대한외과학회지 : 제 60 권 제 2 호
Vol. 60, No. 2, February, 2001

□ 원 저 □

유방암 감시림프절에서 미세전이에 관한 연구

서울대학교 의과대학 외과학교실, [1]병리학교실

김성원 · 박성신[1] · 안수정 · 강희준 · 윤여규 · 오승근 · 최국진 · 노동영

Detection of Breast Cancer Micrometastases in Sentinel Lymph Nodes

Sung-Won Kim, M.D., **Sung-Shin Park,** M.D.[1], **Soo-Jung Ahn,** M.S., **Hee Joon Kang,** M.D., **Yeo-Kyu Youn,** M.D., **Seung Keun Oh,** M.D., **Kuk Jin Choe,** M.D. and **Dong-Young Noh,** M.D.

Purpose: Axillary lymph node status is a powerful prognostic factor in breast carcinomas. However, patients without axillary lymph node metastases are not completely devoid of risk for relapse. Also, the axillary lymph node micrometastases significantly contribute to the selection of high-risk patients. Recently, sentinel lymph node (SLN) biopsy has been proposed as a potential alternative to full axillary lymph node dissection for staging breast carcinomas. To validate this hypothesis, we evaluated the distribution of occult metastases in sentinel and nonsentinel lymph nodes.
Methods: Twenty patients who had breast carcinomas and who underwent a SLN biopsy followed by an axillary lymph node dissection during March and July 2000 at Seoul National University Hospital were evaluated. Thirty SLNs devoid of metastasis, as determined by hematoxylin and eosin (H&E) staining, were evaluated for micrometastases by pan-cytokeratin immunohistochemistry (IHC) and reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) using Keratin 19 mRNA and MUC1 mRNA. Nonsentinel lymph nodes (NSLN) were also evaluated by pan-cytokeratin IHC.
Results: One out of the 30 SLNs (3.3%) had occult metastases which were identified by IHC and 4 out of the 30 SLNs (13.3%) had occult metastases which were identified by RT-PCR. NSLNs devoid of metastases by H&E staining proved to be free of micrometastases by IHC.
Conclusion: IHC and RT-PCR are more sensitive methods for detecting micrometastases than conventional H&E staining alone. If an SLN is tumor free by IHC or RT-PCR, we can assume that the remaining lymph nodes in the axilla are also tumor free, consequently, an SLN biopsy can be a substitute for axillary lymph node dissection. **(J Korean Surg Soc 2001;60:154-160)**

Key Words: Sentinel lymph node, Micrometastases, Breast carcinoma
중심 단어: 감시림프절, 미세전이, 유방암

Departments of Surgery and [1]Pathology, Seoul National University College of Medicine, Seoul, Korea

서 론

유방암 환자에서 액와림프절 전이는 예후를 결정하는 가장 중요한 인자로, 수술 후 보조적 화학요법 시행여부를 결정하는 가장 중요한 지침이 되고 있다.(*1,2*) 그러나, 림프절 전이가 없는 환자 중에도 5년 내에 최고 30%까지 원격전이를 일으킨다는 보고가 있으며,(*3*) 그 중요한 원인으로 실제로 림프절 전이가 있으나 종래의 병리학적 검사로 발견되지 않는 미세전이를 들 수 있다. 절제된 림프절에서 미세전이를 찾기 위한 검사 방법으로 현재 쓰이고 있는 것은 림프절의 연속절편, 면역조직화학 염색, 역전사 연쇄중합효소 반응 등이다. 그러나, 보통 한 환자에게서 15개 이상의 림프절이 절제되는 것을 감안할 때 모든 림프절을 대상으로 위와 같은 번거로운 검사를 한다는 것은 현실적으로 불가능한 일이다.

감시림프절은 유방암에서 림프관을 통해서 전이가 일어나는 첫 번째 림프절로, 종괴의 크기가 작은 유방암에서 액와림프절의 절제 시 생길 수 있는 합병증을 줄이고자 감시림프절 생검이 시도되고 있다. 감시림프절 생검은 Cabanas등(*4*)에 의해서 음경암에 최초로 사용되기 시작하였고, 1992년 Morton등(*5*)이 흑색종의 림프절 절제에 이용하기 시작하면서 그 이론의 기초가 마련되었다. 유방암에서도 감시림프절 생검은 현재 널리 이용되고 있으며, 액와림프절 절제술을 대신할 수 있는 방법으로 정착되어 가고 있다.(*6-8*) 감시림프절이 액와림프절의 상태를 대표할 수 있다는 정보가 쌓이면서, 감시림프절을 이용한 미세전이에 관한 연구가 활발히 진행되고 있다.(*9*) 과거 전체 액와림프절을 검사했던 것과는 달리 검사해야 할 림프절의

책임저자 : 노동영, 서울특별시 종로구 연건동 28번지
㉾ 110-744, 서울대학교병원 일반외과
Tel: 02-760-2921, Fax: 02-766-3975
E-mail: dynoh@plaza.snu.ac.kr
접수일 : 2000년 11월 16일, 게재승인일 : 2000년 12월 6일

수를 줄임으로써 연속절편(Serial sectioning, 이하 SS) 및 면역조직화학 염색(Immunohistochemistry, 이하 IHC) 그리고, 더 나아가 분자생물학적 방법을 좀 더 현실적으로 이용할 수 있게 되었다.

