

# 종양진단에서의 Cytokeratin에 대한 면역조직화학 연구의 적용

고려대학교 부속병원 병리과

박 해 림 · 김 인 선 · 백 승 롱

## 서 론

외과 병리 영역에서 정확한 조직학적 진단은 향후 다른 진단방법의 선택이나 치료, 혹은 예후를 추정하는데 필수적인 요소이다. 실제로 분화가 좋지 않은 종양은 통상 사용하는 조직학적 혹은 세포학적인 방법으로 진단이 불가능한 경우가 많아서 때로 전자현미경의 도움을 받기도 하는데 이는 시간이 많이 소모되고 조직의 특별한 처리가 필요하다는 점과 관찰 부위를 설정하는 데 따른 판독의 차이 때문에 제한을 받고 있다<sup>1)</sup>.

이를 보완하는 한가지 방법으로 면역 조직 화학법이 소개되어 많은 발전을 이루어 왔는데 그 중의 하나가 중간형 사상체 (intermediate filament)를 이용하는 방법이다<sup>2)</sup>. 이는 6 nm의 미소 사상체, 20내지 25 nm의 미소 관과 함께 세포 골격을 이루는 8~10 nm 크기의 사상체인데 현재까지 keratin, vimentin, desmin, neurofilament protein과 glial fibrillary acidic protein등 다섯 가지가 밝혀져 있다.

이들은 각각 정상 상피, 간엽 조직, 근육, 신경, 신경교세포에서 증명이 되고 세포 배양후 혹은 종양으로 전환된 후에도 같은 종류의 중간형 사상체를 갖고 있다고 알려져 왔다<sup>2~4)</sup>.

Keratin은 40에서 67 Kd의 분자량을 가진 단백질로<sup>5)</sup> 피부의 중층 편평 상피뿐 아니라 위중층 원주 상피, 이행상피, 단층상피 등 모든 상피 세포와 이에 기원한 종양에서 증명된다<sup>6,7)</sup>.

따라서 분화가 나쁜 종양의 경우, 상피성 종양을 림프종 등 간엽 조직의 종양과 감별하는데 간단하고 예민도

가 좋은 방법으로 소개되어 왔는데<sup>3)</sup>, 그 외에도 중피 세포나 선종양 종양, 활액막 육종<sup>8)</sup>, 혹은 상피양 육종 등 일부 간엽 조직에서도 양성임이 보고 되었다. 최근에는 면역 침전법, immunoblotting법, 혹은 이차원적 겔 전기 영동법을 통하여 19종류의 polypeptide로 분리가 가능한데 이에 특이하게 작용하는 단클론성 항체를 적용하여 각 상피 종양의 기원을 설명하려는 단계에까지 이르렀다.

이에 저자들은 1984년 5월에서 1987년 7월까지 4년 동안에 고려대학교 부속병원에서 절제되었던 조직표본 중에서 정상이라고 판단되는 25예와 종양 61예를 대상으로 파라핀 포매된 조직을 이용하여 keratin에 대한 면역 조직 화학법을 적용하여 그 진단적 가치를 평가해 보았다.

## 재료 및 방법

### 1. 재 료

연구 재료로는 1984년 5월부터 1987년 7월까지 4년 동안 고려대학교 부속병원에서 절제되었던 조직 표본중에서 통상적인 10% 중화 포르말린 고정과 파라핀 포매후 hematoxylin-eosin 염색되었던 현미경 표본을 재검토하여 정상 조직이라고 생각되는 25예와 각 장기의 대표적인 종양 61예를 임의로 선정하여 총 86예를 그 대상으로 하였다.

### 2. 항혈청

일차 항체로는 Histogen 제품으로 생쥐에서 생성된 40, 46, 50, 52, 56, 58, 65-67 Kd keratin에 광범위하게 반응하는 단클론성 항체를 사용하였고 이차 항체는 생쥐에 대한 염소항체 (goat anti-mouse antibody)에 과산화 효소를 결합시킨 혈청을 이용하였다.

\*본 논문의 요지는 1987년 5월 22일 대한 병리학회 제12차 춘계학술대회에서 전시되었음.

- proteins and carcinoembryonic antigen in lung carcinoma: An immunoperoxidase study of fifty four cases, with ultrastructural correlations. Hum Pathol 14:70, 1983*
- 2) **Ramaekers F, Puts J, Moesker O, Kant A, Jap P, Vooijs P:** *Demonstration of keratin in human adenocarcinomas. Am J Pathol 111:213, 1983*
  - 3) **Schlegel R, Schlegel SB, McLeod J, Pinkus GS:** *Immunoperoxidase localization of keratin in human neoplasms. Am J Pathol 101:41, 1980*
  - 4) **Altmannsberger M, Osborn M, Schauer A, Weber K:** *Antibodies to different intermediate filament proteins. Lab Invest 45:427, 1981*
  - 5) **Schlegel SPB, McDowell EM, Wilson TS, Trump BF, Harris CC:** *Keratin proteins in human lung carcinomas. Am J Pathol 114:273, 1984*
  - 6) **Schlegel R, Schlegel SB, Pinkus GS:** *Immunohistochemical localization of keratin in normal human tissues. Lab Invest 42:91, 1980*
  - 7) **Sun TT, Shin C, Green H:** *Keratin cytoskeletons in epithelial cells of internal organs. Proc Natl Acad Sci USA 76:2813, 1979*
  - 8) **Miettinen M, Lehto VP, Virtanen I:** *Keratin in the epithelial-like cells of classical biphasic synovial sarcoma. Virchows Arch (Cell Pathol) 40:157, 1982*
  - 9) **Osborn M, Weber K:** *Biology of disease. Tumor diagnosis by intermediate filament typing: A novel tool for surgical pathology. Lab Invest 48:372, 1983*
  - 10) **Cooper D, Schermer A, Sun TT:** *Biology of disease. Classification of human epithelia and their neoplasms using monoclonal antibodies to keratins: Strategies, applications, and limitations. Lab Invest 52:243, 1985*
  - 11) **Battifora H, Kopinski MI:** *Distinction mesothelioma from adenocarcinoma. Cancer 55:1679, 1985*
  - 12) **Pinkus GS, O'Connor EM, Etheridge CL, Corson JM:** *Optimal immunoreactivity of keratin proteins in formalin-fixed, paraffin-embedded tissue requires preliminary trypsinization. J Histo Cyto 33:465, 1985*
  - 13) **Corson JM, Pinkus GS:** *Mesothelioma: Profile of keratin proteins and carcinoembryonic antigen. Am J Pathol 108:80, 1982*
  - 14) **Gabbiani G, Kapanci Y, Barazzone P, Franke WW:** *Immunochemical identification of intermediate-sized filaments in human neoplastic cells. Am J Pathol 104:206, 1981*
  - 15) **Debus E, Moll R, Franke WW, Weber K, Osborn M:** *Immunohistochemical distinction of human carcinomas by cytokeratin typing with monoclonal antibodies. Am J Pathol 114:121, 1984*
  - 16) **Corson JM:** *Keratin protein immunohistochemistry in surgical pathology practice. Pathol Ann 21:47, 1986*
  - 17) **Warhol MJ, Pinkus GS, Schlegel SPB:** *Localization of keratin proteins in the human epidermis by a postembedding immunoperoxidase technique. J Histo Cyto 31:517, 1983*
  - 18) **Moll R, Levy R, Czernobilsky B, Majert PH, Hellweg GD, Franke WW:** *Cytokeratin of normal epithelia and some neoplasms of the female genital tract. Lab Invest 49:599, 1983*
  - 19) **Blobel GA, Moll R, Franke WW, Myokopf IV:** *Cytokeratins in normal lung and lung carcinomas. Virchows Arch (Cell Pathol) 45:407, 1984*
  - 20) **Löning T, Caselitz J, Otto HF:** *The epithelial framework of the thymus in normal and pathological conditions. Virchows Arch (Pathol Anat) 392:7, 1981*
  - 21) **Battifora H, Sun TT, Bahu RM, Rao S:** *The use of antikeratin antiserum as a diagnostic tool: Thymoma versus lymphoma. Hum Pathol 11:635, 1980*
  - 22) **Saba SR, Espinoza CG, Richman AV, Azar HA:** *Carcinomas of the lung: An ultrastructural and immunocytochemical study. Am J Clin Pathol 80:6, 1983*
  - 23) **Makin CA, Bobrow LG, Bodmer WF:** *Monoclonal antibody to cytokeratin for use in routine histopathology. J Clin Pathol 37:975, 1984*
  - 24) **Kahn HJ, Hanna W, Yeger H, Baumal R:** *Immunohistochemical localization of prekeratin filaments in benign and malignant cells in effusions. Am J Pathol 109:206, 1982*
  - 25) **Walts AE, Said JW, Schlegel SB:** *Keratin and carcinoembryonic antigen in exfoliated mesothelial and malignant cells: An immunoperoxidase study. Am J Clin Pathol 80:671, 1983*
  - 26) **Miettinen M, Lehto VP, Dahl D, Virtanen I:** *Varying expression of cytokeratin and neurofilaments in neuroendocrine tumors of human gastrointestinal tract. Lab Invest 52:429, 1985*
  - 27) **Penneys NS, Nadji M, Weissman JZ, Morales AR:** *Prekeratin in spindle cell tumors of the skin. Arch Dermatol 119:476, 1983*
  - 28) **Steeper TA, Pisciolli F, Rosai J:** *Squamous cell carcinoma with sarcoma-like stroma of the female genital tract. Cancer 52:890, 1983*

