

## 결장 및 직장암에서 면역조직화학 염색으로 발견된 림프절 유리 암세포의 의의

경상대학교 의과대학 외과학교실

이진석 · 임정우 · 최상경 · 정은정 · 이영준 · 홍순찬 · 권수인 · 박순태 · 하우송

### The Prognostic Significance of Immunohistochemically Detected Isolated Tumor Cells in Lymph Node in Colorectal Cancer

Jin-Seok Lee, M.D., Jung-woo Lim, M.D., Sang-Kyung Choi, M.D., Eun-Jung Chung, M.D., Young-Joon Lee, M.D., Soon-Chan Hong, M.D., Soo-In Kwon, M.D., Soon-Tae Park, M.D., Woo-Song Ha, M.D.

Department of Surgery, College of Medicine, Gyeong-Sang National University, Jinju, Korea

**Purpose:** Metastasis of a colorectal carcinoma to regional lymph nodes indicates poor prognosis. The detection of lymph node metastasis is routinely performed by histopathological analysis of hematoxylin-eosin (H&E) stained sections. However the routine histological technique may fail to detect isolated tumor cells in lymph nodes. The aims of this study are to elucidate the prognostic significance of the presence of isolated tumor cells in the regional lymph nodes in colorectal cancer, and to elucidate the correlation between the presence of isolated tumor cells and p53 protein expression in the primary colorectal cancer tissue.

**Methods:** We used immunohistochemical staining with anti-cytokeratin antibody to examine 452 lymph nodes in 24 patients (11 recurrent and 13 nonrecurrent) who were histologically determined Astler-Coller B. And we used immunohistochemical staining with p53 protein to examine primary colorectal cancer tissues of the patients.

**Results:** Immunohistochemical staining of cytokeratin revealed the presence of isolated tumor cells in 5/13 patients (38.5%), 5/214 lymph nodes (2.34%) in the nonrecurrent group and 6/11 patients (54.6%), 11/244 lymph nodes (4.51%) in the recurrent group, respectively. The detection rate of isolated tumor cells in the recurrent group was slightly higher than nonrecurrent group, but the difference was not significant statistically. The expression rate of p53 protein was 23.1% (3/13) in the nonrecurrent group and 36.4% (4/11) in the recurrent group, respectively. The expression rate of the p53 protein was not significantly correlated with the presence of isolated tumor cells in

regional lymph nodes and the rate of tumor recurrence. **Conclusions:** The presence of isolated tumor cells in regional lymph nodes was not a prognostic indicator in predicting recurrence in histologically determined Astler-Collar B colorectal cancer patients. *J Korean Soc Coloproctol 2002;18:317-323*

**Key Words:** Isolated tumor cell, Cytokeratin, Colorectal cancer, p53 protein expression

유리 암세포, 사이토케라틴, 결직장암, p53 단백질 발현

### 서 론

결장 및 직장암의 환자에서 예후를 결정하는 인자로는 암의 침윤도, 원격 전이 및 림프절 전이 등을 들 수 있다.<sup>1,2</sup> 특히 그중에서 수술 후 절제해 낸 림프절 전이 유무가 중요한 예후인자이기 때문에 그 전이 유무를 평가하는 것은 중요하다. 현재는 절제한 림프절을 hematoxylin-eosin으로 염색해서 광학 현미경으로 관찰하여 암세포 전이 여부를 진단하고 있다. 그러나 hematoxylin-eosin 염색만으로는 몇 개의 흩어져 있는 암세포들을 진단하기는 어렵다. Hematoxylin-eosin 염색만으로는 발견할 수 없고 면역조직화학 염색이나 분자생물학적 기법으로 발견할 수 있는 세포를 유리 암세포 (isolated tumor cells)라고 하며,<sup>3</sup> 최근에는 여러 면역조직화학 염색 및 분자생물학적 기법이 도입되면서 파라핀 블록이나 동결건조조직에서도 hematoxylin-eosin 염색으로 확인이 되지 않는 림프절에서 암세포의 유무를 진단할 수 있게 되었다.<sup>4,5</sup> 유리 암세포를 진단할 수 있는 방법에는 항케라틴 항체(anti-cytokeratin antibody)와 항CEA 항체를 이용한 면역조직화학적 방법과, mutant allele specific amplification technique 및 CEA mRNA를 이용한 RT-PCR과 같은 방법들이 있다.<sup>6,7</sup> 림프절 유리 암세포와 예후와의 관계는 아직 논

