

原 著

子宮体癌におけるエストロゲンレセプターの発現と抗 Ki-67
抗体を用いた細胞増殖能についての免疫組織化学的検討

東京女子医科大学 産婦人科学教室 (主任：武田佳彦教授)

菊 地 愛 子

(受付 平成9年8月14日)

**Immunohistochemical Study of the Estrogen Receptor and Ki-67
Expression in Endometrial Carcinoma****Aiko KIKUCHI**Department of Obstetrics and Gynecology (Director: Prof. Yoshihiko TAKEDA)
Tokyo Women's Medical College

We examined the tumors of fifty-eight patients with endometrial carcinoma by immunohistochemical analysis of estrogen receptor (ER) expression and Ki-67 labeling index (L.I.). In twenty-four patients we also performed a biochemical analysis of ER. The results were as follows.

1) There was a good correlation between the immunohistochemical categories and biochemical levels of ER. 2) The presence of ER was significantly ($p < 0.05$) associated with surgical stage, but was not related to histologic differentiation. 3) In the ER-negative group, Ki-67 L.I. was significantly ($p < 0.05$) associated with surgical stage, histologic differentiation, lymph-node metastasis, ductal permeation and recurrence, Ki-67 may become a prognostic marker in this group of patients. 4) In the premenopausal patients who had ER, the level of Ki-67 was significantly higher ($p < 0.01$) than the ER-negative premenopausal patients. Our results suggest that the proliferative effect of the endogenous estrogen on endometrial carcinoma affects the Ki-67 levels in the ER-positive group, where as some extra-estrogenic factor such as an oncogene may affect the elevated Ki-67 levels in the ER-negative group.

Immunohistochemical analysis of ER status with Ki-67 L.I. is not only simple and practical, but also predicts the degree of malignancy.

緒 言

エストロゲンやプロゲステロンの標的臓器である子宮内膜を発生母地とする子宮体癌(以下体癌)は近年増加の傾向にあり, 子宮癌全体の20~25%を占めるに至っている¹⁾.

従来より体癌はホルモン依存性の癌とされ, 長期にわたるエストロゲンの過剰刺激により内膜が増殖し, 更に何らかの癌化に関わる因子が加わり癌へと進展していくものと考えられているが, ホルモン非依存性の癌もあり, これらの予後が一般

に悪いことから最近注目されてきている²⁾. 更に子宮内膜は増殖因子により増殖, 分化の抑制を受けていることから体癌における増殖能も, 一つの予後を推測する目安になるものと考えられる. 従来ホルモンレセプター単独で, あるいは増殖マーカー単独で体癌における予後を解析した報告はみられるが³⁾⁴⁾, 両者を組み合わせて検索した報告は少ない. そこで今回, エストロゲンレセプター(ER) および Ki-67 に対するモノクローナル抗体を用いて, ホルモンレセプターと細胞増殖能の関

連について免疫組織化学的に検索を行った。

対象および方法

1. 対象

1990年から96年の7年間に当科で子宮体癌と診断され、準広汎子宮全摘出術あるいは拡大子宮全摘出術および骨盤リンパ節郭清術がなされ、組織型が確認された58例を対象とした。年齢は56.9±12.3歳(30～80歳)で、16例が閉経前、42例は閉経後であった。組織型はいずれも類内膜癌で、類内膜腺癌(endometrioid adenocarcinoma)56例、扁平上皮への分化を伴う類内膜腺癌(endometrioid adenocarcinoma with squamous differentiation)2例である。進行期分類は1995年の日本産科婦人科学会の手術進行期分類に従い⁵⁾、I期38例、II期7例、III期13例であった。なお、これらの症例においてはいずれも長期にわたるホルモン治療の既往は認めなかった。

2. 方法

1) 免疫組織化学染色

上記58例の子宮体癌患者より採取された検体を10%ホルマリンで約24時間固定した後、パラフィン包埋標本より切片を作製し免疫染色を行った。染色はヒストファイン免疫組織化学染色キット(ニチレイ)を用い、streptavidin-biotin (SAB)法により行った。一次抗体は抗エストロゲンレセプター・マウスモノクローナル抗体(以下ER抗体: Immunotech)およびKi-67抗原・マウスモノクローナル抗体(以下Ki-67抗体: Novocastra)を用いた。

染色方法は上記染色キットの方法に準じ(表1)、いずれも抗原賦活化のため、マイクロウェーブ処理⁶⁾を行った後、ER抗体は50倍希釈で一晩、Ki-67抗体は100倍希釈で1時間処理した。発色基質は3,3'-ジアミノベンチジン(DAB)を用い、10～15分間インキュベートし顕微鏡下に染色を確認し、マイヤー・ヘマトキシリンによる核染、脱水、キシレンによる透徹後、封入し永久標本とした。

