特集 新展開する呼吸器病学

順天堂医学 36 (4)
P. 470~477 (1991)

呼吸器疾患への細胞分子生物学的アプローチ：

肺癌についての最近の知見**

Biological and molecular aspects of lung cancer

下 里 幸 雄*

YUKIO SHIMOSATO, M. D.

肺小細胞癌の分化抗原については、最近、話題になっている cluster 1 small cell lung cancer antigen (NCAM) を中心に、腺癌では surfactant apoproteins が他臓器の腺癌との鑑別に利用できることを述べた。腺癌には組織学的・細胞学的亜型が多いが、その悪性度関連因子(予後因子)として、癌細胞核の平均 DNA 量、異数体細胞の出現頻度が重要であること、また、癌細胞の増殖性も重要な因子であることを解説した。増殖性を知るには bromodeoxyuridine ラベル後の免疫染色、proliferating cell nuclear antigen に対する免疫染色が有用であった。癌抑制遺伝子の欠失ないし不活化については、13q 17p 3p を中心に、また癌遺伝子の異常については *myc* 関連遺伝子の増幅・活性化について、それぞれ肺癌発生と憎悪との関連で概説した。これらの基礎研究の成果のあるものはすでに臨床応用が可能である。

索引用 語：肺小細胞癌，cluster 1 SCLC 抗原，神経細胞接着分子，表面活性物質，核 DNA 量，増殖細胞核抗原，癌抑制遺伝子，癌遺伝子

Key words：small cell lung cancer (SCLC)，Cluster 1 SCLC antigen，neural cell adhesion molecule (NCAM)，surfactant apoproteins，nuclear DNA content，proliferating cell nuclear antigen (PCNA)，antioncogenes，oncogenes

はじめに

癌細胞の細胞レベルでの知識は長年光学顕微鏡に頼ってきたが、1950年代に入って電子顕微鏡が解析の道具として加わり、多くの超微形態レベルでの知見が加わった。その後1970年代に免疫酵素組織化学が考案され、細胞内物質の同定がある程度可能となり、形態に機能を結びつけた研究が

行われるようになった¹⁾。これに更に、拍車を掛けたのがハイブリドーマを用いたモノクローナル抗体の開発である。これと時期をほぼ同じくして、flow cytometry あるいは cytophotometry・cytofluorometry を用いた ploidy や cell kinetics の研究が盛んに行われるようになった。それ以前は³H-thymidine をラベルし、autoradiography でDNA 合成期(S期)細胞の解析が行われてはいたが、同位元素を使用するという難点があった。細胞増殖、特に DNA 合成期(S期)細胞に関しては最近では thymidine の analogue である bromodeoxyuridine (BrdU) を細胞に取り込ませ、BrdU に対する抗体を用いて免疫染色を

* 国立がんセンター病院臨床検査部長

Clinical Laboratory Division, National Cancer Center Hospital, Tokyo, Japan

** 第254回順天堂医学会学術集会 (Sept. 20, 1990 開催)
〔Oct. 25, 1990原稿受領〕

行い同定することができるようになった²⁾。また proliferating cell nuclear antigen (PCNA, cyclin) などに対する免疫染色で増殖性を知り得るようになった³⁾。

更に最近になって、DNA technology の著しい進歩の結果、癌細胞の遺伝子異常（癌遺伝子の増幅・点突然変異・活性化・癌抑制遺伝子の不活性化など）を知ることができるようになった⁴⁾。形態中心の病理医に活をいれたのは、長年倉庫に温存していたホルマリン固定パラフィン包埋組織が、DNA の解析にある程度使用可能であることがわかったことである⁵⁾。

本稿では、上述の時間の流れに沿った肺癌の細胞・分子生物学的知見を、筆者が本年3月まで所属していた研究室のデータを中心に述べることにする。

免疫組織化学を用いた肺癌細胞の解析

免疫組織化学を用いることによって解析できる抗原は、大きく分化抗原 (differentiation antigen) と癌関連抗原 (cancer associated antigen) の二つに分けられる。

A. 肺癌細胞の分化抗原

分化抗原として最もよく活用されているのがケラチンで、この存在は、紡錘細胞（扁平上皮）癌の診断の根拠ともなる。扁平上皮の terminal differentiation を示すものとしては、involucrine がある。ここでは小細胞癌と腺癌についてまとめる。

