

□ 원 저 □

Human Lung Cancer에서 면역세포화학적 방법을 이용한 Tumor Angiogenesis에 관한 연구

이화여자대학교 의과대학 내과학교실, 해부병리학교실*, 연세대학교 의과대학 암센터**

천선희, 김성숙*, 라선영**, 정현철**

= Abstract =

A study of Tumor Angiogenesis in Human Lung Cancer
by Immunohistochemical Stain

Seon Hee Cheon, M.D., Sung Sook Kim*, M.D.,
Sun Young Rha**, M.D., Hyun Cheol Chung**, M.D.

Department of Internal Medicine, Department of Pathology*,
Ewha Womans University, College of Medicine, Seoul, Korea. Yonsei Cancer Center**,
Yonsei University, College of Medicine, Seoul, Korea.

Background : Tumor angiogenesis is the growth of new vessels toward and within tumor. It has been demonstrated that the growth of tumor beyond a certain size requires angiogenesis and it is closely involved in tumor progression and metastasis. The finding that intensity of neovascularization correlates independently with metastasis may lead to identification of patients in whom radical surgery should be supplemented by systemic treatment.

Method : We have collected paraffin blocks of bronchoscopic biopsy of patients with non-small cell lung cancer. We highlighted the vessel by staining endothelial cell with JC70 monoclonal antibody(to CD31) immunohistochemically and counted microvessels under 200 X field using light microscopy.

Results :

- 1) The mean microvessel count was 32.7 ± 20.8 (9-96) in total 29 cases.
- 2) There were no correlations between microvessel counts and pathologic cell type, T staging, node metastasis(N) and hematogenous metastasis(M) ($p > 0.05$).
- 3) The median follow-up duration was 15 months(2-46) and there was no correlation between the microvessel counts and survival rate of lung cancer patients ($p > 0.05$).

* 본 논문은 1996년도 이화여자대학교 교수 연구비의 보조로 이루어 졌음.

Conclusion : Tumor angiogenesis seems to be an important prognostic factor suggesting the probability of metastasis. But the microvessel count in the bronchoscopic biopsy specimen was inadequate and very limited. There has been no data about angiogenesis of lung cancer in Korea yet. So the study of tumor angiogenesis using resected lung tumor specimen would be demanded.

Key Words : angiogenesis, microvessel count, lung cancer.

서 론

원발성 폐암은 다른 종류의 종양에 비하여 빈번하게 혈성 전이를 잘 하며 아직까지도 치료성이 매우 불량하다. 또한 세포유전학적 분자생물학적 연구의 결과도 다양하여 종양발생 및 진행에 관한 세포학적 연구 결과가 충분하지 못한 상태로 진단 및 치료경과의 관찰에 이용될 수 있는 명백한 생물학적 근거를 가진 새로운 예후인자를 필요로 하고 있다.

Tumor angiogenesis란 종양 내에서 및 종양을 향한 새로운 혈관 증식을 말하는 것으로 암의 증식과 전이의 원인이 되며^{1,3)}, 혈성전이의 기전은 확실하게 밝혀져 있지 않으나 단계적으로 발생될 것으로 생각되고 이러한 단계의 초기에 angiogenesis의 역할이 중요할 것으로 생각되고 있다⁴⁾.

몇가지 연구들, 주로 유방암⁵⁻⁸⁾과 전립선암^{9,10)}에서 암세포 조직 내에서의 angiogenesis의 정도와 전이의 상관관계가 보고 되었으며, 나아가서 angiogenesis의 정도가 독립적인 중요한 예후인자라고 보고되었다.

본 연구는 인체 폐암 조직에서 angiogenesis의 정도를 측정하여 폐암의 조직학적 종류, 병기, 임파선 전이, 혈성 전이와의 상관관계를 살펴보고, angiogenesis의 예후인자로서의 가치를 평가하고자 하였다.

대상 및 방법

1. 대상

연구대상은 1990년 1월 부터 1994년 12월 까지 이화여대 부속 동대문병원에서 원발성폐암으로 진단 받고 치료성적 및 생존여부를 알고 있는 환자중 비소세포폐암(non-small cell lung cancer) 환자를 대상으로 기관지내시경(fiberoptic bronchoscopy) 조직의 paraffin embedded block을 확인하여 슬라이드를 제작하였다.

