

①

主論文

6.3.25 甲/216

表在性膀胱癌における Malignant potential の指標としての ABH-isoantigen

——PCNA, c-erbB-2 との関連について——

岡山大学医学部泌尿器科学教室（主任 大森弘之教授）

郭 春 鋼

ISOANTIGEN ABH IN BLADDER TUMORS AS AN INDICATOR OF MALIGNANT POTENTIAL

——A COMBINED STUDY WITH PCNA AND c-erbB-2——

SHUNKO KAKU

Department of Urology (Director: Prof. H. Ohmori),
Okayama University Medical School, Okayama, Japan

西 日 本 泌 尿 器 科 別 冊

1994年3月発行

（第56巻第3号）

表在性膀胱癌における Malignant potential の指標としての ABH-isoantigen

——PCNA, c-erbB-2 との関連について——

岡山大学医学部泌尿器科学教室 (主任 大森弘之教授)

郭 春 鋼

ISOANTIGEN ABH IN BLADDER TUMORS AS AN INDICATOR OF MALIGNANT POTENTIAL

——A COMBINED STUDY WITH PCNA AND c-erbB-2——

SHUNKO KAKU

Department of Urology (Director: Prof. H. Ohmori),
Okayama University Medical School, Okayama, Japan

It is clinically important to predict the clinical course of superficial bladder cancer at the time of initial diagnosis. We analyzed the clinical course of 62 cases of superficial bladder cancer, as regards recurrence, increase in stage and cancer death based on the immunohistochemical detection of blood group isoantigen (BGA), proliferating cell nuclear antigen (PCNA) and c-erbB-2.

Among 10 cases with increase in stage, 9 cases (90%) were BGA-negative. Moreover, all 3 cases resulting in cancer death were also BGA-negative cases. Detection of BGA can be regarded as a potential indicator of the prognosis of superficial bladder cancer (prognostic marker).

The labelling index of PCNA was well correlated with the clinical grade, and indicated the potency of the proliferation. Cases with a low labelling index (less than 30%) had a good clinical course without any increase in stage.

There was no clear correlation between c-erbB-2 positivity and prognosis.

A combination of BGA and PCNA was effective for the differentiation between those cases which were in the low-risk group (BGA-positive and PCNA-labelling index of less than 30%) and those cases which were in the high-risk group (BGA-negative and PCNA-labelling index of more than 30%).

(Nishinohon J. Urol. 56: 251-257, 1994)

key words: bladder cancer, malignant potential, BGA, PCNA, c-erbB-2

キーワード: 膀胱癌, malignant potential, 血液型抗原, 増殖性細胞核抗原, c-erbB-2

緒 言

表在性膀胱癌は一般に 60~80%が再発するが, その多くは表在性再発のまま経過する。しかしながら, 10~20%は再発時に浸潤癌に移行し, 不幸な転帰をとることがあり, 初発時にその予後を予測することは臨床上重要である。予後予測の指標の一つとして血液型抗原 (ABH-isoantigen, blood group isoantigen, 以下 BGA と略す) が有用であることが報告されている^{1)~7)}。また, G1 後期から S 期にかけて合成される DNA polymerase- δ 補助

蛋白である増殖性細胞核抗原 (proliferating cell nuclear antigen, 以下 PCNA と略す) は細胞増殖の指標と考えられている⁸⁾。一方, protooncogene である c-erbB-2 遺伝子は乳癌, 胃癌, 腎癌, 卵巣癌などにおいて増幅, 過剰発現し, 予後因子としての意義が注目されている⁹⁾¹⁰⁾。今回, BGA, PCNA および c-erbB-2 蛋白の表在性膀胱癌における局在を免疫組織学的に検討するとともに, 予後 (stage-up, 癌死) との関連について検討した。

対象および方法

1986年から1990年までの5年間に岡山大学泌尿器科において表在性膀胱移行上皮癌 (Ta, T₁) と診断され、かつパラフィン包埋された組織の入手が可能であった62例を対象とした。年齢は33歳から85歳までで、平均64.8歳であった。性別は男性51例、女性11例であり、

