대한병리학회지 1996; 30: 920~927

골육종의 상피세포항원 발현에 대한 면역조직화학적 연구

연세대학교 원주의과대학 병리학교실

배 종 엽 · 조 미 연 · 정 순 희

Immunohistochemical Study of Cytokeratin and Epithelial Membrane Antigen Expression in Osteosarcoma

Jong Yup Bae, M.D., **Mee-Yon Cho,** M.D. and **Soon-Hee Jung,** M.D.

Department of Pathology, Yonsei University Wonju College of Medicine

Immunohistochemical analysis of 24 paraffin-embedded osteosarcomas was studied to evaluate the expression of simple cytokeratin, basal cytokeratin and epithelial membrane antigen(EMA) according to the histologic subtypes and anatomical locations. Mean age of the patients was 18 years. Anatomical locations of the tumors were femur(8), tibia(10), humerus(4), lumbar spine(1), and zygomatic arch(1). Histologic subtypes included osteoblastic(14), fibroblastic(4), chondroblastic(4), epithelioid(1), and mixed osteoblastic and fibroblastic(1). All were positive in the immunohistochemical stain for vimentin. The expression of cytokeratin and/or EMA was found in 10 cases(41.7%) regardless of anatomical locations and histologic subtypes. Positive immunoreaction for EMA was demonstrated in osteoblastic(5), chondroblastic(2), epithelioid(1), and mixed osteoblastic and fibroblastic(1) types. Osteoblastic (2), chondroblastic(2), and epithelioid(1) types among them also showed immunoreactivity with anti-simple cytokeratin monoclonal antibody, NCL-5D3. The expression of basal cytokeratin (NCL-LL002) was found in two osteoblastic, one chondroblastic, one epithelioid, and one mixed osteoblastic and fibroblastic types. These findings indicate that cytokeratin and EMA immunoreactivity can not be regarded as an absolute specific marker of the epithelial origin of tumor and may also occur in osteosarcoma. **(Korean J Pathol 1996; 30: 920~927)**

Key Words: Osteosarcoma, Immunohistochemistry, Cytokeratin, EMA

서 론

암종과 육종은 대부분 통상적인 조직학적검사에서 세포의 모양과 배열 등으로 감별이 가능하지만, 일부의 분화가 나쁜 종양은 암종과 육종의 감별 및 종양의 분류가 어려울 수 있는데 이때에는 종양세포의 기원을 알아보기 위하여 면역조직화학염색이나 전자현미경검사를 하여 도움을 받는다. 이 중 면역조직화학염색은 상피세포 표지자로 세포질내에 존재하는 중간세사(intermediate filament) 중 하나인 cytokeratin[1]과 상피세포 형질막의 구성요소인 Epithelial mem-

접 수 : 1996년 3월 12일, 게재승인 : 1996년 5월 6일
주 소 : 강원도 원주시 일산동 162 우편번호 220-701
연세대학교 원주의과대학 병리학교실, 정순희

brane antigen(EMA)[2]을 일차항체로 이용하고 있다. Cytokeratin은 일반적으로 상피세포 기원 또는 상피세포의 분화를 보이는 종양에 대한 표지자로 널리 이용되고 있으나 활막육종[3], 횡문근육종[4], 상피양육종[5], 평활근육종[6], 악성 섬유조직구종[7] 등의 육종과 척삭종[8], 성상교세포종[9] 등의 비상피성 종양에서도 발현됨이 보고되었다. 또한 상·하악골은 골의 내부에 상피세포종양이 잘 발생하는 독특한 골격으로써 이 부위에 발생한 골육종은 cytokeratin에 대한 면역조직화학염색에서 위양성 반응을 보인다는 보고가 있고[10], 18예의 골육종을 대상으로 면역조직화학염색을 시행한 연구에서 1예의 골아세포형 골육종에서 EMA와 cytokeratin이 발현되었음을 기술하는[11] 등 골육종에서 EMA와 cytokeratin의 발현에 대한 소수의 보고가 있었다. 이에 저자들은 골육종에서 EMA와 cytokeratin의 발현 빈도를 아형 및 발생부위별로 알아보고 그 결과가 비전형적인 임상특성 군에서 특히 소량 생검조직으로 골육종과 다른 암종과의 감별에 유용한지를 알아보고자 병리 및 방사선학적 소견상 전형적인 골육종으로 진단된 예를 대상으로 면역조직화학염색을 시행하였다.

재료 및 연구방법

1984년부터 1995년까지 연세대학교 원주의과대학 원주기독병원에서 임상 및 방사선학적 소견상 골육종을 의심하여 외과적으로 절제하고 병리학적 소견상 골육종으로 확진된 24예를 대상으로 하였다.

1. 임상검사

임상기록지와 방사선검사 결과를 검토하여 환자의 나이, 발생부위 및 수술전 진단 등을 확인하였다.

2. 조직학적검사

모두 10% 포르말린에 24시간 고정하고 10% 포름산으로 탈회한 후 파라핀에 포매한 조직을 이용하였다. 통상의 hematoxylin-eosin염색 후 골육종을 조직학적 소견에 따라 골아세포형, 섬유아세포형, 연골아세포형, 혈관확장형, 상피양형, 혼합형 등의 아형으로 분류하였다.