미세전이를 검사하는 방법으로 SS, IHC, 역전사 연쇄중합효소 반응(Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction, 이하 RT-PCR) 등이 쓰이고 있다. Hematoxylin and eosin 염색(이하 H&E 염색)상 전이가 없는 림프절을 대상으로 SS나 IHC를 시행할 경우 최고 29%의 미세전이를 더 발견할 수 있다고 보고하고 있다.(*10*) 최근 미세전이의 진단에 많이 사용되고 있는 RT-PCR법은 Keratin 19나 MUC1과 같은 상피세포에 표현되는 유전자가 전이가 있는 림프절에서 발현됨을 이용한 검사로, 매우 적은 양으로 존재하는 상피세포의 mRNA를 찾아낼 수 있어서 IHC에 비해서 100배나 민감도가 높은 것으로 알려져 있다.(*11*)

이에 저자들은 H&E 염색상 음성으로 판독된 감시림프절을 대상으로 Pan-cytokeratin 항체를 이용한 IHC 및 MUC1 mRNA와 Keratin19 mRNA을 이용한 RT-PCR을 이용하여 감시림프절에서 미세전이의 빈도를 확인하고자 한다. 또, 액와림프절에 전이가 없는 환자들에서 절제된 전체 액와림프절을 대상으로 IHC를 실시하여 감시림프절과 비감시림프절에서 미세전이의 빈도를 확인하고, 감시림프절 생검의 임상적 유용성을 확인하고자 한다.

방 법

1) 연구 대상

2000년 3월부터 7월까지 유방암으로 수술 받은 환자 중 감시림프절 생검을 시행한 20명의 환자를 대상으로 하였다. 환자들의 임상적 정보를 요약하여 보면(Table 1), 평균 나이는 44.1세로 25세에서 59세에 걸쳐 있었고, 12명의 환자가 폐경 전 여성이었으며, 나머지 8명은 폐경 후 여성이었다. 종괴의 위치는 상외측에 위치한 것이 가장 많아서 9명이었으며, 상내측이 6명, 하외측이 3명, 유륜하에 위치하는 예가 두 명이었다. 수술 전 진단은 세침흡인 생검(fine needle aspiration cytology)과 중앙부절침 생검(core needle biopsy)을 이용한 예가 각각 8명이었고, 나머지 두 명의 경우 절개 생검(excisional biopsy)을 이용하였다. 20명의 환자 중 종괴가 촉지되지 않는 경우도 두 예가 있었다. 수술은 14예에서 유방 전절제술을 시행하였고, 6예에서 유방보존술을 시행하였다. 종괴의 조직병리학적 인자들을 요약하면(Table 2), 종괴의 조직학적 분류는 침윤성 관암이 17예로 가장 많았고, 점액성 암이 두 예, 미세침윤성 유방암이 한 예였다. 종괴의 크기는 평균 2.0 cm으로 모두 3.0 cm 이하였다. 종괴의 수가 두 개 이상인 경우가 2예 있었다. Black에 의한 핵분화도는 1도가 6예, 2도가 11예, 3도가 2예였고, 조직학적 분화도는 1도가 2예, 2도가 9예, 3도가 6예이었다. 조직학적으로 광범위한 관내암(extensive intraductal component, EIC)이 존재하는 경우가 7예 있었고, 림프관 침범이 있는 예가 두 예 있었다. 액와림프절에 암세포의 전이가 없는 경우가 15예 있었고, 한 개에서 세 개의 림프절에 전이가 있는 예가 두 예, 네 개 이상의 림프절에 전이가 있는 경우가 3예 있었다. 환자의 병기는 I기가 8예, IIA가 7예, IIB기가 5예 있었다. 종괴에 에스트로겐 수용체가 존재하는 것이 14예 있었고, 프로게스테론 수용체가 존재하는 경우가 10예 있었다. 감시림프절 생검 시 발견된 감시림프절의 개수는 평균 1.7개로 한 개가 발견된 경우가 11예, 두 개가 발견된 경우가 6예, 세 개가 발견된 경우가 2예, 4개가 발견된 경우도 1예 있었다. 20명의 환자 중 감시림프절과 비감시림프절 모두에서 유방암전이가 발견되지 않은 경우가 15예 있었고, 비감시림프절에만 전이가 있는 경우가 1예, 감시림프절에만 전이가 있는 경우가 2예, 감시림프절과 비감시림프절 모두에 전이가 있는 예가 2예 있었다(Table 3). 20명의 환자에서 발견된 전체 액와림프절 320개 중 감시림프절의 수는 36개, 비감시림프절의 수는 284개였다. 절제된 감시림프절 36개 중 30개가 H&E 염색상 림프절 전이가 없는 것으로 판명되었다.

