

厚生労働科学研究費補助金（医療技術実用化総合研究事業）
分担研究報告書

ラジオ波焼灼療法の適応症例選択に関する研究
～サブタイプからみたRFAの適応を考える～

研究分担者 増田 慎三
国立病院機構大阪医療センター 外科 医員

研究要旨

ラジオ波熱凝固療法の適正な適応は、術前エコーおよびMRI検査で、周囲乳管内進展を疑う所見のない限局型に限定しかつER/HERのサブタイプ別に局所制御と全身治療のバランスを考慮して行う必要があることが示唆された。

A. 研究目的

大阪医療センターでのRFAに関する準備状況であるが、第1段階の「RFA→切除」による効果判定試験が、被験者の利益が全くないこと、逆に焼灼による遠隔再発リスクの増加が懸念されるとの意見から負の利益が予想され、IRBの承認を得ることができなかった。次に現在班全体で実施されている「RFA→非切除」試験は、IRB申請を行い、説明文書の改訂などの上、承認され、次に、倫理委員会の承認を得るために現在詰めの調整中である。大阪医療センターでの本治療の取り組みには理解が得られているが、常に慎重にという立場での対応ではないかと予想される。

そのため、我々はその準備期間中に、早期乳癌へのラジオ波焼灼療法の適正実施に向けて、その適応となる症例選択基準を明らかにする解析を行ってきた。現行診療システムの中で、手術に代わり得る「ラジオ波焼灼療法」の位置づけを検討し、今後のスムーズな前向き臨床試験への参加を促す。

B. 研究方法

2007年1月から2008年11月に国立病院機構大

阪医療センターで乳癌初期根治手術を行った症例をレビューし、術前画像診断（エコー/MRI）所見と術後病理所見の一致度を癌の広がり診断の観点から検討する。昨年度検討をベースに今回は、サブタイプと局所制御、予後との関係に注目した。

（倫理面への配慮）

術前画像診断と病理結果による後ろ向き調査のため、データのプライバシー保護に遵守することで倫理面への配慮を担保する。

C. 研究結果

2007年1月から2008年11月の乳癌初期根治手術実施例は385例。まず本手技の適格基準である（エコー径で）2cm以下の腫瘍（T1）を満たす症例は120例（31%）であった。（注意：第2次試験の非切除の取り組みは1cm以下であるが、従前との比較のために2cm以下を研究の適応とした。）

MMGで広範な区域性石灰化、多発性、乳頭直下、乳頭や皮膚に近接しその部分の皮膚合併切除が望ましい症例、乳頭異常分泌を有する症例、他院生検後などの不適格例18例を除き、

まず第1候補としてピックアップされた症例は102例で、乳癌全体の26.5%に相当した。

当院でラジオ波焼灼療法を実施するにあたり、重要なコンセプトは、手術と同等の局所成績を得るためには、①周囲に広がるDCIS成分もきちんとコントロールすべき②浸潤癌だけは(最低)きちんとコントロールすべき、つまり、DCIS成分は、放射線療法や全身療法(内分泌療法)で浸潤癌の発生を予防できればOKとする③ER(-)例は周囲のDCIS成分もきちんとコントロールすべきだが、ER(+)例では、浸潤癌だけは(最低)きちんとコントロールすべきの大きく3つの可能性がありうるが、原則①と考える。その観点で術前画像診断(広がり診断として汎用するMRI)との関係を検討した。

エコーで単発、2cm以下の広がり(2cmを超えて低エコー域の広がりを認め、乳管内進展を疑うものを除外)した102例中、91例でMRI実施されていたが、その中で、単発で、かつ病変の広がり(浸潤部+DCIS成分)が2cm以下であり、ラジオ波焼灼療法の適応と考えられたのが72例、一方、MRIで2cm以上の病變の広がりを示唆された症例は19例存在した。

91例の温存手術施行の病理標本切り出し図で浸潤癌+周囲非浸潤癌の範囲が2cm以下の症例を「ラジオ波適応あり」、2cmを超えて、非浸潤部などの広がりを有する場合を「適応なし」と判断すると、MRIで適応が示唆された72例中、19例(26%)で「適応なし」と判定された。

そこでこれらのRFA適応型53例と不適の19例について、その予測要因をER, HER2, Histological grade, ly, 組織型から検証した(表1)。

DCISや乳頭腺管癌は他の組織型よりも注意が要することが確認されたが、Ly因子やHistological gradeに有意な傾向はみられなかった。

表1：針生検から得られる情報から適正化を検討した結果

		病理結果からラジオ波可能	ラジオ波不適	p
		53 (74%)	19 (26%)	
ER	+ / -	33 / 20	13 / 6	0.8407
HER2	+ / -	9 / 44	6 / 13	0.3101
HG	3 / 1 or 2	14 / 39	4 / 15	0.8773
Ly	+ / -	7 / 46	4 / 15	0.6571
組織型	Pap-tub, DCIS / others	15 / 38	13 / 6	0.0051

またERとHER2に関しては、そのタイプ別の個別化治療も要求される時代になっているので、4つのタイプに分けて検討してみた(表2)。

表2：ER/HER2サブタイプ別に適正化を検討した結果

ER / HER2	病理結果からラジオ波可能	ラジオ波不適	RFA可能な割合
	53 (74%)	19 (26%)	
(+) / (-)	31	8	80%
(+) / (+)	2	5	40%
(-) / (+)	7	1	88%
(-) / (-)	13	5	72%

ER(+)HER2(+)のいわゆるdouble positiveタイプが他のタイプと比べて、有意にRFAの適応が狭いことが分かった(p=0.0167)。

D. 考察

画像診断で予想した範囲と実際の病巣の広がりとの乖離(RFAの適応 vs 不適)に関してはSubtypeに関わらず20%程度はありうることは、乳癌の生物学的特性として避けることのできない広がりや多発性を有することと関連する。そのタイプは局所制御の面からも避けることが望ましく、Pap-tub/DCISタイプは注意を要する(p=0.0051)こと、またER(+)HER2(+)のdouble positiveも注意したい(p=0.0167)ことが本研究から推測された。

RFAの適応がsmall noduleであることを考え

ると、その20%をcontrolするために、systemicなover treatmentを課すことは避けたいところで、その意味ではHER2(+)やTriple Negative症例ではsystemic therapyの適応がある場合に限定するか適切な乳房照射(Boost追加)が必要だろう。その際に、RTで十分な局所コントロールが可能かどうかは、別研究によるRTなし症例の長期経過症例の検討が必要になる。

近年、局所制御が予後に及ぼす影響が、従前の4:1 ratio (5yの局所再発を減らせば、15yの乳がん死を1人減らせる)から、生物学的特性から分類されて、basal typeは1:1, luminal Aは2:1, luminal Bは1.5:1ともいわれるように、局所コントロールも重要とされている。その意味では、RFAは、Biologyを考慮した集学的な治療体系を理解した上に成立する局所の治療法であると考ええる。

E. 結論

RFAの症例選択は、個々のBiologyをも考慮して、集学的治療の中で丁寧に構築しないといけない局所療法の一つである。前向き臨床試験による症例蓄積と長期の経過観察が欠かせない。

F. 研究発表 (本研究関連分)

1. 論文発表

1. Onishi H, Masuda N, et al. Computed radiography-based mammography with 50- μ m pixel size: intra-individual comparison with film-screen mammography for diagnosis of breast cancers. *Academic radiology*, 16(7): 836-841, 2009.
2. 増田 慎三, 他. 乳癌の術後補助療法決定のストラテジー. *外科治療*, 106(6), 674-680, 2009.
3. 増田 慎三, 他. 乳頭異常分泌症例に対する ICG 蛍光法を用いた乳管腺葉部分切除. *外科*, 71(9): 922-928, 2009.
4. 多根井 智紀, 増田 慎三, 他. 乳頭分泌液中 CEA におけるイムノクロマトグラフィ (ICGA)法と酵素免疫測定(EIA)法の

比較検討. *乳癌の臨床*, 23(2): 123-128, 2008.

