

p53癌抑制遺伝子変異検索の膵癌診断

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 公開日: 2017-10-05 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 渡邊, 弘之, 山口, 泰志, 澤武, 紀雄 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/40638

膵癌の分子生物学—その基礎、診断と治療の展望—

p53 癌抑制遺伝子変異検索の膵癌診断*渡邊 弘之¹⁾・山口泰志・澤武紀雄

要約：膵癌では胃癌や大腸癌のように生検が行えないことが、その早期診断や鑑別診断を困難にしているが、K-ras コドン 12 の変異が高率にみられるに注目し、膵液中 K-ras 変異の検出が試みられている。しかし、その陽性率は高いものの、偽陽性がかなりみられ、癌特異性が問題になっている。このような点を補完し、膵液中 DNA 診断の向上を目指して、私共は、*p53* 癌抑制遺伝子変異の有無を non-RI-SSCP 法にて検討している。本法による *p53* 遺伝子変異（エクソン 5～8）は膵癌の 42.3% (11/26) に認められている。一方、粘液産生膵腫瘍（腺腫）4 例と慢性膵炎 16 例の膵液には同変異は検出されず、その癌特異性は非常に高い。また、K-ras 変異陰性例にも *p53* 変異陽性例がみられ、K-ras 変異と組み合わせることにより、膵癌の遺伝子診断が向上する。

Key words : *p53*, K-ras, 膵液, 膵癌

はじめに

膵癌では早期膵癌や小膵癌の段階で診断される症例は依然として少ないので、その発生・進展過程における遺伝子異常を系統的に検索する機会に乏しく、他の消化器癌に比較して遺伝子異常について不明な点も多い。しかし、膵癌で種々の癌関連遺伝子異常の発現することが明らかにされ、膵癌の 95%以上を占める膵管癌では、K-ras 癌遺伝子コドン 12 の点突然変異が膵癌組織で 75%～100%と高頻度に発現することより^{1～4)}、内視鏡下経乳頭的に採取した膵液において K-ras 変異の分析が行われている⁵⁾。これまでに報告されている膵液中 K-ras 変異の頻度は検出法の感度などによりその陽性率は異なるが^{5～15)}、検出感度を高めると、粘液細胞過形成に由来する K-ras 変異も検出されることが明らかとなり¹⁶⁾、偽陽性の高いことが問題となっている^{11,12)}。定量的な K-ras 変異測定により、癌特異性を高めることが可能であるが、検出感度はやや低下する¹⁵⁾などの問題が残る。本稿では、膵癌における

p53 癌抑制遺伝子異常について概説し、膵液中 *p53* 変異の検索する意義を K-ras 変異のそれと対比しながら述べる。

I. 膵癌組織における *p53* 癌抑制遺伝子の異常

癌抑制遺伝子の代表的存在である *p53* 遺伝子は、点突然変異などによる異常を起こすことによって、正常の *p53* 蛋白の機能が失われ、細胞周期において G1 停止を回避し、さらにアポトーシスを阻害し癌化を引き起こすと考えられている。この変異は種々の癌で共通してみられ、1994 年 Greenblatt ら¹⁷⁾のまとめた文献的集計によると、消化器癌組織では食道癌 279 例中 45%，胃癌 314 例中 41%，大腸癌 960 例中 50%，肝細胞癌 716 例中 29%，膵癌 170 例中 44% という *p53* 変異率が報告されている。K-ras の場合のように特別に高率ではないが、他の遺伝子に比して高い変異率がみられている。表 1 は膵癌組織における *p53* 変異率を遺伝子レベルと蛋白レベルで検討した従来の成績をまとめたものである。最近、切除膵癌の初代 xenograft で 76% (31/41) と高い変異率も報告されている¹⁸⁾。これは、マイクロダイセクション法により組織より癌細胞を慎重に選択し、非癌細胞の混入を極力少なくした材

* Detection of *p53* Suppressor Gene Mutations in the Diagnosis of Pancreatic Cancer

1) 金沢大学がん研究所内科 (〒921-8044 金沢市米泉町 4-86)

