

# 5 ニトロイミダゾール類とは異なる集積機序をもつ $^{99m}\text{Tc}$ 標識低酸素イメージングプローブの開発

梅田 泉、木村 禎亮、藤井 博史

国立がん研究センター東病院 臨床開発センター機能診断開発分野

## はじめに

固形腫瘍の病巣内では、異常な脈管構造構築により生じた血流低下による酸素供給と酸素消費の不均衡によって慢性的な低酸素領域が存在し、特異的な微小環境が構築されている<sup>1</sup>。低酸素環境下では低酸素誘導因子 (hypoxia inducible factor-1; HIF-1) が活性化し、それによって誘導される諸因子ががんの増殖分化、転移浸潤を助長する。従って悪性度の高い領域といえる。また、X線など放射線の生物作用 (殺細胞効果) は酸素の存在に大きく依存することから、低酸素環境にあるがん細胞は放射線治療抵抗性を示す。さらにこれらは化学療法に対しても抵抗性を示すことが報告されている。このように、がん病巣内の低酸素環境はがんの悪性度や治療抵抗性の指標となることから、その可視化はがん治療の最適化にとって必須であり、がん画像診断の重要な課題である<sup>2</sup>。

これまで核医学領域では、低酸素イメージングプローブとして  $^{18}\text{F}$ -fluoromisoimidazole ( $^{18}\text{F}$ -FMISO)、 $^{18}\text{F}$ -fluoroazomycin arabinoside ( $^{18}\text{F}$ -

FAZA)、 $^{18}\text{F}$ -flortanidazole ( $^{18}\text{F}$ -HX4)、 $^{60/62/64}\text{Cu}$ -diacetyl-bis (N4-methylsemicarbazone) ( $^{60/62/64}\text{Cu}$ -ATSM) などが開発されてきた (図 1A)<sup>3,4</sup>。これらはいずれも PET プローブであり、また前三者はニトロイミダゾール骨格を土台としている。低酸素環境は電子が過剰で過還元状態にある。ニトロイミダゾール化合物は高い還元電位を有し (= 電子不足)、低酸素環境下で特異的に生体還元代謝を受けて、最終的に細胞内の求核高分子 (タンパク質や核酸) と結合すると考えられている (図 1B)。上述のイメージングプローブは臨床研究でも用いられているが、現時点では画像診断薬として認可されているものはない。PET プローブは半減期が短く、基本的にはサイクロトロンを有する施設でしか使用できないため、汎用性の点に問題がある。そこで本研究では、より汎用性の高い SPECT 低酸素プローブの開発を目指し、 $^{99m}\text{Tc}$  標識でかつニトロイミダゾールとは異なる機序で低酸素領域に留まる化合物を設計・合成し、低酸素プローブとしての有用性を評価した。

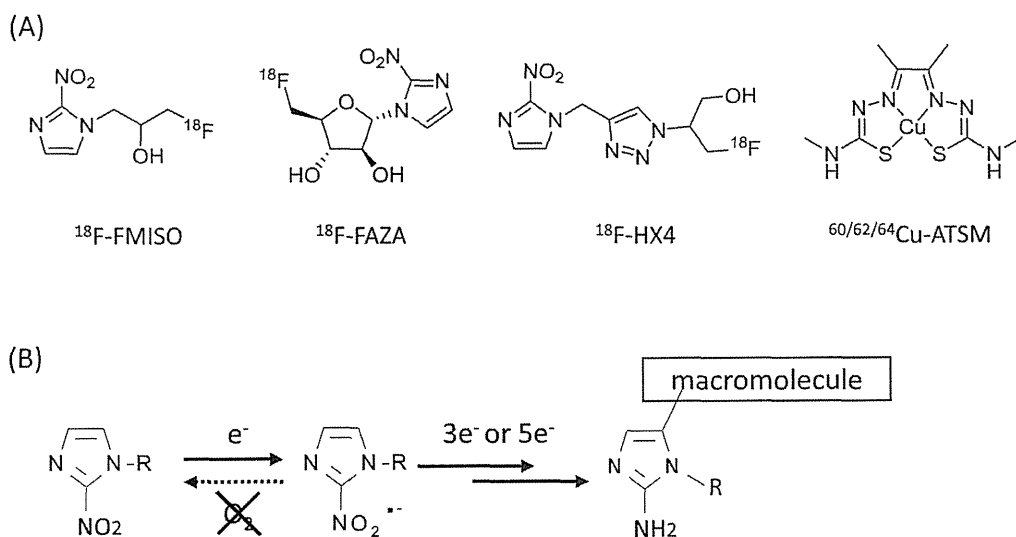


図 1 従来の核医学低酸素イメージング剤

(A) 代表的な低酸素イメージング剤

(B) ニトロイミダゾール化合物の低酸素領域集積機序 (推定)