책임저자: 최상경, 경남 진주시 칠암동 92  
경상대학교 의과대학 외과학교실(우편번호: 660-751)  
Tel: 055-750-8096  
E-mail: choisk@nongae.gsnu.ac.kr

란이 많이 되고 있지만, 위암이나 유방암에서 항케라틴 항체를 이용한 면역조직화학적 방법으로 확인된 림프절 유리암세포가 예후를 결정하는 중요한 인자가 된다고 보고되고 있고<sup>8,9</sup> 결장 및 직장암에서는 아직 그 유용성에 대해 논란이 되고 있다.<sup>4</sup> 또한 결장 및 직장의 원발암을 대상으로 p53 단백을 이용하여 면역조직화학 염색을 시행하여, 림프절 유리 암세포와 함께 p53 단백질이 발현되면 예후인자로서 유용성이 있다고 보고되고 있다.<sup>10</sup> 따라서 hematoxylin-eosin 염색으로 림프절의 전이가 없다고 보고된 Astler-Coller B 결장 및 직장암 환자의 림프절과 원발암 조직을 각기 항케라틴 항체와 항p53 항체를 이용하여 면역조직화학 염색을 시행하여 림프절 유리 암세포 유무 및 림프절 유리 암세포와 예후와의 관계를 알아보고, 림프절 유리 암세포와 원발암의 p53 단백질 발현과의 관계를 알아보고자 본 연구를 시행하였다.

재료 및 방법

1) 재료

1987년부터 1996년까지 경상대학교병원에서 결장 및 직장암으로 수술 받은 226명의 환자 중 림프절 전이가 없다고 보고된 Astler-Coller B 환자 123명 중에서 재발한 환자 11명의 244개 림프절과 무작위 추출로 선택된 재발하지 않은 환자 13명의 208개 림프절을 대상으로 하였다. 평균 나이는 비재발군에서는 54.5세, 재발군에서는 60.3세였고 남녀비는 비재발군에서는 1 : 1.6, 재발군에서는 4.5 : 1였다. 암의 크기는 비재발군과 재발군에서 각각 5.0 cm, 5.45 cm였고, 통계적으로 유의한 차이는 없었다. 암의 위치는 두 군 모두 직장암이 61.5% (비재발군)와 45.5% (재발군)로 가장 많았다. 조직학적 분류상 두 군 모두 중등도 분화형이 53.9% (비재발군)와 72.7% (재발군)로 많았다. Astler-Coller 병기 분류상 비재발군에서는 B1이 11명(84.6%), B2가 2명(15.5%)이었고, 재발군에서는 B1이 6명(54.6%), B2가 5명(45.5%)으로 비재발군에서 재발군보다 B1이 더 많았지만 통계적으로 유의성은 없었다 (Table 1). Astler-Coller B 환자 123명 중에서 재발한 환자는 11명으로 재발률은 8.9% (11/123)였고, 재발한 장기는 간이 5명(38.5%), 폐가 3명(23.1%), 골반내 림프절이 2명(15.4%), 뇌, 뼈, 방광이 각각 1명(0.77%)이었다.

