

Appendix VI

Vacutainer® tube または紫色の蓋の抗凝固剤 EDTA 入り Vacutainer® tube を施設で用意できない場合、GOG Tissue Bank のスタッフに連絡することで、これらの tube が準備できた時に担当者が貴施設に提供する。

E. 血清と血漿の検体採取のためのガイドラインと推奨事項

血清と血漿は採血から 4 時間以内には必ず凍結されなければならないが、理想としては、可能であれば採血から 2 時間以内に処理と凍結が行われるべきである。血清と血漿は採血から凍結までの時間が早いほど好ましい。採血後 1-2 時間で血清と血漿が処理されれば、最も高品質のものが得られる：一方、2-4 時間で処理された血清と血漿は品質が劣る。血清と血漿が採血後 4 時間を超えた後に処理された場合、測定にとっては最も低品質である。血清と血漿の処理時間を確認調査することは、測定する検体の品質と安定性を評価するために重要なことである。

原則的には、血清と血漿は超低温フリーザー(-70°C以下)や液体窒素(液体か気化状態)、あるいは多目のドライアイスに直接入れて凍結されなくてはならない。施設で超低温の凍結条件が利用できない場合、霜取り装置のない-20°Cフリーザーを用いても良い。ただし、このタイプのフリーザーを用いて血清と血漿を保管する場合は、その保管時間を最小限にとどめなければならない。なぜならこの温度は十分な凍結固体状態を得るには不十分な温度であるからだ(水性の液体は-56°C以下で凍結固体になる)。霜取り装置のないフリーザーは霜が出来るため、手作業で霜取りを行わなくてはならない。霜取り装置のない-20°Cのフリーザーで保存される血清と血漿は、凍結固体の状態に達してそれが維持されるようになるまで、十分なドライアイスで囲い、保存しなければならない。血清と血漿を霜取り装置付きの-20°Cフリーザーで保存すると、凍結サイクルのたびに繰り返し検体が損なわれる(これはフリーザーが解凍、再凍結を行うためである)。超低温の条件下で凍結された血清と血漿は最も高い品質を有し、あらゆるタイプの実験、測定に適している。霜取り装置のない-20°Cフリーザーで凍結された血清と血漿は品質が劣り、実験、測定項目に関してある程度制限が生じる。霜取り装置付き-20度フリーザーで凍結された血清と血漿は最も低品質で、研究目的としては非常に限られた使用となる。血清と血漿の処理時間を確認調査することは、測定する検体の品質と安定性を評価するのに重要なことである。

F. 血清の準備方法

1. 凍結チューブのラベリング：個々の患者用のスクリーキャップ付き凍結チューブに GOG プロトコル番号、GOG Bank ID、検体コード、採取日をラベルする。
*GOG-0218 では一人の患者あたり 1.8ml のスクリーキャップ付き凍結チューブ 10 本にラベルし、治療前の血清には SB01 という検体コードを用いる。
2. 採血：7-10ml の血液を赤色の蓋の無添加 Vacutainer® チューブに採血する。血清分離チューブは用いない。
3. 血液凝固させる：チューブを室温で 30 分間垂直にして凝固させる。

Appendix VI

* (次段階で) 血液を直ちに遠心分離することができない場合は、凝固した血液を4℃または十分な氷を入れたバケツ中で採血後3時間までを限度に保存する。30分の凝固段階の後の遠心分離は、早く行うほど好ましい。

4. 血液の遠心分離：フィブリン塊や血球細胞から血清（透明で麦わら色の液体）を分けるために血液を遠心分離する。

*至適な遠心条件は、3500xgまで、4℃、10分間である。最低条件では、1000xgまで、室温、15分間である。遠心速度が遅い場合は時間を長くすることで対応できる。冷却なしで15分以上遠心分離することは、機械で過剰な熱が発生し、血清の品質を損ねる可能性があるため避ける。

5. 血清の攪拌と分注：血液チューブ、15ml円錐チューブ、凍結チューブの蓋をはずす。血清を15ml円錐チューブへ移し、血清をゆっくりと攪拌する。次に、血清をあらかじめラベルされた可能な限り多数のスクリーキャップ付き凍結チューブに均一分注する。これらのチューブにしっかりと蓋をする。

*GOG-0218ではそれぞれの凍結チューブの血清量は、最少で0.25ml(cc)、最大で1.7ml(cc)となる。血清を多量をより少数のチューブに分離するより、少量をより多数のチューブに分離するほうが好ましい。

6. 血清の凍結：凍結チューブ中の血清を垂直に保ったまま速やかに凍結し、極力、第VI章-Eで述べた通りに適切な凍結/保管スペースを用いる。

7. SP Formの記入：第VII章で述べられている通りにGOG Specimen Form (SP Form)を記入する。GOG Tissue Bankに検体を発送する際には検体にSP Formのコピーを添え、貴施設のファイルにもコピーを保管しておかなくてはならない。

8. GOG Tissue Bankへの血清の発送：第VIII章で述べられている通りに、GOG Tissue Bankから供給されたSingle-Chamber Specimen Kitに凍結血清を十分な量のドライアイスとともに入れ、GOG Tissue Bankへ発送する。

*可能な限り、凍結血清チューブはこのプロトコル用にGOG Tissue Bankより供給された1つのSingle-Chamber Specimen KitにGOG-0218の同一患者の血漿凍結チューブと凍結腫瘍とも梱包すること。1つのSingle-Chamber Specimen Kitには、最大20本の凍結チューブと凍結腫瘍組織を梱包することができる。

G. 血漿の準備方法

1. 凍結チューブのラベリング：個々の患者用のスクリーキャップ付き凍結チューブにGOGプロトコル番号、GOG Bank ID、検体コード、採取日をラベルする。

*GOG-0218では1.8ml入りスクリーキャップの凍結チューブ10本にプロトコル番号(GOG-0218)、GOG Bank ID(##-##-G###)、検体コード(PB01)、採取日をラベルする。

2. 採血：7-10mlの血液を紫色の蓋（ラベンダー蓋）の抗凝固剤EDTA入りのVacutainer®チューブに真空状態が消失するまで採血する。

3. 血液凝固させる：ゆっくりと5-10回チューブの上下を返して血液と抗凝固剤を混ぜ合わせる。

Appendix VI

*次の（遠心分離の）段階で血液を直ちに処理することができない場合は、血液を冷蔵庫または十分な量の氷を入れたバケツ中で採血後 3 時間を限度に 4℃で保管する。抗凝固剤との混和後、血液の遠心分離を早く行うほど、より好ましい。

4. 血液の遠心分離：血球細胞から血漿（透明で麦わら色の液体）を分けるために血液を遠心分離する。

*至適な遠心条件は 3500xg まで、4C、10 分間である。適した機器が揃わない場合、遠心分離の最低条件は、1000xg まで、室温で 15 分間である。遠心速度が遅い場合は時間を長くすることで対応できる。冷却なしで 15 分以上遠心分離することは、機械で過剰な熱が発生し、血漿の品質を損ねる可能性があるため避ける。