2. 방법

5um 두께로 만든 슬라이드를 탈파라핀(deparaffinization)하기 위하여 xylene에 각각 10분 씩 3회에 걸쳐 통과시킨 다음 100%, 90%, 80% 및 70% ethanol에 각각 2회, 5분씩 담가서 함수화(rehydration)를 시키고 PBS(Gibco Laboratories, Grand Island, NY)에 세척하였다. 조직내에 포함되어 있는 neutrophil등이 갖고 있는 endogenous peroxidase activity를 제거하기 위하여 3 % H2O2 5 ul를 첨가한 50 ml methanol에 5분간 담근 후 PBS에 세척하였다.

탈파라핀화된 슬라이드를 endothelium(혈관내피세포)에 대한 표지자(marker)인 CD31의 항체로 monoclonal JC70(Dako, Denmark)¹¹⁾을 사용하여 LSAB kit(Dako, Denmark)를 이용하여 염색하였다.

절편된 슬라이드에 일차항체(primary antibody)로 monoclonal mouse anti-CD31 IgG(Dako, Denmark) 1:200 희석액을 100 μ l 점적하고 실온에서 30분간 반응시킨 후 PBS에 5분씩 3회 세척하고, 이차항체(secondary antibody)인 biotinylated anti mouse IgG antibody(Dako, Denmark) 1:200 희석액을 100 μ l 점적한 후 humid chamber에 넣고 실온에서 10분간 반응시켰다. PBS에 5분씩 3회 세척하고 peroxidase conjugated streptavidin reagent 용액을 100 μ l씩 점적한 후 실온에서 10분간 반응시키고 PBS에 5분씩 3회 세척하였다. 세척이 끝난 슬라이드를 DAB (3'-3'-diaminobenzidine ; Dako, Denmark) 용액에 담그어 2내지 10분간 발색을 본후 증류수에 10분간 세척하고 공기중에 건조시켰다. Methyl green으로 counter stain한 후 수성 media로 포매하였다.

3. 판독

염색된 슬라이드 중 저배율에서 혈관생성(neovascularization)이 가장 현저한 부위를 골라 현미경 200배율(0.723 mm²)에서 CD31에 대한 항체에 양성을 보이는 곳을 endothelial cell로 인식하여 microvessel의 수를 측정하였다.

4. 통계처리

생존률은 Kaplan-Meier Method를 이용하여 1년 생존률 및 2년 생존률을 구하였으며, 각 군별 생존률의 유의성 여부는 Log-rank test를 이용하였다.

결 과

CD31은 주로 혈관내피세포의 세포질이나 세포막에서 관찰되었다. 그러나 전체 57예의 기관지 내시경 조직 중에서 29예 만이 microvessel count가 가능하여 이 29예만을 대상으로 평가하였다.

이들 29예에서 microvessel의 수는 현미경하 200배율에서 9개에서 96개 까지 평균 32.7 ± 20.8 개 였는데, 조직학적 유형에 따라 편평상피세포암(epidermoid carcinoma) 17예에서 32.4 ± 17.1 개, 선암(adeno carcinoma) 11예에서 34.2 ± 26.9 개, 대세포암(large cell carcinoma) 1예가 22개로 특별한 차이가 없었다($p > 0.05$), (Table 1), (Fig 1).

Table 1. Microvessel Counts in Tumor according to Cell Type

	No.	Mean \pm SD	Range
Total	29	32.7 ± 20.8	(9 - 96)
Epidermoid	17	32.4 ± 17.1	(10 - 65)
Adeno	11	34.2 ± 26.9	(9 - 96)
Large	1	22.0	(22)

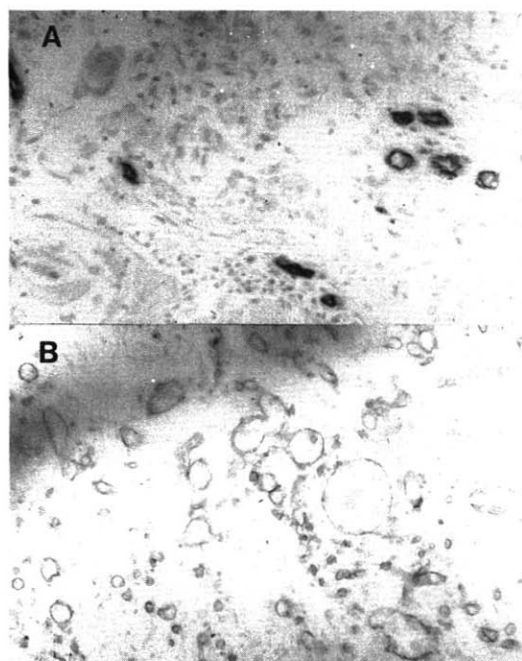


Fig. 1. Staining of lung tumor with CD31; Blood vessels were highlighted for CD31 with the use of the modified ABC method.