Table 1. Clinical data on patients with breast cancer

	Number of patients (%)
Total	20
Age (years)	
Mean	44.1
Range	25～59
Menopausal status	
Pre-	12 (60)
Peri- and post-	8 (40)
Location	
Upper inner	6 (30)
Upper outer	9 (45)
Lower outer	3 (15)
Subareolar	2 (10)
Preoperative diagnosis	
Fine needle cytology	8 (40)
Core needle biopsy	8 (40)
Excisional biopsy	3 (15)
Chief complaint	
Mass	18 (90)
MMG abnormality	2 (10)
Operation	
Mastectomy	14 (70)
Lumpectomy	6 (30)

MMG = mammography.

Table 2. Pathologic data on patients with breast cancer

	Number of patients (%)
Histologic type	
Invasive ductal carcinoma	17 (85)
Microinvasive carcinoma	1 (5)
Mucinous carcinoma	2 (10)
Tumor size (cm)	
0～1.0	2 (10)
1.1～2.0	7 (35)
2.1～3.0	11 (55)
Multiple tumor	2 (10)
Nuclear grade (Blacks)	
1	6 (30)
2	11 (55)
3	2 (10)
Histologic grade	
1	2 (10)
2	9 (45)
3	6 (30)
Extensive intraductal component (+)	7 (35)
Lymphatic vessel invasion (+)	2 (10)
Axillary nodal involvement	
0	15 (75)
1～3	2 (10)
4 or more	3 (15)
Stage	
I	8 (40)
IIA	7 (35)
IIB	5 (25)
Estrogen receptor status	
Positive	14 (70)
Negative	6 (30)
Progesterone receptor status	
Positive	10 (50)
Negative	10 (50)
Number of sentinel lymph node	
1	11 (55)
2	6 (30)
3	2 (10)
4	1 (5)

Table 3. Tumor status of sentinel and nonsentinel axillary lymph nodes by H&E staining

Tumor status		Number of patients
SLN (−)	NSLN (−)	15
SLN (−)	NSLN (+)	1
SLN (+)	NSLN (−)	2
SLN (+)	NSLN (+)	2
Total		20

SLN = sentinel lymph node; NSLN = nonsentinel lymph node.

2) 방법

(1) 감시림프절 생검 및 조직검체의 준비: 수술 당일 오전 Tc-99m antimony sulfide colloide 0.4 mCi를 0.1 cc 생리식염수에 희석하여 종괴의 중심부의 피부에 피내주사 한다. 주사 후 45분 뒤 전후면 영상과 측면 영상을 감마 카메라를 이용하여 촬영하고 대략의 감시림프절의 위치와 수를 확인한다. 피내주사 후 2시간에서 3시간 뒤 수술장에서 감시림프절 생검을 실시한다. 먼저 전신마취하에서 감마선 탐침자를 이용하여 액와부위를 검색하여 가장 gamma 선의 강도가 가장 높은 열점(hot spot)을 찾은 후 이 위치의 피부에 2 cm 내지 3 cm의 절개를 가하고 탐침자를 이용하여 감시림프절을 찾고 생검을 시행하였다. 절제된 감시림프절을 탐침자를 이용하여 10초간의 값을 기록하고 이 값의 10% 이상인 경우만을 감시림프절로 분류하였다. 생검한 림프절은 반으로 절개한 후 수술장 병리과로 보내져 각인세포검사(imprint cytology)를 시행한다. 이 중 반은 H&E 염색과 면역화학염색을 위해서 10%-buffered formalin에 고정하고, 나머지 반은 eppendorf tube에 담아 액체 질소에 넣어 얼린 후 RNA 추출 전까지 −80°C에 보관하였다. 감시림프절 생검이 끝난 후 유방에 대한 수술을 시행하였고, 감시림프절 생검의 결과와 무관하게 액와절제술을 시행하였다.

(2) 면역조직화학 염색: 파라핀 포매된 조직을 4 μm 두께로 박절한 뒤 silane 또는 poly-L-lysin이 처리된 slide에 얹어 통상의 방법대로 탈-파라핀하고 증류수로 씻은 뒤 3% 과산화수소로 5분간 처치하였다. 다음 10 mM citrate buffer (Ph 6.0)에 담근 채 750 W microwave에 5분 그리고 trypsin에 5분 처치하고 PBS 용액으로 세척한 뒤 정상 쥐 혈청으로 20분간 반응시켰다. 여기에 200배 희석된 pan-cytokeratin 단클론 항체(DAKO®)를 얹어 30분 동안 반응시킨 후 PBS용액으로 반응을 중지시키고 연결항체(linked antibody; biotinylated horse anti-mouse serum)로 30분간 상온에서 처치하였다. 다시 PBS용액으로 세척한 후 표지항체(labeled antibody; avidin-biotinylated peroxidase complex)로 30분간 반응시켰다. 발색은 diaminobenzidine (Sigma®)을 사용하였으며 Meyer씨 hematoxylin으로 대조 염색하였다. 각각의 슬라이드는 저배율의 광학현미경으로 양성세포를 선별하였고, 고배율에서 각각의 양성세포의 모양을 확인하였다. 한 개 혹은 그 이상의 악성 상피세포가 관찰될 때 양성으로 판독하였다.

