前立腺癌における癌遺伝子産物 c-erbB-2の免疫組織化学的検討

滋賀医科大学泌尿器科学教室 (主任: 友吉唯夫教授)

國保 昌紀 吉貴 達寛 濱口 晃一

岡田 裕作 友吉 唯夫

国立京都病院検査科

樋口 佳代子

IMMUNOHISTOCHEMICAL STUDY OF c-erbB-2 PROTO-ONCOGENE PRODUCT IN PROSTATIC CANCER

Masanori Kokuho, Tatsuhiro Yoshiki, Akikazu Hamaguchi, Yusaku Okada and Tadao Tomoyoshi

Department of Urology, Shiga University of Medical Science

(Director: Prof. T. Tomoyoshi, M.D.)

Kayoko Higuchi

Department of Surgical Pathology, Kyoto National Hospital

The c-erbB-2 proto-oncogene product is expressed in adenocarcinomas of breast cancer and ovarian cancer, and its significance as a prognostic factor has been increasingly noted. We immunohistochemically studied the expression of c-erbB-2 proto-oncogene product using anti-c-erbB-2 gene product polyclonal antibody (Nichirei), which was produced using a synthetic peptide at the C-terminal portion as the immunogen. The subjects consisted of 52 patients with prostatic cancer who were treated at the Department of Urology, Shiga University of Medical Science, from 1982 to 1990. The expression of c-erbB-2 gene was observed in 40 of the 52 patients (76.9%). The positive rate was highest in patients with poorly differentiated cancer and in stage D2 patients, but there were no significant differences in positive rates among patients with different histological types or clinical stages. The probability that progression would occur was significantly ($p<0.05$) lower in the group that tested positive for c-erbB-2 than in the group that tested negative among 33 stage D2 patients after 5 years of treatment. When cause-specific survival rates were calculated using the Kaplan-Meier method, the group that tested positive had a significantly ($p<0.001$) poorer outcome than the group that tested negative after 3 years and 6 months of treatment.

The above results suggest that c-erbB-2 expression in prostatic cancer may be useful in predicting the prognosis of the disease.

Key words: prostatic cancer, c-erbB-2, immunohistochemistry

要旨: c-erbB-2遺伝子産物は乳癌、卵巣癌などの腺癌において発現しており、その予後因子としての意義が注目されている。今回われわれは、この10年間に滋賀医科大学泌尿器科で加療した前立腺癌52症例を対象として、C末端部分の合成ペプチドを免疫原として作製された抗 c-erbB-2遺伝子産物ポリクローナル抗体 (株式会社ニチレイ) を用いて免疫組織化学的に c-erbB-2産物の発現を観察し、その臨床的意義について考察を加えた。52症例中40症例 (76.9%) に c-erbB-2産物の発現を認めた。組織学的には低分化癌症例が、臨床病期としては stage D2症例が、それぞれ最も陽性率が高かったが、統計学的有意差はなかった。内分泌療法を施行された Stage D2 33症例において、c-erbB-2陽性群では probability without progression が治療開始後5年の時点で陰性群に比べて有意に低かった ($p<0.05$)。cause-specific survival rates を Kaplan-Meier 法にて算定すると、陽性群は治療開始後3年6カ月の時点で陰性群に比べて有意 ($p<0.001$) に不良な転帰を示した。

以上の結果から、前立腺癌における c-erbB-2産物の発現は、その予後を推定する因子のひとつとなりうる事が示唆された。

キーワード：前立腺癌, c-erbB-2, 免疫組織化学

緒 言

c-erbB-2は epidermal growth factor (EGF) 受容体と構造類似性を有する受容体型の癌遺伝子である¹⁾²⁾。c-erbB-2遺伝子産物は胎生期の胃、小腸、気管支、尿路上皮、腎尿細管において発現が認められている³⁾。また、この蛋白質は乳癌において発現しており、その発現の有無が核異型度、リンパ節転移、生存率等との関連をうかがわせるとする報告がある^{4)~6)}。

一方、前立腺癌の予後因子として、病理組織学的所見、病期分類、内分泌療法の効果、リンパ節の転移様式、腫瘍マーカーなど多くの項目が検討されてきた^{7)~10)}。しかし、その予後を推定する因子については、いまだ確立されているとは言い難い。そこで、今回われわれは、前立腺癌において c-erbB-2産物の発現と転帰との関係を検討し、この蛋白質が予後を推定する因子となりうるかどうか、その臨床的意義について考察を加えたので報告する。