1) 小細胞癌

肺の小細胞癌 (SCLC) が ACTH・抗利尿ホルモンなど下垂体や視床下部から産生されるアミン・ペプチドホルモンを産生することが知られていたため、これらを細胞内に固定しようとの試みから始まった。その後この SCLC が神経内分泌的性質を兼ねるため、gastrin releasing peptide (GRP)・calcitonin (CT) などをはじめ産生し、GRP は治療時におけるモニタリング・マーカーとして有用であることが示された⁶⁾。また chromogra-

nin A がマーカーとして使用される一方、神経内分泌細胞に特長的な酵素 aromatic L-amino-acid decarboxylase (L-dopa decarboxylase) (AADDC)・neuron specific enolase (NSE)・creatin kinase BB (brain form) が生化学的・免疫組織学的マーカーとして使用されている⁷⁾。これらの酵素は癌細胞にびまん性に認められるが、アミン・ペプチドホルモンの反応産物は少数細胞に散在性にみられるにすぎない。

最近注目され始めた抗原に、cluster 1 SCLC antigen がある。この抗原は数施設で、SCLC 細胞を免疫源として得られたモノクローナル抗体が同一抗原を認識することから名付けられたが、免疫組織化学的にも細胞化学的にも SCLC の全例に存在し、非小細胞癌ではまれであることが明らかになった。そしてこの抗原は膜蛋白で分子量125-145 kDaであること、そしてこの抗体は neural cell adhesion molecule (NCAM) と反応することが最近明らかになった¹⁰⁾。しかしながら、cluster 1 SCLC 抗原はホルマリンで容易に不活化されるので、モノクローナル抗体の多くは凍結切片ないし冷アセトン固定標本 (AMeX)¹¹⁾を必要とする。筆者らも NCC-LU-243 244 246 の3種の抗体を得、それぞれが cluster 1 SCLC 抗原上の異なった epitope を認識することを示したが⁹⁾、なかでも LU-243 はホルマリンで短時間 (overnight) 固定された標本とは反応することが示され、かつホルマリンに2%の割合で zinc sulfate を加えることで抗原性を比較的良好に保つことができることを示した¹²⁾。なお、NCAM の糖鎖を認識する抗体 MoAb 735 との比較検討では、反応性がやや異なること、すなわち、免疫染色で 735 と反応する抗原はややホルマリン抵抗性であるが分布範囲は狭く、甲状腺濾胞細胞や副腎皮質細胞には認められず、肺の腺癌細胞のあるものでは、細胞質内に顆粒状の反応産物として認められることがあるなどである（当銘ら 未発表データ）。

LU-243 での免疫染色では純 SCLC の全例で、かつほとんどすべての癌細胞膜が染まるが（図-1）、SCLC with large cell component と診断される

図-1 肺小細胞癌

Cluster 1 SCLC 抗原と反応する NCC-LU-243 モノクローナル抗体を用いた免疫染色。すべての癌細胞の細胞膜が陽性所見を示す

図-2 肺大細胞癌

図-1と同じ抗体を用いた免疫染色で、細胞膜が陽性所見を示すものとしからざるものがある。(日本胸部臨床. 48 (8), 629~637, 1990 より転載)

癌や、時に陽性所見を示す大細胞癌・腺癌・扁平上皮癌では常に巣状に陽性癌細胞群が認められ、その間には未染の癌細胞群が介在することから

(図-2), pure SCLC とは区別されることを知った。ところで深山らは、この抗原が胎児期の肺の上皮細胞に存在することを示している¹³⁾、陽性所見は必ずしも neural cell への分化を意味するのではなくて、後に述べる癌細胞の胎児化を意味するのかも知れない。そのように理解すれば、非 SCLC のあるものが陽性所見を示すことがうなずける。

2) 腺癌

腺癌における分化抗原の一つとして、気管支腺の方向に分化を示す癌における lactoferrin や、分泌細胞に見られる secretory component があげられるけれども、最も重要な抗原は surfactant apoproteins (SAP) である。

