

위암에서 림프절 미세전이의 면역조직화학적 방법에 의한 측정 및 생존율과의 상관관계

순천향대학교 의과대학 외과학교실 및 ¹임상병리학교실

박경규 · 문 철 · 이문수 · 허경열 · 장용석 · 김재준 · 이민혁 · 진소영¹ · 이동화¹

Immunohistochemical Assay for Lymph-Node Micrometastasis in Gastric Cancer and Correlation with Survival Rate

Kyung-Kyu Park, M.D., Chul Moon, M.D., Moon Soo Lee, M.D., Kyung Yul Hur, M.D., Yong Seog Jang, M.D., Jae Joon Kim, M.D., Min Hyuk Lee, M.D., So-Young Jin, M.D.¹ and Dong Wha Lee, M.D.¹

Departments of Surgery and ¹Anatomic Pathology, College of Medicine, Soonchunhyang University, Seoul, Korea

Purpose: The purpose of this study is to identify immunohistochemical evidence of lymph-node micrometastasis in histologic node-negative gastric cancer patients and to evaluate the prognostic significance of lymph-node micrometastasis.

Materials and Methods: A retrospective study of 50 gastric cancer patients who underwent curative resections from October 1990 to November 1994 was performed. Two consecutive sections were prepared: one for ordinary hematoxylin and eosin staining, and the other for immunohistochemical staining with Pan cytokeratin antibody (Novocastra, UK). In the univariate analysis, the survival rate was calculated using the Life Table Method, and the multivariate analysis was determined using a Cox Proportional Hazards Model. The statistical analyses of the relationships between the clinicopathologic factors and micrometastases were performed by using a Chi-square test.

Results: Of 2522 harvested lymph nodes, 81 (4.1%) nodes and 19 (38%) of 50 patients were identified as having lymph-node micrometastases by using immunohistochemical staining for cytokeratin. The incidence of lymph-node micrometastases was significantly higher in diffuse type carcinomas (54%, $P=0.024$) and in patients with serosal invasion

(52.2%, $P=0.05$). For patients with lymph-node micrometastases ($n=19$), the 5-year survival rate was significantly decreased (73.7%, $P=0.015$). The Lauren's classification ($P=0.021$) and the depth of invasion ($P=0.035$) were shown by multivariate analysis to have a significant relationship with the presence of micrometastases. Multivariate analysis revealed that lymph-node micrometastasis was independently correlated with survival in histologic node-negative gastric cancer patients.

Conclusion: The presence of cytokeratin detected lymph-node micrometastases correlates with the worse prognosis for patients with histologic node-negative gastric cancer. (J Korean Gastric Cancer Assoc 2002;2:5-11)

Key Words: Gastric cancer, Lymph-node micrometastasis, Prognostic indicator

중심 단어: 위암, 림프절 미세전이, 예후 지표

서 론

원발 위암에서 림프절 광경술을 포함한 근치적 절제술 후 정확하고 객관적인 병기의 결정은 환자의 예후를 예측하고 향후 치료 계획을 수립하며 재발의 위험성을 예견하는 데 중요하다. 근치적 절제술 후 원발 위암의 병기 및 예후를 결정하는 중요한 인자로는 림프절 전이, 위벽 침윤도 및 다장기로의 원격 전이 유무이다.(1-11) 이 중 림프절 전이는 독립된 예후 인자로 인정되고 있으며 현재는 림프절 전이의 해부학적 범위 또는 절제된 전이 림프절의 개수에 따른 병기 분류에 의해서 예후의 예측이 이루어지고 있다.(1-9)

절제된 림프절의 전이 유무를 확인하는 기존의 방법으로 Hematoxylin & Eosin 염색 방법을 사용하였으나 이러한 방법으로는 암세포의 미세 군집은 확인하기가 어려울 뿐만 아니라 림프절의 전이 범위 및 개수를 검출하는 데 있어서도 한계가 있을 수 있다. 그러나 최근의 면역조직화학적 염색 및 분자생물학적 방법의 도입으로 기존의 조직학적 염색 방법으로 검출되지 않는 미세 전이를 검출

책임저자 : 박경규, 서울시 용산구 한남동 657-58
순천향대학교 의과대학 외과학교실, 140-743
Tel: 02-709-9244, Fax: 02-795-1682
E-mail: schpkk@hosp.sch.ac.kr

접수일 : 2001년 12월 17일, 게재승인일 : 2002년 2월 1일

할 수 있게 되었다.(12-19) 따라서 위암 환자의 예후를 결정하는 데 있어서 면역조직화학적 염색으로 검출된 미세 전이의 의의에 대한 연구가 활발히 진행되고 있으며(13-18) 기타 장기의 암환자에서도 역시 활발히 연구되고 있다.(20-22) 이에 저자들은 림프절 전이가 없는 위암 환자에서 면역조직화학적으로 확인된 미세 전이가 갖는 의의 및 생존율과의 상관관계에 대하여 알아보고자 하였다.

