

# 늑막 삼출액의 면역조직화학적 방법에 의한 병리학적 재 검색

연세대학교 의과대학 병리학교실

신동환 · 안희정 · 양우익 · 최인준

## 서 론

늑막은 중배엽 기원 중피세포의 특수성으로 인하여 병적인 상태에서 대개 예외없이 삼출액이 다량 생기며<sup>1)</sup> 이 삼출액을 세포학적으로 검사하여 병리진단을 한다. 그러나 늑막 질환이 원발성 혹은 속발성인지 여부를 감별하여야 할 경우가 많으며 특히 종양성질환의 경우에는 향후 치료방향 및 예후 판정 때문에 그 중요성이 점차 증대되고 있다<sup>2)</sup>. 늑막 중피세포의 반응성증식과 중피종<sup>3-5)</sup>, 또 중피종과 늑막전이 암종간의 병리조직학적 감별도 매우 어렵다는 것은 주지의 사실이다<sup>6-8)</sup>.

근래 면역조직화학적 방법의 현저한 발달로 늑막 삼출액내의 세포를 감별진단하는데 유용한 여러가지 표지가 알려져 있어<sup>9,10)</sup>, 이의 특이성을 검정하고 또 표지 상호간의 예민도 및 정확도를 대비하여 봄으로써 늑막삼출의 감별진단에 도움을 얻고자 본 연구를 시작하였다.

## 연구재료 및 방법

### 1. 연구재료

1984년 7월부터 1986년 7월말까지 만 3년간 연세대학교 의과대학 병리학교실에 의뢰된 늑막 삼출액의 세포블럭 중 파라핀 블럭의 보전이 양호하고 조직생검에서 암종으로 확진되었던 26예를 대상으로 하였다. 이와 함께 늑막 및 복막에서 발생한 각각 1예의 악성 중피종으로서 늑막 삼출액에서 종양세포가 발견되지 않았던 2예의 조직표본과 반응성 중피증식 2예의 조직표본을 비교대조를 위해 함께 사용하였다.

\*본 연구는 1987년 교수 연구비로 이루어졌음.  
\*본 논문의 요지는 1987년 10월 24일, 대한병리학회 제39차 추계학술대회에서 발표되었음.

## 2. 연구방법

**임상소견 검토** : 임상기록을 검토하여 종양의 발생부위를 조사하였다.

**늑막 삼출액 세포블럭의 조직화학적 검색** : 일반적인 조직화학적 소견을 보기 위한 hematoxylin-eosin 염색, 세포질내 물질의 성상을 파악하고자 PAS, d-PAS, alcian-blue(pH 2.5)와 mucicarmine 염색을 시행하였다.

**늑막 삼출액 세포블럭의 면역세포화학적 검색** : Histogen Kit(Biogenex Lab. San Ramon, CA, USA)를 이용하여 상피세포로의 분화를 알기 위한 keratin과 epithelial membrane antigen (EMA), 조직구로의 분화를 보기 위한 lysozyme, 그리고 위장관계, 췌장, 폐장의 선암종표지로 이용되는 carcinoembryonic antigen(CEA)에 대한 항체를 1차 항체로 한 면역과산화 효소염색을 시행하였다.

## 결 과

### 1. 악성 늑막 삼출액의 원발부위에 따른 분포

26예의 늑막 삼출액 표본 중 폐장에서 전이된 암종이 20예로 가장 많았고, 난소, 유방, 위장이 각각 3예, 2

Table 1. Primary sites of metastatic carcinoma of the pleural effusion (n=26)

	No. of specimens
Total	26
Lung	20
Ovary	3
Breast	2
Stomach	1

예, 1예의 순으로 관찰되었다(Table 1).