ERの染色性の判定は、方法2)による組織中のERレセプターが最高値を示した切片を陽性コントロール、第一抗体の代わりにPBSを用いたも

表1 免疫染色の方法

1	脱パラフィン, 水洗
2	3%過酸化水素加メタノール処理/PBS洗浄
3	10%ヤギ正常血清によるブロッキング
4	マイクロウェーブ処理
5	第一抗体 抗ER抗体: 50倍希釈で室温一夜 抗Ki-67抗体: 100倍希釈で室温1時間
6	PBS洗浄
7	第二抗体(ビオチン標識抗マウスIgG抗体)
8	PBS洗浄
9	酵素試薬(ペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジン)
10	PBS洗浄
11	基質溶液の添加, 反応(3,3'-ジアミノベンチジン)
12	対比染色
13	水洗, 脱水, 封入

のを陰性コントロールとし、プレパラート上の腫瘍組織全体を100とし、染色されている部分の割合が10%以下を弱陽性10～50%を中等度陽性、50%以上を強陽性として判定した。

Ki-67の染色性の判定は、高標識率を示すことが既知の子宮肉腫組織切片を陽性コントロール、第一抗体の代わりにPBSを用いたものを陰性コントロールとし、標本中の陽性細胞密度が最も高い部分を選び、対物10～40倍で写真撮影し、400細胞をカウントして腫瘍細胞数と陽性細胞数を数え、陽性細胞数/腫瘍細胞数をもって標識率(labeling index: L.I.)とした。

2) 組織中のエストロゲンレセプター測定法

子宮体癌58例のうち24例については組織を採取し、サイトゾル(細胞質可溶性分画)中のER測定を行った。測定はE2R「オーツカ」キット(大塚製薬)を用いた。摘出子宮から約0.5gの腫瘍組織片を採取し、ホモゲナイザーで氷冷下に10秒間ずつ3回ホモゲナイズし、続いて10,500Gで4℃、1時間超遠心分離し上清を採取しER測定および蛋白定量用に供した。測定原理は5段階濃度のヨウ化エストラジオール(¹²⁵I)液と一定量のサイトゾル(上清)を、それぞれ過剰のジエチルスチルベストロール存在下または非存在下で反応させ、チャコールデキストランにより遊離の¹²⁵Iを吸着除去した後、エストロゲンレセプターに結合した¹²⁵Iのカウントを計測した。ジエチルスチルベ

ストロール存在下における結合を差し引いたものを特異的結合とし、各濃度における特異的結合量を scatchard 解析し最大結合部位数および解離定数を算出した。

3) 統計処理

統計解析には unpaired-t 検定および χ^2 検定 (または Fisher's exact probability test) を行い、 $p < 0.05$ を統計上有意と判定した。

結 果

1. ER の免疫染色態度と ER 測定キットの比較検討

今回行った免疫染色による ER 蛋白発現と、組織中の ER 測定キットによる定量結果を比較検討した (図 1)。免疫染色結果と定量結果はよく合致しており、陰性 (N) 群における ER 値は 12.2 ± 3.0 (fmol/mg protein)、弱陽性 (W) 群では 38.2 ± 14.8 、中等/強度 (M/S) 群では 215.7 ± 61.2 と漸増傾向を認め、N と M/S 間ならびに W と M/S 間に有意差 ($p < 0.05$) を認めた。図 1 の ER 染色強度と ER 値の関係より ER 値を 30 fmol/mg protein で分類すると、30 以下の群では ER 染色陰性の 8 例がすべて含まれ、30 以上の群では中等度以上陽性の 8 例すべてがカットオフ値以上であった (弱陽性は 3 例)。

以上より本免疫染色における感度はおよそ 30 fmol/mg protein 前後に相当するものと思われた。

2. 免疫染色による ER および Ki-67 の局在

ER は主として高分化型腺癌を中心に染色され (図 2A)、核を中心に比較的びまん性に染色されていた (図 2B)。間質部も一部弱陽性に染色されていたが、腫瘍部の染色性が相対的に強かった。Ki-67 は核に局在が認められた (図 2C, D)。