- 29) **Huszar M, Herczeg E, Lieberman Y, Geiger B:** *Distinctive immunofluorescent labeling of epithelial and mesenchymal elements of carcinosarcoma with antibodies specific for different intermediate filaments. Hum Pathol 15:532, 1984*
- 30) **Battifora H, Sheibani K, Tubbs RR, Kopinski MT, Sun TT:** *Antikeratin antibodies in tumor diagnosis. Cancer 54:843, 1984*
- 31) **Ramaekers F, Huysmans A, Moesker O, Kant A, Jap P, Herman C, Vooijs P:** *Monoclonal antibody to keratin filaments, specific for glandular epithelia and their tumors. Lab Invest 49:353, 1983*
- 32) **Miettinen M, Lehto VP, Virtanen I:** *Immunofluorescence microscopic evaluation of the intermediate filament expression of the adrenal cortex and medulla and their tumors. Am J Pathol 118:360, 1985*
- 33) **Espinoza CG, Azar HA:** *Immunohistochemical localization of keratin-type proteins in epithelial neoplasms. Am J Clin Pathol 78:500, 1982*
- 34) **Corson JM, Weiss LM, Schlegel SPB, Pinkus GS:** *Keratin proteins and carcinoembryonic antigen in synovial sarcomas: An immunohistochemical study of 24 cases. Hum Pathol 15:615, 1984*
- 35) **Chase DR, Weiss SW, Enzinger FM, Langloss JM:** *Keratin in epithelioid sarcoma. Am J Surg Pathol 8:435, 1984*
- 36) **Rosai J, Pinkus GS:** *Immunohistochemical demonstration of epithelial differentiation in adamantinoma of the tibia. Am J Surg Pathol 6:427, 1982*
- 37) **Miettinen M, Lehto VP, Dahl D, Virtanen I:** *Differential diagnosis of chordoma, chondroid, and ependymal tumors as aided by anti-intermediate filament antibodies. Am J Pathol 112:160, 1983*
- 38) **Shi SR, Goodman ML, Bhan AK, Pilch BZ, Chen LB, Sun TT:** *Immunohistochemical study of nasopharyngeal carcinoma using monoclonal keratin antibodies. Am J Pathol 117:53, 1984*
- 39) **Kahn HJ, Yeger H, Baumal R, Thom H, Phillips JM:** *Categorization of pediatric neoplasms by immunostaining with antiprekeratin and antivimentin antisera. Cancer 51:645, 1983*
- 40) **Madri JA, Barwick KW:** *An immunohistochemical study of nasopharyngeal neoplasms using keratin antibodies. Am J Surg Pathol 6:143, 1982*

— Abstract —

### An Application of Immunohistochemical Study of Cytokeratin in Tumor Diagnosis

Hye Rim Park, M.D., Insun Kim, M.D.  
and Seung Yong Paik M.D.

Department of Pathology,  
Korea University Hospital

Cytokeratins are a family of polypeptides of intermediate filaments which in diverse epithelia are expressed in different, yet specific combinations. To evaluate the diagnostic value of keratin, immunohistochemical staining was done in formalin-fixed, paraffin-embedded normal and neoplastic tissues by PAP and StreptABC methods. The antiserum for cytokeratin is monoclonal antibody which gives the specificity for 40, 46, 50, 52, 56, 58, and 65-67 Kd keratin classes.

The results are as follows:

1) The staining was positive for cytokeratin in all of the squamous epithelium, ductular epithelial cells of various glands, respiratory and urinary tract epithelium, and mesothelial cells.

2) No staining for cytokeratin was observed in respiratory alveolar epithelium, acinar cells of various glands, renal glomeruli, hepatocytes, and many mesoderm-derived tissues such as muscle, hematopoietic and lymphoid tissues, nerve, bone, cartilage, and fibroblasts.

3) Squamous cell carcinomas, transitional cell carcinomas, mesotheliomas, and some of the adenocarcinomas (stomach, colon, uterine cervix, biliary tract and breast) exhibited positive staining for cytokeratin. Epithelial cells of thymoma, adenomatoid tumor, pleomorphic adenoma of salivary gland, papillary carcinoma of thyroid, lymphoepithelioma, and craniopharyngioma were also positive.

4) Some of the adenocarcinomas (prostate and pancreas), renal cell carcinoma, ovarian stromal and germ cell tumors, hepatocellular carcinoma, malignant melanoma, and mesoderm-derived tumors including malignant lymphoma were uniformly negative for staining.

5) From the above results, the immunohistochemical study in paraffin-embedded tissues using monoclonal

antibody for cyto keratin may be useful to differentiate various tumors, especially in differential of hepatocellular carcinoma from bile duct adenocarcinoma, lymphoepithelioma and other undifferentiated carcinomas from lymphoma, thymoma from lymphoma, and squamous cell carcinoma from melanoma. It will be

helpful in the diagnosis of transitional cell carcinoma in which the differentiation from renal cell carcinoma and prostatic adenocarcinoma be difficult.

---

**Key Words:** Cytokeratin, tumor.

### 3. 면역 과산화 효소 염색 방법

1) 통상적인 포르말린 고정과 파라핀 포매를 거친 조직을 5~6  $\mu\text{m}$  두께의 절편으로 만들어 아교로 처리한 슬라이드에 부착시킨후 56°C oven에서 한 시간 정도 가온한다.

