

Cytokeratin의 RT-PCR 및 면역조직화학적 분석을 이용한 구강편평세포암종의 임파절 미세전이 진단과 예후인자 효용성 평가

박성진 · 이원덕 · 임구영 · 강진한 · 명 훈 · 이종호 · 김명진

서울대학교 치과대학 구강악안면외과학교실

Abstract (J. Kor. Oral Maxillofac. Surg. 2005;31:105-115)

DIAGNOSIS OF MICROMETASTASIS IN LYMPH NODE AND CLINICAL EVALUATION OF PROGNOSTIC FACTOR OF ORAL SCC USING RT-PCR AND IMMUNOHISTOCHEMISTRY FOR CYTOKERATIN

Sung-Jin Park, Won-Deok Lee, Ku-Young Lim, Jin-Han Kang, Hoon Myung,
Jong-Ho Lee, Myung-Jin Kim

Department of Oral and Maxillofacial Surgery, College of Dentistry, Seoul National University

Purpose: The lymph node status assessed by conventional histological examination is the most important prognostic factor in patients undergoing surgery for oral squamous cell carcinoma. The presence of lymph node metastasis has a strong adverse impact on patient survival even after extended radical resection. Despite these findings, tumour recurrence is not rare after surgery, even when histological examination shows no lymph node metastasis. Recently, molecular- genetically and immunohistochemically demonstrated micrometastasis to the lymph nodes has been shown to have a significant adverse influence on survival in patients with squamous cell carcinoma and histologically negative nodes. The present study sought to determine the incidence and clarify the clinical significance of molecular-genetically and immunohistochemically demonstrated nodal micrometastases and to correlate these data with the stage of oral cancer.

Methods: Lymph nodes systematically removed from 71 patients who underwent curative resection between 1998 and 2003 with head and neck squamous cell carcinoma were examined molecular-genetically to detect cytokeratin 5 mRNA with RT-PCR and immunohistochemically to detect cells that stained positively for cytokeratins with the monoclonal antibody cocktail AE1/AE3. The postoperative course and survival rates were compared among patients with and without micrometastases, after numerical classification of overt metastatic nodes.

Results: micrometastases were detected in 43(60%) of 71 patients by RT-PCR and 26(36%) of 71 patients by immunohistochemistry. By RT-PCR analysis, patients exhibiting a positive band for CK 5 mRNA had a significantly worse prognosis than those were RT-PCR negative. By immunohistochemistry, the presence of micrometastasis did not predict patient outcome.

Conclusion: Micrometastases detected by RT-PCR may be of clinical value in identifying patients who may be at high risk for recurrence and who are therefore likely to benefit from systemic adjuvant therapy.

Key words : Oral squamous cell carcinoma, Micrometastasis, Lymph node, Cytokeratin

I. 서 론

기존의 조직학적 검사 방법을 이용하여 구강편평세포암종으로 수술 받은 환자의 임파절을 진단한 결과, 확인된 임파절에서의 전이는 하나의 중요한 예후 인자가 되며 가장 적절한

구강편평세포암종의 치료법을 선택할 때 결정요소로 이용된다¹⁾. 심지어 광범위한 근치적 수술 이후에도 임파절에서의 전이는 환자의 생존율에 악영향을 줄 수 있는데 최근 어떤 연구에서는 전이된 임파절의 위치보다는 임파절의 수가 환자의 예후를 예측하는데 더 유용할 수 있다는 보고가 있으며 치료도 전이된 임파절의 수가 4개 혹은 그 이하가 되어야 가능하다는 보고도 있지만 조직학적 검사 결과 임파절 전이를 보이지 않는 경우라 할지라도 수술 이후 재발이 드물지 않게 나타나고 있다^{2,3)}. 두경부 영역에서 발생하는 편평세포암종은 임파절에서의 잠복된 미세전이를 동반하는 경우가 많다. 여러 연구들에 의해 미세전이가 구강편평세포암종 환자의 임파절에 존재함이 밝혀졌고, 이는 다양한 종류의 악성을 보이는 환자의 임

김 명 진

110-768 서울시 종로구 연건동 28-3

서울대학교 치과대학 구강악안면외과학교실

Myung-Jin Kim

Department of Oral and Maxillofacial Surgery, College of Dentistry, Seoul National University

28 Yeongun-dong, Jongno-gu, Seoul, # 110-768, South Korea

Tel : 82-2-2072-3813, 2632 Fax : 82-2-766-4948

E-mail : myungkim@plaza.snu.ac.kr

파절에 존재하는 것으로 생각된다^{6,11}. 임파절에 전이가 있으면 국부적인 재발의 위험성이 높고 환자의 낮은 생존율을 보이게 되는데 심지어 병소와 동측에 있는 경부 임파절 전이가 단 하나만 존재해도 생존율을 50%까지 감소시킬 수 있다¹². 일반적으로 사용되는 임상 검사는 전이된 임파절을 정확히 평가하는데 있어 20%에서 30%에 이르는 위음성 결과를 나타낸다¹³. 전산화단층촬영(CT), 자기공명영상촬영(MRI), 미세침흡인세포 검사법을 이용한 초음파 그리고 양전자방출단층촬영(PET)과 같은 방사선학적 검사들은 잠복되어 있는 작은 미세전이를 감지할 수 없다. 구강편평세포암종의 조직병리학적 평가는 진단, 구강암 병기결정과 예후에 대한 정보를 제공한다. 임파절에서 조직학적인 전이는 hematoxylin과 eosin (H&E)에 염색된 절편의 관찰을 통해 임상적으로 확인되는데 미세전이는 미미해서 hematoxylin과 eosin (H&E) 염색법에서 검출될 수 없다⁶. 따라서 면역조직화학적 방법과 분자유전학적 방법이^{6,9, 10, 14-16} 미세전이를 검출하는데 사용되고 있다^{10, 17-25}. 미세전이 검출에 있어 가능한 임상적 적용을 평가하기 위해 유전적 진단방법과 면역조직화학적 방법 사이에서 나타난 이전의 다른 결과들이 분석될 필요가 있다. 대부분의 이전 연구들이 오직 하나의 방법만을 사용하였기 때문에 이번 연구에서는 근치적 수술을 받고 임상적 결과가 이미 알려져 있는 구강편평세포암종 환자에서의 역전사-연쇄중합효소 반응(RT-PCR)과 면역조직화학적 방법 모두를 이용하여 임파절에서의 미세전이에 대해 조사하였다. 최근 여러 방법들에 의해 검출된 미세전이가 조직학적으로 음성인 결과를 보이는 환자의 생존율에 악영향을 보이는 것으로 보고 되고 있지만 명백한 전이를 보이는 환자에 있어 미세전이의 이환율 및 임상적 유용성에 대해서는 잘 알려져 있지 않다. 이번 연구의 목적은 구강편평세포암종으로 외과적 시술을 받은 환자에서 임파절 미세전이의 임상적 유용성을 밝히는 데 있다.

II. 재료 및 방법

1. 환자

1998년부터 2003년까지 서울대학교 치과병원 구강악안면외과에서 구강편평세포암종으로 진단받고 근치적 수술을 받은 총 71명의 환자를 대상으로 하였다. 나이는 21세부터 79세까지 평균 60세를 보였는데, 61세 이상이 35명, 60세 이하가 36명이었다. 이중 남자가 45명, 여자는 26명이었으며 수술 후 방사선 치료와 화학요법과 같은 보조 치료를 받은 사람은 34명이었다. T stage별로 보면 T1이 19명, T2가 22명, T3가 11명, T4가 19명이었으며, 발생 부위별로 보면 이중 45명이 하안면에 발생하였고 26명이 중안면부와 상안면에 나타났다. 절제된 임파절을 hematoxylin과 eosin(H&E) 염색법으로 관찰하였을 때 전이가 확인된 환자는 총 44명(61%)이었다(Table 1).