A. Example of low vascularization (X 200)

B. Example of high vascularization (X 200)

TNM staging에 따라 microvessel의 수를 비교하여 보았을때 T1은 12.5 ± 5.0 개로 T2 30.7 ± 16.7 개, T3 35.3 ± 18.3 개, T4 36.4 ± 26.0 개에 비하여 microvessel의 수가 비교적 상당히 적었으나 2예로 예수가 적었고 다른 T staging간에 특별한 차이를 볼 수 없었으며, N0, N1, N2 및 N3 간에도 별다른 차이가 없었다. M0는 33.5 ± 21.1 개였으며 M1은 29.7 ± 20.9 로 역시 차이가 없었다($p > 0.05$), (Table 2). Stage I, II, IIIa, IIIb 및 IV 간에도 유의한 차이가 없었다($p > 0.05$), (Table 3).

Table 2. Microvessel Counts in Tumor of each Grade.

	No	Mean \pm SD	Range
Factor T1	2	12.5 ± 5.0	(9 - 16)
T2	9	30.7 ± 16.7	(12 - 62)
T3	7	35.3 ± 18.3	(13 - 65)
T4	11	36.4 ± 26.0	(10 - 96)
Factor N0	3	41.3 ± 24.5	(16 - 65)
N1	4	31.0 ± 19.1	(13 - 48)
N2	11	26.3 ± 17.8	(9 - 62)
N3	11	37.4 ± 24.5	(13 - 96)
Factor M0	23	33.5 ± 21.1	(9 - 96)
M1	6	29.7 ± 20.9	(13 - 68)

Table 3. Microvessel Counts in Tumor according to Stage

	No	Mean \pm SD	Range
Stage I	1	16	(16)
II	2	30.0 ± 24.0	(13 - 47)
IIIa	10	36.2 ± 19.3	(9 - 65)
IIIb	10	33.2 ± 24.7	(10 - 96)
IV	6	29.7 ± 20.9	(13 - 68)

대상환자의 평균 추적기간은 15 개월(2-46 개월) 이었다. 전체환자를 microvessel 수가 20개 이상인 군(20예)과 20개 이하인 군(9예)으로 나누어

생존률을 비교하여 본 결과 1년 생존률은 20개 이상인 군 50%, 20개 이하인 군 46%, 2년 생존률은 20개 이상인 군 30%, 20개 이하인 군 0%로 microvessel 수에 따른 유의한 차이가 없었다($p > 0.05$).

고 안

Tumor angiogenesis란 종양 내에서 및 종양을 향한 새로운 혈관증식을 말하는 것으로, 정상 조직에 비하여 종양내에서 endothelium의 증식은 30-40배 빠르다¹²⁾. 새로운 암세포가 10^6 개 정도의 크기가 되었을때 이것이 더 큰 크기로 확장되려면 새로운 혈관의 증식을 필요로 하게된다¹⁾. 신생혈관은 암조직에 산소와 영양분을 공급하고 acid와 toxic metabolites를 제거하여 암세포의 성장을 촉진시키며 또한 증식된 혈관을 따라서 암세포가 혈류(circulation) 내로 들어갈 수 있게되고 전이(metastasis)도 발생할 수 있게된다¹³⁾. Angiogenesis의 유도는 암세포와 흔히 대식세포에서 유리되는 angiogenic molecule에 의하여 매개되고 prevascular phase와 vascular phase의 두 단계에 거쳐 발생된다^{3,14-16)}. Prevascular phase는 수년간 지속될 수 있으며 암세포가 host stroma를 국소적으로 침입하는 것으로 암의 성장이 제한되어 전이는 거의 발생되지 않는다. 그러나 vascular phase 시에는 암세포가 혈관(blood vessel)이나 임파관(lymphatics)으로 침투하고 암의 성장속도가 빨라져 출혈이나 전이가 발생할 수 있다. 따라서 angiogenesis 없이는 vascular phase로 들어갈 수 없다.