Table 1 Patients' characteristics

No. of Pts.	62
Age (years)	33~85 (mean 64.8)
Sex:	
Female	11
Male	51
Blood Type:	
A	23
B	15
AB	7
O	17
Stage:	
Ta	23
T ₁	39
Grade:	
G1	15
G2	29
G3	18
Recurrent	23
times:	
1~3	35
4~12	4
Follow-up periods (mos.)	1~71 (mean 37.8)

3% hydrogen peroxidase (10 min)

Normal serum (15 min)

Primary monoclonal antibody
(4°C overnight)

Biotinylated secondary antibody (60 min)

Peroxidase-conjugated streptavidin (30 min)

DAB (3, 3'-diaminobenzidine) (5 min)

Counterstaining with Hematoxylin

Fig. 1 Method (paraffin-embedded tissue)

Table 2 Staining pattern of BGA, PCNA and c-erbB-2 by LSAB

BGA: Positive:	Type I: Stained homogeneously and as intensely as normal urothelium.
	Type II: Stained homogeneously but less intensely than normal urothelium.
	Type III a: Stained non-homogeneously with negative area (less than 50%).
Negative:	Type III b: Stained non-homogeneously with negative area (more than 50%).
	Type IV: Stained negatively with no positive area.
PCNA: Labeling Index (LI):	
The percentage of positive tumor cells among 500 cells	(Fig. 2)
c-erbB-2: Negative (-): Stained negatively without positive area.	
Positive (+): Stained positively with or without negative area.	(Fig. 3)

血液型はA型が23例、B型が15例、O型が17例、AB型が7例であった。GradeはG1が15例、G2が29例、G3が18例であった。なお、経過中に遠隔転移を認めたか、T₂以上の浸潤癌へ移行した症例をstage-upと判定した。表在性膀胱癌62例のうち、経過中、再発を認めた症例は39例(62.9%)で、stage-upを認めた症例は10例(16.1%)であった(**Table 1**)。

染色方法であるが、ホルマリン固定(24hrs以内)パラフィン包埋組織を3μmに薄切し、キシレン、エタノールにて脱パラフィン後、Labelled Streptavidin Biotin法にて、自動免疫染色装置(Cadenza)を用いて染色した。すなわち、燐酸緩衝食液(PBS)にて洗浄し、3%過酸化水素水で10分間処理、組織内因性peroxidaseを消化した。次いで正常ヤギ血清(1:5希釈, DAKO社製)にて15分間処理し、background stainingを除去した。第1次抗体である抗A(1:100希釈), 抗B(1:20希釈), 抗H(1:5希釈)マウス血清(DAKO), 抗PCNAマウス血清(1:20希釈, DAKO, PC10), 抗c-erbB-2マウス血清(1:10希釈, TRITON, mAb1)を4°Cでovernightし、自動免疫染色装置に装填し、燐酸緩衝食液(PBS)にて洗浄後、第2次抗体であるビオチン標識抗マウスイムノグロブリン・ヤギ抗体を30分間、peroxidase-conjugated streptavidinを30分間反応させ、DAB(3, 3'-diaminobenzidine)にて5分間発色した。最後に、hematoxylinにてcounterstainingを行った(**Fig. 1**)。

なお、有意差検定にはt検定およびχ²検定を用いた。

結 果

1. BGA, PCNA, c-erbB-2の染色パターン

a) BGA

正常尿路上皮細胞、赤血球、血管内皮上皮がDAB-H₂O₂反応物質により、一様に暗褐色に染色された。腫瘍細胞は正常の尿路上皮細胞と同様に染色されるものから全く染色が消失しているものまであり、腫瘍細胞の染色パ

ターンの判定は那須らの判定基準に従って分類した(**Table 2**)⁴⁾。BGA type I~III aはBGA陽性群, BGA

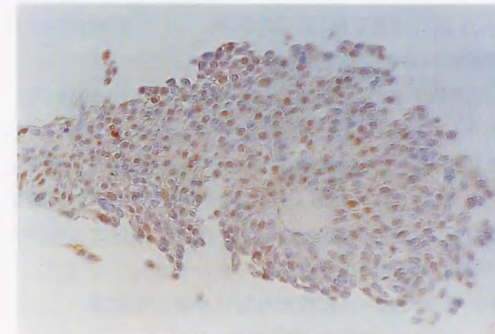


Fig. 2 PCNA is positive in the nucleus.