## 2. 늑막 삼출액의 조직화학적 소견

악성 늑막 삼출액 26예 중 선암으로 진단된 예가 19예 이고 그 중 4예(21%)에서 d-PAS 염색에 양성이고 7예(37%)가 alcian-blue와 mucicarmine 염색에 양성반응을 보였다. 2예의 편평세포암에서는 점액을 보기위한 위의 세 염색에 모두 음성반응을 보였다. 반면 비교 대조에 이용된 악성 종괴종 2예의 재박절된 조직절편에서는 d-PAS 염색에 모두 양성이었고 alcian-blue와 mucicarmine 염색에 모두 양성인데 비하여 반응성 증식증피는 이들에 모두 음성이었다(Table 2).

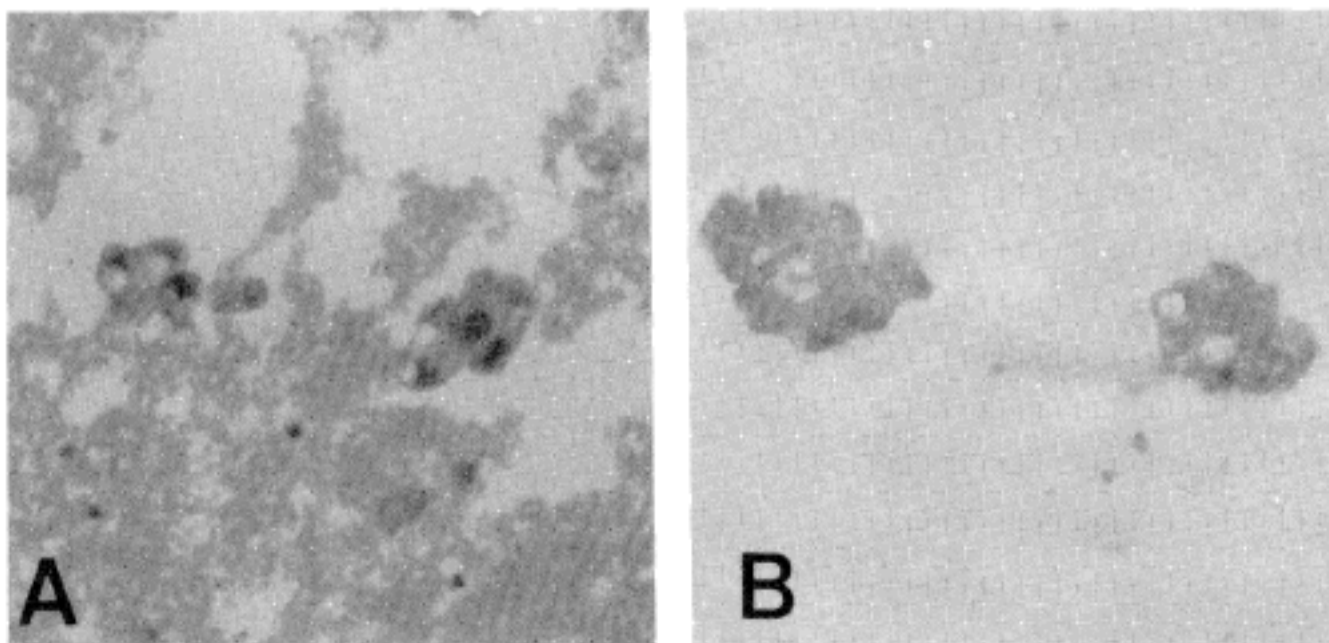
**Table 3.** Immunocytochemical results of metastatic carcinoma and malignant mesothelioma in the pleural fluid

	Keratin	EMA	CEA
Total	19/26 (73%)	19/26 (73%)	19/26 (73%)
Lung	16/20 (80%)	15/20 (75%)	18/20 (90%)
Ovary	0/3	1/3	0/3
Breast	2/2	2/2	0/2
Stomach	1/1	1/1	1/1
Malignant mesothelioma	2/2	2/2	0/2
Reactive mesothelium	2/2	0/2	0/2

