

## 유두상 갑상선암종의 종양맥관형성도와 상피분화도

연세대학교 의과대학 <sup>1</sup>외과학교실, <sup>2</sup>병리학교실

박정수<sup>1</sup> · 정응윤<sup>1</sup> · 서진학<sup>1</sup> · 김호근<sup>2</sup>

### An Immunohistochemical Study of Tumor Angiogenesis and EMA Reactivity in Papillary Thyroid Carcinoma

Cheong Soo Park, M.D.<sup>1</sup>, Woong Youn Chung, M.D.<sup>1</sup>  
Jin Hak Suh, M.D.<sup>1</sup> and Ho Geun Kim, M.D.<sup>2</sup>

Department of <sup>1</sup>Surgery and <sup>2</sup>Pathology, Yonsei University College of Medicine

**Purpose:** This study was carried out to investigate the correlation among tumor angiogenic activity, epithelial membrane antigen(EMA) reactivity and various clinicopathologic parameters. We also evaluated the validity of both as an independent prognostic factor in patients with papillary thyroid carcinoma.

**Materials & Methods:** We studied 120 patients out of 727 patients with papillary thyroid carcinoma who underwent thyroidectomy at our institute from January 1986 to December 1994. The age of the patients ranged from 14 to 80 years with a mean of 48.2 years. There were 24 males and 96 females(M:F=1:4). The paraffin embedded tissues of these patients were stained with the monoclonal antibodies against factor VIII related antigen, antigen CD34 to highlight microvessels and against EMA to show immunoreactivity. We measured microvessel density(MVD) in the area of highest vascular density at 200 times of magnification(0.785 mm<sup>2</sup> per field). The positive cells for EMA were counted as percentages of the whole cell population and the degree of reaction was rated on a five-point scale.

**Results:** Mean MVDs and EMA reactivities by location of tissue per field were 64.8 ± 18.9, 1.97 ± 0.74, in the center of the tumor; 41.3 ± 15.3, 1.55 ± 0.68 in the periphery of tumor; and 22.1 ± 14.4, 1.09 ± 0.75 in normal thyroid tissue, respectively. In relation to TNM stage, only the MVDs of patients with stage IV disease were higher than those of other disease stages with statistical significance (p<.05). In relation to DeGroot stage, the MVDs of patients with stage IV disease was also higher than others with statistical significance (p<.005). There were no significant differences in MVD and EMA reactivity between the two groups of low risk (n=77) and high risk (n=43) by AMES scale. The MVDs and EMA reactivities of patients with local recurrence (n=23) and death (n=7)

---

책임저자 : 박정수, 서울시 신촌동 134, 연세대학교 의과대학 외과학교실, 120-752

본 논문은 1996년도 연세대학교 학술연구비 보조로 이루어졌음.

본 논문의 요지는 1997년 3월 5일 제 11 차 아시아 외과 학술대회(홍콩)에서 구연발표되었음.

접수일 : 1997년 4월 7일, 게재승인일 : 1997년 6월 13일

during the follow-up period had no statistical significance against those patients without recurrence and living patients.

**Conclusion:** Tumor angiogenic activity and EMA reactivity in papillary thyroid carcinoma did not correlate with TNM stage, DeGroot stage, AMES score, local recurrence, and patient death. However, MVD was significantly higher in patients with distant metastasis and may be useful in predicting the distant metastasis in papillary thyroid carcinoma.

**Key Words:** Papillary thyroid carcinoma, Tumor angiogenic activity, EMA reactivity, Prognostic factor

## 서 론

갑상선의 악성종양 중 가장 많은 빈도를 차지하는 유두상암종은 대부분이 성장이 느리며 예후가 좋은 것으로 알려져 있다. 그러나 동일한 병기 및 분화도에도 불구하고 수술 후 국소재발 및 원격전이가 되는 경우를 저위험군에서도 상당수 관찰할 수 있는데, 이를 예측할 수 있는 위험인자를 찾기 위해 노력해 왔다.

최근 종양의 미세혈관형성(angiogenesis) 정도가 종양의 성장 및 전이와 밀접한 관계가 있다는 것이 밝혀짐에 따라, 종양에서의 혈관형성이 전이 과정에 관여할 뿐만 아니라 종양세포의 생존과 성장에 필수적이며 신생혈관의 생성과 종양세포의 성장속도는 밀접한 것으로 알려져 있다(1~4). 또한, 혈관형성은 신생혈관의 증식을 자극하는 인자들과 이를 억제하는 인자의 평형에 의해 조절이 되는데, 종양에서는 자극인자의 분비가 증가되고 억제인자의 분비가 감소하여 혈관형성이 활발하게 일어난다고 알려져 있다(5~6). 현재까지 여러 암종에서 종양의 미세혈관형성 정도가 암종의 진행과 연관관계가 있으며 독립적인 예후 인자가 될 수 있다는 연구결과가 보고되고 있으나, 현재까지 갑상선암종에서의 종양맥관형성에 대한 연구는 극히 드문 실정이다.

또한 갑상선암종에서 EMA(Epithelial membrane antigen)의 발현도를 측정함으로써 종양의 상피분화도와 병기 및 예후와의 상관관계를 밝히려는

연구가 진행되고 있으며, EMA의 발현도는 정상 세포보다 종양세포에서 높고 원격전이의 위험인자로서 유용하다고 보고되고 있다(7~9).

이에 저자들은 면역조직화학염색을 이용하여 유두상 갑상선암종의 맥관형성도 및 상피분화도를 측정하여 각 병기 및 환자의 예후와의 상관관계를 분석함으로써 새로운 위험인자로 유용한가를 알아보고자 본 연구를 시행하였다.

## 대상 및 방법

### 1) 연구재료

1986년 1월부터 1994년 12월까지 본원에서 유두상 갑상선암종으로 수술을 시행받은 727예중, 1992년에 수정된 American Joint Committee on Cancer의 TNM 병기(10) 및 DeGroot 병기(11)와 AMES scoring system(12)에 따른 위험군, 추적관찰기간 중 국소재발 및 사망한 경우를 고려하여 선택된 120예를 대상으로 하였다.