2) 탈파라핀 및 함수 과정을 다음과 같이 시행한다.

(1) Xylene에서 5분씩 2번 처리한다.

(2) 100% 알콜에서 3분씩 2번 처리한다.

(3) 95% 알콜에서 3분간 처리한다.

(4) 70% 알콜에서 3분간 처리한다.

(5) 증류수로 세척한다.

3)  $\text{H}_2\text{O}_2$ -methanol 용액에서 30분간 처리하여 조직 내에 있는 내인성 과산화 효소의 활동을 억제시킨 후 증류수로 세척한다.

4) 종양 특이 항원의 검출을 증진시키기 위해 37°C를 유지하면서 0.1% 트립신에서 30분간 처리한 후 증류수로 세척한다.

5) Tris완충액(pH 7.6)에서 3분간 3번 세척한다.

6) 단백질과의 비특이성 결합을 억제시키기 위해 슬라이드를 습윤 상자에 넣고 정상 염소혈청을 가하여 실온에서 30분간 반응시킨다.

7) 습윤 상자에서 정상 혈청을 가볍게 떨어뜨린 후 45분 동안 생쥐에서 만들어진 일차 항체로 반응시킨다.

8) Tris 완충액에서 3분간 3번 세척한다.

9) 습윤 상자에서 과산화 효소와 결합된 염소에서 생성된 이차 항체를 30분 동안 반응시킨다.

10) Tris 완충액에서 3분간 3번 세척한다.

11) Diaminobenzidine(DAB) 6 mg을 10 ml의 Tris 완충액에 녹인후 30% 과산화 수소 3  $\mu\text{l}$ 를 가한다. 일부 경우에서 3-amino-9-ethylcarbazole(AEC)을 색원체로 사용했다.

12) 현미경 검색하에서 원하는 붉은 갈색이 나올때까지 DAB로 발색시킨다.

13) 흐르는 물에서 세척한다.

14) Mayer's hematoxylin으로 2분간 대조 염색한다.

15) 흐르는 물에서 세척한후 glycerin jelly로 봉입한다.

### 4. Biotin-Strept Avidin amplified system

일부의 경우에는 Strept ABC 방법을 이용하여 염색하였는데 과정 9)에서 goat 에서 만든 biotinylated antimouse antibody 와 horseradish peroxidase-labelled streptavidin을 반응시킨다. 이 방법을 사용한 예는 PAP를 적용한 경우보다 염색성이 조금 강하였으나 결과 판정에는 큰 차이가 없었으므로 같이 포함시켜 판독하였다.

### 5. 염색반응의 결과 판정

광학현미경으로 관찰하여 세포막과 세포질이 뚜렷한 과립상의 갈색으로 나타나는 세포를 양성, 발색되지 않은 세포를 음성, 그리고 소수의 세포에서 약한 갈색 또는 적색으로 염색된 경우를 약양성으로 판정하였다.

## 결 과

### 1. 정상 조직 (Table 1)

우선 keratin은 표피의 전층 즉 기저층에서부터 각질층에 이르기까지 강하게 양성 반응을 보였으며, 피부 부속기 즉 모낭, 피지선, 한선에도 같은 반응을 보였다. 그 외 자궁 외경부, 항문, 식도, 후두, 비인두를 구성하는 다른 편평상피에도 마찬가지로 강하게 염색이 되었다 (Fig. 1).

이와 대조적으로, 상피 기원의 선, 예를 들면 이하선이나 췌장은 서로 유사한 keratin의 분포를 보여, 관을 이루는 상피세포는 많은 세포내 keratin을 함유하였고, 소포 구조는 모두 음성이었다. 폐의 기관지 상피, 자궁 내경부와 전립선은 공통적으로 표층의 원주 세포와 기저 혹은 저장 세포로 구성되어 있으나 염색성은 약간 차이가 있었다. 즉 자궁 내경부의 경우 표피 원주 세포는 음성이면서 기초막에 위치한 기저 세포만 keratin을 함유하고 있었지만, 폐의 기관지와 전립선의 경우에는 기저 세포뿐 아니라 원주 상피에도 약한 양성 반응을 보였다. 기관지나 자궁 경부 상피에는 편평 화생이 흔한데 이는 기저에 위치한 keratin 양성인 상피의 국소적인 증식과 관련되어 있다. 따라서 편평화생이 일어난 부위에서 기원된 조직의 종류와 관계없이 keratin에 대한 항체를 강하게 염색되었다.

유방 조직은 근상피 세포와 표층 관세포 즉 관을 이루

**Table 1.** Keratin reactivity in normal tissue

Site		Reactivity	Site	Reactivity		
Skin	Epidermis	+	Distal tubule	—		
	Hair follicle	+		Pelvis	+	
	Sebaceous gland			Urinary bladder and ureter	Transitional epithelium	+
	Sebaceous cell	+			Smooth muscle	—
	Basal cell	+		Prostate	Columnar cell	±
	Sweat gland				Basal cell	±
	Ductal cell	+		Testis	Tubule	—
	Myoepithelial cell	+			Interstitial	—
	Dermal collagen	—		Female genital tract		
					Ovary	Granulosa cell
Respiratory tract				Stroma	—	
	Nasopharynx			Ovum	—	
Larynx	Squamous epithelium	±	Uterus	Endometrial gland	—	
	Respiratory epithelium	±		Oviduct	Columnar epithelium	±
	Submucosal glands				Cervix	Exocervix
		Ducts		+		Squamous epithelium
	Acini	±	Endocervix			
	Myoepithelial cell	+	Columnar epithelium	—		
Lung	Trachea and bronchus		Basal cell	+		
	Columnar epithelium	+	Metaplastic epithelium	+		
	Goblet cell	—	Reserve cell hyperplasia	+		
	Alveoli	—				
Gastrointestinal tract			Breast	Ducts and acinar epithelium	+	
	Esophagus	+		Myoepithelial cell	±	
	Stomach	Surface epithelium	+	Endocrine organs		
		Mucous gland	—		Adrenal	Cortex and medulla
	Ileum	Surface epithelium	+	Thyroid	Follicular epithelium	±
		Mucous gland	±	Lymphoreticular system		
	Colon	Surface epithelium	+		Spleen	
		Mucous gland	±	Thymus	Hassal's corpuscles	+
	Duodenum	Surface epithelium	±		Epithelial reticular cell	+
	Anus	Squamous cell	+	Lymph node		—
Anal gland		+	Mesenchymal tissue			
					Nerve	—
Liver	Hepatocytes	—		Muscle		
	Bile ducts	+	Smooth	—		
	Hepatic artery and vein	—	Skeletal	—		
Pancreas	Ducts	±	Fibroblast	—		
	Acini	—	Cartilage	—		
	Islets	—	Blood vessel	—		
Parotid gland	Ducts	+	Bony trabeculae	—		
	Acini	—	Hematopoietic cell lines	—		
	Lymphoid tissue	—	Mesothelial cells	+		
Genitourinary tract			Pleura and peritoneum			
	Kidney			Glomeruli	—	
	Proximal tubule	+				

