

선단 흑자성 흑색종의 면역조직화학적 연구

단국대학교 피부과학교실, 연세대학교 피부과학교실*, 병리학교실**

김유찬 · 이민걸* · 조상호** · 최성환 · 박향준 · 신용우

=Abstract=

Immunohistochemical Study on Acral Lentiginous Melanoma

You Chan Kim, M.D., Min Geol Lee*, M.D., Sang-Ho Cho**, M.D.,
Sung Whan Choe, M.D. Hyang Joon Park, M.D., Yong Woo Cinn, M.D.

Department of Dermatology, Dankook University, College of Medicine, Cheonan,
Department of Dermatology* and Pathology**, Yonsei University, Seoul, Korea

Background : Although clinicopathologic characteristics of acral lentiginous melanoma (ALM) is well established, immunohistochemical study on ALM has rarely been reported.

Objective : Our purpose is to evaluate the usefulness of several immune markers in the diagnosis of ALM.

Methods : An immunohistochemical study was performed on paraffin sections of 20 ALMs using S-100 protein, HMB-45, vimentin, epithelial membrane antigen (EMA), and CAM 5.2.

Results :

1. Nineteen (95%) and 16 (80%) out of 20 ALM showed reactivity with S-100 protein and HMB-45, respectively.
2. Melanin bleaching was useful for diagnosing heavily pigmented ALM using both S-100 protein and HMB-45.
3. The immunoreactivity of S-100 protein and HMB-45 did not correlate with tumor thickness or level of invasion of ALM. The intensity of HMB-45 correlated well with the melanin content.
4. One and 2 out of 20 cases stained focally with EMA and CAM5.2 respectively, but these cases stained also with HMB-45 and/or S-100 protein.

Conclusion :

S-100 protein and HMB-45 were relatively sensitive markers for diagnosing ALM. Despite the occasional positivity for the epithelial markers in ALM, all epithelial marker-positive cases stained also with HMB-45 and/or S-100 protein. Therefore, S-100 protein and HMB-45 are very useful markers for diagnosing ALM. (Korean J Dermatol 2002;40(6) : 620~625)

Key Words : Acral lentiginous melanoma, HMB-45, S-100 protein

서 론

악성 흑색종을 조직학적으로 유사한 다른 종양과 감별할 때 면역조직화학 염색이 매우 유용하게 사용된다. 하

지만 악성 흑색종의 아형에 따라 면역조직화학 소견이 다를 수 있는 것으로 보고되었다^{1,2}. 우리나라에서 가장 흔한 아형인 선단 흑자성 흑색종(acral lentiginous melanoma : ALM)에 관한 임상 및 병리조직학적 연구는 활발히 이루어져 왔으나³⁻⁵, 면역조직화학적 연구는 거의 이루어진 바 없다⁶. 저자들은 ALM으로 진단 받은 20예에 대하여 악성 흑색종의 진단에 일반적으로 사용되는 면역표지자들의 발현양상을 알아보았다.

<접수:2002년 4월 13일>

*이 연구는 2000년도 대한피부과학회 연구비에 의해 이루어졌음.

교신저자 : 김유찬

주소 : 330-714 충남 천안시 안서동 16-5

단국대학교 의과대학 피부과학교실

전화 : (041)550-3968 Fax : (041)562-6542

E-mail : kyccc@anseo.dankook.ac.kr

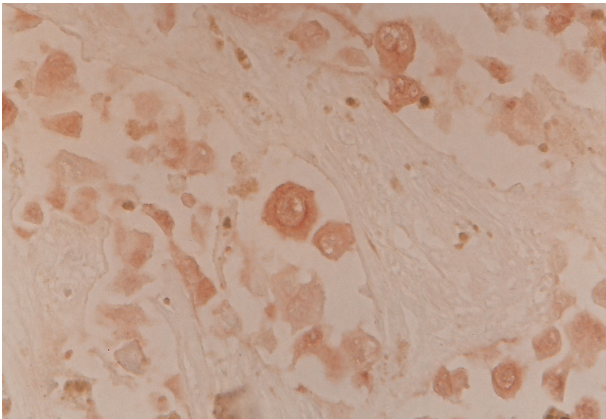


Fig. 1. Nuclear and cytoplasmic staining with S-100 protein in tumor cells of acral lentiginous melanoma(×400).