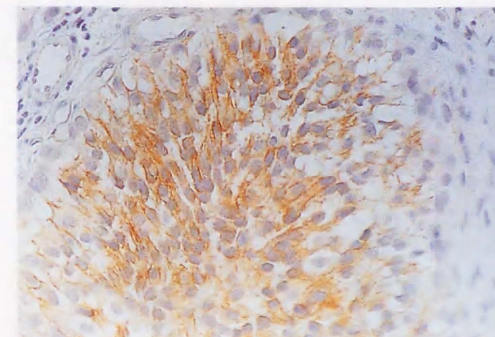


Fig. 3 C-erbB-2: Immunohistochemical localization is at the cell membrane.

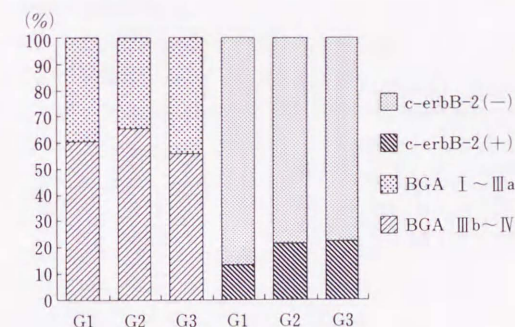


Fig. 4 Correlation of BGA, c-erbB-2 with grade

type III b, IVはBGA陰性群とした。BGA陽性であった症例は24例(38.7%)であり、陰性であった症例は38例(61.3%)であった。

b) PCNA

正常移行上皮細胞の核および腫瘍細胞の核がDAB-H₂O₂反応物質によって、暗褐色に染色された(**Fig. 2**)。腫瘍細胞500個中のPCNA陽性細胞の割合をLabeling index (LI)として算定した。正常移行上皮組織におけるLIは5%以下で、腫瘍組織におけるLIは全体で21.6%~91.5%(平均60.1%)であった。LIについては30%未満のもの、30%以上~50%未満のもの、50%以上~70%未満のもの、70%以上のものの4群に分けて検討した。

c) C-erbB-2

腫瘍細胞の細胞膜に存在し、DAB-H₂O₂反応物質によって、暗褐色に染色された。腫瘍細胞の染色性を認めたものをpositiveとし、染色性を全く認めなかったものをnegativeと判定した(**Fig. 3**)。C-erbB-2が陽性であったのは12例(19.4%)であった。

2. 組織学的異型度との関係

BGA, c-erbB-2とGradeとの関係を**Fig. 4, Table 3**に示した。BGAの消失はG1で60.0%, G2で65.5%, G3で55.6%で、BGAの消失率は各Grade間に統計学的に有意の差は認められなかった。C-erbB-2についてはG1群の陽性率は13.3%, G2群の陽性率は20.7%, G3群の陽性率は22.2%で、G1に比しG2, G3で陽性率の高い傾向を認めたが、有意ではなかった。

PCNAとGradeとの関係を**Fig. 5**に示した。G1群のLIは21.6%~80%で平均46.2%, G2群のLIは22.6%~91.5%で平均60.3%, G3群のLIは44.4%~89.7%で平均71.3%であり、G3のLIはG1のそれに比し有意に高かった(p<0.001)。

3. 表在性膀胱腫瘍の予後との関係

各マーカーの染色性と予後との関係を**Table 4**に示した。再発についてみると、BGA陽性群24例では11例(45.8%), BGA陰性群38例では28例(73.7%)に再発を認めた。Stage-upについてみると、BGA陽性群では1例(4.2%), BGA陰性群では9例(23.7%)にstage-

Table 3 Correlation of BGA, and c-erbB-2 with grade

Grade	BGA		c-erbB-2	
	I~III a	III b~IV	Negative	Positive
G1 (n=15)	6 (40%)	9 (60%)	13 (86.7%)	2 (13.3%)
G2 (n=29)	10 (34.5%)	19 (65.5%)	23 (79.3%)	6 (20.7%)
G3 (n=18)	8 (44.4%)	10 (55.6%)	14 (77.8%)	4 (22.2%)
Total	24 (38.7%)	38 (61.3%)	50 (80.6%)	10 (19.4%)

up を認めた。BGA 陰性例において stage-up ($p=0.052$), 再発の症例 ($p=0.0928$) が多い傾向を認めた。さらに, 癌死例 3 例はすべて BGA 陰性例であった。