表 1 ヒト脾癌における *p53* 変異と *p53* 蛋白発現（組織染色）の頻度

報告者	国	年度	頻度	検出方法
Casy ら	アメリカ	1993	33% (8/24)	d
Scarpa ら*	イタリア	1993	38% (8/21)	b
	日本	1993	43% (6/14)	b
Berrizpe ら	スペイン	1994	27% (8/30)	b
Redston ら	アメリカ	1994	70% (19/27)	c, d
Pellegata ら	イタリア	1994	51% (18/35)	a
Nakamori ら	日本	1995	43% (16/37)	b
Ruggeri ら	アメリカ	1996	39% (53/136)	b
Rozenblum ら	アメリカ	1997	76% (31/41)	b

a : direct sequence of PCR products with DGGE (Denaturing gradient gel electrophoresis)

b : direct sequence of PCR products with SSCP

c : sequence of cloned PCR products

d : direct sequence of PCR products

*イタリアと日本の脾癌それぞれ 21 例と 14 例を用いた

<免疫組織染色体>				
Casy ら	(アメリカ)	(1993)	47% (16/34)	
Scarpa ら*	(イタリア)	(1993)	57% (12/21)	
	(日本)	(1993)	64% (9/14)	
DiGiuseppe ら	(アメリカ)	(1994)	40% (19/48)	
Zhang ら	(アメリカ)	(1994)	37% (20/54)	
Lee ら	(オーストラリア)	(1994)	63% (32/51)	
Ruggeri ら	(アメリカ)	(1996)	56% (76/136)	
Dergham	(アメリカ)	(1997)	57% (43/75)	
Sato ら	(日本)	(1997)	70% (45/64)	

料から DNA を抽出する方法の普及、および分析法の感度や精度の向上により、検出率が高くなったことによると思われる。脾癌の *K-ras* 変異はコドン 12 に集中してみられるのに対し、*p53* にはこのようなホットスポットは存在しない。しかし、いずれの癌においてもドメイン II-V をコードするエクソン 5~8 (コドン 128~306) に変異が集中しており^{19,20)}、従来の脾癌における *p53* 変異の検索もエクソン 5~8 に限って検討された報告が多い²¹⁾。

p53 変異がみられるときにはそのほとんどで一方の対立遺伝子座の欠失を伴っており、同時に変異型 *p53* 蛋白は核内の heat shock protein などと結合し、半減期が延長し、核内蓄積が起こるとされている²²⁾。このようなことを反映して、抗 *p53* 抗体により核が強く染色されるようになる。ただし、実際には野性型蛋白と変異型蛋白とを区別できる抗体ではなく、非癌細胞にも散発的に染色される場合が多い。また、ナンセンス変異や欠失により蛋白が産生されない場合は検出されないと留意する必要がある²³⁾。また、マイクロウェーブ処理による抗原提示能の上昇に伴い、免疫染色陽性率の上昇もみられている。これらのことより、最近では癌細胞の 20%以上に細胞核が染色されたと

きに *p53* 蛋白過剰発現と表現し、染色陽性と判定されるべきだという意見が強い。

粘液産生脾腫瘍を呈した腺腫（境界型）で *p53* 変異を認めたという報告²⁴⁾もあるが、一般に過形成や腺腫では *p53* 変異は認められず、脾癌においても *p53* 変異は悪性腫瘍としての病理形態学的特徴が明らかとなつた時点で発見するとされている。*p53* 変異陽性群と陰性群には脾癌の臨床病理学的事項に差異はみられないが、治癒切除群、非治癒切除群を問わず *p53* 変異陽性群で有意に予後が不良であるという報告²⁵⁾があり、*p53* 変異の検索が悪性度や予後判定の指標として役立つ可能性はある。脾の他の腫瘍における *p53* 変異は、島細胞癌で 12 例中 1 例 (8%) と例外的で、腺房細胞癌でも 22 例中陽性例はないと報告されている。

II. 脾液中 *p53* 変異の検索による 脾癌診断への応用

脾癌の *p53* 変異には *K-ras* コドン 12 のような都合のよいホットスポットがないので、分析法が *K-ras* の場合に比して、煩雑である。このようなことを反映してか、これまで遺伝子診断として体液中の *p53* 変異を検討した報告は、未だ少ない。肺癌患者の喀痰サンプル 15 例中 2 例 (13%) に *p53* 変異がみられた報告²⁶⁾ や肺癌組織に *p53* 変異が確認された肺癌患者の気管支肺胞洗浄液 28 例中 11 例 (39%) に組織と同一の *p53* 変異が検出されたとの報告²⁷⁾がみられる。さらに、膀胱癌患者の尿サンプル 15 例中 11 例 (73%)²⁸⁾、30 例中 24 例 (80%)²⁹⁾ に *p53* 変異がみられたという報告がある。