방 법

1990년 10월 1일부터 1994년 11월 30일까지 순천향대학교 병원 외과학교실에서 근치적 위절제술과 동일한 술 후 보조화학요법을 받은 환자 중 T2-3N0M0 64예를 대상으로 Hematoxylin & Eosin (H & E) 염색 및 면역조직화학 염색을 시행하여 모두에서 양성을 보인 8예와 생존 확인이 불가능한 4예 및 위암으로 사망하지 않은 2예(뇌경색, 간경화)를 제외한 50예를 최종대상으로 하여 후향적 연구를 시행하였다.

연구 방법으로는 전체 64명의 환자로부터 절제된 2522개의 림프절(평균 39.4개)을 검사하였고 모든 림프절 조직 표본에서 연속 절편 후 암세포가 나타나는지 알아보기 위하여 파라핀에 포매된 림프절 조직 표본을 4µm 두께로 박절하여 연속 절편을 한 뒤 2장은 Hematoxylin & Eosin (H & E) 염색을 시행하였고 1장은 면역조직화학 염색을 시행하였다.

면역조직화학 염색은 다음과 같이 시행하였다. 연속 절편한 조직을 poly-L-lysine으로 표면 처리한 슬라이드에 부착하여 실험에 사용하였으며 오븐에서 일부 파라핀을 녹인 후 xylene으로 파라핀을 완전히 제거하였다. 계열 알코올로 함수시킨 후 조직 내 항원의 재현성을 높이기 위하여 citrate buffer 용액에 조직을 담근 후 전자레인지에서

끓였다. 내인성 과산화 효소의 작용을 억제하기 위하여 3% 과산화수소 용액에서 10분간 처리하고 PBS 완충액으로 세척하였다. 비특이적인 반응을 방지하기 위하여 3% 정상 면양 혈청으로 10분간 반응시켰다. 슬라이드를 가볍게 던 후 일차 항체를 상온에서 30분간 반응시켰다. 일차 항체로는 Pan cytokeratin (Novocastra, UK)을 1 : 100배로 희석하여 사용하였다. PBS 완충액으로 세척한 후 이차 항체인 streptavidin biotin complex를 떨어뜨려 15분간 상온에서 반응시킨 후 PBS 완충액으로 세척하였다. 이후 streptavidin peroxidase를 가하여 15분간 반응시킨 후 완충액으로 세척하였다. 발색은 acetyethylcabamide (AEC)로 3~5분간 반응시킨 후 완충액으로 세척한 뒤 Mayer's hematylin으로 대조 염색하고 Crystal mount (Biomedica, CA, USA)로 봉입하였다. 음성 대조 슬라이드는 일차 항체 대신 PBS로 대체하여 같은 과정으로 염색하였으며 양성 대조는 전이가 있는 림프절 조직을 이용하였다. 염색 결과 판정은 림프절 피막하 또는 수질 내부 및 유동(sinusoid) 내부 적갈색으로 염색되는 단독세포 3개 이상 또는 세포 군집이 한 개 이상 있을 때 미세 전이로 판독하였다(Fig. 1, 2). 면역조직화학 염색으로 림프절 내 미세 전이가 확인된 경우에는 연속 절편을 한 H & E 염색 표본을 재검색 후 전이 여부를 관찰하여 전이를 보인 환자 8예는 연구에서 배제하였다.

대상환자의 임상기록 및 수술 후 병리 조직 검사 보고를 근거로 후향적 분석을 하였으며, 추적 조사는 입원 및 외래 임상 기록지 열람과 전화 조사 및 관계기관의 협조를 얻어 시행한 주민등록 추적 조사 등을 통하여 행하였다. 모든 자료의 통계분석은 Window용 SPSS 8.0을 이용하였으며 미세전이와 다른 예후 인자들과의 상관관계는 Chi-square test를 이용하였고, 생존을 분석은 생명표 방식(Life table method)을 이용하여 처리하였다. 다변량 분석은 다중 회귀분석(Multiple Regression Analysis) 및 Cox's Propor-



Fig. 1. Microscopic finding of lymph node in gastric cancer: No cancer cells are noted (H-E, ×100).

