

乳癌における癌遺伝子産物の免疫組織学的検討 ——c-erbB-2 product を中心に——

田 内 克 典*, 長 村 義 之**, 藤 巻 雅 夫*

富山医科薬科大学外科学第2教室*, 東海大学病理学教室**

はじめに

近年、乳癌において癌遺伝子と予後因子との関連が注目されているが、未だ統一した見解はえられていない¹⁻⁴⁾。その手法も核酸レベルで癌遺伝子の増

幅, mutation を検出する方法と癌遺伝子産物を検出する方法に大別されている。我々は、新鮮凍結切片を用いて c-erbB-2 product, epidermal growth factor receptor(EGFR), c-myc protein, estrogen receptor(ER) の免疫組織学的検討を行い既に報告し

Table 1. Details of the cases and immunohistochemistry of breast cancers

Case	Age	Histology	Grade ¹	Size(cm)	LN meta	c-erbB-2	EGFR	c-myc	ER
1	43	S-T ²	III	3.5x3.5	0/5	++	-	+++	+++
2	53	Sci ³	II	3.5x2.5	2/20	+++	-	+++	-
3	56	S-T	II	5.0x4.5	0/22	-	-	+++	-
4	70	Sci	I	1.5x1.5	0/16	+/-	-	++++	+++
5	33	SQ ⁴	III	1.6x1.2	1/21	+++	+++	+/-	-
6	67	Sci	I	1.5x1.2	0/18	+	-	+++	+++
7	72	Muc ⁵	I	2.0x2.0	0/22	+	+	-	+++
8	48	S-T	II	5.5x5.0	44/48	+++	+++	+++	-
9	43	Sci	I	4.5x3.5	10/17	++++	-	+++	++
10	49	S-T	I	2.0x2.0	1/14	+++	-	+++	+++
11	51	S-T	II	5.0x4.0	0/40	+/-	+++	+	++
12	72	Sci	I	6.0x5.0	0/25	+	-	+++	++
13	43	Sci	III	4.2x3.2	2/17	-	+++	++	-
14	47	S-T	I	1.5x1.0	0/4	++	-	+++	+++
15	43	Sci	I	1.5x1.5	0/10	+	+	+	+++
16	47	Sci	II	1.5x1.0	1/12	+	-	+++	-
17	44	S-T	II	3.0x3.2	2/13	++	-	+++	+++
18	50	P-T ⁶	I	3.9x3.5	5/17	+	+++	+++	+
19	61	S-T	III	8.0x7.0	11/25	++++	+++	+++	-
20	89	Sci	II	3.0x2.7	1/14	+	-	+++	++
21	44	Sci	I	2.0x2.0	0/11	+	-	++++	+
22	44	Sci	II	4.0x2.0	1/10	+/-	-	+++	+
23	49	Sci	II	1.6x1.8	0/11	+	+	+++	+
24	33	P-T	III	1.7x0.5	1/21	+++	++	+++	-
25	68	Sci	III	2.0x2.5	4/12	+/-	-	+++	+++

¹ : Histological grade was determined using a modification of Bloom and Richardson's method (Elston et al. 1982) ² : Solid-Tubular Carcinoma ³ : Scirrhus Carcinoma ⁴ : Squamous Cell Carcinoma ⁵ : Mucinous Carcinoma ⁶ : Papillotubular Carcinoma - : negative ; +/- : 1%~5 % positive ; + : 5%~25% positive ; ++ : 25%~50% positive ; +++ : 50%~75% positive ; ++++ : more than 75% positive

Table 2. Details of the antibodies used in fresh frozen tissues

Antibody	Source	Dilution	Fixation	Method
c-myc (OM-11-906)	Cambridge Research Biochemicals	1 : 100	10% formalin	indirect ¹
EGFR (RPN513)	Amersham	1 : 50	100% acetone	indirect
c-erbB-2 (pAb1)	Triton Biosciences Inc	1 : 10	10% formalin	indirect
ER	Abbott Laboratories	kit	10% phosphate buffered formalin	PAP ²