対象および方法

1982年より1990年までに滋賀医科大学泌尿器科において、組織学的に前立腺癌と診断された58症例のうち、評価可能な52症例を対象とした。前立腺癌の臨床病期分類は前立腺癌取扱い規約¹¹⁾に従った。その内訳は stage A 3例 (5.8%)、stage B 2例 (3.8%)、stage C 14例 (26.9%)、stage D 33例 (63.5%) (全例 D2) であった。

病理組織学的には、高分化型 7例 (13.5%)、中分化型 25例 (48.1%)、低分化型 20例 (38.5%) であった。

c-erbB-2遺伝子産物を同定するために、ABC法による免疫染色を行った。前立腺癌標本としては、原則的に治療開始前に得られたホルマリン固定パラフィン包埋切片を使用した。一次抗体として、c-erbB-2癌遺伝子産物の C 末端部分の合成ペプチドを免疫原にして作成された抗ヒト c-erbB-2遺伝子産物ポリクローナル抗体 (株式会社ニチレイ)³⁾¹³⁾を用いた。この抗体はパラフィン切片での染色が可能で、しかも EGF 受容体 (gp170) とは反応しないことが判明している¹²⁾¹³⁾。4 μ m のパラフィン切片を脱パラフィンし、0.1% H_2O_2 /PBS で10分間処理して内因性ペルオキシダーゼ活性を不活化した。次にブロックエース (大日本製薬株式会社) で抗体の非特異的結合部位を1時間ブロックン

グし、25倍希釈抗ヒト c-erbB-2遺伝子産物抗体を2時間、次いで200倍希釈ビオチン化抗ウサギ IgG ヤギ抗体を1時間、avidin-biotin peroxidase complex (ABC, Vector Laboratory) 溶液を1時間、室温で順次反応させた。なお、各段階ごとに PBS で切片を十分に洗浄した。これらの切片に0.05% H_2O_2 ・0.2mg/ml DAB (3,3'-Diaminobenzidine tetrahydro-chloride, 和光純薬工業株式会社) 溶液を5分間反応させ、発色させた。最後に、ヘマトキシリンで核染色を施し封入した。陰性対照として抗 c-erbB-2蛋白質抗体の代わりに正常家兎血清 (Cedarlane Labo. Ltd., Canada) を用いて各症例の連続切片を染色し比較した。

抗 c-erbB-2遺伝子産物抗体の反応性については、切片上の全癌細胞を観察し、細胞膜あるいは細胞質が少数でも陽性に染色された癌細胞が存在する場合には陽性症例と判定した。逆に、まったく反応していない場合だけを陰性症例とした¹⁴⁾。

内分泌療法に対する反応性と c-erbB-2蛋白質との関係についても検討した。対象としては、同じような進展度で全例内分泌療法を受けており背景因子に違いが少ないと考えられる stage D2に限定した。disease progression の判定は NPCP の基準¹⁵⁾に準じ、c-erbB-2陽性・陰性群のそれぞれの内分泌療法開始後の probability without progression を Kaplan-Meier 法で算出し、検定には Generalized Wilcoxon test を用いた。

生存率は、前立腺癌による癌死だけを死亡例として取り扱う cause-specific survival rates を Kaplan-Meier 法で検討した。臨床病期や組織学的分化度と染色性との関係については χ^2 検定によって調べた。

結 果

1) 前立腺癌細胞に対する抗 c-erbB-2遺伝子産物抗体の反応性

ABC法で染色した結果、全症例の76.9% (52例中40症例) に陽性所見が得られた。反応産物は癌細胞に認められたが、細胞膜だけでなく細胞質にも存在した。また癌細胞の染色性は同一切片内でも部位によって差が認められた (Fig. 1)。

2) 臨床病期と c-erbB-2産物の陽性率

各臨床病期における陽性率は、stage A 66.7% (2/3例)、stage B 50.0% (1/2例)、stage C 71.4% (10/

Table 1 Clinical stage and positive rates for c-erbB-2 oncogene product

Reactivity	Stage A	Stage B	Stage C	stage D	Total
Positive	2(66.7%)	1(50%)	10(71.4%)	27(81.8%)	40(76.9%)
Negative	1	1	4	6	12
Total	3	2	14	33	52

N.S.