형성전이의 기전은 확실하게 밝혀져 있지 않으나 단계적으로 발생될 것으로 생각되고, 이러한 단계의 초기에 angiogenesis의 역할이 중요할 것으로 생각되고 있다⁴⁾. 암세포가 전이를 일으키기 위해서는 몇가지 growth factor나 cytokine을 분비하

고 이에 반응할 뿐만 아니라 일련의 장벽들을 뚫고 들어가야 한다^{17,18)}.

우선 암세포가 원발암 부위의 혈관에 접근하여야 하며 순환하면서 살아남아야 하고 목표기관의 소혈관에 다달하여 다시 떨어져 나와 조직내에서 증식할 수 있어야 한다. 새롭게 증식되는 혈관은 fragmented basement membrane을 가지고 있어 성숙된 혈관에 비하여 암세포의 침투가 용이하다¹³⁾.

증식하는 혈관 선단에 위치하는 endothelial cell은 collagenase와 plasminogen activator와 같은 degradative enzyme을 분비하여 암세포를 주변 신생혈관으로 쉽게 떨어져 나오게 한다¹⁹⁾. 따라서 angiogenesis 없이는 혈성전이 일어날 수 없다. 인체종양에서 angiogenesis의 정도가 전이의 가능성을 예견할 수 있다는 첫 증거는 1986년 cutaneous melanoma에서 보고되었다²⁰⁾. 이후 1991년 Weidner등⁵⁾은 49예의 원발성 침윤성 유방암(primary invasive breast carcinoma) 조직에서 factor VIII-related antigen (F8-RA)으로 endothelium을 염색하여 angiogenesis의 정도로 측정한 micro-vessel의 density와 액외부 임파선 및 원격지 전이정도는 통계학적으로 유의한 상관관계가 있다고 밝혀 angiogenesis 정도의 측정이 초기 유방암 환자에서도 적극적인 치료를 요하는 환자를 선택하는데 도움이 된다고 하였다. 이러한 사실은 다시 Bosari등⁶⁾, Kaldjian등⁷⁾, Horak등⁸⁾에 의하여 역시 유방암을 대상으로 확증되었으며, Weidner등⁹⁾, Wakui등¹⁰⁾에 의하여 전립선암을 대상으로 확증되었다.

Machialini등²¹⁾은 87예의 T1N0M0 non-small cell lung cancer(NSCLC)를 대상으로 factor VIII을 이용하여 microvessel을 염색하여 microvessel density를 측정하고 microvessel의 수를 측정하여 angiogenesis가 암의 전이와 아주 유의하게 상관관계가 있으며 전이의 유일한 독립적인 예후측정 인자라고 하였다. microvessel을 현미경 200 X 하에서

측정하여 radical surgery 이후 평균 8년간 경과관찰 하였을때 microvessel의 수가 0-9개인 경우 6/65(9.2%)예가 전이되었으며, microvessel의 수가 10-19개인 경우 10/16(62.5%)예가 전이되었고, microvessel의 수가 20-30개인 경우 6/6(100%)예가 전이되어 NSCLC에서 angiogenesis의 정도가 원격전이의 가능성을 예견할 수 있다고 하였다. Yamazaki등²²⁾은 폐 선암(adenocarcinoma)에서 factor VIII을 이용하여 endothelial cell을 염색하여 현미경하 200 X 에서 microvessel을 측정하여 폐절제술후 재발(relapse)한 환자의 microvessel count는 75.4 ± 64.3 개로 술후 5년간 재발되지 않았던 환자의 42.6 ± 26.0 개에 비하여 유의하게 높았다고 하였으며, 임파선 전이의 정도와는 특별한 차이가 없었고, angiogenesis는 모든 stage의 폐 선암에서 임파선 전이나 암의 크기와 상관없이 수술 후 재발 및 혈성 전이와 유의한 상관관계가 있다고 하였다. 폐암을 대상으로 한 angiogenesis에 관한 연구에서 Machialini등²¹⁾은 200 X 배율 하에서 microvessel count를 30개 까지 보고한 반면, Yamazaki등²²⁾의 연구에서는 평균 66.8 ± 54.4 개로 훨씬 angiogenesis의 정도가 심한데 이는 Machialini등²¹⁾은 T1N0M0의 NSCLC를 대상으로한 반면 Yamazaki등²²⁾은 여러 병기의 선암만을 대상으로한 연유로 생각되며, 이는 폐암 중에서도 역시 선암이 가장 전이가 잘 되는 이유가 아닌가도 생각된다.