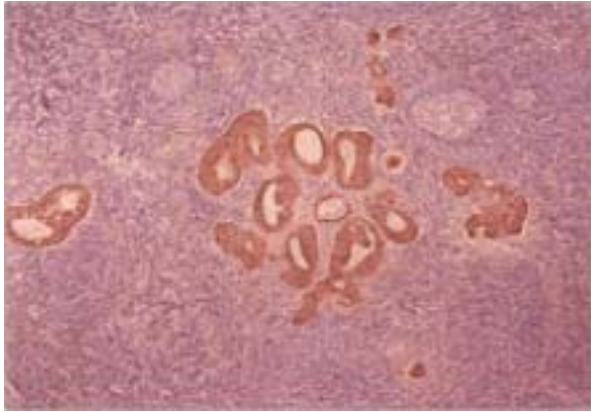
2) 방법

보관된 림프절의 파라핀 포매 조직을 이용하여

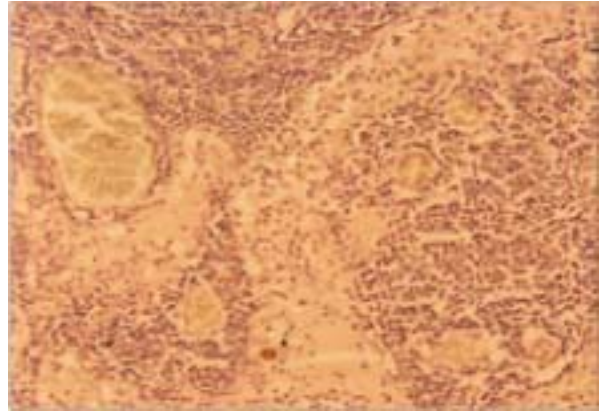
cytokeratin에 대한 면역조직화학 염색을 시행하고, 염색 결과에 따라 유리 암세포의 유무를 알아보았다. 연구대상인 Astler-Coller B 환자 24명의 결장 및 직장 원발암 조직의 현저한 중앙부위를 이용하여 p53 단백질에 대한 면역 조직화학염색을 시행하였다. 면역조직화학 염색 과정은 다음과 같다. 림프절 또는 원발암 조직의 파라핀 조직을 4µm 두께로 1회 잘라서 xylene에 넣어 탈파라핀화 후 재수화과정을 거치고, p53 면역화학염색을 위해서는 전자렌지 처리를 하였고, cytokeratin 염색을 위해서 20분간 0.2% trypsin으로 처리하였다. 내인성 peroxidase의 활성을 제거하기 위해 조직 슬라이드를 hydrogen peroxide가 포함된 메탄올 용액에 처리하고 Tris buffer로 10분간 수세하였다. 수세 후 실온에서 1 : 50으로 희석한 monoclonal anti-human cytokeratin (clone MNF116, DAKO, Copenhagen, Denmark)과, 1 : 50으로 희석한 monoclonal anti-mouse p53 protein (clone Do-7, DAKO, Copenhagen, Denmark)으로 반응시킨 후, 15분간 link antibody (biotinylated anti-mouse immunoglobulin, DAKO, Copenhagen, Denmark)와 반응시켰다. 반응 후 다시 streptavidine horseradish peroxidase로 15분간 반응시켰다. 반응 후 Tris buffer로 10분간 수세하고, 실온에서 10분간 DAB (diaminobenzidine)로

Table 1. Clinicopathological characteristics

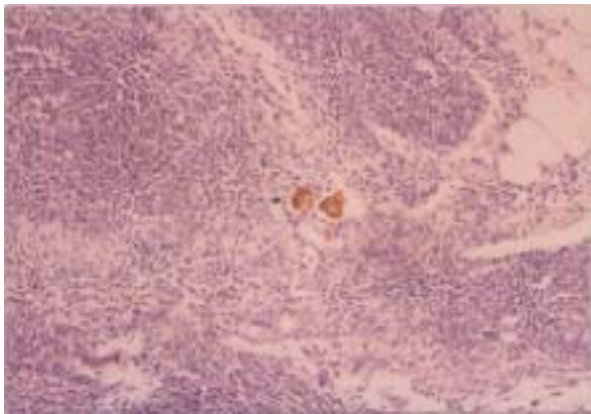
	Non-recurrent group (N = 13)	Recurrent group (N = 11)	P value
Age			
Mean	54.5	60.3	.100
Sex			
Female	8 (61.5)	2 (18.2)	.032
Male	5 (38.5)	9 (81.8)	
Tumor size (cm)			
Mean	5.0	5.45	.512
Tumor site			
Rt. colon	0 (0.0)	1 (9.1)	.590
Lt. colon	4 (30.8)	3 (27.4)	
Transverse colon	1 (7.7)	2 (18.2)	
Rectum	8 (61.5)	5 (45.5)	
Histologic type			
Well	6 (46.2)	3 (27.3)	.341
Moderately	7 (53.9)	8 (72.7)	
Astler-Coller			
B1	11 (84.6)	6 (54.6)	.106
B2	2 (15.5)	5 (45.5)	



