancer. Br J Surg 1985;72:698-702.
5. Phillips RKS, Hittinger R, Blesovsky L, Fry JS, Fielding LP. Large bowel cancer: surgical pathology and its relationship to survival. Br J Surg 1984;71:604-10.
6. Talbot IC, Ritchie S, Leighton MH, Hughes AO, Bussey HJ, Morson BC. The clinical significance of invasion of veins by rectal cancer. Br J Surg 1980;67:439-42.
7. Choi HJ, Jung IK, Kim SS, Hong SH. Proliferating cell nuclear antigen expression and its relationship to malignancy potential in invasive colorectal carcinomas. Dis Colon Rectum 1997;40:51-9.
8. Teixeira CR, Tanaka S, Haruma K, Yoshihara M, Sumii K, Kajiyama G. Proliferating cell nuclear antigen expression at the invasive tumor margin predicts malignant potential of colorectal carcinomas. Cancer 1994;73:575-9.
9. Quirke P, Dixon MF, Clayden AD, et al. Prognostic significance of DNA aneuploidy and cell proliferation in rectal adenocarcinomas. J Pathol 1987;151:285-91.
10. Kokal W, Sheibani K, Terz J, Harada JR. Tumor DNA content in the prognosis of colorectal carcinoma. JAMA 1986;255:3123-7.
11. Choi HJ, Hyun MS, Jung GJ, Kim SS, Hong SH. Tumor angiogenesis as a prognostic predictor in colorectal carcinoma with special reference to mode of metastasis and recurrence. Oncology 1998;55:575-81.
12. Mooteri S, Rubin D, Leurgans S, Jakate S, Drab E, Saclarides T. Tumor angiogenesis in primary and metastatic colorectal cancers. Dis Colon Rectum 1996;39:1073-80.
13. Takebayashi Y, Aklyama S, Yamada K, Akiba S, Aikou T. Angiogenesis as an unfavorable prognostic factor in human colorectal carcinoma. Cancer 1996;78:226-31.
14. Newland RC, Chapuis PH, Pheils MT, MacPherson JG. The relationship of survival to staging and grading of colorectal carcinoma: a prospective study of 503 cases. Cancer 1981;47:1424-9.
15. Broll R, Schauer V, Schimmelpenning H, et al. Prognostic relevance of occult tumor cells in lymph nodes of colorectal carcinomas: an immunohistochemical study. Dis Colon Rectum 1997;40:1465-71.
16. Waldman SA, Cagir B, Rakinic J, et al. Use of guanylyl cyclase C for detecting micrometastases in lymph nodes of patients with colon cancer. Dis Colon Rectum 1998;41:310-5.
17. Cutait R, Alves VAF, Lopes LC, et al. Restaging of colorectal cancer based on the identification of lymph node micrometastases through immunoperoxidase staining of CEA and cytokeratins. Dis Colon Rectum 1991;34:917-20.
18. Haboubi NY, Clark P, Kaftan SM, et al. The importance of combining xylene clearance and immunohistochemistry in the accurate staging of colorectal carcinoma. J R Soc Med 1992;85:386-8.
19. Jeffers MD, O'Dowd GM, Mulcahy H, et al. The prognostic significance of immunohistochemically detected lymph node micrometastases in colorectal carcinoma. J Pathol 1994;172:183-7.
20. Greenson JK, Isenhart CE, Rice R, Mojzisik C, Houchens D, Martin EW Jr. Identification of occult micrometastases in pericolic lymph nodes of Duke's B colorectal cancer patients using monoclonal antibodies against cytokeratin and CC49. Correlation with long-term survival. Cancer 1994;73:563-9.
21. McGuckin MA, Cummings MC, Walsh MD, Hohn BG, Bennett IC, Wright RG. Occult axillary node metastases in breast cancer: their detection and prognostic significance. Br J Cancer 1996;73:88-95.
22. Hayashi N, Ito I, Yanagisawa A, et al. Genetic diagnosis of lymph-node metastasis in colorectal cancer. Lancet 1995;345:1257-9.
23. Mori M, Mimori K, Inoue H, et al. Detection of cancer micrometastases in lymph nodes by reverse transcriptase-polymerase chain reaction. Cancer Res 1995;55:3417-20.
24. Jass JR, Sobin LH. Histologic typing of intestinal tumors. WHO international histological classification of tumors. 2nd ed. Berlin: Springer, 1989.

25. Fleming ID, Cooper JS, Henson DE, Hutter RVP, Kennedy BJ, Murphy GP, Sullivan BO, Sobin LH, Yarbro JW, eds. AJCC Cancer staging manual. 5th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 1997.
26. Hermanek P. pTNM and residual tumor classifications: problems of assessment and prognostic significance. World J Surg 1995;19:184-90.
27. Hermanek P, Sobin LH. Colorectal carcinoma. In: Hermanek P, Gospodarowicz MK, Henson DE, Hutter RV, Sobin LH, eds. Prognostic factors in cancer. Berlin: Springer, 1995.
28. Huvos AG, Hutter RV, Berg JW. Significance of axillary macrometastases and micrometastases in mammary cancer. Ann Surg 1971;173:44-6.
29. Yamamoto N, Kato Y, Yanagisawa A, Ohta H, Takahashi T, Kitagawa T. Predictive value of genetic diagnosis for cancer micrometastasis: histologic and experimental appraisal. Cancer 1997;80:1393-8.
30. Cawthorn SJ, Gibbs NM, Marks CG. Clearance technique for the detection of lymph nodes in colorectal cancer. Br J Surg 1986;73:58-60.
31. Cote RJ, Houchens DP, Hitchcock CL, et al. Intraoperative detection of occult colon cancer micrometastases using 125 I-radiolabled monoclonal antibody CC49. Cancer 1996;77:613-20.
32. Davidson BR, Sams VR, Styles J, Deane C, Boulos PB. Detection of occult nodal metastases in patients with colorectal carcinoma. Cancer 1990;65:967-70.
33. Berg A, Stenling R, Tavelin B, Lindmark G. Are lymph node micrometastases of any clinical significance in Dukes stages A and B colorectal cancer? Dis Colon Rectum 1998;41:1244-9.
34. Adell G, Boeryd B, Fr nlund B, Sj dahl R, H kansson L. Occurrence and prognostic importance of micrometastases in regional lymph nodes in Dukes' B colorectal carcinoma: an immunohistochemical study. Eur J Surg 1996;162:637-42.
35. Sasaki M, Watanabe H, Jass JR, et al. Occult lymph node metastases detected by cytokeratin immunohistochemistry predict recurrence in “node-negative” colorectal cancer. J Gastroenterol 1997;32:758-64.
36. Nakanishi Y, Ochiai A, Yamauchi Y, Moriya Y, Yoshimura K, Hirohashi S. Clinical implications of lymph node micrometastases in patients with colorectal cancers. A case control study. Oncology 1999;57:276-80.
37. Galea MH, Athanassiou E, Bell J, et al. Occult regional lymph node metastases from breast carcinoma: immunohistological detection with antibodies CAM 5.2 and NCRC-II. J Pathol 1991;165:221-7.
38. Schlimok G, Funke I, Bock B, Schweiberer B, Witte J, Riethmuller G. Epithelial tumor cells in bone marrow of patients with colorectal cancer: immunocytochemical detection, phenotypic characterization, and prognostic significance. J Clin Oncol 1990;8:831-7.