### 2) 대상환자의 임상 및 병리학적 소견

남녀비는 1:4로 각각 24명(20.0%), 96명(80.0%)이었으며 평균연령은 48.2세(14~80세)이었다. TNM 병기상 stage I은 50예(41.7%), stage II는 21예(17.5%), stage III은 40예(33.3%), stage IV는 9예(7.5%)이었고, DeGroot 병기상 stage I은 30예(25.0%), stage II는 47예(39.2%), stage III은 31예(25.8%), stage IV는 12예(10.0%)이었으며, AMES scoring system상 저위험군은 77예(64.2%), 고위험

군은 43예(35.8%)이었다.

평균 추적기간은 86개월(24~132개월)이었으며, 추적기간동안 국소재발 및 사망은 각각 23예(19.2%), 7예(5.8%)이었다.

### 3) 광학현미경적 검색

10% 중성 포르말린에 고정후 파라핀에 포매하여 보관된 블록을 연속 절편하여 hematoxylin-eosin 염색을 하여 세포밀도, 혈관형성정도, 종양내 괴사여부 등을 관찰하여면역조직화학염색에 적합한지를 알아보았으며, 석회침착이 많은 sclerosing carcinoma와 조직괴사가 심한경우를 제외시켰다.

### 4) 면역조직화학염색법

(1) **종양맥관형성도**: 원발병소 종양조직 및 인접 정상조직을 포함하는 파라핀에 포매된 조직을 대상으로 factor VIII 관련항원에 대한 단클론 항체(DAKO Corporation, Glostrup, Denmark)와 CD34 항원에 대한 단클론항체(Immunotech, MA, USA,) 및 LSAB Kit(DAKO Corporation, Carpinteria, CA, USA)을 이용한 면역조직화학염색을 시행하였다.

파라핀에 포매된 조직을 3 um 두께로 절단한 후 탈파라핀과 함수과정을 거쳐 3%과 산화수소수(LSAB kit)로 세포내에 존재하는 페록시다제 활성도를 제거하였다. 조직항 원이 잘 노출될 수 있도록 Pepsin용액(Bimoda Corporation, Foster, CA, USA)을 조직 위에 4분간 부치하였다. 조직항원과 항체간의 반응에 있어서 비특이적 결합을 억제 하기 위하여 Tissue conditioner용액(LSAB kit)을 4분간 부치한 후, CD34 염색은 citric acid buffer(pH 6.0)에 침수시킨체로 10분간 microwave에 처리한 후 실온에서 1:100 으로 희석된 항체와 함께 약 60분간 반응시킨 후 4°C에서 12시간 정도 부치하였다. Factor VIII 염색은 microwave에 처리하지 않고 Tris-Hcl buffer(DAKO Corporation, Carpinteria, CA, USA)에 항체를 1 : 40으로 희석하여 약 60분간 반응시킨 후 4°C에서 12시간 정도 부치하였다. Link antibody(LSAB kit)를 조직위에 5분간 부치한 후 Streptavidine과 Tris/Hcl buffer

(LSAB Kit)를 60 : 1로 희석하여 4분간 부 치하였다. 페록시다제의 역가를 증가시키기 위해 페록시다제 inhancer(Biomedica Corporation, Foster, CA, USA)처리 후 발색제로 AEC Chromogen(3-Amino-9-ethylcarbazole)을 10분간 부치한 후 Hematoxylin으로 대조 염색을 시행하였다. 염색의 전 과정에 서 완충액은 10X immunoassay buffer(Biomedica Corporation, Foster, CA, USA)을 사용하였다.

(2) **상피분화도**: Epithelial membrane antigen에 대한 단클론 항체(M613; DAKOPATTS, Glostrup, Denmark) 및 ABC Kit를 이용한 면역조직화학염색을 시행하였다.

파라핀에 포매된 조직을 3 um 두께로 절단한 후 탈파라핀과정을 거친 후 0.3% hydrogen peroxide가 함유된 methanol 용액에서 30분간 실온에서 처치하여 세포내에 존재하는 페록시다제 활성도를 제거하였다. Phosphate-buffer saline(pH 7.4)으로 세척한 후 diluted normal horse serum(Vectastain ABC Kit PK-4002, Vector Labs, Burlingame, CA)을 20분간 부치하였다. Epithelial membrane antigen에 대한 단클론 항체(M613; DAKOPATTS, Glostrup, Denmark)을 1:100으로 희석하여 반응시킨 후 4°C에서 12시간 동안 부치하였다. Phosphate-buffer saline으로 세척한 후 희석된 biotinylated secondary antibody를 30분간 부치하였다. Phosphate-buffer saline으로 세척한 후 avidine-biotin-peroxidase complex를 이용하여 30분간 부치하였다. 100 ml의 Tri-Hcl buffer(pH 7.4)에 20 mg의 diaminobenzidine이 함유된 diamino-benzidine 용액과 0.01% hydrogen peroxidase으로 처리하여 갈색으로 발색시켰다. Methylene blue를 이용하여 대조염색을 시행하였다.

### 5) 검사판독

(1) **종양맥관형성도**: 환자의 임상적 특징에 대한 사전 지식이 없는 2명의 의사가 각 조직절편 중 원발병 소의 종양조직 및 인접 정상조직에서 염색된 미세혈관이 가장 많은 부위를 저배율(40 배 or 100배)의 현미경 시야에서 찾아 2명의 의사

가 동의한 후 그 부위를 200배(0.785 mm<sup>2</sup> per field) 시야에서 혈관수를 측정하여 미세혈관밀도(microvessel density, MVD)로 표현하고 혈관 중에서 6~8개 이상의 적혈구가 들어갈만한 큰 직경의 혈관, 두꺼운 근층이 있는 혈관, 괴사 염증 및 경화가 있는 부위는 구복반응으로 인한 이차적인 혈관의 증식으로 높은치를 보일 수 있으므로 제외하였다.

(2) 상피분화도: 저배율(×100)에서 탐색한 후 고배율(200×)상에서 5군데의 현미경적 영역을 검색하여 면역조직화학 염색에 양성인 세포군을 측정하여 90% 이상에서 반응을 보인 경우는 ++(4), 51~90%에서 양성을 보인 경우는 +++(3), 11~55%는 ++(2), 단지 10% 이하에서 양성을 보인 경우는 +(1), 양성반응이 없는 경우는 -(0)으로 표현도를 표시하였다.