5. 増田 慎三. Current Organ topics-乳癌-乳がん治療における最近の進歩-個別化治療への挑戦. *癌と化学療法*, 34(12): 2228-2235, 2007.
 6. 増田 慎三. 乳がん治療の現状と展望-個別化治療をめざして-. *総合臨床*, 56(11): 3103-3105, 2007.
- #### 2. 学会発表
1. 増田 絃子, 増田 慎三, 他: 術前化学療法からみた triple negative 乳癌における Biomaker の検討. 第 34 回乳癌懇話会, 福岡, 2009.
 2. Masuda H, Masuda N, et al: Predictive factors for effectiveness of neoadjuvant chemotherapy in triple negative breast cancers. IMPAKT Breast Cancer Conference, Belgium, 2009.
 3. Masuda N, et al. Randomized phase II study of neoadjuvant chemotherapy and trastuzumab for operable breast cancer with overexpression of HER2. 2009 ASCO Annual Meeting, USA, 2009.
 4. Masuda N, et al. Coparison of Molecular characterization of ER+early-stage cancer by standardized quantitative RT-PCR analysis between Japanese and North American populations. ASCO Breast, USA, 2009.
 5. Kinoshita T, Masuda N, et al. A phase I/ II study of radiofrequency ablation as local therapy for early breast carcinomas: A multicenter study in Japan, ASCO Breast, USA, 2009.

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

厚生労働科学研究費補助金（医療技術実用化総合研究事業）
分担研究報告書

早期乳癌へのラジオ波焼灼療法の安全性および有効性の評価

研究分担者 津田 均
国立がんセンター中央病院 臨床検査部 分子病理診断室 医長

研究要旨

早期乳癌に対するラジオ波焼灼療法（RFA）の病理学的効果判定基準を確立する目的で、ヘマトキシリンエオジン（HE）染色による組織変性所見と、組織化学的な nicotinamide adenine dinucleotide (NADH)-diaphorase 染色とを比較対照し、組織学的に有意な所見を抽出した。組織学的には細胞・核の線条化とクロマチン凝集、細胞質の融解と細胞境界の不明瞭化、膠原線維構造消失と好酸性変性、が重要な所見であり、熱変性を受けた領域の最外層に血管拡張やうっ血像を認めた。基準の普及のための手順書作成、非切除プロトコール開始の際の針生検での評価の妥当性の検討が今後の課題である。

A. 研究目的

早期乳癌へのラジオ波焼灼療法（RFA）の効果判定基準として現時点で決まったものはないが、今後RFAの普及が見込まれ、病理学的治療効果判定はRFA後の治療計画に不可欠となると考えられる。今回、RFAが施行され、直後に外科切除された腫瘍と周囲乳腺において、HE染色標本での組織学的変化と、凍結切片を用いたNADH diaphorase活性の比較対照をレトロスペクティブに行い、RFA後の癌細胞における病理学的治療効果判定のための有意な所見を確定することを目的とした。

B. 研究方法

平成18～19年に術中にRFAが施行され直後に乳房切除ないし乳房部分切除が行われた15名の原発性乳癌患者を対象にした。切除直後に腫瘍の最大断面のマクロ所見を観察した。また、最大断面の組織を切り出し、組織をOCT compoundに埋め込んでクライオスタットを用いて凍結切片を作製した。凍結切片のHE染色標本作製と共に、NADH-diaphorase染色に供した。後者の染色は、切片を0.8 mg/mL nitro blue

tetrazolium、0.5 mg/mL 還元型NADH (以上 Sigma)、0.05M Tris-HCl buffer (pH 7.4)中で37℃1時間反応させ、NADH-diaphoraseを発色させた。30分室温でホルマリン固定し、2分間水洗の後NADH diaphorase活性を組織切片上で検討し、染色性を示すviableな細胞の割合を焼灼後の癌組織と対照の背景乳腺との間で比較した。

切除後のホルマリン固定標本においては、HEレベルでのRFA効果を判定した。効果を反映する病理学的所見は昨年度の検討で、上皮細胞の熱凝固変性像として、1. 細胞構造の融解、不明瞭化、2. 核クロマチン粗造化・濃縮、3. 細胞・核の線条化、などが挙げられ、また間質の変化として1. 線維構造消失、好酸性変性などの膠原線維の変化と2. 線維芽細胞の熱変性像が挙げられた。これらの基準を適用し2名の病理医で15症例の病理学的治療効果評価を行った。

（倫理面への配慮）

研究計画は施設内倫理委員会の承認を受けて行った。患者に対しては研究内容を口頭と文書

によって十分に説明したのち文書による同意を取得した。

C. 研究結果

1. マクロ所見

焼灼領域は中心部の針穴を中心に、周囲よりより固く脆い灰白色～淡黄色調の平坦な部分を形成していた。焼灼部の辺縁部にはリング状の赤色領域が14例で明瞭に認められた。

2. HE 染色標本でのミクロ所見

切除後のホルマリン固定標本において HE レベルでの腫瘍と周囲非腫瘍組織を含む RFA 変性領域は、上皮・間質細胞の細胞構造の融解・不明瞭化、核クロマチン粗造化・濃縮(pyknosis)、細胞・核の線条化、が全例にみられた。また間質膠原線維における線維構造消失、好酸性変性も全例で認められた。これらの変化は焼灼領域の中心部では強く、辺縁ではより弱い傾向を示し、最外層はマクロで見られたリング状領域にほぼ一致した。リング状領域は血管拡張とうっ血、一部出血を示した。

3. NADH-diaphorase 染色と HE 所見の対比

NADH-diaphorase染色は陽性と陰性の境界が比較的明瞭に同定出来、陰性領域はほぼ赤色のリング状領域の内部と一致した。

D. 考察

今回の手術例の検討にて HE 標本による RFA の組織学的効果判定は可能であることが確認された。その基準として、1. 上皮・間質細胞の細胞構造の融解・不明瞭化、2. 上皮・間質細胞の核クロマチン粗造化・濃縮(pyknosis)、3. 細胞・核の線条化、4. 間質膠原線維における線維構造消失、好酸性変性、5. 最外層での血管拡張、うっ血もしくは出血、が挙げられた。RFA による治療効果の病理所見を詳細に記載した文献は非常にすくない。2004年に Fornage らが記載した

所見が最も詳しく、腫瘍細胞の細胞質、核、周囲のリング様領域形成について述べているが、間質膠原線維の変性については今回新たに見出された項目である。

今後の課題として、RFA の普及を見越した病理診断 (NADH-diaphorase 染色を含む) の手順書の作成、観察者間の再現性の検討、今回の病理学的効果判定基準が非切除例の生検標本にも適用できるかどうかの検討、NADH-diaphorase 染色を並行して行う必要性の検討、などが挙げられる。

E. 結論

HE による RFA の病理学的効果判定基準作成のための重要な病理所見を確定した。HE レベルで効果判定は十分可能であるが、普及までにはいくつかの課題の克服が必要と考える。

研究協力者：関邦彦部長 (JR東京総合病院)

