

## 唾液腺粘表皮癌における PCNA および c-erbB-2 の発現

—免疫組織学的検索—

山辺 滋・水野明夫・藤田修一\*

高橋 弘\*・岡邊治男\*

### Expression of PCNA and c-erbB-2 in mucoepidermoid carcinoma of salivary glands: An immunohistochemical study

Shigeru YAMABE · Akio MIZUNO · Shuichi FUJITA\*

Hiroshi TAKAHASHI\* · Haruo OKABE\*

**Abstract:** In 30 cases of mucoepidermoid carcinoma of the salivary glands, the expressions of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) and c-erbB-2 oncogene products were investigated immunohistochemically. A statistically significant difference was found between solid regions ( $12.26 \pm 9.95$ ) and tubular regions ( $0.77 \pm 2.01$ ) on the basis of the PCNA index. Three types of c-erbB-2 antibodies (NCL-PC11, CB11, and CBE 1) showed different patterns of expression. C-erbB-2 (PC11) was expressed on the cell membranes of solid regions in 17 cases (57%) and tubular regions in 7 cases (23%). C-erbB-2 (CB11) was expressed in the cytoplasm of solid regions in 20 cases (67%) and tubular regions in 7 cases (23%). Moreover, c-erbB-2 (CBE 1) was expressed in tubular regions in only 2 cases (7%). In the present study, PCNA index was not related to the overexpression of c-erbB-2 in mucoepidermoid carcinoma.

**Key words:** mucoepidermoid carcinoma (粘表皮癌), salivary gland tumor (唾液腺腫瘍), proliferating cell nuclear antigen (増殖細胞核抗原), c-erbB-2 oncogene product (c-erbB-2 癌遺伝子産物), immunohistochemistry (免疫組織化学)

#### 緒 言

1945年, Stewartら<sup>1)</sup>により唾液腺腫瘍の1亜型として位置付けされた粘表皮腫は, 1991年に改訂された唾液腺腫瘍のWHO新分類においては, 粘表皮癌の名称で記載された<sup>2)</sup>. 本腫瘍は, 予後が比較的良好なものから不良なものまで多様であり<sup>2, 3)</sup>, その生物学的態度は予測しがたい. 本腫瘍は, 病理組織学的に粘液産生細胞, 類表皮細胞および中間細胞などからなり,

その構成細胞の比率はさまざまであり, これらの細胞の相互関係は明らかではなく, その発生由来あるいは増悪の本態がどの細胞であるのかに関しても一致した見解は得られていない<sup>4~8)</sup>.

そこで, 本腫瘍の構成組織における増殖能や性格を明らかにするために, 増殖関連抗原である ploliferating cell nuclear antigen (PCNA), 癌遺伝子産物である c-erbB-2 について, ABC法による免疫組織化学的染色を行った. また, 本腫瘍の構成組織と免疫組織

長崎大学歯学部第一口腔外科学教室

(主任: 水野明夫教授)

\*長崎大学歯学部口腔病理学教室

(主任: 岡邊治男教授)

First Department of Oral and Maxillofacial Surgery, Nagasaki University School of Dentistry

(Chief: Prof. Akio Mizuno)

\*Department of Oral Pathology, Nagasaki University School of Dentistry (Chief: Prof. Haruo Okabe)

受付日: 平成9年1月16日

表1 粘表皮癌の発生部位

| 部 位  | 症例数 | (%)     |
|------|-----|---------|
| 大唾液腺 | 17  | (56.7%) |
| 耳下腺  | 16  | (53.3%) |
| 顎下腺  | 1   | (3.3%)  |
| 小唾液腺 | 13  | (43.3%) |
| 歯 肉  | 4   | (13.3%) |
| 口 蓋  | 4   | (13.3%) |
| 口 底  | 3   | (10.0%) |
| 舌    | 1   | (3.3%)  |
| 頬粘膜  | 1   | (3.3%)  |
| 扁桃   | 1   | (3.3%)  |
| 計    | 30  | (100%)  |