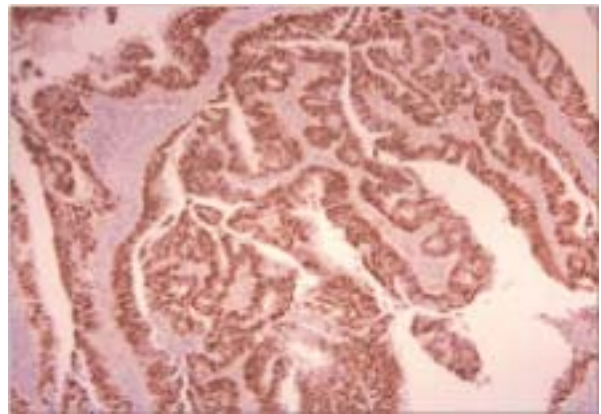
**Fig. 1.** Cytokeratin positive cells in a lymph node of positive control (×200)



**Fig. 3.** Photomicrograph of lymph node showing a small cluster of cytokeratin-positive tumor cells (arrow, ×200)



**Fig. 2.** Photomicrograph of lymph node showing a single cytokeratin-positive tumor cell (arrow, ×200)



**Fig. 4.** Nuclear staining of p53 protein in primary colorectal cancer (×200)

발색시켰다. Hematoxyline으로 대조 염색한 후 봉입하였다.

각 면역조직화학 염색의 음성대조군은 일차 항체를 처리하지 않았으며 양성대조군은 절제한 결장 및 직장암 조직과 전이가 확인된 림프절로 하였다. Cytokeratin에 대한 면역조직화학 염색은 주로 세포질과 세포막에 강하게 염색되는 것을 양성으로 하였고(Fig. 1), keratin debris를 함유한 조직구와 구별하기 위하여 핵의 비정형성 등의 조직학적 소견을 면밀히 관찰하였다. p53 단백질은 주로 핵에 염색이 되며, 전체 암세포 30% 이상 염색이 될 때를 양성으로 판정하였다.

통계학적 비교는 재발군과 비재발군에 따른 평균의 차이는 t-검정을 실시하였으며 비율에 대한 차이는  $\chi^2$  검정을 하였고  $P < 0.05$ 일 경우를 의의가 있는 것으로 하였다.

## 결 과

### 1) 림프절 유리 암세포의 진단

Cytokeratin에 대한 면역조직화학 염색으로 진단되는 림프절 유리 암세포는 두 가지 형태로 나눌 수 있는데, 한 개의 세포가 염색되는 단일세포 형태(Fig. 2)와 2~4개 정도의 암 세포들이 뭉쳐서 염색되는 군집 형태(Fig. 3)이다. 유리 암세포 발견율은 비재발군 13명에서 5명으로 38.5%, 전체 림프절 214개에서 5개로 2.34%였고, 재발군에서는 11명 중 6명으로 54.6%, 전체 림프절 244개 중 11개로 4.51%로 비재발군보다 높은 유리 암세포 발견율을 보였지만, 통계적인 유의성은 없었다. 염색되는 형태에 따라 재발군과 비재발군을 비교했을 때, 두 군 모두 각각에서 단일세포 형태가 60% (3/5), 66.6% (4/6)으로 많았다(Table 2).

**Table 2.** The rate and pattern of isolated tumor cells in the lymph nodes

	Non-recurrent group (N = 13)	Recurrent group (N = 11)	P value
Lymph node micrometastasis			
Absent (%)	8 (61.5)	5 (45.5)	.431
Present (%)	5 (38.5)	6 (54.6)	
Tumor cell pattern			
Single cell (%)	3 (60)	4 (66.6)	.569
Cell cluster (%)	1 (20)	2 (33.3)	
Both (%)	1 (20)	0	
CK(+) L/N	5/214 (2.34)	11/244 (4.51)	.198

CK = cytokeratin

**Table 3.** The relationship between isolated tumor cells in regional lymph nodes and clinicopathological characteristics