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Watanabe T, Tsuda H, et al. Oral uracil-tegafur compared with classical cyclophosphamide, methotrexate, fluorouracil as postoperative chemotherapy in patients with node-negative, high-risk breast cancer: National Surgical Adjuvant Study for Breast Cancer 01 trial. J Clin Oncol. 27(9): 1368-1374, 2009.
2. Sasaki Y, Tsuda H, et al. Histological differences between invasive ductal carcinoma with a large central acellular zone and matrix-producing carcinoma of the breast. Pathol Int. 59(6): 390-394, 2009.
3. Ishihara A, Tsuda H, et al. Morphological characteristics of basal-like subtype of breast carcinoma with special reference to cytopathological features. Breast Cancer, 16(3): 179-185, 2009.
4. Tsuchiya S, Tsuda H, et al. A new reporting form for breast cytology. Breast Cancer, 16(3): 202-206, 2009.
5. Toi M, Tsuda H, et al. Phase II study of

- preoperative sequential FEC and docetaxel predicts of pathological response and disease free survival. *Breast Cancer Res Treat.* 110(3): 531-539, 2008.
6. Kurosumi M, Tsuda H, et al. Histopathological assessment of anastrozole and tamoxifen as preoperative (neoadjuvant) treatment in postmenopausal Japanese women with hormone receptor-positive breast cancer in the PROACT trial. *J Cancer Res Clin Oncol*, 134(6):715-722, 2008.
7. Tsuda H. Individualization of breast cancer based on histopathological features and molecular alterations. *Breast Cancer*, 15: 121-132, 2008.
8. Umemura S, Tsuda H, et al. What causes discrepancies in HER2 testing for breast cancer? : A Japanese ring study in conjunction with the global standard. *Am J Clin Pathol*, 130(6): 883-891, 2008.
9. Toi M, Tsuda H, et al. Predictive implications of nucleoside metabolizing enzymes in premenopausal women with node-positive primary breast cancer who were randomly assigned to receive tamoxifen alone or tamoxifen plus tegafur-uracil as adjuvant therapy. *Int J Oncol*, 31(4): 899-906, 2007.

2. 学会発表

1. 津田 均. ラジオ波熱凝固療法の現状と今後. 第 17 回日本乳癌学会総会、東京、2009 年 7 月 3 日～4 日. 抄録集 p59.
2. 津田 均. ワークショップ 3「癌化学療法及び放射線療法の病理診断医の役割」. 乳癌診療における病理診断の役割. 第 47 回日本癌治療学会学術集会、横浜、2009 年 10 月 22 日～24 日. *日本癌治療学会誌*, 44(2): 315, 2009.
3. Ono M., Tsuda H, et al. Tumor-infiltrating lymphocytes (TIL) and tumor cell apoptosis are predictive markers for response to neoadjuvant chemotherapy in triple-negative breast cancer. The 45th Annual Meeting of American Society of Clinical Oncology, Orlando, May 29-June 2, 2009. *J. Clin. Oncol.* 27(Suppl): 15s, 2009 (Abstr 559)

G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

早期乳癌へのラジオ波焼灼療法の安全性および有効性の評価に関する研究

研究分担者 和田 徳昭

国立がんセンター東病院 乳腺科 医長

研究要旨

ラジオ波熱焼灼療法(RFA)は電極針を病変部位に穿刺し、ラジオ波により発生するジュール熱により病変を凝固壊死させる治療法である。低侵襲で外科切除に匹敵する根治的効果が期待され、整容的にもすぐれた結果が望める。今回 2cm 以下の早期乳癌に対する RFA 手技の確立と安全性の評価を目的とし、RFA 後乳房切除をする臨床試験をおこなった。現在まで腫瘍径 10-17mm の 3 症例に施行し、病理学的な判定では腫瘍部全体に核の濃縮、膨化などの熱変を確認し焼灼効果を認めた。皮膚熱傷、大胸筋熱傷などの合併症は認められず、device の取扱いも容易・簡便であり安全に施行可能であった。更なる症例集積が必要であるが、RFA は腫瘍径が小さな乳癌に対して安全で有効な治療法として実行可能である。

A. 研究目的

ラジオ波熱焼灼療法(RFA)は細径の電極針を病変部位に穿刺し、ラジオ波により発生するジュール熱により病変を凝固壊死させる治療法である。経皮的にまた短時間で施行可能であり、画像誘導下で正確に施行する事により、低侵襲で外科切除に匹敵する根治的効果が期待され、整容的にもすぐれた結果が望める。当院では2005年から多針展開針Le Venを用いたRFA後乳房部分切除をする臨床試験を施行していた。その結果、H&E染色による完全焼灼率は87% (26/30)、nicotina mide adenine dinucleotide(NADH)染色による評価でviable tumor cellsを認めない率は92% (24/26)と良好であった。合併症も皮膚熱傷、大胸筋熱傷などがみられたがいずれも重篤なものではなく回復した。今年度から高度医療として腫瘍径1cm以下を対象とした単針内部冷却式電極Cool-tipを用いたRFA後非切除試験が開始される。当院としては使用経験のないdeviceであるCool-tipを用いるため、まずRFA後切除を施行し経験を積む必要があったこと、適応拡大をめざし対象となる腫瘍径

を2cm以下の早期乳癌に対するRFA手技の確立と安全性の評価を目的とした臨床試験をおこなった。Primary endpointとして有害事象の発現頻度と程度、Secondary endpointとしてRFAのプロトコール完了の頻度とした。

B. 研究方法

対象は、組織学的に確認された乳癌で、病変が1個で超音波エコーにて長径が2cm 以下、広範な乳管内進展がない症例である。治療の方法は、超音波エコーガイド下に電極針を穿刺し、ラジオ波の通電を開始する。インピーダンスの上昇と出力の低下から、凝固が完成されたと判断された時点でRFAを終了する。通電終了後、患部温度が60℃以上になっていることを確認する。温度が60度以上になっていない場合は通電を再開する。通常、通電時間は12分から20分で終了する。ラジオ波熱焼灼後、乳房切除を行う。手術はラジオ波熱焼灼の結果に係わらず事前に打ち合わせた乳房部分切除又は全切除術を予定通り実施する。切除した病変部位の組織を免疫染色によって腫瘍壊死判定する。

C. 研究結果

倫理委員会の承認後、現在まで3症例にRFA後切除を施行した。

症例1) 58歳女性。左腫瘍径12mm、術前針生検では非浸潤性乳管癌。初期インピーダンス168Ω、ラジオ波焼灼時間6分、最終温度86℃。

症例2) 57歳女性。左腫瘍径10mm、術前針生検では浸潤性乳管癌。初期インピーダンス145Ω、ラジオ波焼灼時間8分、最終温度94℃。

症例3) 65歳女性。右腫瘍径17mm、術前針生検では浸潤性乳管癌。初期インピーダンス235Ω、ラジオ波焼灼時間8分、最終温度99℃。

これら3症例ともRFA後乳房部分切除術を施行、H&Eでの病理組織学的検査ではRFA焼灼範囲の判定では腫瘍部全体に核の濃縮、膨化などの熱変性を確認し焼灼効果が認められた。外科的な標本の切除断端は陰性であった。またいずれの症例も、皮膚熱傷、大胸筋熱傷などの合併症は認められず、deviceの取扱いも容易・簡便であり安全に施行可能であった。

D. 考察

本試験において、今回3症例ともすぐれたRFAによる治療効果が病理学的に確認できた。腫瘍径は10-17mmであったが、H&E染色で既に腫瘍部の熱変性が全体に及んでいることが判明したが、今後NADH染色を追加し viable cellがなく細胞変性がおきていることを確認したい。乳癌のRFA治療が外科的切除に代わる方法として普及するため、十分な安全性の確保が必要であり現在1cm以下の症例に対してRFA後非切除試験を開始している。しかし適応となる症例は極めて少ない。RFA後非切除の適応拡大のために、RFA後切除し病理学的に確認する基礎的検討は今後とも必要であり、2cm以下を対象とした試験を継続し症例を集積したい。