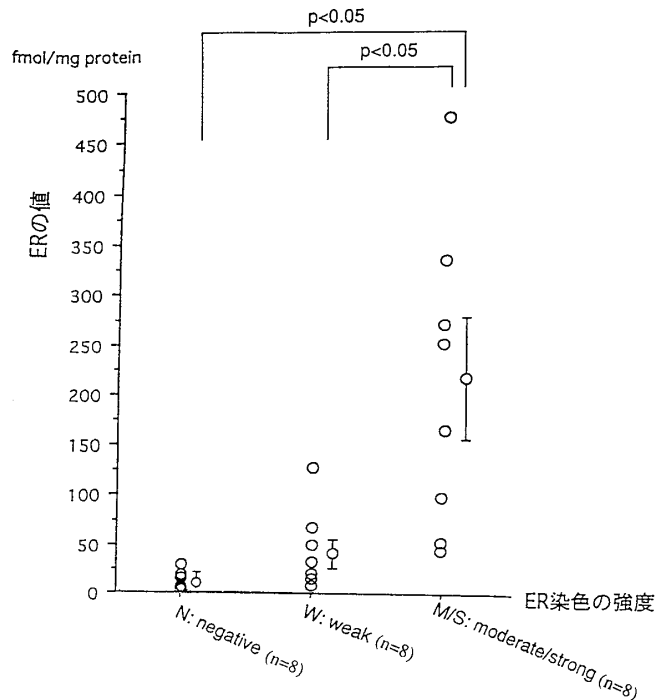


図 1 ER 染色強度と ER receptor assay の値の比較

3. ER の染色態度による種々の因子の検討 (表 2)

ER 陽性率は 50% (29 例) であった。ER が陰性であった 29 例と陽性であった 29 例の 2 群について年齢、月経の有無、進行期、分化度、筋層浸潤、リンパ節転移、脈管侵襲、更に再発の有無について比較検討した。年齢はいずれも平均 57 歳前後と両者ともほぼ等しく、月経の有無についても有意差はなかったが、進行期では、子宮内に限局する I, II 期に陽性例が有意 ($p < 0.05$) に多く認められたのに対して、子宮外へ進展する III 期は陰性例が多くを占めた。その他の予後因子についてはいずれも有意差を認めなかった。

- 図 2 A ER 免疫染色 (対物×10) 高分化型腺癌：癌細胞を中心にびまん性に染色されている。
- B ER 免疫染色 (対物×40) A の拡大図：核に局在が認められる。
- C Ki-67 免疫染色 (対物×10) 中分化型腺癌：癌細胞を中心に染色されている。
- D Ki-67 免疫染色 (対物×40) C の拡大図：核に局在が認められる。
- E, F 同一連続切片 (低分化型腺癌) における ER (E) および Ki-67 (F) の局在：ER は陰性だが Ki-67 は強陽性を示す。
- G, H 同一連続切片 (高分化型腺癌) における ER (G) および Ki-67 (H) の局在：ER, Ki-67 ともに陽性を示す。

