
장액성 삼출액의 도말 표본에서 반응성 중피세포와 샘암종 세포의 감별에 중피세포 표지자의 유용성

인제대학교 의과대학 동래백병원, 부산백병원,¹ 병리과

최 수 임 · 강 미 선¹

= Abstract =

The Diagnostic Utility of Mesothelial Markers in Distinguishing between Reactive Mesothelial Cell and Adenocarcinoma Cells in Serous Effusions with Cytospin Preparation

Sooim Choi, M.D. and Mi Sun Kang, M.D.¹

Department of Pathology, Dongrae Paik Hospital and Pusan Paik Hospital,¹
Inje University, College of Medicine,

Evaluation of serous effusions can include immunocytochemical stains that differentiate reactive mesothelial cell from adenocarcinoma cell. Among several positive mesothelial cell markers, we used desmin, CK5/6, WT1 and calretinin all known to have high sensitivity and specificity as selective mesothelial cell markers. We studied smears obtained with cytospin from 15 malignant and eight benign effusions. The mesothelial cells were positively stained by desmin, CK5/6, WT1 and calretinin in 60.9%, 29.1%, 26.7% and 56.5%, respectively among 8 benign and 15 malignant effusions; the adenocarcinoma cells were positively stained 6.7%, 13.3%, 1.0% and 0.0%, respectively among 15 malignant effusions. The percentage of positively stained mesothelial cells were somewhat lower for all antibodies compared to the results of previous studies. This was likely due to the differences in preparation methods and fixatives among studies. In conclusion, the use of desmin and calretinin were more valuable than CK5/6 and WT1 for distinguishing between reactive mesothelial cell and adenocarcinoma cells in serous effusion; however, choice of the proper preparation methods and fixatives are also important

Key words: Effusion, Desmin, CK5/6, WT1, Calretinin, Cytospin preparation

논문접수 : 2006년 2월 28일
게재승인 : 2006년 8월 19일

책임저자 : 최 수 임

주 소 : (609-819), 부산광역시 금정구 부곡3동 223-83, 인제대학교 의과대학 동래백병원 병리과

전 화 : 051-607-8278

팩 스 : 051-512-2966

E-mail address : withsooim@yahoo.co.kr

본 논문은 2002년도 인제대학교 학술연구조성비 보조에 의한 것임

서 론

체강내 삼출액의 세포학적 검사에서 반응성 중피세포와 샘암종 세포의 구별을 위한 세포학적 기준은 잘 밝혀져 있지만, 실제적으로 이들의 감별은 매우 힘든 경우가 있고 이를 위해서는 점액질을 위한 특수염색을 하거나 면역세포화학 염색을 시행한다.^{1,2} 이전에는 중피세포의 확인을 위한 일차 항체가 거의 없어서 대부분 CEA, BerEP4, B72.3, LeuM1, cytokeratin 및 E-cadherin 같은 샘암종의 확인을 위한 일차 항체에 음성반응을 보이는 것을 중피세포로 해석하였으나, 현재는 중피세포에 양성 반응을 보이는 것으로 알려진 vimentin, CA19-9, HBME-1, thrombomodulin, CD44s, N-cadherin, calretinin, desmin, CK5/6 및 WT-1에 대한 항체를 이용하여 면역세포화학 염색을 시행하며^{3,4} 최근에는 이들 외에도 podoplanin이나 D2-40등의 중피세포에 대한 항체가 보고 되고 있다.⁵

이 중에서 desmin은 중피세포에서 cytokeratin 및 vimentin과 함께 동시에 발현되는 것이 알려진 이후⁶ 샘암종과의 감별에 있어서 53.3~100%의 감수성과 32~100%의 특이성을 보이는 것으로 보고 되고 있다.⁷ CK5/6은 악성중피종에서 관찰되는 세포뼈대성분으로 보고된 이래⁸ 악성중피종과 샘암종을 감별하는 데에 53.1~100%의 감수성과 75.0~100%의 특이성을 보이는 것으로 알려졌으나,⁹⁻¹¹ 체강삼출액이나 조직에서 반응성 중피세포에 대한 연구는 아직 없다. WT-1은 원래 윌름즈 종양에서 밝혀진 종양표지자인데 악성중피종의 표지자로 알려진 이후¹² 주로 악성 중피종과 샘암종의 감별에서 11.1~100%의 감수성과 77.3~100%의 특이성을 보이고 반응성 중피세포에 대한 소수의 연구에서 67.7~100%의 감수성을 보인다고 보고 되어 있다.¹³⁻¹⁶ Calretinin은 원래 신경조직에서 발견되었으나, 여러 면역조직화학적 연구에서 중피세포의 증식이 있을 때 샘암종과의 감별에서 27.3~100%의 감수성과 42.9~100%의 특이성을 보이는 것으로 알려져 있다.^{17,18}

이에 본 연구에서는 cytospin 방법을 이용한 체강삼출액의 세포검사서 중피세포의 표지자로 알려진 desmin, calretinin, CK5/6 및 WT1에 대한 면역세포화학 염색을 시행하여 형태학적 소견만으로는 감별이 힘든 샘암종과의 감별에 있어서 이 표지자들의 유용성을 조사하고자 하였다.