E. 結論

症例は少ないが、腫瘍径が小さな乳癌に対してRFAは安全で有効な治療法として実行可能である。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Imoto S, Wada N, et al. Feasibility study on radiofrequency ablation followed by partial mastectomy for stage I breast cancer patients. *The Breast*, 18(2): 130-134, 2009.
2. 藤井 博史, 和田 徳昭, 他. 核医学検査、臨床の最前線” SPECT の臨床 センチネルリンパ節. *Rad Fan*, 7(12): 35-38, 2009.
3. 藤井 博史, 和田 徳昭, 他. 乳癌の診断と治療 update 乳腺のリンパ系の解剖と画像診断. *臨床放射線*, 51(11): 1435-1445, 2009.
4. 清水 薫, 和田 徳昭, 他. 図説放射線診断・治療シリーズ 非触知乳がん診断の進め方. *国立医療学会誌 医療*, 63(6): 392-398, 2009.
5. Hasebe T, Wada N, et al. Histopathologic factors significantly associated with initial organ-specific metastasis by invasive ductal carcinoma of the breast: a prospective study. *Hum Pathol*, 39(5): 681-693, 2008.
6. Tanaka K, Wada N, et al. Invasive apocrine carcinoma of the breast: clinicopathologic features of 57 patients. *Breast J*, 14(2): 164-168, 2008.
7. Hasebe T, Wada N, et al. Grading system for lymph vessel tumor emboli for prediction of the outcome of invasive ductal carcinoma of the breast. *Hum Pathol*, 39(3): 427-436, 2008.
8. Wada N, Imoto S. Clinical evidence of breast cancer micrometastasis in the era of sentinel node biopsy. *Int J Clin Oncol*, 13(1): 24-32, 2008.
9. Wada N, Sakemura N, et al. Sentinel node biopsy in primary breast cancer: Radioactive detection and metastatic disease. *Eur J Surg Oncol*, 33(6): 691-695, 2007.
10. Yamauchi C, Wada N, et al. Accurate assessment of lymph vessel tumor emboli in invasive ductal carcinoma of the breast according to tumor areas, and their prognostic significance. *Hum Pathol*, 38(2): 247-259, 2007.

11. Inagaki M, Wada N, et al. Smaller regional volumes of brain gray and white matter demonstrated in breast cancer survivors exposed to adjuvant chemotherapy. *Cancer*, 109(1): 146-156, 2007.
12. 田中 仁寛, 和田 徳昭, 他. 術前化学療法後のセンチネルリンパ節生検にて術中迅速病理診断が偽陰性となった浸潤性小葉癌の1例. *乳癌の臨床*, 22: 409-412, 2007.

2. 学会発表

1. 嶋田 俊之, 和田 徳昭, 他. 肥満乳癌患者におけるセンチネルリンパ節同定率についての検討. 第109回日本外科学会総会, 一般演題, 2009. 4, 福岡.
2. 和田 徳昭, 他. 乳房温存術後の整容性評価と患者満足度. 第17回日本乳癌学会学術総会, ワークショップ, 2009. 7, 東京.
3. 嶋田 俊之, 和田 徳昭, 他. 併用法におけるラジオアイソトープ (RI) 10% rule の有用性. 第17回日本乳癌学会総会, 一般演題, 2009. 7, 東京.
4. 和田 徳昭, 他. SLN 陽性乳癌における non-SLN 転移を予測する因子 術前術中に判定可能な Scoring System. 第47回日本癌治療学会総会, 一般演題, 2009. 10, 横浜.
5. 嶋田 俊之, 和田 徳昭, 他. 純型粘液癌の臨床病理学的特徴. 第47回日本癌治療学会総会, 一般演題, 2009.10, 横浜.
6. 和田 徳昭. 現在の乳癌手術 温存手術の整容性評価と低侵襲治療に向けて. 静岡県形成外科医会, 特別講演, 2009.9, 静岡.
7. 和田 徳昭, 他. 乳癌センチネルリンパ節微小転移の治療戦略. 第11回 Sentinel Node Navigation Surgery 研究会, 学術集会, シンポジウム, 2009.11, 東京.
8. Ishihara M, Wada N, et al. A Retrospective Analysis of Risk Factors of Central Nervous System Metastases in Operable Breast Cancer: Different Survival by Biological Subtype and Ki67 Overexpression. 32nd San Antonio Breast Cancer Symposium, Poster Session, 2009. 12, San Antonio, USA.

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
木下 貴之, 他	センチネルリンパ節生検一色素法とRI法ー	福富 隆志	改訂2版 乳癌診療ハンドブック	中外医学社	東京	2009	154-167
木下 貴之, 他	腋窩リンパ節センチネルリンパ節生検一色素法とRI法ー	戸井 雅和	みんなに役立つ 乳癌の基礎と臨床	医薬ジャーナル社	東京	2009	418-429
木下 貴之, 他	乳房の構造と機能, 乳がんの組織学的分類とその特徴, 手術療法,	藤原 康弘	がん看護実践シリーズ8 乳がん	メヂカルフレンド社	東京	2007	10-21, 92-109
高島 大典, 他	検査・診断方法とケア	独立行政法人国立病院機構四国がんセンター	乳癌看護トータルガイド	照林社	東京	2008	24-39
中村 ハルミ, 津田 均.	2. 病理診断 3) 術前薬物療法後の病理診断.	戸井 雅和	みんなに役立つ乳癌の基礎と臨床	医薬ジャーナル社	大阪	2009	361-369
佐々木 由佳, 津田 均.	総論17. 乳癌治療に対する病理学的効果判定.	秋山 太, 他	乳腺病理カラーアトラス	文光堂	東京	2008	68-69
和田 徳昭, 他	第3章 患者自立・社会復帰のためのチーム医療の展開 I 早期退院・社会復帰の促進と支援 A 医学的管理と退院指導 1) 乳癌術後フォローアップ	藤原 康弘	がん看護実践シリーズ8 乳がん	メヂカルフレンド社	東京	2007	154-156

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Kinoshita T, Iwamoto E, et al.	Radiofrequency ablation as local therapy for early breast carcinomas.	Breast Cancer			in press

Hasebe T, <u>Kinoshita T</u> , et al.	p53 expression in tumor-stromal fibroblasts is closely associated with the nodal metastasis and outcome of patients with invasive ductal carcinoma who received neoadjuvant therapy.	Human PATHOLOGY	41	262-270	2010
Akagi T, <u>Kinoshita T</u> , et al.	Clinical and pathological features of intracystic papillary carcinoma of the breast.	Surgery Today	39(1)	5-8	2009
Shien T, <u>Kinoshita T</u> , et al.	Comparison among different classification systems regarding the pathological response of preoperative chemotherapy in relation to the long-term outcome.	Breast Cancer Res Treat	113	307-313	2009
Shien T, <u>Kinoshita T</u> , et al.	Clinicopathological features of tumors as predictors of the efficacy of primary neoadjuvant chemotherapy for operable breast cancer.	World Journal of Surgery	33	44-51	2009
Yonemori K, <u>Kinoshita T</u> , et al.	Immunohistochemical expression of PTEN and phosphorylated Akt are not correlated with clinical outcome in breast cancer patients treated with trastuzumab-containing neo-adjuvant chemotherapy.	Med Oncol	26	344-349	2009
Akashi-Tanaka S, <u>Kinoshita T</u> , et al.	21-Gene expression profile on core needle biopsies predicts responses to neoadjuvant endocrine therapy in breast cancer patients.	The Breast	18	171-174	2009
Akashi-Tanaka S, <u>Kinoshita T</u> , et al.	Whole-breast volume perfusion images using 256-row multislice computed tomography :visualization of lesions with ductal spread.	Breast Cancer	16	62-67	2009
Yoshida M, <u>Kinoshita T</u> .	A case of ductal carcinoma in situ of the breast.	Jpn J Clin Oncol	39(2)	132	2009
Hojo T, <u>Kinoshita T</u> , et al.	Primary small cell carcinoma of the breast.	Breast Cancer	16	68-71	2009
Tamura N, <u>Kinoshita T</u> , et al.	Tumor histology in lymph vessels and lymph nodes for the accurate prediction of outcome among breast cancer patients treated with neoadjuvant chemotherapy.	Cancer Science	100(10)	1823-1833	2009