脾液を用いた検討では、内外を通じて私共³⁰⁾と広島大学第一内科のグループ^{31~33)}のものだけである。ただし、後者は脾管ブラッシングによる細胞診のサンプルを用いて、主として *p53* 蛋白染色により検索したものである。

私共³⁰⁾は脾癌患者 26 例より内視鏡下経乳頭的に採取した脾液において nonRI-SSCP 法で *p53* 遺伝子の変異 (エクソン 5-8) について検索したところ、表 2 に示すように、エクソン 5 で 3 例、エクソン 6 で 2 例、エクソン 7 で 3 例、エクソン 8 で 3 例に変異バンドがみられ、脾癌全体で 26 例 11 例 (42.3%) に *p53* 変異がみられた。一方、粘液産生脾腫瘍 (腺腫) 4 例、および慢性脾炎患者 16 例から採取した脾液においては、検索したいずれのエクソンにも *p53* 遺伝子の変異バンドは検出されなかった。このように、脾癌における *p53* 変異は良性疾患では認められず、癌特異性は非常

表 2 膵癌患者の臨床病理学的因子と膵液中 *p53* 変異ならびに *K-ras* 変異の成績

Patient no.	Age (year)	Sex	Location ^a	Size (TS) ^b	Stage	<i>p53</i> mutation ^c			K- <i>ras</i> mutation ^c	
						SSCP (exon)	Codon	Sequence	PCR-RFLP	HPA pattern
1	58	M	H	2	III	—			+	Asp
2	70	F	H	2	III	+ (5)			+	Asp
3	70	M	H	2	IVb	+ (7)			—	
4	74	M	B	4	IVb	+ (7)			+	Asp
5	52	M	B	3	III	—			+	Asp
6	69	M	T	3	IVb	—			—	
7	79	M	B	3	IVb	+ (8)			+	Asp
8	78	M	H	4	III	—			+	
9	48	F	B	4	IVb	—			+	Asp
10	72	M	B	3	IVb	+ (8)			+	Cys, Asp
11	51	M	B	4	IVb	+ (8)			+	Arg
12	47	M	H	3	IVb	+ (6)			+	Asp
13	44	F	B	1	I	—			—	
14	45	M	T	2	IVb	—			+	
15	51	M	H	2	II	+ (6)			+	Asp
16	70	M	H	3	IVa	+ (5)	156	CGC → CAC	—	
17	65	F	B	4	IVa	—			+	
18 ^d	61	M	H	2	III	—			+	Asp
19	60	M	H	4	IVb	—			+	Asp
20	82	M	T	3	IVb	—			+	Asp
21 ^d	83	M	H	3	IVb	+ (7)	248	CGG → CCG	+	Asp
22 ^d	71	F	H	2	IVb	—			+	
23 ^d	74	F	T	3	IVb	—			+	Asp
24	51	M	H	3	IVb	—			+	Asp
25 ^d	70	F	H	2	IVa	+ (5)	144	CAG → TAG	+	Arg
26	74	M	B	2	IVb	—			nd	

^aH, head ; B, body ; T, tail^bTS 1≤2.0 cm ; 2.0 cm< TS 2≤4.0 cm ; 4.0 cm< TS 3≤6.0 cm ; 6.0 cm< TS 4^c+, mutation ; -, no mutation^dMutational analysis of *p53* was performed not only in the PPJ but also in the pancreatic tumor tissue

に高いと考えられる。上記の異常バンドを検出した症例のうち 3 例につき、直接シーケンス法にて塩基配列を検討し得た。表 2 に示すように、症例 16 は、エクソン 5 のコドン 156 に CGC → CAC (アルギニン→ヒスチジン)への変異を認めた。症例 25 はエクソン 5 のコドン 144 に CAG → TAG への変化を認めた。これは、グルタミンから停止コドンへ変化するナンセンス変異であった。症例 21 はエクソン 7 のコドン 248 が CGG → CCG (アルギニン→プロリン)への変異を認めた。また、症例 18, 21, 22, 23, 25において、マイクロダイゼーション法にて組織標本から抽出した DNA について *p53* 遺伝子の解析を行ったところ、いずれも膵液標本のものと一致していた。