5. 血清の攪拌と分注：血液チューブ、15ml 円錐チューブ、凍結チューブの蓋をはずす。血漿を 15ml 円錐チューブへ移し、ゆっくりと攪拌する。次に血漿をあらかじめラベルされた可能な限り多数のスクリーキャップ付き凍結チューブに均一分注する。これらのチューブにしっかりと蓋をする。

*GOG-0218 では、それぞれの凍結チューブの血漿量は最小で 0.25ml (cc)、最大で 1.7ml (cc) とする。血漿は多量をより少数のチューブに分離するより、少量をより多数のチューブに分離するほうが好ましい。

6. 血漿の凍結：凍結チューブ中の血漿を垂直に保ったまま速やかに凍結し、極力、第 V 章-E で述べた通りに適切な凍結/保管スペースを用いる。

7. SP Form の記入：第 VII 章で述べられている通りに GOG Specimen Form (SP Form) を記入する。GOG Tissue Bank に検体を発送する際には検体に SP Form のコピーを添え、貴施設のファイルにもコピーを保管しておかなくてはならない。

8. GOG Tissue Bank への血漿の発送：第 VIII 章で述べられている通りに、GOG Tissue Bank から供給された Single-Chamber Specimen Kit に凍結血漿を十分量のドライアイスとともに、GOG Tissue Bank へ送付する。

*可能な限り、凍結血漿チューブはこのプロトコル用に GOG Tissue Bank より供給された 1 つの Single-Chamber Specimen Kit に GOG-0218 の同一患者の血清凍結チューブと凍結腫瘍ともに梱包すること。1 つの Single-Chamber Specimen Kit には、最大 20 本の凍結チューブと凍結腫瘍組織を梱包することができる。

VII. GOG-0218 への SP Form の提出

A. GOG-0218 の各患者における SP Form の必要事項の概要

検体の提出状況がどの段階にあるかにかかわらず、プロトコルで必要とされた一検体あたりひとつの SP Form を記入し、SDC Electronic Data Entry System (SEDES) を用いて GOG Statistical and Data Center (SDC) へ電子的に提出されなくてはならない。SEDES を通して SP Forms for GOG-0218 へスクロールダウンすることで、SP Form の記入要領が入手できる。

B. CTSU 以外の施設が SP フォームを電子的に提出する方法

Appendix VI

SP Form は SEDES を用いて GOG SDC に電子的に提出されなければならない。SP Form は GOG Web Menu の Registration/Data Entry から入手することが可能である。記入済みフォームのコピーは、GOG Tissue Bank に発送されるそれぞれの検体に同封しなければならない（検体が採取されていない場合は、SP Form を GOG Tissue Bank へ郵送する必要はない）。SP Form を電子的に提出する際には、GOG Web Menu にログオンし、SEDES を使ってウェブ上で SP Form のデータを入力する。アクセスに関する質問や問題点については、the GOG Statistical and Data Center の User Support Department の電子メール support@gogstats.org または電話 716-845-7767 で直接指示を受けることができる。記入済みフォームを印刷し、貴施設の控えとして保管する。検体を GOG Tissue Bank へ送付する際にはその記入済みフォームのコピーを同封する。

C. CTSU 施設が SP Form を電子的に提出する方法

CTSU の the Logistical Guideline の Translational Research の項、GOG-0218 用 SP Form 記入要領を参照すること。

VIII. GOG-0218 への検体の発送

A. 全ての検体を以下のアドレスの GOG Tissue Bank に発送すること：

GOG Tissue Bank / Protocol GOG-0218
Children' s Hospital
700 Children' s DrIVe, WA1340
Columbus, OH 43205
Phone: (614) 722-2810
Fax: (614) 722-2897
E-mail: gogbank@pediatrics.ohio-state.edu

B. ホルマリン固定検体

原発巣または転移巣のホルマリン固定保存腫瘍検体(FT01)は、試験登録から8週以内にGOG Tissue Bank に発送しなくてはならない。アメリカ国内のGOG施設で登録された患者については必須、アメリカ国外のGOG施設で登録された患者については任意である。特に腫瘍ブロックや腫瘍組織の代わりの切片は、各施設で準備した容器に入れてGOG Tissue Bank に送らなくてはならない。切片を提出する場合には、laser capture microdissection や RNA 抽出、ゲノム解析に適した、清潔にオートクレーブされたスライドグラスにのせた 10 μ m の厚さの無染色切片 15 ケと、RNA 抽出とゲノム解析に適した小型遠心器用チューブや凍結バイアルに入れた 50 μ m の厚さのスクロールの

Appendix VI

腫瘍 1 ケを提出することに注意する。

C. 凍結された腫瘍、血漿、血清の検体

任意の検体の必要条件を満たすために、原発性または転移性の凍結腫瘍検体 (RT01)、凍結血清 (SB01)、凍結血漿 (PB01) は、試験登録から 8 週以内に GOG Tissue Bank に郵送されなくてはならない。特にひとりの GOG-0218 患者から得られた急速凍結または OTC 包埋凍結の腫瘍組織、凍結血清、凍結血漿は、GOG Tissue Bank から供給された Single-Chamber Specimen Kit に入れて GOG Tissue Bank へ郵送されなければならない。以下の方法で、ひとりの患者から得られた凍結腫瘍組織や凍結血清、凍結血漿をひとつの Single-Chamber Specimen Kit に梱包し、GOG Tissue Bank へ発送する。

凍結された組織、血清および／または血漿の検体の発送方法

1. Single-Chamber Specimen Kit にドライアイスをおよそ 3 分の 1 ほど入れる： GOG Tissue Bank から供給された蓋から蓋の発泡体を取り除き、容器のなかにドライアイスをおよそ 3 分の 1 になるまで積み重ねる。
2. ジップロック式バッグに凍結検体を入れる： 各患者から得られた凍結腫瘍、凍結血清の凍結チューブおよび／または凍結血漿の凍結チューブを個々のジップロック式バッグに入れる。バッグを密封する前に可能な限り空気を追い出す。
3. 検体を二番目の封筒と Tyvek 封筒に入れる： 凍結検体が入ったジップロック式バッグを吸湿剤の入ったビニール製のバイオハザードの二番目の封筒に入れる。その後、その二番目の封筒を Tyvek 封筒に入れる。どちらの封筒ともに密封する前に可能な限り空気を追い出す。
4. 検体とドライアイスをおよそ 3 分の 1 ほど入れる： 凍結検体が入った Tyvek 封筒を Single-Chamber Specimen Kit に入れた後、Kit の上端までドライアイスで満たす。
5. Single-Chamber Kit に SP Form を入れる： 凍結検体のための SP フォームを折りたたんで Single-Chamber Specimen Kit に入れる。
6. Single-Chamber Kit を密封する： Single-Chamber Kit の上に発泡スチロールのカバーを置き、フィラメントまたはそれ以外の耐久性のある密封テープでしっかりと Kit に封をする。
7. 航空貨物輸送状の記入と貼付： 予め印刷された Federal Express の航空貨物輸送状を完成させ、ビニール袋に入れ、kit の上に貼る。
8. 他のラベルの記入と貼付： ドライアイスのラベルを記入し、ドライアイスのラベル、バイオハザードラベル、UN3373 ラベル、規定のラベルを箱の側面に貼る。
9. Federal Express の集荷の手配： 貴施設の通常の方法、または、電話番号 1-800-238-5355 に電話をして、Federal Express の集荷を手配する。集荷を依頼する際、予め印刷された航空貨物輸送状の取引番号が (1290-2562-0) であること、集荷先が貴施設の住所であることを確認する。