Hasebe T, <u>Kinoshita T</u> , et al.	p53 expression in tumor stromal fibroblasts is associated with the outcome of patients with invasive ductal carcinoma of the breast.	Cancer Science	100(11)	2101-2108	2009
Shien T, <u>Kinoshita T</u> , et al.	Primary tumor resection improves the survival of younger patients with metastatic breast cancer.	ONCOLOGY REPORTS	21	827-832	2009
木下 貴之.	乳癌	治療	91(10)	2476-2482	2009
木下 貴之, 菊山 みずほ, 他	術前化学療法後のセンチネルリンパ節生検の現状と展望	乳癌の臨床	24(1)	71-76	2009
木下 貴之.	術前薬物療法；最近の知見	Pharma Medica	27(2)	21-25	2009
木下 貴之.	乳癌治療における画像診断の役割－術前化学療法と画像診断－	日獨医報	54(2)	136-142	2009
菊山 みずほ, 木下 貴之.	若年男性乳癌の1例	手術	63(11)	1735-1739	2009
Shien T, <u>Kinoshita T</u> , et al.	Evaluation of axillary status in patients with breast cancer using thin-section CT.	Int J Clin Oncol	13(4)	314-319	2008
Shien T, <u>Kinoshita T</u> , et al.	Clinical efficacy of S-1 in pretreated metastatic breast cancer patients.	Jpn J Clin Oncol	38(3)	172-175	2008
Uehara M, <u>Kinoshita T</u> , et al.	Long-term prognostic study of carcinoembryonic antigen (CEA) and carbohydrate antigen 15-3 (CA 15-3) in breast cancer.	Int J Clin Oncol	13(5)	447-451	2008
Sugano K, <u>Kinoshita T</u> , et al.	Cross-sectional analysis of germline <i>BRCA1</i> and <i>BRCA2</i> mutations in Japanese patients suspected of hereditary breast/ovarian cancer.	Cancer Science	99(10)	1967-1976	2008
吉田 亮介, 木下 貴之, 他	破骨細胞様巨細胞の出現を伴う乳癌の9例	日本臨床外科学会雑誌	69(7)	1615-1619	2008
枝園 忠彦, 木下 貴之, 他	原発性乳がんに対するPrimary systemic (PST) の適応－PST抵抗性乳がんを治療前に判定可能か？	乳癌の臨床	23(1)	49-53	2008
枝園 忠彦, 木下 貴之, 他	80歳以上の超高齢者乳癌の治療	乳癌の臨床	23(2)	118-122	2008

<u>Kinoshita T.</u>	Sentinel lymph node biopsy is feasible for breast cancer patients after neoadjuvant chemotherapy.	Breast Cancer	14	10-15	2007
Tsukamoto S, <u>Kinoshita T.</u> , et al.	Brain metastases after achieving local pathological complete responses with neoadjuvant chemotherapy.	Breast Cancer	14	420-424	2007
Kurebayashi J, <u>Kinoshita T.</u> , et al.	The prevalence of intrinsic subtype and prognosis in breast cancer patients of different race.	The Breast	16	72-77	2007
Akashi TS, <u>Kinoshita T.</u> , et al.	Favorable outcome in patients with breast cancer in the presence of pathologic response after neoadjuvant endocrine therapy.	The Breast	16	482-488	2007
赤木 智徳, 木下 貴之.	Intracystic papillary carcinoma (ICPC)の診断と臨床的特徴－自験例14例からの検討－	乳癌の臨床	22	280-285	2007
<u>Takabatake D.</u> , Taira N, et al.	Feasibility Study of Docetaxel with Cyclophosphamide as Adjuvant Chemotherapy for Japanese Breast Cancer Patients.	Jpn J Clin Oncol	39(8)	478-483	2009
<u>Takabatake D.</u> , Taira N, et al.	Two cases of occult breast cancer in which PET-CT was helpful in identifying primary tumor.	Breast Cancer	15	181-184	2008
山本 尚人, 田部井 敏夫, 他.	腋窩リンパ節転移陰性乳がんに対する術後補助化学療法としてのDocetaxelとCyclophosphamideの忍容性および安全性.	癌と化学療法	37(1)	57-63	2010
Kurosumi M, <u>Yamamoto N.</u> , et al.	Relationship between the signal ratios of HER-2/CEP17 and C-MYC/CEP17 and the pathological response of neoadjuvant therapy using docetaxel and trastuzumab in breast cancer.	Molecular medicine reports	1	71-75	2008
Suga T, <u>Yamamoto N.</u> , et al.	Haplotype-based analysis of genes associated with risk of adverse skin reactions following radiotherapy in breast cancer patients.	Int J Rad Oncol Biol Phys	69(3)	685-693	2007
Saeki T, <u>Yamamoto N.</u> , et al.	Dofequidar Fumarate(MS-209) in Combination with Cyclophosphamide, Doxorubicin, and Fluorouracil for Patients with Advanced or recurrent Breast Cancer.	JCO	25(4)	411-417	2007
山本 尚人, 他.	術前化学療法の適応と限界	日本臨床	65(6)	500-506	2007

柏葉 匡寛, 山本 尚人, 他.	JBCRG03:Docetaxel75mg/m ² followed by FEC100mg/m ² による 術前化学療法—JBCRG01,02 から の review と reathrough—	乳癌の臨床	22(5)	372-375	2007
Kojima M, Fujisawa T, et al.	Presence of immunoglobulin heavy chain rearrangement in so-called "plasma cell granuloma of the lung".	Pathol Res Pract	206(2)	83-87	2010
山本 尚人, 藤澤 知巳, 他.	腋窩リンパ節転移陰性乳がんに対 する術後補助化学療法としての DocetaxelとCyclophosphamideの忍 容性および安全性.	癌と化学療法	37(1)	57-63	2010
Kimura M, Fujisawa T.	Study of time-course changes in annual recurrence rates for breast cancer: data analysis of 2,209 patients for 10 years post-surgery.	Breast Cancer Research and Treatment	106(3)	407-411	2007
Onishi H, Masuda N, et al.	Computed radiography-based mam mography with 50- μ m pixel size: intra-individual comparison with film-screen mammography for diagnosis of breast cancers.	Academic radiology	16(7)	836-841	2009
増田 慎三, 他.	乳癌の術後補助療法決定のストラ テジー.	外科治療	106(6)	674-680	2009
増田 慎三, 他.	乳頭異常分泌症例に対するICG蛍 光法を用いた乳管腺葉部分切除.	外科	71(9)	922-928	2009
多根井 智紀, 増田 慎三, 他.	乳頭分泌液中CEAにおけるイムノ クロマトグラフィー (ICGA)法と 酵素免疫測定(EIA)法の比較検討.	乳癌の臨床	23(2)	123-128	2008
増田 慎三.	Current Organ topics-乳癌-乳がん 治療における最近の進歩—個別化 治療への挑戦.	癌と化学療法	34(12)	2228-2235	2007
増田 慎三.	乳がん治療の現状と展望—個別化 治療をめざして—.	総合臨床	56(11)	3103-3105	2007
Watanabe T, Tsuda H, et al.	Oral uracil-tegafur compared with classical cyclophosphamide, methotrexate, fluorouracil as postoperative chemotherapy in patients with node-negative, high-risk breast cancer: National Surgical Adjuvant Study for Breast Cancer 01 trial.	J Clin Oncol	27(9)	1368-1374	2009