Abbreviations : +; positive —; negative ±; weak positive

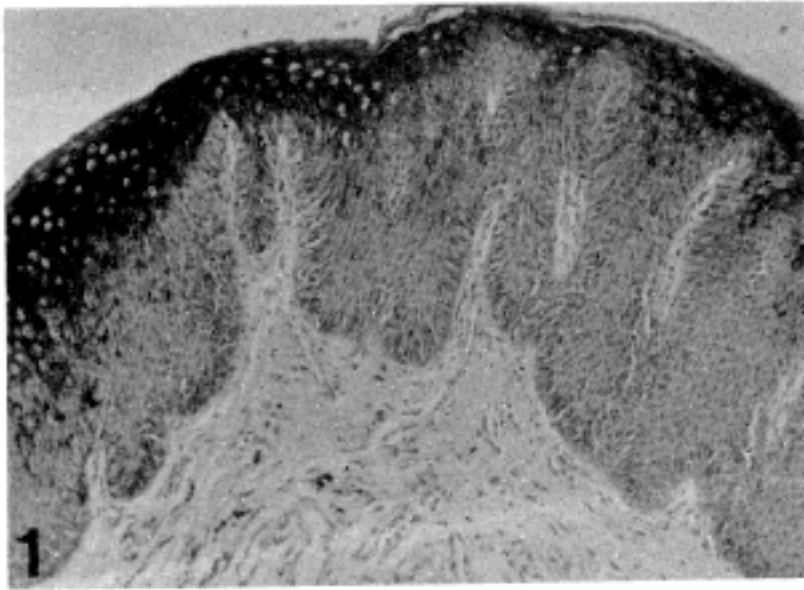
**Table 2.** Keratin reactivity in tumor

Tumor	Reactivity	Tumor	Reactivity		
Squamous cell carcinoma	Skin		Adrenal cortex adenoma	—	
	Respiratory tract		Duodenum carcinoid	—	
		Nasopharynx (spindle cell variety)	Mesothelial tumor	Adenomatoid tumor	+
	Larynx		Malignant mesothelioma	±	
	Lung	Female genital tumor	Endodermal sinus tumor	—	
	Gastrointestinal tract		Granulosa cell tumor	—	
		Esophagus		Fibrothecoma	—
		Anus		Dysgerminoma	—
	Cervix		Choriocarcinoma	—	
	Bone, metastatic		Malignant mixed mesodermal tumor	+	
Basal cell carcinoma	±				
Transitional cell carcinoma	+	Breast tumor	Fibroadenoma	+	
Adenocarcinoma	Lung (bronchioloalveolar carcinoma)		Cystosarcoma phyllodes	+	
			Pleomorphic adenoma	+	
	Gastrointestinal tract		Warthin's tumor	±	
		Stomach		Mucoepidermoid tumor	+
		Colon			+
		Pancreas	Thymoma		+
	Liver	Soft tissue tumor	Ganglioneuroma	—	
	Biliary duct		Schwannoma	—	
	Genitourinary tract		Neurofibroma	—	
		Kidney		Granular cell tumor	—
Endometrium			Neuroblastoma	—	
Cervix			Rhabdomyosarcoma	—	
Prostate		Dermatofibroma	—		
Breast		Synovial sarcoma	—		
	Ductal		Ewing's tumor	—	
Lobular		Brain tumor	Craniopharyngioma	+	
Undifferentiated carcinoma	Large cell		Astrocytoma	—	
			Meningioma	—	
	Lung		Salivary gland	—	
	Lymph node, metastatic lymphoepithelioma	Lymphoma	Nasopharynx	—	
	Small cell		Kidney, plasmacytoma	—	
Hypopharynx		Melanoma	—		
Lung			—		
Endocrine tumor	Thyroid				
	Papillary carcinoma				
	Follicular adenoma				

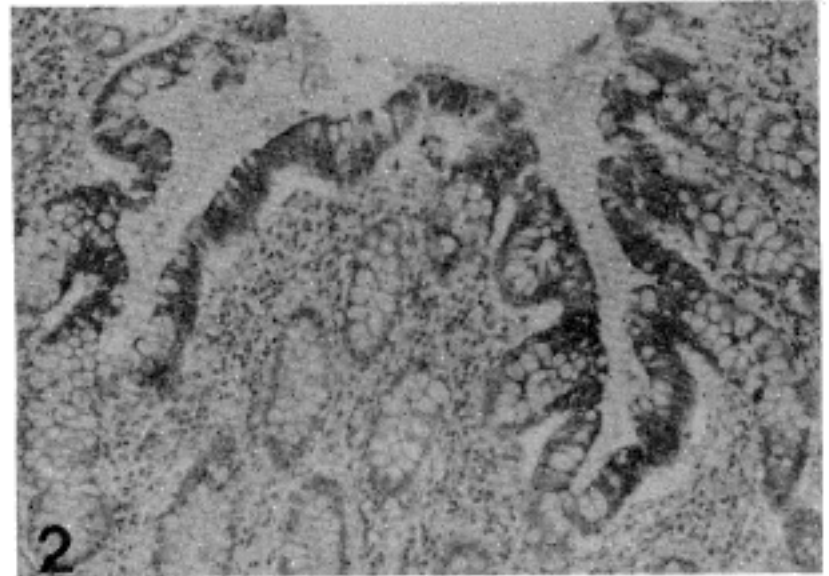
Abbreviations ; + ; positive — ; negative, ± ; weak positive

는 모든 표피에 균등한 염색성을 나타내었다. 자궁내막, 부신을 이루는 세포는 음성이었으며, 난관과 갑상선의 세포는 증례에 따라 약한 양성 반응을 보였다. Keratin은

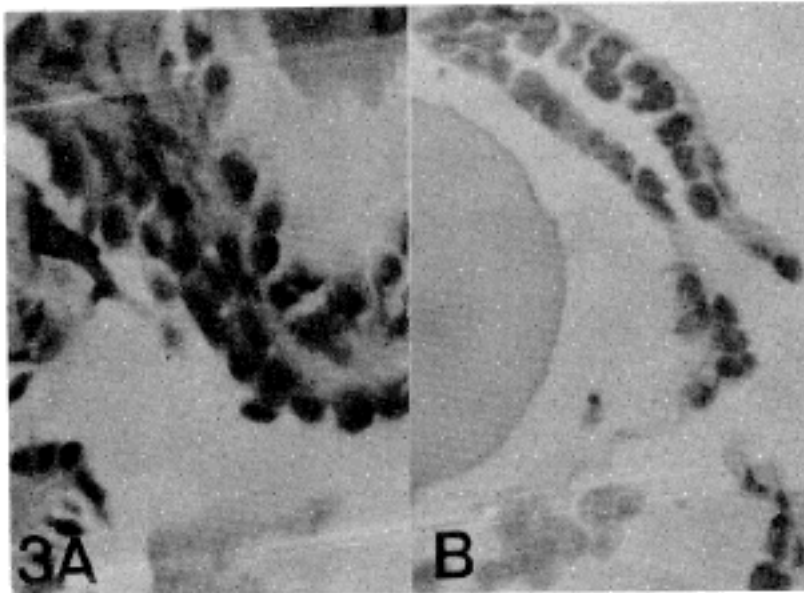
방광과 요관, 신우를 덮고 있는 요로 점막에서 양성이었지만 신장 사구체에는 음성이었다. 간에서는 단지 담관만이 keratin 단백을 가지고 있었고, 위장관의 염색 특