Appendix VI

10. 検体を GOG Tissue Bank に発送する：凍結検体に、適切な SP Form を添付し、GOG Tissue Bank の Federal Express 取引番号 (1290-2562-0) を使用して Federal Express Priority の翌日配達で凍結検体を GOG Tissue Bank に発送する。検体は月曜から木曜発、火曜から金曜着で送る。

*可能な限り、検体が翌午前中に確実に凍結固体の状態に到着するように、凍結検体を入れた kit がドライアイスで満たされていることを GOG Tissue Bank に検体を発送する前に確認すること。

IX. GOG-0218 における検体の保管

GOG Tissue Bank のスタッフは GOG-0218 に提出された臨床検体について、その受け取り、保管、分配に関連する全ての行動について責任を負う。また GOG Tissue Bank のスタッフは、この Appendix の第 III 章に述べられた特別な材料を含む Single-Chamber Specimen Kits の準備と配送についても責任を負う。GOG の参加施設から GOG-0218 の検体を郵送するのにかかる費用は、GOG Tissue Bank Federal Express の口座に請求される。

GOG-0218 のための検体を含むいかなる郵送物も、GOG Tissue Bank のスタッフは受け取り次第ただちに、その種類、量、状態を評価する。その後、適切な GOG Specimen Form に必要事項を記入し、その検体をデータベースシステムに入力し、検体を適切な状態で保管する。また、GOG Tissue Bank のスタッフは、このプロトコルのためのいかなる臨床検体についても、受領から 3 営業日以内に各検体の SP Form の下段部分を完成させ、GOG Statistical and Data Center に電子的データを提出する。完成された各検体の SP Form のコピーは、GOG Tissue Bank のファイルに保管される。さらに GOG Tissue Bank は検体識別子の同定、情報、状態、質を一致させるために GOG Statistical and Data Center と必要に応じて連携する。

A. ホルマリン固定腫瘍検体

原発巣または転移巣のホルマリン固定腫瘍組織を“ブロック”または“Slides+Scroll” (laser capture microdissection や RNA 抽出、腫瘍細胞特異的ゲノム解析に適した、清潔にオートクレーブされたスライドガラスにのせた 10 μ m の厚さの無染色切片 15 ケと、RNA 抽出やゲノム解析に適したオートクレーブされた小型遠心器用チューブや滅菌凍結チューブに入れた 50 μ m の厚さのスクロール組織 1 ケ)として提出する。GOG Tissue Bank のスタッフは、それぞれのブロック、スライド、スクロールの入ったチューブ/バイアルに GOG プロトコル番号(GOG-0218)、GOG Bank ID、適切な検体コード(FT01)、採取日が添付されていることと、腫瘍の分類 (SP Form の Item22 において腫瘍が原発巣であるか転移巣であるかを明記されているか)を確認する必要がある。

何種類かの固定腫瘍を入手した場合、連番で、腫瘍検体が原発巣の組織には FT01、転移巣の組織には FT02 を確実にラベルする。FT02 の検体を入手した場合は、この患者の GOG-0218 の FT02 用

Appendix VI

SP Form を確実に SEDES にロードするために GOG Statistical and Data Center に連絡をする。

1. ブロック：原発巣または転移巣の腫瘍をパラフィンブロックとして受領した場合、それぞれのブロックは真空遮光下で保管される。

- a. 無染色切片

研究室試験へ分配される前に、標準的な免疫組織化学的分析に適したスライドの上に $5\mu\text{m}$ の厚さの無染色切片 15 ケ、laser capture microdissection や RNA 抽出、ゲノム解析に適した、清潔にオートクレーブされたスライド上に $10\mu\text{m}$ の厚さの無染色切片 15 ケ、RNA 抽出とゲノム解析に適した、オートクレーブされた凍結チューブに入れた $50\mu\text{m}$ の厚さのスクロール組織 1 ケが準備される。個々のスライドとスクロール組織の入った凍結チューブには上記に示すような識別子がラベルされる。その後、スライドはワックスに浸した状態で配送され、真空遮光下で保存される。

- b. 組織マイクロアレイ (TMA)

適切なブロックから採取された試料は、GOG-0218 の臨床的予後を示すマーカーの研究のために TMA を作成する目的で用いられる。この研究では二通りの予後マーカーの TMA を作成する予定である。ひとつは奏効 (complete response; CR または partial response; PR)、安定 (stable disease; SD)、あるいは進行 (increasing disease) の患者別に採取された腫瘍の試料を含むものである。もうひとつは短期生存、中期生存、長期生存の患者別に採取された腫瘍の試料を含むものである。このプロトコルのために提出されたパラフィンブロックとそれらの症例について観察された臨床的予後によって、特殊な TMA が作成されることもある。理想的には、それぞれの TMA は 200 の症例と 50 のコントロールからなる計 250 の試料を含むことが望ましい。同一のパラフィンブロックから採取された 3~4 つの試料は、従来の組織切片での染色の反映が必要であるため、両方の臨床的予後の TMA を作成するには、4 つの試料が 2 組必要となる。それぞれの組には 200 の症例と 50 のコントロールが必要である。ひとつの組はスクリーニングや予備分析に使用され、もう一方はその検証のために使われる。コントロールは、分子構造のわかっている 15 のヒト細胞系、20 の婦人科組織 (正常組織および癌組織)、15 の非婦人科組織 (正常組織および癌組織) を含んでいる。それぞれの TMA に同一のコントロールを取り入れることで、ある基準を満たした場合に、研究者は個々のアレイの性質を評価でき、個々のアレイから推論を引き出すことができる。Bank はランダムに試料をブロック内に位置づけるが、これは実際上の理由により完全にランダムにはなりえない。それぞれの試料は可能な限り幅 1mm 深さ 2mm の大きさで採取する。病巣範囲が限られている場合、 $0.8\text{mm} \times 2\text{mm}$ サイズの試料を採取する。ブロックから切片を作れば作るほど、切片の作成中における試料の損失は多くなり、統計的に試料の損失は 15% と予測される。GOG の病理学者は TMA に用いるために最も質の高いケースを特定し、TMA 用に試料を抽出するためにブロック内の的確な部分を選択し、腫瘍細胞質と同様に試料の完全性や欠損を光学顕微鏡で検査して、作成された TMA の質を評価する。P27 に記載されている固定状態や酸化に影響されやすいマーカーや androgen receptor の免疫組織学的染色は、試料に最適な組織を特定するために用いられる。各々の TMA 切片は組織の抗原性を保