Fig. 1 Well differentiated adenocarcinoma. Reactive products for anti-c-erbB-2 oncogene product antibody are observed in the cytoplasm and the membrane of the cancer cells. Bars=10 μ m

14例), stage D 81.4% (27/33例)であった。 χ^2 検定では、臨床病期と陽性・陰性の反応結果は統計学的に有意な関係ではなかった。stage C, Dを併せた進行癌での陽性率は78.7% (37/47例)であり、早期癌(stage A, B)の陽性率60.0% (3/5例)より高い傾向がみられた (Table 1)。

3) 組織学的分化度と c-erbB-2産物の陽性率

分化度別の陽性率は、高分化型85.7% (6/7例)、中分化型64.0% (16/25例)、低分化型90.0% (18/20例)であり、統計学的な有意差はなかったが、低分化型の陽性率が高い傾向を示した (Table 2)。いずれの陽性症例でも、陽性細胞と陰性細胞が混在しており、陽性細胞の占める比率に関して、分化度による違いは認められなかった。

染色強度は各症例で様々で、分化度ごとの共通した特徴はなかった。

4) stage D2症例について

stage D2 33症例を対象として詳細に検討を加えた。病理組織学的には高分化癌4例、中分化癌18例、低分化癌11例で、c-erbB-2陽性症例は、それぞれの分化度

Table 2 Histological grade and positive rates for c-erbB-2 oncogene product

Reactivity	Well	Moderate	Poor	Total
Positive	6(85.7%)	16(64%)	18(90%)	40(76.9%)
Negative	1	9	2	12
Total	7	25	20	52

N.S.

Fig. 2 Probability without progression curves were estimated according to the Kaplan-Meier method. The proportion of patients who did not experience progression was significantly ($p < 0.05$) lower in the group that tested positive for c-erbB-2 than in the group that tested negative among stage D2 patients after 5 years of treatment.

において4例 (100%), 12例 (66.7%), 11例 (100%)であった。陽性細胞の占める比率について、高分化癌と低分化癌の間に差はみられなかった。

内分泌療法開始後の probability without progression は、c-erbB-2陽性症例群では治療開始後5年の時点で、陰性群より有意 ($p < 0.05$) に低い値を示した (Fig. 2)。

stage D2 33例のうち、前立腺癌による癌死17例、心

Fig. 3 Cause-specific survival rates among stage D2 patients were calculated using the Kaplan-Meier method. The group that tested positive had a significantly ($p < 0.001$) poorer outcome than the group that tested negative after 3 years and 6 months of treatment.

血管系障害死 1 例, 他因死 3 例が確認できた。後 2 者の 4 例を除外して生存率を検討すると, 治療開始後 3 年 6 カ月の時点で c-erbB-2 陽性症例の方が陰性症例に比較して有意 ($p < 0.001$) に不良であった (Fig. 3)。

ちなみに, c-erbB-2 陽性群, 陰性群の年齢はそれぞれ 71.9 ± 8.1 歳, 74.0 ± 8.5 歳 (平均値 $\pm$ 標準偏差) で統計学的に有意差はなく, 病理組織学的分化度についても両群間に有意な違いは認めなかった。

考 察

c-erbB-2 は EGF 受容体をコードする遺伝子と構造類似性を有する受容体型の癌遺伝子で, その産物は腺上皮や腺癌に対する未知の増殖因子の受容体と考えられている²⁾。1987 年になって Salmon ら⁴⁾がヒト乳癌で c-erbB-2 遺伝子が増幅しており, しかも予後と関連すると報告してから, 乳癌を中心として c-erbB-2 に対する臨床的研究が進んできた^{4)~6)16)~19)}。前立腺癌についても, 以前から年齢, 臨床病期, 組織学的分化度, estrogen 投与量, 去勢の有無など予後因子に関する検討が続けられてきた^{7)~10)}が, 対象となったどの項目でも, その有用性は必ずしも十分ではない。c-erbB-2 遺伝子が同定¹¹⁾されてから数年が経過し, 前立腺癌における c-erbB-2 の意義についての報告も見られるようになった²⁰⁾²¹⁾が, 予後因子としての役割についてはこれからの検討課題である。今回, われわれは c-erbB-2 の臨床的意義の中でも特に予後因子としての重要性に注