## 新規プローブの分子設計

プローブの設計にあたり、1) 核医学核種として最も汎用性の高い<sup>99m</sup>Tcを用いること、2) 低酸素環境下で特異的に構造を大きく変化させ、細胞内に留まる機構を持たせることの2点を基本概念とし、第2項達成のため、4-nitrobenzyl esterの利用を企画した。低酸素環境のような電子過剰状態で、4-nitrobenzyl esterは還元を受け、最終的に脱離基が脱離する(図2A)。この脱離基に<sup>99m</sup>Tcを結合し、低酸素環境下で特異的に細胞内に集積させることを試みた(図2B)。この化合物は脂溶性であり、細胞内に移行すると考えられる。常酸素濃度の細胞では、化合物に変化は起こらず、経時的に細胞から洗い出される。一方、低酸素細胞に取り込まれた場合、低酸素下の過還元状態において、4-nitrobenzyl基が還元・脱離し、その結果、水溶性の<sup>99m</sup>Tc標識化合物に変化すると予想される。構造によっては電荷も有するようになる。それらの生成物は細胞膜を透過できず、従って低酸素細胞に留まることを期待した。

## 低酸素イメージングプローブとしての評価

この分子設計に基づき、10種類余の候補化合物を

合成した。それぞれの化合物を<sup>99m</sup>Tcで標識し、その標識率と製剤安定性を検討した後に、マウス乳癌FM-3A細胞あるいはEMT6細胞を用いて常酸素・低酸素環境下での細胞取込の相違を調べた。さらに担がん動物モデルを用いて、候補化合物の腫瘍集積性および体内動態を検討し、SPECT/CTイメージングも実施した。低酸素環境特異性に関しては、凍結組織切片を作成し、オートラジオグラフィと免疫染色による検討を実施した。

最初の候補化合物としてSD32を合成した。構造を図3Aに示す。細胞取込実験において、低酸素条件下の細胞へのSD32の取込は正常状態の細胞より有意に高いことが認められた(図3B)。それぞれの細胞の融解液をHPLCで分析した結果、正常細胞ではSD32は最初の構造を保っていたが、低酸素細胞では脱ベンジル体に変換していることが明らかとなった(図3C)。従って本プローブは、図2に示した設計概念どおりに機能していることが証明された<sup>5)</sup>。しかしながら、これらのプローブを担がん動物に投与すると、血中から速やかに消失し、腫瘍にはほとんど到達しなかった。