2. 임파절 조직으로부터의 RNA 추출과 역전사-연쇄중합효소 반응(RT-PCR)

(1) 임파절에서 RNA 추출

-80도에 저장중인 임파절의 냉동절편을 막자사발에 넣고 액체질소를 부으면서 잘게 조직을 분쇄한 후 이 가루를 eppendorf tube에 담고 TRIzol[®] 1ml (Gibco BRL)를 첨가하여 흔들어 준 후 상온에 약 5분간 방치하였다. Chloroform 200 μ l (Sigma chemical company)를 첨가하고 잘 혼합한 후, 14,000 rpm, 4도에서 15분간 원심분리 하였다. 상층액 400 μ l 를 걸어서 새 eppendorf tube에 옮기고 isopropyl alcohol(Sigma chemical company)을 동량 넣고 20도에 15분간 방치하고 다시 14,000 rpm에서 15분간 원심분리 하여 pellet을 확인하고 상층액을 제거하였다. 여기에 75% ethanol 500 μ l 를 넣고 위와 같은 방식으로 원심분리한 후 ethanol

Table 1. Clinicopathologic data on patients with oral squamous cell carcinoma

Factor	Number of patients (%)
Age	
≥ 61	35 (49.2)
≤ 60	36 (50.8)
Sex	
Male	45 (63.3)
Female	26 (36.7)
Tumor site	
lower	45 (63.3)
middle & upper	26 (36.7)
Histologic grade	
Well	45 (63.3)
Moderately	26 (36.7)
T stage	
T1	19 (26.7)
$\geq T2$	52 (73.3)
Metastasis	
Absent	27 (38.0)
Present	44 (62.0)
No. of metastatic LN	
≤ 3	59 (83.0)
≥ 4	12 (17.0)
Adjuvant Tx.	
Performed	34 (47.8)
Not performed	37 (52.2)

Lower : lower facial part

Middle & upper : middle and upper facial part

Well : well-differentiated

Moderately : moderately-differentiated

No. of metastatic LN : number of metastatic lymph node

을 제거하고 10분간 상온에서 건조시켰다. 20 μ l의 DEPC-DW(diethyl pyrocarbonate-distilled water) (Sigma chemical company)를 넣고 분리된 RNA를 잘 용해시킨 후 분광 광도계를 사용하여 RNA를 정량하고 -20°C 냉장고에 보관하였다.

(2) 역전사

각각의 RNA 1 μ g, random primer 1 μ l (Roche), dNTP mixture 2 μ l, 5 \times PCR 완충액 4 μ l, 0.1M DTT 1 μ l, RNase inhibitor 1 μ l (Takara), MgCl₂ 2 μ l 와 MMLV-reverse transcriptase 1 μ l (Gibco BRL)를 혼합하여, 42도에서 60분, 99도에서 5분 동안 반응하여 얻어진 각각의 cDNA를 4도에 보관하였다.

(3) 연쇄증합효소 반응

Cytokeratin 5에 대한 시발체는 이전에 보고되었던 염기 서열로 제작되었고, 비교군으로 GAPDH의 PCR 시발체 염기 서열을 사용하였다(Table 2). 연쇄증합효소 반응을 위해 cDNA 3 μ l, 10 \times PCR 완충액 2.0 μ l 와 dNTP mixture 2 μ l 를 사용하였고, 각각의 시발체는 전진형과 역행형을 각각 1 μ l (10 pM/ μ l)씩을 사용하였다. Taq polymerase 0.2 μ l (5unit/ μ l)씩 혼합하고 Hybaid MultiBlock System을 사용하여 Table 3의 온도 조건에 따라 증폭하였다. 연쇄증합효소 반응 결과 얻어진 산물은 6 \times loading dye를 첨가하여 2% agarose gel(Sigma chemical company)에서 50V로 전기영동한 후 Ethidium Bromide(Sigma chemical company)로 염색하였다. 이것을 자외선 투시기하에서 각각의 연쇄증합 반응 생성물을 확인하였다.

3. H&E 염색과 면역조직화학적 방법

H&E 염색과 monoclonal cytokeatin antibody AE1/AE3를 이용한 면역조직화학적 방법을 시행하기 위해 모든 임파절들을 5에서 6 μ m 간격의 절편으로 만들었다. 표준 조직학적 방법에 따라 H&E 염색이 시행되었다²⁰. 면역조직화학적 염색은 ABC법(avidin biotin peroxidase complex method)을 사용하였는데 그 원

리는 거의 모든 상피세포에 존재하는 cytokeatin에 특이한 1차 항체(primary monoclonal antibody)를 반응시킨 후, biotin과 결합한 2차 항체를 반응시키고, 이어서 avidin-biotin-peroxidase complex를 반응시킨다. Diaminobenzodine으로 발색반응을 일으켜 cytokeatin 항원을 확인하는 것이다.

면역조직화학적 염색의 순서는 다음과 같다.

- ① 임파절 절편으로부터 파라핀을 제거하기 위해 Xylene으로 처리한 후 알코올(alcohol)로 수화 시켰다.
- ② 증류수로 5분간 세척 후 0.1% trypsin(in 0.1% calcium chloride)으로 37°C에서 10분간 처리한다. 그리고 나서 phosphated buffered solution(PBS)으로 세척 후 10mM citrate buffer로 처리하였다.
- ③ PBS로 5분간 3회 세척 후 endogenous peroxidase를 제거하기 위해서 3% H₂O₂로 6분간 처리하였다.
- ④ PBS로 5분간 3회 세척 후 차단 항체로 염소 혈청(normal serum)을 사용하여 30분간 반응시켰다.
- ⑤ 1차 항체(anti-cytokeatin monoclonal Ab specific for low molecular and high molecular weight cytokeatin)를 차단 항체(blocking antibody)로 1: 50으로 dilution 하여 1시간 30분간 반응시켰다.
- ⑥ PBS로 5분간 3회 세척 후 2차 항체인 biotinylated anti-mouse IgG(Dako LSAB kit)으로 30분간 반응시켰다.
- ⑦ PBS로 5분간 3회 세척 후 avidin-biotin-peroxidase complex (Dako LSAB kit)로 30분간 처리하였다.
- ⑧ PBS로 5분간 3회 세척 후 chromogen으로 diaminobenzodine을 이용하여 발색반응을 일으켰다.
- ⑨ 물로 세척 후 Mayer hematoxylin으로 대조 염색 후 현미경으로 관찰하였다.

4. 미세전이의 평가

미세전이는 명백한 전이성 물질을 포함하지 않는 임파절에서 분자유전학적 방법이나 면역조직화학적으로 cytokeatin에

Table 2. Primers for RT-PCR amplification

cDNA	product size(bp)	primers 5' -3'
Cytokeratin 5	160	(F): GGTCGCGACTACAGTGCATATTACA (R): CCTCAGCAGCCAGTTTAGCATTATC
GAPDH	450	(F): ACCACAGTCCATGCCATCAC (R): TCCACCACCCTGTTGCTGTA

Table 3. Temperature conditions for RT-PCR

	Cytokeratin 5	GAPDH
Denaturing temp	94°C/60seconds	94°C/60seconds
Annealing temp	58°C/60seconds	58°C/60seconds
Lengthening temp	72°C/60seconds	72°C/60seconds

양성인 결과를 보이는 단일세포 또는 다섯 개나 그 이하의 세포 덩어리의 존재로 판단된다²⁷⁾. 망상세포나 형질세포도 cytokeratin에 양성반응을 나타낼 수 있지만 이런 비종양성 세포들은 다른 염색 형태를 보이기 때문에 전이성 종양세포에서의 미세전이를 평가하는데 어려움이 없었다²⁸⁾.