	CK (-) (N = 13)	CK (+) (N = 11)	P value
Age			
mean	56.7	57.7	.773
Sex			
Female (%)	7 (53.9)	3 (27.3)	.188
Male (%)	6 (46.2)	8 (72.7)	
Tumor size (cm)			
Mean	5.4	5.0	.579
Tumor site			
Rt. colon (%)	0 (0.0)	1 (9.1)	.590
Lt. colon (%)	3 (23.1)	4 (36.4)	
Transverse colon (%)	2 (15.4)	1 (9.1)	
Rectum (%)	8 (61.5)	5 (45.5)	
Histologic type			
Well (%)	6 (46.2)	3 (27.3)	.341
Moderately (%)	7 (53.9)	8 (72.7)	
Astler-Coller			
B1 (%)	11 (84.6)	6 (54.6)	.106
B2 (%)	3 (15.4)	5 (45.5)	

CK = cytokeratin

**2) 림프절 유리 암세포와 임상 및 조직학적 인자와의 비교**

Cytokeratin에 대한 면역조직화학 염색으로 진단된 림프절 유리 암세포와 임상 및 조직학적 인자들과의 관계를 비교했을 때, 환자의 나이, 성별, 암의 크기, 암의 위치, 조직학적 분화도 및 Astler-Coller에 따른 병기

**Table 4.** The relationship between the expression of p53 protein in primary colorectal cancer tissue and clinicopathological characteristics

	p53 (+) (N = 7)	P53 (-) (N = 17)	P value
Age			
Mean	58.0	56.8	.765
Sex			
Female (%)	1 (14.3)	9 (52.9)	.081
Male (%)	6 (85.1)	8 (47.1)	
Tumor size (cm)			
Mean	5.42	5.11	.683
Tumor site			
Rt. colon (%)	1 (14.3)	0 (0.0)	.441
Lt. colon (%)	2 (28.6)	5 (29.4)	
Transverse colon (%)	0 (0.0)	3 (17.7)	
Rectum (%)	4 (57.1)	6 (35.3)	
Histologic type			
Well (%)	3 (42.9)	6 (35.3)	.728
Moderately (%)	4 (57.1)	11 (64.7)	
Astler-Coller			
B1 (%)	5 (71.4)	12 (70.6)	.967
B2 (%)	2 (28.6)	5 (29.4)	
Cytokeratin			
- (%)	4 (57.1)	9 (52.9)	.653
+ (%)	3 (42.9)	8 (47.1)	
Recurrence			
- (%)	4 (57.1)	9 (52.9)	.851
+ (%)	3 (42.9)	8 (47.1)	

에 따라 유의한 상관관계는 없었다(Table 3).

**3) p53 단백질 발현**

p53 단백질의 전체 발현율은 29.1% (7/24)였고, 비재발군에서는 23.1% (3/13), 재발군에서는 36.4% (4/11)로 재발군에서 조금 더 높은 발현율을 보였지만 통계적 유의성은 없었다(Fig. 4). p53 단백질 발현과 림프절 유리 암세포 및 그 외의 나이, 성별, 암의 크기, 암의 위치, 조직학적 분화도 및 암의 병기에 따른 p53 단백질 발현은 유의한 상관관계가 없었다(Table 4).

**고 찰**

Cytokeratin은 20개 이상의 단백질로 구성된 복잡한 형태의 intermediate filament protein family이다. 분자량 (40~67KD), 산성도, 그리고 발현되는 상피세포에 따라 세부 군으로 나누어지게 된다. 상피세포와 비상피

세포성 암(lymphoma, sarcoma, melanoma)을 구분하는데 흔하게 사용하는 cytokeratin은 저분자량 군(cytokeratin 8, 18 and 19)과 고분자량 군(cytokeratin 1, 5, 10 and 14)으로 나눈다.<sup>11</sup>

림프절의 유리 암세포는 hematoxylin-eosin 염색만으로는 진단이 어렵고, 항cytokeratin 항체, 항-CEA 항체를 사용한 면역조직화학 염색 및 CEA mRNA를 이용한 RT-PCR 등으로 진단이 가능하다. 이런 방법들로 진단된 림프절 유리 암세포는 유방암 및 위암에서 유용한 예후 인자로 보고되고 있다.<sup>8,9</sup>

유방암에서의 림프절 유리 암세포에 대한 연구 중 Leong<sup>12</sup>의 연구에서는 미세전이를 2 mm 이하의 암세포 전이로 규정하여 연속절편과 항케라틴 항체를 이용한 면역조직화학 염색으로 33%의 유리 암세포율을 보고하였고 유용한 예후 인자가 된다고 보고하고 있다. Elson 등<sup>13</sup>의 연구에서도 유방암 환자에서 항cytokeratin 항체를 이용하여 면역조직화학 염색을 시행하여 20.9%의 유리 암세포를 발견하였고, 유리 암세포가 있는 군이 없는 군보다 재발률이 의미있게 높았고 생존율에도 큰 차이를 보여 유용한 예후 인자가 된다고 보고하고 있다.