#### 6) 통계분석

SPSS Program으로 t-test를 이용하여 판독된 종양혈관형성도 및 상피분화도와 각 병기 및 예후 인자와의 상관관계를 알아보았으며, 통계학적 유의수준은 95% 이상(p<0.05)으로 정하였다.

## 결 과

### 1) 종양혈관형성도

병소중심 부위는 CD34 항원에 대한 항체, 병소 주변부와 정상부위는 factor VIII 항원에 대한 항체를 이용하여 미세혈관밀도(MVD)를 측정하였고(Fig. 1, Fig. 2), 각 부위간의 평균값은 통계적으로 유의한 차이를 보였다(p<0.05). TNM 병기상 각 병기에 대한 병소부위의 평균 미세혈관밀도는 각각 62.3±13.8, 64.1±12.3, 66.2±13.9, 73.8±9.2로 원격전이가 있는 stage IV에서만 다른 병기와 차이가 통계적으로 유의하였다(p<0.05). 또한 DeGroot 각 병기에 대한 병소부위의 평균 미세혈관밀도 역시 stage IV에서만 다른 병기와 차이가 통계적으로 유의하였다(p<0.005). AMES scoring system상 병소 부위의 평균 미세혈관밀도는 저위험군이 63.6±21.3, 고위험군은 67.1±20.1이었으며 통계적으로 각 군간의 유의한 차이는 없었다. 추적기간 중 국소재발 및 사망한 경우의 평균 미세혈관밀도는 각각 67.2±23.5, 66.8±18.7이었으며 통계적으로 각각 대조군과의 유의한 차이

Fig. 1. Immunohistochemical staining for Ag CD34 in the center of the tumor (×200). Microvessels were represented by brown clusters which was highlighted from other tissue.

Fig. 2. Immunohistochemical staining for Factor VIII related Ag. ( $\times 100$ ).

Microvessels are represented in red clusters, especially in the periphery of the tumor and normal tissue.

Fig. 3. Immunohistochemical staining for epithelial membrane antigen(EMA) ( $\times 200$ )

The apical surface membrane of tumor cells is stained for EMA.

는 없었다(Table 1).

## 2) 상피분화도

갈색으로 표현된 EMA 양성 세포를 측정하였

고(Fig. 3), 병소부위 및 병소주변부와 정상부위 간의 평균 EMA 발현도는 통계적으로 유의한 차이를 보였다( $p < 0.05$ ). TNM 각 병기 및 DeGroot 각 병기에 대한 병소부위의 평균 발현도는 각 병기

**Table 1.** MVDs in relation to location and various clinicopathologic parameters

Parameters	MVD* (Mean ± SD)	p-value
Location (n=120)		
Center	64.8 ± 18.9	< .05
Periphery	41.3 ± 15.3	< .05
Normal	22.1 ± 14.4	
TNM stage		
Stage I (n=50)	62.3 ± 13.8	
Stage II (n=21)	64.1 ± 12.3	
Stage III (n=40)	66.2 ± 13.9	< .05 <sup>†</sup>
Stage IV (n=9)	73.8 ± 9.2	
DeGroot Stage		
Stage I (n=30)	62.4 ± 15.1	
Stage II (n=47)	63.2 ± 18.6	
Stage III (n=31)	65.8 ± 12.8	< .005 <sup>†</sup>
Stage IV (n=12)	74.9 ± 10.2	
AMES Scale		
Low risk (n=77)	63.6 ± 21.3	
High risk (n=43)	67.1 ± 20.1	NS <sup>†</sup>
Recurrence. (n=23)		
No recurrence. (n=97)	64.2 ± 28.2	NS <sup>†</sup>
Dead (n=7)		
Alive (n=113)	64.6 ± 24.9	NS <sup>†</sup>

\*Micro-Vessel Density

<sup>†</sup>Stage VI vs stage I or Stage II or Stage III

<sup>†</sup>Not Significant

간에 통계적으로 유의한 차이는 없었다. 또한 AMES scoring system상 병소부위의 평균 발현도는 저위험군이  $.90 \pm 0.69$ , 고위험군은  $2.07 \pm 0.83$  이었으며 통계적으로 각 군간의 유의한 차이는 없었고, 추적기간 중 국소재발 및 사망한 경우의 평균 발현도는 각각  $2.17 \pm 0.65$ ,  $2.14 \pm 0.69$ 이었으며 통계적으로 각각 대조군과의 유의한 차이는 없었다(Table 2).

## 고 찰

유두상 갑상선암종 환자의 수술범위는 동측엽

**Table 2.** EMA reactivity in relation to location and various clinicopathologic parameters

Parameters	EMA* reactivity (Mean ± SD)	p-value
Location (n=120)		
Center	1.97 ± 0.74	< .05
Periphery	1.55 ± 0.68	< .05
Normal	1.09 ± 0.75	
TNM stage		
Stage I (n=50)	1.86 ± 0.70	NS <sup>†</sup>
Stage II (n=21)	2.01 ± 0.71	NS <sup>†</sup>
Stage III (n=40)	2.05 ± 0.82	NS <sup>†</sup>
Stage IV (n=9)	2.11 ± 0.78	
DeGroot Stage		
Stage I (n=30)	1.73 ± 0.64	NS <sup>†</sup>
Stage II (n=47)	1.94 ± 0.67	NS <sup>†</sup>
Stage III (n=31)	2.16 ± 0.82	NS <sup>†</sup>
Stage IV (n=12)	2.17 ± 0.84	
AMES Scale		
Low risk (n=77)	1.90 ± 0.69	
High risk (n=43)	2.07 ± 0.83	NS <sup>†</sup>
Recurrence. (n=23)		
No recurrence. (n=97)	1.92 ± 0.76	NS <sup>†</sup>
Dead (n=7)		
Alive (n=113)	1.96 ± 0.75	NS <sup>†</sup>