また, PCNA については, LI が 30%未満の症例では stage-up あるいは癌死例は 1 例も認められなかった。し

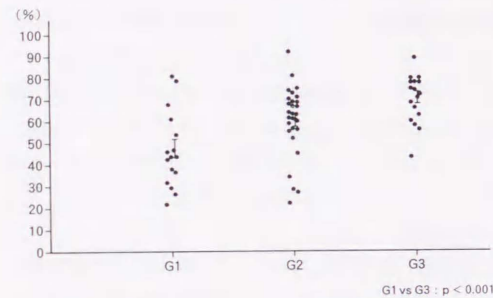


Fig. 5 Correlation of PCNA with grade

Table 4 Correlation of BGA, PCNA and c-erbB-2 with recurrence, stage-up and cancer death

		Recurrence	Stage-up	C. D. *
BGA	I ~ III a (n=24)	11 (45.8%)	1 (4.2%)	0 (0%)
	III b ~ IV (n=38)	28 (73.7%)	9 (23.7%)	3 (7.9%)
PCNA	<30% (n=6)	3 (50%)	0 (0%)	0 (0%)
	30 ≤ <50% (n=10)	4 (40%)	3 (30%)	1 (10%)
	50 ≤ <70% (n=26)	17 (65.4%)	5 (19.2%)	1 (3.8%)
	≥ 70% (n=20)	15 (75%)	2 (10%)	1 (5%)
c-erbB-2	Negative (n=50)	32 (64%)	9 (18%)	2 (4%)
	Positive (n=12)	7 (58.3%)	1 (9.3%)	1 (9.3%)
	Total (n=62)	39 (62.9%)	10 (16.1%)	3 (4.8%)

* C. D.: Cancer Death

※ 0.05 < p < 0.1

Table 5 Correlation of BGA with PCNA

BGA	Labelling index of PCNA				Total
	<30%	30% ≤ <50%	50% ≤ <70%	≥70%	
I ~ III a	4 (16.6%)	5 (20.8%)	6 (25%)	9 (37.5%) [1]	24
III b ~ IV	2 (5.3%)	5 (13.2%) [3]	20 (52.6%) [5]	11 (28.9%) [1]	38
Total	6	10	26	20	62

BGA vs PCNA: 0.1 < p < 0.2

[] : stage-up

Table 6 Correlation of BGA with c-erbB-2

BGA	c-erbB-2		Total
	(-)	(+)	
I ~ III a	21 (87.5%) [1]	3 (12.5%)	24 [1]
III b ~ IV	29 (76.3%) [8]	9 (23.7%) [1]	38 [9]
Total	50	12	62

BGA vs c-erbB-2: 0.3 < p < 0.5

[] : stage-up

かし, LI が 30%~50%の 10 例では 3 例が stage-up し, 1 例が癌死した。50~70%の 26 例では 5 例が stage-up し, 1 例が癌死した。70%以上の 20 例では 2 例が stage-up し 1 例が癌死した。以上の結果については統計的に有意差は認められなかった。

C-erbB-2 については陰性例 50 例の内, 32 例 (64%) が再発し, 9 例 (15%) に stage-up を認め, 2 例 (4%) が癌死した。また陽性例 12 例の内 7 例 (58.3%) が再発し, 1 例 (9.3%) に stage-up を認め, この症例が癌死した。C-erbB-2 の発現と再発率, 予後については統計学的に有意の差は認められなかった。

4. 各マーカーの相関ならびに予後との関連

1) BGA と PCNA (Table 5)

BGA の判定と PCNA の LI との間には明らかな相関関係は認められなかった。Stage-up 症例 10 例のうち 9 例が BGA 陰性かつ PCNA の LI が 30%以上であり, 予

Table 7 Correlation of PCNA with c-erbB-2

c-erbB-2	Labelling index of PCNA				Total
	<30%	30% ≤ <50%	50% ≤ <70%	≥70%	
(-)	5 (10%)	9 (18%) [2]	23 (46%) [5]	13 (26%) [2]	50
(+)	1 (8.3%)	1 (8.3%) [1]	3 (36%)	7 (58.3%)	12
Total	6	10	26	20	62

c-erbB-2 vs PCNA: 0.1 < p < 0.2

[] : stage-up

後不良であった。また, BGA 陽性の症例で stage-up を認めたのは 1 例であるが, この症例の PCNA の LI は 70%以上であった。

2) BGA と c-erbB-2 (Table 6)