3. 면역조직화학염색

조직학적 검사시 괴사가 적고 종양을 대표할 수 있는 절편을 골라 면역조직화학염색에 사용하였다. 일차항체로 vimentin(monoclonal, V9, [1:50], DAKO), EMA(monoclonal, E29, [1:50], DAKO)와 cytokeratin을 사용하였는데 cytokeratin은 simple type(CK 8/18, monoclonal, NCL-5D3, [1:40], Novocastra)과 basal type(CK14, monoclonal, NCL-LL002, [1:20], Novocastra)으로 나누어서 사용하였다. 면역조직화학염색은 vimentin, EMA, basal cytokeratin은 DAKO사의 labelled streptavidin-biotin(LSAB) kit를 이용하여 통상적인 avidin-biotin complex 방법으로 염색하였고, simple cytokeratin은 Tris buffer에 0.1 gm의 trypsin과 0.1 gm의 calcium chloride를 혼합한 용액에서 37°C로 2분간 전처치 한 후 염색하였으며, 염색 후에는 amino-ethylcarbamazole (AEC, DAKO, Ca. USA)로 발색하였다.

4. 결과의 판독

종양세포의 세포질이나 세포막에 뚜렷하게 염색된 경우와 다수의 종양세포와 사이의 일부 기질이 양성반응을 보인 것을 양성으로 판정하였고, 기질에만 국소적으로 약양성반응을 보인 예는 음성이라고 판독하였다. 양성반응의 정도는 국소적과 미만성으로 분류하였다.

결 과

1. 임상소견

환자의 연령분포는 8세에서 48세로 10대에 가장 호발하였고, 평균연령은 18세였다. 남녀비는 남자가 13예, 여자가 11예로 비슷하였다. 종양의 위치는 경골이 10예로 가장 많았고, 대퇴골이 8예, 상완골은 4예, 척추와 협골궁이 각각 1예였다.

2. 광학현미경적 소견

총 24예의 골육종은 골아세포형 14예, 섬유아세포형 4예, 연골아세포형 4예였고, 골아세포와 섬유아세포의 혼합형이 1예였으며, 협골궁에 발생한 1예는 상피양아형으로 전이성 암종과의 감별이 어려웠다.

3. 면역조직화학염색 소견

총 24예는 모두 vimentin에 강양성 반응을 보였고, 이 중 10예(41.7%)에서 EMA, simple cytokeratin, 또는 basal cytokeratin 중 1개 이상의 상피세포항원에 대해 양성반응이 관찰되었는데, 양성반응은 모두 국소적이었으나 종양세포의 세포질 또는 세포막에 강양성이었다. 발생부위별 양성인 예의 빈도는 경골이 10예 중 4예(40%), 대퇴골이 7예 중 2예(28.6%), 상완골이 4예 중 2예 (50%)이었으며 척추와 협골궁은 각각 1예 모두에서 상피세포항원의 발현이 있었다 (Table 1). 아형별로 구별하여 보면 골아세포형이 6

Table 1. Expression of various epithelial markers in osteosarcomas according to the anatomic locations

Anatomical sites	Patients no.	EMA	CK(s)*	CK(b)**	Total*** (%)
Proximal tibia	10	4	3	2	4/10 (40.0)
Distal femur	7	2	0	1	2/ 7 (28.6)
Proximal femur	1	0	0	0	0/ 1 (0.0)
Humerus	4	1	0	1	2/ 4 (50.0)
Lumbar spine	1	1	1	0	1/ 1 (100.0)
Zygomatic arch	1	1	1	1	1/ 1 (100.0)
Total	24	10	5	5	10/24(41.7)

* simple epithelium (CK 8/18, NCL-5D3)
** squamous epithelium basal (CK 14, NCL-LL002)
*** Number of cases showing immunoreactivity for one or more epithelial marker(s)

Table 2. Expression of various epithelial markers in osteosarcomas according to the histologic subtypes

Histologic subtypes	Patients no.	EMA	CK(s)	CK(b)	Total* (%)
Osteoblastic	14	5	2	2	6/14 (42.9)
Fibroblastic	4	0	0	0	0/ 4 (0.0)
Chondroblastic	4	2	2	1	2/ 4 (50.0)
Epithelioid	1	1	1	1	1/ 1 (100.0)
Mixed osteoblastic & fibroblastic	1	1	0	1	1/ 1 (100.0)
Total	24	9	5	5	10/24 (41.7)

* Number of cases showing immunoreactivity for one or more epithelial marker(s)