Appendix VI

持するために、研究室試験に分配される前にワックスにつけられ、密封され、真空遮光下で保存される。

2. 無染色切片：原発巣または転移巣の腫瘍を無染色切片として受領した場合、そのスライドはワックスにつけられ、真空遮光下で保管される。

B. 凍結腫瘍検体

原発巣あるいは転移巣の腫瘍凍結組織は、急速冷凍または OCT 包埋凍結として提出される。GOG Tissue Bank のスタッフは、腫瘍検体（実際にはジップロック式バッグや OCT 用鋳型）に GOG プロトコル番号(GOG-0218)、GOG Bank ID、適切な検体コード(RT01)、採取日がラベルされていることを確認する必要がある。また、腫瘍の分類について、SP Form の Item22 において、腫瘍が原発巣であるか転移巣であるかを明記されていなくてはならない。検体はドライアイスと直接接触した状態で凍結固体のかたちで Bank に届けられなければならない。Bank では凍結検体は超低温冷凍庫（-70℃以下）または液体窒素タンクのなかで保存される。何種類かの凍結腫瘍を入手した場合、腫瘍検体が原発巣の組織には RT01、転移巣の組織には RT02 を確実にラベルする。RT02 の検体入手した場合は、この患者の GOG-0218 の RT02 用 SP フォームを確実に SEDES にロードするために GOG Statistical and Data Center に連絡をする。

C. 治療前の血清

Bank では凍結血清は超低温冷凍庫（-70℃以下）または液体窒素タンクのなかで保存される必要がある。Bank のスタッフは、血清検体に GOG プロトコル番号(GOG-0218)、GOG Bank ID、適切な検体コード(SB01)、採取日がラベルされていることを確認する。SP Form の Item 11 において処理にかかった時間は“4 時間未満”、Item 12 において保存状態の種類は“超低温フリーザ/液体窒素/ドライアイス”、Item 16 において血液採取の種類は“赤い蓋”とされるべきであり、血清はドライアイスと直接接触した状態で凍結固体のかたちで Bank に届けられなければならない。

D. 治療前の血漿

Bank では凍結血漿は超低温冷凍庫（-70℃以下）または液体窒素タンクのなかで保存される必要がある。Bank のスタッフは、血清検体に GOG プロトコル番号(GOG-0218)、GOG Bank ID、適切な検体コード(PB01)、採取日がラベルされていることを確認する。SP フォームの Item 11 において処理にかかった時間は“4 時間未満”、Item 12 において保存状態の種類は“超低温フリーザ/液体窒素/ドライアイス”、Item 16 において血液採取の種類は“EDTA”とされるべきであり、血漿はドライアイスと直接接触した状態で凍結固体のかたちで Bank に届けられなければならない。

X. GOG-0218 における研究室試験のための検体配布

GOG0218_Protocol_Japanese_ver.1.0_20070827

Appendix VI

GOG Statistical and Data Center と GOG Tissue Bank は、研究室試験のために承認された研究者に選択された患者から採取された検体一式の分配を調整するために協力する。検体は患者の適格性、評価基準、統計的考察、関連した臨床情報のみならず検体の調達や状態に関する情報に基づいて選択される。

GOG Tissue Bank のスタッフは研究者と GOG Statistical and Data Center に発送ごとに電子ファイルを E-mail する必要がある。電子ファイルには、郵送された検体の量や状態のみならず、検体の識別情報が添付された郵送物に含まれているすべての検体の一覧表が含まれる。GOG Statistical and Data Center は研究者に電子ファイルを E-mail する。電子ファイルには、検体の状態、試験への適合性、試験の要素に関わる適格性/評価可能性、実験室データに関連した検体識別情報が含まれる。

A. ホルマリン固定腫瘍組織

適切な場合、GOG Tissue Bank のスタッフは、選択された GOG-0218 患者から得られた通常の腫瘍ブロックから作成された指定数の無染色切片と次のプロジェクトのための特定の TMA の郵送について、責任を負う。

1. 血管新生マーカー (CD-31 および VEGF) の免疫組織化学的発現を究明するために、通常のスライド上の無染色切片と 4 つ 1 組の TMA 切片を下記の住所の Dr. Robert Burger に郵送する。この検体上で評価・分析される他の血管新生マーカーの厳密な選定は、この領域で導き出されたデータを基に再評価される予定である。

Laboratory of Robert A. Burger, M. D.
DIVision of GYN Oncology
UnIVersity of California Irvine Medical Center
Chao Family ComprehensIVe Cancer Center
Room 107
101 The City DrIVe
Orange, California 92868
Phone: 714-456-6570
E-mail: raburger@uci.edu

2. 選定された遺伝子の発現プロフィールを究明するためのゲノム解析を行うために、無菌スライドガラス上の無染色切片とチューブ/バイアルに入れられた 50 μ m の厚さのスクロール組織を下記の住所の Dr. Michael Birrer に郵送する。

Laboratory of Michael Birrer, M. D., Ph. D.
National Cancer Institute

Appendix VI

Key West Research Center
9610 Medical Center Drive
Building C
Rockville, MD 20850
Phone: 301-402-3128
E-mail: birrerm@bprb.nci.nih.gov

B. 凍結腫瘍組織

適切な場合、GOG Tissue Bank のスタッフは、ゲノム解析を行うために選択された GOG-0218 患者から得られた特定量の凍結腫瘍組織を上記の Dr. Michael Birrer の住所に郵送することについて、責任を負う。

C. 治療前血清と血漿

適切な場合、GOG Tissue Bank のスタッフは、VEGF の循環レベルを酵素結合免疫吸着試験で定量化するために選択された GOG-0218 患者から得られた一定分量の治療前血清と血漿を上記の Dr. Michael Birrer の住所に発送する責任を負う。この検体上で評価・分析される他の血管新生マーカーの厳密な選定は、この領域で導き出されたデータを基に再評価される予定である。

GOG-0218 の検体を用いて免疫学的検定やゲノム解析を行う治験担当医師は、いかなる個人的な識別情報にもアクセスできない。治験担当医師は GOG-0218 に参加している患者から採取された検体で行われた研究室試験の直接監督および管理について、責任を負う。

各研究室の個々人は、GOG-0218 の検体で行われたすべての研究室試験の正確な記録が保存され、研究室試験の結果が確実に適切な検体識別情報へリンクしており、関連した研究室データが確実に GOG Statistical and Data Center に転送されることについて、責任を負う。study chair はその研究結果の分析、報告および発表に際し、study co-chair、協力科学者および GOG Statistical and Data Center と調整する。