**Table 2.** Histochemical results of metastatic carcinoma in the pleural fluid

	d-PAS	Alcian-blue	Mucicarmine
Adenocarcinoma	4/19 (21%)	7/19 (37%)	7/19 (37%)
Epidermoid carcinoma	0/2 (0%)	0/2 (0%)	0/2 (0%)
Others*	1/5 (20%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)
Reactive mesothelium	0/2 (0%)	0/2 (0%)	0/2 (0%)
Malignant mesothelioma	0/2 (0%)	2/2 (100%)	2/2 (100%)

\* Undifferentiated carcinoma, endodermal sinus tumor



**Fig. 1.** Metastatic adenocarcinoma from the lung in the pleural diffusion.

(A) Hematoxylin-eosin-stained section of cytologic cell block. ( $\times 200$ )

(B) The strong cytoplasmic staining in the malignant cells. (PAP stain for carcinoembryonic antigen,  $\times 200$ )

### 3. 늑막 삼출액의 면역세포화학적 소견

총 26예의 암종은 Lysozyme에 대한 과산화효소염색에 모두 음성반응을 보여 조직구와 감별진단하였고, Keratin, EMA 및 CEA에대한 과산화효소염색(PAP 염색)을 시행한 결과 19예(73%)에서 이들 세포표지에 양성반응을 보였으며(Table 3), 특히 폐장에서 전이된 암종은 CEA에 90%의 가장 높은 양성율을 보였다(Fig

1). 비교 대조된 악성 중피종은 재박절된 조직절편에서 keratin과 EMA에 양성인 반면 CEA에 모두 음성이었고(Fig 2) 반응성 증식중피는 keratin에만 양성반응을 보였을 뿐 CEA와 EMA에 모두 음성이었다(Table 3). 전이성 암종과 중피종 간 keratin에 대한 염색상의 유일한 차이점은 없었다(Fig 3).