3) 역전사 연쇄중합효소 반응(RT-PCR)

(1) 감시림프절에서 RNA 추출: −80°C에 저장중인 감시림프절의 냉동절편을 막자사발에 넣고 액체질소를 부으면서 잘게 조직을 분쇄한 후 이 가루를 eppendorf tube에 담고 TRIzol® 1 ml (Gibco BRL)를 첨가하여 흔들어 준 후 상온에 약 5분간 방치하였다. Chloroform 200 μl (Sigma chemical company)를 첨가하고 잘 혼합한 후, 14,000 rpm, 4°C에서 15분간 원심분리하였다. 상층액 400 μl를 걷어서 새 eppendorf tube에 옮기고 isopropyl alcohol (Sigma chemical company)을 동량 넣고 20°C에 15분간 방치하고 다시 14,000 rpm에서 15분간 원심분리하여 pellet을 확인하고 상층액을 제거하였다. 여기에 75% ethanol 500 μl를 넣고 위와 같은 방식으로 원심분리한 후 ethanol (Merk)을 제거하고 10분간 상온에서 건조시켰다. 20 μl의 DEPC-DW (diethyl pyrocarbonate-distilled water) (Sigma chemical company)를 넣고 분리된 RNA를 잘 용해시킨 후 분광광도계를 사용하여 RNA를 정량하고 20°C 냉장고에 보관하였다.

(2) 역전사: 각각의 RNA 1 μg, random primer 1 μl (Roche), dNTP mixture 2 μl, 5×PCR 완충액 4 μl, 0.1 M DTT 1 μl, RNase inhibitor 1 μl (Takara), $MgCl_2$ 2 μl와 MMLV-reverse transcriptase 1 μl (Gibco BRL)를 혼합하여, 42°C에서 60분, 99°C에서 5분 동안 반응하여 얻어진 각각의 cDNA를 4°C에 보관하였다.

(3) 연쇄중합효소 반응: Keratin19와 MUC1에 대한 시발체 서열은 각각 Luqmani등(*12*)과 Stern등(*13*)에 의해서 보고된 서열을 제작하였고(Table 4), 비교군으로 β-actin의 PCR 시발체 염기서열을 사용하였다.(*14*) 연쇄중합효소 반응을 위해 cDNA 3 μl, 10×PCR 완충액 2.0 μl와 dNTP mixture 2 μl를 사용하였고, 각각의 시발체는 전진형과 역행형을 각각 1 μl (10 pM/μl)씩을 사용하였다. Takara사의 taq polymerase 0.2 μl (5 unit/μl)씩 혼합하고 Hybaid Multi-Block System을 사용하여 Table 5의 온도 조건에 따라 증폭하였다. 연쇄중합효소 반응 결과 얻어진 산물은 6×loading dye를 첨가하여 2% agarose gel (Sigma chemical company)에서 50 V로 전기영동한 후 Ethidium Bromide (Sigma chemical company)로 염색하였다. 이것을 자외선 투시기하에서 각각의 연쇄중합 반응 생성물을 확인하였다.

Table 4. Primers for RT-PCR amplification

mRNA	Product size (bp)	Primers 5-3
MUC1	288	CGTCGTGGACATTGATGGTACC
		GGTACCTCCTCTCACCTCCTCCAA
Keratin 19	460	AGGTGGATTCCGCTCCGGGCA
		ATCTTCCTGTCCCTCGAGCA
β-Actin	154	CACTGTGTTGGCGTACAGGT
		TCATCACCATTGGCAATGAG

Table 5. Temperature conditions for RT-PCR

	Keratin 19	MUC1	β-Actin
Denaturing temp	94°C/1 min	94°C/1 min	94°C/1 min
Annealing temp	50°C/1 min	53°C/1 min	55°C/1 min
Lengthening temp	72°C/1 min	72°C/1 min	72°C/1 min

결 과

1) H&E 염색상 음성으로 판명된 30개의 감시림프절에 대한 미세전이 검사

20명의 환자에서 절제된 36개의 감시림프절 중 H&E 염색상 전이가 없다고 확인된 30개의 감시림프절에 대한 미세전이의 유무를 확인하기 위해 Pan-cytokeratin을 이용해 IHC와 Keratin19 mRNA 및 MUC1 mRNA를 이용한 RT-PCR을 실시하였다.