Sasaki Y, <u>Tsuda H.</u>	Histological differences between invasive ductal carcinoma with a large central acellular zone and matrix-producing carcinoma of the breast.	Pathol Int	59(6)	390-394	2009
Ishihara A, <u>Tsuda H.</u> , et al.	Morphological characteristics of basal-like subtype of breast carcinoma with special reference to cytopathological features.	Breast Cancer	16(3)	179-185	2009
Tsuchiya S, <u>Tsuda H.</u> , et al.	A new reporting form for breast cytology.	Breast Cancer	16(3)	202-206	2009
Toi M, <u>Tsuda H.</u> , et al.	Phase II study of preoperative sequential FEC and docetaxel predicts of pathological response and disease free survival.	Breast Cancer Res Treat	110(3)	531-539	2008
Kurosumi M, <u>Tsuda H.</u> , et al.	Histopathological assessment of anastrozole and tamoxifen as preoperative (neoadjuvant) treatment in postmenopausal Japanese women with hormone receptor-positive breast cancer in the PROACT trial.	J Cancer Res Clin Oncol	134(6)	715-722	2008
<u>Tsuda H.</u>	Individualization of breast cancer based on histopathological features and molecular alterations.	Breast Cancer	15(2)	121-132	2008
Umemura S, <u>Tsuda H.</u> , et al.	What causes discrepancies in HER2 testing for breast cancer? : A Japanese ring study in conjunction with the global standard.	Am J Clin Pathol	130(6)	883-891	2008
Toi M, <u>Tsuda H.</u> , et al.	Predictive implications of nucleoside metabolizing enzymes in premenopausal women with node-positive primary breast cancer who were randomly assigned to receive tamoxifen alone or tamoxifen plus tegafur-uracil as adjuvant therapy.	Int J Oncol	31(4)	899-906	2007
Imoto S, <u>Wada N.</u> , et al.	Feasibility study on radiofrequency ablation followed by partial mastectomy for stage I breast cancer patients.	The Breast	18(2)	130-134	2009
藤井 博史, 和田 徳昭, 他.	核医学検査、臨床の最前線” SPEC Tの臨床 センチネルリンパ節	Rad Fan	7(12)	35-38	2009
藤井 博史, 和田 徳昭, 他.	乳癌の診断と治療update 乳腺のリンパ系の解剖と画像診断	臨床放射線	51(11)	1435-1445	2009

清水 薫, 和田 徳昭, 他.	図説放射線診断・治療シリーズ 非触知乳がん診断の進め方	国立医療学会 誌 医療	63(6)	392-398	2009
Hasebe T, Wada N, et al.	Histopathologic factors significantly associated with initial organ-specific metastasis by invasive ductal carcinoma of the breast: a prospective study.	Hum Pathol	39 (5)	681-693	2008
Tanaka K, Wada N, et al.	Invasive apocrine carcinoma of the breast: clinicopathologic features of 57 patients.	Breast J	14 (2)	164-168	2008
Hasebe T, Wada N, et al.	Grading system for lymph vessel tumor emboli for prediction of the outcome of invasive ductal carcinoma of the breast.	Hum Pathol	39 (3)	427-436	2008
Wada N, Imoto S.	Clinical evidence of breast cancer micrometastasis in the era of sentinel node biopsy.	Int J Clin Oncol	13 (1)	24-32	2008
Wada N, Sakemura N, et al.	Sentinel node biopsy in primary breast cancer: Radioactive detection and metastatic disease.	Eur J Surg Oncol	33 (6)	691-695	2007
Yamauchi C, Wada N, et al.	Accurate assessment of lymph vessel tumor emboli in invasive ductal carcinoma of the breast according to tumor areas, and their prognostic significance.	Hum Pathol	38 (2)	247-259	2007
Inagaki M, Wada N, et al.	Smaller regional volumes of brain gray and white matter demonstrated in breast cancer survivors exposed to adjuvant chemotherapy.	Cancer	109 (1)	146-156	2007
田中 仁寛, 和田 徳昭, 他.	術前化学療法後のセンチネルリン パ節生検にて術中迅速病理診断が 偽陰性となった浸潤性小葉癌の 1 例	乳癌の臨床	22	409-412	2007



Original contribution

p53 expression in tumor-stromal fibroblasts is closely associated with the nodal metastasis and outcome of patients with invasive ductal carcinoma who received neoadjuvant therapy[☆]

Takahiro Hasebe MD, PhD^{a,*}, Nobuko Tamura MD^b, Nao Okada MD^b,
Takashi Hojo MD^b, Sadako Akashi-Tanaka MD, PhD^b, Chikako Shimizu MD^c,
Histoshi Tsuda MD, PhD^d, Tatsuhiro Shibata MD, PhD^e, Yuko Sasajima MD, PhD^d,
Motoki Iwasaki MD, PhD^f, Takayuki Kinoshita MD, PhD^b

^aClinical Trials and Practice Support Division, Pathology Consultation Service,
Center for Cancer Control and Information Services, National Cancer Center, Tokyo 104-0045, Japan

^bDepartment of Breast Surgery, National Cancer Center Hospital, Tokyo 104-0045, Japan

^cDivision of Breast and Medical Oncology, National Cancer Center Hospital, Tokyo 104-0045, Japan

^dClinical Laboratory Division, National Cancer Center Hospital, Tokyo 104-0045, Japan

^eCancer Genomics Project, National Cancer Center Research Institute, Tokyo 104-0045, Japan

^fEpidemiology and Prevention Division, Research Center for Cancer Prevention and Screening, National Cancer Center, Tokyo 104-0045, Japan

Received 10 April 2009; revised 27 July 2009; accepted 30 July 2009

Keywords:

Breast cancer;
p53;
Fibroblast;
Tumor stroma;
Prognosis

Summary The purpose of this study was to determine whether p53 immunoreactivity in tumor-stromal fibroblasts assessed by the Allred scoring system in biopsy specimens obtained before neoadjuvant therapy and assessed in surgical specimens obtained after neoadjuvant therapy is significantly associated with nodal metastasis by invasive ductal carcinoma and with the outcome of 318 patients with invasive ductal carcinoma who received neoadjuvant therapy, according to UICC pathologic TNM stage, in multivariate analyses with well-known clinicopathologic factors. The Allred scores for p53 in tumor-stromal fibroblasts in the surgical specimens were significantly associated with the presence of nodal metastasis. The Allred scores for p53 in the tumor-stromal fibroblasts of biopsy and surgical specimens were a very important outcome predictive factor for patients who received neoadjuvant therapy, independent of UICC pathologic TNM status, but the outcome predictive power of the Allred scores for p53 in tumor-stromal fibroblasts assessed in the surgical specimens was superior to that of the Allred scores for p53 in tumor-stromal fibroblasts in the biopsy specimens. The results indicated a close association between p53 protein expression in tumor-stromal fibroblasts, especially in surgical

[☆] This study was supported in part by a Grant-in-Aid for Scientific Research (KAKENHI) (C) (19590378, 21590393) from Japan Society for the Promotion of Science and in part by a Grant-in-Aid for Cancer Research from the Ministry of Health, Labor and Welfare (20-16) of Japan.

* Corresponding author.

E-mail address: thasebe@ncc.go.jp (T. Hasebe).

specimens, and both the presence of nodal metastasis and the outcome of invasive ductal carcinoma patients who received neoadjuvant therapy.