4 μ m의 두께로 절편을 만들어 섭씨 60 $^{\circ}$ C 오븐에서 1시간 건조하였다. 면역염색은 LSAB(Labelled streptavidin-biotin)를 이용한 ABC method를 사용하였다. 염색의 전 처치로 탈 파라핀을 위해 xylene에 5분씩 4회 담그었으며, 재수화(rehydration)를 위해 100% 알코올에 5분씩 2회, 95% 알코올에 5분씩 2회 담근 후, 증류수에 5분간 담그었다(단, EMA와 CAM5.2는 unmasking을 위해 0.01M sodium citrate buffer, pH6.0을 이용하였다.) 수돗물로 1회 5분 동안 세척한 후 내재성 peroxidase activity를 제거하기 위해 3% 과산화수소수로 15분간 담근 후, 수돗물, phosphate buffered saline(PBS)로 각각 5분씩 세척하고 Shandon immunostaining system을 장착하였다. 다시 PBS로 5분간 세척한 후 조직의 비특이적 결합을 막기 위해 혈청으로 15분간 blocking

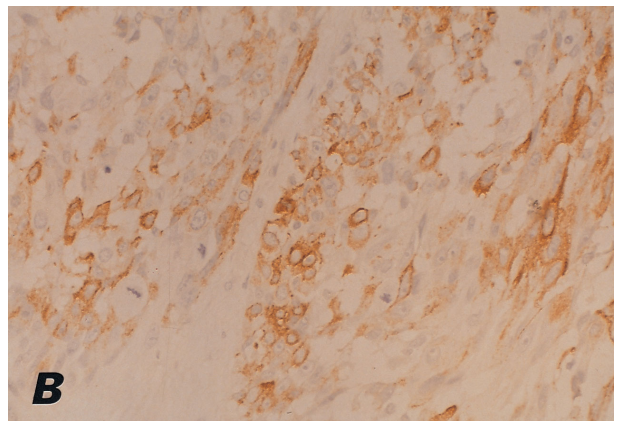
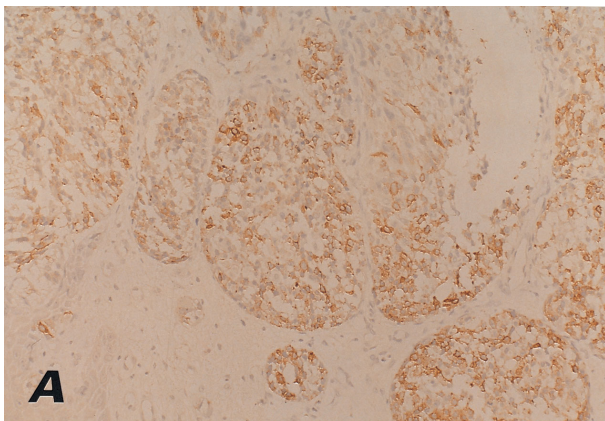


Fig. 2. HMB-45 staining of an acral lentiginous melanoma(A, ×40). Strong membranocyttoplasmic staining with HMB-45 in tumor cells(B, ×100).

연구대상 및 방법

1. 연구대상

1990년에서 1998년까지 연세대학교 신촌세브란스병원에서 선단흑자성 흑색종으로 진단한 20예를 임의로 선택하였다.

2. 연구방법

조직표본에 대해 일반 염색과 면역조직화학 염색을 시행하였다. 일차 항체로는 S-100단백(Biogenex, San Jose, CA, USA, 1:80), HMB-45(DAKO, Carpinteria, CA, USA, 1:100), vimentin(Biogenx, 1:200), epithelial membrane antigen(EMA)(DAKO, 1:50), CAM5.2(Becton-Dickinson, San Jose, CA, USA, predilution)를 사용하였다. 조직의 고정액으로 10% phosphate buffered formalin을 사용하였으며 일정한 조직치리를 거친 후 파라핀에 포매하였다. 박절기를 이용하여

한 후 적당 비율로 희석된 항체들을 1시간 부양하였다. PBS로 5분간 세척후 이차항체를 30분간 부양하고, PBS로 5분간 세척후 streptavidin-peroxidase complex를 30분간 부양하였다. 발색제로는 AEC(3-amino-9-ethylcarbazole)을 사용하였다. 다시 PBS로 5분간 세척한 후 Hematoxylin으로 대조염색을 3분간 시행한 후 수돗물로 5분간 세척하고 봉입하였다. 멜라닌 색소침착이 현저하면서 S-100 단백질 또는 HMB-45에 음성소견을 보인 예에 대해 멜라닌 색소의 탈색을 시행하였다. Acid alcohol 탈염과정을 거친 후 색소를 제거하기 위해 각 절편들을 0.25% 과망간산 칼륨 용액에 담그고 증류수로 세척하였다. 그 후 각각 필요에 따라 항 S-100 단백질 항체와 HMB-45를 이용하여 재 염색을 시행하였다.