SAP は正常肺ではⅡ型肺胞上皮細胞の細胞質内に存在し、この細胞の免疫組織学的同定に用いられる。これを認識するモノクローナル抗体には PE-10 がある¹⁴⁾。筆者らの経験では肺腺癌の約半数が分化度にかかわらず、陽性所見を示した(図-3)(表-1)¹⁵⁾。当初はⅡ型肺胞上皮型の腺癌や Clara 細胞型の腺癌のみが陽性所見を示すのではないかと考えたが、実際には杯細胞型を除くすべての腺癌亜型で陽性を示すものがあり、細胞形態に関しどの方向への分化を示しても SAP をもつものがあることがわかった。更に肺以外の腺癌について検討したところ、胃癌・膵癌・胆管癌・乳癌には1例も陽性例がなかったが、

表-1 Surfactant Apoprotein Positive Lung Cancers

	positive cases/ examined cases	%
Adenoca.	36 (18) / 75	48% (24%)
well diff.	19 (12) / 41	46% (29%)
mod. diff.	11 (5) / 24	46% (21%)
poorly diff.	6 (1) / 10	60% (10%)
Squam. cell ca.	0 / 5	0%
Large cell ca.	0 / 8	0%
Small cell ca.	0 / 1	0%
Metastatic lung ca.	0 / 23	0%

Parentheses indicate the number of cases with positive reaction in nuclear inclusions.

図-3 肺の高分化乳頭腺癌

surfactant apoproteins に対するモノクローナル抗体 PE-10 を用いた免疫染色。大多数の癌細胞の細胞質が陽性所見を示す

表-2 Surfactant Apoprotein Positive Adenocarcinoma of Various Organs

	positive cases/ examined cases	%
Gastric ca.	0 / 40	0
Pancreatic ca.	0 / 39	0
Breast ca.	0 / 20	0
Ca. of biliary tree	0 / 27	0
Thyroid ca.	3 / 22	14
Total	3 / 148	2

Nuclear inclusions were positive in 2 cases of thyroid carcinoma.

甲状腺癌の22例中3例に陽性所見を示すものがあった(表-2)。しかしながら、コロイドも共に染まることから、染色所見が肺腺癌と甲状腺癌で異なるといえる。この所見から、原発不明の転移性腺癌でSAP陽性なら肺癌であると診断できる。さらに胸膜中皮腫では全例陰性なので、陽性であれば中皮腫ではなく肺腺癌と診断できる¹⁶⁾。

B. 癌関連抗原

癌関連抗原として最もよく知られているのは carcinoembryonic antigen (CEA) であるが、

Clara 型腺癌の約70%が免疫染色で陽性である。この抗原はまた癌細胞の異型度が強くなると増量するようである。

細胞の癌化に伴って糖鎖の合成不全ないし異常な合成の結果、前駆物質の蓄積が見られることがある。この好例として血液型抗原があげられる。たとえば、非腫瘍性の上皮細胞の粘液はH抗原陽性であるが、腺癌の粘液ではH抗原の合成がみられず、その前段階物質である1(Ma)抗原がみられた¹⁷⁾。この所見は肺ではかなり特異的であるが、胃粘膜では腸上皮化生における杯細胞のあるものが陽性所見を示し、癌に特異的ではないことが明らかとなった。

Cytofluorometry による腺癌細胞の解析

癌細胞のDNA量の測定には flow cytometry・cytofluorometry・cytophotometry などがあるが、筆者ら形態を専門とするものはcytofluorometry を用いる場合が多い。核DNA量が癌細胞の悪性度の indicator になり得るか否か、重要な予後因子の一つとなり得るか否かについて検討される場合が多く、幾つかの臓器の癌について肯定的な結果が得られている^{18~20)}。肺癌でも腺癌について悪性度関連因子の一つになり得ることが示された。すなわち、組織学的に低分化な腺癌の予後は高分化腺癌に比べ不良であるが、平均DNA量でみると低分化なるもの程大であった²¹⁾。またStage Iの腺癌で、術後5年以内に再発した群と再発しなかった群を比較すると、再発群で平均DNA量が有為に大であり、かつ高分化癌において、またT₁癌においてより有為であった²²⁾。更に、平均核DNA量だけでなくaneuploid stem lineの出現の頻度、ヒストグラム・パターンの正常からの偏倚も悪性度と関連していた。そして平均核DNA量は、癌細胞核の核面積ともよい相関関係を示していた。核のDNA量の検討は、またneoplastic (or malignant) progressionの検討にも使われた。すなわち、肺腺癌の発生における異型腺腫様病変(腺腫あるいは極めて高分化