5. 통계적 분석

RT-PCR과 면역조직화학적 방법을 통해 확인한 임파절에서의 cytokeratin 발현과 임상병리학적 요소와의 관련성을 알아보기 위해 Chi-square test를 시행하였다. 구강편평세포암종과 관련된 생존율을 평가하기 위해 Kaplan-Meier 방법을 사용하였으며, log rank test를 이용하여 통계적 유의성을 조사하였다. 또한 생존율에 대한 단일변량 분석법과 다변량 분석법을 시행하였는데 다변량 분석을 위해 Cox proportional hazard model을 이용하여 여러 인자들이 술 후 생존율에 관계되는 양상을 알아보았다. 프로그램 SPSS 12.0 소프트웨어를 이용하여 통계적 분석을 시행하였으며 p<0.05가 통계적으로 유의한 차이가 있는 것으로 간주하였다.

III. 연구결과

1. 임파절에서의 RT-PCR에 의한 cytokeratin 5 mRNA의 검출

2 set의 cytokeratin 5 시발체로 PCR을 35회 시행할 때까지는 control군의 어떤 표본에서도 Cytokeratin 5 mRNA transcript가 발현되지 않으나, 40회 이후에는 cytokeratin 5 mRNA의 band가 몇몇 임파절에서 나타날 수 있다²⁹⁾. 이런 결과에 기초하여 PCR은 계속되는 실험을 통해 35회까지 시행하였다(Fig. 1). Cytokeratin 5 mRNA의 발현은 H&E 염색법에 의해 조직학적으로 전이가 있었던 44명중 26명에서와 조직학적으로 전이가 없었던 27명중 17명에서 확인할 수 있었다. 따라서 전체 실험 환자 71명중 43명(60%)의 환자에서 Cytokeratin 5 mRNA의 발현을 관찰할 수 있었으며 GAPDH mRNA의 band는 모든 실험대상의 임파절에서 확인할 수 있었다.

2. 면역조직화학적 방법에 의한 cytokeratin의 검출

채취된 임파절의 연속절편을 anti-cytokeratin antibody로 염색시킨 후 광학 현미경으로 미세전이 세포가 존재하는지를 관찰하였다(Fig. 2). Anti-cytokeratin antibody에 의해 세포질 염색을 보인 경우는 H&E 염색법에 의해 명백한 임파절 전이를 보였던 환자 44명 중 20명과 임파절 전이가 없었던 환자 27명 중 6명에서 확인할 수 있었다. 따라서 검사 대상인 구강편평세포암종 환자 71명 중 총 26명(36%)에서 cytokeratin 양성 반응을 보였다. 대부분의 미세전이 세포는 단일세포로 발견되었으며 작은 세포의 군을 이루는 경우는 드물게 나타났다.

3. 임상병리학적 인자와 cytokeratin 및 cytokeratin 5 mRNA 발현으로 검출된 미세전이의 관계

Table 4는 cytokeratin 5 mRNA 발현 유무에 의해 분류된 71명 환자의 임상병리학적 특성을 나타낸 것이다. 나이, 성별, 일차종양의 위치, 조직학적 분화도, T stage, 전이여부 그리고 보조요법 시행여부와 cytokeratin 5 mRNA 발현 유무와의 관계를 알아보기 위해 Chi-square test를 시행하였지만 통계적으로 유의한 차이는 보이지 않았다.

Table 5은 면역조직화학적 방법에 의한 cytokeratin 검출 유무에 의해 분류된 71명 환자의 임상병리학적 특성을 나타낸 것이다. 나이, 성별, 일차종양의 위치, 조직학적 분화도, T stage, 전이여부 그리고 보조요법 시행여부와 cytokeratin에 반응을 보이는 세포의 존재 여부와의 관계를 알아보기 위해 Chi-square test를 시행하였는데 단지 임파절에서의 전이 여부만이 cytokeratin에 음성 반응을 나타내는 군보다 양성을 나타내는 군에서 통계적으로 유의하게 더 많은 것으로 나타났다(p=0.049).

4. Cytokeratin 5 mRNA가 발현되는 경우 생존율에 미치는 영향

RT-PCR 방법을 이용하여 cytokeratin 5 mRNA 발현 여부를 알아본 후 나타난 결과에 따라 환자를 두개의 군으로 분류하였다. Cytokeratin 5 mRNA의 발현을 보이는 군(43명)과 cytokeratin 5 mRNA의 발현을 보이지 않는 군(28명)에 대해 생존 분석법을 시행한 결과 미세전이를 보이는 군의 5년 생존율이 미세전이를 보이지 않는 군의 5년 생존율보다 유의하게 더 낮게 나타났다(Fig. 3).

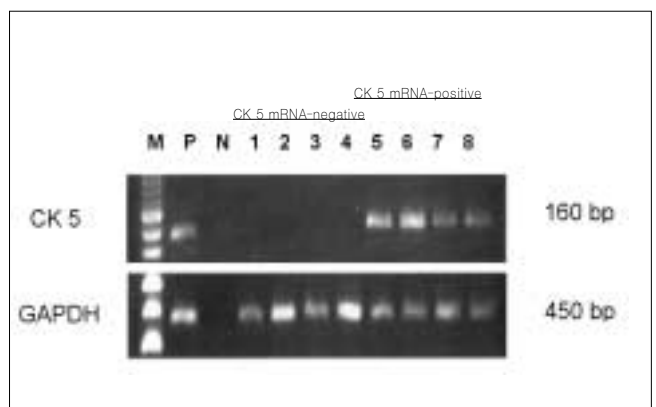


Fig. 1. Expression of CK and GAPDH mRNA in lymph nodes by RT-PCR amplification
 Lanes 1-4: CK 5 mRNA-negative lymph nodes
 Lanes 5-8: CK 5 mRNA-positive lymph nodes
 Abbreviation: bp=base pairs
 M=marker
 P=positive control
 N=negative control devoid of RNA extracts

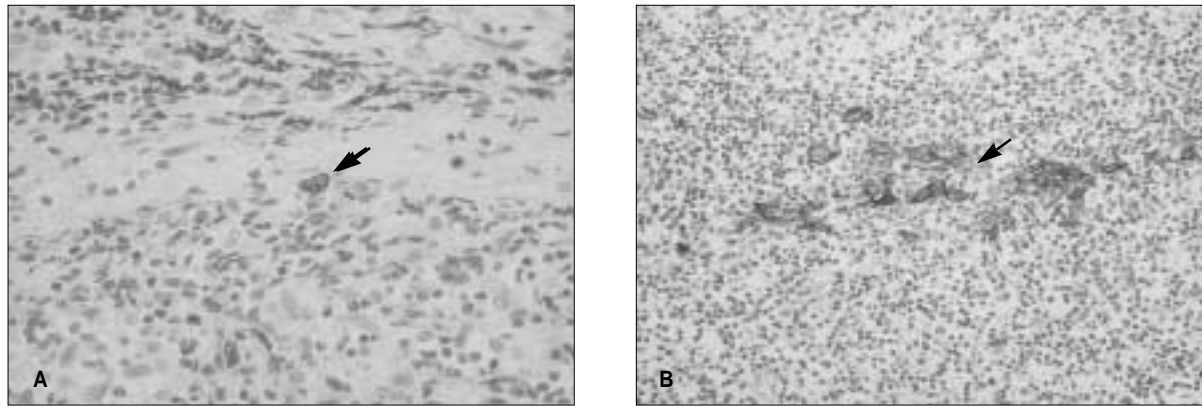


Fig. 2. Immunostaining of an occult cancer cell with anti-cytokeratin antibody in the lymph node
 The stained cell exhibited a morphologic feature of malignancy, such as large nuclei and nuclear small body
A single tumor cells showing immunostaining for cytokeratin by AE1/AE3 antibody cocktail(original magnification X 100)
B cluster of micrometastatic tumor cells detected by immunostaining with an by AE1/AE3 antibody cocktail (original magnification X 100)