3. 결과판정

평가의 기준으로 전체 종양세포에 대한 면역염색에 양

Table 1. Histologic and immunohistochemical findings of 20 cases of ALM

Case	Tumor thickness (Breslow)	Invasion level	Pigment	S-100 protein	HMB-45	Vimentin	EMA	CAM5.2
1	0.4mm (1)	1	2	1 *0	1	2	0	0
2	0.6mm (1)	1	2	2	1	1	0	0
3	1.1mm (2)	2	2	1	2	2	0	0
4	1.1mm (2)	3	2	2	2	2	0	0
5	1.3mm (2)	4	1	2	2	2	0	0
6	1.6mm (3)	4	0	1	1	2	0	0
7	1.8mm (3)	3	2	2 *0	2 *0	2	0	0
8	2.0mm (3)	4	0	0	1	2	1	0
9	2.4mm (3)	3	1	2	1	2	0	0
10	2.4mm (3)	4	0	1	0	1	0	0
11	2.5mm (3)	3	2	2	2	2	0	0
12	2.5mm (3)	4	2	1	1	1	0	0
13	2.5mm (3)	4	2	2	1	2	0	0
14	2.9mm (3)	4	1	1	0	2	0	0
15	3.4mm (3)	4	0	1	0	1	0	0
16	3.9mm (4)	5	0	2	1	2	0	0
17	6.1mm (4)	4	1	1	1	2	0	1
18	>6.5mm(4)	>5	0	1	0	2	0	0
19	7.5mm (4)	5	0	2	1	1	0	0
20	8.2mm (4)	5	1	2	1	2	0	1

The tumor thickness by Breslow was scored as follows; 1, <0.76mm; 2, 0.76mm to 1.69mm; 3, 1.7mm to 3.6mm; 4, >3.6mm. The invasion level of Clark was scored as follows; 1, The melanoma cells are confined to epidermis; 2, There is extension into papillary dermis; 3, Tumor cells fill papillary dermis; 4, There is extension into reticular dermis; 5, Tumor cells invade subcutaneous fat. The immunostaining was scored as follows; 0, <5%; 1, 5% to 50%; 2, >50%; EMA, epithelial membrane antigen; *, immunostaining results before melanin bleaching.

성을 보이는 종양세포들의 백분율을 점수화하여 5% 미만일 때 0점, 5-50%일 때 1점, 50%이상일 때 2점으로 하였다. 종양세포들의 색소침착 정도는 색소침착이 없을 때 0점, 약간의 색소침착이 있을 때 1점, 심한 색소침착이 있을 때 2점으로 하였다. 종양의 두께와 침습된 정도는 Breslow법⁷과 Clark법⁸을 따랐다. Breslow법에 의한 종양의 두께는 0.76mm 미만일 때 1점, 0.76-1.69mm일 때 2점, 1.70-3.6mm일 때 3점, 3.61mm이상일 때 4점으로 하였다. Clark법에 의한 종양의 침습정도는 종양이 표피내 국한된 경우 1점, 유두진피를 침습한 경우 2점, 유두진피 전체를 침습한 경우 3점, 망상진피를 침습한 경우 4점, 피하지방층을 침습한 경우를 5점으로 하였다.

4. 통계학적 분석

S-100 단백질의 발현과 종양의 두께 또는 침습정도와의 연관성은 Spearman의 correlation coefficient(SAS version, 6.12)를 이용하여 분석하였다. HMB-45의 연관성도 같은 방법을 이용하였다. P값이 0.05 미만일 때를 통계학적으로 의

의가 있다고 보았다.

결 과

1. 임상 및 병리조직학적 소견

20예의 선단흑자성 흑색종은 남자 14예, 여자 6예이었으며(Table 1), 진단 당시 환자의 평균연령은 65세이었다. 발생부위는 발꿈치 9예, 발바닥 7예, 발가락 1예, 엄지손가락 3예이었다. 병리조직학적 소견상 13예에서 색소침착이 발견되었으며 종양세포의 형태학적 분류로는 주로 원형 세포로 구성된 예가 11예, 주로 방추상 세포로 구성된 예가 4예, 혼합되어 있던 예가 5예이었다.