¹ : indirect immunoperoxidase method

² : peroxidase-antiperoxidase method

ているが⁵⁾, 加えて c-erbB-2 product の長期予後因子としての意義につき検討した。

month について検討した。

結 果

材料および方法

- 1 新鮮凍結切片を用いた検討：対象は手術的に切除された25例で、症例の要約を Table 1 に示す。使用した抗体、固定法及び染色法を Table 2 に示す。組織学的悪性度はElston ら⁶⁾による方法を使用した。
- 2 新鮮凍結切片とパラフィン切片の比較：対象は手術的に切除された57例で、方法は Table 3 に示す。
- 3 長期予後因子としての検討：初回手術後10年経過した40例ではパラフィン切片を用いた c-erbB-2 product の染色性と手術時リンパ節転移の有無及び予後について、腫瘍摘出術並びに剖検の行われた16例については同様にして組織型、病期、術式、再発形式、disease free month, overall survival

新鮮凍結切片を用いた oncogene products 及び ER の染色結果を Table 1 に示す。それぞれの陽性率は c-erbB-2 80%, EGFR 40%, c-myc 96%, ER 28%で EGFR と ER の染色性について逆相関が認められた ($p < 0.05$)。手術時リンパ節転移陽性の14例と転移陰性の11例の比較では、c-erbB-2 の陽性率において有意の相関を認め ($p < 0.05$)、c-erbB-2 強陽性 (+++ あるいは +++) 例の7例 (28.0%) は全例リンパ節転移陽性であった。その他の因子の検討では、組織学的悪性度と ER の染色性で相関を認めた ($p < 0.05$) 他、有意な関連は認められなかった。

c-erbB-2 product の新鮮凍結切片とパラフィン切片の陽性例の比較では、新鮮凍結切片では42例 (73.7%) うち強陽性18例 (31.6%), パラフィン切片で

Table 3. Method of immunohistochemistry used in fresh frozen and paraffin-embedded tissues

Specimens	Fixation	Incubation	Dilution	Method
Fresh frozen	10% formalin	room temperature 30 minutes	1 : 10	indirect immunoperoxidase
Paraffin-embedded	10% formalin	4°C overnight	1 : 100	indirect immunoperoxidase

1st antibody : c-erbB-2(pAb1), (Triton Biosciences Inc)

2nd antibody : donkey anti-rabbit Ig, 1 : 100 (Amersham)

は10例(17.5%)であり、パラフィン切片陽性例は全例新鮮凍結切片強陽性例であった(Table 4)。新鮮凍結切片で強陽性を示した18例中13例(72.2%)、パラフィン切片陽性例10例中 8例(80.0%)に手術時リンパ節転移を認めたが、手術時リンパ節転移陽性の20例からみると新鮮凍結切片での強陽性例は13例(65.0%)であったが、パラフィン切片陽性例は 8例(40.0%)と低率であった。

術後10年経過40例のパラフィン切片を用いた検討では、手術時リンパ節転移陽性例22例中 8例(36.3%)が、リンパ節転移陰性18例中 1例(5.6%)が陽性であったが、生存例と死亡例の間では陽性率に有意差は認められなかった。剖検例16例の検討では、陽性例を示したのは4例で、陽性例中 3例に手術時リンパ節転移を認め、手術時リンパ節転移陰性の1例もリンパ節転移を主徴として再発していた。disease free 及び overall survival month はそれぞれ、陽性群 14.3 ± 10.1 , 24.8 ± 18.7 陰性群 16.5 ± 12.2 , 37.0 ± 29.0 で両群の間に有意な差は認められな

ったが(Table 5), stage 4 の3例を除いた overall survival month では、陽性群 24.8 ± 18.7 , 陰性群 47.0 ± 26.7 で有意差を認めた ($p < 0.05$)。

考 察

乳癌における癌遺伝子産物の免疫組織学的検出と予後因子との関連については近年多くの報告を認め、特に *neu oncogene*⁷⁾ としても知られている分子量185kDa のチロシンキナーゼ活性を有する *trans-membrane glycoprotein* である *c-erbB-2 product*⁸⁻¹⁰⁾ は独立した予後因子として注目されているが²⁻⁴⁾, 予後因子として重要と思われるリンパ節転移と *c-erbB-2 product* との関連については、未だ一致をみないのが現状である。我々の新鮮凍結切片を用いた検討では、*c-erbB-2 product* の免疫組織化学とリンパ節転移の有無とに相関を認めたが、腫瘍の大きさと相関があるとされている EGFR や、腫瘍の増殖能と関連が示唆されている *c-myc protein* では、予