\*Epithelial Membrane Antigen

<sup>†</sup>Not Significant

갑상선 절제술부터 갑상선 전절제술까지 선택의 논란이 많으나 최근에는 일률적인 수술범위 선택 보다는 환자 개개인의 예후를 감안한 위험인자 (risk factor)를 적용하여, 고위험군에서는 적극적인 수술(전절제술 혹은 근전절제술)과 수술 후 동위원소 치료를 추가하고, 저위험군에서는 협부를 포함한 동측엽 절제술 또는 갑상선아전절제술을 시행한 후 추적관찰만을 시행하는 경향이다(12~17). 위험인자 적용에서 Mayo Clinic에서는 AGES scoring system(age, cell grading, extent of tumor, tumor size)(15,18) 및 이를 보완한 MACIS scoring system(age, tumor size, incomplete resection, extra-

thyroidal invasion, distant metastasis)(19)을, Lahey Clinic에서는 AMES scoring system(age, metastasis, extent of tumor, tumor size)(12)을, 유럽에서는 EORTC prognostic index(age, sex, cell type, extent of tumor, distant metastasis)(20)를 적용하고 있으나, 일반적으로 AMES scoring system이 임상조건만으로 적용하기가 쉬워 많이 선호되고 있으며, 어느 system을 적용하더라도 갑상선암종의 85%는 저위험군, 15% 정도는 고위험군으로 분류된다.

수술 후 재발률과 사망률은 대개 병기가 높을수록, 고위험군인 경우에 높은 것으로 나타나지만 병기가 낮은 경우 및 저위험군에서도 상당수의 재발 및 원격전이에 의한 사망률(2%)을 보이고 있어(15,18) 이를 예측할 수 있는 새로운 위험인자에 대한 연구가 계속되고 있다. 최근 분자생물학 및 면역조직화학법의 발달로 유두상 갑상선암종 조직에서 DNA content 분석을 통해 예후와의 상관관계를 규명하려는 시도(21~22)가 있었으나 확실한 결론을 얻지 못하였으며, 1994년 ras 단백질 산물(p21 단백질)의 과표현이 유두상 갑상선암종 환자의 생존과 밀접한 관계가 있었다는 Basolo 등의 보고(23) 및, 1996년 Pollina 등(24)이 p53 단백질 및 bcl-2 단백질의 표현도는 갑상선암종 환자의 예후와 연관성이 없었다고 보고한 것 외에도 cytokeratin과 vimentin(25~26), tyroglobulin(27), Ki67(28)등을 이용한 여러 가지 단편적인 연구가 이루어진 바 있으나 아직까지 명백하게 새로운 위험인자를 제시하지는 못하는 실정이다.

최근의 암세포 생물학의 연구는 종양세포의 성장조절이 비정상적으로 규제되며 분화되지 않는 것에 초점을 맞추어, 암세포의 증식과 분화를 조절하는 인자 및 유전자에 집중되어 왔다. 악성종양의 과정 중 중요한 것은 암세포와 숙주의 맥관계 사이에서 일어나야 하는 여러 가지 반응인데, 이는 새로운 혈관을 형성하여 암세포가 확장하고 암세포가 전이하는데 필수적인 반응이다. 따라서 암세포와 혈관과의 반응을 연구하는 것은 악성종양의 과정을 이해하는데 절대적으로 필요하다.

종양의 성장이 종양내 혈관형성에 의존한다는

개념은 Folkman(29)에 의하여 처음 제안되었는데, 이는 종양이 일단 발생한 후 반드시 신생혈관의 종양내 증식이 선행되어야만 종양세포군이 증가한다는 것이고 또한 종양의 침윤 및 전이의 선결조건이라는 것이다(30~31). 즉 종양이 전혈관기(prevascular)에서 혈관기(vascular) 및 침습기(invasive)로 전환되면 신생 모세혈관이 증식하는 종양세포에 적절하게 산소 및 영양분을 공급하게 되고 전이된 종양에도 동일한 기전으로 혈관형성이 동반된다(2). 실제로 종양세포수가  $10^6$ 개인  $1\sim 2\text{ mm}^3$  까지가 신생혈관의 생성없이도 자랄 수 있는 종양의 최대 크기이며, 신생혈관의 생성과 종양세포의 성장속도와는 밀접한 관계가 있는 것으로 알려져 있다(1). 따라서 종양의 성장과 전이가 신생혈관형성에 의존한다는 사실은 종양의 맥관형성도가 암종의 영속적인 분열속도, 주위로의 침윤, 전이를 예측할 수 있는 생물학적 지표로써 사용될 수 있을 것으로 보아 이에 대한 관심이 증가하게 되었다.

종양의 맥관형성도와 악성종양의 예후와의 관계를 예측하는 기준으로써 이용된 것은 악성 흑색종(32)에서 처음 시행되었으며, 그 외에 유방암종(33~34), 자궁경부암종(35), 대장암종(36), 직장암종(37), 전립선암종(38~39), 방광암종(40), 두경부암종(41~42), 폐암종(43), 연부조직종양(44), 위암종(45) 등에서 의의있게 나타났고, 최근 Weidner 등(33)이 유방암종에서 맥관형성도가 독립적인 예후인자로서 의의가 높다고 보고하였으나, 현재까지 갑상선암종에서 종양맥관형성도와 예후에 대한 연구는 극히 드문 실정이다.