(1) Pan-cytokeratin 면역조직화학 염색을 이용한 연구 (Fig. 1, 3): H&E 염색상 전이가 없다고 판정된 30개의 감시림프절 중에서 IHC검사상 양성으로 즉, 미세전이가 있다고 확인된 림프절은 한 개로, IHC를 이용한 경우 3.3% (1/30)에서 미세전이를 더 확인할 수 있었다. 이 환자의 경우 비감시림프절에만 H&E 염색상 전이가 있던 위음성 증례로, 두 개의 감시림프절에서는 H&E 염색상 전이가 발견되지 않은 예이다. 이 중 한 개의 감시림프절에서 Pan-cytokeratin을 이용한 IHC로 미세전이를 발견할 수 있었다. 하지만, 환자를 기준으로 생각해 보면 H&E 염색상 전체 액와림프절에 전이가 없던 15예의 감시림프절에서는 면

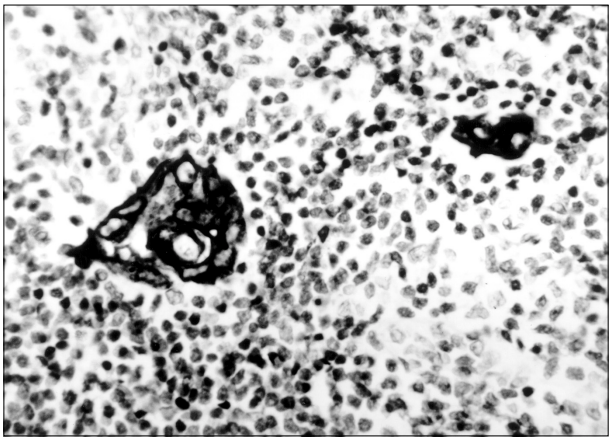

Fig. 1. Immunohistochemical staining for Pan-cytokeratin. A stained cluster of malignant cells is seen in the lymphoid tissue (×200).

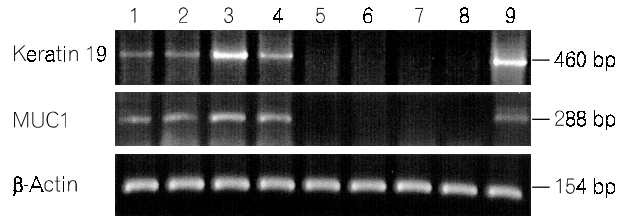

Fig. 2. RT-PCR amplification of Keratin 19 mRNA, MUC mRNA, and β-actin mRNA obtained from sentinel lymph nodes (lane 1-7), negative control lymph nodes of patients with cholelithiasis (lane 8), and primary breast carcinoma (lane 9). Total RNA was obtained from each of 30 sentinel lymph nodes obtained from 20 patients and the results of agarose gel electrophoresis are shown.

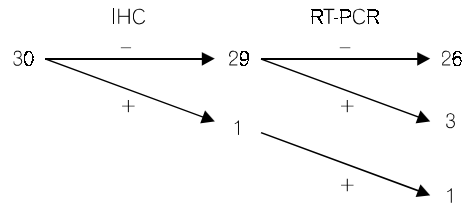

Fig. 3. Detection of micrometastases in sentinel lymph nodes previously diagnosed as free of metastasis by immunohistochemistry of Pan-cytokeratin and reverse transcriptase polymerase chain reaction of MUC1 mRNA and Keratin 19 mRNA.

역조직화학 염색을 통하여 추가로 미세전이가 확인되지는 않았다.

(2) Keratin19 mRNA 및 MUC1 mRNA RT-PCR을 이용한 연구(Fig. 2, 3): Keratin19 mRNA를 이용하여 H&E 염색상 전이가 없었던 30개의 감시림프절에 대한 RT-PCR을 시행하였을 때 네 개의 감시림프절에서 미세전이가 더 발견되었다. 앞서 시행한 Pan-cytokeratin IHC에서 미세전이가 발견된 감시림프절이 포함되어 있었고, 나머지 3예의 경우 다른 감시림프절에는 이미 H&E 염색상 전이가 발견된 예이다. 림프절을 기준으로 볼 때 Keratin19 mRNA를 이용한 RT-PCR을 통하여 13.3% (4/30)에서 미세전이가 더 확인되었다. 하지만, H&E 염색상 전체 액와림프절 전이가 없었던 15예에서는 IHC의 경우와 마찬가지로 RT-PCR 방법에 의해서도 감시림프절에서 새로운 미세전이는 발견되지 않았다. MUC1 mRNA를 이용하여 RT-PCR을 시행하였을 때, Keratin19 mRNA을 이용한 경우와 같은 결과를 보여주고 있으며, 추가로 발견된 미세전이는 없었다.

2) H&E 염색상 액와림프절 전이가 없는 15예에 대한 검사

위에서 검사한 20명의 환자 중 H&E 염색상 감시림프절 및 비감시림프절에 유방암의 전이가 없다고 판명된 15예의 환자에서 절제된 243개의 림프절에 대한 유방암 미세전이에 대한 연구를 시행하였다. 243개의 림프절 중 감시림프절은 17개였으며 비감시림프절은 226개였다. 앞서의 실험 결과를 보면 17개의 감시림프절 중 IHC 및 RT-PCR을 이용한 검사상 미세전이가 확인된 예는 한 예도 없었다. 226개의 비감시림프절에 대한 Pan-cytokeratin IHC를 실시하였으나, 미세전이가 추가로 확인된 예는 한 예도 없었다.