Table 4. Relationship between CK mRNA expression in LNs and clinicopathologic factors

		CK mRNA in LNs				
		positive (n= 43)		negative (n= 28)		
		No.	%	No.	%	p
Age						
	≥ 61	23	53.4	16	57.1	0.381
	≤ 60	20	46.6	12	42.9	
Sex						
	Male	28	65.1	17	60.7	0.707
	Female	15	34.9	11	39.3	
Tumor site						
	lower	26	60.4	19	67.8	0.527
	middle & upper	17	39.6	9	32.2	
Histologic grade						
	Well	27	62.7	18	64.2	0.898
	Moderate	16	37.3	10	35.8	
T stage						
	T1	11	25.5	8	28.5	0.781
	≥ T2	32	74.5	20	71.5	
Metastasis						
	Absent	17	39.5	10	35.7	0.746
	Present	26	60.5	18	64.3	
No. of meta. LN						
	≤ 3	37	86	22	78.5	0.411
	≥ 4	6	14	6	21.5	
Adjuvant Tx.						
	Performed	21	48.8	15	53.5	0.843
	Not performed	22	51.2	13	46.5	

Table 5. Relationship between CK expression in LNs and clinicopathologic factors

	CK expression in LNs				p
	positive (n= 26)		negative (n= 45)		
	No.	%	No.	%	
Age					
≥ 61	16	61.5	19	42.2	0.117
≤ 60	10	38.5	26	57.8	
Sex					
Male	16	61.5	29	64.4	0.807
Female	10	38.5	16	35.6	
Tumor site					
lower	19	73	26	57.8	0.197
middle & upper	7	27	19	42.2	
Histologic grade					
Well	19	73	26	57.8	0.197
Moderate	7	27	19	42.2	
T stage					
T1	5	19.2	14	31.1	0.276
≥ T2	21	80.8	31	68.9	
Metastasis					
Absent	6	23	21	46.6	0.049*
Present	20	77	24	53.4	
No. of meta. LN					
≤ 3	20	77	39	86.6	0.291
≥ 4	6	23	6	13.4	
Adjuvant Tx.					
Performed	14	53.8	20	44.4	0.445
Not performed	12	46.2	25	55.6	

* : significant (p<0.05)

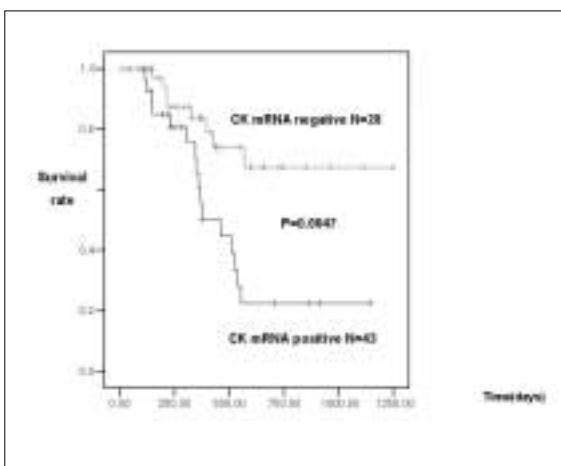


Fig. 3. Probability of the 5-year overall survival rate of oral squamous cell carcinoma according to Cytokeratin mRNA expression in lymph nodes. Significant difference was found in both survival curve(p=0.0047)

5. 임파절에서 cytokeratin에 양성인 결과를 보이는 경우 생존율에 미치는 영향

면역조직화학적 방법을 이용하여 cytokeratin에 반응 유무를 알아본 후 나타난 결과에 따라 환자를 두개의 군으로 분류하였다. Cytokertin에 양성반응을 보이는 군(26명)과 cytokeratin에 음성반응을 보이는 군(45명)에 대해 생존 분석법을 시행한 결과 미세전이를 보이는 군의 5년 생존율과 미세전이를 보이지 않는 군의 5년 생존율의 유의한 차이는 없었다(p=0.1392) (Fig. 4).

6. 생존율에 대한 임상병리학적 요소들의 단일변량 분석법 (Univariate analysis)

수술을 받은 구강편평세포암종 환자에서 임파절 미세전이가 예후에 어떤 영향을 주는지를 알아보기 위해 다양한 임상

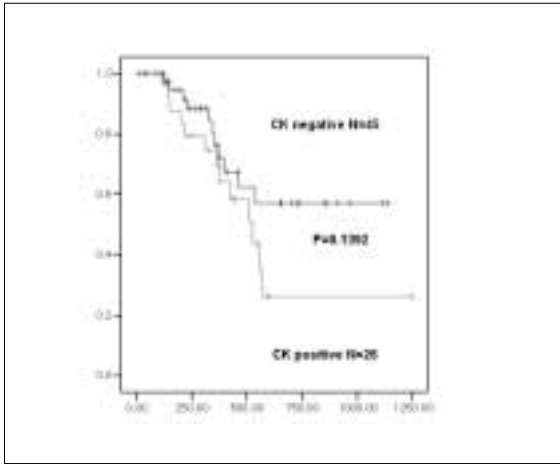


Fig. 4. Probability of the 5-year overall survival rate of oral squamous cell carcinoma according to presence of micrometastasis in lymph nodes by immunohistochemistry. No significant difference was found in survival curve ($p=0.1392$)

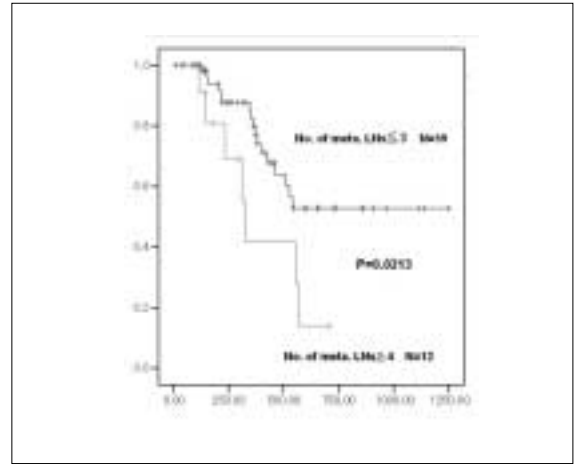


Fig. 5. Probability of the 5-year overall survival rate of oral squamous cell carcinoma according to number of metastatic lymph nodes. Significant difference was found in survival curve ($p=0.0213$)

Table 6. Univariate analysis of the clinicopathologic factors for survival in oral squamous cell carcinoma patients

Factor	Survival rate (p value)
Age	0.8162
Sex	0.9080
Tumor site	0.9628
Histologic grade	0.2365
T stage	0.6043
Metastasis	0.8972
No. of metastatic LN	0.0213*
Adjuvant Tx.	0.4483
CK expression in LNs	0.1392
CK mRNA in LNs	0.0047*

* : significant ($p<0.05$)

병리학적 요소와 임파절에서의 cytokeratin 5 mRNA 발현 그리고 면역조직화학적 방법에 의한 cytokeratin 검출 유무에 대해 평가하였다(Table 6). 결과에서 전이된 임파절의 수와 ($p=0.0213$) 임파절에서의 cytokeratin 5 mRNA의 발현 여부가 ($p=0.0047$) 5년 생존율과 유의한 관계가 있음을 보여주었다. 따라서 전이된 임파절의 수가 4개 이상인 경우와 cytokeratin 5 mRNA 발현을 보이는 경우 유의하게 더 낮은 생존율을 나타냈다(Fig. 5).