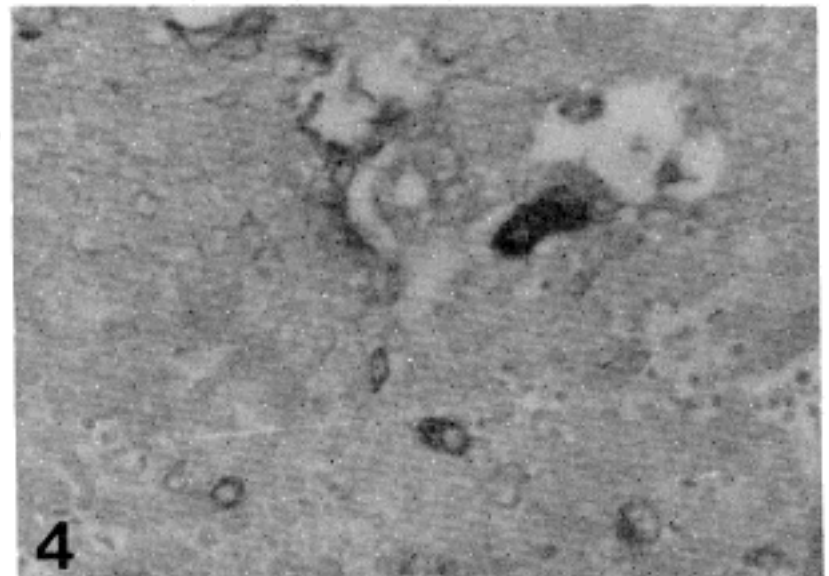
**Fig. 1.** Stratified squamous epithelium of anus. The superficial layer shows more intense cytoplasmic reaction for keratin than the basal layer (PAP, x100)



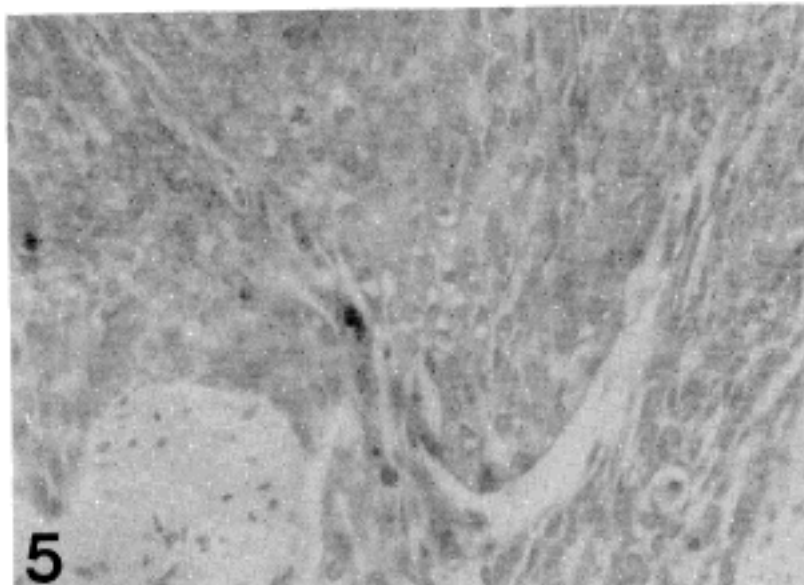
**Fig. 2.** Simple columnar epithelium from colonic mucosa. The surface epithelium stains moderately with keratin antibody, especially along the luminal border. The mucus-secreting glandular cells are only weakly positive. (PAP, x100)



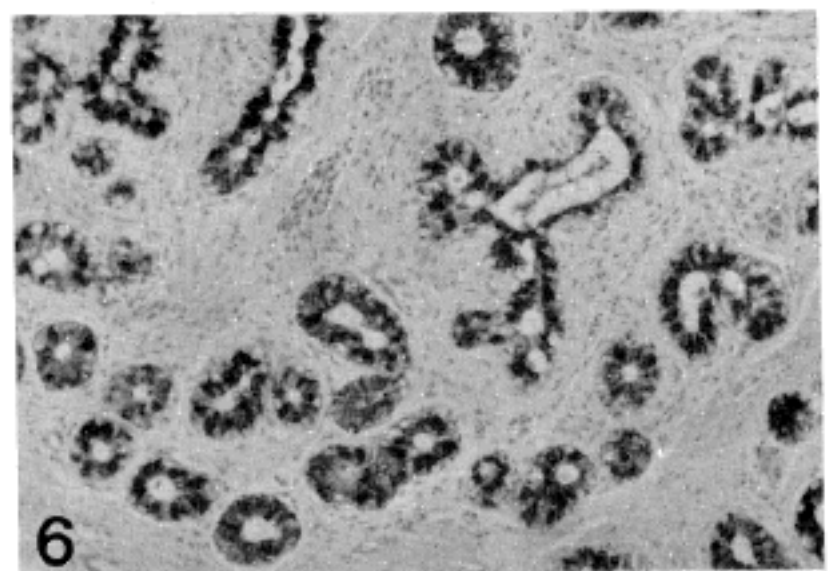
**Fig. 3.** Reactive mesothelial cells of the pleura. Keratin protein is strongly and homogeneously present in the cytoplasm (A : H&E, x400, B : PAP, x400)



**Fig. 4.** Well-differeiated squamous cell carcinoma of anus, showing diffuse cytoplasmic staining for keratin. Staining is strong at the center of the tumor, where keratinization is most prominent. (PAP, x250)



**Fig. 5.** Transitional cell carcinoma, grade 2, of urinary bladder. Most of tumor cells are positive for keratin with varying degrees of intensity. (PAP, x250)



**Fig. 6.** Fibroadenoma of breast. The glandular epithelial cells are intensely positive for keratin but the stroma is negative. (PAP, x100)



성은 증례별로 좀 차이가 있었는데, 대부분 약한 양성 반응을 보이는 것으로 판별하였다(Fig. 2).

홍선의 Hassall's corpuscle은 내배엽 기원이라고 생각되지만 그 조직학적 양상은 표피양인 구조로써, 강한 양성 반응을 보였고, 홍선의 다른 부분은 염색되지 않았다.

모든 결합 조직은 전혀 염색되지 않았는데, 이에선 신경, 평활근, 골격근, 섬유아세포, 연골, 혈관, 골, 조혈 세포 등이 속한다. 비장과 임파절을 포함한 임파선 조직도 음성 반응을 보였고 난소와 고환의 모든 생식 세포나 간질 세포 역시 keratin에 반응하지 않았다. 특이한 것으로 증배엽 기원이라고 생각되는 중피 세포에 강한 염색성이 관찰되었다(Fig. 3).

## 2. 종양 조직 (Table 2)

Keratin 단백질은 여러 종류의 상피성 종양에서 관찰할 수 있었지만 장기에 관계없이 편평 세포암에서 가장 많은 양을 함유하고 있었다. 따라서 피부, 폐, 식도, 후두, 항문, 자궁 경부에 생긴 편평 세포암은 keratin 항체에 대해 강한 세포내 염색을 보여주었다(Fig. 4).

염색되는 강도는 종양세포의 분화 정도와 관련이 되지만 편평 세포암의 경우는 분화가 나쁜 종양도 keratin 항체와 반응하였다. keratin에 대한 비교적 뚜렷한 염색성이 표피의 기저 세포암, 요로 상피암에서 발견되었는데, 방광 요로 상피에서 기원한 이행 세포암의 경우, 부분적으로 편평세포로 분화한 부분은 세포의 염색성이 증가되는 특징을 보였다(Fig. 5).