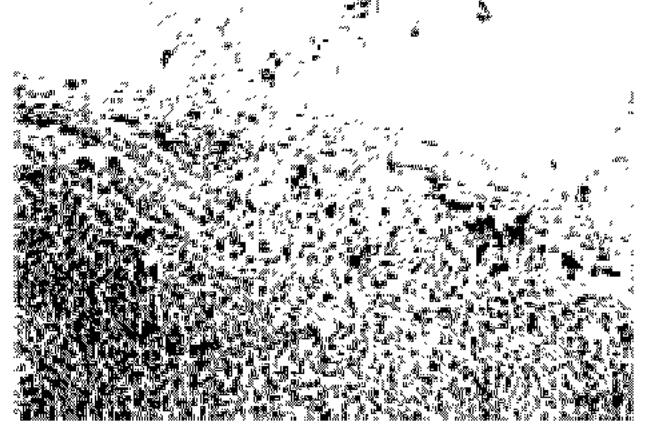


Fig. 2. Immunohistochemical finding of lymph node in gastric cancer: Many metastatic single cancer cells are noted in the subcapsular sinuses (ABC for cytokeratin, ×100).

tional Hazards Model을 이용하였다.

결 과

환자의 평균 연령은 53.6세로 26세에서 80세의 연령 분포였고 남녀비는 1.63 : 1이었다(Table 1).

전체 50명을 대상으로 면역조직화학 검사결과 양성은 19

예(38%)였으며 미세전이를 보인 림프절은 총 81개(4.1%)로 환자당 4.26개(1~15개 범위)가 확인되었다.

Lauren에 의한 위암의 조직학적 분류상 미만형 24예 중 13예(54%)에서 미세전이가 있었던 반면에 장형 26예 중 6예(23%)에서 미세전이를 보여 유의한 차이가 있었다(P=0.024)(Table 2).

원발 종양의 침윤도에 따른 분류와 병기에 따른 미세전이와의 상관관계는 장막을 침범하지 않은 stage IB 27예 중 7예(25.9%)에서 미세전이를 보인 반면 장막을 침범한 stage II 23예 중 12예(52.2%)에서 미세전이를 보여 유의한 차이를 보이지는 않았지만(P=0.053) 유의 수준을 P<0.1로 늘여 잡아 평가한다면 경계역의 유의한 차이는 있었다(P<0.1).

암세포의 림프관이나 혈관의 침습에 따른 미세전이의 상관관계는 없었다(Table 2).

Cytokeratin을 이용한 면역조직화학 검사 결과에 따른 림

Table 1. Clinicopathologic features

Characteristics	Number of patients
Mean age (range, years)	53.6 (26-80)
Gender	
Male	31
Female	19
Lauren's classification	
Intestinal	26
Diffuse	24
Depth of invasion	
Proper muscle layer (PM)	18
Subserosa (SS)	9
Serosa (SE)	23
TNM stage	
IB (T2N0M0)	27
II (T3N0M0)	23
Lymphatic invasion	
Positive	25
Negative	25
Vascular invasion	
Positive	6
Negative	44
*CK immunohistochemical staining	
Positive	19
Negative	31

*Cytokeratin

Table 2. Evaluation of cytokeratin immunohistochemical staining for lymph node micrometastases in gastric cancer

Characteristics	Cytokeratin staining		p value
	Positive	Negative	
Lauren's classification			0.024
Intestinal	6	20	
Diffuse	13	11	
TNM stage			0.053
IB (T2N0M0)	7	20	
II (T3N0M0)	12	11	
Lymphatic invasion			0.145
Positive	7	18	
Negative	12	13	
Vascular invasion			0.588
Positive	2	4	
Negative	17	27	

Table 3. Stage migration before and after immunohistochemical staining

		After			
		IB	II	IIIA	IIIB
Before					
IB (T2N0M0, n=27)	*CK (-)	20			
	CK (+)		7 (T2N1M0)		
II (T3N0M0, n=23)	CK (-)		11		
	CK (+)			8 (T3N2M0)	4 (T3N2M0)

*Cytokeratin

프절 미세전이에 의한 병기이동 현상은 7명의 환자에서 IB 병기(T2N0M0)에서 II 병기(T2N1M0)로, 8명의 환자에서 II 병기(T3N0M0)에서 IIIA 병기(T3N1M0)로, 4명의 환자에서 IIIB 병기(T3N2M0)로 이동되었다(Table 3).