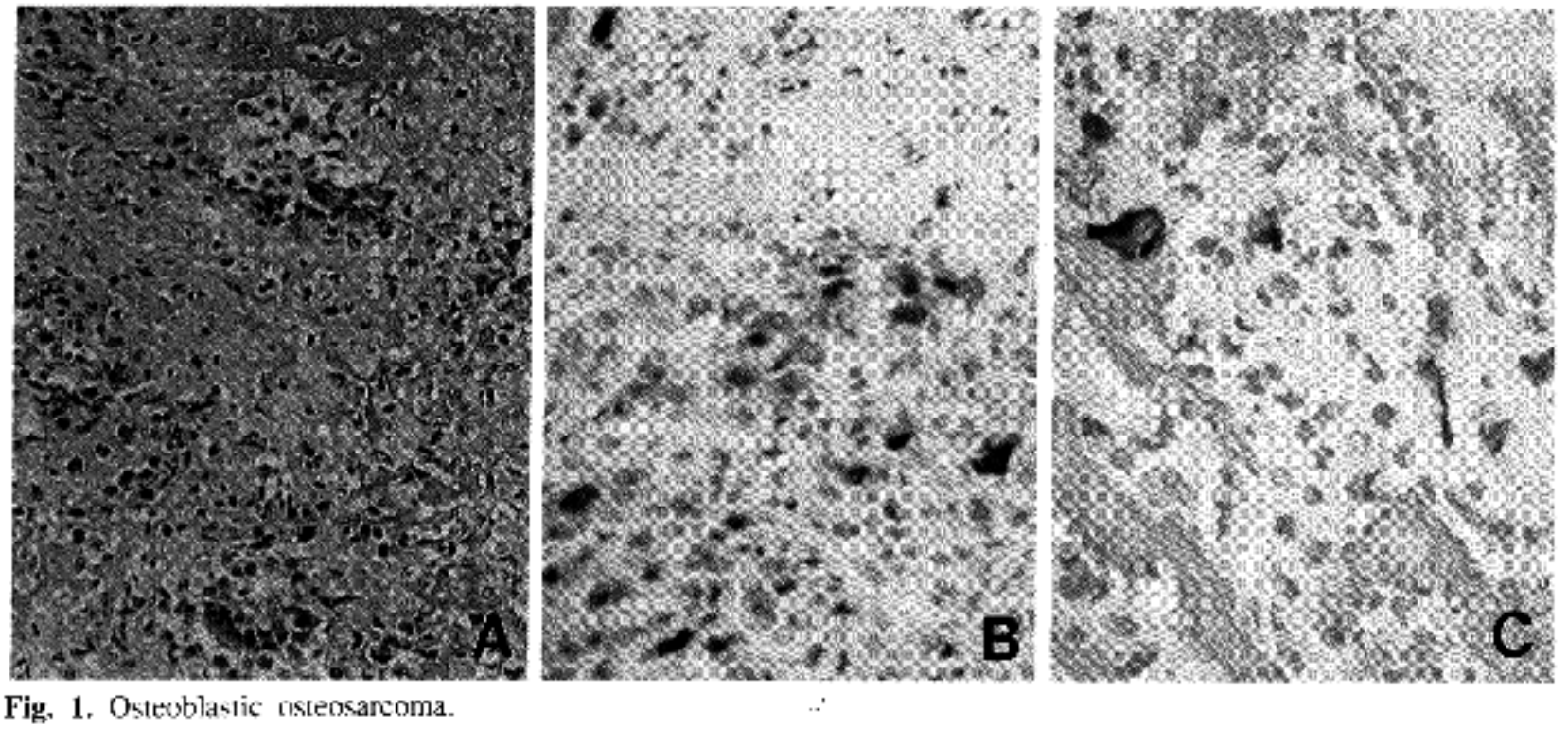

Fig. 1. Osteoblastic osteosarcoma.
Malignant tumor cells are admixed with homogeneous eosinophilic masses of osteoid(A). The immunohistochemical stains for EMA(B) and simple cytokeratin(C) show strong immunoreactivity in the cytoplasm of tumor cells.

예, 연골아세포형이 2예, 상피세포아형이 1예, 골아세포와 섬유아세포의 혼합형이 1예에서 양성반응을 보였다(Table 2).

1) 골아세포형: 골아세포형은 모두 14예로 상피세포항원의 발현은 6예에서 관찰되었는데 2예는 EMA와 simple cytokeratin에 양성반응을 보였고, 3예는 EMA에만 양성이었으며, 1예는 basal cytokeratin에만 양성반응을 보였다. 모든 예에서 양성반응은 국소적이나 강하였다(Fig. 1).

2) 섬유아세포형: 섬유아세포형은 4예있는데 EMA외 cytokeratin에 양성반응을 보인 예는 없었다.

3) 연골아세포형: 연골아세포형은 4예 중 2예가 상피세포항원에 양성반응을 보였는데 이 중 1예는 EMA, simple cytokeratin과 basal cytokeratin에 모두 양성반응을 보였고(Fig. 2), 1예는 EMA와 simple cytokeratin에 양성반응을 보였다.

4) 상피양아형: 상피양아형은 1예였는데 이는 EMA, simple cytokeratin, basal cytokeratin 모두에 양성반응을 보였다(Fig. 3).