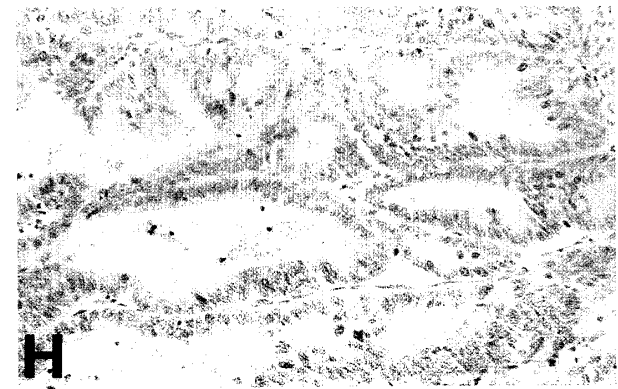
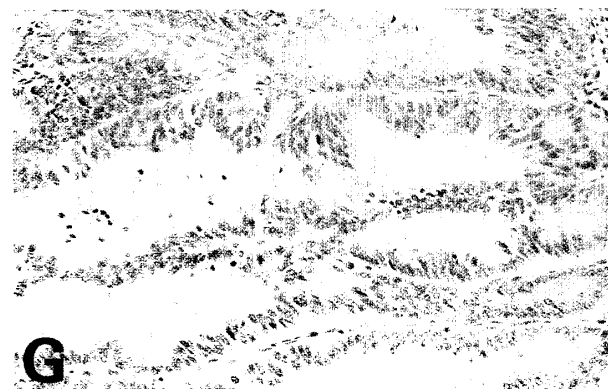
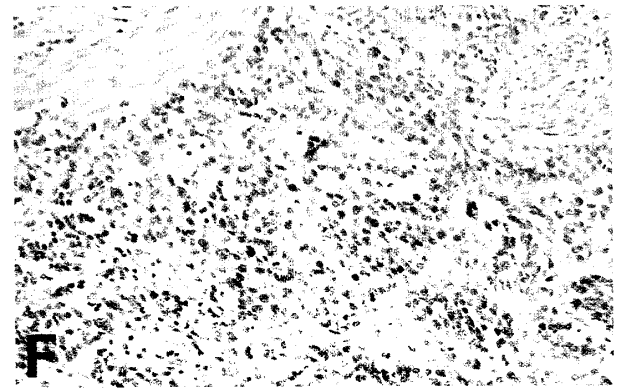
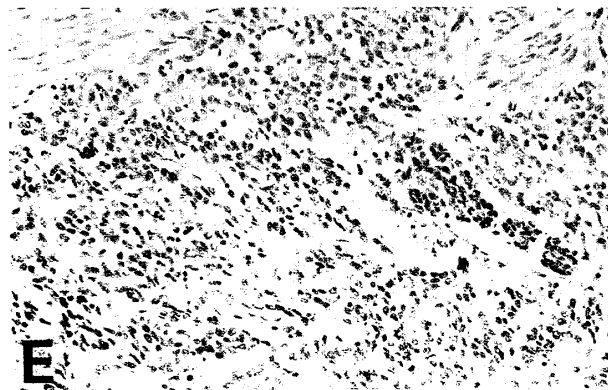
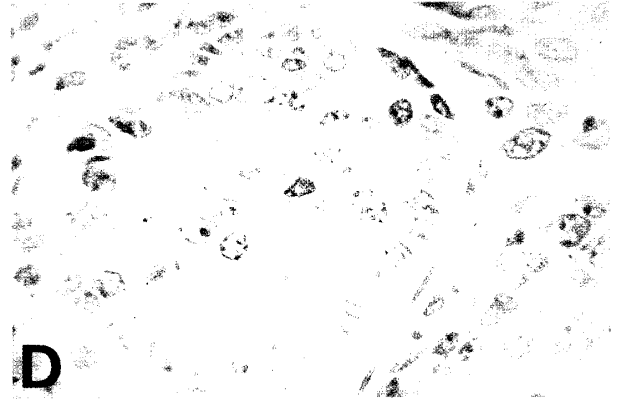
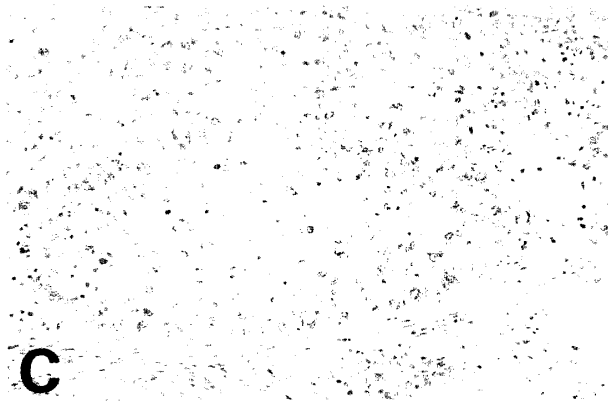
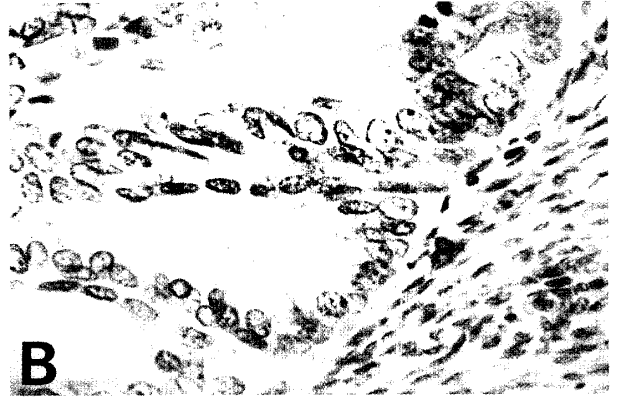
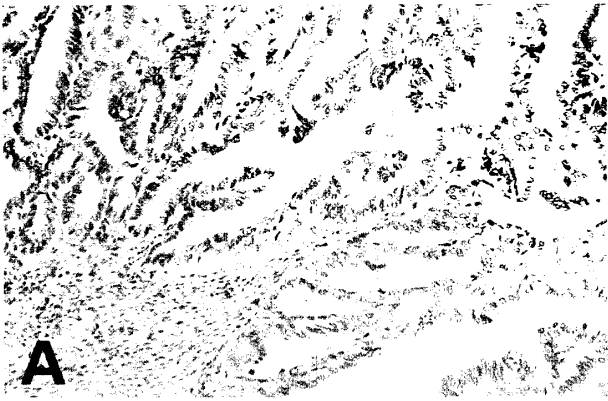


表2 ERの染色態度による種々の因子の検討

因子	症例数	ER染色		有意差
		陰性	陽性	
症例数		29	29	
年齢(歳)		56.8±2.4	57.0±2.1	NS
月経				
閉経前	16	8	8	NS
閉経後	42	21	21	
進行期				
I・II期	45	9	26	p<0.05
III期	13	10	3	
分化度				
G1	37	16	21	
G2	14	8	6	NS
G3	7	5	2	
筋層浸潤				
<1/2	33	14	19	NS
1/2≤	25	15	10	
リンパ節転移				
なし	52	25	27	NS
あり	6	4	2	
脈管侵襲				
なし	45	23	22	NS
あり	13	6	7	
再発				
なし	53	25	28	NS
あり	5	4	1	

