

卵巣癌の予後に関する HSP27の免疫組織化学的検討 ～第2報～

前畑賢一郎

卵巣癌における p53, Ki-67, heat shock proteins (HSP 27, 70, 90) の発現を免疫組織化学的に検索し予後因子となりうるか否かを検討した。

1985～99年にかけて当院で治療し予後を追及しえた上皮性卵巣悪性腫瘍97症例に対して現在の WHO 分類に従って再評価し、その中で卵巣癌と診断した68例を対象にした。残りの29例は境界悪性腫瘍であったため予後の検討からは除外したが、卵巣癌との発現の違いに関して比較検討した。

まず UNIVERSAL GRADING SYSTEM による悪性度評価を行い、その腫瘍像を反映したホルマリン固定・パラフィンブロックを用いて p53, Ki-67, HSP27, HSP70, HSP90 の発現を免疫組織化学的に検索した。そして組織型、腫瘍組織分化度、進行期、再発及び Kaplan-Meyer 法による生存率との関連を統計学的に解析した。

境界悪性群に比べ悪性群で Ki-67の発現が有意に高かった ($p < 0.01$)。p53は漿液性腺癌で他の組織型と比べて強く発現している傾向がみられたが、HSP27, Ki-67では組織型による発現の差はみられなかった。HSP90を除くすべてのマーカーは悪性度とよく相関していた。HSP27と p53では有意差はないものの進行癌での発現が早期癌に比べ高い傾向にあり、また再発群では非再発群と比べ発現が高い傾向があった。生存解析では HSP27陽性群は陰性群と比較して有意に予後不良であった ($p = 0.0119$)。p53では陰性群と比べ陽性群で生存率が低い傾向がみられた ($p = 0.0534$)。多変量解析では進行癌 (Ⅲ・Ⅳ期癌) ($p < 0.01$)、HSP27陽性群 ($p < 0.05$) で有意に予後不良であった。

以上より HSP27の発現は卵巣癌の予後不良因子となることがわかった。(平成15年6月9日受理)

Immunohistochemical Study of HSP27 in Ovarian Cancer, 2nd Report — Determination of Optimal Evaluation Method —

Kenichiro MAEHATA

Objectives : The aim of this study was to evaluate the prognostic value of the immunohistochemical expression of heat shock proteins 27, 70 and 90 (HSP27, HSP70, HSP90), p53 and Ki-67 in epithelial ovarian cancer patients.

Methods : The relationship between the immunohistochemical expression of these markers and conventional clinicopathological parameters was studied in 68 epithelial ovarian cancer patients. Expression of these markers in the carcinomas ($n = 68$) and 29 borderline malignant tumors was

compared. Survival analysis was performed using the Kaplan–Meier method, the Logrank test and multivariate analysis employing the Cox regression model.

Results : Ki-67 expression was significantly higher ($p < 0.01$) in the carcinomas than in the borderline tumors. There were no significant differences in histological type, but serous adenocarcinomas tended to show frequent p53 expression. Positive correlation was observed between histological grade and HSP27, HSP70 and p53 expression ($p < 0.05$). Although there was no statistically significant relationship between the expression of these markers and the International Federation of Gynecology and Obstetricians (FIGO) stage or the recurrence rate, expression of HSP27 and p53 was frequently observed in stage III · IV patients and patients with recurrent tumors. Survival analysis demonstrated that HSP27 expression is significantly related to a poor survival rate ($p < 0.05$), but the relationship between p53 expression and a poor survival rate did not reach statistical significance. In multivariate analysis, stages III · IV and HSP27 expression retained independent prognostic values.

Conclusion : The current study data suggest that HSP27 expression is the most significant factor related to a poor prognosis in epithelial ovarian cancer patients. (Accepted on June 9, 2003)

Kawasaki Igakkaishi 29(2) : 105–114, 2003

Key Words ① Ovarian carcinoma ② Prognosis
③ Immunohistochemistry ④ Heat shock protein 27
⑤ p53 ⑥ Ki-67

はじめに

卵巣癌の予後因子として進行期や初回手術後の残存腫瘍径、組織型及び分化度などの臨床病理学的因子とともに種々の分子マーカーが研究されている^{1)~7)}。我々は免疫組織化学染色法を用いて Heat shock protein 27 (HSP27) が卵巣癌症例における予後不良因子であることを示した⁸⁾。本研究では HSP27 とともに p53, Ki-67, HSP70, HSP90 と卵巣癌の予後との関連を免疫組織化学染色法にて検討し有用な予後因子となりえるマーカーを検索した。

対象と方法

1985年から1999年にかけて、川崎医科大学附属病院産婦人科で上皮性卵巣悪性腫瘍と診断され治療後、予後の追求が可能であった97例を再鏡検し、最新の WHO 分類を用いて悪性腫瘍と診断した68例を対象とした。残りの29例は再鏡