선암종은 매우 다른 염색 형태를 가지고 있었다. 즉 위와 대장은 선암인 경우 keratin에 대한 항체에 음성이거나 약하게 염색되는 등 반응이 다양하였고, 췌장이나 간암은 염색성이 관찰되지 않았다. 비뇨 생식기관 증 정상 전립선에서 소량의 keratin 단백질이 증명되었음에도 불구하고 전립선의 선암은 keratin 항체에 반응하지 않았고 신장 선암도 음성이었다. 관 선암, 분엽 선암, 섬유종 혹은 엽상 낭상 육종 등의 유방 종양에서는 정상 유방조직과 마찬가지로 상피 성분들이 keratin 항체에 반응하였다(Fig. 6). 미분화 암종 중에서 폐와 위에 생긴 대세포 미분화암과 폐, 하인두에 생긴 소세포암은 비교적 약한 정도의 염색성을 보였다. 내분비계 종양중 갑상선의 여포상 선종과 유두상 암종은 양성을 나타냈지만 부신 피질 선종과 십이지장에 생긴 악성 유암종은 음성이었다.

중피에서 기원한 종양으로 알려진 선종양 종양과 악성 중피종에서 모두 양성반응을 보였다. 여성 생식계증 난소의 생식 세포 종양과 간질 세포 기원의 종양 모두 음성이었고, 자궁 내막과 자궁 경부에서 생긴 선암의 경우는 약한 정도의 염색성을 나타내었다. 타액선에 발생한 종양, 즉 다형성선종, Warthin씨 종양, 점막 표피암 모두에서 양성 반응을 보였고, 홍선종에서도 상피 세포의 세포질 내에서 염색되는 과립을 발견할 수 있었다. 연부 종양중 keratin에 양성으로 알려진 활액막 육종에서는 음성이었고 뇌 종양 중에서는 유일하게 두개 인두종에서 양성 반응을 관찰할 수 있었다.

여러가지 간엽 조직 기원의 양성 혹은 악성 종양, 임파종, 신경계통의 종양, 악성 흑색종 모두에서 keratin을 증명할 수 없었다.

## 고 안

포유동물의 세포질에는 세포 형태와 운동성의 유지, 세포막 단백질의 이동 조절, 염색체와 세포 돌기의 운동, 세포질 분열, 세포 증식의 조절에 관여하는 사상체로 된 단백질이 존재하는 것으로 알려져 있다<sup>9)</sup>. 이 중간형 사상체 (intermediate filament)는 분자량과 조직내의 분포 양상에 따라 다섯 가지의 군으로 나눌 수 있다. 이중 desmin, vimentin과 glial fibrillary acidic protein은 하나의 polypeptide로, neurofilament는 세 종류의 polypeptide로 구성되어 있는데 반해, keratin은 생화학적으로 다양하여 현재까지 19종의 polypeptide가 증명되었다.

Keratin은 표피나 피부 부속기뿐만 아니라 호흡기, 위장관, 비뇨 생식관을 구성하는 상피 세포와 간, 신장, 췌장 등 내장 기관의 상피 세포에도 존재하는 것으로 밝혀져 있다<sup>9,10)</sup>. 현재까지 알려진 19종의 keratin polypeptide중 분자량이 가장 작은 45 Kd와 52 Kd keratin은 간 세포나 소장, 대장 등의 단순 상피에만 존재하므로 단순 상피의 표지자로 이용되고 keratin 50 Kd와 58 Kd는 자궁 경부, 식도, 표피 등 모든 증층 상피의 표지자로 이용될 수 있다. Keratin 51 Kd와 59 Kd는 식도, 자궁 경부, 허 등 일부의 증층 상피에서 발견되고 keratin 55 Kd와 64 Kd는 각막에 존재하는 것으로 알려져 있다. 가장 분자량이 큰 56.5 Kd와 65에서 67 Kd의 keratin은 각화가 일어난 표피 세포에서만 증명되기 때문에 각화의 표

지로 사용된다<sup>10)</sup>.

Formalin에 고정 후 파라핀 포매된 조직에서 면역 과산화 효소법으로 keratin 단백을 처음으로 검출한 것이 1980년인데 이 때에는 대부분의 암종이 keratin에 양성 반응을 보였지만 일부 장기의 선암은 약하게 염색되거나 전혀 염색되지 않았다<sup>3)</sup>.

그후 고정액의 선택, 단백 분해 효소의 사용 여부와 keratin 항체 종류의 선택이 염색성을 좌우한다는 점이 밝혀졌다. 이에 따르면 액체 질소나 isopentane과 dry ice의 혼합 물질에서 급속 동결시킨 조직을 사용한 경우에 keratin 단백질이 제일 잘 보존되고<sup>4,11)</sup>, absolute alcohol이나 methacarn에 고정한 경우에도 비교적 뛰어난 보존 상태를 보이는 것으로 알려져 있다<sup>2,11)</sup>. Formalin에 고정하는 과정과 파라핀 포매과정 둘다 keratin 단백질의 면역 반응성을 감소시키는데<sup>2)</sup> 이는 trypsin등 단백 분해 효소를 사용하여 항원 결합 장소를 노출시켜 줌으로써 보완할 수 있다<sup>12)</sup>. 때로는 파라핀 절편에서 염색의 민감도가 감소되는 점을 진단에 이용하기도 하는데, 가령 중피종은 keratin 함량이 많아 강하게 염색되고 대부분의 선암은 양이 적어 파라핀 절편에서 음성을 보이는 경우가 많다는 점이 그 예이다<sup>3,13)</sup>. 비슷한 경우로 방광에 생긴 이행 세포암은 keratin에 강하게 염색되기 때문에 파라핀 절편에서 keratin에 보통 음성인 전립선 선암과 구별하는데 도움이 된다<sup>3)</sup>.

Keratin에 대한 다클론성 항체는 사람의 피부 각질이나 소의 입, 발굽같은 조직에서 개발되었는데 이 항원체는 제조된 물질의 종류에 따라 특이성의 차이가 있어 각 종양에 대한 면역 반응성도 다르게 나타난다<sup>9,14)</sup>. 다클론성 항체는 일정한 특이도와 반응성을 보이는 것으로 크게 두 가지 군으로 나눌 수 있다. 첫째, 광범위하게 반응하는 항체는 여러 종류의 keratin polypeptide와 반응하기 때문에 대부분의 장기에 생긴 상피성 종양을 인지할 수 있는데 KG 8.13 이 그에 해당된다<sup>15)</sup>. 둘째로 제한된 특이성을 갖는 항체는 단 한개 혹은 소수의 keratin polypeptide를 대표하므로 서로 다른 조직에서 기원된 종양을 구별하는데 그 이용이 연구되어 지고 있다. Gown과 Vogel은 정상 편평 상피, 관성 상피 혹은 단순 상피와의 항체 반응성에 따라 keratin에 대한 다클론성 항체를 class I, II, III, IV로 구별하였는데 class I항체는 정상 편평 상피, 관성 상피 및 단순 상피 모두와 반응하고 class II는 편평 상피에만 반응한다. Class III항체는 관

성 상피와 단순 상피에 반응하고 Class IV는 관성 상피와 편평 상피에 반응하는 것으로 알려져 있다<sup>16)</sup>. 따라서 다클론성 항체는 암종과 육종을 감별하는데, 그리고 저분자량, 고분자량의 다클론성 항체는 각각 암종의 종류를 결정하는데 유용할 것이다.