4. ER陰性群・陽性群における各因子間のKi-67標識率の検討(表3)

ER染色結果をER陰性群(n=29)と陽性群(n=29)に分け、その各群ごとに諸因子間のKi-67標識率を比較検討した。ER陽性群においては、月経の有無、進行期、分化度、筋層浸潤、リンパ節転移、脈管侵襲、再発のいずれの因子も有意差を認めなかったのに対して、ER陰性群においては、進行期ではI・II期間に、分化度ではG1とG3の間に有意差(p<0.05)を認め、それぞれII期、G3に高値を示した。またリンパ節転移、脈管侵襲についても「あり」の群が「なし」の群に比して有意(p<0.05)に高値を示し、再発ありの群が有意(p<0.01)に高値を示した。

5. ER陰性群・陽性群間のKi-67標識率の比較検討(図3)

次に各因子についてER陰性群と陽性群間のKi-67標識率を比較検討した。諸因子中で有意差を

認めたのは閉経前(p<0.01)、リンパ節転移なし(p<0.05)、再発なし(p<0.05)の3項目で、いずれもER陽性群にKi-67標識率が高く、特に閉経前ではER陰性群で1.4±1.4%であったのに対してER陽性群では19.0±5.0%と有意に高かった。その他の因子は差を認めなかった。

考察

エストロゲンやプロゲステロンの標的臓器である子宮内膜を発生母地とする体癌は近年増加傾向にあるが、ホルモン依存性のものとホルモン非依存性の二つに大別される。その発生原因については未だ明らかではないが、前者についてはエストロゲン優位の内分泌環境(プロゲステロンの分泌の低下と、相対的な内膜へのエストロゲン刺激の持続)が指摘されており、肥満・糖尿病・高血圧と関連し、内膜増殖症と合併することも多いことから、体癌の前癌病変とされる内膜増殖症を経て癌化していくとする発癌モデルが考えられており、比較的予後良好であるとされている²⁾。

一方ホルモン非依存性の体癌についての発癌機構は不明な点が多く、前者に比べると一般に発見時年齢が高齢者にシフトしており、予後不良例が多い傾向にある。しかしホルモン依存性体癌患者の血中エストロゲン濃度は必ずしも高いとはいえず⁷⁾、むしろ体癌組織中のエストロゲンレセプターの有無が指標となるが、その測定法は生化学的手法によるreceptor assayか、免疫組織化学的手法によるものが主たる方法である。両者の関連をみると染色態度が陰性、弱陽性、中等度～強度陽性となるに従い、ER値も増加しており(図1)、染色態度はおよそER値を反映しているとみなしてよいと思われた。近年、抗ERモノクローナル抗体を用いたenzyme immunoassay法が開発され⁸⁾、より再現性にすぐれ、核内のERも同様に捉えることができるため、従来の方法からEIA法に移りつつある。以上の条件設定のもと、子宮体癌58例についてER染色を行ってみると(表2)、陰性と陽性が同数(各29例)となり、年齢層も56.8対57.0歳とほとんど同じであった。一般にホルモン依存性体癌は比較的若年者に、非依存性体癌は比較的高齢者に多いとされているが、体癌の好発

表3 ER 陰性群・陽性群における各因子間の Ki-67標準率の比較

	ER 染色陰性群 (n=29)			ER 染色陽性群 (n=29)		
	症例数	Ki-67標識率(%)	有意差	症例数	Ki-67標識率(%)	有意差
月 経						
閉経前	8	1.4 ± 1.3	NS	8	19.0 ± 5.0	NS
閉経後	21	10.9 ± 3.1		21	10.5 ± 3.5	
進行期						
I 期	16	4.4 ± 2.1	p<0.05	22	13.2 ± 3.3	NS
II 期	3	15.8 ± 3.3		4	19.8 ± 9.1	
III 期	10	12.1 ± 5.7		3	1.3 ± 1.3	
分化度						
G 1	16	5.3 ± 2.2	p<0.05	21	11.2 ± 2.6	NS
G 2	8	6.2 ± 3.4		6	22.2 ± 10.1	
G 3	5	20.8 ± 9.8		2	2.0 ± 2.0	
筋層浸潤						
<1/2	14	5.4 ± 2.6	NS	19	14.8 ± 3.8	NS
1/2 ≤	15	10.9 ± 3.9		10	9.1 ± 4.2	
リンパ節転移						
なし	25	6.0 ± 1.9	p<0.05	27	13.1 ± 3.0	NS
あり	4	22.3 ± 11.5		2	2.0 ± 2.0	
脈管侵襲						
なし	23	5.1 ± 1.8	p<0.05	22	12.2 ± 3.4	NS
あり	6	20.4 ± 8.1		7	14.9 ± 6.1	
再 発						
なし	25	5.6 ± 1.8	p<0.01	28	13.3 ± 2.9	-
あり	4	24.6 ± 10.7		1	0	

NS: not significant.