2. 면역조직화학적 소견

S-100 단백질은 20예중 17예에서 양성이었다(Fig. 1), HMB-45는 15예에서 양성이었다(Fig. 2). 심한 색소침착을 보이면서 S-100단백과 HMB-45에 음성이었던 3예에 대해 멜라닌 색소의 탈색을 시행한 후 면역염색을 다시 시행하였을 때 모든 예에서 양성으로의 전환을 나타내었다. 그

결과 S-100단백에서는 19예(95%)에서 양성이었으며 HMB-45에 대해서는 16예(80%)에서 양성을 나타내었다. Vimentin은 모든 예에 대해 양성이었으며, 이중 16예에서 강양성이었다. EMA와 CAM5.2는 각각 1예와 2예에서만 양성이었다. S-100단백과 HMB-45의 발현정도와 종양의 두께 또는 침습정도와 관계에 대해서는 통계학적으로 유의 있는 연관성을 나타내지 않았다. HMB-45의 발현정도와 멜라닌 색소침착과는 비례하였으나($P= 0.003$), S-100 단백질의 발현정도와 멜라닌 색소침착과는 연관관계가 없었다.

고 찰

악성흑색종은 멜라닌 세포 기원의 악성종양으로 주요 4가지 아형으로는 악성 흑자 흑색종(lentigo maligna melanoma), 표재 확장성 흑색종(superficial spreading melanoma), 결절성 흑색종(nodular melanoma), ALM 등이 있다⁹. ALM은 손과 발에 주로 발생하며 특히 동양인에게서 발생빈도가 높다⁹. 악성 흑색종의 진단을 위한 면역조직화학 검사로서 가장 많이 사용하는 항체로는 HMB-45와 S-100 단백질이 있다¹⁰. HMB-45는 Premelanosome의 구성성분인 10Kd의 세포질 당단백에 대한 항체로서 멜라닌 세포성 병변에 반응한다. 악성흑색종에 대해 높은 감수성 및 비교적 높은 특이도를 보여, 약 93%의 악성흑색종에 양성을 보이는 것으로 보고되었다^{10,11}. 하지만 후천성 모반의 진피부위와 결합조직형성 흑색종(desmoplastic malignant melanoma)은 HMB-45에 대해 음성이다¹⁰. 본 연구에서는 ALM에 대한 HMB-45의 민감도가 비교적 낮아 20예중 16예(80%)에서 양성이었다. HMB-45에 음성이었던 4예는 모두 색소침착이 관찰되지 않은 예들이었다. 하지만 색소침착을 보이지 않았던 ALM 7예중 나머지 3예는 부분적으로 HMB-45에 양성이었다. 따라서 HMB-45에 음성인 ALM은 모두 색소침착이 없었지만 색소침착이 없었던 ALM 모두가 HMB-45에 음성은 아닌 것을 알 수 있었다. 증례11은 ALM의 소견과 함께 결합조직형성 흑색종의 소견을 보이고 있었는데 표피와 진피상층부의 일부 종양세포는 HMB-45에 양성이었으나 진피에 위치한 대부분의 방추상 세포는 HMB-45에 음성이었다. 이것은 Carlson 등¹²의 연구결과와 일치하는 소견이었다.

본 연구에서 ALM은 S-100 단백질에 대해 95%의 양성율을 보였는데 이것은 Orchard 등¹³의 연구에서 나타난 95% 이상의 양성율과 비슷하였다. 그러므로 본 연구결과로 볼 때, ALM을 진단함에 있어서 S-100 단백질(95%)이 HMB-45보다 더 민감함을 알 수 있었다. Wick 등¹¹도 67개의 악성흑색종과 133개의 악성 흑색종 이외의 피부종양을 대상으로 S-100단백과 HMB-45의 면역조직화학 염색을 시행한 결과 악성흑색종에 대한 감수성은 S-100단백 (100%)

이 HMB-45 (93%)보다 높았으며 특이성은 HMB-45 (100%)가 S-100단백 (87%)보다 우수하였다고 보고한 바 있다.