検の結果、すべて境界悪性腫瘍（漿液性腫瘍8例、粘液性腫瘍17例、混合型腫瘍4例）であったため予後の検討からは除外し、卵巣癌との違いのみを検討した。

卵巣癌症例の組織型は漿液性腺癌31例、粘液性腺癌7例、類内膜腺癌12例、明細胞癌16例、未分化癌2例であった。進行期はI期19例、II期13例、III期33例、IV期3例であった。腫瘍の悪性度は Shimizu らが提唱した universal grading system^{9),10)} に従い判定したところ、Grade1は23例、Grade2は30例、Grade3は15例であった (Table 1)。平均年齢は54.4歳 (21~83歳)であった。

最も代表的な腫瘍像を示した切片と同部位の10%ホルマリン固定・パラフィン包埋ブロックを用い、4 μm の厚さで薄切し免疫組織化学染色を行った。HSP は ENVISION PLUS 法にて染色した。1次抗体は HSP27 ; SPA-800, mouse monoclonal IgG1 (StressGen, Victoria, Canada), HSP70 ; W27, mouse monoclonal IgG2a (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA), HSP90 ;

Table 1. Clinicopathological characteristics and universal grading system in 68 ovarian carcinomas

	Grade 1 (n=23)	Grade 2 (n=30)	Grade 3 (n=15)
Serous (n=31)	3	15	13
Mucinous (n=7)	5	2	0
Endometrioid (n=12)	8	3	1
Clear cell (n=16)	7	9	0
Undifferentiated (n=2)	0	1	1
FIGO stage I (n=19)	7	10	2
II (n=13)	7	3	3
III (n=33)	8	15	10
IV (n=3)	1	2	0

H-114, rabbit polyclonal IgG (Santa Cruz) を用いた。脱パラフィン・脱キシレン後、5分間のマイクロウェーブ加熱処理による抗原賦活化を行った。冷却後に3% H₂O₂による内在性ペルオキシダーゼ阻害を5分間行った。PBSにて洗浄した後、ブロッッキング試薬を10分間反応させた。1次抗体は200倍に希釈し室温にて60分間反応させた。PBS洗浄後、ENVISION試薬を室温にて30分間反応させた。PBS洗浄した後、diaminobenzidine (DAB)による発色を行い、ヘマトキシリン染色をした。陽性コントロールとしてHeLa細胞を用いた。HSP27, 70, 90の染色結果の評価は我々が提唱した基準⁸⁾を用い発現腫瘍細胞が25%以上認められたものを陽性とした (Fig. 1A)。

p53, Ki-67に対しては avidin biotin peroxidase complex (ABC) 法で染色した。1次抗体は p53; DO-7, mouse monoclonal IgG2b (DAKO Corporation, Carpinteria, USA), Ki-67; anti-human Ki-67 antigen, mouse monoclonal IgG1 (DAKO)を使用した。脱パラフィン・脱キシレン後、10分間のマイクロウェーブ加熱処理 (レンジ活力綱)による抗原賦活化を行った。冷却後に3% H₂O₂による内在性ペルオキシダーゼ阻害を10分間行った。PBSにて洗浄しブロッッキング試薬を10分間反応させた。1次抗体は、いずれも50倍に希釈し室温にて60分間反応させた。PBS洗浄後に2次抗体を室温にて30分間反応させた。PBSにて洗浄した後ABC試薬を

室温にて30分間反応させた。PBS洗浄した後、DABによる発色を行い、ヘマトキシリン染色をした。陽性コントロールとして子宮内膜腺癌の組織切片を用いた。p53, Ki-67の染色結果は腫瘍細胞を1000個を鏡検したうえでDABで核が発色した細胞の割合を算定し、p53標識率, Ki-67標識率として検討した。そして標識率が10%未満であったものを陰性(-), 10%以上のものを陽性(+)と分類

し生存解析を行った (Fig. 1B)。境界悪性腫瘍29例に対しても同様に染色した。

卵巣癌68例の染色結果と臨床病理学的予後因子 {組織型 (Table 2-2), 組織学的悪性度 (Table 3), 進行期 (Table 4-1, 4-2), 再発 (Table 5)}との関連について Wilcoxon's test, Kruskal-Wallis test, Spearman rank correlation coefficientにて解析した。生存解析はKaplan-Meier法を用い陰性群と陽性群の2群間における生存曲線との差をlog rank testで検定した (Fig. 2)。また生存率に関する最も有用な因子を検索するためにCox回帰分析による多変量解析も行い、p<0.05を有意差ありとした (Table 6)。

結 果

まず、境界悪性腫瘍と卵巣癌の組織型別にみたHSP27, 70, 90, p53, Ki-67の染色結果をTable 2-1, 2-2に示す。境界悪性腫瘍 (Table 2-1)ではHSP27, 70, 90の陽性率は3抗体とも悪性腫瘍 (Table 2-2)と比べ低い傾向にあったが有意差はなかった。Ki-67の平均標識率は境界悪性腫瘍で有意に低かった (p<0.01)。各組織型別に検討したところ症例数が少なく統計学的に有意差はなかったが、境界悪性の漿液性腫瘍ではp53の平均標識率が高く、漿液性腺癌でも他の卵巣癌と比べて高い傾向がみられた。粘液性腺癌でのHSP70, 90の陽性率は他の組織型と比べてやや低かった。HSP27, Ki-67で