면역 과산화 효소법은 결과를 판독하는 과정에서 위양성과 위음성을 초래할 수 있는데 양성인 세포를 반드시 종양 세포의 형태학적인 특징을 만족시키는 세포로 정확하게 규정하고, 적절한 대조군을 사용함으로써 위양성을 줄일 수 있다. 위음성은 대부분 부적절한 고정이나 부적당한 keratin 항원체를 사용함으로써 발생하고 때로 종양의 일부만을 검색하면 부위에 따라 keratin 단백질이 표현되지 않을 수도 있다<sup>16)</sup>.

정상 조직에서 면역 형광법에 의한 keratin 표현 양상과 전자 현미경 소견을 비교해 보면 공통점을 찾을 수 있다. 우선 모든 중층 편평 상피와 모낭, 한선의 관동 포피 부속기를 이루는 세포는 keratin 항원체에 의해 매우 강하게 염색되는데 전자 현미경으로 보아 이 세포들이 풍부한 tonofilament를 갖고 있다는 소견과 일치한다<sup>7)</sup>. 포피의 경우 기저층에는 주로 저분자량의 keratin이, 포층에는 고분자량의 keratin이 풍부하게 존재하는데<sup>17)</sup> 미세구조상 세포가 분화함에 따라 개개로 존재하던 tonofilament가 tonofibril로 조직화되는 현상과 관련이 있다. 장관, 비뇨생식기관, 호흡기의 상피에도 keratin은 존재하는데<sup>8)</sup> 각화세포와 비교하면 훨씬 그 양이 적지만 전자 현미경으로 보면 교소체와 관련되어 있고, 주로 관강쪽으로 강하게 염색된다.

기도, 기관지, 전립선과 자궁 경부에서는 주로 기저 세포가 keratin 합성의 중요한 장소이다<sup>8)</sup>. 자궁 내경부와 자궁 외경부가 이행되는 부위는 흔히 기저 세포의 증식으로 인해 편평 화생이 일어나는데 이때에는 중층 상피 세포와 단순상피의 특징을 보이는 세포들이 서로 혼재되어 복잡한 keratin분포 형태를 나타낸다<sup>18)</sup>.

타액선, 췌장, 폐의 keratin은 서로 비슷한 분포 형태를 보인다. 이 기관들은 발생학적으로 상피 성장아가 분지하여 형성되는데 keratin은 초기 분지 단계의 관이나 기관지에서 발견되고 종말 소포나 세포에는 거의 없는 것으로 보아 아마 선이나 기관으로의 발달과정이 keratin의 소실을 초래하는 것으로 생각된다<sup>6)</sup>. 그러나 최근에 특정한 keratin polypeptide로 시행한 연구에 의하면 실제로 기관과 폐를 이루는 모든 상피세포는 keratin을 함

유하지만 호흡기도의 각 부분에 따라 서로 다른 keratin을 표현하는 것으로 밝혀졌다<sup>19)</sup>.

본 실험에서 여러가지 선상 구조중 자궁 내막, 부신, 간, 이하선, 췌장, 자궁 내경부 등이 음성 반응을 보인 것은 고정 방법이나 항체 선택에 따른 차이로 생각되며 적절한 고정과 선세포에 특이한 저분자량의 단클론성 항체를 적용시키면 양성반응이 기대된다.

다음으로 본 실험과 여러 문헌을 종합하여 각 종양에서의 keratin 분포를 살펴보겠는데 각 저자들이 사용한 항체 종류와 고정 방법에 따라 결과에 많은 차이가 있음을 알 수 있다.

정상 흉선의 Hassal's corpuscle과 상피성 세망 세포가 keratin을 함유하고 있듯이 흉선종도 keratin에 양성 반응을 보여 임파종이나 정상피종과 감별할 수 있다<sup>20,21)</sup>.

소세포 미분화암은 항체의 종류와 조직의 고정 방법에 따라 다양한 결과가 보고되었는데 formalin 고정과 파라핀 포매를 거친 조직에 사람 각질 keratin에 대한 다클론성 항체를 적용시킨 경우에 양성율이 낮았고<sup>22)</sup> 분자량이 작은 keratin을 인지할 수 있는 단클론성 항체를 사용한 경우에는 양성율이 높았다<sup>23)</sup>. 본 연구에서는 폐와 하인두에 생긴 소세포암에 적용시켜 보았는데 비교적 약한 정도의 염색성을 관찰할 수 있었다.

Keratin 적용에 대해 많은 연구가 이루어진 것 중의 하나가 중피종과 선암의 감별인데 중피종인 경우에는 강한 염색성을 보이면서 양성 과립의 분포가 광범위, 특히 핵주위에 뚜렷하고 carcinoembryonic antigen(CEA)에 대한 면역 과산화 효소 염색에는 잘 반응하지 않는다. 이에 반해 선암인 경우에는 CEA에 강한 반응을 보이면서 keratin에 대해서는 그 염색성이 약하고 주로 주변막을 따라 양성 과립이 분포된다<sup>11-13,22,24)</sup>.

최근에는 세포학적 검체를 이용하여 면역 효소 화학법을 적용하는 연구가 이루어지고 있는데 세포학적인 검색은 단시간의 alcohol 고정 과정을 거치므로 항원 보존이 쉽고 항원항체 반응이 일어날 수 있는 세포 표면적이 증가한다는 장점이 있다<sup>25)</sup>. 본 연구에서는 실제로 악성 중피종에서 약한 정도의 양성 반응을 보여 선암과 뚜렷이 감별될 정도의 차이를 발견하지 못했는데, CEA에 대한 염색을 같이 시행하거나 좀 더 많은 예에 적용시켜 보는 것이 필요할 것 같다. 또한 췌장과 대장 선암에서 각각 음성과 약양성의 결과를 보인 것은 이들 조직을 고정하는 시간이 지연되어 오는 위음성으로 생각된다.

유암종(carcinoid tumor)도 항혈청과 고정 방법에 따라 그 결과가 좌우되는데 파라핀 포매를 거쳐 다클론성 항체를 사용한 경우에는 대부분 음성 반응을 보이고<sup>26)</sup> class I이나 class III의 단클론성 항체를 적용한 경우에는 모두 양성반응을 보이는 것으로 보고되어 있다<sup>23)</sup>. 이는 위장관이나 췌장의 정상 신경 내분비 세포에서도 keratin양성 반응을 보이는 보고와 일치한다<sup>26)</sup>. 본 연구에는 단 1예의 악성 유암종이 포함되어 있었는데 그 결과는 음성이었다.

구강, 식도, 인두, 피부, 후두, 유방과 신장에 생기는 방추 세포암은 통상적인 광학 현미경으로는 육종이나 흑색종과 감별하기 어려운데 keratin을 적용하면 양성반응을 보이므로 감별진단에 이용이 가능하다<sup>27-29)</sup>.