BGA と c-erbB-2 との関連は今回の結果では明らかではなかった。予後についても一定の傾向は認められなかった。

3) PCNA と c-erbB-2 (Table 7)

PCNA と c-erbB-2 との関連は今回の結果では明らかではなく, 予後についても一定の傾向は認められなかった。

考 察

表在性膀胱癌の治療としては, 膀胱保存的治療が一般的に選択されるが, 表在性膀胱癌の再発例の 15%前後に stage-up が認められる¹¹⁾。表在性膀胱癌の治療成績を向上させるためにはその stage, grade を正確に判定して治療法を選択することが重要であることは言うまでもないが, さらに初回治療時に再発の際の stage-up を予測する因子を検討することは, 最適の治療法を選択するために必要である。我々は 1980 年以来, 表在性膀胱癌の血液型 ABH-isoantigen を分析し, その膀胱腫瘍における malignant potential の指標としての有用性を報告してきた¹¹⁻⁷⁾。我々の施設を含め, 多くの研究者は肯定的であるが, 必ずしも臨床上広く用いられているとは言えない。この点に関しては, BGA の検出法とその判定基準の一般化が行われていないことが最大の問題であると考えられる⁷⁾。

検出方法については今回は Labelled Streptavidin Biotin 法を用いることにより, パラフィン切片から counterstaining まで短時間 (約 3.5 時間) で行い得ることを確認した。また, 自動免疫染色装置 (Cadenza) を用いることにより, 良好な再現性をもって, 効率的に処置することが可能であった。判定基準についてであるが, 今回は, 那須ら⁵⁾が提唱した染色パターン⁵⁾の 5 型分類 (Type I ~ IV) に従って判定した。今回検討した 1986 年

以後の 62 例のうち, stage-up を認めた 10 例中 9 例が BGA 陰性で, 癌死例 3 例はすべて BGA 陰性例であり, 以前の報告とほぼ同様な結果であった。

抗 PCNA 抗体は 1978 年に Miyachi ら¹²⁾によって発見され, SLE 患者の血清に存在し, 肝や腎等の実質臓器の細胞核とは反応せず, リンパ節, 脾, 胸腺等のリンパ球核と反応する自己抗体として報告された。また, 増殖性細胞とも反応を示すことより, 増殖性細胞核抗原 (proliferating cell nuclear antigen: PCNA) に対する抗体と名付けられた。Takasaki ら¹³⁾はこの抗体を用い, 蛍光抗体法にて細胞周期との関係を検討した。その対応する抗原 (PCNA) は G₀期にはほとんど存在せず, G₁, S, G₂期に核質全体に speckled pattern で検出され, G₁後期から S 早期には核小体にも検出されたと報告した。Bravo ら¹⁴⁾は S 期に急激に増加する核酸蛋白 cyclin を発見し, Mathews ら¹⁵⁾はこれが PCNA と同一物質であると証明した。PCNA の機能については確証が得られていないが, 1987 年に Bravo ら¹⁶⁾と Prelich ら¹⁷⁾により, DNA polymerase- δ 補助蛋白であることが示された。Ogata ら¹⁸⁾は PCNA に対するモノクローナル抗体を作製し, 外科的材料を用いて免疫組織学的に増殖期細胞を検出することにより, 一般病理診断における腫瘍の良性悪性の判定, 予後の推定などに応用した。さらに, 鈴木ら¹⁹⁾は Ogata らが作製したモノクローナル抗体を用いて, ホルマリン固定パラフィン包埋切片において免疫組織学的に増殖期細胞の同定が可能であることを示した。さらに, 白血病においては PCNA は細胞増殖の指標となりうると報告されている⁸⁾²⁰⁾。

今回, 我々は表在性膀胱癌において PCNA の染色パターンについて検討した。PCNA の LI の平均値は G1 で 46.2%, G2 で 60.3%, G3 で 71.3%で, Grade が高いほど PCNA の LI は高く, G1 群と G3 群では G3 群の LI が有意に高かった ($p < 0.001$)。したがって, 表在性膀胱癌において PCNA は腫瘍の悪性度の指標に成り得ることが示唆された。PCNA の LI と予後との関係については stage-up, 再発, 癌死と有意の相関関係は認められな