Weidner등⁵⁾은 유방암과 전립선암을 대상으로 한 연구에서 현미경하 200 X 배율에서 microvessel의 수를 측정하여 100개 이상인 경우에는 100%에서 전이가 되었다고 하였으나 Yamazaki등²²⁾이 폐 선암을 대상으로한 연구에서는 90개 이상인 경우에 80%에서 전이가 되었고 microvessel count가 150개인 한 예의 경우에는 재발이나 전이 없이 술 후 5년 이상 경과되었다고 보고하였다. 또한 pulmonary calcinoid tumor는 풍부한 혈관증식을 가

지고 있으나 거의 원격전이가 되는 예는 없어²³⁾, 암의 전이는 tumor angiogenesis 뿐 아니라 angiogenesis와 관련이 없는 다른 요인들 즉, 주변의 basement membrane에 도달하는 능력이나 adhesion molecule, 면역작용등과도 관련이 있을 것이라고 생각되고 있다^{24,25)}. 새로운 혈관증식은 암의 전이를 보장하는 것 보다는 허락한다고 볼 수 있으며, 일단 길이 열리면 전이의 발생 유무는 시간에 달려있다고 할 수 있다. 따라서 다른 요인들도 관련이 있겠으나 여러 연구 결과들을 종합해 볼 때 angiogenesis가 수술 후 원격 전이와의 상관관계가 가장 크므로 수술 후 얻어진 암 조직에서 angiogenesis의 정도를 측정할 수 있다면 수술 후에 부파적인 다른 치료를 요하는 환자를 선택하는데 도움을 얻을 수 있을 것으로 생각된다.

암세포가 주변의 임파선에 전이되기 위해서는 혈성전이와 유사한 과정을 거치는데 주변의 장벽을 뚫고 stroma의 임파관에 침투하여 따라서 흐르다 hilum이나 mediastinum의 주변 임파선으로 퍼진다. 혈관과 달리 임파관은 basement membrane이 없으므로 암세포의 침투가 더욱 용이하다²⁶⁾. Bosari등⁶⁾과 Horak등⁸⁾의 유방암을 대상으로한 연구에서 액와부 임파선 전이가 있는 환자는 임파선 전이가 없는 환자에 비하여 현저히 높은 microvessel 수를 보이는데 반하여 Yamazaki등²²⁾의 연구에서 폐암은 임파선 전이와 microvessel 수 간에 유의한 의의를 보이지 않았다. 이는 물론 암 조직이나 병기에 따른 차이도 있겠으나 암은 암 조직 내에 혈관과는 달리 새로운 임파관은 형성하지 않으며 임파관이 angiogenesis와는 다른 기전에 의하여 형성되는 것으로 생각되고 있다²⁷⁾.

본 연구에서는 기관지내시경을 통하여 얻은 폐암의 조직검사 조직을 endothelial cell에 현재까지 가장 예민한 표지자로 알려져 있으며 paraffin 조직에서도 잘 염색된다고 보고되어있는 CD31에

대한 JC70 Ab¹¹⁾를 사용하여 염색하였는데, CD31은 endoCAM-1(endothelial cell adhesion molecule) 혹은 PECAM-1(platelet/endothelial cell adhesion molecule)이라고 알려진 cell adhesion molecule이다. 그러나 조직검사 조직은 조직의 크기가 작고 충분한 stroma가 없어 실질적으로 angiogenesis를 측정할 수 있었던 슬라이드는 염색한 57예중 51%인 29예 뿐이었으며, 현미경하 200배율에서 측정된 microvessel count의 수는 9개에서 96개까지 평균 32.7 ± 20.8 개 었었다. 기관지내시경 조직과 수술 후 적출된 조직에서의 angiogenesis 비교가 가능하였던 3예(data not shown)가 있었는데, 한예는 stage II의 선암으로 microvessel count는 내시경 조직이 47개, 수술 조직이 64개, 다른 한예는 역시 stage II 선암으로 내시경 조직 13개, 수술 조직 23개, Stage IIIa 편평상피암에서는 내시경 조직 17개, 수술조직 43개로 내시경 조직에 비하여 수술 후 적출된 암 조직에서 측정된 microvessel의 수가 현저히 높았다. 따라서 내시경 조직은 작고 충분한 stroma를 갖고 있지 않으므로 암조직 자체의 heterogeneity를 감안한다고 하더라도 중앙부위에 비하여 microvessel 수가 훨씬 떨어져서 그 암을 평가할 수 있는 조직이라고 볼 수가 없었다. 본 연구에서는 내시경 조직에서 측정된 microvessel의 수와 병기, 임파선 전이, 혈성 전이와의 어떤 상관관계도 살펴볼 수 없었고 또한 생존률과의 관계도 찾아볼 수가 없었으며 이는 내시경 조직이 그 암을 대표하는 조직이 될 수 없었기 때문으로 생각된다. 그러나 다른 연구들을 토대로 살펴볼때 tumor angiogenesis는 재발 및 혈성 전이의 가능성을 시사하는 중요한 예후 예측인자이며, 아직까지는 우리나라에서 폐암에서의 angiogenesis에 관한 연구가 없는 상태로 수술 조직을 이용한 연구가 다시 필요할 것으로 생각된다.