다변량 분석 결과 Lauren 분류(P=0.021) 및 위벽 침윤도

(P=0.035)는 림프절 미세전이와 유의한 상관관계를 갖는 독립 인자로 밝혀졌으나, 림프관 또는 혈관 침습 등은 림프절 미세전이와 유의한 상관관계가 없었다(Table 4).

림프절의 미세전이를 보인 19예의 5년 생존율은 73.7% (평균 생존기간 96개월)로 미세전이가 없었던 31예의 96.8%

Table 4. Multivariate analysis for lymph node micrometastasis in histologic node negative gastric cancer patients

Variables	Relative risk (95% Confidence Interval)	p value
Lauren's classification	2.388 (2.0~3.2)	0.021
Depth of invasion	2.180 (1.8~3.0)	0.035
Lymphatic invasion	0.829 (0.4~1.5)	0.411
Vascular invasion	1.212 (0.6~1.6)	0.232

Table 5. Independent prognostic factors on multivariate analysis in histologic node negative gastric cancer patients

Variables	Relative risk (95% Confidence Interval)	p value
Micrometastasis	2.788 (1.4~3.5)	0.034
Lauren's classification	1.434 (0.7~2.0)	0.352
Depth of invasion	0.935 (0.4~1.6)	0.569

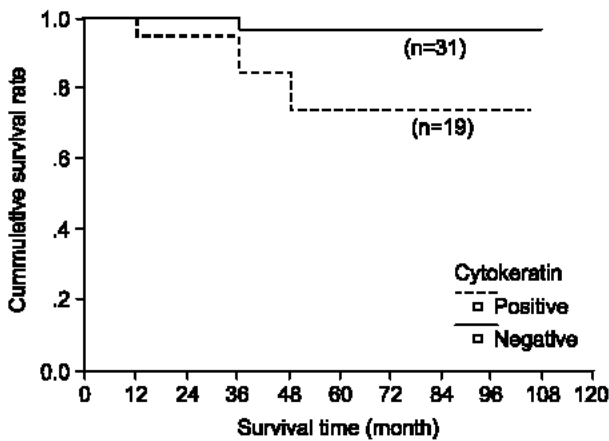


Fig. 3. Survival rates according to the lymph node micrometastasis in patients with gastric carcinoma (P=0.015).

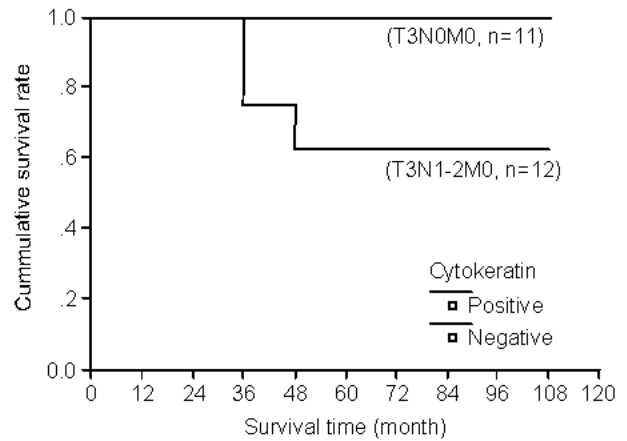


Fig. 5. Survival rates according to the lymph node micrometastasis among the stage II patients (P=0.032).

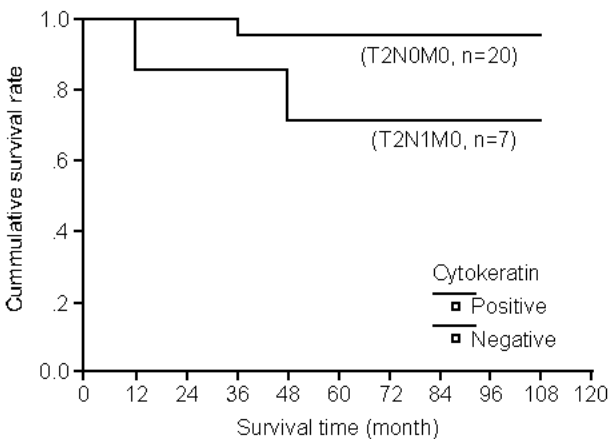


Fig. 4. Survival rates according to the lymph node micrometastasis among the stage IB patients (P=0.094).