위암에서도 림프절 유리 암세포에 대한 연구가 많이 보고 되고 있는데 그중 권 등<sup>14</sup>의 연구에 의하면 70예의 총림프절 2,203개 중에서 19예(27.1%)의 37개(1.6%) 림프절에서 유리 암세포가 발견되었는데, 유리 암세포는 1군과 2군의 림프절에서만 발견되었고, 병기 Ib군에서 유리 암세포가 있는 군이 없는 군보다 생존율이 유의하게 낮았다고 보고하고 있다. 그 외 Nakajo<sup>15</sup>의 연구에서는 E-cadherin을 이용한 면역조직화학 염색을 시행하여 1.5% (30/1761)의 유리 암세포를 발견하였고 유리 암세포의 진단이 유용한 예후인자임을 주장하였다. 반면 Fukagawa<sup>16</sup>의 연구에서는 유리 암세포가 있는 군과 없는 군에서 5년 생존율은 각각 94%와 89%, 10년 생존율은 각각 79%와 74%로 예후에 큰 차이가 없는 것으로 보고하고 있다.

최근에는 Adell<sup>17</sup>의 연구에서 hematoxylin-eosin 염색으로 림프절 전이가 없다고 보고된 Duke B 결장 및 직장암 환자를 대상으로 항cytokeratin 항체를 이용하여 림프절 미세전이를 조사해 본 결과 림프절 유리 암세포율은 39%였으나, 예후인자로서의 유용성이 없다고 보고하는 반면, Greenson<sup>4</sup>의 연구에서는 앞의 연구와 같이 Duke B 결장암 환자를 대상으로 항cytokeratin 항체로 진단된 림프절 미세전이가 중요한 예후 인자가 된다고 보고하고 있다. 이같이 림프절 유리 암

세포가 hematoxylin-eosin 염색으로 없다고 판명된 결장 및 직장암 Duke B 환자에서는 예후와의 관계가 여전히 논란이 되고 있다.

본 연구에서는 림프절 전이가 없다고 보고된 Astler-Coller B 결장 및 직장암 환자를 재발군과 비재발군으로 나누어서, 항 cytokeratin 항체를 이용하여 림프절의 유리 암세포율을 조사해 보았는데, 비재발군 13명에서 5명으로 38.5%, 전체 림프절 214개에서 5개로 2.34%였고, 재발군에서는 11명 중 6명으로 54.6%, 전체 림프절 244개 중 11개로 4.51%로 비재발군보다 높은 유리 암세포율을 보였지만, 통계적인 유의성은 없었다. Nakanishi<sup>10</sup>의 연구에서 보고된 림프절 유리 암세포율은 재발군 22명에서 15명으로 68%, 전체 림프절 820개에서 82개로 10%였고, 비재발군에서는 22명 중 15명으로 68%, 전체 림프절 813개 중 45개로 6%로 본 연구에서 보다 높은 유리 암세포율을 보였다. 그 이유로는 본 연구에서는 림프절 한 블록당 1개의 조직절편을 만들어 면역조직화학 염색을 하였지만, Nakanishi의 연구에서는 3개의 연속 조직절편을 사용한 차이를 들 수 있다. 또 다른 이유로는 적출한 림프절의 평균 개수가 본 연구에서는 한 증례당 22개였던 것에 비해 Nakanishi의 연구에서는 골반강내 림프절을 포함한 림프절 광청술을 시행하여 37개로 더 많은 것을 들 수 있다. 그러나 유리 암세포율이 본 연구에서 보다 높았지만 재발군과 비재발군 간의 유의한 차이는 없었으며 Nakanishi 등은 체계적인 림프절 광청술이 시행된다면 림프절 유리 암세포는 환자의 예후에 영향을 끼치지 않는다고 주장하고 있다.