재료 및 방법

연구재료

2003년 12월부터 2004년 9월까지 부산 백병원 병리과에 의뢰된 흉강 및 복강의 삼출액의 세포 검사에서 분명한 샘암종 세포로 진단된 예 중 조직생검이나 절제를 통하여 조직학적으로 원발병소가 증명된 15예와 임상소견상 악성 질환을 발견할 수 없고 반응성 질환으로 증명되었던 8예를 대상으로 하였다.

연구 방법

임상 및 병리학적 검색

대상 환자들의 임상병력지와 병리보고서를 재검토하여 체강내에 전이한 암종의 원발부위를 조사하였고 양성 반응성 삼출액의 경우에는 기존 질환들을 조사하였다. 악성 삼출액의 경우에 원발 부위는 폐 5예, 난소 2예, 유방 2예, 췌장 2예, 위 1예, 대장 1예, 담낭 1예 및 불명 1예 이었다.

세포 도말과 cytospin을 이용한 슬라이드 제작

이들은 임상외에 의해 천자되어 그 일부가 신선한 상태로 병리과에 의뢰되었으며 5분간 1500rpm으로 원심분리과정을 거친 후 4장의 세포 도말 슬라이드와 5장 이상의 cytospin 슬라이드를 제작하였다. 이들 중 1장의 세포 도말 슬라이드는 H-E 염색을 시행하였고 3장의 세포 도말 슬라이드와 1장의 cytospin 슬라이드는 Pap 염색을 시행하여 광학현미경하에서 검경하여 반응성 중피세포와 샘암종 세포의 진단기준에 따라 악성 삼출액임을 확인하였다. 검체 1~2cc를 cytocentrifuge를 이용하여 5장의 슬라이드를 만들어 에틸 알코올(95%)에 즉시 담귀 보관하였다.

면역세포화학 염색

각각의 슬라이드를 아세톤에 담구어 10분간 전처리 후 흐르는 물에 수세하고 H₂O₂ (0.5%)에 10분간 처리한 후 일차 항체로 desmin (DAKO, USA)를 1:50으로, calretinin (DAKO, USA)를 1:100으로, cytokeratin 5/6 (DAKO, USA)를 1:100으로, 그리고 WT1 (Novocastra, UK)를 1:100으로 희석하여 1시간동안 반응시켰다. EnVision (DAKO, USA)을 1시간동안 반응시키고 ACE 색소원을 발색 시킨 후 Mayer's 헤마톡실린으로 대조

염색하고 crystal mount로 봉입하였다.

결과 판독

악성 삼출액에서 샘암종 세포와 주변의 반응성 중피세포에서 각각 양성 여부를 판정하였고, 양성 삼출액에서도 중피세포에서의 양성반응 여부를 조사하였다. Desmin과 CK5/6은 세포질에 적색으로 염색되는 것을 양성으로 하였고, calretinin과 WT1은 핵에 적색으로 염색되는 것을 관찰하였으며 한 개라도 양성반응을 보이는 것을 양성으로 하였다.

결 과

Desmin에 대한 면역세포화학 염색 소견

Desmin은 양성 삼출액 8예 중 5예 (62.5%)의 반응성 중피세포의 세포질에서 양성반응을 보였고 (Fig. 1), 악성 삼출액 15예 중 1예 (6.7%)에서 소수의 샘암종 세포에서 약하게 양성반응을 보였다 (p=0.0037) (Table 1).

CK5/6에 대한 면역세포화학 염색 소견

CK5/6은 양성 삼출액 8예 중 3예 (37.5%)의 반응성 중피세포의 세포질에서 양성반응을 보였고 (Fig. 1), 악성 삼출액 15예 중 2예 (13.3%)에서 소수의 샘암종 세포에서 양성반응을 보였다 (p=0.1808) (Table 1).