Table 7. Multivariate Cox regression analysis of clinicopathologic factors for survival in oral squamous cell carcinoma patients

Factor	Survival rate (p value)
Age	0.810
Sex	0.142
Tumor site	0.827
Histologic grade	0.904
T stage	0.627
Metastasis	0.174
No. of metastatic LN	0.107
Adjuvant Tx.	0.640
CK expression in LNs	0.099
CK mRNA in LNs	0.018*

* : significant ($p<0.05$)

7. 생존율에 대한 임상병리학적 요소들의 다변량 분석법 (Multivariate analysis)

Table 7에서와 같이 Multivariate Cox regression 분석법은 RT-PCR방법에 의한 cytokeratin 5 mRNA 발현이 구강편평세포암종 환자에 있어 생존율에 대한 유의한 예후 인자임을 보여 주었으나($p=0.018$) 다른 요소들은 유의한 결과를 나타내지 못했다. 4개 또는 5개의 공변량을 이용하여 몇몇 다른 조합으로 분석하였으나 유사한 결과를 얻을 수 있었다.

IV. 고 찰

편평세포암종의 예후를 결정하는 인자로는 종괴의 크기, 위치, 임파절 전이의 유무 등이 있으며 이중 임파절 전이가 가장 중요한 예후 인자로 알려져 있다. 임파절에서 전이소견이 있다는 것은 암종이 계속 진행되고 있음을 반영하고 더 이상 어느 한 부분에 국한될 수 없음을 의미한다. 임파절 전이가 편평세포암종 환자에 있어서 나쁜 예후에 대한 민감한 지표가 된다고^{30,34} 알려져 있으나 심지어 임파절에서 음성인 결과를 보이는 경우라 할지라도 대략 10%에서 20%의 환자에게 적어도 5년 안에 재발이 나타나고 있다³⁰. 최근 많은 연구들은 다양한 종류의 악성 종양에서 상피에 특이적인 monoclonal antibody나 RT-PCR을 이용하여 임파절이나 골수에서 미세전이 종양세포의 존재를 밝혀 내었다^{7,35}. 그러나 그런 미세전이가 임상적으로 유용성이 있는지에 대해서는 아직까지 논란의 여지가 많다. 어떤 저자들은 예후에 있어 미세전이는 중요한 영향을 끼치지 않는다고 보고한^{20,36} 반면 다른 저자들은 수술 후 환자의 재발과 연관된 결과를 나타낸다고 하였다^{27,37}. Glickman³⁸ 등은 식도암 환자에 있어 임파절에서의 미세전이와 낮은 생존율에 대한 상관관계를 발견하지 못하였으나 Izbicki³⁹등과 Natsugoe⁴⁰ 등은 식도절제술 후 미세전이의 존재는 나쁜 예후에 대한 유의한 인자가 된다고 보고하였다. 그러나 아직도 두경부 편평세포암종 환자에서의 미세전이의 임상적 중요성에 대해서는 잘 알려지지 않았다. 임파절 전이 여부는 보통 하나의 임파절 절단면의 H&E 염색으로 판정하게 되는데 일부 임파절에서 나타나는 작은 수의 암세포는 발견되지 않을 수 있다. Gusterson⁴¹ 등은 임파절에서 전이 음성으로 진단된 환자의 임파절을 연속 절편으로 재검사한 결과 약 20%에서 미세전이가 발견되었다고 보고하였다. 연속 절편의 수가 증가함에 따라 임파절 전이의 발견율은 증가하게 되나 실제 병리 검사에서 이러한 연속 절편을 시행하는 것은 어렵다. 최근 분자 생물학의 비약적인 발전으로 역전사-중합효소 연쇄반응을 이용하여 암세포에서만 배타적으로 발현되는 mRNA를 발견함으로써 민감하게 임파절 미세전이를 발견할 수 있다. 그러나 이러한 역전사-중합효소 연쇄반응은 위양성이 문제가 되고 있다. 이에 비해 anti-cytokeratin antibody를 이용한 면역조직화학염색은 일반 병리검사에서 발견되지 않은 임파절 미세전이를 비교적 간편하고 쉽게 발견할 수 있다. Cytokeratin은 구강편평세포암종의 미세전이를 검출하는 데 종종 사용되어져 왔다. 예비적인 연구에서 anti-cytokeratin antibody가 anti-CEA antibody 보다 좀더 강한 세포질 염색을 보였기 때문에 본 연구에서는 잠복된 암종 세포를 감지하는데 CEA antibody 대신 cytokeratin antibody를 사용하였다. Cytokeratin은 상피세포의 골격을 유지하는 중요한 세포내 단백질이고 정상과 악성 점막 상피세포에서 면역조직화학염색으로 발견되므로 상피세포의 표식자 역할을 한다^{42,43}. Cytokeratin은 단순 또는 편평상피세포에서 나타나며 세포에서의 중간제사(intermediate filament component)를 구성한다. Cytokeratin은 세포의 모양과 내부의 구성에 기여하고 적어도