このプロトコルのトランスレーショナルリサーチの項目完了後に、GOG-0218 のいかなる患者から得られたいかなる検体についてもまだ利用可能な場合には、次の条件が満たされた場合、GOG Tissue Bank Specimen Distribution Policies に基づいて、検体および GOG-0218 の TMA は GOG Tissue Bank に預けられ、承認を得た癌や癌以外の研究のために必要に応じて引き続き使用する。すなわち、各 GOG-0218 患者から癌や癌以外の研究のための検体使用について予め承諾を得ていなくてはならない。これらの回答(選択)は、患者自身がそのプロトコルについてのインフォームドコンセント文書にサインして記録される。また、治療を行っている GOG 施設のスタッフが GOG Web site で利用可能な Specimen Consent Application を使用して患者の選択をオンラインで入力した際に電子的に文書化される。治療を行っている GOG 施設

Appendix VI

のスタッフは、患者が選択を変えた場合、その患者の検体の将来的な利用に関する患者の選択を修正するのにもこのアプリケーションを使用できる。このアプリケーションによって GOG Statistical and Data Center と GOG Tissue Bank で情報を共有することができ、このアプリケーションで管理、報告、確認および証明ができるといった特徴がある。患者が未来の癌や癌以外の研究の目的で検体の使用を承諾しない場合、このプロトコルのトランスレーショナルリサーチ要素の完了後に、患者希望通り、GOG Tissue Bank はいかなる余剰の検体も破棄するように指示される(焼却処分する)。患者のパラフィンブロックが TMA の 1 つを作成するために使用されている場合、問題となる試料は TMA から削除され、破棄される(焼却処分される)。

Appendix VII

Appendix VII

GOG-0218 における研究の手順

章	目次	ページ
I.	GOG-0218 における研究室試験の早見表	-
II.	GOG-0218 における免疫組織化学的分析	-
III.	GOG-0218 におけるゲノム解析	-
IV.	GOG-0218 における酵素免疫測定法	-

I. GOG-0218 における研究室試験の早見表

分析	検体	成果	試験研究室
免疫組織化学的分析 (IHC)	ホルマリン固定パラフィン包埋保存腫瘍組織 (FT01)	CD-31 と 血管内皮増殖因子 (VEGF) の発現	Dr. Robert Burger ¹ の Laboratory
ゲノム解析	ホルマリン固定パラフィン包埋保存腫瘍組織 (FT01) と凍結腫瘍 (RT01)	選択遺伝子の RNA 発現	Dr. Michael Birrer ² の Laboratory
酵素免疫測定法 (ELISA)	治療前の血清 (SB01) と血漿 (PB01)	VEGF の循環レベル	Dr. Robert Burger ¹ の Laboratory

¹ Laboratory of Robert A. Burger, M.D.
 DIVision of GYN Oncology
 UnIVersity of California Irvine Medical Center
 Chao Family ComprehensIVe Cancer Center
 Room 107
 101 The City DrIVe
 Orange, California 92868
 Phone: 714-456-6570
 E-mail: raburger@uci.edu

² Laboratory of Michael Birrer, M.D.,
 Ph. D.
 National Cancer Institute
 Key West Research Center
 9610 Medical Center DrIVe
 Building C
 Rockville, MD 20850
 Phone: 301-402-3128
 E-mail: birrerm@bprb.nci.nih.gov

腫瘍や血清あるいは血漿の検体を用いて評価される他の腫瘍マーカーや検査項目、実施される解析についての厳密な選択は、この領域で得られたデータを基に再評価される予定である。

II. GOG-218 における免疫組織化学的分析

Appendix VII

免疫組織化学分析は、GOG-0218に参加する患者の原発巣もしくは転移巣のホルマリン固定腫瘍組織の従来の組織切片もしくは組織マイクロアレイ (TMA) における CD-31 や VEGF などの angiogenic marker の発現を検査するために University of California Irvine Medical Center の Dr. Robert Burger の研究室にて行われる予定である。治療前の腫瘍検体を用いて評価/実施される他の angiogenic marker/分析についての厳密な選択は、この領域で得られたデータを基に決定される予定である。

A. 免疫組織化学的分析の手順

厚さ約 5 μ m の無染色の連続切片を脱パラフィンし、3%過酸化水素水溶液に 10 分浸漬後、水道水、蒸留水の順で洗浄する。免疫組織化学的分析は、下の表に示す市販の一次抗体と、自動染色装置 (Ventana, Tucson AZ; BioGenex, San Ramon, CA) と高感度アビジン-ビオチン検知キット (BioGenex) を用いて行う。CD-31 と VEGF のプロナーゼ消化は antigen retrieval method に含まれている。非特異結合物質をヤギ血清室温 10 分でブロックする。検体を適量の一次抗体溶液に室温で 30-60 分浸漬、リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) で 5 分間ずつ 3 回洗浄し、ビオチン標識抗マウス抗体で室温で約 30 分反応させる。PBS で 5 回洗浄後、西洋わさびペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジンを室温で 30 分反応させ、PBS で洗浄後、3,3'-diaminobenzidine を室温で 5 分間反応させる。検体を PBS で洗浄後、ヘマトキシリン溶液で 1 分間対比染色させ、水道水で約 10 分間洗浄し、アルコールにて脱水後、キシレンで透徹し、Permount を用いて封入する。Titration は全ての抗体試薬で、最小限での background staining と任意の抗原の発見を確実にするためにやっている。全ての免疫組織化学染色での background staining の Negative 抗体コントロールは、一次抗体の抗マウス IgG 抗体として活用する。

Biomaker	一次抗体の種類	Source	Clone #
CD-31	anti-CD-31 mouse antibody	Dako	JC/70A
VEGF	anti-VEGF mouse antibody	Dako	SN6h

B. 検体および分析の control:

VEGF の免疫組織化学染色の positive control は、高レベルの VEGF を発現するホルマリン固定パラフィン包埋 MCF7-WT ヒト乳癌細胞株と、低レベルの VEGF を発現するドキシソルビシン耐性誘導体 MCF7-40F である。VEGF 免疫組織化学的分析の negative control では、VEGF を発現しないホルマリン固定パラフィン包埋浸潤乳癌細胞株を用いる。適切な CD-31 の染色を確実にするために、平均血管数による血管新生の control は、各々の検体のスライドを平行な断面として作成する。浸潤乳癌の検体で、毛細血管が高度に染色している部分を positive control とし、同じ腫瘍内で染まってない部分をこのマーカーの negative control とする。CD31 の発現は内皮細胞で評価する。VEGF は分泌性蛋白であるが、この研究では腫瘍内と内皮細胞内の免疫組織染色での VEGF の発現の評価に焦点をあてる。

Appendix VII

C. データ収集と評価手順:

1. 半定量的方法

各々の免疫組織化学的分析の終了後、レビュアーは、検体の内容と同様に病理組織学的・臨床的データを隠された状態で、光化学顕微鏡にて独立してそれぞれのスライドを診断する。個々のスライドは、内皮細胞および/あるいは腫瘍細胞内、または各々の細胞内の CD-31 と VEGF の染色の程度と割合を数値化する。可能であれば、最低 1000 個の細胞で CD-31 と VEGF の染色に関して各々評価する。それぞれの Biomarker の結果は染色陽性の割合で評価し (0-100%)、染色の程度は+1 から+5 にて評価し、0~500 までの免疫組織化学的スコアの総計もしくは亜分類化を行う。