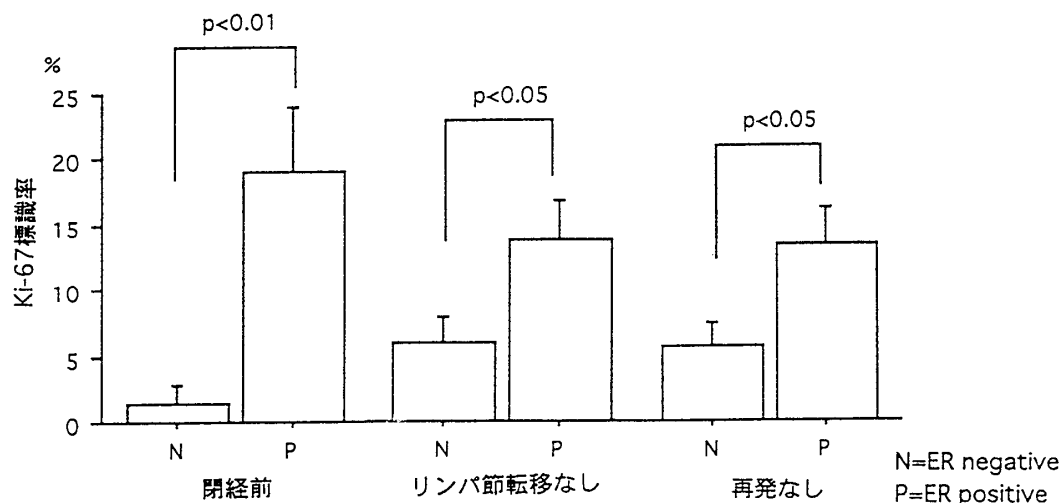


図3 ER 陰性群, 陽性群間の Ki-67標識率の比較 (有意差を認めた因子のみ)

年齢が閉経前後の50歳代にピークを有していることを考えると, 実際に依存性・非依存性を年齢で区別することは難しい。

ホルモンレセプターと体癌の予後については従

来より多くの報告があるが, ERの発現はプロゲステロンレセプター (PR) の発現とよく相関しており⁹⁾, いずれも独立した予後因子として陽性例は陰性例より予後良好であるとされてい

る^{10)~12)}。データには示さなかったが、ER と同時に PR を測定した22例における両者の相関係数は0.80と強い相関を認めた。エストロゲン依存性の体癌はPR も多く発現しているといえるが、今回は増殖能との関連をみるため ER についてのみ検索を行った。その結果、いくつかの予後因子のうち進行期については有意差 ($p < 0.05$) を認められたが、分化度や再発の有無については有意差を認めなかった。ER/PR レセプターに関する報告をみると、アッセイの方法や感度の違いにより必ずしも従来いわれている予後因子との関連が認められないものも少なくない^{13)~15)}。体癌はおよそ70%がI期で発見されるため症例が偏りがちであるが、当科でも再発例は58例中5例(8.6%)のみであり、症例も比較的新しいため今回は予後因子の検索にとどめ、生死を含む予後の検索は行わなかった。

子宮内膜の増殖と分化は性ステロイドにより制御されており、癌化に伴ってER や PR に対する反応性が低下し、性ステロイドの制御から逸脱していくと考えられるが¹⁶⁾¹⁷⁾、同時に性ステロイド以外の生理活性物質が増殖をつかさどる可能性が考えられる。

近年、ホルモン依存性腫瘍である乳癌では、ホルモンレセプターに刺激を受けると、増殖因子である transforming growth factor- α (TGF- α) を自ら分泌し、自らに存在する epidermal growth factor receptor (EGF-R) を介して、autocrine, paracrine 機構により増殖を調節すると考えられてきており¹⁸⁾¹⁹⁾、子宮内膜でも同様に TGF- α とそのレセプター (EGF-R) はエストロゲン作用のメディエーターとなることが示されている²⁰⁾。更にEGF-R とホモロジーの高い *c-erbB-2* 癌遺伝子の過剰発現は、乳癌において予後不良の因子であり²¹⁾、増殖に関して重要な役割を果たしていると考えられており、子宮体癌培養細胞株を用いた報告も *c-erbB-2* は組織分化度の低下に伴い過剰発現していた²⁰⁾。

そこで58例の体癌について細胞増殖能のマーカである Ki-67を用いて ER の有無と増殖能との関連について検索を行った。

Ki-67は細胞周期のG1, S, G2, M期の増殖期

細胞を表現するマーカーで、休止期 (G0期) 細胞とは反応しないことが知られている²²⁾²³⁾。細胞増殖の程度と細胞動態の増減を反映することから、本抗体を用いた免疫染色の結果は腫瘍の悪性度の一指標となり、予後を知る上でも有用なマーカーとされ、実際に乳癌、卵巣癌、肺癌などで悪性度や予後を推測する上で有用であるとする報告がみられる^{24)~26)}。