19개의 다른 폴리펩티드의 군을 나타낸다. Cytokeratin은 낮은 분자량을 가지고 있으며 비교적 산성을 보이는 type I 과 높은 분자량을 가지고 있으며 비교적 염기성을 보이는 type II 로 분류될 수 있다. Cytokeratin 10과 12-19는 type I 에, cytokeratin 1-8은 type II 에 해당된다. 임파절에 있는 간엽세포는 cytokeratin을 포함하고 있지 않으므로 면역조직화학적검사에서 cytokeratin에 양성반응을 보이게 되면 구강편평세포암종의 임파절 미세전이가 존재하는 것으로 판단하게 된다. 이번 연구에서 cytokeratin에 작용하는 monoclonal antibody로 AE1과 AE3가 사용되었는데 AE1는 주로 낮은 분자량의 산성 cytokeratin을 인식하며, AE3는 주로 높은 분자량의 염기성 cytokeratin을 인식한다. 상피신생물은 전형적으로 낮은 분자량의 cytokeratin이 증가된 소견을 보이는 반면, 분화도가 나쁜 구강편평세포암종 세포는 낮은 분자량의 cytokeratin이 감소된 소견을 보인다. 따라서 monoclonal cytokeratin antibody AE1과 AE3가 편평세포암종과 연관된 임파절에서의 미세전이를 확인할 것으로 기대되었다. 이런 면역조직화학적 방법으로 36%의 환자에서 미세전이를 검출하였으며 잠복 전이된 세포는 대부분 단일세포 형태로 나타났는데, 이런 비율은 다른 연구 결과에 비해 비교적 낮은 것이며, 통계적 분석 결과 나쁜 예후에 대한 유의한 요소가 되지 못하였다. 하지만 본 연구에서 보다 많은 임파절의 연속 절편을 사용하였다면 이번 결과보다 높은 미세전이 검출율을 보일 수 있었으며 따라서 통계적으로도 다른 결과를 나타낼 수 있었을 것이다. 종래의 조직학적 방법에 의한 미세전이의 검출은 얻어진 표본의 정도에 따라 다르게 나타난다. 관찰된 절편의 수는 양성인 결과를 보이는 표본의 수와 관계가 있다. 기존까지는 미세전이를 검출하기 위해 단지 몇개의 절편만을 사용하였기 때문에 검출율이 0%에서 39%정도에 지나지 않았으나^{17,24} 최근의 다른 실험에서는 임파절 당 5개 이상의 연속 절편을 이용하기 때문에 명확한 진단을 내리는 데 큰 도움을 주고 있다(49.5%)⁴⁴. 이것은 미세전이가 편평세포암종에서 흔하게 있기 때문에 단순히 미세전이의 존재 여부보다는 비교적 많은 잠복 전이세포를 검출하는 것이 임상적으로 유용할 수 있음을 의미한다. 전체 임파절에 해당하는 충분한 슬라이드를 제작하고 관찰하는 것이 비현실적이기 때문에 면역조직화학적 방법은 미세전이의 양을 측정하는 데 한계가 있다. 이와는 대조적으로 RT-PCR 방법은 부피가 큰 임파절을 관찰하는데 잇점이 있으며 따라서 정량화도 가능하다. 이번 분자 유전학적연구에서는 미세전이의 존재 유무를 평가하기 위해 DNA 보다는 RNA를 이용하였다. 모든 경우에 있어 그런 것은 아니지만 구강편평세포암종에서 일부 유전자들의 변이가 나타날 수 있기 때문에 DNA에 기초한 방법은 한계를 가지고 있다. 반면 cytokeratin은 일차 구강편평세포암종 조직에 반드시 나타나며 이번 연구에서 또한 모든 일차 종양과 조직학적으로 양성인 임파절에서 cytokeratin 단백질이 발견되는 것을 관찰하였다. 이 방법을 사용한 다른 이유는 mRNA가 매우 불안정하기 때문이며 따라서 RT-PCR을 이용하여 종양세포를 감지하였다. 이와는 대조적으로 국소 임파절에서 발견되는 변이된 DNA는 암세포로

부터 유래된 것이라기보다 자유 종양 DNA의 일부분일 수 있다는 견해가 있다^{45, 46}. 이번 연구를 통해 전체 환자의 60%에서 Cytokeratin 5 mRNA가 발현되는 것을 확인하였는데 이 비율은 다른 연구의 결과와 다를 수 있다(52.1%에서 100%)^{9, 14-16}. 그 이유는 reverse transcription system과 PCR 실험조건에서의 차이 때문이다. 실험이 가능한 임파절의 매우 작은 부분만이 RT-PCR을 위해 처리되고 이런 과정이 조직을 파괴하기 때문에 동일한 절편을 RT-PCR과 조직학적 방법 모두를 이용해 검사하는 것은 불가능하다. 이것은 RT-PCR에서는 음성인 결과를 보였지만 조직학적으로는 전이가 확인된 경우에 대한 설명이 될 수 있으며 다른 가능성으로는 임파절 processing의 지연으로 이는 결과적으로 mRNA의 분해를 일으킨다. PCR 증폭의 대상으로 사용된 cytokeratin transcript는 정상 상피세포와 편평세포암종 세포에서도 발견된다. 따라서 PCR cycle수를 증가시키게 되면 감지율이 증가하게 될 것이다. PCR에서는 cytokeratin cDNA를 2단계로 증폭시킴으로써 높은 민감도를 얻게 할 수 있는데 결과적으로 임파절 전이 소견이 없는 환자에서 100%의 감지율을 나타낸다. Cytokeratin 5 mRNA 때가 비편평세포암종의 비교 임파절의 몇몇 표본에서 40cycle 후에 cytokeratin 때가 나타났기 때문에 위양성 반응을 피하기 위해 cytokeratin transcript를 위한 PCR이 단일 단계로 시행되도록 하였으며 증폭 cycle 수도 35회로 제한하였다. 본 연구에서 단일변량 분석법과 다변량 분석법을 이용하여 임파절에서의 cytokeratin 5 mRNA의 발현이 나쁜 예후에 대한 유의한 요소가 될 수 있음을 발견하였다. 하지만 이번 연구 결과에서 나타난 60%의 검출율 내에는 RT-PCR의 높은 민감도에 의한 위양성 결과가 포함되었을 가능성이 있다. Komukai¹⁷ 등은 명백하게 전이를 보이는 임파절의 수가 구강편평세포암종으로 수술 받은 환자의 생존율에 가장 큰 영향을 끼치는 것으로 평가하였고 명백한 전이를 보이지 않은 환자들과 4개 이하의 임파절 전이를 보이는 환자들 중에서 미세전이를 보이는 환자들의 생존율이 훨씬 낮았으나 5개 이상의 명백한 임파절 전이 소견이 있는 경우에는 미세전이의 존재 유무가 환자의 생존율에는 영향을 주지 못했기 때문에 전이된 임파절의 수가 4개 이하인 환자들만이 치료가 가능한 반면 5개 이상인 경우에는 광범위한 근치적 수술 이후에도 나쁜 예후를 나타내는 것으로 결론 내렸다. 따라서 위의 연구 결과를 통해 임파절의 미세전이는 치료가 가능한 구강편평세포암종 환자에서만 임상적 유용성을 가질 수 있다고 생각할 수도 있다. Natsugoe¹⁸ 등은 발현 전이는 없었지만 새롭게 미세전이가 발견된 환자에서도 발현 전이를 보이는 환자에서와 같이 나쁜 예후를 나타낸다고 보고하였다. 이는 Komukai 등의 연구 결과에서도 확인할 수 있었는데 발현 전이를 보이지는 않았지만 미세전이가 발견된 환자의 생존 곡선이 미세전이는 발견되지 않았지만 전이된 임파절의 수가 4개 이하인 환자의 생존 곡선과 유사하게 나타났다. 게다가 미세전이를 동반하며 전이된 임파절의 수가 4개 이하인 환자의 생존 곡선은 전이된 임파절의 수가 5개 이상인 환자의 생존 곡선과 유사하게 나타났다. 이런 결과를 보면 병리학적 임파절 병기 결정에 있어 미세전이

에 대한 존재 유무가 중요한 결정 요소가 될 수 있다. 경부 임파절의 전이여부는 예후와 생존율에 영향을 주며 따라서 환자의 수술 치료 계획에 영향을 주게 된다. 병리학적으로 경부 임파절이 N1인 환자는 일차 종양의 위치에 따라 전형적으로 경부 광청술이나 방사선 치료를 받는다. 게다가 병리학적으로 경부 임파절이 N2인 환자는 높은 재발율과 낮은 생존율을 보이는 것으로 알려져 있는데, 결과적으로 흔히 수술과 복합된 보조 치료를 받는다. 미세전이의 존재가 수술 후 방사선 치료를 결정하기 위한 임상적 판단에 영향을 주는지에 대해 알아보는 것이 유용할 수 있다. 임상적인 관점에서 보면 이번 실험의 결과는 특히 구강편평세포암종의 재발을 예방하기 위해 중요한데 그 이유는 예상했던 것보다 생존율이 낮게 나타났기 때문이다. 일반적으로 모든 구강편평세포암종 환자들이 수술 후 보조요법으로 화학치료를 받는 것은 아니지만 좀더 좋은 예후를 제공하기 위해 재발의 위험이 높은 환자에게는 보조적 치료를 처방하는 것이 이로울 것이다. 분자 유전학적인 진단은 재발을 일으킬 위험이 높은 환자를 확인하는 데 도움이 될 수 있다. 이번 연구 결과처럼 cytokeratin에 특이적인 RT-PCR 방법에 의해 검출된 미세전이가 구강편평세포암종 환자에서 재발의 위험을 예측하는 데 유효할 수 있다. 하지만 실제 임상에 적용하기 위해서는 임파절에서의 미세전이와 예후와의 인과관계에 대한 전향적 연구가 선행되어야 할 것이다. 앞으로 무작위 위도 선택된 대상자들에 대한 잘 조절된 실험을 통해 이 방법으로 정확한 병기 결정과 재발의 위험이 높다고 판단되는 환자들이 보조적 치료를 통해 도움이 될 수 있는지를 확인하는 연구가 필요할 것이다.