요 약

연구배경 : Tumor angiogenesis란 종양 내에서 및 종양을 향한 새로운 혈관 증식을 말하는 것으로 암의 증식과 전이의 원인이 되며, 주로 유방암과 전립선암에서 암세포 조직 내에서의 angiogenesis와 전이의 상관관계가 보고되었으며, angiogenesis의 정도가 암의 독립적인 중요한 예후인자로 보고되었다. 본 연구는 폐암 조직에서 angiogenesis의 정도를 측정하여 예후인자로서의 가치를 평가하고자 하였다.

방법 : 1990년 1월 부터 1994년 12월 까지 이화여대 부속 동대문병원에서 원발성 폐암으로 진단 받고 치료성적 및 생존여부를 알고 있는 비소세포 폐암(non-small cell lung cancer) 환자의 기관지내시경 조직의 paraffin embedded block을 이용하여 CD31에 대한 antibody인 JC70을 사용하여 면역세포화학적 방법으로 endothelial cell을 염색하였다.

결과 :

1) 전체 29예에서 microvessel의 수는 32.7 ± 20.8 (9-96) 개 었다.

2) Microvessel의 수와 폐암의 조직학적 유형, T staging 간에는 유의한 상관관계가 없었으며, 임파선 전이(N staging) 및 혈성 전이(M staging)와도 관계가 없었다($p > 0.05$).

3) 대상환자의 평균 추적기간은 15개월(2-46)로 microvessel의 수가 20개 이상인 군(20예)과 이하인(9예) 군으로 나누어 보았을때 1년 생존률 각각 50%, 46%, 2년 생존률 각각 30%, 0%로 유의한 차이가 없었다($p > 0.05$).

결론 : Tumor angiogenesis는 임파선 및 원발 전이의 가능성을 시사하는 중요한 예후 예측인자일 것으로 생각되나 폐암의 기관지내시경 조직검사 조직을 이용하여서 angiogenesis의 정도를 측정하는 것은 조직이 적절하지 못하고 측정이 제한적

이었으며, 아직까지는 우리나라에서 폐암에서의 angiogenesis에 관한 연구가 없는 상태로 수술조직을 이용한 더 많은 연구가 필요할 것으로 생각된다.

참 고 문 헌

- 1) Folkman J : What is the evidence that tumors are angiogenesis dependence ? J Natl Cancer Inst 82 : 4, 1990
- 2) Mahadevan V, Hart JR : Metastasis and angiogenesis. Acta Oncol 29 : 97, 1990
- 3) Folkman J, Watson K, Ingber D, Hanahan D : Introduction of angiogenesis during the transition from hyperplasia to neoplasia. Nature 339 : 58, 1989
- 4) Liotta LA, Steeg PS, Stetler-Stevenson WG : Cancer metastasis and angiogenesis : an imbalance of positive and negative regulation. 64 : 327, 1991
- 5) Weidner N, Semple JP, Welch WR, Folkman J : Tumor angiogenesis and metastasis-correlation in invasive breast carcinoma. N Eng J Med 324 : 1, 1991
- 6) Bosari S, Lee AKC, DeLellis RA, Heatley G, Wiley B, Silverman ML : Microvessel quantitation and prognosis in invasive breast carcinoma. Hum Pathol 23 : 755, 1992
- 7) Kaldjian E, Jin L, Lloyd R : Immunohistochemical analysis of breast carcinoma : correlation of estrogen and progesteron receptors, proliferative activity, tumor vascularity, and lymph node metastasis. Mod Pathol 5 : 14a, 1992
- 8) Horak E, Leek R, Klenk N, LeJeune S, Smith K, Stuart N, Greenall M, Stepniowska K, Harris