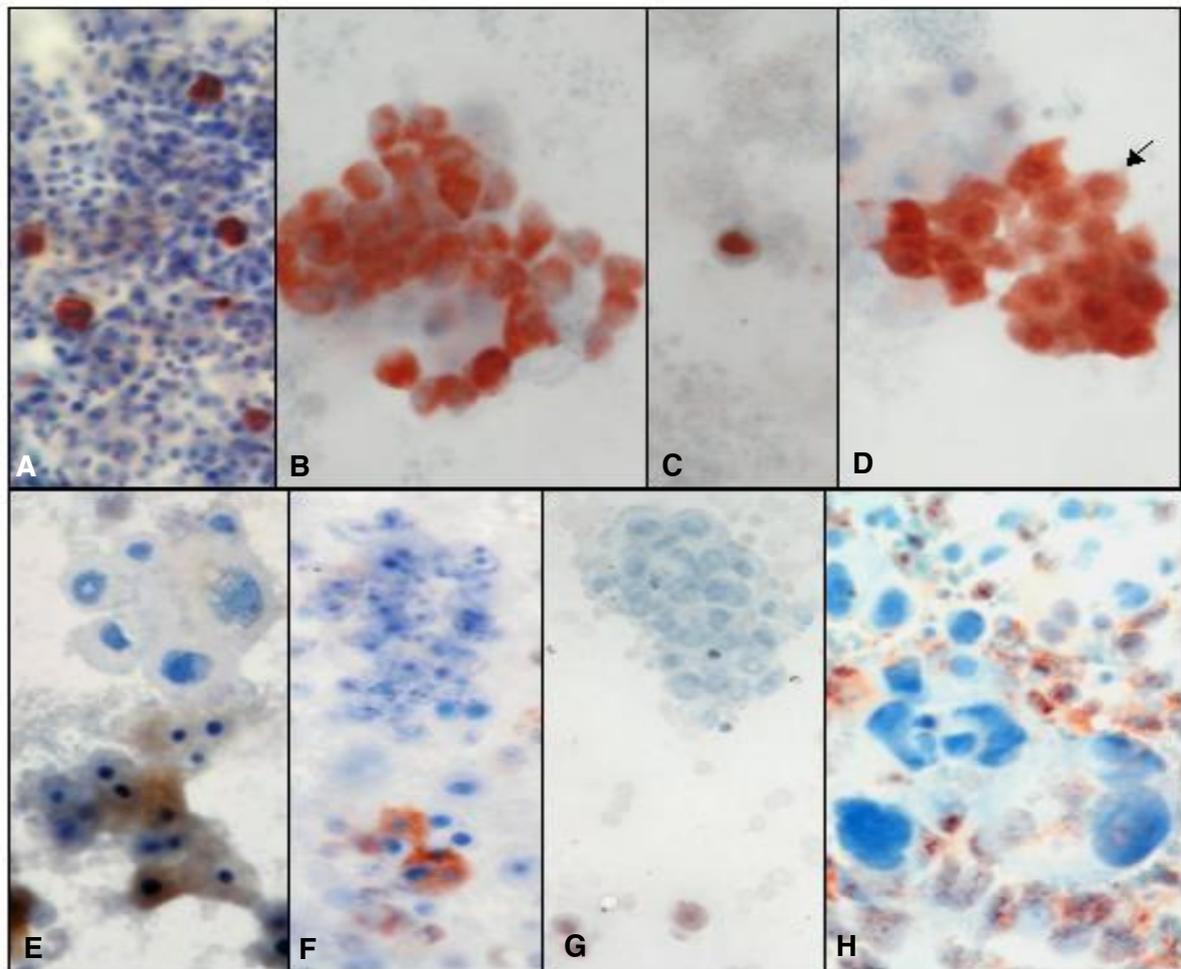


Fig. 1. Mesothelial cells were positively stained by desmin (A), CK5/6 (B), WT1 (C) and calretinin (D). Note the nuclear stain in C and D (arrow). Adenocarcinoma cells were negatively stained by desmin (E), CK5/6 (F), WT1 (G) and calretinin (H).

Table 1. Expression of mesothelial markers in serous effusions.

	Desmin (%)	CK5/6 (%)	WT1 (%)	Calretinin (%)
RM (8)	5 (62.5)	3 (37.5)	1 (12.5)	6 (75.0)
ACA (15)	1 (6.7)	2 (13.3)	1 (6.7)	0 (0.0)
p-value	0.0037	0.1808	0.6363	<0.0001

RM: Reactive mesothelial cell, ACA: adenocarcinoma

WT1에 대한 면역세포화학 염색 소견

WT1은 양성 삼출액 8예 중 1예 (12.5%)의 반응성 중피세포의 핵에서 양성반응을 보였고 (Fig. 1), 악성 삼출액 15예 중 1예 (6.7%)에서 소수의 샘암종 세포에서 약하게 양성반응을 보였다 (p=0.6363) (Table 1).