Table 4. Immunohistochemistry for *c-erbB-2* in node positive cases

Case	Age	Histology	Size(cm)	LN meta	fresh	paraffin
1	53	Sci ¹	3.5x2.5	2/20	+++	+
2	33	SQ ²	1.6x1.2	1/21	+++	+
3	48	S-T ³	5.5x5.0	44/48	+++	++
4	43	Sci	4.5x4.3	10/17	++++	+
5	49	S-T	2.0x2.0	1/14	+++	-
6	43	Sci	4.2x3.2	2/17	-	-
7	47	Sci	1.5x1.0	1/12	+	-
8	44	S-T	3.0x3.2	2/13	++	-
9	50	P-T ⁴	3.9x3.5	5/17	+	-
10	61	S-T	8.0x7.0	11/25	++++	++
11	89	Sci	3.0x2.7	1/14	+	-
12	44	Sci	4.0x2.0	1/10	-	-
13	33	P-T	1.7x0.5	1/21	+++	-
14	68	Sci	2.0x2.5	4/12	-	-
15	46	P-T	3.0x2.5	4/30	+++	-
16	39	S-T	3.0x2.5	2/33	+++	+
17	32	S-T	4.0x4.0	3/25	+++	+
18	51	Med ⁵	7.0x7.0	2/15	+++	-
19	36	S-T	3.8x3.8	4/9	+++	-
20	47	P-T	10.0x10.0	36/36	+++	+

¹: Scirrhus Carcinoma ²: Squamous Cell Carcinoma

³: Solid-Tubular Carcinoma ⁴: Papillotubular Carcinoma

⁵: Medullary Carcinoma

Table 5. Details of the cases and immunohistochemistry for *c-erbB-2* in autopsy cases

Case	Age	Histology	Stage	Operation	Recurrence	Free ¹	Overall ²	<i>c-erbB-2</i>
1	45	P-T ³	T ₃ N ₁ M ₀ , III	Extended	Local	4	13	++
2	69	S-T ⁴	T ₂ N ₀ M ₀ , II	Standard	Bone	7	20	-
3	53	S-T	T ₂ N ₁ M ₀ , II	Extended	Liver	17	18	-
4	45	Med ⁵	T ₄ N ₁ M ₀ , III	Extended	Bone	7	10	-
5	41	S-T	T ₂ N ₂ M ₁ , IV	Standard			3	-
6	34	S-T	T ₂ N ₃ M ₀ , III	Extended	Bone	11	16	++
7	58	S-T	T ₄ N ₁ M ₁ , IV	Standard			14	-
8	32	Med	T ₄ N ₂ M ₁ , IV	Simple			4	-
9	52	S-T	T ₃ N ₂ M ₀ , III	Extended	Bone	30	37	-
10	32	P-T	T ₂ N ₀ M ₀ , II	Standard	Lymph node	31	57	+
11	43	S-T	T ₃ N ₁ M ₀ , III	Standard	Local	34	51	-
12	54	S-T	T ₂ N ₁ M ₀ , II	Extended	Local	27	74	-
13	32	Sci ⁶	T ₃ N ₃ M ₀ , III	Modified	Bone	28	53	-
14	49	S-T	T ₂ N ₂ M ₀ , III	Standard	Local	27	66	-
15	29	S-T	T ₂ N ₁ M ₀ , II	Modified	Ovary, Bone	11	13	+++
16	72	S-T	T ₂ N ₁ M ₀ , II	Standard	Pleura	19	94	-