さらに、*p53* 遺伝子を検討した膵癌患者の膵液の同一の検体について、*K-ras* 癌遺伝子コドン 12 の変異についても検討した。PCR-RFLP 法¹²⁾を用いると、表 2 に示すごとく膵癌症例 25 例中 21 例 (94%) に *K-ras* コドン 12 の変異バンドを認めた。*K-ras* 変異の定量的測定法であると同時に、その変異型をも同定できる HPA 法^{15,34)}では、膵癌 26 例中 17 例 (65%) が変異陽

表 3 膵癌患者における膵液中 *p53* 変異と *K-ras* 変異の比較1) *p53* 変異と *K-ras* 変異 (HPA 法) との比較

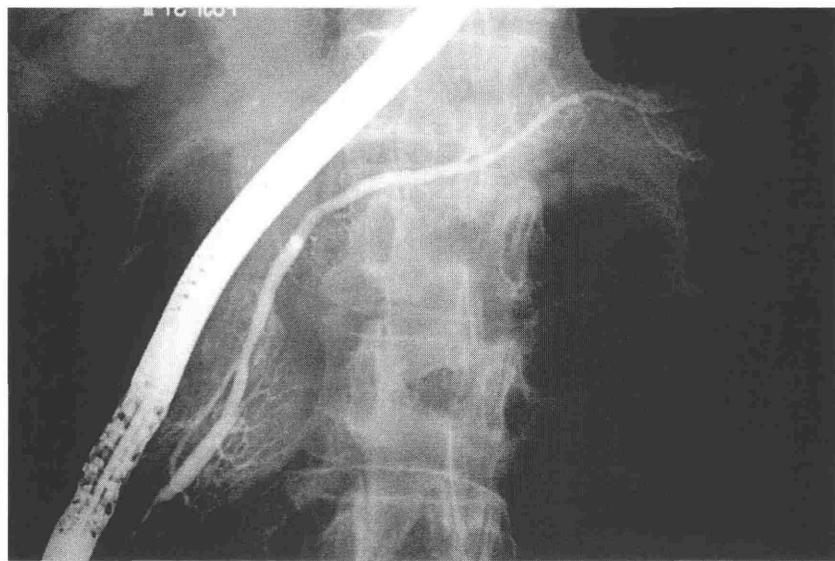
	<i>p53</i> 変異	+	-	Total
<i>K-ras</i> 変異	+	9	8	17
	-	2	7	9
Total		11	15	26

2) *p53* 変異と *K-ras* 変異 (PCR-RFLP 法) との比較

	<i>p53</i> 変異	+	-	Total
<i>K-ras</i> 変異	+	9	12	21
	-	2	2	4
Total		11	14	25

性と判定された。変異パターンではアスパラギン酸が 15 例と圧倒的に多く、アルギニンが 2 例、システインが 1 例に認められた。症例 10 は、2 種類の変異が同時に認められた。

さらに、膵癌患者膵液の、同一検体で *p53* 変異と *K-ras* 変異の有無を比較した成績を表 3 に示した。癌特異性の高い定量的な方法である HPA 法で測定した



ERCP

脾液細胞診 : class II

K-ras コドン 12(HPA 法) :
GGT(Gly) → GAT(Asp)