© 2010 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

It has recently been reported that the gene expression profile and protein expression profile of the tumor stroma play a very important role in tumor progression in carcinoma [1-3] and that the interaction between tumor cells and stromal cells also plays a very important role in tumor progression by carcinoma [4,5]. We have already reported that the proliferative activity of tumor-stromal fibroblasts plays a very important role in nodal metastasis and distant organ metastasis by invasive ductal carcinoma (IDC) of the breast [6,7]. Recently, a high frequency of p53 mutations in tumor cells and the surrounding stroma has also been reported [8], and p53 mutations in breast cancer stromal cells have been reported to be closely associated with nodal metastasis [9]. These findings strongly suggest a significant role of the tumor stroma in tumor progression by IDC, and the p53 status of tumor-stromal fibroblasts may play a very important role in tumor progression by IDC.

The purpose of the present study was to determine whether p53 protein expression in tumor-stromal fibroblasts assessed in biopsy specimens obtained before neoadjuvant therapy and surgical specimens obtained after neoadjuvant therapy is significantly associated with the presence of nodal metastasis by IDC, and significantly associated with the outcome of IDC patients who received neoadjuvant therapy, according to the UICC (International Union Against Cancer) pathologic TNM (pTNM) stage. The results indicated that p53 protein expressions in tumor-stromal fibroblasts in both the biopsy specimens and the surgical specimens were closely associated with the presence of nodal metastasis and the outcome of IDC patients who received neoadjuvant therapy.

2. Materials and methods

2.1. Cases

The subjects of this study were 318 consecutive patients with IDC of the breast and who received neoadjuvant therapy before surgery at the National Cancer Center Hospital between January 2000 and December 2005. The IDCs were diagnosed preoperatively by needle biopsy, aspiration cytology, mammography, or ultrasonography. Clinical information was obtained from the patients' medical records after complete histologic examination of all IDCs. All patients were Japanese women, and they ranged in age from 26 to 75 years (median, 54 years). All had a solitary lesion; 127 patients were premenopausal and 191 were postmeno-

pausal. Partial mastectomy had been performed in 152 and modified radical mastectomy in 166. Level I and level II axillary lymph node dissection had been performed in all patients, and level III axillary lymph node dissection had been performed in some of patients with IDC.

Of the 318 patients, 37 (12%) achieved a pathologic complete response (34, no residual tumor; 3, only residual ductal carcinoma in situ; they have no nodal metastasis) to neoadjuvant therapy.

The neoadjuvant therapy consisted of chemotherapy in 235 patients, endocrine therapy in 43 patients, and chemoendocrine therapy in 3 patients; and 214 of 281 patients received adjuvant therapy, which consisted of chemotherapy in 47 patients, endocrine therapy in 116 patients, and chemoendocrine therapy in 51 patients. The chemotherapy regimens used were anthracycline-based with or without taxane and non-anthracycline-based, and the endocrine therapy regimens consisted of tamoxifen with or without a gonadotropin-releasing-hormone agonist, tamoxifen with or without an aromatase inhibitor, an aromatase inhibitor alone, or a gonadotropin-releasing-hormone agonist alone. There were no cases of inflammatory breast cancer in this series. All tumors were classified according to the UICC pTNM classification.

For the pathologic examination, biopsy specimens obtained before neoadjuvant therapy and surgically resected specimens obtained after neoadjuvant therapy were fixed in 10% formalin and subsequently examined. The size and gross appearance of the surgically resected tumor specimens were recorded as the residual invasive tumor size. The tumor size of the surgically resected specimens was confirmed by comparison with the tumor size on histologic slides; if more than one invasive focus was present, the size of the largest invasive focus was recorded as the residual invasive tumor size in this study.

2.2. Histologic examination

Serial sections of the biopsy specimens obtained before neoadjuvant chemotherapy and of the tumor area in the surgically resected specimens obtained after neoadjuvant therapy were cut from paraffin-wax blocks. One section of each biopsy specimen and surgical specimen was stained with hematoxylin and eosin and examined histologically to confirm the diagnosis, and another section was subjected to immunohistochemistry. The following 9 histologic features of the primary invasive tumors were evaluated in the biopsy specimens obtained before neoadjuvant therapy and the surgical specimens obtained after neoadjuvant therapy: (1) residual tumor size (no residual tumor or residual ductal

carcinoma in situ; residual tumor ≤ 20 mm, >20 to ≤ 50 mm, >50 mm), (2) histologic grade (1, 2, 3) [10], (3) tumor necrosis (absent, present) [11], (4) fibrotic focus (FF) (biopsy specimen: absent, present; surgical specimen: absent; FF diameter ≤ 8 mm, FF diameter >8 mm) [12,13], (5) lymph vessel invasion (absent, present), (6) blood vessel invasion (absent, present), (7) adipose tissue invasion (absent, present), (8) skin invasion (absent, present), and (9) muscle invasion (absent, present). We also evaluated the outcome predictive power of Fisher's neoadjuvant-therapy-effect classification for surgical specimens obtained after neoadjuvant therapy [14,15].

2.3. Immunohistochemistry

Immunohistochemical staining for estrogen receptors (ERs), progesterone receptors (PRs), p53, and HER2 products was performed with autoimmunostainer (Optimax Plus; BioGenex, San Ramon, CA). Antigen retrieval device for Optimax Plus was autoclave and each specimen was immersed in citrate buffer and incubated at 121°C for 10 minutes. Immunoperoxidase staining was performed by using a labeled streptavidin biotin staining kit (BioGenex) according to the manufacturer's instructions. The antibodies used were mouse anti-ER monoclonal antibody (mAb), ER88 (BioGenex), mouse anti-PR mAb, PR88 (BioGenex), and mouse anti-HER2 mAb, CB11 (BioGnex) and mouse p53 mAb, DO7 (Dako, Glostrup, Denmark). ER88, PR88, and CB11 were already diluted and DO7 was applied at 1:100 dilution. After immunostaining, the sections were counterstained with hematoxylin. Sections of IDCs positive for ER, PR, HER2, and p53 were used each time as positive control. As a negative control, the primary antibody was replaced with normal mouse immunoglobulin.

2.4. Assessment of ER, PR, p53, and HER2 expression

Sections of biopsy specimens and surgical specimens immunostained for ER, PR, and p53 in tumor cells were scored by the Allred system as described previously [16-19]. In brief, each entire slide was evaluated by light microscopy as follows. First, one of the following proportion scores was assigned according to the estimated proportion of tumor cells that stained positive: 0, 0/100 (0%); 1, $<1/100$ ($<1\%$); 2, $1/100$ to $1/10$ (1% to 10%); 3, $>1/10$ to $1/3$ ($>10\%$ to 33%); 4, $>1/3$ to $2/3$ ($>33\%$ to 67%); 5, $>2/3$ ($>67\%$). Next, one of the following intensity scores was assigned according to the average intensity of staining by the positive tumor cells: 0, no staining; 1, weak; 2, intermediate; 3, strong. The proportion score and intensity score were then added to obtain a total score, with possible total scores ranging from 0 and 2 to 8. However, the number of tumor-stromal fibroblasts that express p53 in tumors is relatively small, and examination of the distribution of tumor-stromal fibroblasts expressing p53

shows that they are scattered even in IDCs with tumor-stromal fibroblasts having Allred scores of 4 to 8. We therefore modified the Allred scoring system to assess nuclear expression of p53 in tumor-stromal fibroblasts by identifying one field with the highest of both proportion score and intensity score for p53 nuclear expression in the whole tumor area by scanning the tumor section stained for p53 at medium-power field ($\times 20$ objective and $\times 10$ ocular). The highest intensity score, not the average intensity score, for nuclear expression of p53 was assigned to the tumor-stromal fibroblast staining, and the highest p53 nuclear expression proportion score and intensity score were then evaluated in one high power field ($\times 40$ objective and $\times 10$ ocular) (Fig. 1). The HER2 status of the tumor cells was semiquantitatively scored on a scale of 0 to 3 according to the level of HER2 protein expression [20]. Immunohistochemistry was used to score 290 of the 318 IDCs for ER, PR, HER2, and p53 expression in biopsy specimens. In surgical specimens, immunohistochemistry was used to score 273 of the 318 IDCs for ER, PR, and p53 expression and to score 271 of them for HER2 expression.