5) 골아세포와 섬유아세포의 혼합형: 이 아형은 1예였고 조직학적 소견상 악형성의 상피세포와 유사한 악성 종양세포가 다수 관찰되었는데 이 세포들은

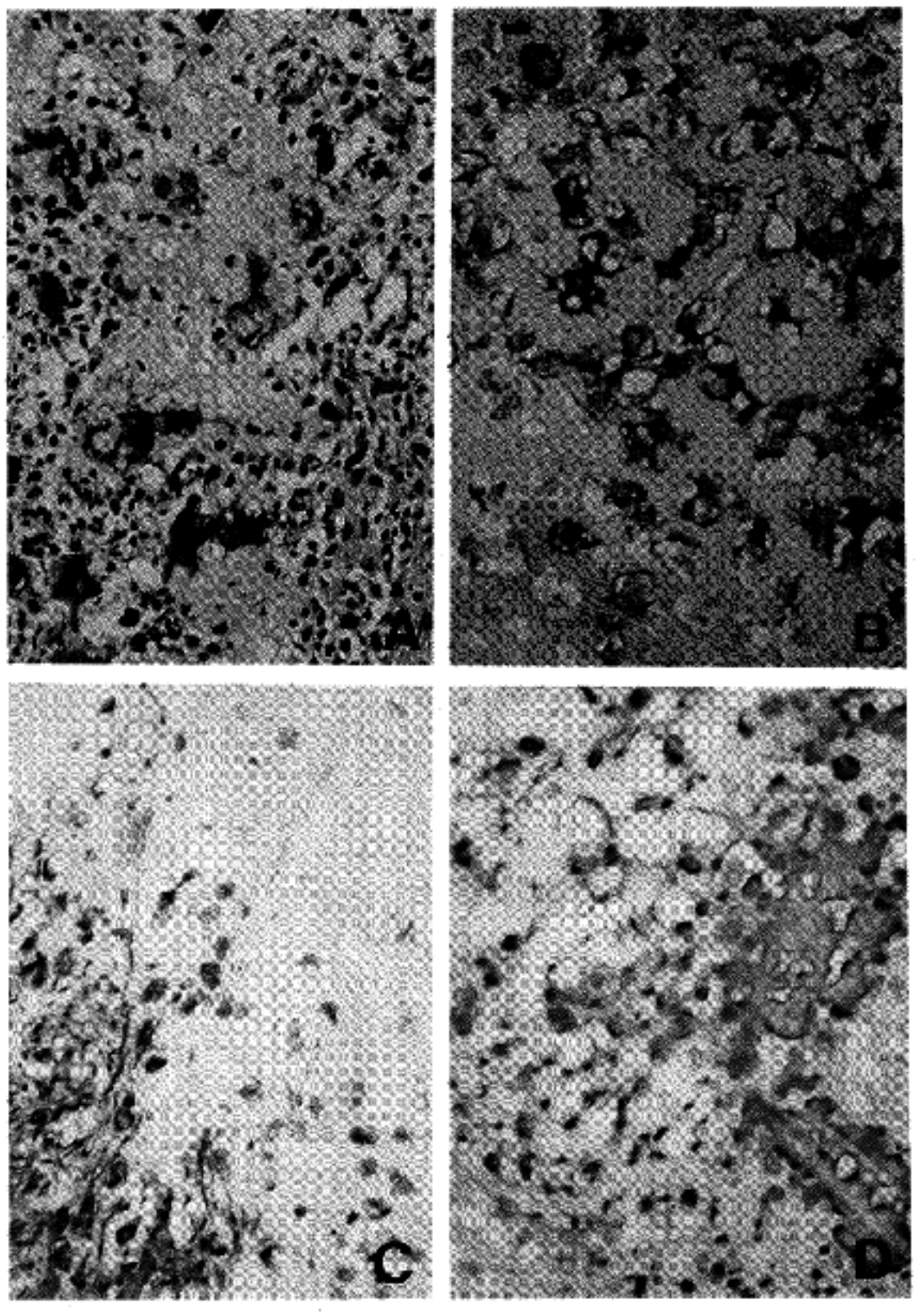

Fig. 2. Chondroblastic osteosarcoma
Histologically, malignant cells are admixed with malignant cartilage (A). The Immunohistochemical stains for EMA(B), simple cytokeratin(C), and basal cytokeratin (D) show focal and strong positivity.