고 찰

유방암의 예후를 결정하는 인자로는 종괴의 크기, 림프절 전이의 유무, 호르몬 수용체의 유무 등이 있으며, 이중 림프절 전이의 유무가 가장 중요한 예후인자로 알려져 있다.(*1,2*) 하지만, 흔히 시행하는 H&E 염색상 림프절에 전이가 없다고 확인된 예에서도 일부 예후가 좋지 않은 경우가 있고 이는 기존의 검사로는 발견되지 않은 미세전이 때문이라고 보고되고 있다.(*15*) Dowlatshahi등(*16*)에 의하면, SS 및 IHC를 시행하였을 때 기존의 방법으로 발견할 수 없었던 미세 전이를 7%에서 33% 더 발견할 수 있었다. 일부 연구에서는 유방암 환자에서 림프절에 미세전이가 있더라도 예후와는 무관하다고 주장하고 있으나,(*17*) 최근 들어 SS 및 IHC를 이용한 검사에서 림프절 미세전이가 확인된 환자의 경우 예후가 나쁘다는 보고가 많이 나오고 있다.(*18-20*) Braun등(*21*)은 유방암 환자의 골수를 채취하여 cytokeratin IHC를 실시하여 골수에 미세전이가 있는 경우 재발의 위험이 증가한다고 보고하였다. 미세전이에 대한 관심이 고조되어 가고 있는 상황에서 또 다른 연구 방법으로 호평을 받고 있는 것은 림프절에서 Keratin19 mRNA 또는 MUC1 mRNA의 발현유무를 RT-PCR 방법을 통하여 확인하는 것이다. 이는 림프절에 존재하는 아주 적은 양의 mRNA도 찾아낼 수 있으며, 면역조직화학 염색보다는 100배나 민감한 검사법으로 알려져 있다.(*11*) 하지만, 이렇게 미세전이를 발견할 수 있는 좋은 연구방법이 있음에도 불구하고 실제로 임상에서 널리 쓰이지 못 했던 가장 큰 이유 중의 하나는 유방암 환자에서 절제되는 15개 이상의 림프절에 대해서 이런 복잡한 검사를 하기에는 너무 번거롭기 때문이다. 이런 방법상의 번거로움을 덜기 위하여 Noguchi등은 환자에서 절제된 림프절을 모두 모은 후, 이 전체의 조직에서 mRNA를 추출하여 Keratin19 mRNA 및 MUC1 mRNA를 RT-PCR을 통해서 검사하기도 하였지만, 미세한 양으로 존재하는 상피세포 mRNA가 정상 림프절에 의해서 희석된다는 단점이 있어, 임상적으로 그리 널리 쓰이지는 못 하였다.(*3*)

이런 현실적인 문제를 극복하고자 현재 시도되고 있는 방법은 감시림프절에서의 미세전이의 진단이다. 유방암의 액와림프절 전이는 순차적으로 진행된다는 것은 이미 알

려진 사실이고,(22) 이에 근거하여 감시림프절 생검도 가능해졌다. 실제로 본 연구에서도 1도, 2도, 3도의 순서로 순차적인 림프절 전이를 보였으며, 선행 감시림프절을 뛰어 넘어서 전이를 일으킨 예는 한 예에 불과하였다. 1997년 Turner등(23)에 의하면, SS 및 IHC와 같은 방법으로 철저히 검사하여 감시림프절에 전이가 없다고 판단되면, 그 이외의 림프절에 전이가 있을 확률은 0.1%도 되지 않는다고 하였다. 액와림프절을 대표하는 소수의 감시림프절을 대상으로 철저히 미세전이에 대하여 검사하는 것은 그리 힘든 일이 아니므로 미세전이에 대한 임상적 이용이 현실적으로 가능하게 된다. 본 저자들의 연구에서도 H&E 염색상 액와림프절 전이가 없다고 확인된 환자의 감시림프절에 대해서 IHC 및 RT-PCR 등의 방법으로 철저히 검사하여 전이가 발견되지 않은 15예의 환자에서는 나머지 비감시림프절에도 IHC상 전이가 없었다. 물론 본 연구에 포함된 예가 20개에 불과하지만, 감시림프절에 대해 미세전이의 유무를 철저히 검사한 후 전이가 없다고 판단되면, 전체 액와림프절에도 전이가 없다고 추측할 수 있을 것이다. 감시림프절의 미세전이에 대한 검사결과를 토대로 보조화학요법의 시행유무를 판단할 수 있고, 더 나아가서는 예후를 예측할 수 있는 좋은 근거가 된다.