Calretinin에 대한 면역세포화학 염색 소견

Calretinin은 양성 삼출액 8예 중 6예 (75.0%)의 반응성 중피세포의 핵에서 양성반응을 보였고 (Fig. 1), 악성 삼출액 15예 모두 핵에서 양성반응을 보이는 샘암종 세포는 없었다 (p<0.0001) (Table 1). 반응성 중피세포의 경우에는 핵에서 양성인 경우에는 모두 세포질에서도 양성 반응을 보였으며, 샘암종 세포에서는 핵과 세포질 모두 양성반응을 보이는 경우가 없었다.

고 찰

체강 삼출액의 세포 검사에서 중피세포는 여러 가지 염증성 병변이나 양성 병변에서도 증식을 하여 세포의 변형을 나타내고 때로는 악성 중피세포나 전이성 상피암 세포와 비슷한 양상을 보이기도 한다. 이런 반응성 중피세포와 악성 세포는 통상의 형태학적 소견만으로는 구별이 어려워져 여러 가지 특수 염색, 면역세포화학 염색, 전자현미경 검색, 흐름세포측정 등의 여러 가지 보조적인 방법들이 연구되어있다.² 면역세포화학 염색으로 반응성 중피 세포와 악성 상피세포를 감별하려 할 때 중피세포에 양성반응을 보이는 것으로 알려진 표지자로는 mesothelin, thrombomodulin (CD141), HBME-1, CD44s, N-Cadherin, desmin, CK5/6, WT-1, calretinin 등이 있고 그 외에 D2-40이나

podoplanin 등이 연구되고 있다.⁵

Thrombomodulin은 악성 중피종과 샘암종에서 각각 52~96%와 5.0~56%,^{11,19} mesothelin은 8.6~100%와 46.2~52.3%²⁰ HBME-1은 8.6~100%와 9.0~100%,²¹ CD44s는 69~73%와 28.0~48.0%,²² vimentin은 75~100%와 4.4~100.0%,^{21,23} 그리고 N-cadherin은 35.0~100%와 0~48%의²⁴ 양성율을 보여서 음성일 경우에는 중피세포가 아닐 가능성이 많지만 샘암종에서도 비교적 높은 양성율을 보이므로 샘암종과의 감별에 있어서는 그 유용성이 떨어진다. 본 연구에서는 중피세포와 샘암종의 감별에 있어서 비교적 감수성과 특이성이 높은 것으로 알려진 중피세포의 양성 표지자들 중에서 desmin, calretinin, CK5/6 및 WT1을 이용하였다.

Desmin은 세포 블럭이나^{24,25,27} 조직을 이용한 지금까지의 연구에서는^{28,29} 반응성 중피세포에서 84~100% (평균 86.1%)와 샘암종에서 0~68% (평균 7.9%)의 양성율을 보였고 세포도말이나 cytospin을 이용한 연구에서는¹⁴ 반응성 중피세포에서 53~100% (평균 93.3%)와 샘암종에서 0~20% (평균 5.5%)의 양성율을 보였는데, 본 연구에서는 반응성 중피세포에서 62.5%, 샘암종에서 6.7%의 양성율을 보여서 (p=0.0037) 이전의 연구들 보다 낮은 양성율을 보이지만, 일단 양성 반응을 보이는 경우에는 샘암종의 가능성이 적은 것으로 생각할 수 있었다. 그러나 desmin은 반응성 중피세포에서는 양성율이 높지만 악성 중피종에서는 비교적 낮은 양성율을 보이는 것으로 되어 있어서 (0~21.9%)^{24,26,29} 악성 중피종과 샘암종의 감별에 있어서는 그 유용성이 떨어진다.

Cytokeratin은 중피 세포에서 고분자량 및 저분자량 cytokeratin이 발현된다고 알려져 있는데 이들은 여러 종류의 상피암에서도 양성 반응을 보인다. 다양한 분자량의 cytokeratin 중에서 CK5가 중피세포에 존재함이 1989년 동결조직을 이용한 연구에서 증명되었고³⁰ 이후 1997년부터 상업적으로 사용가능한 CK5/6을 이용한 연구들이 있었는데 모두 조직절편을 이용한 연구들이었고 삼출액을 이용한 연구는 아직 보고된 것이 없다. 지금까지의 연구로는 반응성 중피세포에 대한 것은 없고, 악성 중피종의 53.1~100% (평균 78.1%)와 샘암종의 0~25% (평균 13.5%)가 양성반응을 보인다고 한다.^{9-11,16,19,31,32} 본 연구에서는 반응성 중피세포의 37.5%와 샘암종 세포의 13.3%가 양성반응을 보여서 (p=0.1808), 중피세포에서의 양성율이 조직을 이용

한 연구에서 보다 현저하게 떨어지는 것으로 나타났는데, 이것은 본 연구가 알코올에 고정된 cytospin 검체를 이용한 것이어서 아마도 고정액이 다른 것이거나 어느 정도의 공기 건조 등이 그 차이의 원인으로 생각된다.