조직에서 미세혈관을 확인하는 방법으로 기존의 hematoxyline and eosin 염색(H&E stain)만으로는 관찰이 어려워 이에 대한 많은 연구가 있었는데, 최근 면역조직화학염색법의 발달로 factor VIII 관련항원, blood group 특이항원(A, B, H), 6-keto-PGE1 alpha, Ulex europaeus lectin, CD31 항원 등의 혈관내피세포 표시자들을 이용한 종양맥관형성에 대한 연구가 활발히 진행되고 있으며, 이 중 factor VIII 관련항원에 대한 단클론성항체가 가장

많이 이용되나(33,36,42), 비특이성 염색성 때문에 세포의 분비물에도 염색이 되고 배경염색이 동반되어 판독이 어려운 경우가 많다는 단점이 있다(34). 따라서 혈관내피세포에만 민감하고 특이하게 염색되는 CD31 항원에 대한 항체를 이용한 연구가 점차 많아지고 있는데, CD31 항원은 platelet/endothelial cell adhesion molecule(PECAM)로서 다른 혈관내피세포 표지자에 비하여 예민하고 특이성이 높다고 하나, 형질세포에도 양성으로 염색되므로 판독시 유의해야 하는 단점이 있다(41,46~47). 또한, 조혈전구세포(hemopoietic progenitor cell)의 항원인 CD34 항원에 대한 단클론성항체를 이용한 연구가 최근 갑상선암종에서 보고된 바 있으며(48), 비교적 민감도는 우수하나 간엽조직(mesenchymal tissue)에도 염색이 되는 단점이 있다고 한다. 본 연구에서는 먼저 가장 보편적으로 사용되는 factor VIII 관련항원에 대한 단클론성 항체를 사용하여 면역조직화학염색을 시행하였는데, 종양의 주변부 및 정상조직에는 미세혈관들을 확인할 수 있게 염색이 잘 되었으나 종양의 중심부에는 배경염색이 심하게 되어 미세혈관들을 확인할 수 없었다. 수차례에 걸쳐 실험과정을 검토하여 재염색을 시행하였고, 단클론성항체의 고정도 잘 되게 하기위해 microwave에 처리해 보아도 같은 결과를 보여 종양의 중심부에서 확인된 미세혈관의 수는 H&E 염색으로 확인된 미세혈관의 수와 비슷했다. 이와 같은 결과는 factor VIII 관련항원에 대한 단클론성항체가 갑상선 조직, 특히 암성조직 부위에서 조직내 풍부한 colloid 성의 고유한 단백질성과 심한 교차반응을 보였을 것으로 추측을 하였으나 colloid 성분이 마찬가지로 존재하는 정상조직에서는 염색이 잘 되어 명확한 원인으로 제시하기에는 부족하였다. 하지만 수차례에 걸친 재염색의 결과가 동일한 것으로 보아 실험과정 중의 문제는 없었을 것으로 생각되며, factor VIII 관련항원에 대한 항체와 유두상 갑상선암종 조직의 어떤 고유한 단백질성과의 교차반응에 대한 가능성은 연구해야 할 과제로 생각되었다.

이처럼 factor VIII 관련항원에 대한 항체를 이용하여 미세혈관을 측정할 수 없었으므로 최근 갑상선암종 조직에서 이용된 것으로 보고된 바 있는 CD34 항원에 대한 단클론성항체를 이용해 재염색을 시행하였으며, 염색방법은 factor VIII 관련항원에 대한 항체를 이용한 방법과 대부분 동일하였으나 항체의 고정을 돕기위해 10분간 microwave에 처리하였다. 염색결과 종양의 중심부와 주변부 및 정상조직에서 모두 염색이 되었으나 종양의 주변부 및 정상조직에서 간엽조직세포(mesenchymal cell)들의 염색이 많이 동반되어 연구자들이 검색하기에 어려움이 많았다. 결국, 숙련된 병리의가 factor VIII 관련항원에 대한 항체를 이용한 조직 표본과 CD34 항원에 대한 항체를 이용한 조직표본을 모두 검색해 본 결과 종양의 주변부 및 정상조직에서의 미세혈관의 수가 CD34 항원에 대한 항체를 이용한 경우와 factor VIII 관련항원에 대한 항체를 이용한 경우에서 큰 차이가 없었고, 오히려 factor VIII 관련항원에 대한 항체를 이용한 경우에 미세혈관의 수를 더 많이 검색할 수 있었다. 따라서 종양의 중심부는 CD34 항원에 대한 단클론성항체로 염색된 조직 표본을(Fig. 1), 종양의 주변부 및 정상조직에서는 factor VIII 관련항원에 대한 항체로 염색된 조직 표본을(Fig. 2) 이용해 미세혈관수를 측정하였다.

종양맥관형성도를 평가하는데 유의사항으로는 첫째, H&E 염색된 조직절편들 중에서 특히 종양의 침투성을 잘 나타내는 부위가 포함된 조직절편을 선택하여 면역조직화학염색을 시행해야 하며, 둘째 가장 혈관형성이 왕성한 곳을 저배율(40×, 100×)에서 찾아 고배율(200×) 시야(0.785 mm<sup>3</sup>)에서 미세혈관 수를 측정하고, 셋째 주변의 미세혈관, 종양세포, 교원 요소와 명확히 구분되어 염색된 단 하나의 혈관내피세포, 혈관내피세포 집락, 또는 분지되는 혈관은 모두 하나의 혈관으로 간주하며, 넷째 두명의 관찰자가 동시에 관찰할 수 있는 현미경을 이용하여 동의하에 측정되 차이가 있을 경우는 경험있는 제 3의 관찰자에게 의뢰하고, 다섯째 격자가 있는 대안렌즈를 이용



하여 혈관수를 측정해야 한다(33,41,45). 본 연구에서도 상기 방법에 따라 병리의에 의해 선택된 조직절편을 염색하였으며, 염색된 표본은 다시 병리의가 그 염색의 적합도를 판정하였다. 환자의 임상기록을 모르는 2명의 임상외과가 병리의의 도움을 받아 숙련과정을 거친 후 3차례에 걸쳐 검색을 시행하였으며, 차이가 있을 경우는 숙련된 병리의에게 의뢰하여 실험적 오차를 줄이려고 노력하였다.

Weinder등(33)과 Maeda등(45)은 각각 유방암종 및 위암종에 대한 연구에서 종양맥관형성도는 종양세포와 인접 정상세포의 주변부에서 가장 높은 것으로 보고하였으나, 본 연구에서는 종양의 중심부와 주변부 및 정상 조직에서의 각각의 평균미세혈관밀도(mean MVD)는  $64.8 \pm 18.9$ ,  $41.3 \pm 15.3$ ,  $22.1 \pm 14.4$ 로 종양의 중심부에서 가장 높았으며 각 부위간에 통계적으로 유의한 차이를 보였다( $p < 0.05$ ). 이 같이 종양맥관형성도가 종양의 주변부 보다 중심부에서 더 높았던 이유는 비교적 동질적인 다른 고형암종과 달리 유두상 갑상선암종의 중심부에는 유두상 돌기의 구조물들이 다양하게 존재하여 각 돌기의 저부에서 말단 및 분기에까지 종양세포의 성장 및 증식에 필요한 미세혈관들이 발달하여 비교적 큰 혈관들이 많이 분포한 종양의 주변부위보다 미세혈관밀도가 높았던 것으로 생각된다.