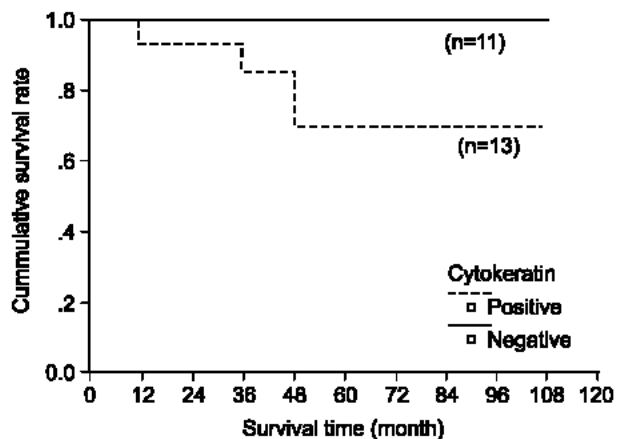


Fig. 6. Survival rates according to the lymph node micrometastasis in patients with diffuse type adenocarcinoma of the stomach (P=0.0497).

(평균 생존기간 96개월)와 유의한 차이를 보였다($P=0.015$) (Fig. 3). 이를 병기별로 보면 기존의 stage IB (T2N0M0)에 속하는 27명의 환자 중 미세전이가 발견되어 stage II (T2N1M0)로 병기 이동이 일어난 7명의 5년 생존율은 71.4%로 미세전이가 발견되지 않은 20명에서의 95%보다 낮았으며($P=0.094$)(Fig. 4), 특히 위암이 장막을 침습한 기존의 stage II (T3N0M0)에 속한 23명의 환자 중 미세전이로 인해 stage IIIA (T3N1M0) 및 IIIB (T3N2M0)로 병기 이동이 일어난 12명의 5년 생존율은 62.5%로 미세전이가 발견되지 않은 11명에서의 100%에 비해 유의하게($P=0.032$) 낮았다(Fig. 5).

Lauren 분류에 따른 미만형은 미세전이를 보인 군에서 5년 생존율 69.2%로 없었던 군의 100%보다 의미 있게 낮았다($P=0.0497$)(Fig. 6).

암세포의 림프관이나 혈관 침습이 있으면서 미세전이를 보인 군과 보이지 않은 군 간의 5년 생존율은 유의한 차이가 없었다.

Cox's Proportional Hazards Model을 이용한 다변량 분석 결과 림프절 미세전이는 생존율과 유의한($P=0.034$) 상관관계를 갖는 독립 예후 인자로 밝혀졌다(Table 5).

고 찰

원발 위암에서 림프절 광청술을 포함한 근치적 절제술 후 조직병리학적 검사에서 림프절 전이는 가장 중요한 예후 인자 중의 하나이다. 또한, 최근 연구에 의하면 조직학적으로 림프절 전이가 없었던 위암 환자에서 림프절 미세전이가 예후에 의미를 갖는 것으로 밝혀지고 있다.(13-17) 따라서 절제된 림프절의 전이 유무를 확인하는 기존의 방법으로 Hematoxylin & Eosin 염색 방법을 사용하고 있으나 이러한 방법으로는 암세포의 미세 군집은 확인하기가 어려울 뿐만 아니라 현재 사용되는 병기분류상 림프절의 전이 범위 및 개수를 검출하는 데 있어서도 한계가 있을 수 있다. 이러한 한계성은 오늘날 조기 진단 및 수술에 의해 확진된 병기상 초기 단계의 위암 환자가 증가되는 추세에서 고전적 염색 방법만으로 환자의 정확한 병기 결정이 안되어 보조적 치료 기회 상실, 재발, 생존율의 감소 등에 영향을 줄 수 있다. 그러나 최근의 면역조직화학적 염색 방법의 도입으로 기존의 조직학적 염색 방법으로 검출되지 않는 미세 전이를 검출할 수 있게 되었고 검출에 따른 보조적 치료 요법의 추가, 예후 인자로 이용 가능성 및 환자의 생존율 향상에 도움이 될 수 있으리라 생각되어 본 연구를 시행하였다.