여러가지 생식 세포 종양 중에서 태생암, 내배엽강 종양, 기형암종, 용모암인 경우는 keratin에 염색되고 미분화 세포종과 정상피종은 음성이다. 이때에도 ethanol에 고정된 조직이나 동결절편을 사용하고 단클론성 항체를 반응시켜야 결과가 좋다<sup>23,30,31)</sup>. 신장, 간, 전립선, 부신 피질에 생긴 선암도 선택된 항혈청의 종류에 따라 많은 차이를 보이는데<sup>16)</sup> 단순 상피의 분자량이 작은 keratin을 인지하는 class I과 III의 단클론성 항체나 소의 입에 대해 만들어진 광범위한 반응성을 갖는 다클론성 항체가 적당하다. 본 실험에서는 광범위하게 반응하는 단클론성 항체를 사용하였는데도 모두 음성 결과를 얻었는데 이는 아마도 keratin 함량이 적은 조직이기 때문에 고정에 의해 반응성이 많이 소실된 것으로 생각된다. 갑상선의 경우는 종양과 항혈청의 종류에 따라 달라지게 되는데 각질 keratin에 대한 다클론성 항체를 사용한 경우 유두상 암종은 모두 양성임을 관찰할 수 있지만 여포상 암종, 수질암, 퇴행성 암인 경우에는 극히 일부만이 양성을 나타낸다. 그러나 class III의 단클론성 항체를 사용한 경우에는 종양의 종류에 상관없이 모두 양성 반응을 보여준다<sup>32)</sup>. 본 예에서는 유두상 암종과 여포상 선종에 실험하였는데 모두 양성 반응을 관찰할 수 있었다.

뇌 종양 중에서는 유일하게 두개인두종이 keratin을 함유하고 있어 뇌하수체 선종과 대조를 이룬다<sup>33)</sup>. 연부 조직에 생기는 육종 중 활액 육종은 keratin을 함유하고 있어 섬유육종, 평활근육종, 악성 혈관 외피세포종과 구별하는데 도움이 되는데<sup>34)</sup> 이는 조직배양이나 전자 현미경을 통한 연구에서도 뒷받침이 된다. 그러나 두경부, 복벽, 액와부, 서혜부 등에 생기는 이상성(biphasic) 활액

육종은 선암과 유사한 형태를 보이는데 이는 keratin에 대한 반응성으로 감별이 불가능하다<sup>34)</sup>. 비교적 드문 질환이지만 육종종에서 keratin에 양성인 것으로 상피양육종을 들 수 있는데 이로써 악성 흑색종, 포상 횡문 근육종, 양성 혹은 악성 섬유 조직구종, 피사성 육아종, 결절성 근막염, 포상 연부 육종등과 감별할 수 있다<sup>35)</sup>.

대부분 골에 생긴 종양은 keratin을 표현하지 않는데 예외로 척색종과 범랑종의 경우에는 keratin에 양성 반응을 보인다<sup>36,37)</sup>. 특히 경골에 생기는 범랑종은 상피성 혹은 혈관 내피성 기원이라는 주장이 있는데 실제로 factor VIII related antigen(FVIII-RA)에는 음성이면서 keratin에 양성 반응을 보여 상피로의 분화를 시사해 준다.

폐나 비인두에 생긴 대세포 미분화암의 경우 keratin을 함유하고 있어 분화 나쁜 임파종이나 흑색종과 감별하는데 유용한 것으로 알려져 있다<sup>38,39)</sup>. 특히 비인두에 생긴 종양은 그 조직학적 형태가 다양하고 충분한 조직을 생검하기 어려운 경우가 많으며, 압좌에 의한 인공 산물이 혼하기 때문에 진단이 어려운 경우가 많다<sup>40)</sup>. 임파상피종은 미세 구조상으로도 keratin과 교소체의 존재가 증명되어 있고, 본 연구에서는 임파절로 전이되었던 비인두의 임파 상피종에서 양성 반응을 보여 진단에 유용한 결과를 얻을 수 있었고, 그 기원이 상피임을 짐작케 했다.

분화가 나쁜 암종을 육종이나 임파종과 감별하기 위해서 전자현미경으로 tonofilament bundle을 찾기도 하는데 실제로 상피기원을 증명하는 방법으로는 keratin 단백질에 대한 면역 과산화 효소 염색법이 전자 현미경 보다 몇가지의 장점을 갖고 있다. 즉 충분한 양의 조직 표본을 검색할 수 있고, 특별한 고정방법이나 처리 과정이 필요하지 않으며, 시간 소모가 적다는 점이다. 또한 keratin 사상체로 인지되기 위해 tonofilament나 교소체 같은 특징적인 구조로 응괴되지 않아도 되고 세포의 구조나 상관관계를 같이 관찰할 수 있으며, 영구적인 보전이 가능하다는 점이다<sup>6,40)</sup>.

최근에는 각각의 keratin분자에 특이한 항혈청을 개발하기 위한 연구가 진행되고 있는데 실제로 모든 keratin 단백질에는 공통으로 존재하는 항원 결정 인자가 있기 때문에 용이하지 않다<sup>16)</sup>.

그러나 각각의 subunit에 특이한 아미노산 서열의 다양성을 알게되고 특이성과 결합 활성이 높은 단클론성 항

체를 생산하는 새로운 방법이 개발중에 있다. 이것이 완성되면 단순히 상피성 종양을 다른 간엽성 종양과 감별하는 목적이 아니라 각각의 상피성 종양을 기원별로 분류하고 정상 혹은 비정상적인 상피 분화의 분자학적인 기전을 연구하는데 많은 도움을 줄 것이 기대된다<sup>10)</sup>.

## 결 론

1984년에서 1987년 사이에 절제되었던 정상 조직 25예와 각종 종양 61예에서 keratin에 대한 면역 조직화학적 염색을 파라핀 포매 조직에 시행하여 외과 병리 분야에서 그의 진단적 가치를 검토한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1) Keratin은 여러 장기의 편평상피, 상피기원 선의 관상피, 호흡기와 비뇨기계의 상피 및 증피 세포에서 양성 반응을 보였다.

2) Keratin은 폐포, 각선의 소포세포, 신장 사구체 및 간세포 등의 상피세포와 근육, 조혈 임파조직, 신경, 골, 연골 및 섬유 아세포등의 간엽성 세포에서는 염색성을 관찰할 수 없었다.

3) 편평 상피 세포암, 이행 상피 세포암, 증피종 및 일부의 선암(위, 대장, 자궁경부, 담관과 유방)에서 keratin 항체에 대해 양성 반응을 보였다. 흉선종, 선종양 종양, 타액선의 다형성 선종, 갑상선의 유두상 암종, 임파상피종 및 두개인두종등도 양성이었다.

4) 일부의 선암(전립선과 췌장), 신장암, 난소의 간질 및 생식세포 종양, 간세포암, 악성 흑색종 및 악성 임파종을 비롯한 간엽 조직 기원의 종양은 모두 음성 반응을 보였다.

이상과 같은 결과는 파라핀 포매 조직에서 단클론성 항체를 이용함으로써 여러 종류의 종양을 진단하는데 도움을 줄 수 있으리라 생각되는데 특히 간암과 담관 선암, 임파 상피종을 비롯한 각종 암종과 임파종, 흉선종과 임파종, 편평 상피세포암과 흑색종등의 감별에 유용하며 신장에 생긴 신장선암과 이행 상피 세포암의 감별이나 전립선암과 방광의 이행 상피 세포암의 감별이 어려울 때에도 유용하리라 사료된다.

## 참 고 문 헌

1) Said JW, Nash G, Tepper G, Schlegel SB: Keratin