Nakajima 등¹⁴은 멜라닌의 함량과 S-100 단백질에 대한 면역조직화학 염색의 정도는 반비례하였고 이것은 무색소성 흑색종의 진단에 S-100 단백질이 유용하다는 것을 뜻한다고 보고하였다. 그러나 본 연구에서는 색소침착이 없었던 ALM 대부분에서 S-100 단백질이 비록 양성이었지만 그 염색정도와 멜라닌 색소침착 정도와는 통계학적으로 유의한 상관관계를 보이지 않았다. 즉, 중간정도의 색소침착을 보였던 ALM에서 S-100 단백질에 강양성을 보이기도 하였다.

HMB-45와 S-100 단백질은 멜라닌 탈색에 의해 면역염색의 정도가 변하지 않는 것으로 알려져 있다^{15,16}. 본 연구에서 조직내에 과색소침착을 보이면서 S-100 단백질 또는 HMB-45에 음성이었던 예들이 멜라닌 탈색후에는 이들 면역염색에 대해 양성을 나타내었다. 따라서 멜라닌 탈색 이전의 음성소견은 색소침착에 의한 물리적인 차폐에 의한 것으로 생각된다. Mirecka 등¹⁷은 피부와 점막부위에 발생한 악성흑색종 97예를 대상으로 한 연구에서 S-100 단백질의 염색정도와 환자들의 생존과 반비례한다고 보고하였다. 그러나 본 연구에서는 악성흑색종의 예후인자인 종양의 두께와 침습정도는 S-100 단백질이나 HMB-45의 염색정도와 연관성을 나타내지 않았다.

Vimentin은 섬유모세포, 내피세포, 평활근 세포, 멜라닌 세포, 연골, 지방세포, 대식세포 등의 구성성분의 하나로써 이들 세포에서 유래한 양성 또는 악성종양에 양성이다¹⁸. 일부의 상피세포 종양에서도 양성을 보여 특이성이 떨어지지만 중간엽(mesenchymal) 또는 멜라닌 색소성 분화를 보이는 병변을 진단시 다른 표지자와 함께 사용하면 유용하다¹⁸. 본 연구에서는 20예의 ALM 모두에서 양성이었다.

EMA는 상피종양들과 한선, 피지선 등에 양성소견을 나타내는 상피세포성 표지자로서 소수의 악성흑색종에서 양성이며 특히 파라핀 포매된 조직에서의 반응은 드물다¹⁹. 본 연구에서도 20예의 ALM중 1예에서만 양성이었다.

CAM5.2는 한선에 양성이나 정상 표피에 음성을 보이는 저분자량의 세포각질(cytokeratin)로 또 하나의 상피세포성 표지자이다¹⁸. Leader 등²⁰은 28예의 악성흑색종 모두가 CAM 5.2에 음성소견을 보여 중간엽 세포기원의 종양과 상피종양을 감별시 유용하게 사용될 수 있다고 하였으나, 그 후 다른 연구자들에 의해 악성흑색종에도 드물게 양성소견을 보이는 것으로 알려졌다¹⁹. 본 연구에서는 20예의 ALM중 2예에서만 약하게 염색되었으며 나머지 18예는 음성이었다.

악성흑색종은 드물게 상피세포성 표지자에 양성이지만 파라핀 조직에서의 양성율은 낮으며 염색정도도 대개 악

한 것으로 알려져 있다¹⁹. 본 연구에서 EMA에 1예, CAM5.2에 2예에서 양성되었는데 EMA에 양성되었던 1예는 S-100 단백질에 음성이었으나 HMB-45와 vimentin에 양성이었으며 CAM5.2에 양성되었던 2예는 S-100 단백질, HMB-45, vimentin 모두에 양성이었다. 그러므로 ALM이 EMA나 CAM5.2 같은 상피세포성 표지자에 드물게 양성을 보이더라도 S-100 단백질, HMB-45, vimentin 같은 다른 면역표지자를 함께 사용하면 ALM 진단에 별 문제가 없으리라 생각한다.

결 론

1. ALM을 진단함에 있어서 S-100 단백질이 95%의 양성율을 보여 80%의 양성율을 보인 HMB-45보다 더 민감하였다.
 2. 심한 색소침착을 보이는 ALM을 진단을 위해 S-100 단백질 및 HMB-45 염색시 멜라닌 탈염색법이 유용하였다.
 3. HMB-45의 면역염색 정도는 S-100단백과 달리 멜라닌 색소침착과 상관관계가 있었다.
 4. ALM 20예중 EMA에는 1예, CAM5.2에는 2예에서 양성이었으나 이 예들은 모두 HMB-45나 S-100단백에 양성이었다.
- 이상의 결과로 볼 때, ALM을 진단할 때 S-100 단백질과 HMB-45이 매우 유용하게 사용할 수 있는 표지자라는 것을 알 수 있었다.