본 연구에서는 림프절 절제(D2)를 포함한 근치적 위절제술 후 병리조직학적으로 확인된 T2-3N0M0 위암 환자 50예를 대상으로 조직화학 및 면역조직화학적 검사를 실시한 결과, H&E 염색 음성이면서 면역조직화학적 염색

양성일 경우로 정의하는 미세전이는 19예(38%)였다. 이는 Ishida 등(13)이 여러 방법 중 CAM5.2를 이용한 경우 전이를 정확히 검출하는 표식자로 가장 민감하였다고 하며 보고한 109예 중 11예(10.1%)의 미세전이 양성률 및 Maehara 등(16)의 23.5%보다 높은 수치이며, Lawrence 등(14)이 보고한 36%, Jianhui 등(18)의 34%와 유사하였다.

본 연구에서 Lauren 분류(23)에 따른 미세전이를 분석한 결과 미만형이 장형보다 유의한 차이($P<0.05$)를 보이며 높은 양성률을 나타냈다. 이러한 결과는 Ishida 등(13)의 미세전이 양성률이 미만형에서 장형에 비해 의미있게 높았다는 보고나, Lawrence 등(14)의 미만성 및 저분화 암이 미세전이와 유의한 상관관계가 있다고($P=0.05$, Chi-square) 보고한 것과 일치하며, 이러한 이유에 대하여 Becker 등(24)은 Lauren분류에 의한 미만형인 경우 adhesion molecule (E-cadherin)의 mutation이 증가하여 미세침범이 증가하는 경향이 있고 이러한 미세전이는 종양들의 세포 사이에 microadhesion의 감소로 인한 E-cadherin 발현의 dysregulation에 의한다고 설명하였다.(25)

본 연구에서 다변량 분석 결과 Lauren 분류($p=0.021$) 및 위벽 침윤도($p=0.035$)는 림프절 미세전이와 유의한 상관관계를 갖는 독립 인자로 밝혀졌으나, 림프관 또는 혈관 침습 등과는 무관하였다. 이는 림프절 미세전이 여부가 특히 Lauren 분류와 위벽 침윤도에 따라 좌우될 수 있음을 보여주는 중요한 결과라 하겠다.

림프절의 미세전이는 위암 환자의 생존율에 중요한 영향을 주는 것으로 생각되며, 본 연구에서도 림프절 미세전이를 보인 군의 5년 생존율이 미세전이가 없었던 군보다 의미있게 낮았으며($P=0.015$), 특히 병기별로는 장막 침윤을 동반하는 기존의 stage II (T3N0M0)에 속한 환자에서 미세전이가 발견된 경우 5년 생존율의 유의한 감소를 보였다($P=0.032$). 이러한 결과는 Ishida 등(13), Lawrence 등(14), Siewert 등(17)의 림프절 미세전이가 있을 경우 예후가 좋지 않았다는 보고와 일치되는 소견이다. 또한 Fukagawa (26) 등은 T2N0M0 위암 환자의 경우 근치적 위절제술(D2)을 시행한 환자에서 미세전이가 예후에 영향을 미치지 않는다는 연구 결과를 보고하였으며 이는 기존의 stage IB (T2N0M0)에 속하는 27명의 환자 중 미세전이가 발견된 7명의 5년 생존율(71.4%)이 미세전이가 발견되지 않은 20명(95%)과 유의한 차이가 없다는 저자들의 연구 결과와도 일치되었다($P=0.094$).

미세전이를 동반한 위암 환자의 생존율에 영향을 주는 인자로는 Lauren 분류에 따른 미만형에서 5년 생존율이 의미 있게 낮았으며($P=0.0497$), 또한 위암이 장막을 침습한 환자에서 미세전이가 발견된 경우(T3N1-2M0) 5년 생존율이 62.5%로 미세전이를 보이지 않았던 군(T3N0M0)의 100%보다 유의하게 낮았다($P=0.032$).

기존의 여러 연구(1-7) 결과에서 보듯이 위암 환자에서

위벽 침윤도는 림프절 전이 여부와 함께 중요한 독립 예후 인자로 밝혀져 있으나 본 연구에서는 생존율과 연관된 예후 인자들에 대한 다변량 분석 결과 림프절 미세전이만이 생존율과 유의한 상관관계를 갖는 독립 예후 인자로 밝혀졌다. 이는 본 연구의 대상 환자가 적었던 점과 대상 환자가 일부 환자(T2-3N0M0)로만 제한된 점 등에 기인한 결과로 추정되며 향후 더 많은 환자를 대상으로 한 연구가 필요할 것으로 사료된다.