表2 粘表皮癌の年齢分布と性別

| 年 齢     | 男    | 女    | 計    |
|---------|------|------|------|
| 0～9     | 1    | 0    | 1    |
| 10～19   | 1    | 1    | 2    |
| 20～29   | 1    | 2    | 3    |
| 30～39   | 0    | 2    | 2    |
| 40～49   | 2    | 3    | 5    |
| 50～59   | 3    | 5    | 8    |
| 60～69   | 3    | 3    | 6    |
| 70～79   | 2    | 0    | 2    |
| 80～89   | 0    | 1    | 1    |
| 計       | 13   | 17   | 30   |
| 平均年齢    | 48.5 | 47.2 | 47.8 |
| 男女比 (%) | 43.3 | 56.7 |      |

表3 使用した抗体

| 抗体名(クローン)              | タ イ プ      | 希釈倍率    | 会 社 名      |
|------------------------|------------|---------|------------|
| 抗 PCNA (PC10)          | ウサギポリクロナール | 1 : 100 | NOVOCASTRA |
| 抗 c-erbB 2 (NCL-PC11)  | ウサギポリクロナール | 1 : 400 | NOVOCASTRA |
| 抗 c-erbB 2 (NCL-CB11)  | マウスモノクロナール | 1 : 40  | NOVOCASTRA |
| 抗 c-erbB 2 (NCL-CBE 1) | マウスモノクロナール | 1 : 10  | NOVOCASTRA |

化学的結果について若干の考察を加えて報告する。本研究の目的は粘表皮癌における PCNA および c-erbB-2 の発現の局在、組織学的分化度との関係、あるいは PCNA と c-erbB-2 との関連性を調べることにある。

## 対象および方法

### 1. 対象

対象は長崎大学歯学部口腔病理学教室(1982～1991年)、同大学医学部附属病院中央検査部病理(1962～1991年)およびその関連施設(1965～1981年)で、粘表皮癌と診断された30例である。WHO新分類<sup>2)</sup>の組織学的分化度(悪性度)分類では、高分化型(低悪性度腫瘍)が11例、低分化型(高悪性度腫瘍)が19例であった。これらの例に対して、新たにパラフィン切片を薄切し、HE染色、PAS染色およびアルシアンブルー染色を施した。発生部位は、耳下腺が、全体の半数以上(53.3%)と最も多かった(表1)。また、女性が男性よりやや多く56.7%を占めた。年齢分布は、9～80歳(平均47.8歳)で、40歳台～60歳台にピークを認めた(表2)。

### 2. 免疫組織化学的染色

各症例の切除標本を10%ホルマリンで固定、パラフィ

ン包埋後、厚さ3 $\mu$ mの連続切片を作製し、免疫組織化学的にABC法により、それぞれNOVOCASTRA社製の抗PCNA(PC10)および3種類のc-erbB-2(NCL-PC11, CB11およびCBE1)を用いて染色した(表3)。

### 3. 検索方法

粘表皮癌における腫瘍組織(写真1)の構成組織を類表皮細胞および中間細胞からなる充実部と、粘液産生細胞および腺管形成からなる腺管部に分けて検索した。なお、腺管部においては、PAS染色およびアルシアンブルー染色により、粘液産生を確認した。

PCNAについては、各構成組織に対して、目算で5か所以上を観察し、1,000個以上の腫瘍細胞を抽出し、PCNA陽性率(%)を算出した。なお、腺管部の腫瘍細胞が、染色標本中1000個未満の症例においては、すべての腫瘍細胞について計測した。

そこで、各構成組織(充実部および腺管部)におけるPCNA陽性率および3種類のc-erbB-2(PC11, CB11およびCBE1)陽性例数を求めた。次に、各構成組織において、WHO新分類<sup>2)</sup>による組織学的分化度別に、PCNA陽性率および3種類のc-erbB-2陽性例数を求めた。