な腺癌とも考えられる) よりの腺癌の段階的発生 (あるいは多段階悪性度増強) である。この検討の結果、肺腺癌のあるものは段階的に DNA 量を増し、腺腫より腺癌になるとの考え、すなわち、大腸癌同様に adenoma carcinoma sequence を示すのではないかと考えられた²³⁾。そして更に、原発巣と脳転移・肝転移・リンパ節転移を比較することによって、平均核 DNA 量は、血行転移巣では原発巣あるいは一次リンパ節転移よりも有為に高いことが示された。また同じ症例のヒストグラムの解析で、平均核 DNA 量が血行転移巣でより大きいことは、(1) 原発巣において平均核 DNA 量の大きい (悪性度の高い) クローンが出現し、それが血行転移を示す場合と (2) 転移先で DNA 量のより大きな subclone が出現する場合があるらしいことを知った (野守ら 未発表データ)。

癌細胞の増殖性の解析

細胞回転や DNA 合成期 (S 期) の細胞の検討に、³H-thymidine を使ったオートラジオグラフィが好んで使われたが、前述の如く、最近これに代わって BrdU を取り込ませた後、免疫染色で取り込んだ細胞を同定するという方法が使用されるようになった。BrdU は放射線の増感剤に用いられるので、脳外科領域では手術前に BrdU を静注し *in vivo* で取り込ませるという方法がとられている。この方法で、肺癌の脳転移症例の labeling index は 5% 以上であることが示された²⁴⁾。しかし本邦においては、その他の癌について *in vivo* でラベルするには、各施設における倫理委員会での承認を必要とする。そこで筆者らは、*in vitro* で 3 気圧加の状態でラベルする方法をとっている。この結果、小細胞癌でのラベリングは平均 19%、扁平上皮癌では平均 11%、肺癌では 3.6% で、前 2 者では症例が狭い範囲に集まっていたが、腺癌では 0.1% から 19.2% と広がりが大きく、かつ約 2/3 症例は 3% 以下という低値を示した²⁴⁾。このデータと先に示した脳転移のデータを

併せると、labeling index が 3% 以下の腺癌は先ず血行転移を示さない (血行転移成立には癌細胞の増殖性が良くなければならない) という考えが成り立つ。*in vivo* にしろ *in vitro* にせよ S 期にある細胞がすべてラベルされるとは限らない。ラベルされるためには BrdU が直接癌細胞と接触せねばならないからである。そこで最近では増殖期にある細胞の核内にある抗原を染めだそうとの試みがなされている。すなわち、先に述べた PCNA や Ki-67 などである。この種の抗原の多くはホルマリンに不安定で、凍結切片の使用を余儀なくされている。しかしながら最近、ホルマリン固定パラフィン切片でも反応する抗体 TOB-7 が作成されている³⁾。この抗体を用いて前述の carcinoma in adenoma と考えられる病変を染色したところ、adenoma と考えられる部分では陽性細胞がほとんど認められなかったが、腺癌と診断される所では多くの癌細胞の核が陽性所見を示した (松野ら 未発表データ)。肝臓における nodule in nodule 病変でも類似の所見が得られている²⁵⁾。肺癌全体からみると癌細胞の増殖性と予後は必ずしも相関するものではないが、腺癌という一つの組織型についてみると、その相関関係は大であるように思われる。

肺癌における遺伝子異常とその意義

遺伝子異常については癌抑制遺伝子と癌遺伝子の異常がある。

1) 癌抑制遺伝子

SCLC の培養株細胞の核型分析の結果、検索された全例で 3 番染色体短腕 3p (13-24) に、部分欠失があることが報告されたのは約 8 年前である²⁶⁾。当時多くの研究者がこの所見が事実であるとしたが、3p (-) のみられない SCLC もあるという報告もあった。その後 DNA technology の進歩によって、restriction enzyme fragment length polymorphism (RFLP) を見出す方法が開発され、この結果、SCLC 全例に 3p (-) があることが証明された^{4, 27)}。そののみならず SCLC の