¹: Disease free month, ²: Overall survival month, ³: Papillotubular Carcinoma

⁴: Solid-Tubular Carcinoma, ⁵: Medullary Carcinoma, ⁶: Scirrhous Carcinoma

後因子としての相関は認められなかった⁵⁾。乳癌の外科的治療は、従来の拡大切除術を中心とした術式から、より侵襲の少ない縮小手術が首座を占めようとしており、外科医にとって術式や術後化学療法選択のうえで、術前にリンパ節転移の状態を把握することは以前にも増して重要となってきた。我々の検討では、腫瘍径 2.0cm未満でリンパ節転移を認めた3症例全例が *c-erbB-2* 陽性を示し、2例は強陽性であり、従来術前に診断が困難であったリンパ節転移の予測についても *c-erbB-2* product の有用性が示唆されている。*c-erbB-2* product の新鮮凍結切片を用いた免疫組織化学は、gene amplification の検出に比較して短時間で比較的簡単に行え、細胞診にも応用が可能であり、従来行われてきた組織学的悪性度の検討や estrogen receptor の状態に加え、腫瘍の biological behavior を予測する上で重要な意味を持つものと期待される。

c-erbB-2 product の免疫組織化学の新鮮凍結切片とパラフィン切片との陽性率の比較では、新鮮凍結切片では42/57 (73.7%)、うち強陽性18/57 (31.6%)、パラフィン切片では10/57(17.5%)であり、新鮮凍結切片での良好な抗原性の保存が証明された。新鮮凍結切片で強陽性を示した18例中13例(72.2%)、

パラフィン切片陽性10例中8例(30.0%)に手術時リンパ節転移を認め、*c-erbB-2* product の免疫組織化学とリンパ節転移との相関が示唆されたが、手術時リンパ節転移陽性の20例よりみると、新鮮凍結切片での強陽性例は13例(65.0%)であったが、パラフィン切片陽性例は8例(40.0%)と低率であり、今回用いた抗体では *c-erbB-2* の免疫組織化学とリンパ節転移の相関は新鮮凍結切片での比較が望ましいと思われる。

c-erbB-2 の免疫組織化学と術後10年経過例の予後検討では、明かな関連は認められなかった。剖検例16例の検討では、Stage IV の3例全例が *c-erbB-2* 陰性であったことより、*c-erbB-2* product の over-expression は必ずしも乳癌の進行度を表してはいないと思われたが、Stage IV の3例を除いて *c-erbB-2* 陽性群と陰性群の間に overall survival の期間に有意差を認めたことより *c-erbB-2* の免疫組織化学は長期予後因子たる可能性を示唆した。

文 献

- 1) Slamon D. J., Clark G. M., Wong S. G. et al. : Human breast cancer : correlation of

- relapse and survival with amplification of the HER-2/*neu* oncogene. *Science* **235** : 177–182, 1987.
- 2) Berger M. S., Locher Q. W., Saurer S. et al. : 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.
- 3) Van de Vijver M. J., Peterse J. L., Mooi W. J. et al. : *Neu*-protein overexpression in breast cancer : association with comedo-type ductal carcinoma in situ and limited prognosis value in stage II breast cancer. *N. Engl. J. Med.* **319** : 1239–1245, 1988.
- 4) Wright C., Angus B., Nicholson S. et al. : Expression of *c-erbB-2* oncoprotein : a prognostic indicator in human breast cancer. *Cancer Res.* **49** : 2087–2090, 1989.
- 5) Tauchi K., Hori S., Osamura R. Y. et al. : Immunohistochemical studies on oncogene products (*c-erbB-2*, EGFR, *c-myc*) and estrogen receptor in benign and malignant breast lesions : with special reference to their prognostic significance in carcinoma. *Virchows Arch. [Pathol. Anat.]* **416** : 65–73, 1989.
- 6) Elston C. W., Gresham G. A., Rao G. S. et al. : The cancer research campaign (King's/Cambridge). Trial for early breast cancer : Clinico-pathological aspects. *Br. J. Cancer*, **45** : 655–669, 1982.
- 7) Schechter A. L., Stern D. F., Vaidyanathan L. et al. : The *neu* oncogene : an *erbB*-related gene encoding a 185000-Mr tumor antigen. *Nature* **312** : 513–516, 1984.
- 8) Semba K., Kamata N., Toyoshima 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.
- 9) Coussens L., Yang-Feng T. L., Liao Y. C. et al. : Tyrosine kinase receptor with extensive homology to EGF receptor shares chromosomal location with *neu* oncogene. *Science* **230** : 1132–1139, 1985.
- 10) Akiyama T., Sudo C., Ogawara H. et al. : The product of the human *c-erbB-2* gene : a 185-kilodalton glycoprotein with tyrosine kinase activity. *Science* **232** : 1644–1646, 1986.