また、c-erbB-2のうちで最もよく使用されている

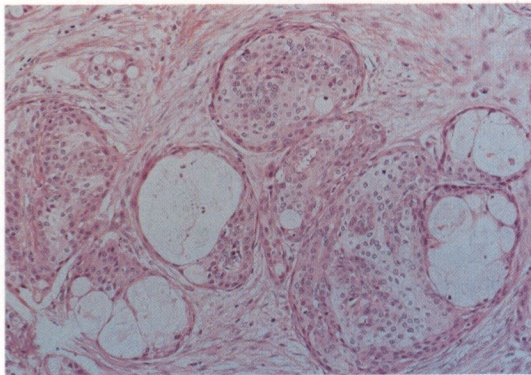


写真1 粘表皮癌 HE 染色 (×100)

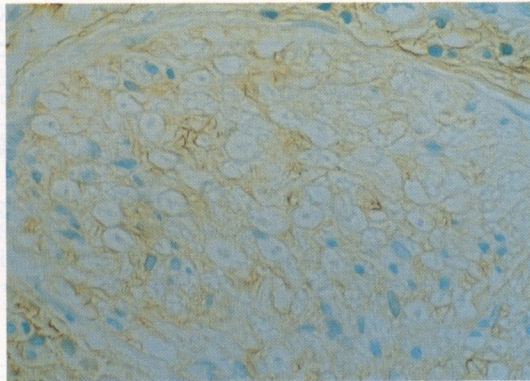


写真4 粘表皮癌の充実部 c-erbB-2 (NCL-PC11) (×200)

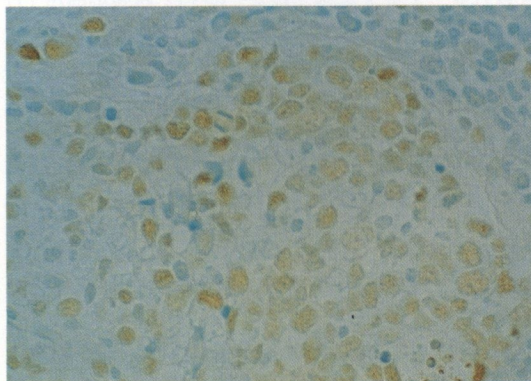


写真2 粘表皮癌の充実部 PCNA (×200)

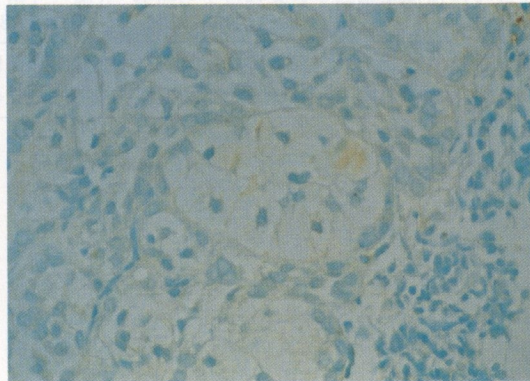


写真5 粘表皮癌の腺管部 c-erbB-2 (NCL-PC11) (×200)

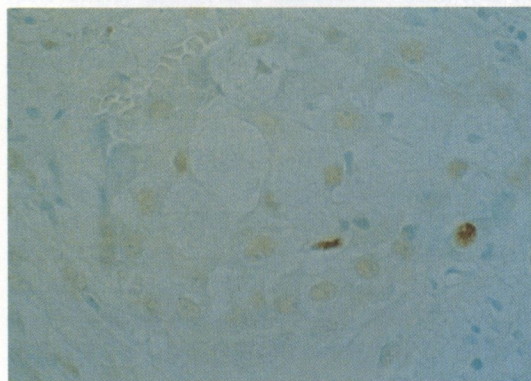


写真3 粘表皮癌の腺管部 PCNA (×200)