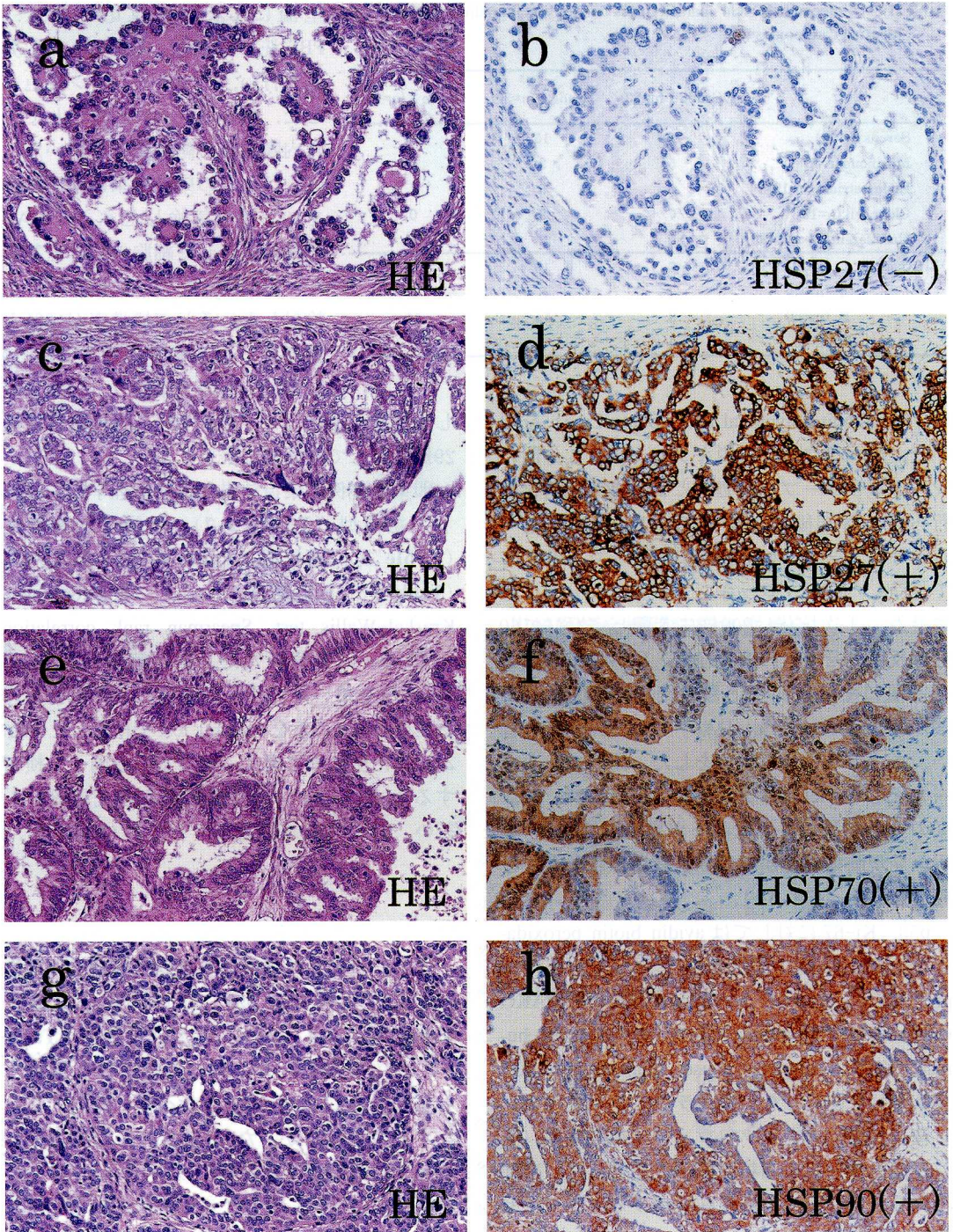


Fig. 1A. Immunohistochemical stain for HSP27 (a-d), HSP70 (e, f) and HSP90 (g, h) in ovarian carcinoma
a. Clear cell adenocarcinoma (HE ×100) **b.** Clear cell adenocarcinoma (Immunohistochemistry ×100) Note that HSP 27 is negative in this case. **c.** Serous adenocarcinoma (HE ×100) **d.** Serous adenocarcinoma (Immunohistochemistry ×100) Note that HSP27 is positive in this case. **e.** Mucinous adenocarcinoma (HE ×100) **f.** Mucinous adenocarcinoma (Immunohistochemistry ×100) Note that HSP70 is positive in this case. **g.** Serous adenocarcinoma (HE ×100) **h.** Serous adenocarcinoma (Immunohistochemistry ×100) Note that HSP90 is positive in this case.