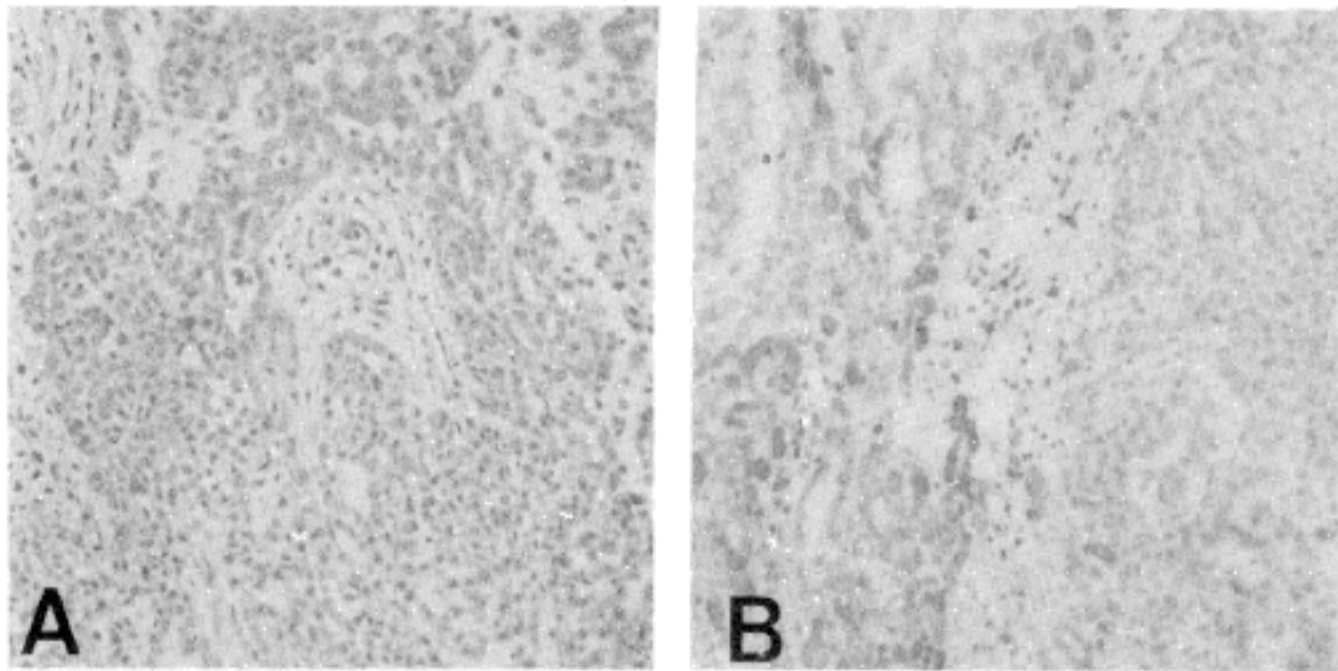


Fig. 2. Malignant epithelial mesothelioma of the pleura showing papillary growth pattern.  
(A) Hematoxylin-eosin preparation ( $\times 100$ )  
(B) Positive PAP staining with epithelial membrane antigen ( $\times 100$ )

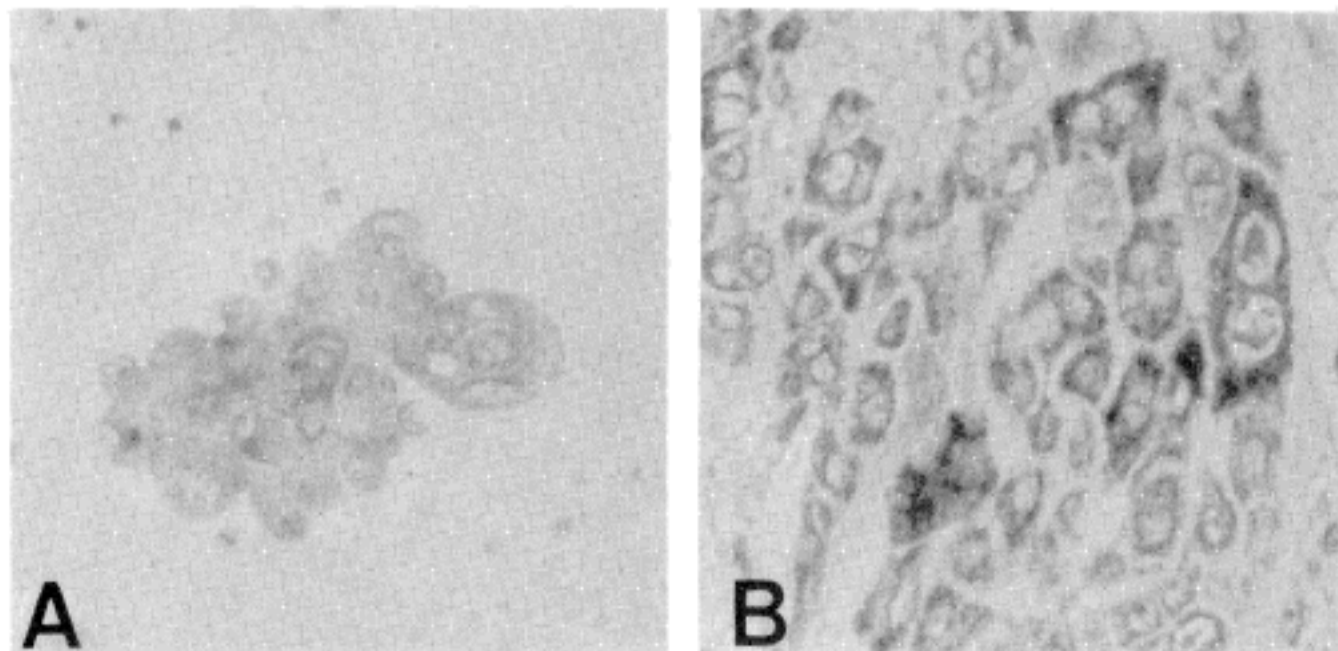


Fig. 3. PAP sections stained with keratin of low molecular weight.  
(A) Metastatic squamous cell carcinoma from the lung in the pleural effusion. ( $\times 400$ )  
(B) Malignant epithelial mesothelioma of the pleura. Notice diffuse cytoplasmic staining pattern. ( $\times 400$ )