WT1은 원래 윌름즈 종양에서 발견된 종양유전자로써 1995년에 Amin등이 중피세포에서도 발현됨을 보고하였다.¹² 악성 중피종과 샘암종의 감별을 위한 여러 연구 결과를 보면 악성 중피종 20~100% (78.1%),^{12,14-16,33,34} 반응성 중피세포 100%,¹⁴ 샘암종 0~22.7% (평균 13.5%)에서^{13-16,33} 양성반응을 보였는데 본 연구에서는 반응성 중피세포의 21.7%에서 양성반응을 보였고 샘암종에서는 모두 음성이었다 ($p=0.3391$). 이는 이전의 연구보다 현저하게 낮은 양성율인데 고정액의 차이가 이의 원인으로 생각되며, WT-1은 대부분의 샘암종에서는 양성율이 낮지만 난소의 장액성 암종의 경우에 양성율이 높으므로 (83.3~91.2%),^{14,22,34} 난소암이 의심되는 경우에는 중피세포와의 감별에 유용하지 않다.

Calretinin은 원래 망막을 비롯한 신경계에서 발견되는 칼슘 결합 단백질로서 1996년 Gotzos와³⁵ Doglioni 등이³⁶ 각각 악성 중피종에서 발현됨을 보고한 이래 악성 중피종이나 반응성 중피세포와 전이성 샘암종의 감별을 위한 연구에 가장 많이 이용되는 일차 항체이다. 이것은 조직이나 세포 블럭을 이용한 연구에서는 반응성 중피세포에서 27.3~100% (평균 85.7%),^{17,23,33,37-40} 샘암종에서 0~70.0% (16.0%)의 양성율을 보이고,^{9,11,13,15,16,19,31,33,35,36,40-45} 세포도말이나 cytospin을 이용한 연구에서는 반응성 중피세포에서 83~100% (평균 96.1%),^{18,36,46-48} 샘암종에서 0~30.8% (12.3%)의 양성율을 보이는 것으로 되어 있다.^{18,36,41,46-48} 이 calretinin은 연구에 따라 양성율이 크게 차이가 나는데 그 원인은 일차 항체의 종류에 따라서 양성율의 차이가 커서 anti-human 항체가 anti-guinea pig 항체보다 양성율이 높은 것으로 되어 있으며,⁴³ 세포질 뿐 아니라 핵에서도 양성 반응을 보여서, 세포질에서의 염색은 샘암종에서도 0~70%까지 높은 양성율을 보인다.³³ 세포질과 핵에서의 양성율을 비교한 연구를 보면 샘암종 세포의 세포질에서의 양성율은 13.3~57.1% 이고 핵에서의 양성율은 0~13.3%로써^{31,38,39} 중피세포와 샘암종의 감별에 있어서는 핵에서의 양성반응을 비교하는 것이 중요하다. 본 연구에서는 핵에 염색된 것만을 양성으로 하였는데, 반응성 중피세포의 75.0%에서 양

성반응을 보였는데 이들은 대부분 세포질에서도 양성 반응을 보였고 샘암종 세포에서는 핵과 세포질 모두에서 음성이어서 ($p<0.0001$) 핵과 세포질에서의 염색 양상이 차이가 나지 않는 것으로 생각되고, 양성율이 낮기는 하지만 일단 양성 반응을 보이는 경우에는 샘암종의 가능성이 적은 것으로 생각할 수 있다.

면역염색을 이용한 연구에서는 그 결과에 영향을 미치는 인자들이 많이 있는데, 예를 들면 단클론이거나 다클론인 일차 항체의 종류, 열처리나 단백질 분해 효소등에 의한 항원 회수 방법 및, 염색된 양상을 해석하는 방법 등에 따라 결과가 달라질 수 있다. 또한 조직 절편을 이용한 연구와 달리 장액성 삼출액을 이용한 연구에서는 그 이외에도 검체의 처리 방법, 고정액의 종류, 검체의 보존 기간과 방법 등에 따라서도 결과가 달라질 수 있다. 예를 들어서 desmin의 경우, pronase처리를 하면 알코올에 고정된 조직에서만 항원의 소실이 있고 pronase 처리를 하지 않는 경우에는 알코올을 제외한 포르말린이나 Zenker, Bouin, B5등에 고정된 경우에 항원 소실이 있어서 고정액의 종류가 중요하고,²⁸ 세포 도말의 경우에는 아세톤에 고정하는 것이 좋은 결과를 얻는 데에 결정적인 요소가 된다. Calretinin의 경우에는 탈염색된 세포 도말 표본을 이용해서 염색을 한 경우에는 모두 세포질에만 염색이 되고 포르말린에 고정된 조직절편이나 세포블럭을 이용해서 염색을 한 경우에는 세포질과 핵에 모두 양성 반응을 보이며, calretinin이나 WT1은 사후 검체에서는 염색이 되지 않거나 양성율이 감소하고 고정이 중요하다라는 보고가 있고^{13,33} 특히 WT1은 고정된 조직에서도 절편의 가장자리와 고정액의 침투가 어려운 조직의 중심부에서의 양성율이 차이가 나는 것으로 보아 고정의 과정이 중요한 것으로 보인다.^{15,33}