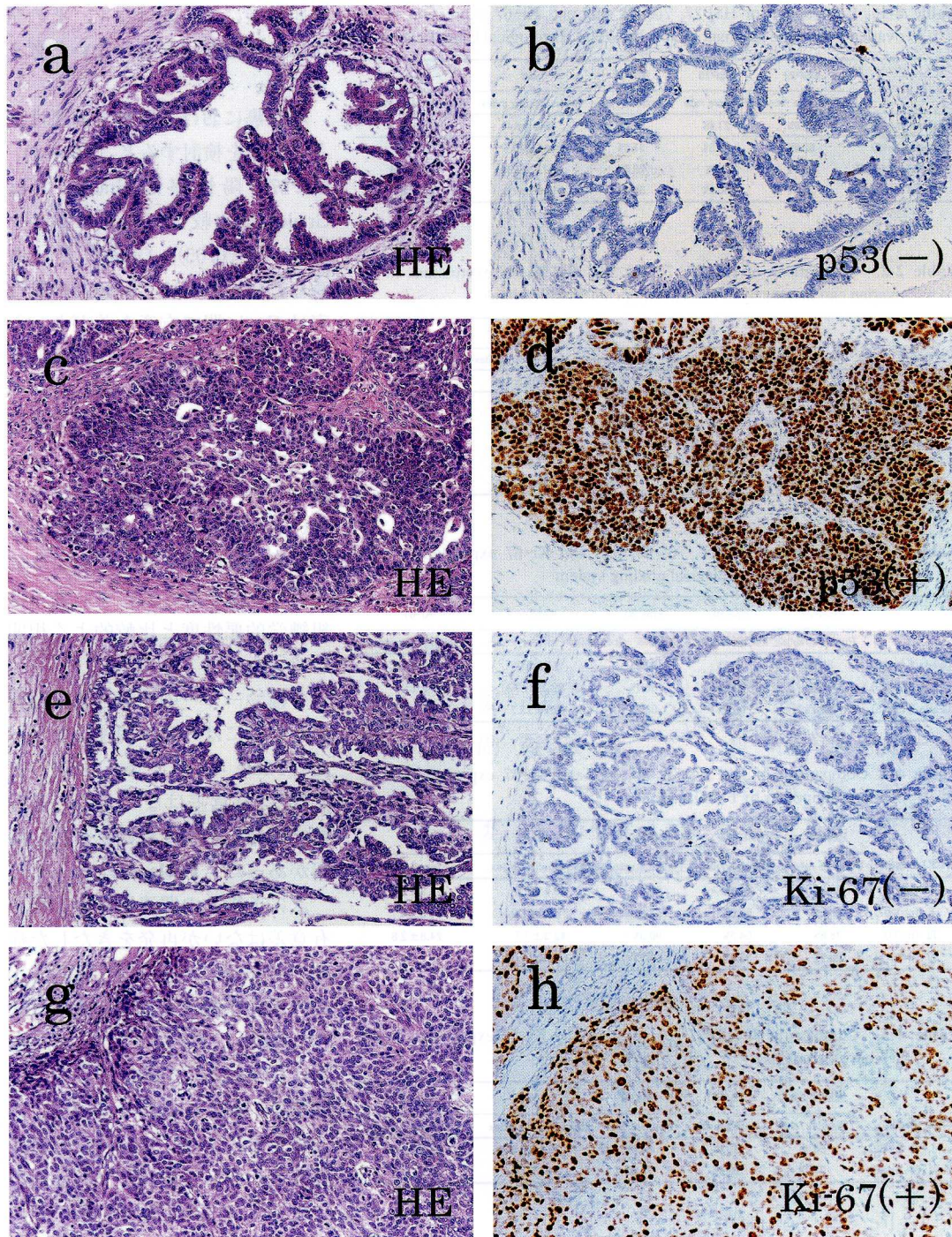


Fig. 1B. Immunohistochemical stain for p53 (a-d) and Ki-67 (e-h) in ovarian carcinoma

a. Serous adenocarcinoma (HE $\times 100$) **b.** Serous adenocarcinoma (Immunohistochemistry $\times 100$) Note that p53 is negative in this case. **c.** Serous adenocarcinoma (HE $\times 100$) **d.** Serous adenocarcinoma (Immunohistochemistry $\times 100$) Note that p53 is positive in this case. **e.** Serous adenocarcinoma (HE $\times 100$) **f.** Serous adenocarcinoma (Immunohistochemistry $\times 100$) Note that Ki-67 is negative in this case. **g.** Serous adenocarcinoma (HE $\times 100$) **h.** Serous adenocarcinoma (Immunohistochemistry $\times 100$) Note that Ki-67 is positive in this case.