## 고 찰

늑막 및 복막을 피복하고 있는 장막에서 기원하는 중피종은 그 병리조직 진단이 매우 어려운 경우가 많아 병리 의사간에도 가장 견해 차가 많은 종양에 속하며<sup>11)</sup> 때로는 사후 부검에서야 진단이 확정되는 예도 종종 있다<sup>2)</sup>. 현재로서는 늑막 삼출을 동반한 늑막 질환환자에서 늑막 삼출액의 세포학적 검사와 비록 작은 조직편 이긴 하나 조직생검이 늑막질환의 감별 진단에 긴요하게 이용되고 있다. 특히 임상적으로 종양성 늑막 질환이 의심될때 이의 감별진단은 대단히 중요하게 되는데 조직생검에 의한 종양성 늑막질환의 병리진단시 반응성 중피종식과 악성 중피종과의 구분과 일단 종양성 증식으로 판단될 경우에도 전이성 늑막 종양과의 감별이 문제된다<sup>13)</sup>.

늑막 생검조직을 이용한 악성 중피종의 진단기준에 관한 자세한 연구<sup>12)</sup>와 세포학적 특성에 의한 감별진단에 대한 연구<sup>11,13)</sup>등이 있었으나 절대적 진단기준은 마련하지 못하고 있다. 그리하여 현재 악성 중피종의 진단은 특징적인 육안소견 및 합당한 현미경적 소견을 토대로 전이 암종을 배제한 후 가능하게 된다<sup>14,15)</sup>. 또한 악성 중피종을 가진 환자의 약 40%에서 늑막 삼출의 증상을 보이지 않으며, 늑막 삼출을 보인다고 해도 약 38%에서 세포학적으로 음성반응을 나타낸다고하여<sup>16)</sup> 세포학적 검사로서 악성 중피종과 전이성 암종을 구별하는 것은 더욱 힘들것으로 사료된다. 본 연구의 악성 중피종 2예도 늑막 삼출을 보였으나 악성 세포들이 출현하지 않아 세포학적으로 음성이었으므로 조직절편을 이용하였다. 악성 중피종의 조직학적 관찰에서 종양세포내 점액물질의 성상에 관한 조직화학적 연구는 오늘까지도 중요한 진단기준으로 여겨지고 있는데<sup>17)</sup> 본 연구에서도 2예의 악성 중피종은 d-PAS 염색에는 음성이었고 alcian blue 염색에 양성반응을 보여 과거 Wagner 등<sup>18)</sup>의 전형적인 연구결과와 일치하였으나 종래의 hyaluronic acid와 중성 점액염색법에 대한 의문 제기와 근래 일차성 폐선암종의 약 50%에서 소량의 hyaluronic acid가 있는 것이 확인되어<sup>19)</sup> 종래의 조직화학적 방법은 일정한 한계가 있음이 밝혀졌다.

최근 monoclonal 항체를 이용한 면역조직화학 기법이 매우 발전하여 악성 중피종과 전이성 암종의 감별진

단에 널리 이용되고 있는데 크게 두종류의 항원을 근간으로 삼는 바 intermediate filaments과 수종의 고분자량 glycoprotein이 그것이다. 중피세포는 정상에서 intermediate filaments로 구성된 복잡한 세포골격(cytoskeleton)을 지니고 있고 그 중에서도 keratin family가 가장 많아 효용성이 높는데 정상 및 반응성 증식을 하는 중피세포 모두 keratin을 표현하고 종양은 흔히 그 기원이 되는 모조직(parental tissue)과 동일한 intermediate filament pattern을 가지고 있으므로<sup>20)</sup> 거의 모든 중피종이 면역조직화학 염색상 keratin에 양성을 보인다. 본 연구에서도 2예의 악성 중피종과 대조염색된 반응성 증식을 보인 중피 모두 keratin에 양성을 보였으나 전이성 암종에서도 73%의 높은 양성율을 나타내어 중피종과의 감별진단에 어려움이 있음이 시사되었다. Blobel 등<sup>21)</sup>의 주장에 따르면 중피종과 전이성 암종간에 다른 keratin 표현이 있다고 하였으나 본 연구에서도 광범역(broad-spectrum)항 keratin 항체를 사용하였기 때문에 이들의 감별이 어려운 원인의 일부가 될 수 있을 것으로 생각된다.