p53分析

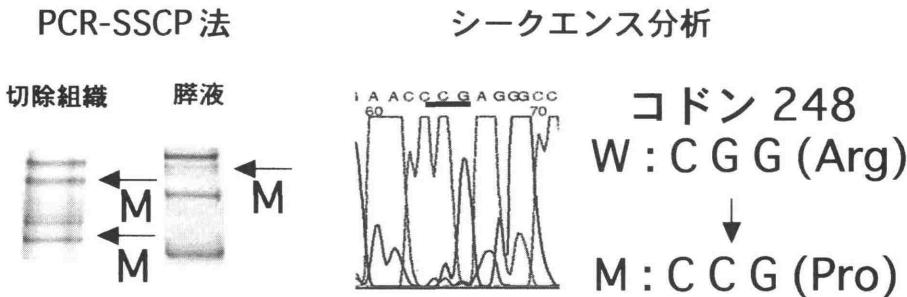


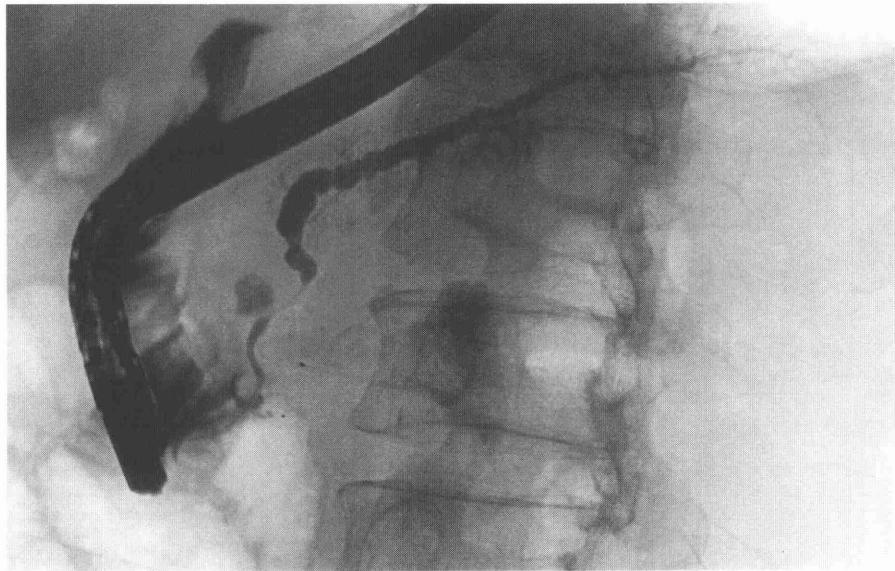
図 1 脾液中遺伝子変異が有用であった脾癌症例
脾管造影では明らかな異常所見は認められなかった。脾液の細胞診は陰性であったが、脾液の遺伝子分析を行うと K-ras と p53 の変異が陽性であった

K-ras 変異の結果と対比してみると、両者ともに変異陽性例は 26 例中 9 例であり、いずれか一方のみは p53 で 2 例、K-ras で 8 例であり、結局いずれか陽性であったものは 26 例中 19 例 (73%) であったという成績が得られている。また、癌特異性に問題はあるが検出感度に優れている PCR-RFLP 法で分析した K-ras と p53 変異の結果を組み合わせると、両者ともに変異陽性を示したのは 25 例中 9 例であり、いずれか一方のみ陽性であったものは 25 例中 23 例 (92%) にみられた。このように、特異的診断法、スクリーニング

法のいずれの目的に使用するにしても K-ras と p53 変異の両者を併用することは診断率の向上をもたらすものであり、脾液中 p53 遺伝子変異を分析することの意義の重要性が窺われる。

ここで、脾液中の遺伝子変異検索が有用であった脾癌 2 症例を提示する。

症例 1 : 症例は 83 歳、男性で、食欲不振にて来院した。血清アミラーゼとエラスターーゼ I は正常で、腫瘍マーカーは CEA 0.8 ng/dl, CA 19-9 < 6 U/ml と正常で、SCC のみ 51 ng/ml と上昇していた。US・CT に



ERCP

膵液細胞診 : class II

K-ras コドン 12 :
PCR-RFLP 法、HPA 法ともに陰性

p53 分析

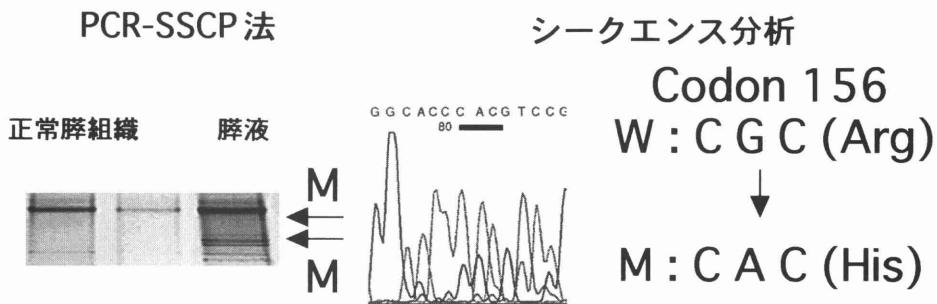


図 2 脇液中 *p53* 変異が有用であった膵癌症例

膵管造影では、膵頭部に尾側膵管の拡張を伴う主膵管狭窄と仮性囊胞がみられ、慢性膵炎との鑑別に難渋した。膵液中の細胞診と *K-ras* 変異は陰性であったが、*p53* 変異は検出された