1996년 Fontanini등(48)은 여러 갑상선 암종에서 CD34 항원에 대한 단클론항체를 이용한 면역조직화학염색을 통해 종양맥관형성도와 예후와의 상관관계를 알아보고자 하였는데, 유두상 갑상선암종, 여포성 갑상선암종, 미분화 갑상선암종의 경우는 생존군과 사망군간의 종양맥관형성도의 통계학적 차이가 없었고, 수질암종의 경우는 두 군간의 통계학적 차이가 있어( $p = 0.00098$ ), 종양맥관형성도가 수질암종 환자의 예후를 측정하는 데 중요한 역할을 할 것으로 보고하였다. 본 연구에서도 사망군( $n=7$ )과 생존군간의 종양맥관형성도를 비교하였는데 각각 평균값이  $66.8 \pm 18.7$ ,  $64.6 \pm 24.9$ 로 사망군에서 높았으나 통계학적 의의는 없

었다. 이 외에도 본 연구에서는 TNM 병기, DeGroot 병기, AMES scale에 의한 위험군 및 국소재발군과 비재발군에 따른 종양맥관형성도의 차이를 알아보았는데, TNM 각 병기상 병소부위의 평균미세혈관밀도는 각각  $62.3 \pm 13.8$ ,  $64.1 \pm 12.3$ ,  $66.2 \pm 13.9$ ,  $73.8 \pm 9.2$ 로 병기가 높을수록 수치가 높게 측정되었으나 원격전이 있는 stage IV에서만 다른 병기와 통계적으로 유의한 차이를 보였으며( $p < 0.05$ ), DeGroot 각 병기에 대한 평균미세혈관밀도는 각각  $62.4 \pm 15.1$ ,  $63.2 \pm 18.6$ ,  $65.8 \pm 12.8$ ,  $74.9 \pm 10.2$ 로 역시 병기가 높을수록 높은 수치를 보였으나, stage IV에서만 다른 병기와의 차이가 통계적으로 유의하였다( $p < 0.005$ ). 또한 AMES scoring system에 따른 평균미세혈관밀도는 저위험군이  $63.6 \pm 21.3$ , 고위험군은  $67.1 \pm 20.1$ 로 고위험군에서 높게 나타났지만 통계적으로 유의한 차이는 없었고, 국소재발군과 비재발군간의 평균미세혈관밀도는 각각  $67.2 \pm 23.5$ ,  $64.2 \pm 28.2$ 로 국소재발군이 비재발군에 비해 높았으나 통계적으로 유의한 차이는 없었다. 그러나 이처럼 비록 통계적 유의성은 없었으나 TNM 및 Degroot 병기가 높을수록, 고위험군인 경우, 재발 및 사망한 경우에 미세혈관밀도가 높게 측정된 것은 종양맥관형성도가 유두상 갑상선암종의 진행 및 악성도와 관련성이 있을 것으로 생각되며, 특히 원격전이가 있었던 Stage IV에서 다른 병기와 통계적으로 유의한 차이를 보였던 것은 유두상 갑상선암종에서 종양맥관형성도가 원격전이의 예측인자로서의 가능성을 시사하는 중요한 실험결과로 생각된다.

또한, 유두상 갑상선암종 환자의 EMA(epithelial membrane antigen) 발현도가 새로운 예후인자로서 가능성이 있는지를 알아보기 위해 EMA에 대한 단클론항체를 이용하여 면역조직화학염색을 시행하였다. EMA는 정상 상피세포에서도 발현될 수 있지만 정상세포가 손상을 받는 염증 및 악성세포로의 변환 등의 변화에 의해 발현도가 높은 것으로 알려져 있다(7~9). Sloane과 Ormerod(9)는 EMA가 많이 생성되는 것은 상피세포의 손상(injury)에 대한 반응이며, 악성종양의 느슨한 세포간

연결(poor cell contact)이 EMA의 높은 발현도와 밀접한 관계가 있다고 보고하였으며, Yamamoto등(8)은 유두상 갑상선암종에서 EMA에 발현된 세포는 손상을 받았거나 괴사상태이거나, 악성변화에 의해 세포간 연결이 느슨한 것으로 생각하였고, 특히 세포간 느슨한 연결이 악성세포의 원격전이와 관련이 있을 것으로 생각되며, 악성도가 높은 암종에서 EMA의 발현도가 악성도가 낮은 암종보다 높은 것으로 보고하였고, 또한 Livolsi등(49)은 악성도가 높은 미분화 갑상선암종의 55%가 EMA에 발현된 높은 발현도를 보였다고 보고하였다. 이처럼 EMA의 발현도가 암종의 진행과 특히 원격전이와 관련이 있고, 비록 현재까지 EMA의 발현도와 유두상 갑상선암종의 예후와의 상관관계를 밝히려는 연구는 거의 없었지만 최근 Yamamoto등(8)의 연구에서 원격전이가 있는 유두상 갑상선암종의 EMA 발현도가 원격전이가 없는 경우 및 크기가 작은 잠재성 암종인 경우에 비해 높게 나타나( $p < 0.001$ ), 원격전이 및 사망의 위험인자로 유용할 수 있다고 보고한 바 있어 EMA 발현도가 유두상 갑상선암종의 위험인자로서 가능성이 있을 것으로 생각되었다.