p53 단백질은 돌연변이가 일어나기 전에는 세포의 주기 조절, 분화 및 핵산의 보수와 합성의 기능을 하며, 정상적인 경우는 매우 적은 양이 존재하여 검출하기가 힘들지만, 돌연변이가 일어난 p53 단백질은 종양 억제 역할을 하지 못하고 그 양도 5배에서 100배로 증가되어 면역조직화학 염색으로 쉽게 검출이 가능하다.<sup>18</sup>

p53 단백질은 이미 위암, 폐암, 유방암, 식도암 및 대장암과 같은 여러 암 발생과정에 관여하는 것으로 알려져 있고, 특히 결장 및 직장암 환자에서는 예후와 관련 있다고 알려져 있다.<sup>10, 19, 22</sup> 또 다른 연구에서는 횡장암에서 p53 단백질 발현이 림프절 전이와 상관관계가 있고 유용한 예후인자가 된다고 보고하고 있다.<sup>23</sup> 결장 및 직장암에서 p53 단백질 발현군에서 림프절 유리 암세포율이 더 많았다고 보고하고 있지만,<sup>10</sup> 본 연구에서는 p53 단백질 발현은 재발군과 비재발군에서 차이가 없었고, 림프절 유리 암세포와도 유용한 상관관계가 없

었다.

이상으로 본 연구에서는 hematoxylin-eosin 염색으로 림프절 전이가 없다고 보고된 결장 및 직장암에서의 림프절 유리 암세포가 환자의 예후와는 통계적인 상관관계가 없었지만, 연구자 간의 결과에 따라 아직 논란의 여지가 있으므로 이에 대한 연구가 좀더 이루어져야 할 것으로 생각된다.

## 결 론

저자들은 hematoxylin-eosin 염색으로 림프절 전이가 없다고 보고된 Aster-Coller B 결장 및 직장암 환자의 림프절 및 원발암 조직을 항cytokeratin 항체와 p53 단백으로 면역조직화학 염색을 시행하여 예후와의 관계를 알아보았다. 림프절내의 유리 암세포는 비재발군에서 38.5% (5/13), 전체 림프절 214개에서 5개로 2.34%였고, 재발군에서는 54.6% (6/11), 전체 림프절 244개 중 11개로 4.51%로 비재발군보다 높은 유리 암세포율을 보였지만, 통계적인 유의성은 없었다( $P > 0.05$ ). 림프절의 유리 암세포가 있는 군에서의 p53 단백 발현율은 42.9% (3/7)였고, 유리 암세포가 없는 군에서는 57.1% (4/7)로 상관관계는 없었다. 이상으로 림프절 유리 암세포율은 재발군과 비재발군에서 유의한 차이를 보이지 않으므로 Astler-Coller B 결장 및 직장암 환자에서 영향력 있는 예후 인자는 아닌 것으로 생각되지만 유리 암세포의 존재는 흥미로운 사실이며 블록당 조직절편의 개수를 늘리면 결과가 다르게 나타날 수 있으며 좀더 많은 환자를 대상으로 한 연구를 통해서만 결론을 내릴 수 있을 것으로 생각된다. 그리고 림프절의 유리 암세포가 예후를 결정하는 인자인 림프절의 전이가 되는 과정에 대한 연구도 이루어지는 것이 중요하다고 생각된다.