て膵鉤部から体部にかけて径 4.5 cm 大の腫瘍が認められた。しかし、図 1 に示すように、ERP では、膵管像に明らかな異常は指摘されなかった。膵液細胞診は class II であったが、膵液中遺伝子分析を行うと *K-ras* コドン 12 に GGT → GAT の変異および *p53* エクソン 7 のコドン 248 に CGG → CCG (アルギニン→プロリン) への変異がともに認められた。本例は低分化型腺扁平上皮癌の組織像を呈した G-CSF 産生膵癌の症例で膵液中遺伝子分析が有用であった³⁵⁾。

症例 2 : 症例は 70 歳、男性で、上腹部痛を主訴に来院した。血液検査にて、血清アミラーゼとエラスターーゼ-1 は正常で、CA 19-9 87 U/ml, CEA 4.3 ng/dl と腫瘍マーカーの軽度上昇がみられた。US・CT にて、主膵管拡張と膵頭部の軽度腫大が認められた。ERP では、図 2 に示すように、膵頭部主膵管の狭窄と尾側膵管の拡張所見が認められた。狭窄部には仮性囊胞もみられ、腫瘍形成性膵炎との鑑別に困った症例であった。内視鏡下に採取した膵液細胞診は class II であり、

K-ras コドン 12 の変異は PCR-RFLP 法と HPA 法とともに陰性であった。一方、p53 変異はエクソン 5 のコドン 156 に CGC → CAC (アルギニン→ヒスチジン) への変異を認め、膵癌と診断した。手術にて膵癌と確認され、組織学的に低分化型腺癌であった。

Ishimaru ら³¹⁾は、ERCP で主膵管の狭窄部位のブラッシングにより得られた細胞に p53 蛋白の免疫染色を行い、膵癌 20 例中 18 例 (90%) に染色陽性であるが、慢性膵炎 8 例ではすべて陰性であるという成績を報告している。また、Iwao ら³²⁾は、同様な検討で、粘液産生膵腫瘍を呈し膵癌であった 9 例中 7 例 (78%) で p53 蛋白染色は陽性を示したのに対し、腺腫 6 例には p53 染色陽性例は認めなかつたとしている。その後、彼ら³³⁾は症例数を増やして検討し、膵癌 44 例中 パパニコロー染色による細胞診では 27 例 (61%) が陽性であったのに対し、p53 蛋白の免疫染色では 36 例 (82%) が陽性であるという成績を得ている。一方、慢性膵炎 30 例ではすべて p53 蛋白の染色は陰性であったと報告している。さらに、p53 蛋白の免疫染色陽性 14 例中 12 例 (86%) に p53 変異が分子生物学的解析により検出されたと報告している。

p53 蛋白染色法は従来の細胞診の判定が鏡検者の主観的判断に由来しているのに対し、免疫染色という客観的な方法を導入した点は利点ではあるが、細胞核が少しでも染色されれば陽性と判定することに問題がある。本法は、抗体が野生型蛋白と変異蛋白とを区別できない、非癌細胞にも散発的に染色されるものがあり、染色パターンから陽性、陰性の判定に客観性が保ちにくい、ナンセンス変異や欠失により蛋白が産生されない場合は検出できない、などの問題点も指摘される。また、ブラッシング法では、該当部位にブラシを挿入できる場合には細胞が多量に得られる利点があるが、膵管開口部から離れた部位になるほど該当部位までブラシの挿入が難しくなる。さらに、採取部位はほとんど主膵管領域に限られ、分枝由来の小膵癌などいわゆる膵野型膵癌ではブラッシングは不可能である。一方、膵液中の脱落細胞から DNA を抽出する方法では、理論的には膵管のいずれかの部位から脱落した癌細胞でも検討が可能である。ただし、得られた細胞のうち、癌細胞が少数であった場合には変異遺伝子が野生型遺伝子に希釈され、遺伝子異常が検出感度以下になるという欠点もある。いずれにしても、ブラッシング細胞診が容易な場合にはその利点を活用すべきであろう。また、p53 蛋白染色の有用な点も利用することは大切である。すなわち、ブラッシング細胞診か膵液の沈渣のスメアにまず p53 蛋白の免疫染色を行い、染色され