かったが、LI が 30%未満の症例においては stage-up、癌死は 1 例も認めず、予後良好因子となり得ることが示唆された。BGA と PCNA を組み合わせて検討すると、BGA 陽性 (type I ~ III a) で PCNA の LI が 70%未満の症例、また、BGA 陰性 (type III b, IV) であっても PCNA の LI が 30%未満の 17 症例では、stage-up 症例は 1 例も認めていない。一方、BGA 陽性 (type I ~ III a) であっても PCNA の LI が 70%以上の症例、また、BGA 陰性 (type III b, IV) で PCNA の LI が 30%以上の 45 症例では、stage-up を認めた症例が 10 例 (22.2%) であった。このように BGA と PCNA の組合わせによって、予後良好群と予後不良群を抽出し得る可能性が示唆された。しかし、BGA および PCNA の判定は光学顕微鏡下にて行われており、検者によって判定が異なる可能性が考えられる。また、PCNA の LI 算定に用いられる細胞数は報告者間で一定しておらず、組織における heterogeneity など未解決の問題が存在している。今後は、判定定量化のために、イメージアナライザー、フローサイトメトリーを用いる方法が必要と考えられた。

癌遺伝子である c-erbB-2 は Semba ら²¹⁾によって発見され、乳癌、胃癌などの腺上皮性癌において増幅、過剰発現するとされている⁹⁾¹⁰⁾。泌尿器科領域では Coombs ら²²⁾は膀胱移行上皮癌において c-erbB-2 遺伝子は増幅、過剰発現し、grade が高いほどその増幅率が高く、増幅と過剰発現の間に相関関係がみられたと報告した。また、Moriyama ら²³⁾は免疫組織学的に膀胱腫瘍における c-erbB-2 遺伝子産生蛋白の出現頻度を調べ、high grade, high stage あるいはリンパ節転移陽性例によく出現すると報告した。C-erbB-2 遺伝子産生蛋白が表在性膀胱癌の予後の予測因子として有用かどうかについては報告がみられていない。著者は c-erbB-2 遺伝子産生蛋白の表在性膀胱癌における局在を免疫組織学的に検出し、その染色性と予後との相関を検討し、予後予測因子と成り得るかどうかを検討した。G1 群より G2 群、G3 群に高い陽性率を認めたが、有意差は認められなかった。Stage-up については陰性例の 15%に stage-up を認め、陽性例の 9.3%に stage-up を認めた。癌死については陰性例の 4%、陽性例の 9.3%に認めたが、明らかな関連は認められず、予後予測因子と成り得るという結論は得られなかった。

結 語

1. 初発表在性膀胱癌における BGA, PCNA および c-erbB-2 蛋白の局在を免疫組織学的に検討した。
2. 経過中 stage-up を来した症例の 90%が初発時

BGA 陰性例であり、また、癌死例 3 例はすべて BGA 陰性であり、BGA は予後予測因子として極めて重要であった。

3. PCNA の LI と Grade は相関傾向を認め、PCNA は腫瘍の悪性度の指標に成り得ると考えた。

4. PCNA を検索することにより、low risk group の抽出が可能になるものと考えられた。

5. c-erbB-2 については stage-up、癌死との関連は明らかではなかった。

6. BGA と PCNA を組合わせることにより、low risk group および high risk group の症例を抽出できる可能性が示唆された。

(稿を終えるにあたり、御指導、御校閲いただいた恩師大森弘之教授、また直接御指導いただいた那須保友講師に深謝致します。また本研究に御協力いただいた津島知靖講師、大野勝雄技官、梅井幸江、原洲尚子技術員に深謝いたします。なお、本論文の要旨は第 80 回日本泌尿器科学会総会および第 51 回日本癌学会において発表した。)