현재까지 알려진 바로는 중피종에서는 저분자량 keratin 외에도 선암종과는 달리 고분자량 kertain이 표현되는데 이를 epidermal keratin 이라고도 부르고 있다. keratin filament가 중피종 세포의 미세구조에서 주로 핵주변에 놓여 있어 면역조직화학 염색에서도 선암종과는 달리 핵주변에 특히 강한 염색상을 보인다고 하나, 조직절편을 이용한 본 연구의 악성중피종 예에서는 뚜렷한 차이를 발견할 수 없었는데 위의 염색상 차이는 조직절편에서는 현저하지 않다고 한다. 고분자량 glycoprotein을 항원으로 삼은 EMA와 CEA는 본 연구에서 주의 할만한 염색상 차이를 보였는데 EMA의 경우 악성 중피종에서 양성을 보인 반면 반응성 증식중피에는 음성을 보여 일견 종양성 중피종식과 반응성 중피종식의 감별진단에 유용할 것으로 생각되나 종례가 소수인 점과 염색기법의 차이등으로 추시가 필요할 것으로 사료된다. CEA의 경우에서는 중피종 및 반응성중피 모두에서 음성반응을 보이고 전이성 암종에서는 전체적으로 볼 때 EMA의 경우와 마찬가지로 73%의 양성율을 보였으나 EMA에 양성을 보인것이 유방암종 및 일부의 전이 난소암종을 제외한 전이 폐암종에서는 EMA보다 뚜렷이 높은 양성율을 보여 악성 중피종과 전이암종의 감별 진단에서는 CEA가 EMA보다 그 효용도가 더 높은 것

으로 사료되며 Tron 등<sup>6)</sup>도 비슷한 결과를 주장한 바 있다.

그러나 면역조직화학적 염색으로 중피종과 전이암종의 구분이 분명해진다는 연구<sup>22)</sup>와 그 반대의 결과를 주장하는 연구<sup>23,24)</sup>도 있다. 이러한 서로 상치되는 면역조직화학 염색연구의 결과는 염색기법의 차이 및 표준화된 면역조직화학 염색법의 부재, 그리고 아직까지 악성 중피종의 절대적인 병리조직 진단기준이 없어 중례 선택에 문제가 있는 것이 그 원인으로 논의되고 있다. 반응중식 중피와 중피종의 구분에서는 일반적인 형태학적 소견 외에 중피종에서는 침윤성 증식이 있고 또 그 방추상 세포들이 면역조직화학염색에서 keratin 양성을 보일때 큰 도움을 받을 수 있다고 알려져 있으며 세포 하나하나의 형태계측학적 관찰도 매우 유용하다는 연구<sup>25)</sup>도 있다.

이상과 같이 현재로서는 늑막에서 발생한 질환, 특히 중양성 질환의 감별진단에서 절대적 진단기준이 마련되어 있지 않아 아직도 어려움이 많으므로 최근 현저한 발전을 이룩한 monoclonal antibody 생성기법을 이용하여 중피에 특이한 표지(mesothelium-specific marker)의 개발이 절실히 요구된다.