目してみた。

免疫染色の結果, 反応産物は細胞膜のみならず細胞質内に認められた (Fig. 1)。本来, c-erbB-2 遺伝子産物は細胞膜を貫通する糖蛋白質である²⁾が, われわれの結果と同様の報告が他にも見られる^{6)17)~19)}。今までのところ, 細胞質に認められる c-erbB-2 蛋白質の生物学的意義は不明である。

染色された切片を評価分類するために今回用いた基準は, 染色強度や陽性細胞の多寡によらず陽性部分が存在する場合を陽性症例とし, まったく反応が認められなかった症例だけを陰性とした¹⁴⁾。免疫染色の結果を判定するとき, 基準の違いで異なる成績が出る可能性があるが, 今回は再現性を重視して可及的簡明な判定基準を採用した。その結果, 52 例中 40 例, 76.9% の陽性率であった。Ware らは, 22 例の前立腺癌のうち 15 例, 68% が陽性であったと報告している²⁰⁾。Mellon らは, まず強陽性, 弱陽性, 陰性の三段階に分類し, 強陽性だけを「陽性」, 弱陽性と陰性を「陰性」とした。その上で, 前立腺癌 29 例中 6 例 (21%) が「陽性」であったと報告した²¹⁾が, 強陽性と弱陽性 10 例を合わせれば 55.2% になる。乳癌での報告を, まったく反応性がなかった場合を陰性例としてまとめてみると, 陽性率には最少 16.8% から最高 86.0% までの著しい幅が見られた^{5)6)16)~18)}。16.8%¹⁸⁾, 29.7%¹⁶⁾と低い陽性率であった報告は, 対象症例数がそれぞれ 185 例, 195 例と多く, 逆に 75.0%¹⁷⁾, 86.0%⁵⁾と高陽性率の報告は, それぞれ 24 例, 43 例と小さな母集団であった。前立腺に関して, 今後は少なくとも 100 例以上の症例を対象として検討することが必要であろう。

臨床病期ごとの陽性率では, stage D が 81.8% と最も高かった。ただ残念ながら, 早期癌症例があまりにも少ないので, 結果の解釈には注意を要する。統計学的には, 臨床病期の進行とともに陽性率が上昇するとは言えなかった (Table 1)。乳癌の場合でも, c-erbB-2 蛋白質の発現がリンパ節転移と関連するとする報告⁶⁾¹⁸⁾と, そうではないとする報告¹⁷⁾¹⁸⁾があり, 見解は一致していない。今回の研究ではリンパ節や骨などの転移部位を調べられなかったが, staging lymphadenectomy の増加とともに, c-erbB-2 とリンパ節転移の関係についての情報も増やせるものと考えている。

組織学的分化度別には, 低分化癌において最も陽性率が高かった。しかし, 3 種類の分化度の間で, 統計学的に有意差はなかった (Table 2)。この点について,

乳癌では抗 c-erbB-2 蛋白質抗体の染色性との間に相関がある⁶⁾¹⁶⁾¹⁸⁾と報告されており、膀胱癌についても Moriyama らは G3 腫瘍での陽性率は G1 および G2 腫瘍に比べて有意に高かったと述べている¹³⁾。前立腺癌では、悪性度が高い症例で陽性率が高いとする報告²⁰⁾と、必ずしもそうではないとする報告²¹⁾があり、検討の余地が残されている。