참 고 문 헌

1. Argenyi ZB, Cain C, Bromley C, Nguyen AV, Abraham AA, Kerschmann R, et al. S-100 protein-negative malignant melanoma : Fact or fiction? A light-microscopic and immunohistochemical study. *Am J Dermatopathol* 1994; 16:233-240
2. Kageshita T, Hamby CV, Hirai S, Kimura T, Ono T, Ferrone S. Differential clinical significance of aVb3 expression in primary lesions of acral lentiginous melanoma and of other melanoma histotypes. *Int J Cancer* 2000;89: 153-159
3. Seiji M, Takematsu H, Hosokawa M, Obata M, Tomita Y, Kato T, et al. Acral Melanoma in Japan. *J Invest Dermatol* 1983;80:56s-60s.
4. 조광현, 조미경, 이유신, 함의근. 선단 흑색종의 임상 및 병리조직학적 고찰 대피지. 1989;27:383-394
5. Paladugu RR, Winberg CD, Yonemoto RH. Acral lentiginous melanoma. A clinicopathologic study of 36 patients. *Cancer* 1983;52:161-168
6. 김규환, 조광현, 함의근. HMB-45 단세포군 항체와

S-100 단백질에 대한 항체를 이용한 악성흑색종의 면역조직화학 염색. *대피지* 1990;28:730-736

7. Breslow A. Thickness, cross-sectional areas, and depth of invasion in the prognosis of cutaneous melanoma. *Ann Surg* 1970;172:902-908
8. Clark WH, Elder DE, Guerry D 4th, Braitman LE, Trock BJ, Schultz D, et al. Model predicting survival in stage I melanoma based on tumor progression. *J Natl Cancer Inst* 1989;81:1893-1904
9. Su WPD. Malignant melanoma : Basic approach to clinicopathologic correlation. *Mayo Clin Proc* 1997;72:267-272
10. Skeleton HG 3rd, Smith KJ, Barrett TL, Lupton GP, Graham JH. HMB-45 staining in benign and malignant melanocytic lesions : A reflection of cellular activation. *Am J Dermatopathol* 1991;13:543-550
11. Wick MR, Swanson PE, Rocamora A. Recognition of malignant melanoma by monoclonal antibody HMB-45. An immunohistochemical study of 200 paraffin-embedded cutaneous tumors. *J Cutan Pathol* 1988;15:201-207
12. Carlson JA, Dickersin GR, Sober A, et al. Desmoplastic neurotropic melanoma : a clinicopathologic analysis of 28 cases. *Cancer* 1995;75:478-494
13. Orchard G, Wilson Jones E. Immunocytochemistry in the diagnosis of malignant melanoma. *Br J Biomed Sci* 1994 ;51:44-56
14. Nakajima T, Watanabe S, Sato Y, Kameya T, Shimosato Y, Ishihara K. Immunohistochemical demonstration of S-100 protein in malignant melanoma and pigmented nevus, and its diagnostic application. *Cancer* 1982;50:912-918
15. Orchard GE, Calonje E. The effect of melanin bleaching on immunohistochemical staining in heavily pigmented melanocytic neoplasms. *Am J Dermatopathol* 1998;20:357-361
16. Foss AJE, Alexander RA, Jefferies EW, Lightman S. Immunohistochemical techniques : the effect of melanin bleaching. *Br J Biomed Sci* 1995;52:22-25
17. Mirecka J, Korabiowska M, Schauer A. Comparative distribution of S-100 protein and antigen HMB-45 in various types of melanomas and naevi. *Pol J Pathol* 1995;46:167-172
18. Wallace ML, Smoller BR. Immunohistochemistry in diagnostic dermatopathology. *J Am Acad Dermatol* 1996; 34:163-183
19. Ben-Izhak O, Stark P, Levy R, Bergman R, Lichtig C.

- Epithelial markers in malignant melanoma. A study of primary lesions and their metastases. *Am J Dermatopathol* 1994;16:241-246
20. Leader M, Patel J, Makin C, Henly K. Analysis of the sensitivity and specificity of the cytokeratin marker CAM5.2 for epithelial tumor. Results of a study of 203 sarcomas, 50 carcinomas, and 28 malignant melanomas. *Histopathology* 1986;10:1035-1324