- AL : Angiogenesis assessed by platelet/ endothelial cell adhesion molecules antibodies, as an indicator of node metastasis and survival in breast cancer. *Lancet* **340** : 1120, 1992
- 9) Weidner N, Carroll PR, Flax J, Blumenfeld W, Foldman J : Tumor angiogenesis corellates with metastasis in invasive prostate carcinoma. *Am J Pathol* **143** : 401, 1993
 - 10) Wakuli S, Furusato M, Itoh T, Sasaki H, Akiyama A, Kinoshita I : Tumor angiogenesis in prostate carcinoma with and without bone marrow metastasis. A morphologic study. *J Pathol* **168** : 257, 1992
 - 11) Parums D, Cordell J, Micklem K, Heryet A, Gatter K, Mason D : JC70 : a new monoclonal antibody that detects vascular endothelium associated antigen on routinely processed tissue sections. *J Clin Pathol* **43** : 752, 1990
 - 12) Fox SB, Gatter KC, Bicknell R, Going JJ, Stanton P, Cooke TG, Harris AL : Ralationship of Endothelial cell proliferation to tumor vascularity in human breast cancer. *Cancer Res* **53** : 4161, 1993
 - 13) Nagy JA, Brown LF, Senger DR, Lanir N, Water NVD, Dvorak AM : Pathogenesis of tumor stroma generation : a clinical role for leaky blood vessels and fibrin deposition. *Biochim Biophys Acta* **948** : 305, 1988
 - 14) Sillman F, Boyce J, Fruchter R : The significance of atypical vessels and neovascularization in cervical neoplasia. *Am J Obstet Gynecol* **139** : 154, 1981
 - 15) Chodak GW, Haudenschild C, Gittes RF, Folkman J : Angiogenic activity as a marker of neoplastic and of preneoplastic lesions of the human bladder. *Ann Surg* **192** : 762, 1980
 - 16) Jensen HM, Chen I, DeVault MR, Lewis AR : Angiogenesis induced by normal human breast tissue : a probable marker for precancer. *Science* **218** : 293, 1982
 - 17) Fidler IJ, Gersten DM, Hart IR : The biology of cancer invasion and metastasis. *Adv Caner Res* **28** : 149, 1978
 - 18) Nicholson GL : Cancer metastasis. *Sci Am* **240** : 66, 1979
 - 19) Moscatelli D, Gross JL, Rifkin DB : Angiogenic factors stimulate plasminogen activator and collagenase production by capillary endothelial cells. *J Cell Biol* **91** : 201a, 1981
 - 20) 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* **22** : 1205, 1986
 - 21) Macchiarini P, Fontanini G, Hardin MJ, Squartini F, Angeletti CA : Relation of neovascularisation to metastasis of non-small cell lung cancer. *Lancet* **340** : 145, 1992
 - 22) Yamazaki K, Abe S, Takekawa H, Sukoh Noriaki, Watanabe N, Ogura S, Nakajima I, Isobe H, Inoue K, Kawakami Y : Tumor angiogenesis in human lung adenocarcinoma. *Cancer* **74** : 2245, 1994
 - 23) Gould VE, Linnoila L, Memoii VA, Warren WH : Neuroendocrine components of the bronchopulmonary tract : hyperplasias, dysplasias, and neoplasms. *Lab Invest* **49** : 519, 1983
 - 24) Sukoh N, Abe S, Nakajima I, Ogura S, Isobe H, Inoue K : Immunohistochemical distributious of cathepsin B and basement membrane antigens

- in human lung adenocarcinoma association with invasion and metastasis. Virchows Arch **424** : 33, 1994
- 25) Nakajima I : Immunohistochemical study of the extracellular matrix in non-small cell lung cancer : relation to lymph node metastasis and prognosis. Hokaido J Med Sci **66** : 356, 1991
- 26) Liotta LA, Rao CN, Barsky SH : Tumor invasion and the extracellular matrix. Lab Invest **49** : 636, 1983
-