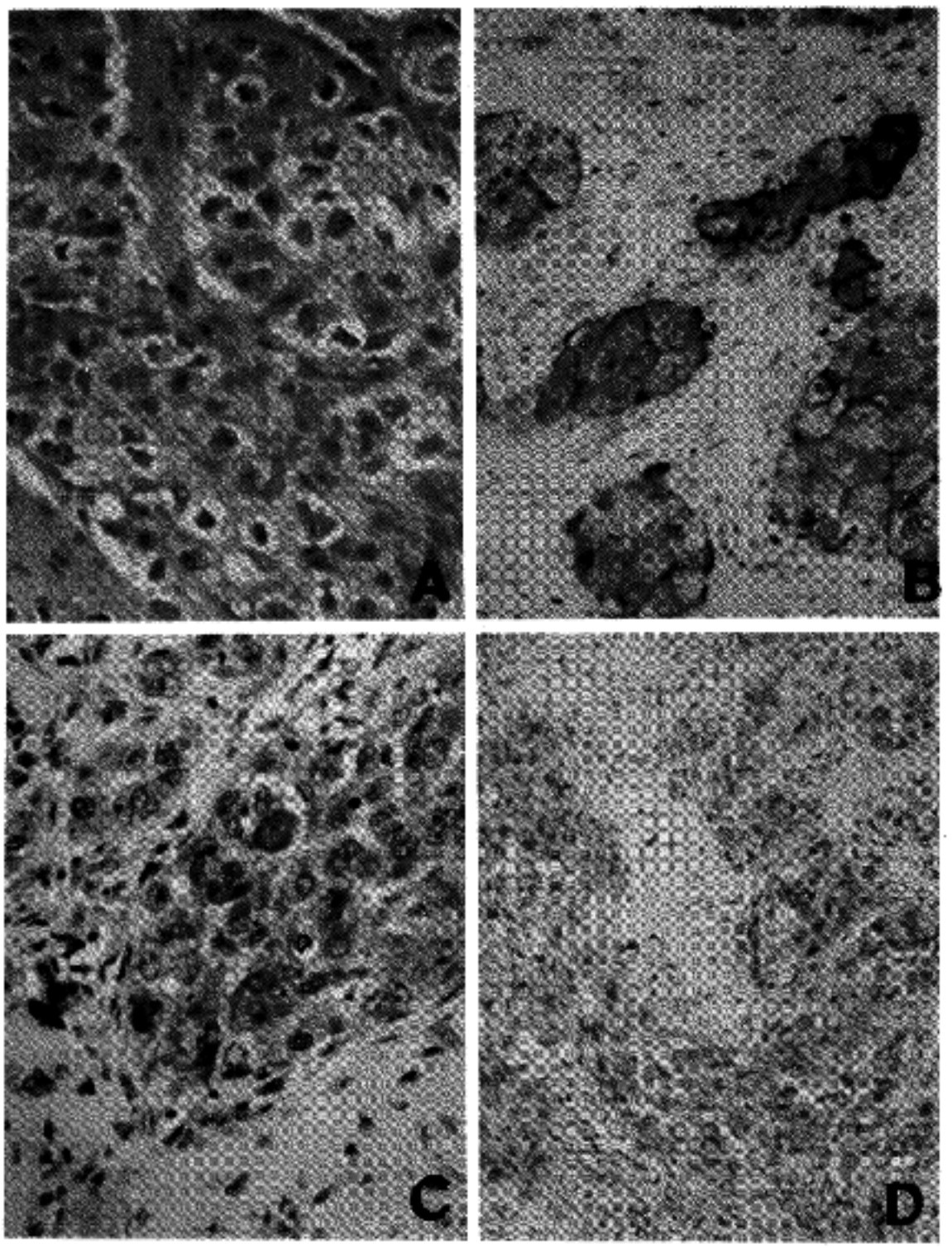

Fig. 3. Epithelioid osteosarcoma
Malignant epithelioid cells are arranged in nesting pattern resembling epithelial tumor(A).
The Immunohistochemical stains for EMA(B), simple cytokeratin (C), and basal cytokeratin(D) show strong and distinct positive reaction of tumor cells.

세포질이 풍부하였고 핵의 다형성이 심하였으며 EMA와 basal cytokeratin에 양성이었다(Fig. 4).

고 찰

골육종의 면역조직화학적 특성에 대한 연구는 드물며, osteocalcin(bone γ-carboxyglutamic acid-containing protein, BGP), osteonectin, 다양한 형의 교원질, alkaline phosphatase를 이용하여 골아세포기원 또는 종양내의 유골 기질을 증명하는 것이 대부분이다[1-3,8]. 골육종에서 상피세포항원의 발현빈도에 관한 연구는 매우 드문데 이 중 Hasegawa 등은 18예의 골육종을 대상으로 면역조직화학적 검사를 시행하여 종양세포가 factor XIIIa, desmin, α smooth muscle actin, 제4형 교원질, EMA와 cytokeratin에 양성반응을 보임을 기술하면서 골육종이 다양한 세포로 구성되어 있음을 추측할 수 있다고 하였다[1]. 또한 하악골에 발생한 골육종을 대상으로 cytokeratin의 발현을 알아보고자 한 연구에서 Regezi등[11]은 연골아세포형과 골아세포형에서 위양성 반응이 있음을 보고하였다. 저자들은 골육종 24예에 상피세포항원에 대한 면역조직화학염색을 시행하여 6예는 EMA와 cytokeratin에 모두, 3예는 EMA에만, 그리고 1예는 basal cytokerain에만 양성반응을 보여 총 10예(41.7%)에서 상피세포항원이