장액성 삼출액에서 반응성 중피세포와 샘암종을 감별해야 할 경우 여러 가지의 검체 처리 방법을 사용할 수가 있는데 검체의 양이 많을 경우에는 포르말린에 고정된 세포 블럭을 이용하는 것이 기존에 익숙한 형태의 세포 모양과 염색양상을 관찰할 수 있고 여러 개의 절편을 만들어서 여러 가지 면역염색을 시행하는 것이 가능하기 때문에 제일 좋은 방법으로 생각이 되지만 검체가 적거나 검체내 세포의 양이 적을 경우에는 탈염색된 세포도말 표본이나 cytospin을 이용한 세포도말 표본을 이용하거나 음성으로 면역 염색된 슬라이드에 다른 일차 항체를 다시 염색하는 방법 등을 이용할 수가 있다. 하지만 삼출액은 단백질이 많은

검체이어서 주변으로 비특이 염색이 많이 되어 해석에 어려움이 많아서 검체의 양이 적은 경우를 제외하고는 세포 블럭을 이용하는 것이 더 좋다. 본 연구는 cytopsin을 이용한 세포도말 표본을 알코올에 고정된 후 그대로 보관하였다가 면역염색을 시행하였고 포르말린에 고정된 세포 블럭은 이용을 하지 않았기 때문에 열처리에 의한 항원 회수 방법은 사용하지 않았다. 그러나 CK5/6과 WT-1의 양성율이 기존의 조직 절편을 이용한 연구에서보다 현저하게 낮은 결과를 보인 것은 장액성 삼출액의 세포 도말을 이용한 연구가 보고된 것이 없기 때문에 비교할 수는 없지만 아마도 고정액의 차이 때문일 것으로 추정된다.

결 론

결론적으로 장액성 삼출액에서 반응성 중피세포와 샘암종 세포의 감별을 위해 면역세포화학 염색을 시행할 경우에 세포 도말이나 cytopsin을 이용한 검사는 세포 블럭을 이용한 경우보다 양성율이 떨어질 수가 있고, 중피세포의 확인을 위한 표지자로는 calretinin과 desmin이 CK5/6이나 WT1보다는 유용한 것으로 생각된다.