V. 결 론

임파절에 대한 미세전이를 면역조직화학적 방법과 RT-PCR 방법을 이용하여 다음과 같은 연구 결과를 얻었다.

1. 구강편평세포암종으로 수술을 받은 환자 71명의 임파절을 RT-PCR 방법으로 분석한 결과 43명(60%)에서 미세전이를 발견하였다. 따라서 임파절에서 발현전이를 보이지 않았던 27명의 환자들 가운데 17명에서 추가적으로 미세전이를 발견할 수 있었다. 또한 통계분석 결과 cytokeratin 5 mRNA 발현 여부가 환자의 생존율에 대한 유의한 인자가 될 수 있음을 확인하였다.
2. 구강편평세포암종으로 수술을 받은 환자 71명의 임파절을 면역조직화학적 방법으로 분석한 결과 26명(36%)에서 미세전이를 발견하였다. 따라서 임파절에서 발현전이를 보이지 않았던 27명의 환자들 가운데 6명에서 추가적으로 미세전이를 발견할 수 있었다. 그러나 면역조직화학적 방법에 의한 cytokeratin 검출 유무가 환자의 생존율에 대해 유의한 결과를 나타내지는 않았다.
3. 본 연구결과 구강편평세포암종의 근치수술을 시행 받은 환자에 있어 임파절 전이는 생존률에 대한 유의한 예후인자로 보여지며 명백한 전이여부에 대한 조직학적 검사와

cytokeratin에 대한 RT-PCR방법을 이용한 미세전이 검사 모두 술 후 정확한 병기 결정과 이에 따른 적절한 치료 계획을 제시하는 데 유용할 수 있음을 시사한다.

참고문헌

- Roder JD, Busch R, Stein HJ, Fink U, Siewert JR: Ratio of invaded to removed lymph nodes as a predictor of survival in squamous cell carcinoma of the oesophagus. *Br J Surg* 1994;81(3):410-3.
- Akiyama H, Tsurumaru M, Udagawa H, Kajiyama Y: Radical lymph node dissection for cancer of the thoracic esophagus. *Ann Surg* 1994;220(3):364-72; discussion 372-3.
- Skinner DB, Little AG, Ferguson MK, Soriano A, Staszak VM: Selection of operation for esophageal cancer based on staging. *Ann Surg* 1986;204(4):391-401.
- Matsubara T, Kaise T, Ishiguro M, Nakajima T: Better grading systems for evaluating the degree of lymph node invasion in cancer of the thoracic esophagus. *Surg Today*, 1994;24(6):500-5.
- Nishimaki T, Tanaka O, Suzuki T, Aizawa K, Hatakeyama K, Muto T: Patterns of lymphatic spread in thoracic esophageal cancer. *Cancer* 1994;74(1):4-11.
- Mori M, Mimori K, Inoue H, Barnard GF, Tsuji K, Nanbara S, Ueo H, Akiyoshi T: Detection of cancer micrometastases in lymph nodes by reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *Cancer Res* 1995;55(15):3417-20.
- Noguchi S, Hiratsuka M, Furukawa H, Aihara T, Kasugai T, Tamura S, Imaoka S, Koyama H, Iwanaga T: Detection of gastric cancer micrometastases in lymph nodes by amplification of keratin 19 mRNA with reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *Jpn J Cancer Res* 1996;87(6):650-4.
- 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. Comparison between MUC1 mRNA and keratin 19 mRNA amplification. *Am J Pathol* 1996;148(2):649-56.
- Futamura M, Takagi Y, Koumura H, Kida H, Tanemura H, Shimokawa K, Saji S: Spread of colorectal cancer micrometastases in regional lymph nodes by reverse transcriptase-polymerase chain reactions for carcinoembryonic antigen and cytokeratin 20. *J Surg Oncol* 1998;68(1):34-40.
- Miyake Y, Yamamoto H, Fujiwara Y, Ohue M, Sugita Y, Tomita N, Sekimoto M, Matsuura N, Shiozaki H, Monden M: Extensive micrometastases to lymph nodes as a marker for rapid recurrence of colorectal cancer: a study of lymphatic mapping. *Clin Cancer Res* 2001;7(5):1350-7.
- Okami J, Dohno K, Sakon M, Iwao K, Yamada T, Yamamoto H, Fujiwara Y, Nagano H, Umeshita K, Matsuura N, Nakamori S, Monden M: Genetic detection for micrometastasis in lymph node of biliary tract carcinoma. *Clin Cancer Res* 2000;6(6):2326-32.
- Enepekides DJ, Sultanem K, Nguyen C, Shenouda G, Black MJ, Rochon L: Occult cervical metastases: immunoperoxidase analysis of the pathologically negative neck. *Otolaryngol Head Neck Surg* 1999;120(5):713-7.
- Marchant FE, Lowry LD, Moffitt JJ, Sabbagh R: Current national trends in the posttreatment follow-up of patients with squamous cell carcinoma of the head and neck. *Am J Otolaryngol* 1993;14(2):88-93.
- Hayashi N, Ito I, Yanagisawa A, Kato Y, Nakamori S, Imaoka S, Watanabe H, Ogawa M, Nakamura Y: Genetic diagnosis of lymph-node metastasis in colorectal cancer. *Lancet*, 1995;345(8960):1257-9.
- Nakamori S, Kameyama M, Furukawa H, Takeda O, Sugai S, Imaoka S, Nakamura Y: Genetic detection of colorectal cancer cells in circulation and lymph nodes. *Dis Colon Rectum* 1997;40(10 Suppl):S29-36.
- Liefers GJ, Cleton-Jansen AM, van de Velde CJ, Hermans J, van Krieken JH, Cornelisse CJ, Tollenaar RA: Micrometastases and survival in stage II colorectal cancer. *N Engl J Med* 1998;339(4):223-8.
- Cutait R, Alves VA, Lopes LC, Cutait DE, Borges JL, Singer J, da Silva JH, Goffi FS: Restaging of colorectal cancer based on the identification of lymph node micrometastases through immunoperoxidase staining of CEA and cytokeratins. *Dis Colon Rectum* 1991;34(10):917-20.
- Greenson JK, Isenhardt CE, Rice R, Mojzisek C, Houchens D, Martin EW Jr: Identification of occult micrometastases in pericolic lymph nodes of Duke's B colorectal cancer patients using monoclonal antibodies against cytokeratin and CC49. Correlation with long-term survival. *Cancer* 1994;73(3):563-9.
- Nicholson, A.G., C.G. Marks, and M.G. Cook: Effect on lymph node status of triple levelling and immunohistochemistry with CAM 5.2 on node negative colorectal carcinomas. *Gut* 1994;35(10):1447-8.
- Jeffers MD, O'Dowd GM, Mulcahy H, Stagg M, O'Donoghue DP, Toner M: The prognostic significance of immunohistochemically detected lymph node micrometastases in colorectal carcinoma. *J Pathol* 1994;172(2):183-7.
- Adell G, Boeryd B, Franlund B, Sjudahl R, Hakansson L: Occurrence and prognostic importance of micrometastases in regional lymph nodes in Dukes' B colorectal carcinoma: an immunohistochemical study. *Eur J Surg* 1996;162(8):637-42.
- Broll R, Schauer V, Schimmelpennig H, Strik M, Woltmann A, Best R, Bruch HP, Duchrow M: Prognostic relevance of occult tumor cells in lymph nodes of colorectal carcinomas: an immunohistochemical study. *Dis Colon Rectum* 1997;40(12):1465-71.
- Oberg A, Stenling R, Tavelin B, Lindmark G: Are lymph node micrometastases of any clinical significance in Dukes Stages A and B colorectal cancer? *Dis Colon Rectum* 1998;41(10):1244-9.
- Isaka N, Nozue M, Doy M, Fukao K: Prognostic significance of perirectal lymph node micrometastases in Dukes' B rectal carcinoma: an immunohistochemical study by CAM5.2. *Clin Cancer Res* 1999; 5(8):2065-8.
- Yasuda K, Adachi Y, Shiraishi N, Yamaguchi K, Hirabayashi Y, Kitano S: Pattern of lymph node micrometastasis and prognosis of patients with colorectal cancer. *Ann Surg Oncol*, 2001;8(4):300-4.
- Woodcock-Mitchell J, Eichner R, Nelson WG, Sun TT: Immunolocalization of keratin polypeptides in human epidermis using monoclonal antibodies. *J Cell Biol* 1982;95(2 Pt 1):580-8.
- Ishida K, Katsuyama T, Sugiyama A, Kawasaki S: Immunohistochemical evaluation of lymph node micrometastases from gastric carcinomas. *Cancer* 1997;79(6):1069-76.
- Sasaki M, Watanabe H, Jass JR, Ajioka Y, Kobayashi M, Hatakeyama K: Immunoperoxidase staining for cytokeratins 8 and 18 is very sensitive for detection of occult node metastasis of colorectal cancer: a comparison with genetic analysis of K-ras. *Histopathology* 1998;32(3):199-208.
- Noura S, Yamamoto H, Ohnishi T, Masuda N, Matsumoto T, Takayama O, Fukunaga H, Miyake Y, Ikenaga M, Ikeda M, Sekimoto M, Matsuura N, Monden M: Comparative detection of lymph node micrometastases of stage II colorectal cancer by reverse transcriptase polymerase chain reaction and immunohistochemistry. *J Clin Oncol* 2002;20(20):4232-41.
- Kell MR, Winter DC, O'Sullivan GC, Shanahan F, Redmond HP: Biological behavior and clinical implications of micrometastases. *Br Surgery* 2000;87:1629-1639.
- Van den Brekel MW, Stel HV, van der Valk P, van der Waal I, Meyer CJ, Sonw GB: Micrometastases from squamous cell carcinoma in neck dissection specimens. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 1992;249:349-53.
- Ambrosch P, Kron M, Fischer G, Brinck U: Micrometastases in carcinoma of the upper aerodigestive tract: detection, risk of metastasizing, and prognostic value of depth of invasion. *Head Neck* 1995;17:473-9.
- Van den Brekel MW, van der Waal I, Meijer CJ, Freeman JL, Caselijns JA, Snow GB: The incidence of micrometastases in neck dissection specimens obtained from elective neck dissections. *Laryngoscope* 1996;106:987-91.
- Woolgar JA: Micrometastasis in oral/oropharyngeal squamous cell carcinoma. Incidence, histopathological features and clinical implica-