次に、c-erbB-2 蛋白質の発現と内分泌療法への反応性との関係について述べる。Ware, Mellon の両者とも、内分泌療法と c-erbB-2 の関連性については言及していない²⁰⁾²¹⁾。しかし、臨床的にはここがもっとも興味のある点である。前立腺癌が内分泌療法に抵抗性を獲得すると、もはや有効な治療法はないに等しい現状では、最終的には生存率が内分泌療法への反応性を意味することになる。しかし現実には、多くの要素が複雑に絡み合って生存率に影響を与えるので、もう少し直接的に反応性を検討する必要がある。その際に、全症例を対象にすると臨床病期や治療法などの因子が強く関与するので、stage D2 症例に限定して検討を加えた。stage D2 は全例、初期治療として何らかの内分泌療法を受けていた。すなわち、原則として両側精巣摘除術、diethyl-stilbestrol-diphosphate 300mg/日、あるいは両者併用のいずれかの治療が施行されていた。今回の検討では再燃例だけではなく、初期治療としての内分泌療法に反応しなかった症例も一括して内分泌療法不応群としてまとめた。その結果は図に示すように、probability without progression でも生存率でも陽性群と陰性群の間に統計学的有意差が認められた (Fig. 2, 3)。全体の例数が少ないので本文中では細分化を避けた検討結果だけを示したが、染色性に対する異なる判定基準でも検討してみた。すなわち、陽性例をさらに強陽性と弱陽性の 2 群に分けて Kaplan-Meier 法で調べると、probability without progression に関して陰性群が強陽性・弱陽性の 2 群とそれぞれ比べて有意に良好であった。同様に生存率でも陰性群の転帰が強陽性群、弱陽性群よりそれぞれ有意に高かった。強・弱陽性の 2 群間ではどちらの検討項目でも有意差はなかった。また別の分類法として、陰性例と弱陽性例を併せて 1 群とし強陽性群と比較したが、probability without progression でも生存率でも有意差はなかった。このように異なる基準に従ってみても、今回採用した分類法が簡便でしかも統計学的にも意味があることが確認できた。その上ここで特筆すべきことは c-erbB-2 陽性群と陰性群の間に、重要な予後因子とされ

ている年齢、臨床病期、組織学的分化度¹⁰⁾について明かな違いがないことである。背景因子が同じ状態で、陰性群が有意に良好な結果であったということは、この遺伝子産物発現の有無が内分泌療法に対する反応性や予後の指標になり得る可能性を示唆している。先に述べたように自験例全体でこの蛋白質の発現と臨床病期や分化度との間に関連はなかった。Table 1, 2 が、さらに各臨床病期、各分化度の症例数を増やして他の腫瘍マーカーをはじめとする種々の予後因子と比較し、独立した予後因子であるのかどうか検討する必要がある。また、対象症例のうち c-erbB-2 蛋白質陰性で progression の見られた例があった。その時点の組織が採取されていなかったのもそれ以上の検討はできなかったが、このような場合に c-erbB-2 蛋白質が発現しているかどうかは大変興味深い。同一症例において治療開始前だけではなく再燃時など経時的に染色性の変化を追求してみたいと考えている。現在の段階では、c-erbB-2 蛋白質がホルモン抵抗性と直接関係するという証拠は得られていないが、この蛋白質が増殖因子の受容体としての機能を有する²²⁾²³⁾ので、何か関連しているとしても不思議ではない。

最後に、免疫染色は確かに有用な実験法ではあるが、Slamon らは組織の固定や包埋の過程で抗原蛋白質の反応性が著しく減弱する危険性を指摘して、免疫組織化学だけで c-erbB-2 蛋白質の状態を評価することに警告を発している¹⁹⁾。しかし、実際の臨床応用を考えた時、個々の一例一例に免疫染色を実施するだけでも必ずしも容易ではないのに、その上サザンブロッティング法やノザンブロッティング法、ウェスタンブロッティング法を利用することは極めて困難である。大部分の症例における組織採取が針生検によっている現状では、手技の煩雑さだけでなく、入手できる試料の量の面からも制約が多い。簡便で再現性があり、しかも客観的な方法で c-erbB-2 を利用できるのでなければ、臨床的価値が高いとは言い難い。幸い、c-erbB-2 蛋白質が細胞外へ分泌される可能性は当初から指摘があり²⁾、実際に測定キットも作製されるようになった²⁴⁾。この蛋白質の血中濃度を測定できれば上記の条件を満足しており、臨床での有用性は現実性が増すのではないかと期待している。

結 語

前立腺癌 52 例のパラフィン切片を用いて、c-erbB-2 遺伝子産物の発現を免疫組織化学的に検討し、その臨床的意義を探った。

1. Stage D2において前立腺癌が進行しない割合は、治療開始後5年の時点でc-erbB-2陽性群のほうが陰性群に比べて有意に低かった ($p < 0.05$).

2. Stage D2における生存率も、治療開始後3年6カ月の時点で陽性群は陰性群より有意に不良であった ($p < 0.001$).

3. 組織学的には低分化癌が、臨床病期ではstage D2が、それぞれ最もc-erbB-2陽性率が高かったが統計学的に有意ではなかった.