全例に17p(-), またほぼ全例に13q(-)があることが示された²⁸⁾. ところで17pにはp53という遺伝子があり, 大腸癌を含む幾種類かの癌でこの欠失があること, また13qには網膜芽腫でよく検討されたRB遺伝子があることが知られている. いずれも癌抑制遺伝子と考えられているもので, この欠失ないし不活性化によって癌が発生するとされている. ところでSCLCにおいても, p53 RB遺伝子に異常があり, その産物が欠損していることが確かめられており, その発生に重要な役割を演じているらしい²⁸⁾²⁹⁾³⁰⁾. 3p(-)はSCLCのみならず肺腺癌でも4/5症例にみられており, 子宮頸癌では100%, 腎癌でも50%以上に認められているので³⁰⁾, ここにも重要な癌抑制遺伝子があるのではないかと考え, 目下解析が急がれている. かなり早期のSCLCにもこの欠失が確認されているので, SCLC発生の鍵を握る遺伝子がここにあるのであろう.

2) 癌遺伝子

癌遺伝子は癌抑制遺伝子よりも先に話題となり, 現在では30種以上が知られている. 癌遺伝子の異常には, 増幅 (amplification)・点突然変異 (point mutation)・転座 (translocation) などによる活性化があげられる. SCLCでは*myc* 関連遺伝子 (*c-myc* *N-myc* *L-myc*) の異常が認められている.

myc 関連遺伝子の増幅・活性化については, 1つの腫瘍内においても *heterogeneity* があり, 現在ではSCLCの発生よりも増悪に関連した遺伝子であろうと考えられている³¹⁾. 培養系においても増殖の速い株で*c-myc* *L-myc* の異常がみられる頻度が高く, ノードマウスへの移植率をみても異常のあるもので頻度が高く, ないものでは *take* しない場合が多いことが示されている³²⁾. 肺腺癌での解析でも, 原発巣18例中*c-myc*の増幅例は0であったが, 脳転移17例中には9例もみられ, この異常が悪性度と関連しているようであった (中島ら 未発表データ).

さて腺癌については, その約30%に*c-Ki-ras*の12番目のcodonに点突然変異が見られるとの

報告がなされたが³³⁾, 筆者らの腺癌67症例の検討では10例 (15%)にみられたにすぎなかった. そして増殖性や悪性度との関連はないようで, むしろ細胞型と密接に関係しており, 気管支表面上皮型や杯細胞型などの気管支上皮への分化を示す癌ではその頻度が高く, 末梢気道の細胞であるClara細胞やⅡ型上皮への分化を示す癌では, その頻度が極めて低かった³⁴⁾. 大腸では癌のみならず腺腫にも点突然変異があり, かつ胃では, 腺腫と分化型腺癌には認められたが, 未分化癌・印環細胞癌では1例も認められていない (木花ら 未発表データ). したがって, *c-Ki-ras*の点突然変異は腫瘍の発生と, またその組織型と関連していると考えられる.

予後との関連については, 神経芽腫における*N-myc*³⁵⁾, 乳癌における*erbB-2*の如く³⁶⁾, 予後不良と関連した遺伝子の証明は肺癌においてはなされていないが, 増殖性との関連で*myc* 関連遺伝子は予後因子である可能性が高い.

おわりに

筆者らがこの数年間に行った肺癌に関する研究を中心に, 肺癌細胞の分化抗原・癌関連抗原, 特にその組織型・細胞型の診断への応用, 予後因子ないし悪性度の指標としての癌細胞核DNA量と増殖性, 肺癌の発生増悪と関連した染色体ないし遺伝子の異常などにつき概説した. これらの分野における研究の進歩はいちじるしく, 近い将来, 加筆すべきデータが種々と出てこよう. 訂正すべき点の見い出される可能性もある. 基礎研究は臨床に応用されてはじめて大きな意味をもたらるのであって, 本稿で述べられた成果の幾つかは, 応用可能なものと考えられる. 診断治療にとどまらず, 基礎研究の成果が肺癌の予防に連なる日が来ることを期待したい.