Table 2-1. Comparison of HSP27, 70, 90, p53 and Ki-67 expression in 29 ovarian borderline malignant tumors by WHO Histological Classification

	HSP27	HSP70	HSP90	p53	Ki-67
	Positive rate	Positive rate	Positive rate	Mean labeling index	Mean labeling index
Borderline (n=29)	37.9%	27.6%	31.0%	25.0±6.4	11.2±1.7
Serous (n=8)	62.5%	62.5%	37.5%	44.5±13.5	8.4±1.5
Mucinous (n=17)	29.4%	5.9%	23.5%	17.7±7.6	14.0±2.6
Mixed (n=4)	25.0%	50.0%	50.0%	17.5±17.5	5.3±2.1

Table 2-2. Comparison of HSP27, 70, 90, p53 and Ki-67 expressions in 68 ovarian carcinomas by WHO Histological Classification

	HSP27	HSP70	HSP90	p53	Ki-67
	Positive rate	Positive rate	Positive rate	Mean labeling index	Mean labeling index
Malignancy (n=68)	67.6%	50.0%	86.8%	30.6±5.0	25.3±2.0
Serous (n=31)	71.0%	64.5%	87.1%	42.6±8.0	28.0±3.2
Mucinous (n=7)	71.4%	14.3%	57.1%	25.9±15.2	28.5±6.2
Endometrioid (n=12)	75.0%	50.0%	100%	31.7±13.0	26.8±4.4
Clear cell (n=16)	50.0%	37.5%	87.5%	5.3±3.7	17.8±3.2
Undifferentiated (n=2)	100%	50.0%	100%	58.0±38.0	23.3±1.5

Table 3. Comparison of HSP27, 70, 90, p53 and Ki-67 expressions in 68 ovarian carcinomas by universal grading system

	HSP27	HSP70	HSP90	p53	Ki-67
	Positive rate	Positive rate	Positive rate	Mean labeling index	Mean labeling index
Grade 1 (n=23)	52.2%	30.4%	82.6%	9.5±5.0	19.9±2.5
Grade 2 (n=30)	80.0%	50.0%	86.7%	39.3±7.7	24.2±2.7
Grade 3 (n=15)	66.7%	80.0%	93.3%	45.6±12.7	36.0±5.1

Table 4-1. Comparison of HSP27, 70, 90, p53 and Ki-67 expressions in 68 ovarian carcinomas by FIGO stage

FIGO stage	HSP27	HSP70	HSP90	p53	Ki-67
	Positive rate	Positive rate	Positive rate	Mean labeling index	Mean labeling index
I (n=19)	63.2%	42.1%	84.2%	19.5±8.0	28.8±3.8
II (n=13)	46.2%	53.8%	84.6%	21.8±11.0	21.5±4.7
III (n=33)	78.8%	54.5%	90.9%	42.3±7.7	24.8±2.8
IV (n=3)	66.7%	33.3%	66.7%	11.0±11.0	26.7±9.3

Table 4-2. Comparison of HSP27, 70, 90, p53 and Ki-67 expressions in 68 ovarian carcinomas by I・II and III・IV stage

FIGO stage	HSP27	HSP70	HSP90	p53	Ki-67
	Positive rate	Positive rate	Positive rate	Mean labeling index	Mean labeling index
I・II (n=32)	56.3%	46.9%	84.4%	20.4±6.4	25.8±3.0
III・IV (n=36)	77.8%	52.8%	88.9%	39.7±7.3	24.9±2.6

Table 5. Comparison of HSP27, 70, 90, p53 and Ki-67 expressions in 68 ovarian carcinomas by recurrence

	HSP27	HSP70	HSP90	p53	Ki-67
	Positive rate	Positive rate	Positive rate	Mean labeling index	Mean labeling index
Recurrence(+)(n=41)	73.2%	46.3%	87.8%	37.0±6.8	24.7±2.4
Recurrence(-)(n=27)	59.3%	55.6%	85.2%	20.9±6.9	26.3±3.4

は組織型による差はなく、その発現には組織型は影響しないと考えられた。

卵巣癌における組織学的悪性度との関連を検討すると (Table 3), HSP27の陽性率は Grade2 では Grade1 に比較して有意に高かったが (p<0.05), Grade3 とは有意な差はなかった。HSP70の陽性率は Grade 間で有意な差があった (p<0.05), HSP90 は全ての Grade で陽性率が高く差がなかった。p53の平均標識率は Grade の程度に応じて有意に高かった (p<0.05)。Ki-67の平均標識率では分化度が悪いものほど高くなる傾向にあるが有意差はなかった。このように HSP90を除くすべてのマーカーは組織学的悪性度と比較的よく関連していた。

各種マーカーの発現と臨床進行期との間には一定の関連はなかった (Table 4-1)。しかし HSP27と p53では有意差はないものの進行癌での発現が早期癌に比べ高い傾向があった (Table 4-2)。

次に予後との関連を検討した。有意差はないが再発をきたした症例での HSP27の陽性率は高く、p53の平均標識率も高かった。HSP70, HSP90, Ki-67では明らかな差はなかった (Table 5)。そこで HSP27と p53の相関をみると、p53陽性例 (28例) のうち HSP27陽性例が82% (23例) であったのに対して p53陰性例 (40例) での HSP27陽性率は42.5%であり (p=0.039), 両者の相関があった。一方、HSP27の陽性例と陰性例における p53の標識率を比較すると、HSP27陰性例 (22例) では18.6±