および強陽性(卅); 50%以上の陽性細胞が認められるもの, 4群に分けた。

さらに, c-erbB-2とPCNAの関連性を求めるために, 各構成組織に対して, それぞれc-erbB-2(PC11)の陽性度別(陰性群, 弱陽性群, 中陽性群および強陽性群)にPCNA陽性率を求めた。

## 結 果

### 1. 各抗体の陽性像

#### 1) PCNA 陽性像

PCNA陽性細胞は正常唾液腺および導管において, ほとんど認められなかった。また, 粘表皮癌の充実部においては, びまん性に陽性所見がみられ, 特に癌巣縁に多くの陽性細胞が認められた(写真2)。腺管部においては, 散在性に弱陽性像が認められた(写真3)。

NCL-PC11においては, 特に詳細な検討を行った。c-erbB-2(PC11)の陽性度については, 陰性(-); 陽性所見が全く認められないもの, 弱陽性(+); 少なくとも1個の陽性細胞が認められるもの, 中陽性(卍); 10%以上, 半数未満の陽性細胞が認められるもの, お



表4 各構成組織におけるPCNA陽性率とc-erbB-2陽性例数

| 構成組織 | PCNA陽性率<br>(%) | c-erbB-2陽性例数 |          |        |
|------|----------------|--------------|----------|--------|
|      |                | PC11         | CB11     | CBE1   |
| 充実部  | 12.26±9.95     | 17 (57%)     | 20 (67%) | 2 (7%) |
| 腺管部  | 0.77±2.01      | 7 (23%)      | 7 (23%)  | 0 (0%) |

\* : P&lt;0.0001 (Wilcoxonの符号付順検定)

\*\* : P&lt;0.01, \*\*\* : P&lt;0.001 (Fisherの直接確率計算法)

表5 各構成組織における分化度別にみたPCNA陽性率とc-erbB-2陽性例数

| 構成組織 | 分化度        | PCNA陽性率<br>(%) | c-erbB-2陽性例数 |          |         |
|------|------------|----------------|--------------|----------|---------|
|      |            |                | PC11         | CB11     | CBE1    |
| 充実部  | 高分化型 (11例) | 9.18±7.52      | 6 (55%)      | 6 (55%)  | 0 (0%)  |
|      | 低分化型 (19例) | 17.21±18.55    | 11 (58%)     | 14 (74%) | 2 (11%) |
| 腺管部  | 高分化型 (11例) | 0.48±0.58      | 2 (18%)      | 4 (36%)  | 0 (0%)  |
|      | 低分化型 (19例) | 0.83±2.43      | 5 (26%)      | 3 (16%)  | 0 (0%)  |

2) c-erbB-2 (NCL-PC11) 陽性像  
c-erbB-2 (PC11) は正常唾液腺および導管において、ほとんど陽性所見はなかった。また、粘表皮癌では、充実部において癌巣全体にわたって細胞膜あるいは一部細胞質に陽性所見がみられ(写真4)、腺管部において細胞膜に弱陽性所見が認められた(写真5)。

### 3) c-erbB-2 (NCL-CB11) 陽性像

ほぼc-erbB-2 (PC11) 陽性症例における陽性細胞に一致して、c-erbB-2 (CB11) の陽性所見が認められたが、c-erbB-2 (CB11) 陽性像は細胞膜にはみられず、細胞質に局限していた。

### 4) c-erbB-2 (NCL-CBE1) 陽性像

c-erbB-2 (CBE1) は、腺管部において陽性所見がみられず、充実部でもほとんど陽性所見はみられなかった。

## 2. 各構成組織におけるPCNA陽性率とc-erbB-2陽性例数(表4)

PCNA陽性率は、充実部では12.26±9.95%、腺管部では0.77±2.01%であり、充実部が腺管部よりも統計学的に有意にPCNA陽性率が高かった(Wilcoxonの符号付順位検定: P<0.0001)。

c-erbB-2 (PC11) は、充実部17例(57%)、腺管部7例(23%)に陽性であり、統計学的に有意差が認められた(P<0.01)。c-erbB-2 (CB11) においても、充実部20例(67%)、腺管部7例(23%)に陽性であり、統計学的に有意差が認められた(Fisherの直接確率計算法: P<0.001)。また、c-erbB-2 (CBE1) は充実部2例(7%)で陽性であったが、腺管部はすべての症例