た細胞のみをマイクロダイセクション法により分離し、染色されない場合には沈渣から DNA を抽出して、p53 の変異を分子生物学的に分析すれば、その検出率ならびに精度はより向上するものと思われる。

参考文献

- 1) Almoguera C, Shibata D, Forrester K, et al. : Most human carcinomas of the exocrine pancreas contain mutant c-K-ras genes. *Cell* **53** : 549-554, 1988.
- 2) Grunewald K, Lyons J, Frohlich A, et al. : High frequency of Ki-ras codon 12 mutations in pancreatic adenocarcinomas. *Int J Cancer* **43** : 1037-1041, 1989.
- 3) Nagata Y, Abe M, Motoshima K, et al. : Frequent glycine-to-aspartic acid mutations at codon 12 of c-Ki-ras gene in human pancreatic cancer in Japanese. *Jpn J Cancer Res* **81** : 135-140, 1990.
- 4) Motojima K, Urano T, Nagata Y, et al. : Mutations in the Kirsten-ras oncogene are common but lack correlation with prognosis and tumor stage in human pancreatic carcinoma. *Am J Gastroenterol* **86** : 1784-1788, 1991.
- 5) Watanabe H, Sawabu N, Ohta H, et al. : Identification of K-ras oncogene mutations in the pure pancreatic juice of patients with ductal pancreatic cancers. *Jpn J Cancer Res* **84** : 961-965, 1993.
- 6) Tada M, Omata M, Kawai S, et al. : Detection of ras gene mutations in pancreatic juice and peripheral blood of patients with pancreatic adenocarcinoma. *Cancer Res* **53** : 2472-2474, 1993.
- 7) Miki H, Matsumoto S, Harada H, et al. : Detection of c-Ki-ras point mutation from pancreatic juice. *Int J Pancreatol* **14** : 145-148, 1993.
- 8) Kondo H, Sugano K, Fukayama N, et al. : Detection of point mutation on the K-ras oncogene at codon 12 in pure pancreatic juice for diagnosis of pancreatic carcinoma. *Cancer* **73** : 1589-1594, 1994.
- 9) Trumper LH, Burger B, von Bonin F, et al. : Diagnosis of pancreatic adenocarcinoma by polymerase chain reaction from pancreatic secretions. *Br J Cancer* **70** : 278-284, 1994.
- 10) Berthelemy P, Bouisson M, Escourrou J, et al. : Identification of K-ras mutations in pancreatic juice in the early diagnosis of pancreatic cancer. *Ann Intern Med* **123** : 188-191, 1995.
- 11) Uehara H, Nakaizumi A, Baba M, et al. : Diagnosis of pancreatic cancer by K-ras point mutation and cytology of pancreatic juice. *Am J Gastroenterol* **91** : 1616-1624, 1996.
- 12) Watanabe H, Sawabu N, Songur Y, et al. : Detection of K-ras point mutations at codon 12 in pure pancreatic juice for the diagnosis of pancreatic cancer by PCR-RFLP analysis. *Pancreas* **12** : 18-24,