Table 6. Univariate and multivariate analysis for overall survival of clinical, histopathologic and immunohistochemical characteristics in 68 ovarian carcinomas p values of Cox regression analysis. ($p < 0.05$)

Prognostic factor	Univariate analysis	Multivariate analysis
Age $50 \leq$ vs. > 50	$p=0.459$	$p=0.736$
Stage I · II vs. III · IV	$p < 0.0001$	$p < 0.001$
Grade 1 · 2 vs. 3	$p=0.856$	$p=0.587$
p53 negative vs. positive	$p=0.084$	$p=0.437$
Ki-67 negative vs. positive	$p=0.655$	$p=0.631$
HSP27 negative vs. positive	$p=0.016$	$p=0.032$
HSP70 negative vs. positive	$p=0.253$	$p=0.081$
HSP90 negative vs. positive	$p=0.969$	$p=0.758$

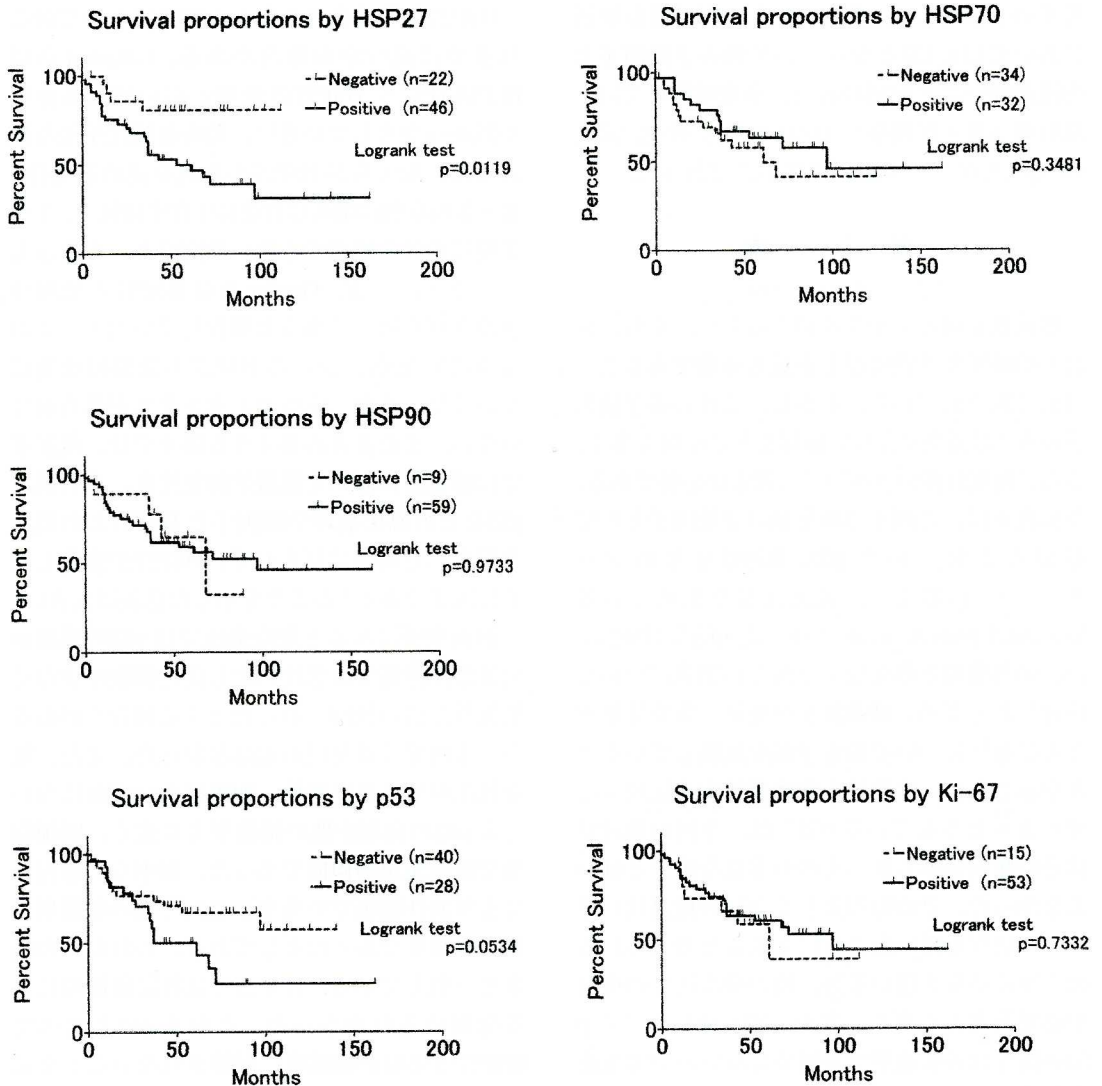


Fig. 2. Overall survival rates in 68 ovarian carcinomas by HSP27, HSP70, HSP90, HSP90, p53 and Ki-67 expressions. (Kaplan-Meier method, Log rank test, $p < 0.05$)