で陰性であった。また、3種類のc-erbB-2 (PC11, CB11およびCBE1)の間で、統計学的に有意な相関関係は認められなかった。

## 3. 各構成組織における分化度別にみたPCNA陽性率とc-erbB-2陽性例数(表5)

PCNA陽性率は、充実部では、低分化型(17.21±18.55)が高分化型(9.18±7.52)よりも高く、腺管部でも、低分化型(0.83±2.43)が高分化型(0.48±0.58)よりも高かったが、統計学的な有意差は認めなかった。

c-erbB-2 (PC11) 陽性例数は、充実部では、高分化型6例(55%)、低分化型11例(58%)であり、腺管部では、高分化型5例(18%)、低分化型5例(26%)であった。c-erbB-2 (CB11) は、充実部では、高分化型6例(55%)、低分化型14例(74%)であり、腺管部では、高分化型4例(36%)、低分化型3例(16%)であった。c-erbB-2 (CB11) は、低分化型の充実部で、2例(11%)のみ陽性であった。3種類のc-erbB-2 (PC11, CB11およびCBE1) 陽性例数において、充実部および腺管部ともに組織学的分化度の違いによる統計学的な有意差は認めなかった。

## 4. 各構成組織におけるc-erbB-2 (NCL-PC11) 陽性度別にみた症例数およびPCNA陽性率(表6)

充実部における各c-erbB-2 (PC11) 陽性度の例数は、強陽性群1例、中陽性群10例、弱陽性群6例および陰性群13例であり、また、腺管部においては、強陽性群0例、中陽性群5例、弱陽性群2例および陰性群23例であった。また、充実部が腺管部よりも統計学的に

表6 各構成組織における c-erbB2 (PC11) 陽性度別にみた PCNA 陽性率

| 構成組織 | c-erbB2 (PC11)       |                    |                     |              |
|------|----------------------|--------------------|---------------------|--------------|
|      | —                    | +                  | ⦿                   | ⦿⦿           |
| 充実部  | 11.37±10.54<br>(13例) | 17.93±0.71<br>(6例) | 10.39±8.49<br>(10例) | 8.70<br>(1例) |
| 腺管部  | 0.95±2.26<br>(23例)   | 0.71±0.33<br>(2例)  | 0±0<br>(5例)         | —<br>(0例)    |

有意に c-erbB-2 陽性度が高かった (Wilcoxon の符号付順位検定:  $P < 0.01$ ).

充実部における PCNA 陽性率は, c-erbB-2 (PC11) の弱陽性群 ( $17.93 \pm 0.71$ ) が最も高く, 次に陰性群 ( $11.37 \pm 10.54$ ), 中陽性群 ( $10.39 \pm 8.49$ ), 強陽性群 (8.70) の順であり, それぞれの群間に有意差は認められなかった.

腺管部における PCNA 陽性率は, c-erbB-2 (PC11) の陰性群 ( $0.95 \pm 2.26$ ) が最も高く, 次に, 弱陽性群 ( $0.71 \pm 0.33$ ), 中陽性群 ( $0 \pm 0$ ) の順であり, それぞれの群間に有意差は認められなかった.