본 연구에서도 5등급으로 구분하여 측정된 EMA 발현도의 평균값이 병소중심부위 및 병소주변부와 정상조직부위에서 각각  $1.97 \pm 0.74$ ,  $1.55 \pm 0.68$ ,  $1.09 \pm 0.75$ 로 각 부위간에 통계적으로 유의한 차이를 보여( $p < 0.05$ ), 암조직에서의 발현도가 높음을 확인하였다. 그러나 TNM 병기, DeGroot 병기, AMES scale에 따른 위험군, 국소재발 및 사망여부에 따른 분석결과는 병기가 높을수록 고위험군인 경우, 국소재발 및 사망한 경우에 다소 높은 발현도를 보였지만, 통계적 유의성은 없었기 때문에 EMA 발현도가 유두상 갑상선암종의 진행 및 악성도와와의 관련성은 있을 것으로 추측하였지만 예후인자로서의 가능성은 제시할 수 없었다.

## 결 론

120예의 유두상 갑상선암조직을 이용하여 면역

조직화학염색을 이용한 맥관형성도 및 상피분화도를 측정하여 각 병기 및 환자의 예후와의 상관관계를 분석하고 새로운 위험인자로서의 임상적의의를 조사하여, 유두상 갑상선암종의 종양맥관형성도와 상피분화도는 TNM 병기, DeGroot 병기, AMES scale에 따른 위험군 및 국소재발과 사망여부의 유효한 상관관계를 규명하지는 못하였지만, 원격전이가 있던 stage IV에서 종양맥관형성도가 다른 병기와 통계적으로 유의한 차이를 보여 원격전이의 가능성을 예측할 새로운 위험인자로서의 가능성을 확인할 수 있었다.

## 참 고 문 헌

1. Folkman J, Klagsburn M. Angiogenetic factors. *Science* 1987; 235: 442-447.
2. Folkman J. What is the evidence that the tumors are angiogenesis dependent? (editorial) *J Natl Cancer Inst* 1990; 82: 4-6.
3. Folkman J. The role of the angiogenesis in tumor growth. *Semin Cancer Biol* 1992; 3: 65-71.
4. Folkman J. Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nat Med* 1995; 1: 27-31.
5. Kim KJ, Li B, Winer J, Aramanini M, Gillert N, Phillips HS, Ferrara N. Inhibition of vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis suppresses tumor growth in vivo. *Nature* 1993; 362: 841-844.
6. Samato K, Ikezaki K, Ono M, Shono T, Kihno K, Kuwano M, Fukui M. Expression of vascular endothelial growth factor and its possible relation with neovascularization in human brain tumors. *Cancer Res* 1995; 55: 1189-1193.
7. Wilson NW, Pambakian H, Richardson TC, Stokoe MR, Makin CA, Heyderman E. Epithelial marker in thyroid carcinoma; an immunoperoxidase study. *Histopathology* 1986; 10: 815-829.
8. Yamamoto Y, Izumi K, Otsuka H. An immunohistochemical study of Epithelial Membrane Antigen, Cytokeratin, and Vimentin in papillary thyroid carcinoma. *Cancer* 1992; 70: 2326-2333.
9. Sloane JP, Ormerod MG. Distribution of epithelial membrane antigen in normal and neoplastic tissues and its value in diagnostic tumor pathology. *Cancer* 1981; 47: 1786-1795.
10. American Joint Committee on Cancer. Manual for stag-

- ing of cancer, 4th. ed. Philadelphia. JB Lippincott 1992 p53
11. DeGroot LJ, Sridama V. Thyroid neoplasia. In DeGroot LJ. (Ed.): Endocrinology. Philadelphia, W.B. Saunders Company, 1989, p768
  12. Cady B, Rossi R: An expanded view of risk-group definition in differentiated thyroid carcinoma. *Surgery* 1988; 104: 947-953.
  13. McConahey WM, Hay ID, Woolner LB, Van Heerden JA, Taylor UF. Papillary thyroid cancer treated at the Mayo Clinic, 1946 through 1970: Initial manifestation, pathologic findings, therapy and outcome. *Mayo Clinic Proc* 1986; 61: 978-996.
  14. Crile G Jr, Antunez AR, Esselstyn CB, Hawk WA, Skillern PG. The advantages of subtotal thyroidectomy and suppression of TSH in the primary treatment of papillary carcinoma of the thyroid. *Cancer* 1985; 55: 2691-1697.
  15. Hay ID, Taylor WF, McConahey WM. A prognostic score for predicting outcome in papillary carcinoma. *Endocrinology* 1986; 119(suppl): 1-15.
  16. Cohn K, Backdahl M, Fosslund G, Auer G, Zetterberg A, Lundell G, Granberg PO, Lowhagen T, Willems JS, Cady B. Biologic considerations and operative strategy in papillary thyroid carcinoma: Arguments against the routine performance of total thyroidectomy. *Surgery* 1984; 96: 957-971.
  17. Park CS, Park BW, Min JS. How to treat papillary carcinoma of the thyroid. *Asian J Surg* 1994; 17: 96-101.
  18. Hay ID, Grant CS, Taylor WF, McConahey WM. Ipsilateral lobectomy versus bilateral lobal resection in papillary thyroid carcinoma: A retrospective analysis of surgical outcome using a novel prognostic scoring system. *Surgery* 1987; 102: 1088-1093.
  19. Tompson NW. Differentiated thyroid carcinoma. In Wheeler MH and Lazarus JH(ed) *Disease of the thyroid: Pathophysiology and management*, London, Chapman & Hall 1994 p368
  20. Byar DP, Green SB, Dor P, Williams ED, Colon J, van Glse HA, Mayer M, Sylvester RJ, van Glabbeke M et al. A prognostic index for thyroid cancer. *Eur J Cancer* 1979; 15: 1033-1041.
  21. Cohn K, Backdahl M, Fosslund G, Auer G, Lundell G, Lowhagen T. Prognostic value of nucleal DNA content in papillary thyroid carcinoma. *World J Surg* 1984; 8: 474-480.
  22. Hrafinkelsson J, Stal O, Enestrom S, Jonasson JG, Bjornsson J, Olafsdottir K, Mondenskijold B. Cellular DNA pattern, S-phase frequency and survaval in papillary thyroid carcinoma. *Acta Oncol* 1988; 27: 329-333.
  23. Basolo F, Pinchera, Fugazzola L, Fontanini G, Elisei R, Romei C, Pacini F. Expression of p21 ras protein as a prognostic factor in papillary thyroid cancer. *Eur J Cancer* 1994; 30: 171-174.
  24. Pollina L, Pacini F, Fontanini G, Vignati S, Bevilacqua G, Basolo F. Bcl-2 and p53 protein expression in thyroid carcinoma: Lack of correlation with clinicopathological parameters and survival. *Br J Cancer* 1996; 73: 139-143.
  25. Henzen-Logmans SC, Mullink H, Ramaskers FCS, Tadema T, Meijer CJLM. Expression of cytokeratin and vimentin in epithelial cells of normal and pathologic thyroid tissue. *Virchows Arch[A]* 1987; 410: 347-354.
  26. Uchida H, Nakayama I, Noguchi S. An immunohistochemical study of cytokeratin and vimentin in benign and malignant thyroid lesions. *Acta Pathol Jpn* 1989; 39: 169-175.
  27. Permanetter W, Nathrath WBJ, Lohrs U. Immunohistochemical analysis of thyroglobulin and keratin in benign and malignant thyroid tumors. *Virchows Arch [A]* 1982; 398: 221-228.
  28. Pfragner R, Wirnserger G, Behmel A, Niederle B, Langle F, Roka R, Mandl A, Purstner P, Auner J, Tatzber F. Biologic and cytogenetic chracterization of three human medullary thyroid carcinoma in culture. *Henry Ford Hosp Med J* 1992; 40: 299-302.
  29. Folkman J. Tumor angiogenesis; therapeutic implication. *N Engl J Med* 1971; 285: 1182-1186.
  30. Folkman J. Angiogenesis. In jaffe EA, Eds. *Biology of Endothelial Cells*. Boston: Martinus-Nijhoff 1984 p 412
  31. Folkman J. Angiogenesis and breast cancer(editorial). *J Clin Oncol* 1994; 12: 441-443.
  32. Srivastava A, Laidler P, Hughes LE, Woodcock J, Shedden EJ. Neovascularization in human cutaneous melanoma; a quantitative morphological and Doppler ultrasound study. *Eur J Cancer Clin Oncol* 1986; 22: 1205-1209.
  33. Weidner N, Semple JP, Welch WR, Folkman J. Tumor angiogenesis and metastasis- correlation in breast carcinoma. *N Eng J Med* 1991; 324: 1-8.
  34. Bosari S, Lee AK, Delellis RA, Wiley BD, Heatler