文 献

- 1) 公文裕巳・他：膀胱腫瘍における Malignant potential の指標としての ABH-isoantigen, 日泌尿会誌, **71**: 767-774, 1980.
- 2) 公文裕巳・他：膀胱腫瘍における Malignant potential の指標としての ABH-isoantigen, その 2, 長期 follow up の成績と検出法, 日泌尿会誌, **75**: 731-738, 1984.
- 3) 那須保友・他：膀胱腫瘍における Malignant potential の指標としての ABH-isoantigen, その 3, PAP 法による検出と染色パターンの分類, 日泌尿会誌, **75**: 739-743, 1984.
- 4) 那須保友：膀胱腫瘍における Malignant potential の指標としての ABH-isoantigen. PAP 法による染色パターンに基づく判定基準の作成ならびに CEA, fibronectin との関連性, 日泌尿会誌, **77**: 977-987, 1986.
- 5) 那須保友・他：膀胱腫瘍における Malignant potential の指標としての ABH-isoantigen, その 4, Thomsen-Friedenrich antigen ならびに CEA との関連性, 日泌尿会誌, **77**: 1511-1518, 1986.
- 6) 三枝道尚・膀胱腫瘍における Malignant potential の指標としての ABH-isoantigen. CEA, BMG, Leu-M1, H 抗原の併用に関する検討, 泌尿紀要, **5**: 1311-1321, 1989.
- 7) 三枝道尚・他：膀胱腫瘍における Malignant potential の指標としての ABH-isoantigen. PAP 法による染色パターンと予後, 日泌尿会誌, **81**: 196-203, 1990.
- 8) Hall, P. A. et al.: Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) immunolocalization in paraffin sections: an index of cell proliferation with evidence of deregulated expression in some neoplasms. J. Pathol. **62**: 285-294, 1990.
- 9) Yokota, J. et al.: Amplification of c-erbB-2 on-

cogene in human adenocarcinoma in vivo. Lancet **1**: 765-767, 1986.

- 10) Mori, S. et al.: Light and microscopical demonstration of c-erbB-2 gene product-like immunoreactivity in human malignant tumors. Virchows Arch. [B] **54**: 8-15, 1987.
- 11) 大森弘之：表在性膀胱癌, 日泌尿会誌, **75**: 1725-1728, 1984.
- 12) Miyachi, K. et al.: Autoantibody to a nuclear antigen in proliferating cells. J. Immunol. **121**: 2228-2234, 1978.
- 13) Takasaki, Y. et al.: A nuclear antigen associated with cell proliferation and blast transformation. Its distribution in synchronized cell. J. Exp. Med. **154**: 1899-1909, 1981.
- 14) Bravo, R. et al.: Identification of a nuclear and of a cytoplasmic polypeptide whose relative proportions are sensitive to changes in the rate of cell proliferation. Exp. Cell Res. **136**: 311-319, 1981.
- 15) Mathews, M. B. et al.: Identity of the proliferating cell nuclear antigen and cyclin. Nature **309**: 374-376, 1984.
- 16) Bravo, R. et al.: Cyclin/PCNA is the auxiliary protein of DNA polymerase- δ . Nature **326**: 515-517, 1987.
- 17) Prelich, G. et al.: Functional identity of proliferat-

ing cell nuclear antigen and a DNA polymerase- δ auxiliary protein. Nature **326**: 517-520, 1987.

- 18) Ogata, K. et al.: Eonoclonal antibodies to a nuclear protein (PCNA/cyclin) associated with DNA replication. Exp. Cell Res. **168**: 475-486, 1987.
- 19) 鈴木幸一・他：抗 PCNA モノクローナル抗体による増殖期細胞の同定, ホルマリン固定パラフィン包埋切片を用いた免疫組織化学的検討, 医学のあゆみ **157**: 655-656, 1991.
- 20) Giordano, M. et al.: Proliferating cell nuclear antigen (PCNA)/cyclin expression during the cell cycle in normal and leukemic cells. Leuk. Res. **15**: 965-974, 1991.
- 21) Semba, K. et al.: 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. USA. **82**: 6497-6501, 1985.
- 22) Coombs, L. M. et al.: Amplification and overexpression of c-erbB-2 in transitional cell carcinoma of the urinary bladder. Br. J. Cancer **63**: 601-608, 1991.
- 23) Moriyama, M. et al.: Expression of c-erbB-2 gene product in urinary bladder cancer. J. Urol. **145**: 423-427, 1991.

(1993 年 12 月 15 日受理 特別掲載)