## 考 察

唾液腺腫瘍に関する WHO 新分類 (1991)<sup>2)</sup> では, 粘表皮癌のすべての型は, 肉眼的あるいは組織学的像とは関係なく, 転移能があると考えられ, 唾液腺良性腫瘍から悪性腫瘍の範疇へ移行された. さらに, 高分化型 (低悪性度腫瘍) および低分化型 (高悪性度腫瘍) の2群に分けられ, 高分化型は, 50%以上の粘液産生細胞および高分化類表皮細胞からなるとし, 低分化型の大部分は, 未分化中間細胞および低分化類表皮細胞からなるとした. つまり, 未分化中間細胞から粘液産生細胞および類表皮細胞の両方向に分化しようという多元性概念を取り入れ, 構成細胞を細かに分けた. 従来より, 本腫瘍の組織学的分化度あるいは悪性度に関しては, 腫瘍組織の組織構造あるいは分化の程度により, 2ないし3群に分類しており, 一般に粘液産生細胞および腺管形成が多く認められるほど, 生物学的悪性度が低いとされている<sup>3-8)</sup>. 本研究においては, 従来からの概念に従い, 腫瘍構成組織を充実部と腺管部に分けて検討した. さらに, WHO 新分類<sup>2)</sup>の組織学的分化度による比較も行った.

粘表皮癌の各構成成分における細胞増殖活性を調べるため proliferating cell nuclear antigen (PCNA) を用いて検討した. 近年, 腫瘍組織における増殖能の評価が, 増殖細胞関連抗原に対する抗体の開発により, かなりの客観性をもつようになってきた<sup>9)</sup>. なかでも, PCNA による細胞動態の評価に関しては, ホルマリン

固定, パラフィン包埋切片上で免疫組織化学的に検出が可能であることから注目をあび<sup>10)</sup>, 種々の腫瘍組織において増殖能の検討に用いられるようになり, その有用性が報告されている<sup>11)</sup>. その一方で, PCNA を使用した場合, 組織による特異性や固定時間あるいは組織自体の保存期間など技術的な問題があることが以前より指摘されてきたが<sup>12)</sup>, 最近では, 優れた抗体の開発や技術的な検討が進むにつれて, 通常のホルマリン固定, パラフィン包埋切片において, 安定した結果が得られることが明らかになっており<sup>13, 14)</sup>, これらの問題もほぼ解決されている.

本研究において, PCNA 陽性率の平均値は, 充実部では, 低分化型が17.21%, 高分化型が9.18%で, 腺管部では, 低分化型が0.83%, 高分化型が0.48%と, 有意差は認められなかったが, 各構成組織で低分化型が高分化型の約2倍の値を示した. したがって, 総じて腫瘍の分化度が低いほど腫瘍細胞の増殖性が高いことが分かった.

さらに, PCNA 陽性率の平均値において, 充実部が12.26%, 腺管部が0.77%と, 充実部が腺管部の約15倍と著しい差がみられた. したがって, 腺管部つまり粘液産生細胞が広範囲を占めるほど悪性度が低く, 予後が良いという従来の考えを支持するものであった. WHO 新分類の記載では, 充実部においては, 中間細胞, 低分化類扁平上皮細胞, さらに高分化類扁平上皮細胞への分化段階が考えられているが, 本研究の PCNA 染色像において, これらの細胞間に明らかな陽性率の違いをみなかった. したがって, これらの細胞増殖性の相違よりも, 充実部と腺管部との増殖能の相違のほうが大きいと思われる.

一方, c-erbB-2 遺伝子産物は185kDの膜糖蛋白で, 特にその細胞内ドメインはチロシンキナーゼ活性を有し, 何らかの細胞内伝達機構に関与していると考えられている<sup>15)</sup>.

本研究において, 3種類の抗 c-erbB-2 抗体を使用した<sup>9)</sup>が, c-erbB-2 (PC11) は細胞膜に陽性を示し, c-erbB-2 (CB11) は本来細胞膜抗体にもかかわらず, 細胞質に陽性であった. c-erbB-2 が細胞質に発現する理由については, ①c-erbB-2 蛋白がレセプターで