참 고 문 헌

- Atkinson BF. Atlas of diagnostic cytopathology. 2nd Ed. Philadelphia: W.B. Saunders. 2003; 205-23.
- Hammar SP, Bockus DE, Remington FL, Rohrbach KA. Mucin-positive epithelial mesotheliomas: a histochemical, immunohistochemical, and ultrastructural comparison with mucin-producing pulmonary adenocarcinomas. *Ultrastruct Pathol* 1996;20:293-325.
- Ordonez NG. Immunohistochemical diagnosis of epithelioid mesothelioma: an update. *Arch Pathol Lab Med* 2005;129:1407-14.
- King JE, Thatcher N, Pickering CA, Hasleton PS. Sensitivity and specificity of immunohistochemical markers used in the diagnosis of epithelioid mesothelioma: a detailed systematic analysis using published data. *Histopathology* 2006;48:223-32.
- Ordonez NG. D2-40 and podoplanin are highly specific and sensitive immunohistochemical markers of epithelioid malignant mesothelioma. *Hum Pathol* 2005;36:372-80.
- Van Muijen GN, Ruiter DJ, Warnaar SO. Coexpression of intermediate filament polypeptides in human fetal and adult tissues. *Lab Invest* 1987;57:359-69.
- Chen LM, Lazcano O, Katzmann JA, Kimlinger TK, Li CY. The role of conventional cytology, immunocytochemistry, and flow cytometric DNA ploidy in the evaluation of body cavity fluids: a prospective study of 52 patients. *Am J Clin Pathol* 1998;109:712-21.
- Blobel GA, Moll R, Franke WW, Kayser KW, Gould VE. The intermediate filament cytoskeleton of malignant mesotheliomas and its diagnostic significance. *Am J Pathol* 1985;121:235-47.
- Clover J, Oates J, Edwards C. Anti-cytokeratin5/6: a positive marker for epithelioid mesothelioma. *Histopathology* 1997;31:140-3.
- Ordonez NG. Value of cytokeratin 5/6 immunostaining in distinguishing epithelial mesothelioma of the pleura from lung adenocarcinoma. *Am J Surg Pathol* 1998;22:1215-21.
- Carella R, Deleonardi G, D'Errico A, et al. Immunohistochemical panels for differentiating epithelial malignant mesothelioma from lung adenocarcinoma: a study with logistic regression analysis. *Am J Surg Pathol* 2001;25:43-50.
- Amin KM, Litzky LA, Smythe WR, et al. Wilms' tumor 1 susceptibility (WT1) gene products are selectively expressed in malignant mesothelioma. *Am J Pathol* 1995;146:344-56.
- Roberts F, McCall AE, Burnett RA. Malignant mesothelioma: a comparison of biopsy and postmortem material by light microscopy and immunohistochemistry. *J Clin Pathol* 2001;54:766-70.
- Hecht JL, Lee BH, Pinkus JL, Pinkus GS. The value of Wilms tumor susceptibility gene 1 in cytologic preparations as a marker for malignant mesothelioma. *Cancer* 2002;96:105-9.
- Foster MR, Johnson JE, Olson SJ, Allred DC. Immunohistochemical analysis of nuclear versus cytoplasmic staining of WT1 in malignant mesotheliomas and primary pulmonary adenocarcinomas. *Arch Pathol Lab Med* 2001;125:1316-20.
- Ordonez NG. The immunohistochemical diagnosis of mesothelioma: a comparative study of epithelioid mesothelioma and lung adenocarcinoma. *Am J Surg Pathol* 2003;27:1031-51.
- Wieczorek TJ, Krane JF. Diagnostic utility of calretinin immunohistochemistry in cytologic cell block preparations. *Cancer* 2000;90:312-9.
- Fetsch PA, Simsir A, Brosky K, Abati A. Comparison of three commonly used cytologic preparations in effusion immunocytochemistry. *Diagn Cytopathol* 2002;26:61-6.
- Miettinen M, Sarlomo-Rikala M. Expression of calretinin, thrombomodulin, keratin5, and mesothelin in lung