### 결 론

인체의 늑막은 병적 상태에서 거의 예외없이 삼출액이 생기며, 그것이 원발성인지, 속발성인지 감별하여야 할 경우가 많고, 특히 중양성 질환일 경우는 더욱 절실히 요구된다. 근래 면역조직화학적 방법의 현저한 발달로 늑막 삼출액내의 세포를 감별진단하는데 유용한 여러가지 세포 표지자가 알려져 있어, 저자들은 1984년 7월부터 1986년 7월까지 만 3년간 연세대학교 의과대학 병리학교실에 의뢰된 늑막 삼출액 중 조직생검에서 암종으로 확진되었던 26예와 악성 중피종 2예의 조직표본으로 대해 CEA, EMA, keratin에 대한 면역 세포화학적 염색을 시행하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1) 악성 늑막 삼출액의 원발부위에 따른 분포는 총 26예 중 폐장이 20예로 가장 많았고, 난소, 유방, 위장이 각각 3예, 2예, 1예의 순이었다.

2) 조직화학적 소견을 보면 악성 늑막 삼출액을 선암으로 진단된 19예에서는 21%에서 d-PAS 염색에, 37%에서 alcian-blue 염색에 양성반응을 보인 반면, 악성 중피종 2예는 모두 d-PAS 염색에 음성, alcian-blue 염색

에 양성이었다.

3) 면역 세포화학적 소견을 보면 총 26예의 악성 늑막 삼출액 중 19예(73%)에서 keratin, EMA, CEA에 모두 양성반응을 보인 반면, 악성 중피종은 모두 keratin과 EMA에 양성이고 CEA 에는 음성반응을 보여, 악성 중피종과 전이암종의 감별진단에서는 CEA의 효용도가 제일 높은 것으로 사료된다.

### 참 고 문 헌

- 1) Naib IM: *Exfoliative cytopathology*. 3rd ed Little brown Boston 1985, 349-380
- 2) Dunnill MS: *Pulmonary Pathology*. 2nd ed. Churchill Livingstone London, 1988, 599-602
- 3) Kawai T, Yakumaru K, Mikata A, Kageyama K, Torikata C, Shimosato Y: *Solitary (localized) pleural mesothelioma. A light and electron-microscopic study*. *Am J Surg Pathol* 2:365-375, 1978
- 4) Klima M, Gyorkey F: *Benign pleural lesions and malignant mesothelioma*. *Virch Arch (A)* 376:181-173, 1977
- 5) Spriggs AI, Grunze H: *An unusual cytologic presentation of mesothelioma in serous effusions*. *Acta Cytol* 27:288-292, 1983
- 6) Tron V, Wright JL, Churg A: *Carcinoembryonic antigen and milk-fat globule protein staining of malignant mesothelioma and adenocarcinoma of the lung*. *Arch Pathol Lab Med* 111:291-293, 1987
- 7) Kannerstein M, Churg J: *Peritoneal mesothelioma*. *Hum Pathol* 8:83-94, 1977
- 8) Wang MS: *Electron microscopy in the diagnosis of pleural mesotheliomas*. *Cancer* 31:1046-1054, 1973
- 9) Ghsh AK, Mason DY, Spriggs AI: *Immunocytochemical staining with monoclonal antibodies in cytologically 'negative' serous effusion from patients with malignant disease*. *J Clin Pathol* 36:1150-1153, 1983
- 10) Epentos AA, Canti G, Taylor-Papadimitriou J, Curling M, Bodner WF: *Use of two epithelium-specific monoclonal antibodies for diagnosis of malignancy in pleural effusions*. *Lancet* 2:1004-1006, 1982
- 11) Whitaker D, Shilkin KB: *Diagnosis of pleural malignant mesothelioma in life; A practical approach*. *J Pathol* 143:147-175, 1984
- 12) Herbert A, Gallagher PJ: *Pleural biopsy in the*