文 献

- 1) Sternberger, LA : The unlabelled antibody peroxidase-antiperoxidase (PAP) method. In : Immunohistochemistry. Second Edition, pp. 104~109, John Wiley & Sons, New York, 1979
- 2) Tada T, Kodama T, Watanabe S, *et al.* : Immunohistochemical cell kinetic study of human lung cancer by using monoclonal antibody to bromodeoxyuridine. Jpn. J. Clin. Oncol., **16** : 129~135, 1986
- 3) Murashima A, Takasaki Y, Ohgaki M, *et al.* : Activated peripheral blood mononuclear cells detected by murine monoclonal antibodies to proliferating cell nuclear antigen in active lupus patients. J. Clin. Immunol., **10** : 1~10, 1990
- 4) Yokota J, Wada M, Shimosato Y *et al.* : Loss of heterozygosity on chromosomes 3, 13 and 17 in small-cell carcinoma and chromosome 3 in adenocarcinoma of the lung. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **84** : 9252~9256, 1987
- 5) Noguchi M, Hirohashi S, Hara F, *et al.* : Heterogenous amplification of *myc* family oncogenes in small cell lung carcinoma. Cancer (in press)
- 6) Maruno K, Yamaguchi K, Abe K, *et al.* : Immunoreactive gastrin releasing peptide as a specific tumor marker in patients with small cell lung carcinoma. Cancer Res., **49** : 629~632, 1989
- 7) Nakajima, T, Shimosato Y, Morinaga S, *et al.* : Immunohistochemical study of small cell lung carcinoma : With special reference to the neuroendocrine markers aromatic L-amino acid decarboxylase and gastrin-releasing peptide. Jpn. J. Clin. Oncol., **16** : 223~233, 1986
- 8) Hirohashi S, Kunii T, Hirano T, *et al.* : 145 kDa cell membrane antigen on SCLCs as a common target for several monoclonal antibodies raised against SCLCs. Lung Cancer, **4** : 103~104, 1988
- 9) Hirano T, Hirohashi S, Kunii T, *et al.* : quantitative distribution of cluster 1 small cell lung cancer antigen in cancerous and non-cancerous tissues, cultured cells and sera. Jpn. J. Cancer Res., **80** : 348~355, 1989
- 10) Patel K, Moore SE, Dickson G, *et al.* : Neural cell adhesion molecule (NCAM) is the antigen recognized by monoclonal antibodies of similar specificity in small-cell lung carcinoma and neuroblastoma. Int. J. Cancer, **44** : 573~578, 1989
- 11) Sato Y, Mukai K, Watanabe S, *et al.* : The AMeX method : a simplified technique of tissue processing and paraffin embedding with improved preservation of antigens in immunostaining. Am. J. Pathol., **125** : 431~435, 1986
- 12) Tome Y, Hirohashi S, Noguchi M, *et al.* : Preservation of cluster 1 small cell lung cancer antigen in zinc-formalin fixative and its application to immunohistochemical diagnosis. Histopathology, **16** : 469~474, 1990
- 13) Fukayama M, Funata N, Hayashi Y, *et al.* : Brain-associated small-cell lung cancer antigen (BASCA) is expressed in developing lung : An immunohistochemical and immunoelectron microscopic study. J. Histochem Cytochem., **38** : 51~57, 1990
- 14) Kuroki Y, Dempo K, Akino T : Immunohistochemical study of human pulmonary surfactant apoproteins with monoclonal antibody. Pathologic application for hyaline membrane disease. Am. J. Pathol., **124** : 25~33, 1986
- 15) Mizutani Y, Nakajima T, Morinaga S, *et al.* : Immunohistochemical localization of pulmonary surfactant apoproteins in various lung tumors, with special reference to lung adenocarcinoma subtypes. Cancer, **61** : 532~537, 1988
- 16) Noguchi M, Nakajima T, Hirohashi S, *et al.* : Immunohistochemical distinction of malignant mesothelioma from pulmonary adenocarcinoma with anti-surfactant apoprotein, anti-Lewis a, and anti-Tn antibodies. Human Pathol., **20** : 53~57, 1989