본 연구에 의하면 IHC의 경우 H&E 염색상 전이가 없는 30개의 감시림프절 중 한 개에서 추가의 미세전이를 발견할 수 있었다. 이 방법에 의해서 3.3%의 미세 림프절 전이가 추가로 확인되었다. 이 증례의 경우는 감시림프절에는 전이가 없었으나 비감시림프절에서 전이가 발견된 위음성 증례로 절제된 두 개의 감시림프절 중 하나에서 IHC에 의해서 미세전이가 발견되었다. 감시림프절에 미세전이가 발견된 경우 다른 비감시림프절에도 거시적 혹은 미세전이가 존재할 확률이 증가할 것이라는 사실을 예측할 수 있고, 미세전이에 관한 연구를 통하여 감시림프절 생검의 가장 큰 문제인 위음성률을 낮추는 데 도움이 될 것이다. 하지만, H&E 염색상 도약전이가 있었던 예가 1예밖에 되지 않아서 IHC와 RT-PCR이 이 경우 얼마나 큰 도움을 줄지는 향후 추가의 연구가 필요한 부분이다. Weaver등(9)에 의한 연구에 의하면 감시림프절 생검의 위음성률은 11.9%에 이르는 것으로 보고하고 있고, 위음성률이 생기는 원인 중에서 미세전이로 설명되는 부분은 극히 일부일 것이라고 주장하였다. 물론, 림프절 전이의 분포가 순차적인 진행이 아닌 경우나, 올바르지 못한 감시림프절 생검의 방법 등도 매우 중요한 이유이겠지만, 익숙해진 외과의사에 의해서 제대로 시행된다면 상당히 많은 부분은 미세전이로 설명될 수 있을 것이다. H&E 염색상 액와림프절 전이가 없었던 15예의 환자에 대한 비감시림프절에 대한 검사에서 IHC상에서도 모두 음성으로 확인되어 특이도가 100%에 이르는 훌륭한 검사임을 확인할 수 있었다.

Keratin19 mRNA 및 MUC1 mRNA에 대한 RT-PCR을 이용하여 위와 동일한 30개의 감시림프절을 검사하였을 때에는 두 검사 모두 동일한 네 개의 림프절에서 미세전이가 추가로 발견되었다. Keratin19 mRNA나 MUC1 mRNA 모두 미세전이를 확인하는 데는 신뢰성이 있는 유전자임을 확인할 수 있었고, 이 방법에 의해서 13.3%의 림프절 전이가 추가로 확인되어서 IHC에 비해서 RT-PCR이 미세전이를 찾는 데 좀 더 예민한 검사임이 확인되었다. 액와림프절에 H&E 염색상 전이가 확인된 예는 20예 중 5예로 이중 4예에서 RT-PCR을 통하여 전이가 없던 감시 림프절에 전이가 추가로 발견되었다. 액와림프절에 전이가 전혀 없었던 15예에서는 RT-PCR 방법에 의해서도 추가로 감시림프절에서 전이가 확인된 예가 없었다는 것은 액와림프절에 전이가 있는 경우 감시림프절에 거시적 혹은 미세전이가 존재할 가능성이 훨씬 높다는 것을 의미한다. Weaver등(9)에 의하면 감시림프절에 미세전이가 있을 가능성은 비감시림프절에 비하여 12.3배나 높다고 밝혔고, 이는 감시림프절 생검의 임상적 유용성을 증명하는 것이다.

본 연구를 통하여 IHC 및 RT-PCR을 이용한 미세전이의 검사는 H&E 염색에 비하여 림프절 전이를 찾는 좀 더 예민한 검사임을 확인할 수 있었다. 감시림프절에 미세전이가 없다고 확인되면, 나머지 액와림프절에도 전이가 없다고 예측할 수 있겠고, 이 경우 액와림프절 절제술 없이 감시림프절 생검만으로도 충분할 것이다. 하지만, 향후 임상적 이용을 위해서는 미세전이와 예후와의 관계에 관한 전향적인 연구가 필요하겠고, 감시림프절 생검이 액와림프절에 대한 수술의 표준이라는 사실이 확인되어야 할 것이다.

결 론

감시림프절 및 비감시림프절에 대한 미세전이를 면역조직화학 염색 및 RT-PCR을 이용하여 연구하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1) 기존의 검사로는 발견되지 않던 미세전이를 면역조직화학 염색을 이용하여 분석한 결과 3.3%의 미세전이를 추가로 발견할 수 있었고, RT-PCR을 이용한 경우 13.3%의 미세전이를 추가로 확인할 수 있었다.

2) 면역조직화학 염색 및 RT-PCR을 이용하여 감시림프절에 미세전이가 없다고 확인되면, 비감시림프절에도 미세전이가 없었다.

이상의 결과를 토대로, IHC 및 RT-PCR을 이용한 미세전이의 검사는 기존에 사용하던 H&E 염색만으로 발견할 수 없었던 림프절 전이를 찾을 수 있는 매우 예민한 검사임을 확인할 수 있었다. 감시림프절에 미세전이가 없을 경우 나머지 액와림프절에는 전이가 없다고 예측할 수 있겠고, 이 경우 액와림프절 절제 없이 감시림프절 생검만

으로 충분할 것이다. 하지만, 실제 임상적 적용을 위해서는 감시림프절 미세전이와 예후와의 인과관계에 대한 전향적 연구가 선행되어야 할 것이다.