- tions. *Br J Oral Maxillofac Surg* 1999;37:181-6.
35. O' sullivan GC, Sheehan D, Clarke A, Stuart R, Kelly J, Kiely MD, Walsh T, Collins JK, Shanahan F: Micrometastases in esophagogastric cancer: high detection rate in resected rib segments. *Gastroenterology* 1999;116(3):543-8.
 36. Galea MH, Athanassiou E, Bell J, Dilks B, Robertson JF, Elston CW, Blamey RW, Ellis IO: Occult regional lymph node metastases from breast carcinoma: immunohistological detection with antibodies CAM 5.2 and NCRC-11. *J Pathol* 1991;165(3):221-7.
 37. McGuckin MA, Cummings MC, Walsh MD, Hohn BG, Bennett IC, Wright RG: Occult axillary node metastases in breast cancer: their detection and prognostic significance. *Br J Cancer* 1996;73(1):88-95.
 38. Glickman JN, Torres C, Wang HH, Turner JR, Shahsafaei A, Richards WG, Sugarbaker DJ, Odze RD: The prognostic significance of lymph node micrometastasis in patients with esophageal carcinoma. *Cancer* 1999;85(4):769-78.
 39. Izbicki JR, Hosch SB, Pichlmeier U, Rehders A, Busch C, Niendorf A, Passlick B, Broelsch CE, Pantel K: Prognostic value of immunohistochemically identifiable tumor cells in lymph nodes of patients with completely resected esophageal cancer. *N Engl J Med* 1997;337(17):1188-94.
 40. Natsugoe S, Mueller J, Stein HJ, Feith M, Hofler H, Siewert JR: Micrometastasis and tumor cell microinvolvement of lymph nodes from esophageal squamous cell carcinoma: frequency, associated tumor characteristics, and impact on prognosis. *Cancer* 1998;83(5):858-66.
 41. Gusterson, B: Are micrometastases clinically relevant? *Br J Hosp Med* 1992;47(4):247-8.
 42. Moll R, Franke WW, Schiller DL, Geiger B, Krepler R: The catalog of human cytokeratins: patterns of expression in normal epithelia, tumors and cultured cells. *Cell* 1982;31(1):11-24.
 43. Debus E, Moll R, Franke WW, Weber K, Osborn M: Immunohistochemical distinction of human carcinomas by cytokeratin typing with monoclonal antibodies. *Am J Pathol* 1984;114(1):121-30.
 44. Noura S, Yamamoto H, Miyake Y, Kim B, Takayama O, Seshimo I, Ikenaga M, Ikeda M, Sekimoto M, Matsuura N, Monden M: immunohistochemical assessment of localization and frequency of micrometastases in lymph nodes of colorectal cancer. *Clin Cancer Res* 2002;8(3):759-67.
 45. Fujiwara Y, Chi DD, Wang H, Keleman P, Morton DL, Turner R, Hoon DS: Plasma DNA microsatellites as tumor-specific markers and indicators of tumor progression in melanoma patients. *Cancer Res* 1999;59(7):1567-71.
 46. Chen X, Bonnefoi H, Diebold-Berger S, Lyautey J, Lederrey C, Faltin-Traub E, Stroun M, Anker P: Detecting tumor-related alterations in plasma or serum DNA of patients diagnosed with breast cancer. *Clin Cancer Res* 1999;5(9):2297-303.
 47. Komukai S, Nishimaki T, Suzuki T, Kanda T, Kuwabara S, Hatakeyama K: Significance of immunohistochemical nodal micrometastasis as a prognostic indicator in potentially curable oesophageal carcinoma. *Br J Surg* 2002;89(2):213-9.