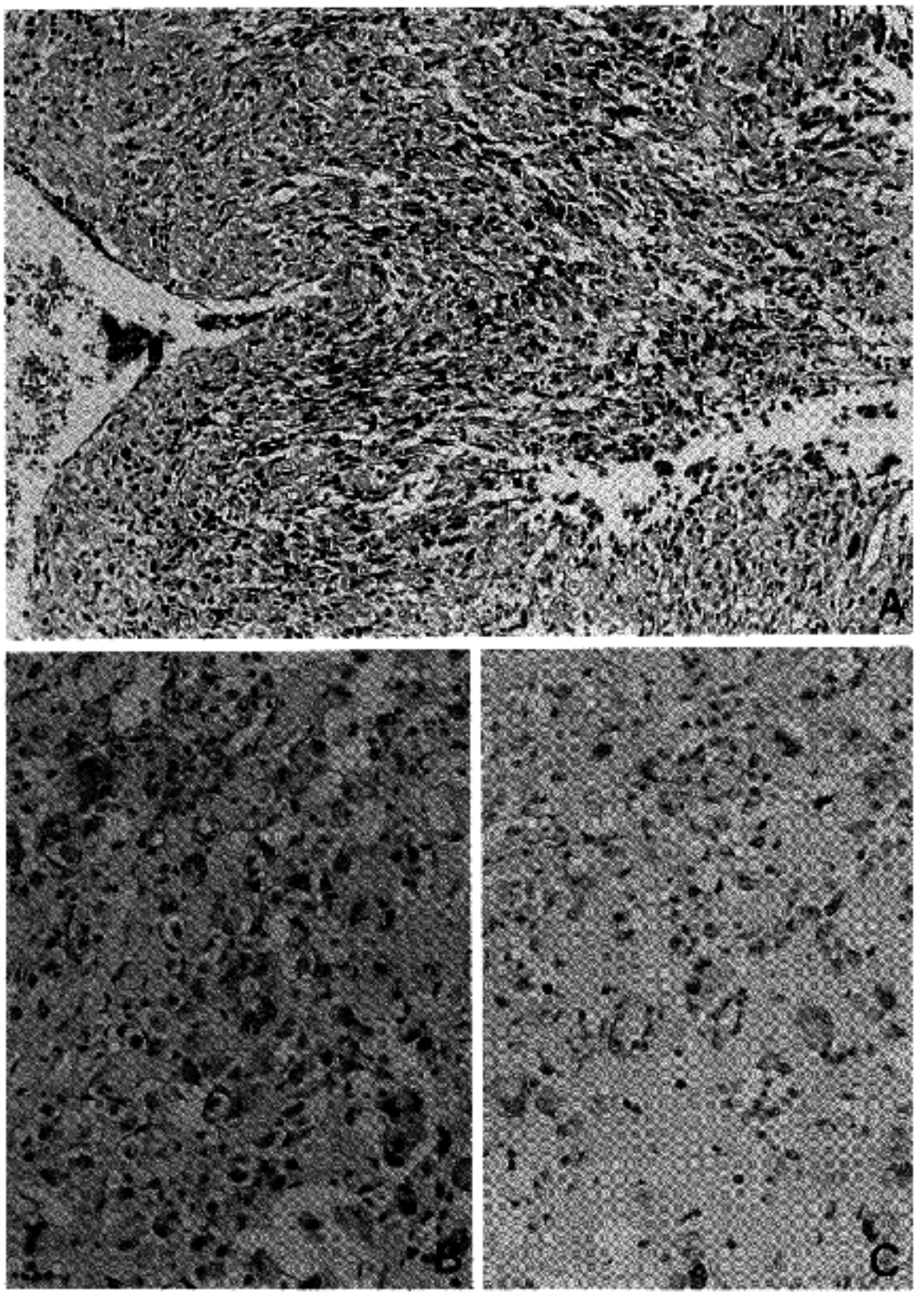

Fig. 4. Mixed osteoblastic and fibroblastic osteosarcoma
Tumor shows mixture of highly anaplastic tumor cells and long spindle cells with sparse osteoid deposit(A). The Immunohistochemical stains for EMA(B) and basal cytokeratin(C) show positive reaction in the cytoplasm of anaplastic tumor cells.

발현됨을 알 수 있었다. 아형별 증례의 수에 차이가 심하여 비교하기는 어려우나 상피양아형을 제외하고는 연골아세포형(50%)에서 상피세포항원의 발현이 가장 빈번하였다. 하악골에 발생한 예는 1예였는데 EMA와 cytokeratin에 모두 양성반응을 보였고, 척추에서 발생한 1예도 EMA와 cytokeratin에 양성이었으며, 장골에 발생한 골육종 22예 중에서도 8예에서 1개 이상의 상피세포항원이 발현되었는데 양성반응은 국소적이지만 뚜렷하였다. 본 연구에서는 cytokeratin을 simple type과 basal type으로 구분하여 염색하였는데, basal type은 세 1형 중간세사단백으로써 편평상피세포기원임을 알기 위하여 사용하며, simple type은 선상피와 비뇨기계의 이행상피 뿐 아니라 편평상피세포암종에서도 양성반응을 보여 광범위한 상피세포항원이라 할 수 있다[19]. 본 연구에서 simple cytokerain과 basal cytokeratin은 각각 5예에서 양성이었다.