あれば、内在化によって、細胞質内に局在する。②c-erbB-2蛋白と同じ epitope を有するミトコンドリア蛋白があり、交差反応により細胞質内に発現する<sup>16)</sup>。③c-erbB-2蛋白は、細胞の分化形質の発現に伴って細胞膜での局在が減少し、細胞質内への局在が増加する<sup>17)</sup>とされている。本研究で、連続切片の検索により同一症例および同一細胞においてc-erbB-2 (PC11)が細胞膜に、c-erbB-2 (CB11)が細胞質に発現を認めたことより、上記の理由のうち、①および③は考えにくく、②の可能性が最も強いと考える。また、c-erbB-2 (CBE 1) はほとんどの症例で陰性であり、粘表皮癌においては有効な抗体ではなかった。他臓器での腺癌<sup>18~21)</sup>には多くのc-erbB-2発現がみられるが、今回の結果では、腺管部においてc-erbB-2の発現はほとんど認められず、粘表皮癌の腺管構成とc-erbB-2の関与は否定的であることが示唆された。また、c-erbB-2はepidermal growth factor receptor (EGF receptor)の遺伝子と非常に類似した構造を有する<sup>22)</sup>ことから、c-erbB-2の発現は腫瘍細胞増殖を促進するものと考えられる。粘表皮癌においては、充実部優勢の例が予後不良とされ<sup>3~8)</sup>、本研究において、充実部が腺管部よりもc-erbB-2陽性度が高かったことより、粘表皮癌の腫瘍細胞増殖および予後因子とc-erbB-2の発現に関連のあることが示唆された。

c-erbB-2の発現量とPCNA陽性率の関連性を求めるために、充実部、腺管部のそれぞれにおいて、おのおのc-erbB-2陽性度症例のPCNA陽性率を算出した。充実部においては、陰性群よりも弱陽性群がPCNA陽性率は高いが、中陽性群、強陽性群に向かうにつれて、PCNA陽性率は低い値を示した。また、腺管部においても、陰性群、弱陽性群および中陽性群とc-erbB-2陽性度が高くなるに従い、PCNA陽性率は低下した。これにより、c-erbB-2の発現量とPCNA陽性率は、粘表皮癌において必ずしも関連性があるとは言えなかった。つまり、PCNAの発現は腫瘍細胞増殖能そのものを反映し、c-erbB-2は腫瘍細胞増殖を促進する因子であると考えられる。

今回、PCNAの局在を検討し、本腫瘍の細胞増殖の本態は充実部にあると考えられた。また、癌遺伝子産物c-erbB-2も粘表皮癌の組織学的悪性度と何らかの関与のあることが示唆された。今後、粘表皮癌に関する免疫組織化学的あるいは分子生物学的情報が蓄積されることにより、この腫瘍の組織発生の解明あるいは予後の予測が可能となることが期待される。

## 結 語

粘表皮癌30例について、c-erbB-2およびPCNA免疫染色を行い、若干の知見を報告した。

1. 粘表皮癌の充実部は、腺管部よりPCNA陽性率

において、統計学的に有意に高い値を示した。また、充実部・腺管部ともに、低分化型が高分化型よりも、PCNA陽性率において高い値を示した。

2. c-erbB-2 (PC11およびCB11)においては、充実部が腺管部よりも有意に陽性例数が高かった。

3. 3種類のc-erbB-2 (PC11, CB11およびCBE 1)はそれぞれ異なる染色態度を示した。c-erbB-2 (PC11)は細胞膜に、c-erbB-2 (CB11)は細胞質に陽性所見を認め、また、c-erbB-2 (CBE 1)はほとんど発現を認めなかった。