- carcinomas of different types: an immunohistochemical analysis of 596 tumors in comparison with epithelioid mesotheliomas of the pleura. *Am J Surg Pathol* 2003; 27:150-8.
20. Ordonez NG. Value of mesothelin immunostaining in the diagnosis of mesothelioma. *Mod Pathol* 2003;16:192-7.
 21. Gonzalez-Lois C, Ballestin C, Sotelo MT, Lopez-Rios F, Garcia-Prats MD, Villena V. Combined use of novel epithelial (MOC-31) and mesothelial (HBME-1) immunohistochemical markers for optimal first line diagnostic distinction between mesothelioma and metastatic carcinoma in pleura. *Histopathology* 2001;38:528-34.
 22. Ordonez NG. Value of thyroid transcription factor-1, E-cadherin, BG8, WT1, and CD44S immunostaining in distinguishing epithelial pleural mesothelioma from pulmonary and nonpulmonary adenocarcinoma. *Am J Surg Pathol* 2000;24:598-606.
 23. Roberts F, Harper CM, Downie I, Burnett RA. Immunohistochemical analysis still has a limited role in the diagnosis of malignant mesothelioma. A study of thirteen antibodies. *Am J Clin Pathol* 2001;116:253-62.
 24. Davidson B, Nielsen S, Christensen J, et al. The role of desmin and N-cadherin in effusion cytology: a comparative study using established markers of mesothelial and epithelial cells. *Am J Surg Pathol* 2001;25:1405-12.
 25. Gill SA, Meier PA, Kendall BS. Use of desmin immunohistochemistry to distinguish between mesothelial cells and carcinoma in serous fluid cell block preparations. *Acta Cytol* 2000;44:976-80.
 26. Afify AM, Al-Khafaji BM, Paulino AF, Davila RM. Diagnostic use of muscle markers in the cytologic evaluation of serous fluids. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2002;10:178-82.
 27. Kang DY, Son JH. The utility of desmin in differentiation between reactive mesothelial cells, malignant mesothelioma cells and metastatic adenocarcinoma cells in serous effusions. *Kor J Cytopathol* 2003;14: suppl 1. 45. Abstr.
 28. Truong LD, Rangaeng S, Cagle P, Ro JY, Hawkins H, Font RL. The diagnostic utility of desmin. A study of 584 cases and review of the literature. *Am J Clin Pathol* 1990; 93: 305-14.
 29. Attanoos RL, Griffin A, Gibbs AR. The use of immunohistochemistry in distinguishing reactive from neoplastic mesothelium. A novel use for desmin and comparative evaluation with epithelial membrane antigen, p53, platelet-derived growth factor-receptor, P-glycoprotein and Bcl-2. *Histopathology* 2003;43:231-8.
 30. Moll R, Dhouailly D, Sun TT. Expression of keratin 5 as a distinctive feature of epithelial and biphasic mesotheliomas. An immunohistochemical study using monoclonal antibody AE14. *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol* 1989;58:129-45.
 31. Cury PM, Butcher DN, Fisher C, Corrin B, Nicholson AG. Value of the mesothelium-associated antibodies thrombomodulin, cytokeratin 5/6, calretinin, and CD44H in distinguishing epithelioid pleural mesothelioma from adenocarcinoma metastatic to the pleura. *Mod Pathol* 2000;13:107-12.
 32. Chu PG, Weiss LM. Expression of cytokeratin 5/6 in epithelial neoplasms: an immunohistochemical study of 509 cases. *Mod Pathol* 2002;15:6-10.
 33. Oates J, Edwards C. HBME-1, MOC-31, WT1 and calretinin: an assessment of recently described markers for mesothelioma and adenocarcinoma. *Histopathology* 2000;36:341-7.
 34. Hwang H, Quenneville L, Yaziji H, Gown AM. Wilms tumor gene product: sensitive and contextually specific marker of serous carcinomas of ovarian surface epithelial origin. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2004;12:122-6.
 35. Gotzos V, Vogt P, Celio MR. The calcium binding protein calretinin is a selective marker for malignant pleural mesotheliomas of the epithelial type. *Pathol Res Pract* 1996;192:137-47.
 36. Doglioni C, Tos AP, Laurino L, et al. Calretinin: a novel immunocytochemical marker for mesothelioma. *Am J Surg Pathol* 1996;20:1037-46.
 37. Leers MP, Aarts MM, Theunissen PH. E-cadherin and calretinin: a useful combination of immunochemical markers for differentiation between mesothelioma and metastatic adenocarcinoma. *Histopathology* 1998;32:209-16.
 38. Chhieng DC, Yee H, Schaefer D, et al. Calretinin staining pattern aids in the differentiation of mesothelioma from adenocarcinoma in serous effusions. *Cancer* 2000;90: 194-200.
 39. Simsir A, Fetsch P, Abati A. Calretinin immunostaining in benign and malignant pleural effusions. *Diagn Cytopathol* 2001;24:149-52.
 40. Kim BH. Utility of calretinin in distinction between benign reactive mesothelial and carcinoma cells in serous effusions. *Kor J Cytopathol* 2001;12:89-95
 41. Barberis MC, Faleri M, Veronese S, Casadio C, Viale G. Calretinin. A selective marker of normal and neoplastic mesothelial cells in serous effusions. *Acta Cytol* 1997;41: 1757-61.
 42. Riera JR, Astengo-Osuna C, Longmate JA, Battifora H. The immunohistochemical diagnostic panel for epithelial mesothelioma: a reevaluation after heat-induced epitope retrieval. *Am J Surg Pathol* 1997;21:1409-19.

43. Ordonez NG. Value of calretinin immunostaining in differentiating epithelial mesothelioma from lung adenocarcinoma. *Mod Pathol* 1998;11:929-33.
44. Brockstedt U, Gulyas M, Dobra K, Dejmek A, Hjerpe A. An optimized battery of eight antibodies that can distinguish most cases of epithelial mesothelioma from adenocarcinoma. *Am J Clin Pathol* 2000;114:203-9.
45. Ko EC, Jhala NC, Shultz JJ, Chhieng DC. Use of a panel of markers in the differential diagnosis of adenocarcinoma and reactive mesothelial cells in fluid cytology. *Am J Clin Pathol* 2001;116:709-15.
46. Nagel H, Hemmerlein B, Ruschenburg I, Huppe K, Droese M. The value of anti-calretinin antibody in the differential diagnosis of normal and reactive mesothelia versus metastatic tumors in effusion cytology. *Pathol Res Pract* 1998;194: 759-64.
47. Kitazume H, Kitamura K, Mukai K, et al. Cytologic differential diagnosis among reactive mesothelial cells, malignant mesothelioma, and adenocarcinoma: utility of combined E-cadherin and calretinin immunostaining. *Cancer* 2000;90:55-60.
48. Politi E, Kandaraki C, Apostolopoulou C, Kyritsi T, Koutselini H. Immunocytochemical panel for distinguishing between carcinoma and reactive mesothelial cells in body cavity fluids. *Diagn Cytopathol* 2005;32:151-5.