4. 前立腺癌におけるc-erbB-2遺伝子産物の発現は予後因子のひとつになりうることを示唆された.

本論文の要旨の一部は第41回日本泌尿器科学会中部総会(1991年11月, 名古屋)において発表した.

本研究の一部は厚生省がん研究助成金「骨盤内悪性腫瘍に対する骨盤外科の確立に関する研究」班の助成を受けて行われた.

本研究の遂行に際し貴重な御助言を賜った大阪大学微生物病研究所発癌遺伝子部門秋山 徹助教授, ならびに京都大学医学部泌尿器科学教室荒井陽一講師に深謝致します.

文 献

- 1) Semba, K., Kamata, N., Toyoshima, K. and Yamamoto, T.: A v-erbB-related protooncogene, c-erbB-2, is distinct from the c-erbB-1/epidermal growth factor receptor gene and is amplified in a human salivary gland adenocarcinoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 82, 6497—6501, 1985.
- 2) Yamamoto, T., Ikawa, S., Akiyama, T., Semba, K., Nomura, N., Miyajima, N., Saito, T. and Toyosima, K.: Similarity of protein encoded by the human c-erbB-2 gene to epidermal growth factor receptor. *Nature (Lond.)*, 319, 230—234, 1986.
- 3) Mori, S., Akiyama, T., Yamada, Y., Morishita, Y., Sugawara, I., Toyoshima, K. and Yamamoto, T.: C-erbB-2 gene product, a membrane protein commonly expressed on human fetal epithelial cells. *Lab. Invest.*, 61, 93—97, 1989.
- 4) Slamon, D.J., Clark, G.M., Wong, S.G., Levin, W.J., Ullrich, A. and McGuire, W.L.: Human breast cancer: Correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science*, 235, 177—182, 1987.
- 5) Venter, D.J., Tuzi, N.L., Kukar, S. and Gullick, W.J.: Overexpression of the c-erbB-2 oncoprotein in human breast carcinomas: Immunohistochemical assessment correlates with gene amplification. *Lancet*, 2, 69—72, 1987.
- 6) Berger, M.S., Locher, G.W., Saurer, S., Gullick, W.J., Waterfield, M.D., Groner, B. and Hynes, N.E.: Correlation of c-erbB-2 gene amplification and protein expression in human breast carcinoma with nodal status and nuclear grading. *Cancer Res.*, 48, 1238—1243, 1988.
- 7) 荒井陽一, 大石賢二, 岡田謙一郎, 吉田 修, 木原裕次, 奥野 博: Stage D1 前立腺癌の検討—リンパ節の転移様式および stage D1 前立腺癌の予後—, 泌尿紀要, 35, 981—986, 1989.
- 8) Arai, Y., Yoshiki, T., Oishi, K., Takeuchi, H. and Yoshida, O.: The role of prostatic specific antigen in monitoring prostatic cancer and its prognostic importance. *Urol. Res.*, 18, 331—336, 1990.
- 9) Arai, Y., Yoshiki, T. and Yoshida, O.: Prognostic significance of prostate specific antigen in endocrine therapy for prostatic cancer. *J. Urol.*, 144, 1415—1419, 1990.
- 10) 熊本悦明, 塚本泰司, 梅原次男, 島崎 淳, 布施秀樹, 大島博幸, 竹内弘幸, 吉田 修, 岡田謙一郎, 斎藤 泰, 金武 洋, 原田昌興, 田宮高宏: 前立腺癌内分泌療法の臨床的検討(第1報)前立腺癌内分泌療法における予後因子の多変量解析による検討.(第2報)前立腺癌治療症例の予後, 特に内分泌療法施行例の予後の検討と死因, 副作用の分析.(第3報)病理組織学的所見による内分泌療法施行例の予後. 泌尿紀要, 36, 275—305, 1990.
- 11) 日本泌尿器科学会・日本病理学会編: 泌尿器科・病理前立腺癌取り扱い規約, 第1版, 金原出版, 東京, 1985.
- 12) Akiyama, T., Sudo, C., Ogawara, H., Toyoshima, K. and Yamamoto, T.: The product of the human c-erbB-2 gene: A 185-kilodalton glycoprotein with tyrosine kinase activity. *Science*, 232, 1644—1646, 1986.
- 13) Moriyama, M., Akiyama, T., Yamamoto, T., Kawamoto, T., Kato, T., Sato, K., Watanuki, T., Hikage, T., Katsuta, N. and Mori, S.: Expression of c-erbB-2 gene product in urinary bladder cancer. *J. Urol.*, 145, 423—427, 1991.
- 14) 今井俊介, 芳賀敏実, 松山友彦, 稲葉征四郎, 上田泰章: ヒト乳腺疾患における突然変異 p53 癌抑制遺伝子の発現. 乳癌の臨床, 6, 355—358, 1991.
- 15) Slack, N.H., Murphy, G.P. and Participants in the National Prostatic Cancer Project: Criteria for evaluating patient responses to treatment modalities for prostatic cancer. *Urol. Clin. N. Amer.*, 11, 337—342, 1984.
- 16) Barnes, D.M., Lammie, G.A., Millis, R.R., Gullick, W.L., Allen, D.S. and Altman, D.G.: An immunohistochemical evaluation of c-erbB-2