- 17) Hirohashi S, Ino Y, Yamada T, *et al.*: Distribution of blood group antigens A, B, H, and I (Ma) in mucus producing adenocarcinoma of human lung. *J. Natl. Cancer Inst.*, **72** : 1299~1305, 1984
- 18) Emdin SO, Stenling R, Roose G : Prognostic value of DNA content in colorectal carcinoma : A flow cytometric study with some methodologic aspects. *Cancer*, **60** : 1282~1287, 1987
- 19) Friendlander ML, Hedley DW, Taylor IW, *et al.*: Influence of cellular DNA content on survival in advanced ovarian Cancer. *Cancer Res.*, **44** : 397~400, 1984
- 20) Trindelli-Danesi D, Teodori S, Mauro F : *et al.*: Prognostic significance of flow cytometry in lung cancer. A 5-year study. *Cancer*, **60** : 844~851, 1987
- 21) Asamura H, Nakajima T, Mukai K *et al.*: DNA cytofluorometric and nuclear morphometric analyses of lung adenocarcinoma. *Cancer*, **64** : 1657~1664, 1989
- 22) Asamura H, Nakajima T, Mukai K, *et al.*: Nuclear DNA content by cytofluorometry of stage 1 adenocarcinoma of the lung in relation to postoperative recurrence. *Chest*, **96** : 312~318, 1989
- 23) Nakayama H, Noguchi M, Tsuchiya R, *et al.*: Clonal growth of atypical adenomatous hyperplasia of the lung : Cytofluorometric analysis of nuclear DNA content. *Modern Pathol.*, **3** : 314~320, 1990
- 24) Yoshida K, Morinaga S, Shimosato Y, *et al.*: A cell kinetic study of pulmonary adenocarcinoma by an immunoperoxidase procedure after bromodeoxyuridine labeling. *Cancer*, **64** : 2284~2291, 1989
- 25) Matsuno Y, Hirohashi S, Furuya S, *et al.*: Heterogeneity of proliferative activity in nodule in nodule lesions of small hepatocellular carcinoma. *Jpn. J. Cancer Res.* **81** : 1137~1140, 1990
- 26) Whang-Peng J, Bunn Jr. PA, Kao-Shan CS, *et al.*: A non-random chromosomal abnormality, del 3p (14~23) in human small cell lung cancer (SCLC). *Cancer Genet. Cytogenet.*, **6** : 119~134, 1982
- 27) Naylor SL, Johnson BE, Minna JD, *et al.*: Loss of heterozygosity of chromosome 3p markers in small-cell lung cancer. *Nature (Lond.)*, **329** : 451~454, 1987
- 28) Yokota J, Akiyama T, Fung Y-KT, *et al.*: Altered expression of the retinoblastoma (RB) gene in small cell carcinoma of the lung. *Oncogene*, **3** : 471~475, 1988
- 29) Takahashi T, Nau MM, Chiba I, *et al.*: p53 : A frequent target for genetic abnormalities in lung cancer. *Science*, **246** : 491~494, 1989
- 30) Yokota J, Tsukada Y, Nakajima T, *et al.*: Loss of heterozygosity on the short arm of chromosome 3 in carcinoma of the uterine cervix. *Cancer Res.*, **49** : 3598~3601, 1989
- 31) Yokota J, Wada M, Yoshida T, *et al.*: Heterogeneity of lung cancer cells with respect to the amplification and rearrangement of *myc* family oncogenes. *Oncogene*, **2** : 607~611, 1988
- 32) Gemma A, Nakajima T, Shiraishi M, *et al.*: *myc* family gene abnormality in lung cancers and its relation to xenotransplantability. *Cancer Res.*, **48** : 6025~6028, 1988
- 33) Rodenhuis S, Slebos RJC, Boot AJM *et al.*: Incidence and possible clinical significance of *K-ras* oncogene activation in adenocarcinoma of the human lung. *Cancer Res.*, **48** : 5738~5741, 1988
- 34) Kobayashi T, Tsuda H, Noguchi M, *et al.*: Association of point mutation in *c-Ki-ras* oncogene in lung adenocarcinoma with particular reference to cytologic subtypes. *Cancer*, **66** : 289~294, 1990
- 35) Tsuda H, Shimosato Y, Upton MP, *et al.*: Retrospective study on amplification of *N-myc* and *c-myc* genes in pediatric solid tumors and its association with prognosis and tumor differentiation. *Lab. Invest.*, **59** : 321~327, 1988
- 36) Tsuda H, Hirohashi S, Shimosato Y, *et al.*: Correlation between long-term survival in breast cancer patients and amplification of two putative oncogene-coamplification units ; *hst-1/int-2* and *c-erbB-2/ear-1*. *Cancer Res.*, **49** : 3104~3108, 1989