2. 計量的手法

CAS 200 system (Becton Dickinson, San Jose, CA) を用いた画像解析 (IA) は、CD-31 もしくは VEGF 陽性細胞の染色の程度を定量化するために行われる。細胞と核抗原の定量化プロトコルを利用する。技術者は、臨床データと細胞株の詳細を隠された状態で IA を行う。CAS 200 IA system から得られた全ての値は、測定された画素情報の変換から派生させる。CD-31 もしくは VEGF の IA に関して、器機の開始時には、細胞膜、細胞質、核間が最も識別できる positive、negative スライドを用いてセットする。抗体は、同程度の関連性のないモノクローナル抗体にて 0 画素に読み取るようにセットする。各々の検体で、陽性の領域の中の少なくとも 10 視野を解析する。値は陽性の領域と染色の程度の結果を CAS 200 software を用いて光学密度 (O.D.) 単位として変換する。抗原の保存状態は、ほとんどの場合 positive control のスライドとビメンチン染色 (希釈 1:200, Dako, Carpinteria, CA) にて評価される。これらの研究において、IHC score、IA の結果、ヒト乳癌細胞中の分子数として表現された標的タンパクの量は、密接に関連していた ($r > 0.9$)。

D. データ転送:

Dr. Burger は、それぞれのスライドの CD-31 や VEGF の免疫組織化学分析の結果の電子サマリーを、検体の識別情報 (GOG プロトコル番号、Bank ID、検体コード、採取日) とともに GOG Statistical Data Center に転送する責任がある。各々のスライドの Biomarker のレベルと検体の追跡情報は、臨床データと合わせ、GOG Statistical Data Center において study chair と scientific collaborator らの協力のもとに適正な統計解析が行われる。study chair と科学協力者らは、この研究結果の報告と論文を準備するために GOG Statistical Data Center と連携する。

III. GOG-0218 におけるゲノム解析

GOG0218_Protocol_Japanese_ver.1.0_20070827

Appendix VII

A. RNA 抽出

1. ホルマリン固定パラフィン包埋組織

Microdissection 法によるパラフィン包埋切片からの、もしくは厚さ 50 μm の腫瘍からの total RNA の分離には Affymetrix expression array analysis を用いる。ホルマリン固定パラフィン包埋組織 (FFPE) からの RNA 抽出では、Bioanalyzer System (Agilent) を用いてのサンプルの定量化と品質検証は禁止する。18S と 28S のリボソーム RNA の持続的に分解することにおける器機の未熟性のためである。しかし、これは必然的にサンプルの質の低下を意味する。FFPE 検体の RNA の状態を効果的に評価するために、二つの異なったプライマーを用いて GADPH と action の発現を評価する real-time PCR を行う。最初の 3' プライマーセットは、転写の 3' 末端の前の 200 塩基の中に存在しており、二番目の 5' プライマーセットは Poly-A tail の上流のおよそ 400 塩基に配置される。二本鎖 cDNA は FFPE 検体から抽出された total RNA を用いて合成され、保管された組織の cDNA の合成には Paradise Reagent System が用いられる (Arcturus)。この方法によって、5ng の total RNA (細胞数およそ 5000 個) から real-time の分析と in vitro transcription に十分な量の cDNA の作成が可能である。

正常な cDNA 検体は、以下に記す方法で転写、hybridization、染色、解析を行う。簡潔には、T7 promoter にリンクした poly-A primer にて FFPE 検体から作成した 100ng の二本鎖 cDNA を、MEGAscript T7 High Yield Transcription Kit (Ambion) を用いて最初の増幅を行う。一回洗浄後、増幅された RNA は、二本鎖 cDNA を作成するために GeneChip IVT Labeling Kit (Affymetrix) を用いて 2 回目の増幅が行われる。増幅の間、biotinylated ribonucleotides は、GeneChip Hybridization Oven 640 (Affymetrix) にて 45°C 16 時間 hybridization 後にアレイのプロープの検出と定量化のために増幅された RNA に結合する。プロープを視覚化するために、アレイは streptavidin phycoerythrin (Molecular Probes) によって染色され、biotinylated antistreptavidin 抗体 (Vector Laboratories) によって incubate され、Fluidics Station 400 (Affymetrix) で streptavidin phycoerythrin によって再度染色される。染色されたマイクロアレイは、GeneChip Scanner 3000 (Affymetrix) にてスキャンされ、結果画像は全般的な質について GeneChip Operating Software (GCOS) version 1.0 (Affymetrix) にて解析、評価される。この方法論は、過去に FFPE の乳癌検体の解析で行われ、高性能な Human X3P GeneChip Arrays (Affymetrix) が用いられた。GeneChip Arrays を複製するために hybridize されたサンプルは、強度相関度 $R=0.983$ の結果であった。

2. 凍結組織

全て原発巣もしくは転移巣の凍結組織は、提出された施設または Dr. Birrer の研究室で OCT に包埋され、-80°C で保存される。凍結切片は、低温保持装置のなかで -20°C 下に厚さ 5 μm に

Appendix VII

切断し、非粘着性の Superfrost Microscope Slides (Fisher Scientific, Pittsburgh, PA) に固定する。組織標本を -80°C から -20°C へ頻回に移動することによる RNA の変性を予防するため、十分な数(10)の切片を一度の凍結切片作業時に切断・固定する。研究を通じて、RNase-free technique を実践する。HistoGene LCM Frozen Section Staining Kit (Arcturus Bioscience, Inc., Mountain View, CA)を用いて、プラスチック容器で一回最大 4 枚まで凍結切片をフード内で染色する。二次的なコンタミネーションを避けるために、プラスチック容器内の溶液は毎回交換する。染色と脱水の手順は、スライドを 70%エタノール、蒸留水、100 μl の HistoGene Staining Solution、水、70% エタノール、95% エタノール、100%エタノールに 30 秒浸漬後、キシレンにて 5 分間 incubate する。空気乾燥されたスライドは、microdissection の準備が出来るまで新しい乾燥剤の入った乾燥器にて保管し、microdissection は AutoPix Laser Capture Microdissection (LCM) System (Arcturus)を使って 2 時間以内に行う。大規模 LCM を迅速に処理するために、完全自動化された AutoPix が使用される。新しいシステムは、PixCell II System (Arcturus)と比較して、より正確な microdissection とより良い画質を保証している。代用として、凍結切片(7 μm)を FRAME Slides (Leica, Germany)に貼り、70%アルコールに 30 秒固定後、1% methylgreen で染色し、水で洗浄後空気乾燥させる。その後、MD LMD laser microdissecting microscope (Leica, Germany)を用いて microdissection を行う。