One author (T. H.) assessed all of the immunohistochemical parameters, and 1 of 3 other authors (H. T., T. S., or Y. S.) identified the immunohistochemical parameters to confirm the IDC immunohistochemical characteristics recorded by TH. Discordant results were reevaluated jointly to reach a consensus. The histologic examination and immunohistochemical examination were performed without knowledge of the patient's outcome.

2.5. Patient outcome and statistical analysis

Survival was evaluated by follow-up for a median period of 52 months (range, 18-102 months) until June 2008. At that time, 199 of the 281 patients were alive and well, 82 had developed tumor recurrence, and 24 had died of their disease. The measurements of tumor recurrence-free survival and overall survival started at the time of surgery. Tumor relapse was considered to have occurred whenever there was evidence of metastasis.

The correlation analyses were performed using Pearson correlation coefficients. The univariate and multivariate analyses for pathologic complete response were performed by using the logistic regression model for all patients. We analyzed the outcome predictive power for tumor recurrence and tumor-related death by the univariate and multivariate analyses using the Cox proportional hazard regression model. The factors analyzed were the mentioned 9 factors, age (≤ 39 , >39 years), type of neoadjuvant therapy (endocrine therapy, chemotherapy, and chemoendocrine therapy), adjuvant therapy (no, yes), and the factors that were significantly associated with outcome in the univariate analyses were then entered together into the multivariate analyses according to UICC pTNM stage. Because the 9 factors were examined using both biopsy specimens obtained before neoadjuvant therapy and surgical specimens obtained

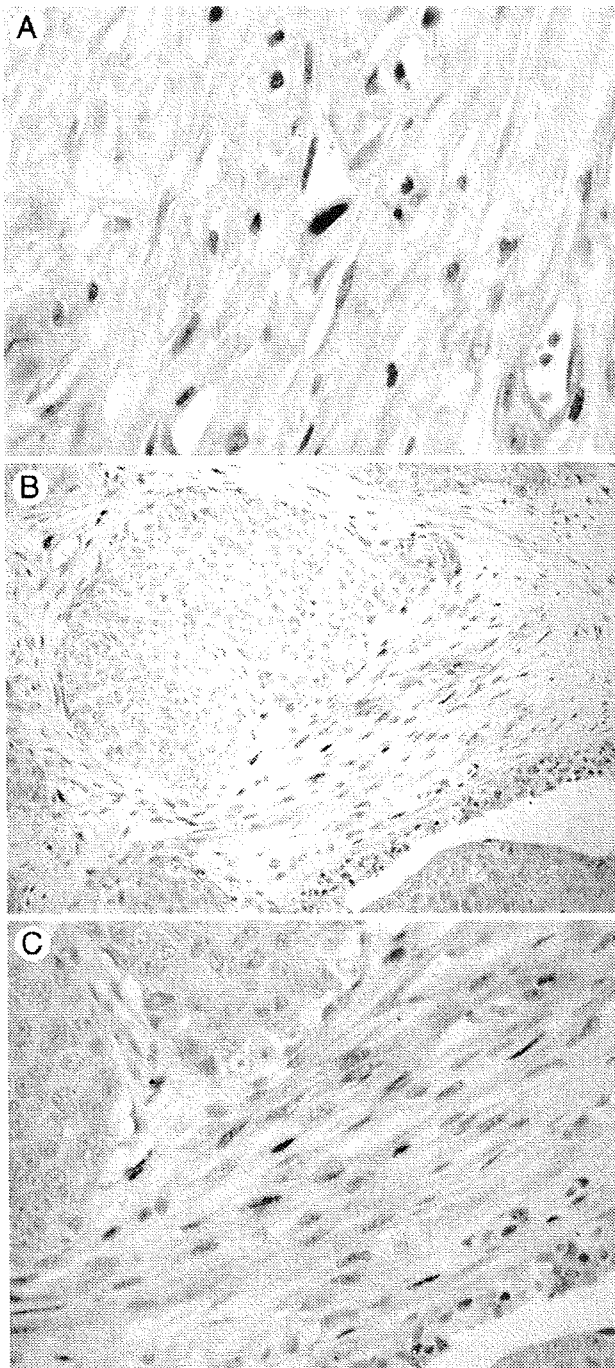


Fig. 1 p53 expression in tumor-stromal fibroblasts of IDCs. (A) Allred score of 3 for p53 in tumor-stromal fibroblasts. One tumor-stromal fibroblast shows moderately intense nuclear staining for p53 in the high-power field (magnification $\times 40$). (B and C) Allred score of 7 for p53 in tumor-stromal fibroblasts. Several tumor-stromal fibroblasts show moderately intense nuclear staining for p53 at the medium-power field (B) and in the high-power field (C). None of the nuclei of the tumor cell have stained positive for p53 (B, magnification $\times 20$; C, magnification $\times 40$).

after neoadjuvant chemotherapy, to accurately assess the prognostic value of each of these factors in multivariate analyses, their mutual influence on outcome was avoided by conducting separate analyses of the prognostic predictive power of the findings in the biopsy specimens obtained before neoadjuvant therapy and the surgical specimens obtained after neoadjuvant therapy (model 1, factors examined based on biopsy specimens obtained before neoadjuvant therapy; model 2, factors examined based on surgical specimens obtained after neoadjuvant therapy). The case-wise and step-down method was applied until all of the remaining factors were significant at a P value less than .05. Because there were fewer than 10 tumor deaths among the patients with UICC pTNM stage 0 and I disease and the patients with UICC pTNM stage II disease, we were unable to perform multivariate analyses for tumor death in these groups. Survival curves were drawn by the Kaplan-Meier method. All analyses were performed with Statistical/Windows software (StatSoft, Tulsa, OK).

3. Results

3.1. Correlations between Allred scores for ER, PR, and p53, and HER2 category assessed in the biopsy specimens and assessed in the surgical specimens

The Allred scores for ER, PR, and p53 in tumor cells and HER2 category in the biopsy specimens were significantly correlated with the Allred scores for ER, PR, and p53 in tumor cells and HER2 category in tumor cells in the surgical specimens (ER: $r = 0.730$, $P < .001$; PR: $r = 0.407$, $P < .001$; p53: $r = 0.576$, $P < .001$; HER2, $r = 0.550$, $P < .001$). There were marginally significant correlations between the Allred scores for p53 in tumor-stromal fibroblasts assessed in the biopsy specimens and the Allred scores for p53 in tumor-stromal fibroblasts assessed in the surgical specimens ($r = 0.109$, $P = .088$) (Table 1, Fig. 1).

3.2. Analysis for nodal metastasis

Although the Allred scores for p53 in tumor-stromal fibroblasts in the biopsy specimens were not significantly associated with the presence of nodal metastasis, the Allred scores for p53 in tumor-stromal fibroblasts in the surgical specimens were significantly associated with the presence of nodal metastasis (Table 1).

3.3. Factors significantly associated with pathologic complete response

In the multivariate analysis, UICC pTNM-pathologic node (pN) category significantly decreased the trend values for the relative risk for pathologic complete response, and