골육종은 종양의 내부 또는 주변에 새로 형성된 유골이나 주변의 파괴된 골조직이 있어서 조직표본을 만들기에 앞서 탈회과정을 거치게 된다. 탈회과정은 EDTA, 포름산, 질산과 Plank-Rychlo 용액 등을 이용하며, 본 연구에 이용된 조직들도 모두 포름산

으로 탈회하였는데, 상기한 시약을 이용한 통상적인 탈회과정은 면역조직화학염색의 강도나 양성세포의 수를 감소시키지 않는다는 보고[20]가 있으며 탈회과정에 의해 면역조직화학염색의 결과가 위양성으로 달라지지는 않았으리라고 사료된다.

조직슬라이드 표본 제작에 필수적인 단계인 고정은 포르말린이 가장 널리 사용되는데 이의 정확한 고정기전은 알 수 없으나 검체내의 폴리펩티드에 있는 아미노산간에 메틸렌 결합을 형성함으로써 아미노 그룹을 차단한다고 알려져 있다[21]. 이 기전으로 포르말린은 단백 분자내에서 뿐 아니라 주변의 단백과 화학결합을 일으키고, 포르말린과 결합된 단백은 그 단백에 대한 항체와의 결합에 방해를 받는다. 성글게 부착되어 있던 포름알데히드만이 수세과정에서 떨어지게 되고 아미노산과 결합된 포름알데히드는 수세를 오래해도 제거되지 않으므로 포르말린에 고정된 조직을 이용하여 면역조직화학염색을 시행할 때에 몇 몇 일차항체는 고정에 의해서 항원-항체반응이 방해를 받아 생기는 위음성의 염색반응을 피하기 위하여 효소, 열, 또는 극초단파를 이용하여야 한다[22]. 본 연구에서는 simple cytokeratin만이 효소 전처치가 필요하였는데 시약을 제조한 실험실(Novocastra, UK)에서 추천하는데로 trypsin을 사용하였고, 열 또는 극초단파는 사용하지 않았다[19]. Regezi등[10]은 골육종에서 cytokeratin의 발현은 트립신을 이용한 효소 전처치로 중간세사간에 교차반응이 일어난 결과라고 기술하였으며 Kim등[23]은 트립신 대신 프로테아제로 효소 전처치를 하면 cytokeratin에 대한 양성반응이 나타나지 않는다고 기술하였다. 본 연구에서는 simple cytokeratin 이외에 basal cytokeratin과 EMA에 대한 면역조직화학염색도 시행하였는데 simple cytokeratin과는 달리 basal cytokeratin과 EMA는 모두 효소 전처치를 하지 않고 통상적인 면역조직화학염색 방법으로 염색하였다. Basal cytokeratin은 5예(20.8%), EMA는 9예(37.5%)에서 양성반응이 관찰되었고, EMA에 대한 양성반응은 골아세포형에서 가장 빈번하였다. Hasegawa등[11]의 보고에서는 18예 중 골아세포형 1예만이 cytokeratin과 EMA 모두에 양성반응을 보였다.

과거에는 조직학적으로 상피세포의 모양을 보이는 활막육종과 상피양 육종이 cytokeratin을 발현하는 대표적인 종양으로 생각하였으나, 여러 비상피성 종양과 평활근 및 태아기의 심근, 설근과 척삭에서도 cytokeratin이 발현됨[3-10]으로써 면역조직화학염색 과정 중의 교차반응 보다는 종양의 분화와 연관시키려는 보고가 있다[2]. 그러므로 골육종에서 cytokeratin의 발현이 vimentin과의 교차반응에 의한 것이라고 단정하기에는 불충분하다고 사료되며, 본 연구 및 Hasegawa등의 결과에서 나타난 바와 같이 고정과 파라핀 포매과정에서 변화되지 않고, 효소 전처치도 필요하지 않은[2] EMA의 발현이 있는 것을 종합하면 종양의 분화와 연관된 것일 가능성에 대한 확인이 필요하며 이를 위하여 종양세포의 중간세사를 생화학적으로 분석하고 종양의 면역전자현미경적 소견으로 cytokeratin을 발현하는 구조의 확인이 있어야 한다고 생각한다.

또한 골에 발생한 분화가 나쁜 종양의 감별진단에 면역조직화학염색을 이용할 경우, 골육종은 모두 vimentin에 양성이지만 cytokeratin과 EMA 발현의 의미를 판독하는데는 주의를 필요로 하며, 반드시 다른 여러 가지 일차항체에 대한 염색결과와 종합하여 판단하여야 한다고 사료된다.

결 론

육종과 암종의 감별에 유용하게 사용되고 있는 면역조직화학염색에서 cytokeratin과 EMA 같은 상피세포항원의 발현이 상피양육종이나 활액막육종 등 이미 알려진 몇몇 육종과 함께 골육종에서도 상당수 관찰됨을 알 수 있었다. 그러므로 골에 발생한 분화가 나쁜 종양을 적은양의 생검조직으로 진단해야 할 때 전이성 암종과 골육종의 감별에 면역조직화학염색상 cytokeratin 또는 EMA 발현의 의미를 판독하는데는 주의가 필요함을 알 수 있었다.