- GJ, Silverman ML. Microvessel quantitation and prognosis in invasive breast carcinoma. *Hum Pathol* 1992; 23: 755-761.
35. Mariuzzi GM, Montironi R, Di Loreto C, Sisti S. Multiparametric quantitation of the progression of the uterine cervix preneoplasia toward neoplasia. *Pathol Res Pract* 1989; 185: 606-611.
36. Frank RE, Saclarides TJ, Leugans S, Speziale NJ, Drab EA, Rubin DB. Tumor angiogenesis as a predictor of recurrence and survival in patients with node negative colon cancer. *Ann Surg* 1995; 222: 695-699.
37. Saclarides TJ, Speziale NJ, Drab E, Szeluga DJ, Rubin DB. Tumor angiogenesis and rectal carcinoma. *Dis Colon Rectum* 1994; 37: 921-926.
38. Wakui S, Furusato M, Itoh T, Sasaki H, Akiyama A, Kinoshita I, Asano K, Tokuda T, Aizawa S, Ushigome S. Tumor angiogenesis in prostatic carcinoma with and without bone marrow metastasis; a morphometric study. *J Pathol* 1992; 168: 257-262.
39. Weidner N, Carroll PR, Flax J, Blumenfeld W, Folkman J. Tumor angiogenesis correlates with metastasis in invasive prostate carcinoma. *Am J Pathol* 1993; 143: 401-409.
40. Chodak GW, Haudenschild C, Gittes RF, Folkman J. Angiogenetic activity as a marker of neoplastic and paraneoplastic lesions of the human bladder. *Ann Surg* 1980; 192: 762-771.
41. Gasparini G, Weidner N, Maluta S, Bevilacqua P, Pozza P, Boracchi P, Mezzetti M, Testolin A, Bevilacqua P. Intratumoral microvessel density and p53 proteins; correlation with metastasis in head and neck carcinoma. *Int J Cancer* 1993; 55: 739-744.
42. Williams JK, Carlson GW, Cohen C, Derose PB, Hunter S, Jarkiewicz MJ. Tumor angiogenesis as a prognostic factor in oral cavity tumor. *Am J Surg* 1994; 168: 373-380.
43. Macchiarini P, Fontaini G, Hardin MJ, Squartini F, Angeletti CA. Relation of neovasculature to metastasis of non-small cell lung cancer. *Lancet* 1992; 340: 145-146.
44. Ewaskaw SP, Collins CA, Conrad EU. Quantitative assessment of blood vessel density and size in soft-tissue tumors. *Mod Pathol* 1993; 6: 6-12.
45. Maeda K, Chung YS, Takasuka S, Ogawa Y, Onoda N, Sawada T, Kato Y, Nitta A, Arimoto Y, Kondo Y. Tumor angiogenesis as a predictor of recurrence in gastric carcinoma. *J Clin Oncol* 1995; 13: 477-481.
46. Horak ER, Leek R, Klenk N, Lejeune S, Smith K, Stuart N, Greenall M, Stepniowska K, Harris AL. Angiogenesis, assessed by platelet/endothelial cell adhesion molecule antibodies, as indicator of node metastasis and survival in breast cancer. *Lancet* 1992; 340: 1120-1124.
47. Kuzu I, Bicknell, Harris AL, Jones M, Gatter KC, Mason DY. Heterogeneity of vascular endothelial cells with relevance to diagnosis of vascular tumors. *J Clin Pathol* 1992; 45: 143-148.
48. Fontanini G, Vignati S, Pacini F, Pollina L, Basolo F. Microvessel Count: An indicator of poor outcome in medullary thyroid carcinoma but not in other types of thyroid carcinoma. *Mod Pathol* 1996; 9: 636-641.
49. Livolsi VA, Brooks JJ, Arendash-Durand B. Anaplastic thyroid tumors: immunohistology. *Am J Clin Pathol* 1987; 87: 434-442.