## REFERENCES

1. Chapuis PH, Dent OF, Fischer R, Newland RC, Pheils MT, Smyth E, 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.
2. Fielding LP, Phillips RK, Fry JS, Hittinger R. Prediction of outcome after curative resection of large bowel cancer. *Lancet* 1986;18:904-7.
3. Hermanek P, Hutter RV, Sobin LH, Wittekind C. International union against cancer. Classification of isolated tumor cells and micrometastasis. *Cancer* 1999; 86:2668-73.
4. Greenson JK, Isenhardt CE, Rice R, Mojzizik C, Houchens D, Martin EW Jr. Identification of occult micrometastases in pericolic lymph nodes of Dukes' B colorectal cancer patients using monoclonal antibodies against cytokeratin and CC49. Correlation with long-term survival. *Cancer* 1994;73:563-9.
5. Liefers GJ, Cleton-Jansen AM, van de Velde CJ, Hermans J, van Krieken JH, Cornelisse CJ, et al. Micrometastases and survival in stage II colorectal cancer. *N Engl J Med* 1998;339:223-8.
6. Hayashi N, Ito I, Yanagisawa A, Kato Y, Nakamori S, Imaoka S, et al. Genetic diagnosis of lymph-node metastasis in colorectal cancer. *Lancet* 1995;345:1257-9.
7. Galea MH, Athanassiou E, Bell J, Dilks B, Robertson JF, Elston CW, et al. Occult regional lymph node metastases from breast carcinoma: immunohistological detection with antibodies CAM 5.2 and NCRC-11. *J Pathol* 1991;165:221-7.
8. Ishida K, Katsuyama T, Sugiyama A, Kawasaki S. Immunohistochemical evaluation of lymph node micrometastases from gastric adenocarcinomas. *Cancer* 1997; 79:1069-76.
9. McGuckin MA, Cummings MC, Walsh MD, Hohn BG, Bennett IC, Wright RG. Occult axillary nodes metastases in breast cancer: their detection and prognostic significance. *Br J Cancer* 1996;73:88-95.
10. 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.
11. Cooper D, Schermer A, Sun TT. Classification of human epithelia and their neoplasms using monoclonal antibodies to keratins: strategies, applications, and limitations. *Lab Invest* 1985;52:243-56.
12. Leong AS. The prognostic dilemma of nodal micrometastases in breast carcinoma. *Gan To Kagaku Ryoho* 2000;27(suppl):315-20.
13. Elson CE, Kufe D, Johnston WW. Immunohistochemical detection and significance of axillary lymph node micrometastases in breast carcinoma. A study of 97 cases. *Anal Quant Cytol Histol* 1993;15:171-8.
14. 권영미, 노재윤, 강경훈. 진행성 위암에서 림프절 미소전이의 예후적 유의성. *대한병리학회지* 2000;34:125-31.
15. Nakajo A, Natsugoe S, Ishigami S, Matsumoto M, Nakashima S, Hokita S, et al. Detection and prediction of micrometastasis in the lymph nodes of patients with pN0 gastric cancer. *Ann Surg Oncol* 2001;8:158-62.
16. Fukagawa T, Sasako M, Mann GB, Sano T, Katai H, Maruyama K, et al. Immunohistochemically detected micrometastases of the lymph nodes in patients with gastric carcinoma. *Cancer* 2001;92:753-60.
17. Adell G, Boeryd B, Franlund B, Sjudahl R, Hakansson

- L. Occurrence and prognostic importance of micro-metastases in regional lymph nodes in Dukes' B Colorectal carcinoma: an immunohistochemical study. *Eur J Surg* 1996;162:637-42.
18. Chang F, Syrjanen S, Syrjanen K. Implications of the p53 tumor-suppressor gene in clinical oncology. *J Clin Oncol* 1995;13:1009-22.
19. Nuorva K, Soini Y, Kamel D, Autio-harmainen H, Risteli L, Risteli J, et al. Concurrent p53 expression in bronchial dysplasia and squamous cell lung carcinomas. *Am J Pathol* 1993;142:725-32.
20. Hollstein M, Sidransky D, Vogelstein B, Harris CC. p53 mutation in human cancers. *Science* 1991;253:49-53.
21. Bennett WP, Hollstein MC, Metcalf RA, Welsh JA, He A, Zhu SM, et al. p53 mutation and protein accumulation during multistage human esophageal carcinogenesis. *Cancer Res* 1992;52:6092-7.
22. Shin DM, Kim J, Ro JY, Hittelman J, Roth JA, Hong WK, et al. Activation of p53 gene expression in pre-malignant lesions during head and neck tumorigenesis. *Cancer Res* 1994;54:321-6.
23. Yamaguchi K, Chijiwa K, Torato N, Kinoshita M, Tanaka M. Ki-ras codon 12 point and p53 mutations: a molecular examination of the main tumor, liver, portal vein, peripheral arterial blood and para-aortic lymph node in pancreatic cancer. *Am J Gastroenterol* 2000; 95:1939-45.
-