- expression in human breast carcinoma. *Br. J. Cancer*, 58, 448—452, 1988.
- 17) Gusterson, B.A., Machin, L.G., Gullick, W.J., Gibbs, N.M., Powles, T.J., Elliott, C., Ashley, S., Monaghan, P. and Harrison, S.: c-erbB-2 expression in benign and malignant breast disease. *Br. J. Cancer*, 58, 453—457, 1988.
 - 18) Wright, C., Angus, B., Nicholson, S., Sainsbury, J.R.C., Cairns, J., Gullick, W.J., Kelly, P., Harris, A.L. and Horne, C.H.W.: Expression of c-erbB-2 oncoprotein: A prognostic indicator in human breast cancer. *Cancer Res.*, 49, 2087—2090, 1989.
 - 19) Slamon, D.J., Godolphin, W., Jones, L.A., Holt, J.A., Wong, S.G., Keith, D.E., Levin, W.J., Stuart, S.G., Udove, J., Ullrich, A. and Press, M.F.: Studies of the HER-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer. *Science*, 244, 707—712, 1989.
 - 20) Ware, J.L., Maygarden, S.J., Loontz, W.W. Jr. and Stron, S.C.: Immunohistochemical detection of c-erbB-2 protein in human benign and neoplastic prostate. *Human Pathology*, 22, 254—258, 1991.
 - 21) Mellon, K., Thompson, S., Charton, R.G., Marsh, C., Robinson, M., Lane, D.P., Harris, A. L., Horne, C.H.W. and Neal, D.E.: p53, c-erbB-2 and the epidermal growth factor receptor in the benign and malignant prostate. *J. Urol.*, 147, 496—499, 1992.
 - 22) Wen, D., Peles, E., Cupples, R., Suggs, S.V., Bacus, S.S., Luo, Y., Trail, G., Hu, S., Silbiger, S.M., Levy, R.B., Koski, R.A., Lu, H.S. and Yarden, Y.: Neu differentiation factor: A transmembrane glycoprotein containing an EGF domain and an immunoglobulin homology unit. *Cell*, 69, 559—572, 1992.
 - 23) Holmes, W.E., Sliwkowski, M.X., Akita, R.W., Henzel, W.J., Lee, J., Park, J.W., Yansura, D., Abadi, N., Raab, H., Lewis, G.D., Shepard, H. M., Kuang, W.-J., Wood, W.I., Goeddel, D.V. and Vandlen, R.L.: Identification of Heregulin, a specific activator of p185^{erbB2}. *Science*, 256, 1205—1210, 1992.
 - 24) Mori, S., Mori, Y., Mukaiyama, T., Yamada, Y., Sonobe, Y., Matsushita, H., Sakamoto, G., Akiyama, T., Ogawa, M., Shiraishi, M., Toyoshima, K., Yamamoto, T.: In vitro and in vivo release of soluble erbB-2 protein from human carcinoma cells. *Jpn. J. Cancer Res.*, 81, 489—494, 1990.

(1992年8月5日受付, 1993年7月9日受理)