참 고 문 헌

1. Lazarides E. Intermediate filaments as mechanical integrators of cellular space. Nature 1980; 283: 249-55.
2. Sloane JP, Ormerod MG. Distribution of epithelial membrane antigen in normal and neoplastic tissues and its value in diagnostic tumor pathology. Cancer 1981; 47: 1786-95.
3. Corson JM, Weiss LM, Banks-Schlegel SP, Pinkus GS. Keratin proteins and carcinoembryonic antigen in synovial sarcomas : an immunohistochemical study of 24 cases. Hum Pathol 1984; 15 : 615-21.
4. Miettinen M, Papola J. Immunohistochemical spectrum of rhabdomyosarcoma and rhabdomyosarcoma-like tumors : expression of cytokeratin and the 68 kD neurofilament protein. Am J Surg Pathol 1989; 13: 120-32.
5. Chase DR, Enzinger FM, Weiss SW, Langloss JM,

Keratin in epithelioid sarcoma: an immunohistochemical study. Am J Surg Pathol 1984; 8: 435-41.
6. Norton AJ, Thomas JA, Issacson PG. Cytokeratin-specific monoclonal antibodies are reactive with tumors of smooth muscle derivation: an immunocytochemical and biochemical study using antibodies to intermediate filament cytoskeletal proteins. Histopathology 1987; 11: 487-99.
7. Weiss SW, Bratthauer GL, Morris PA. Post-irradiation malignant fibrous histiocytoma expressing cytokeratin. Am J Surg Pathol 1988; 12: 554-8.
8. Salisbury JR, Isaacson PG. Demonstration of cytokeratins and an epithelial membrane antigen in chordomas and human fetal notochord. Am J Surg Pathol 1985; 9: 791-7.
9. Cosgrove M, Fitzgibbons PL, Sherrod A, Chandrasoma PT, Martin SE. Intermediate filament expression in astrocytic neoplasms. Am J Surg Pathol 1989; 13: 141-5.
10. Regezi JA, Zarbo RJ, McClatchey KD, Courtney RM, Crissman JD. Osteosarcomas and chondrosarcomas of the jaws: Immunohistochemical correlations. Oral Surg Oral Med Oral Pathol 1987; 64: 302-7.
11. Hasegawa T, Hirose T, Kudo E, Hizawa K, Usui M, Ishi S. Immunophenotypic heterogeneity in osteosarcomas. Hum Pathol 1991; 22: 583-90.
12. Ushigome S, Shimoda T, Fukunaga M, et al. Immunocytochemical aspects of the differential diagnosis of osteosarcoma and malignant fibrous histiocytoma. Surg Pathol 1988; 1: 347-57.
13. Vermeulen AHM, Vermeer C, Bosman FT. Histochemical detection of osteocalcin in normal and pathological human bone. J Histochem Cytochem 1989; 37: 1503-8.
14. Takada J, Ohta T, Koshiba H. Preparation of monoclonal antibodies against human bone γ-carboxyglutamic acid-containing protein (BGP) and its immunohistochemical application to various human tissues. Nippon Seikeigeka Gakkai Zasshi 1990; 64: 453-60.
15. Schultz A, Jundt G, Gerghauser K-H, et al. Immunohistochemical study of osteonectin in various types of osteosarcoma. AM J Pathol 1988; 132: 233-8.
16. Jundt G, Schultz A, Berghauser K-H, Kisher LW, Gehron-Robey P, Termine JD. Immunocytochemical identificantion of osteogenic bone tumors by osteonectin antibodies. Virchows Arch [A] 1989; 414: 345-53.
17. Ueda Y, Nakanishi I. Immunohistochemical and biochemical studies on the collagenous proteins of human osteosarcomas. Virchows Arch [B] 1989; 58: 79-88.
18. Yoshida H, Adachi H, Hamada T, et al. Osteosarcoma: Ultrastructural and immunohistochemical studies on alkaline phosphatase-positive tumor cells constituting a variety of histologic types. Acta Pathol Jpn 1988; 38: 325-38.
19. Angus B, Purvis J, Stock D, et al. NCL-5D3: A new monoclonal antibody recognizing low molecular weight cytokeratins effective for immunohistochemistry using fixed paraffin-embedded tissue. J Pathol 1987; 153: 377-84.
20. Mukai K, Yoshimura S, Anzai M. Effects of decalcification on immunoperoxidase staining. Am J Surg Pathol 1986; 10: 413-9.
21. Puchtler H, Meloan SN. On the chemistry of formaldehyde fixation and its effects on immunohistochemical reactions. Histochemistry 1985; 82(3): 201-4.
22. Cattoretti G, Pileri S, Parravicini C, et al. Antigen unmasking on formalin-fixed, paraffin-embedded tissue sections. J Pathol 1993; 171: 83-98.
23. Kim J, Ellis GL, Mounsdon TA. Usefulness of anti-keratin immunoreactivity in osteosarcomas of the jaw. Oral Surg Oral Pathol 1991; 72: 213-7.