본 연구와 비교해 볼 때, Maehara 등(16)이 조기위암의 병기결정과 예후를 정확히 결정하기 위하여 면역조직화학 염색을 시행할 것을 제한한 점, Siewert 등(17)이 일상적으로 시행하는 조직검사에 림프절 전이의 증거가 없었던(pN0) 국소 림프절 내에서도 다수의 종양세포가 검출되기 때문에 국소 림프절의 절제로 이러한 종양 세포를 감소시킬 수 있고 예후를 증진시킬 수 있으므로 위암 환자의 수술 시 초기 단계의 림프절 전이에 대한 D2 림프절 광청술의 시행을 강력히 주장한 것이나, Ishida 등(13)이 림프절의 미세전이는 위암 환자의 예후를 결정하는 필수적인 요소라고 한 보고들과 본 연구의 결과가 일치한다고 하겠다.

결 론

본 연구에서 D2 림프절 절제를 포함한 근치적 위절제술을 시행 후 병리조직학적으로 확인된 T2-3N0M0 위암 환자 50예를 대상으로 조직화학 및 면역조직화학적 검사를 실시한 결과 H&E 염색 음성인면서 면역조직화학적 염색 양성일 경우로 정의하는 미세전이는 19예(38%)였다. 미세전이는 Lauren 분류에 의한 미만형과 위벽 침윤이 깊을수록 증가하는 경향이 있었으며, 특히 다변량 분석 결과 Lauren 분류 및 위벽 침윤도는 림프절 미세전리와 유의한 상관관계를 갖는 독립 인자였다. 생존율과 연관된 다변량 분석 결과 림프절 미세전이는 생존율과 유의한 상관관계를 갖는 독립 예후 인자로 밝혀졌다.

이상과 같이 미세전이가 발견된 환자의 경우 5년 생존율이 의미 있게 낮았으며, 일상적인 H&E 염색에서 림프절 전이가 없었던 위암 환자에서도 면역조직화학적 검사로는 림프절 미세전이를 발견할 수 있어 이에 따른 예후를 예측할 수 있다는 점을 고려할 때, 특히 고위험 근위층 이상을 침범한 위암 환자에서 일상적인 H&E 염색으로 림프절 전이를 발견하지 못한 경우 림프절 미세전이의 발견을 위한 면역조직화학적 검사가 유용할 것으로 생각된다.

또한 미만형이나 저분화 암인 경우 림프절 미세전이의 동반 가능성이 상대적으로 높으므로 수술 전 진단이 조기 위암으로 예상되어도 광범위한 림프절 광청술이 필요할 것으로 생각되며, 미세전이에 대한 면역조직화학 검사 결과가 보조 항암화학요법 시행 여부의 결정에도 도움을 줄

수 있을 것으로 생각된다.

REFERENCES

1. Maruyama K. The most important prognostic factors for gastric cancer patients. A study using univariate and multivariate analyses. *Scand J Gastroenterol* 1987;22(suppl 133):63-68.
2. Msika S, Chastang C, Houry S, Lacaine F, Huguier M. Lymph node involvement as the only prognostic factor in curative resected gastric carcinoma: a multivariate analysis. *World J Surg* 1989;13:118-123.
3. Noguchi M, Miyazaki I. Prognostic significance and surgical management of lymph node metastases in gastric cancer. *Br J Surg* 1996;83:156-161.
4. Kim WS, Noh SH, Kim YI, Ryu CH, Kim CB, Min JS, Lee KS. Analysis of prognostic factors in gastric cancer patients treated with total gastrectomies. *J Korean Surg Soc* 1997; 53:36-47.
5. Lim CW, Park KK, Lee MH, Kim IS, Ahn JE. The prognostic factors according to results of surgical treated gastric cancer. *J Korean Surg Soc* 1994;47:489-500.
6. Ahn SP, Park YK, Chi KC, Chang IT. Analysis of prognostic factors in 448 gastric cancer patients treated with a gastric resection. *J Korean Surg Soc* 1999;57:684-692.
7. Siewert JR, Bottcher K, Stein HJ, Roder JD. Relevant prognostic factors in gastric cancer. Ten-year results of the German Gastric Cancer Study. *Ann Surg* 1998;228:449-461.
8. Park KK, Lim CW, Lee MH, Lee MS, Hur KY, Moon C, et al. Is there any survival difference between the prior and new UICC TNM classification for gastric cancer. 3rd International Gastric Cancer Congress 1999;401-404.
9. Lee JH, Kim SJ, Yu HJ, Yang HK, Kim JP. Ratio of involved lymph nodes to resected lymph nodes as a prognostic factor of gastric cancer. *J Korean Surg Soc* 1998;55:76-83.
10. Baba H, Korenaga D, Okamura T, Saito A, Sugimachi K. Prognostic factors in gastric cancer with serosal invasion. Univariate and multivariate analyses. *Arch Surg* 1989;124:1061-1064.
11. Boku T, Nakane Y, Minoura T, Takada H, Yamamura M, Hioki K, et al. Prognostic significance of serosal invasion and free intraperitoneal cancer cell in gastric cancer. *Br J Surg* 1990;77:436-439.
12. Mori M, Mimori K, Inoue H, Barnard GF, Tsuji K, Nanbara S, et al. Detection of cancer micrometastases in lymph nodes by reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *Cancer Res* 1995;55:3417-3420.
13. Ishida K, Katsuyama T, Sugiyama A, Kawasaki S. Immunohistochemical evaluation of lymph node micrometastases from gastric carcinomas. *Cancer* 1997;79:1069-1076.
14. Harrison LE, Choe JK, Goldstein M, Meridian A, Kim SH, Clarke K. Prognostic significance of immunohistochemical micrometastases in node negative gastric cancer patients. *J*