7.9%であったのに対し、陽性例では、 $36.4 \pm 6.2\%$ で有意差はない ($p = 0.096$) ものの HSP27 陽性例の p53 標識率が高い傾向にあった。

生存解析 (Fig. 2) では HSP27 陽性群が陰性群と比較して有意に予後不良であった ($p = 0.0119$)。p53 では陰性群と比べ陽性群で低い生存率を示す傾向にあった ($p = 0.0534$)。HSP70, 90, Ki-67 に関しては陰性群、陽性群との間に差はなかった。単変量解析、多変量解析で有意な予後不良因子と判定されたのは進行期、HSP27 の両者であった (Table 6)。p53 は単変量解析での p 値が 0.084 であったものが多変量解析においては 0.437 となっていて他の予後因子と関連が強いことが窺われた。多変量解析では、進行癌 (Ⅲ・Ⅳ期癌) ($p < 0.01$) と HSP27 陽性群 ($p < 0.05$) で有意に予後不良であった。

考 察

卵巣癌症例の予後を推測する上で、病期、腫瘍の組織型や悪性度などが最も重要であることは広く知られている。しかし、これらの予後因子のみでは説明できない転帰をとる症例も多く、さらに精度の高い予後因子の探索は必要である。今回我々は、これまで卵巣癌の予後因子として有用とされていた p53, Ki-67 などのマーカー^{11)~13)}に加えて、最近注目を集めている heat shock protein family の中で代表的な HSP27, 70, 90 の発現と卵巣癌の予後との関連について検討したところ、HSP27 が単変量、多変量解析ともに病期について最も予後を反映していることが示された。他癌腫を含め悪性度を反映するマーカーとされている p53¹⁴⁾は、今回の検討ではその傾向はみられるものの有意な因子とはいえなかった。その原因として今回の検討はパラフィン切片を用いたことにもよると考えられるので凍結切片を用いる等、他の検出法での検討が必要と考えられる。また、卵巣癌における p53 の関与は各組織型で共通ではないので卵巣癌全体を包括して行った検討では予後因子としてあらわれてこなかった可能性もある。

本研究で最も重要な点は、多変量解析において HSP27 の発現が独立した予後因子であることが示されたことである。すなわち、進行期、組織分化度と HSP27 との間には有意な関連がみられなかったにもかかわらず、HSP27 陽性群は有意に予後不良であった。このことは p53 が従来から指摘されていたように悪性度と有意に相関していたために、単変量解析では $p = 0.084$ であった probability が多変量解析において $p = 0.578$ とさらに低下し、その独立予後因子としての意義を失ったことと対照的であった。

HSP27 と卵巣癌の予後との関連についてはこれまでに幾つかの報告がある。Langdon らは ELISA 法にて HSP27 の発現が高いほど生存率が低かったとしている¹⁵⁾。免疫組織化学的な検討では、Arts らが HSP27 の発現を認める場合、Ⅲ・Ⅳ期症例に限れば有意に生存率は低く、Ⅰ～Ⅳ期における検討でも低い傾向であったと示していた¹⁶⁾。一方、Geisler らは HSP27 の発現は予後良好な因子であると報告していた¹⁷⁾。このように卵巣癌における HSP27 の発現の意義については、まだ一定のコンセンサスが得られていない。また著者の知りうる限りでは、現在までに卵巣癌において組織学的悪性度、進行期、p53 などの臨床病理学的因子と HSP27 との関連を解析した研究は見られず、HSP27 が独立した予後因子でありうることを示した意義は大きい。

組織型別にみると免疫染色では p53 の発現が境界悪性腫瘍では悪性に比し陽性細胞が少なく染色性が弱い傾向であったとする報告¹⁸⁾があるが、本研究では発現の差はなかった。また、漿液性腫瘍では境界悪性、卵巣癌のいずれにおいても p53 の発現が他の組織型より強く、明細胞癌では低発現の傾向であった。榎本らの報告¹⁹⁾でも漿液性腺癌での発現が 45% と他の組織型と比べ高頻度であったとしており、われわれの結果と一致している。HSP27 では特に組織型による発現の差はなかった。これも p53 と比べて HSP27 の発現が組織型に影響されないことを示し、HSP27 が独立した予後判定マーカーとしての有用性が高いことを示すデータと考えられ

た。

p53と HSP27との互いの関連性については現在、Artsらは HSP27の発現と p53の発現とは相関しないと考えているが¹⁶⁾、本研究では相関は弱いながらあることが示された。

以上、本研究では HSP27の発現が卵巣癌における重要な予後不良因子であることを示した。限られた症例数での解析であるためさらに多数例での検討が必要であるが、本研究の結果は臨床病理学的にきわめて重要である。