REFERENCES

1) Fisher ER, Sass R, Fisher B. Pathologic findings from the National Surgical Adjuvant Project for Breast Cancers (protocol no. 4). X. Discriminants for tenth year treatment failure. Cancer 1984;53:712-23.
2) Carter CL, Allen C, Henson DE. Relation of tumor size, lymph node status, and survival in 24,740 breast cancer cases. Cancer 1989;63:181-7.
3) Noguchi S, Aihara T, Motomura K, Inaji H, Imaoka S, Koyama H. Detection of breast cancer micrometastases in axillary lymph nodes by means of Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction. Am J Pathol 1996;148:649-56.
4) Cabanas RM. An approach for the treatment of penile carcinoma. Cancer 1977;39:456-66.
5) Morton DL, Wen DR, Wong JH, Economou JS, Cagle LA, Storm FK, et al. Technical details of intraoperative lymphatic mapping for early stage melanoma. Arch Surg 1992;127:392-9.
6) Giuliano AE, Kirgan DM, Guenther JM, Morton DL. Lymphatic mapping and sentinel lymphadenectomy for breast cancer. Ann Surg 1994;220:391-401.
7) Krag DN, Weaver DL, Alex JC, Fairbank JT. Surgical resection and radiolocalization of the sentinel lymph node in breast cancer using a gamma probe. Surg Oncol 1993;2:335-9.
8) Veronesi U, Paganelli G, Galimberti V, Viale G, Zurrida S, Bedoni M, et al. Sentinel-node biopsy to avoid axillary dissection in breast cancer with clinically negative lymph-nodes. Lancet 1997;349:1864-7.
9) Weaver DL, Krag DN, Ashikaga T, Harlow SP, OConnell M. Pathologic analysis of sentinel and nonsentinel lymph nodes in breast carcinoma. Cancer 2000;88(5):1099-107.
10) Van Diest PJ, Peterse HL, Borgstein PJ, Hoekstra O, Meijer CJ. Pathological investigation of sentinel lymph nodes. Eur J Nucl Med 1999;26:S43-9.
11) Noguchi S, Aihara T, Nakamori S, Motomura K, Inaji H, Imaoka S, et al. The detection of breast carcinoma micrometastases in axillary lymph nodes by means of reverse transcriptase-polymerase chain reaction. Cancer 1994;74:1595-600.
12) Luqmani YA, Smith J, Coombes RC. Polymerase chain reaction-aided analysis of gene expression in frozen tissue sections. Anal Biochem 1992;200:291-5.
13) Stern L, Palatsides M, Krètser T, Ford M. Expression of the tumor-associated mucin MUC1 in an ovarian tumor cell line. Int J Cancer 1992;50:783-90.
14) Ben-Ezra J, Johnson DA, Rossi J, Cook N, Wu A. Effect of fixation on the amplification of nucleic acids from paraffin-embedded material by the polymerase chain reaction. J Histochem Cytochem 1991;39:351-4.
15) International (Ludwig) Breast Cancer Study Group. Prognostic importance of occult axillary lymph node micrometastases from breast cancers. Lancet 1990;335:1565-668.
16) Dowlatshahi K, Fan M, Snider HC, Habib FA. Lymph node micrometastases from breast carcinoma: reviewing the dilemma. Cancer 1997;80:1188-97.
17) Silverstein MJ, Gierson ED, Waisman JR, Senofsky GM, Colburn WJ, Gamagami P. Axillary lymph node dissection for T1a breast carcinoma. Is it indicated? Cancer 1994;73:664-7.
18) De Mascarel I, Bonichon F, Coindre JM, Trojani M. Prognostic significance of breast cancer axillary lymph node micrometastases assessed by two special techniques: reevaluation with longer follow-up. Br J Cancer 1992;66:523-7.
19) Hainsworth PJ, Tjandra JJ, Stillwell RG, Machet D, Henderson MA, Rennie GC, et al. Detection and significance of occult metastases in node-negative breast cancer. Br J Surg 1993;80:459-63.
20) Clare SE, Sener SF, Wilkens W, Goldschmidt R, Merkel D, Winchester DJ. Prognostic significance of occult lymph node metastases in node-negative breast cancer. Ann Surg Oncol 1997;4:447-51.
21) Braun S, Pantel K, Muller P, Janni W, Hepp F, Kentenich CRM, et al. Cytokeratin-positive cells in the bone marrow and survival of patients with stage I, II, or III breast cancer. NEJM 2000;342:525-33.
22) Veronesi U, Galimberti V, Zurrida S, Merson M, Greco M, Luini A. Prognostic significance of number and level of axillary node metastases in breast cancer. The Breast 1993;2:224-8.
23) Turner RR, Ollila DW, Krasne DL, Giuliano AE. Histopathologic validation of the sentinel lymph node hypothesis for breast carcinoma. Ann Surg 1997;226:271-8.