- diagnosis of malignant mesothelioma. Thorax* 37: 816-821, 1982
- 13) Roberts GH, Campbell GM: *Exfoliative cytology of diffuse mesothelioma. J Clin Pathol* 25:577-582, 1972
- 14) Roggli VL, Kolbeck J, Sonfilippo F, Shelburne JD: *Pathology of human mesothelioma: Etiologic and diagnostic considerations. Pathol Ann* 22(II):91-131, 1987
- 15) Coleman M, Henderson DW, Mukherjee TM: *The ultrastructural pathology of malignant pleural mesothelioma. Pathol Ann* 24(I):303-353, 1989
- 16) Tao LC: *Lung, Pleura and Mediastinum: Guides to clinical Aspiration Biopsy. Igaku-Shoin, New York, 1988, 182*
- 17) Cotran RS, Kumar V, Robbins SL: *Pathologic Basis of Disease. 4th ed. W.B.Saunders Company, Philadelphia, 1989, 807-808*
- 18) Wagner JC, Murday DE, Harington JS: *Histochemical demonstration of hyaluronic acid in pleural mesotheliomas. J Pathol Bacteriol* 84:73-78, 1962
- 19) Chin B, Churg A, Tengblod A, Pearce R, McCaughy WTE: *Analysis of hyaluronic acid in the diagnosis of malignant mesothelioma. Cancer* 54:2195-2199, 1984
- 20) Grown AM, Vogel AM: *Monoclonal antibodies to human intermediate filament protein. II. Distribution of filament proteins in normal human tissues. Am J Pathol* 114:309-321, 1984
- 21) Blobel GA, Moll R, Franke WW, Kayser KW, Gould VE: *The intermediate filament cytoskeleton of malignant mesotheliomas and its diagnostic significance. Am J Pathol* 121:235-247, 1985
- 22) Battifora H, Kopinski MI: *Distinction of mesothelioma from adenocarcinoma: an immunohistochemical approach. Cancer* 55:1679-1685, 1985
- 23) Marshall RJ, Herbert A, Braye SG, Jones DB: *Use of antibodies to carcinoembryonic antigen and human milk fat globule to distinguish carcinoma, mesothelioma and reactive mesothelium. J Clin Pathol* 37:1215-1221, 1984
- 24) Bolen JW, Hammar SP, McNutt MA: *Reactive and neoplastic serosal tissue: a light-microscopic, ultrastructural and immunocytochemical study. Am J Surg Pathol* 10:34-47, 1986
- 25) Kwee WS, Veldhuizen RW, Golding RP, et al: *Histologic distinction between malignant mesothelioma, benign pleural lesion and carcinoma metastasis. Evaluation of the application of morphometry combined with histochemistry and immunostaining. Virchows Arch (A)* 397:287-299, 1982

— Abstract —

### A Pathological Review of Pleural Effusion by Immunocytochemical Methods

Dong-Hwan Shin, M.D., Hee Jeong Ahn, M.D.  
Woo Ick Yang, M.D. and In Joon Choi, M.D.

Department of Pathology, Yonsei University  
College of Medicine

An unequivocal diagnosis of mesothelioma during life, on the basis of limited biopsy tissue or cytological specimens, is frequently difficult and requires distinction from inflammatory mesothelial hyperplasia on the one hand and secondary neoplasms, especially adenocarcinoma on the other. Although some studies have produced conflicting results, it is generally believed that immunohistochemical methods can aid in this distinction.

To obtain comparable and reproducible results, 23 metastatic carcinoma of the pleura and 2 unequivocal malignant epithelial mesotheliomas were studied by the peroxidase-antiperoxidase method on paraffin-embedded cell blocks, and commercially available antibodies to carcinoembryonic antigen (CEA), keratin and epithelial membrane antigen (EMA) were used. Nineteen metastatic adenocarcinoma (73%) and two mesotheliomas (100%) reacted with keratin and EMA antibodies. Nineteen metastatic adenocarcinomas (73%) reacted with EMA antibodies. Nineteen metastatic adenocarcinomas (73%) reacted with CEA antibody; no mesotheliomas stained for CEA. Two cases of reactive mesothelial hyperplasia showed positive for keratin, but negative reaction for EMA and CEA.

None of the antibodies used in this study was specific for mesothelioma, but CEA was found to be the most useful marker for differentiating between mesothelioma and metastatic carcinoma.

**Key Words:** Immunocytochemistry, Pleural effusion