Microdissection の前の検体の pathology review によって、高い割合の壊死や間質組織や浸潤癌のない切片などが確実に除外される。浸潤癌細胞の部分を顕微鏡で特定、標的とした後、レーザー光波動が CapSure LCM Macro Cap (Arcturus)上のフィルムを活性化させる。約 3000 個の腫瘍細胞が AutoPix LCM もしくは MD LMD 装置によってそれぞれ得られる。LCM caps 上もしくはレーザー切離によって取り込まれた腫瘍細胞は 50 μl 抽出緩衝液に直ちに溶解され、Pico Pure RNA Isolation Kit (Arcturus)により製造者のプロトコルに従って RNA が抽出純化される。RNase-Free DNase Set (Qiagen, Valencia, CA)による DNase treatment step も行われる。各々の卵巣癌の検体の microdissection と平行して、間質や悪性上皮を含んだ凍結組織はスライドから剥がされ、品質管理目的で処理される。

マイクロアレイ解析の前に、RNA 6000 Pico LabChip on the Agilent 2100 Bioanalyzer Automated Analysis System (Agilent)を用いて、製造元の推奨により、精製した total RNA の質と濃度の評価が行われる。一サンプルあたり 200 pg/ μl の少量の RNA を含んだ 10 個の卵巣腫瘍サンプルと、それに加えて control RNA、an RNA ladder (RNA 6000) (Ambion, Austin, TX)がチップごとに詰め込まれる。凍結組織から得た尖った 18s と 28s の ribosomal peak が高品質の RNA が得られたことを示唆する。total RNA での RNase の変性は、RNA の分布が小さいフラグメントへ偏位したり ribosomal peak の蛍光シグナルが減少することによって、容易に発見できる。変性した RNA を含んだサンプルは、その先の解析で除外される。また、Bioanalyzer は RNA を定量化し、確実に 2 サイクルの cDNA 合成開始時に RNA を 10 ng 以上にする。

Appendix VII

B. Affymetrix GeneChip Hybridization

ゲノム解析は、パラフィン包埋切片から RNA を効果的に抽出する X3P GeneChip array や凍結標本から RNA を効果的に抽出する Human U133 Plus 2.0 array を含む何種類かの遺伝子発現マイクロアレイチップを用いて行われる。また、このプロトコルのためにカスタムデザインされた Affymetrix GeneChip array が NCI と Affymetrix の共同で作られる。

原形を保持した分離は、Affymetrix による *in vitro* amplification procedure によって、cDNA と調和した線形増幅 2 サイクルを伴う。1st-strand DNA は、1 反応あたり 2 μ l の 5X 1st strand reaction mix 含有の 10 μ l 反応液、1 μ l の 0.1M DTT、0.5 μ l RNase 阻害剤、0.5 μ l 10mM dNTP、1 μ l の SuperScript II 逆転写酵素を含んだ Two-Cycle cDNA Synthesis Kit (Affymetrix, Santa Clara, CA) 試薬を用いて、25ng の totalRNA と 2 μ l の 5 μ M T7 オリゴ dT プライマーから合成される。これらの反応が一貫して incubate されていることを確実にするため、すべての incubate の段階で Perkin Elmer Gene Amp PCR System 9600 thermal cycler (Perkin Elmer Life Science, Boston, MA) を使用する。1st-strand DNA 合成は以下のプログラムで行われる。70°C、6 分間 (RNA とプライマーの incubation) \rightarrow 4°C で反応液の混合 \rightarrow 42°C、1 時間 (1st-strand DNA 合成) \rightarrow 70°C、10 分間 (酵素不活化)。1st-strand DNA 合成後直ちに、4.8 μ l の RNase-free 水、4 μ l の 17.5mM MgCl₂、0.4 μ l の 10mM dNTP、0.2 μ l の RNase H、0.6 μ l の E. coli DNA Polymerase I を各々の反応液に加えて 16°C、2 時間 incubate し、つづいて第 1 サイクル、2 本鎖 cDNA を生じさせるために 75°C、10 分間の incubate を行う。T7 オリゴ (dT) プライマーと結合した非精製 2 本鎖 cDNA は、1 反応あたり全量 50 μ l に、5 μ l の 10X reaction buffer、5 μ l ATP 溶液、5 μ l CTP 溶液、5 μ l UTP 溶液、5 μ l GTP 溶液、5 μ l 酵素混合液を含んだ Ambion's MEGAscript T7 High Yield Transcription Kit (Ambion) を用いて、37°C、16 時間で第 1 ラウンド目の転写 (*in vitro* transcription: IVT) が行われる。第 1 サイクルの cRNA 生成物は、非結合ヌクレオシドを除去するために、GeneChip Sample Cleanup Module IVT column (Affymetrix) に通される。その溶出液は、2 μ l の 0.2 μ g/ μ l random hexamer プライマーと混和して 70°C、10 分間 incubate し、つづいて 42°C、1 時間の incubate に先立って、4 μ l の 5X 1st-strand reaction mix、2 μ l の 0.1M DTT、1 μ l の 10mM dNTP、1 μ l の Superscript II 逆転写酵素を添加後に 42°C、1 時間の incubate をする。1st-strand 合成の第 2 サイクルを完全にするため、1 μ l の RNase H を各々の反応液に添加し、37°C、20 分間 incubate する。2nd-strand 合成は、すぐに 4 μ l の 5 μ M T7 オリゴ (dT) プライマーの添加と 70°C、6 分間の incubate にすすみ、つづいて 88 μ l の RNase-free 水と 30 μ l の 5X 2nd-strand buffer、3 μ l 10mM dNTP、4 μ l の E. coli DNA polymerase I の存在下で 16°C、2 時間の incubation を行う。第 2 サイクルでは、2 本鎖 cDNA は GeneChip Sample Cleanup Module cDNA column (Affymetrix) で精製され、その溶出液には、4 μ l 10X IVT labeling buffer、12 μ l IVT labeling NTP mix、4 μ l の T7 IVT labeling enzyme mix を試薬とした GeneChip IVT Labeling Kit (Affymetrix) を含んだ 40 μ l の IVT 反応液が添加される。このラベリングの手順は、伸長反応の間、マイクロアレイの target 遺伝子の同定と定量を促進させるため、ビオチン化リボヌクレオシドを結合させる。最終

Appendix VII

的には第2サイクルのビオチン標識 cRNA は、GeneChip Sample Cleanup Module IVT column にて分離され、Beckman Coulter DU-65 UV spectrometer (Beckman Coulter, Fullerton, CA) で260nmの吸光度を用いて定量される。260nm/280nmの吸光度はまた、サンプルの純度の決定にも用いられる (吸光度 1.8~2.1 が許容範囲)。