今回の検討では ER 陰性群においては(表3)、より進行癌であるほど、また低分化癌であるほど Ki-67標識率は有意に高く ($p < 0.05$) (図2E, F) リンパ節転移や脈管侵襲などの予後因子も有意差 ($p < 0.05$) が認められ、再発ありの群に有意 ($p < 0.05$) に標識率が高かった。ER 陰性群では、Ki-67が分化度など、いわゆる癌の悪性度と相関しており、エストロゲンを介さず、*ras* や *c-erbB-2* などの癌遺伝子の増幅を含む活性化などによる増殖能の亢進が優位に働いて、浸潤転移能ともあいまって Ki-67標識率が高く予後不良となっていることが推測され、Ki-67が予後推定のマーカーになりうることが示唆された。

一方、ER 陽性群においては検索した因子に有意差はなく、進行期や分化度との関連は認められなかった(表3)。ER 陽性群にもIII期例やG3症例がみられるが、そのような症例の Ki-67標識率は、有意差はないもののI期やG1症例に比べると低値であった。この理由として、これらの症例では、特に分化度の低い部分における変性が著しかったため Ki-67の標識率が低く、ER は比較的分化のよい部分に染色されていたためと思われた。

更に ER 陰性群、陽性群間の Ki-67の標識率を比較すると(図3)、閉経前の群、すなわちエストロゲンの影響をより強く受ける症例において Ki-67標識率は ER 陽性例で有意に高く、癌に進展するにつれてステロイドホルモンの制御から逸脱するとはいえ、比較的若年の体癌では細胞増殖という点に関してはエストロゲンの影響はまだ大きいと考えられた(図2G, H)。Bomanらは flow cytometry を用いて ER 陽性体癌は陰性例に比べ有意に S-phase fraction が少ないとし、内因性のエストロゲンの影響は限られているとし、我々の

データとはやや異なる結果を示している¹³⁾。しかしER陽性例でのKi-67標識率で想定される増殖能の相対的な亢進は、浸潤転移とは結びつかず、結果として再発が1/29 (3.4%)例と極めて予後良好となっており、換言すればER陽性群においてKi-67は予後を推定するマーカーにはならないことが示唆された。

以上のことから従来、ER陽性の体癌は予後が良好とされ、ER陰性の体癌は予後が不良とされているが、Ki-67標識率を組み合わせることより、ER陰性例においてはより綿密な悪性度の推定が可能となりうることが示唆された。

結 論

子宮体癌58例について、抗エストロゲン抗体を用いて免疫組織化学的にERの有無を検索するとともに、ligand binding assay (LBA)によりERを定量し、両者を比較検討した。更に抗Ki-67抗体を用いて細胞増殖能との関連についても検討を行った。その結果、次のような結論を得た。

1) LBAにより定量したERと免疫染色の結果はよく合致しており、本免疫染色の結果はER量を反映しているとみなしてよいと思われた。

2) ERの有無は進行期(I・II期対III期)において有意差を認め、I・II期症例に陽性例が多く認められたが、分化度や再発の有無については有意差を認めなかった。

3) ER陰性群については進行期、分化度、リンパ節転移、脈管侵襲、再発の有無においてKi-67標識率に有意差を認めたが陽性群において差はなく、Ki-67はER陰性例においては予後を推測するマーカーになりうる可能性が示唆された。

4) 比較的若年者(有経者)においてはER陽性群でKi-67標識率が有意に高く、ER陽性群では内因性エストロゲンなどによる細胞増殖を反映しているものと思われたが、再発例はなかった。

5) 従来より、ERの有無やKi-67の標識率による予後の推定が行われてきたが、前者は判定方法が時に問題となり、後者も細胞増殖能のみでは必ずしも明確な差はでない。しかし両者を掛け合わせることによって、より明瞭な差異が認められ、後方視的検索可能な免疫組織化学的検索により、

体癌の悪性度を類推することが可能と思われた。

稿を終えるにあたり、御指導と御校閲を賜りました武田佳彦教授、本研究に御協力を頂きました笠島武教授に深甚なる謝意を表し、直接御指導いただきました矢島正純講師に感謝いたします。