4. c-erbB-2の発現量とPCNA陽性率は、粘表皮癌において相関性は認められなかった。

なお、本論文の要旨は、第35回歯科基礎医学会総会（長崎, 1993）において報告した。

## 引 用 文 献

- 1) Stewart, F.W., Foote, F.W., et al.: Mucoepidermoid tumours of salivary glands. *Ann Surg* 122: 820-844 1945.
- 2) Seifert, G.: *Histological Typing of Salivary Gland Tumours*, 2nd Ed, Springer-Verlag, Berlin, 1991.
- 3) Thackray, A.C.: *Histological Typing of Salivary Gland Tumours*. Springer-Verlag, Berlin, 1972.
- 4) 石川悟朗, 秋吉正豊: 口腔病理学II, 改訂版, 永末書店, 京都, 1982, 718-728頁.
- 5) 小守 昭, 高橋 功, 他: 唾液腺に発生した粘表皮癌の病理組織学的検討. *口病誌* 45: 263-278 1978.
- 6) Melrose, R.J., Abrams, A.M., et al.: Mucoepidermoid tumor of the intraoral minor salivary glands: A clinicopathologic study of 54 cases. *J Oral Pathol* 2: 314-325 1973.
- 7) Jacobson, P.A., Blank, C., et al.: Mucoepidermoid carcinoma of the Parotid gland. *Cancer* 22: 111-124 1968.
- 8) Healey, W.V., Perzin, K.H., et al.: Mucoepidermoid carcinoma of salivary gland origin: classification, clinical-pathologic correlation, and results of treatments. *Cancer* 26: 368-388 1970.
- 9) 向井 清: 増殖細胞核抗原. *病理と臨床* 8: 178-184 1990.
- 10) Hall, P.A. and Woods, A.L.: Immunohistochemical makers of cellular proliferation: achievements, problems and prospects. *Cell Tissue Kinet* 23: 502-522 1991.
- 11) Robbin, B.A., de la Vega, D., et al.:

- Immunohistochemical detection of proliferating cell nuclear antigen in solid human malignancies. *Arch Pathol Lab Med* 111: 841-845 1987.
- 12) Scott, R.J., Hall, P.A., et al.: A comparison of immunohistochemical makers of cell proliferation with experimentally determined growth fraction. *J Pathol* 165: 173-178 1991.
  - 13) Hall, P.A., Levison, D.A., et al.: Proliferation cell nuclear antigen (PCNA) immunohistochemicalization in paraffin sections: an index of cell proliferation with evidence of deregulated expression in some neoplasm. *J Pathol* 162: 285-291 1990.
  - 14) Wolf, H.K. and Dittrich, K.L.: Detection of proliferation cell nuclear antigen in diagnostic histopathology. *J Histochem Cytochem* 40: 1269-1273 1992.
  - 15) Akiyama T., Sudo C., et al.: The product of the human c-erbB-2 gene; a 185-kilodalton glycoprotein with tyrosinekinase activity. *Science* 232: 1644-1646 1986.
  - 16) De Potter, C.R., Quatacker, J., et al: The subcellular localization of the neu protein in human normal and neoplastic cells *Int J Cancer* 44 969-974 1989.
  - 17) Bacus, S.S., Kiguchi, K., et al.: Differentiation of cultured human breast cancer cells (AU-565 and MCF-7) associated with loss of cell surface HER-2 /nue antigen. *Mol Carcinogenesis* 3: 350-362 1990.
  - 18) Venter D.J., Tuzi N.L., et al.: Overexpression of the c-erbB-2 oncoprotein in human breast carcinomas; immunohistochemical assessment correlates with gene amplification. *Lancet* 2: 69-72 1987.
  - 19) Yonemura Y., Ninomiya I., et al.: Evaluation of immunoreactivity for erbB-2 protein as a poor prognosis in gastric cancer. *Cancer Res* 51: 1034-1038.
  - 20) 山口茂樹, 大木繁男, 他: 大腸癌における c-erbB-2 蛋白発現および脈管侵襲について. *癌と化学療法* 19: 34-39 1992.
  - 21) 刑部東治, 佐藤雄一, 他: 各種甲状腺疾患における c-erbB-2 癌遺伝子産物の検討. *臨床研究* 8: 387-393 1991.
  - 22) O'Reilly, S.M., Barnes, D.M., at al.: The relationship between c-erbB-2 expression, S-phase fraction and prognosis in breast cancer. *Br J Cancer* 63: 444-446 1991.
-