- 1996.
- 13) Iguchi H, Sugano K, Fukayama N, et al. : Analysis of *Ki-ras* codon 12 mutations in the duodenal juice of patients with pancreatic cancer. *Gastroenterology* **110** : 221-226, 1996.
 - 14) Kondo H, Sugano K, Fukayama N, et al. : Detection of *K-ras* gene mutations at codon 12 in the pancreatic juice of patients with intraductal papillary mucinous tumors of the pancreas. *Cancer* **79** : 900-905, 1997.
 - 15) Watanabe H, Yamaguchi Y, Ha A, et al. : Quantitative determination of *K-ras* mutations in pancreatic juice for diagnosis of pancreatic cancer using hybridization protection assay. *Pancreas* **17** : 341-347, 1998.
 - 16) Yanagisawa A, Ohtake K, Ohhashi K, et al. : Frequent *c-Ki-ras* oncogene activation in mucous cell hyperplasias of pancreas suffering from chronic inflammation. *Cancer Res* **53** : 953-956, 1993.
 - 17) Greenblatt MS, Bennett WP, Hollstein M, et al. : Mutations in the *p53* tumor suppressor gene : Clues to cancer etiology and molecular pathogenesis. *Cancer Res* **54** : 4855-4878, 1994.
 - 18) Rozenblum E, Schutte M, Groggins M, et al. : Tumor suppressive pathways in pancreatic carcinoma. *Cancer Res* **57** : 1731-1734, 1997.
 - 19) Nigro JM, Baker SJ, Preisinger AC, et al. : Mutation in the *p53* gene occur in diverse human tumour types. *Nature* **342** : 705-708, 1989.
 - 20) Levine AJ, Momand J, Finlay CA, et al. : The *p53* tumor suppressor gene. *Nature* **351** : 453-456, 1991.
 - 21) Hollstein M, Sidransky D, Vogelstein B, et al. : *p53* mutations in human cancers. *Science* **253** : 49-53, 1991.
 - 22) Pinhasi-Kimhi O, Michalovitz D, Ben-Ze'ev A, et al. : Specific interaction between the *p53* cellular tumor antigen and major heat shock proteins. *Nature* **320** : 182-185, 1986.
 - 23) Hall P, Lane DP. : *p53* in tumor pathology : can we trust immunohistochemistry? *J Pathol* **172** : 1-4, 1994.
 - 24) Kaino M, Kondoh S, Okita K, et al. : *p53* mutations in two patients with intraductal papillary adenoma of the pancreas. *Jpn J Cancer Res* **87** : 1195-1198, 1996.
 - 25) Nakamori S, Yashima K, Murakami Y, et al. : Association of *p53* gene mutations with short sur-
 - vival pancreatic adenocarcinoma. *Jpn J Cancer Res* **86** : 174-181, 1995.
 - 26) Mao L, Hruban RH, Boyle JO, et al. : Detection of oncogene mutations in sputum precedes diagnosis of lung cancer. *Cancer Res* **54** : 1634-1637, 1994.
 - 27) Ahrendt SA, Chow JT, Xu LH, et al. : Molecular detection of tumor cells in bronchoalveolar lavage fluid from patients with early stage lung cancer. *J Natl Cancer Inst* **91** : 332-339, 1999.
 - 28) Sidransky D, von Eschenbach A, Tsai YC, et al. : Identification of *p53* gene mutations in bladder cancers and urine samples. *Science* **252** : 706-709, 1991.
 - 29) Xu X, Stower MJ, Reid IN, et al. : Molecular screening of multifocal transitional cell carcinoma of the bladder using *p53* mutations as biomarkers. *Clin Cancer Res* **2** : 1795-1800, 1996.
 - 30) Yamaguchi Y, Watanabe H, Songur Y, et al. : Detection of mutations of *p53* tumor suppressor gene in pancreatic juice and its application to diagnosis of patients with pancreatic cancer-comparing with *K-ras* mutation. *Clin Cancer Res* **5** : 1147-1153, 1999.
 - 31) Ishimaru S, Itoh M, Hanada K, et al. : Immunocytochemical detection of *p53* protein from pancreatic duct brushings in patients with pancreatic carcinoma. *Cancer* **77** : 2233-2239, 1996.
 - 32) Iwao T, Tsuchida A, Hanada K, et al. : Immunocytochemical detection of *p53* protein as an adjunct in cytologic diagnosis from pancreatic duct brushings in mucin-producing tumors of the pancreas. *Cancer* **81** : 163-171, 1997.
 - 33) Iwao T, Hanada K, Tsuchida A, et al. : The establishment of a preoperative diagnosis of pancreatic carcinoma using cell specimens from pancreatic duct brushing with special attention to *p53* mutations. *Cancer* **82** : 1487-1494, 1998.
 - 34) Watanabe H, Miyagi C, Yamaguchi Y, et al. : Detection of *K-ras* point mutations at codon 12 in pancreatic juice for the diagnosis of pancreatic cancer by hybridization protection assay : a simple method for the determination of the types of point mutations. *Jpn J Cancer Res* **87** : 466-474, 1996.
 - 35) Ohtsubo K, Mouri H, Sakai J, et al. : Pancreatic cancer associated with granulocyte-colony stimulating factor production confirmed by immunohistochemistry. *J Clin Gastroenterol* **27** : 357-360, 1998.

* * *