謝 辞

稿を終えるにあたり、御指導と校閲を賜りました川崎医科大学産婦人科教室河野一郎教授に深謝いたしますと共に、終始有益な御助言とご協力を頂いた前川崎医科大学病理学教室真鍋俊明教授、川崎医科大学病理学教室三上芳喜講師、川崎医科大学産婦人科教室藤原恵一助教授に感謝いたします。また同病理学教室員の方々に感謝いたします。本研究は川崎医科大学プロジェクト研究費（12-119, 13-103）、文部省科学研究費補助金（13671758）からの援助を受けた。

文 献

- 1) Burn JL, Feyler A, Chene G, Saurel J, Burn G, Hocke C : Long-term results and prognostic factors in patients with epithelial ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 78 : 21-27, 2000
- 2) 佐々木寛 : 卵巣癌の予後因子. *日産婦誌* 52 : 451-456, 2000
- 3) 片渕秀隆, 荒尾慎治, 田代浩徳, 岡村均 : 卵巣腫瘍の分子生物学 18 : 446-454, 2000
- 4) Neijt JP : Ovarian cancer : Rethinking prognostic factors and chemotherapy. *American Society of Clinical Oncology. Educational Book* : 214-217, 1994
- 5) 安達 進, 野田恒夫, 清塚康彦, 伊藤公彦, 井谷嘉男, 辻本晃男, 阪倉滋是, 吉田剛祥, 梅影秀史, 中山雅博, 藤田正之 : 卵巣癌における CA125免疫組織染色の意義. *日産婦誌* 46 : 896-902, 1994
- 6) Vogl FD, Frey M, kreienberg R, Runnebaum IB : Autoimmunity against p53 predicts invasive cancer with poor survival in patients with an ovarian mass. *Br J Cancer* 83 : 1338-1343, 2000
- 7) Irie T, Kigawa J, Minagawa Y, Oishi T, Takahashi M, Shimada M, Kamazawa S, Sato S : Alteration of a p53 gene status affects outcome of patients with recurrent ovarian cancer. *Oncol* 58 : 237-241, 2000
- 8) 前畑賢一郎 : 卵巣癌の予後に関する HSP27の免疫組織学的検討～第1報～最適な評価法に関する研究. *川崎医学会誌* 28 : 157-164, 2002
- 9) Shimizu Y, Kamoi S, Amada S, Hasumi K, Akiyama F, Silverberg SG : Toward the development of a universal grading system for ovarian epithelial carcinoma. I. Prognostic significance of histopathologic features-problems involved in the architectural grading system. *Gynecol Oncol* 70 : 2-12, 1998
- 10) Shimizu Y, Kamoi S, Amada S, Akiyama F, Silverberg SG : Toward the development of a universal grading system for ovarian epithelial carcinoma : testing of a proposed system in a series of 461 patients with uniform treatment and follow-up. *Cancer* 82 : 893-901, 1998
- 11) Sakai K, Kaku T, Kamura T, Kinukawa N, Amada S, Shigematsu T, Hirakawa T, Kobayashi H, Ariyoshi K, Nakano H : Comparison of p53, Ki-67, and CD44v6 expression between primary and matched metastatic lesions in ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 72 : 360-366, 1999
- 12) Ozalp S, Yalcin OT, Minsin TH : Expression of p53 in epithelial ovarian cancer. *Int J Obstet Gynecol.* 71 : 277-278, 2000
- 13) Sengupta PS, McGown AT, Bajaj V, Blackhall F, Swindell R, Bromley M, Shanks JH, Ward T, Buckley CH, Reynolds K, Slade RJ, Jayson GC : p53 and related proteins in epithelial ovarian cancer. *Eur J Cancer* 36 : 2317-2328, 2000
- 14) Vogl FD, Frey M, Kreienberg R, Runnebaum IB : Autoimmunity against p53 predicts invasive cancer with poor

- survival in patients with an ovarian mass. *Br J Cancer* 83 : 1338 - 1343, 2000
- 15) Langdon SP, Rabiasz GJ, Hirst GL, King RJB, Hawkins RA, Smyth JF, Miller WR : Expression of the heat-shock protein hsp27 in human ovarian cancer. *Clin Cancer Res* 1 : 1603 - 1609, 1995
 - 16) Arts HJ, Hollema H, Lemstra W, Willems PH, De Vries EG, Kampinga HH, Van der Zee AG : Heat-shock-protein -27 (hsp27) expression in ovarian carcinoma : relation in response to chemotherapy and prognosis. *Int J Cancer* 84 : 234 - 238, 1999
 - 17) Geisler JP, Geisler HE, Tammela J, Wiemann MC, Zhou Z, Miller GA, Crabtree W : Heat shock protein 27 : an independent prognostic indicator of survival in patients with epithelial ovarian carcinoma. *Gynecol Oncol* 69 : 14 - 16, 1998
 - 18) Katabuchi H, Tashiro H, Cho KR, et al : Micropapillary serous carcinoma of the ovary : An immunohistochemical and mutational analysis of p53. *Int J Gynecol Pathol.* 17 : 54 - 60, 1998
 - 19) 榎本隆之, 藤田征巳, 村田雄二 : 卵巣癌の分子生物学. *産科と婦人科* 66 : 18 - 25, 1999