- Surg Oncol 2000;73:153-157.
15. Maehara Y, Baba H, Ohno S, Sugimachi K. Cytokeratin staining reveals micrometastases in lymph node of early gastric cancer[Letter]. *Surgery* 1995;117:480.
 16. Maehara Y, Oshiro T, Endo K, Baba H, Oda S, Ichiyoshi Y, et al. Clinical significance of occult micrometastases in lymph nodes from patients with early gastric cancer who died of recurrence. *Surgery* 1996;119:397-402.
 17. Siewert JR, Kestlmeier R, Busch R, Böttcher K, Röder D, Müller J, et al. Benefits of D2 lymph node dissection for patients with gastric cancer and pN0 and pN1 lymph node metastases. *Br J Surg* 1996;83:1144-1147.
 18. Cai J, Ikeguchi M, Maeta M, Kaibara N. Micrometastasis in lymph nodes and microinvasion of the muscularis propria in primary lesions of submucosal gastric cancer. *Surgery* 2000; 127:32-39.
 19. Hayashi N, Arakawa H, Nagase H, Yanagisawa A, Kato Y, Ohta H, et al. Genetic diagnosis identifies occult lymph node metastases undetectable by the histopathologic method. *Cancer Res* 1994;54:3853-3856.
 20. Izbicki JR, Hosch SB, Pichlmeier U, Rehders A, Busch C, Niendorf A, et al. Prognostic value of immunohistochemically identifiable tumor cells in lymph nodes of patients with completely resected esophageal cancer. *N Engl J Med* 1997; 337:1188-1194.
 21. Natsugoe S, Mueller J, Stein HJ, Feith M, Hofler H, Siewert JR, et al. Micrometastases and tumor cell microinvolvement of lymph nodes from esophageal squamous cell carcinoma: Frequency, associated tumor characteristics and impact on prognosis. *Cancer* 1998;83:858-866.
 22. Jeffers MD, O'Dowd GM, Mulcahy H, Stagg M, O'Donoghue DP, Toner M, et al. The prognostic significance of immunohistochemically detected lymph node micrometastases in colorectal carcinoma. *J Pathol* 1994;172:183-187.
 23. Lauren P. The two histological main types of gastric carcinoma: diffuse and so-called intestinal type carcinoma. *Acta Path Microbiol Scand* 1965;64:31.
 24. Becker KF, Atkinson MJ, Reih U, Becker I, Nekkarda H, Siewert JR, et al. E-cadherin gene mutations provide clues to diffuse type gastric carcinomas. *Cancer Res* 1994;54:3845-3852.
 25. Shimoyama Y, Hirohashi S. Expression of E- and P-cadherin in gastric carcinomas. *Cancer Res* 1991;51:2185-2192.
 26. Fukagawa T, Sasako M, Mann GB, Sano T, Katai H, Maruyama K, Nakanishi Y, Shimoda T. Immunohistochemically detected micrometastases of the lymph nodes in patients with gastric carcinoma. *Cancer* 2001;92:753-760.
-