文 献

- 1) 工藤隆一：婦人科腫瘍委員会報告。日産婦会誌 49：41-75, 1997
- 2) 井上正樹, 京 哲, 藤田征臣ほか：子宮体癌 update 2. 発癌 3) 遺伝子変異との関連。産と婦 62：810-818, 1995
- 3) Ehrlich GE, Young PCM, Stehman FB et al: Steroid receptors and clinical outcome in patients with adenocarcinoma of endometrium. Am J Obstet Gynecol 158：796-807, 1987
- 4) Nordstorm B, Strang P, Bergstrom R et al: A comparison of proliferation makers and their prognostic value for women with endometrial carcinoma. Cancer 78：1942-1951, 1996
- 5) 日本産科婦人科学会, 日本病理学会, 日本医学放射線学会編：子宮体癌取扱い規約。金原出版, 東京(1996)
- 6) Shi SR, Key ME, Kalra KL: Antigen retrieval in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues: An enhancement method for immunohistochemical staining based on microwave oven heating tissue sections. J Histochem Cytochem 39：741-748, 1991
- 7) Judd HL, Davidson BJ, Frumar AN et al: Serum androgens and estrogens in postmenopausal women with and without endometrial cancer. Am J Obstet Gynecol 136：859-871, 1980
- 8) Nyholm HC, Nielsen A, Lyndrup J et al: Estrogen receptor determination in endometrial carcinoma: Ligand binding assay versus enzyme immunoassay. Anticancer Res 15：649-654, 1995
- 9) Carcangiu ML, Chambers JT, Voynick IM et al: Immunohistochemical evaluation of estrogen and progesterone receptor content in 183 patients with endometrial carcinoma Part I: Clinical and histologic correlations. Am J Clin Pathol 94：247-253, 1990
- 10) Chambers JT, Carcangiu ML, Voynick IM et al: Immunohistochemical evaluation of estrogen and progesterone receptor content in 183 patients with endometrial carcinoma Part II: Correlation between biochemical and im-

- munohistochemical methods and survival. *Am J Clin Pathol* 94 : 255-260, 1990
- 11) **Pertschuk LP, Masood S, Simone J et al**: Estrogen receptor immunocytochemistry in endometrial carcinoma: A prognostic marker for survival. *Gynecol Oncol* 63 : 28-33, 1996
 - 12) **Creasman WT**: Prognostic significance of hormone receptors in endometrial cancer. *Cancer* 71 : 1467-1470, 1993
 - 13) **Boman K, Maentrausta O, Backstrom T et al**: Sex steroid hormones and receptors in relation to S-phase fraction and ploidy level in endometrial carcinoma. *Anticancer Res* 15 : 999-1002, 1995
 - 14) **Janne O, Kauppila A, Kontula K et al**: Female sex steroid receptors in normal, hyperplastic and carcinomatous endometrium. *Int J Cancer* 24 : 545-554, 1979
 - 15) **Kauppila A, Kujansuu E, Vihko R**: Cytosol estrogen and progestin receptors in endometrial carcinoma of patients treated with surgery, radiotherapy, and progestin. *Cancer* 50 : 2457-2162, 1982
 - 16) **Li SF, Shinozuka T, Nakayama K et al**: Stepwise abnormality of sex steroid hormone receptors, tumor suppressor gene products (p-53 and Rb), and cyclin E in uterine endometrioid carcinoma. *Cancer* 77 : 321-329, 1996
 - 17) **Snijders MP, Goeij AF, Koudstaal J et al**: Oestrogen and progesterone receptor immunocytochemistry in human hyperplastic and neoplastic endometrium. *J Pathol* 166 : 171-177, 1992
 - 18) **Rickson RB, Huff KK, Spencer EM et al**: Induction of epidermal growth factor-related polypeptides by estradiol in MCF-7 human breast cancer cells. *Endocrinology* 188 : 138-142, 1986
 - 19) **Todaro GJ, Fryling C, De Larco JE**: Transforming growth factors produced by certain human tumor cells: Polypeptides that interact with epidermal growth factor receptors. *Proc Natl Acad Sci USA* 77 : 5258-5262, 1980
 - 20) 秦 宏樹, 浜野美恵子, 辻井 篤ほか: 子宮体癌の分子・細胞生物学 (2) 増殖調節と癌遺伝子. *日婦病理・コルポスコピー会誌* 11 : 167-173, 1993
 - 21) **Paik S, Hazan R, Fisher ER et al**: Pathologic findings from the National Surgical Adjuvant breast and bowel project: Prognostic significance of *erbB-2* overexpression in primary breast cancer. *J Clin Oncol* 8 : 103-112, 1990
 - 22) **Cattoretti G, Becker MHG, Key G et al**: Monoclonal antibodies against recombinant parts of the Ki-67 antigen (MIB 1 and MIB 3) detect proliferating cells in microwave-processed formalin-fixed paraffin sections. *J Pathol* 168 : 357-363, 1992
 - 23) 引野利明, 小山徹也: Ki-67 抗体における免疫染色の基礎的検討. *医検* 42 : 1681-1685, 1993
 - 24) **Henriksen R, Strang P, Backstrom T et al**: Ki-67 immunostaining and DNA flow cytometry as prognostic factors in epithelial ovarian cancers. *Anticancer Res* 14 : 603-608, 1994
 - 25) **Weidner N, Moore DH II, Vartanian R**: Correlation of Ki-67 antigen expression with mitotic figure index and tumor grade in breast carcinomas using the novel "parafinn"-reactive MIB 1 antibody. *Hum Pathol* 25 : 337-342, 1994
 - 26) **Kawai T, Suzuki M, Kono S et al**: Proliferating cell nuclear antigen and Ki-67 in lung carcinoma. *Cancer* 74 : 2468-2475, 1994