最適な分析感度を得るために、15 μ g の増幅産物は6 μ l の 5X fragmentation buffer (Affymetrix) を含んだ 30 μ l の反応液中で、94°C、35 分間の熱とイオン加水分解により分解される。5 μ l の 3nM control oligonucleotide B2、15 μ l の 20X eukaryotic hybridization controls (bioB、bioC、bioD、cre)、3 μ l の 10mg/mL BSA、150 μ l の 2X Hybridization Buffer、30 μ l の DMSO、67 μ l の RNase-free 水を含んだ hybridization cocktail は各々の target に添加され、99°C、5 分間 incubate し、つづいて次の 45°C、5 分間の incubate を行う。Target hybridization cocktail は、GeneChip Hybridization Oven 640 (Affymetrix) により、47000 を上回る transcript や variant、38500 を上回る実証済みのヒトゲノムを含んだ Human U133 Plus 2.0 oligonucleotide array (Affymetrix) のような適切な GeneChip で 45°C、16 時間で hybridize される。プローブを視覚化するために、製造元の推奨により、アレイは Fluidics Station 400 (Affymetrix) によって連続した染色サイクルを施される。要するにこのプロセスは、300 μ l の 2X Stain Buffer、24 μ l の 50mg/ml BSA、6 μ l の 1mg/ml SAPE、270 μ l の DI water を含んだ streptavidin phycoerythrin (Molecular Probes, Eugene OR) (SAPE) 溶液から始まり、ついで 300 μ l の 2X Stain Buffer、24 μ l の 50mg/ml BSA、10mg/ml goat IgG stock、3.6 μ l の 0.5mg/ml ビオチン標識抗体、266.4 μ l の DI water からなるビオチン標識抗 streptavidin 抗体 (Vector Laboratories, Burlingame CA) 溶液による染色が行われる。2回目定分量の SAPE 溶液の使用で染色過程が完了する。

その後、染色されたマイクロアレイは、GeneChip Scanner 3000 (Affymetrix) でスキャンされ、その画像結果は GeneChip Operating Software (GCOS) version 1.0 (Affymetrix) で全体的な質についてレビューする。測定の際、特に注意する点は、1) 平均 background 値が 75 未満、2) スキャナー操作による電氣的ノイズが原因のピクセル間の変動が、すべてのアレイで類似している、3) B2 hybridization control oligo は、各アレイにおける輝度の交互パターンがはっきりと立証されている、4) 細菌学的 oligo hybridization control の bioB、bioC、bioD、cre の spike は信号強度の上昇によって反応する、5) 内部制御遺伝子である GAPDH とアクチンが、各アレイにおいて 3' /5' ratio が 3 未満のときに反応する、6) 遺伝子の存在する割合がすべての解析サンプルで類似している、である。

C. RNA 増幅と定量的ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR)

RNA の線形増幅は、製造元のプロトコルで解説されている通り、NuGEN Ovation Nanosample RNA Amplification System (NuGEN Technologies, Inc., San Carlos, CA) を用いて行われる。増幅された 1 本鎖 DNA は spectrometer で定量化される。mRNA の絶対量は、2 つの非標識遺伝子特異的 PCR プライマーと、FAM™標識遺伝子特異的 TaqMan® MGB プローブと Applied Biosystems ABI PRISM® 7300

Appendix VII

Sequence Detection Systems によって測定される。ノーマライゼーションは、house-keeping sequence cyclophilin を複合させて行われる。

D. データ転送:

Dr. Birrer は、GOG-0218 のホルマリン固定と凍結の腫瘍検体を用いて行われたゲノム解析から得られたすべてのデータの電子コピーを、該当する検体の識別情報(GOG プロトコル番号、Bank ID、検体コード、採取日)とともに GOG Statistical Data Center に転送する責任がある。検体の識別情報に該当するゲノム情報は、臨床データと合致させ、GOG Statistical and Data Center とこのプロトコルの study chair、共同研究者らによって適正な統計解析が行われる。study chair と共同研究者らは、この研究の報告と論文を準備するために GOG Statistical and Data Center と連携する。

IV. GOG-0218 における酵素免疫測定法 (ELISA)

A. 血管新生マーカー:

酵素免疫測定法 (ELISA) は、GOG-0218 に参加する患者の治療前の血清と血漿中の VEGF の定量化のために、UnIVersity of California Irvine Medical Center の Dr. Robert Burger の研究室にて行われる。治療前の血清と血漿を用いて評価される他の血管新生マーカーや実施される解析についての厳密な選択は、この領域で導き出されたデータを基に決定される予定である。

1. VEGF ELISA:

市販の ELISA キットを用いて GOG-218 参加患者の血清、血漿の VEGF を定量する。

Biomarker	ELISA キット (R&D Systems, Inc.)	カタログコード
VEGF	Quantikine Human VEGF Immunoassay	DVE00

簡単に説明すると、R&D Systems, Inc. (Minneapolis, MN) で市販しているマイクロタイター用プレートは VEGF 特異的モノクローナル抗体が塗布済みのものとなる。standard、control、検体はウェル内で incubate され、これらのサンプル中に含まれる VEGF の多くはその固定化抗体と結合する。個々のサンプルは複数希釈された複製で評価し、分析直前に溶解する。標準曲線は組み換え型ヒト VEGF の適正な希釈を使用して作成される。control、standard は各々の ELISA プレートに含まれている。非結合抗体は洗浄され、VEGF 特異的酵素抗体はウェル内で incubate される。非結合抗体洗浄後、色素試薬または基質と増幅溶液をウェルに加える。ついで停止溶液は着色過程を終了させるために添加する。

Appendix VII

2. データの取得と評価手順:

発光輝度は最初の段階で結合した VEGF の量に直接的に比例し、automatic microplate reader により 450nm で計測される。個々のサンプルは 4 回検討され、分析直前に溶解させる。標準曲線は 6 ケのコントロール蛋白(組み換え型ヒトアンギオジェニンまたは VEGF)の 2 倍希釈液を使用したそれぞれの分析結果から作成される。各々の standard、control、サンプルを、4 回測定して平均化し、それぞれから平均 background control が差し引かれる。各サンプル中の VEGF 濃度は各々の標準曲線にて補正される。さらに血清と血漿検体のサブセットについて、異なった量で測定を繰り返すことにより、分析法の信頼性を明確にできる。また、濃度がわかっている精製組み換え蛋白を、分析結果の直線性と再現性を確認するために、いくつかの血清と血漿の検体に加える。すなわちこれらの異なる測定により、このプロトコルで得られた血清と血漿の検体の使用において、分析内と分析間での精度、感度、特異度の裏づけができる。

3. データ転送:

Dr. Burger もしくはその代理人が、ELISA を施行した各々の検体と control を検討するために、VEGF の補正された ELISA の結果を適切な検体の識別情報 (GOG プロトコル番号、Bank ID、検体コード、採取日) とともに GOG Statistical and Data Center へ転送する。対応する検体の追跡情報を伴った Biomarker レベルのデータは、GOG Ingres relational database にダウンロードされ、各々のケースの臨床データと結合する。適正な統計解析が GOG Statistical and Data Center にて行われる。study chair はこの研究の報告と論文を準備するために GOG Statistical and Data Center と連携する。