この結果は、*in vivo*イメージングのためには、もうひとつの因子として血中滞留性を高める必要性を示

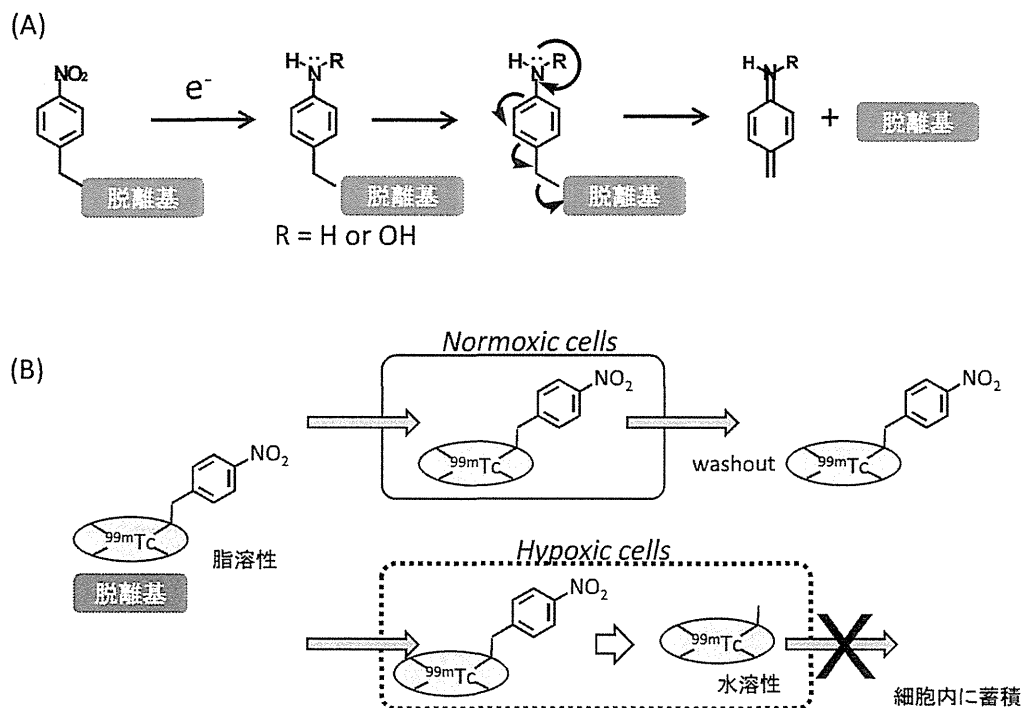


図2 新規プローブの分子設計

(A) ニトロベンジルエステルの還元と脱離

(B) 新規プローブの低酸素集積機構

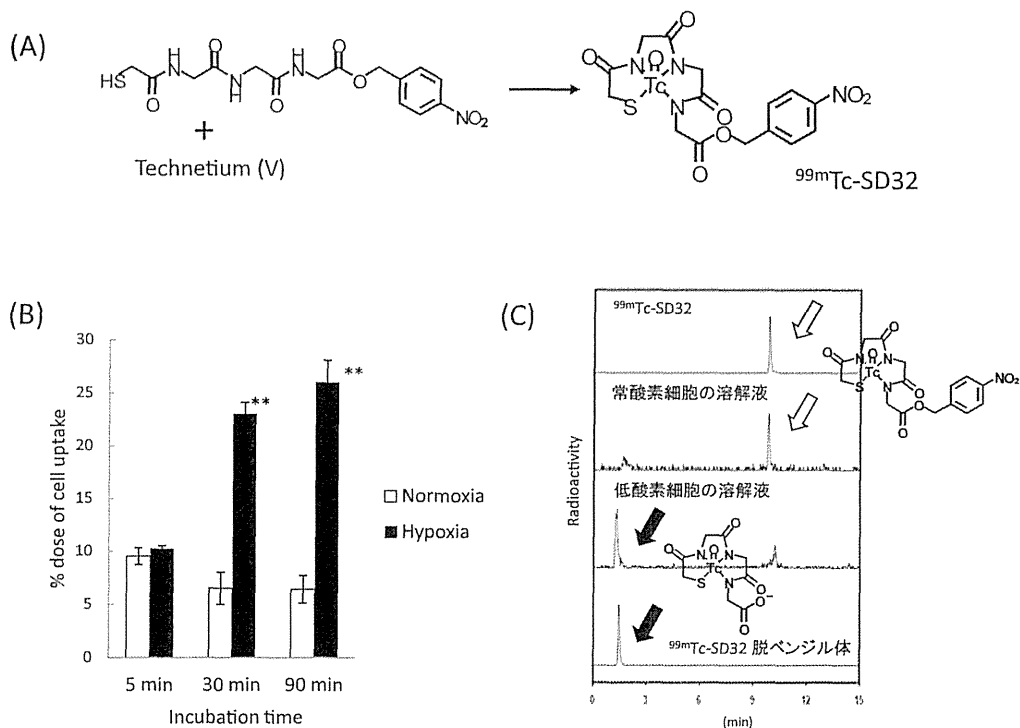


図3 新規低酸素プローブ  $^{99m}\text{Tc-SD32}$   
 (A) 構造  
 (B) 低酸素細胞への選択的集積 \*\*、 $P < 0.01$   
 (C) SD32 およびその代謝物の HPLC 解析

唆している。そこで、リガンド部分の構造に変更を加え、試行錯誤でプローブの体内動態の改良に努めた。緒検討の結果、投与3時間後で、腫瘍集積率が投与量の約1-2%/g、腫瘍/血液比2-3、腫瘍/筋肉比15-20程度の良好な成績を示すプローブを得ることが出来た(特許出願中)。このプローブを用いて *in vivo* SPECT イメージングを行った結果、腫瘍が明瞭に描画された。さらに腫瘍を摘出してオートラジオグラフィと低酸素マーカーであるピモニダゾール免疫染色を行った結果、両者の分布はよく一致した。従って本プローブの集積は低酸素環境に依存したものであると認められた。これらの結果より、本研究で新規に開発した  $^{99m}\text{Tc}$  標識プローブは、新しい腫瘍低酸素 SPECT プローブとして期待できる。

### まとめと今後の展望

本研究では、従来の低酸素イメージングプローブとは異なる集積機序を持ち、かつ汎用性の高い  $^{99m}\text{Tc}$  標識低酸素プローブの開発を目指し、有望な成績を得ることができた。今後はがん治療への寄与に力点を置いて検討を進める予定である。近年、放射線治療は強度

変調放射線治療 (IMRT) やペンシルビーム陽子線治療のように極めて位置精度の高い照射が可能となっている。本プローブにより、腫瘍内低酸素環境の有無のみでなく、腫瘍内低酸素部位の局在までも描画できれば、理想的な画像ガイド下治療となりうる。我々は腫瘍内不均一性の描画に関しても検討を進めている<sup>6</sup>。また、化学療法においても、最近低酸素環境を標的とした治療薬の開発が進められており、すでに臨床試験も開始されている。これらの治療薬が有効な患者の選別や、効果予測、効果判定においても、本プローブの有効性が大いに期待される。個々の患者の腫瘍の特性の把握は個別化治療の第一歩となる。がん治療の最適化への貢献を目指し、さらなる研究の発展を目指したい。

### 謝辞

本研究の一部は、日本学術振興会科学研究費補助金、厚生労働省科学研究費補助金およびがん研究振興財団がん研究助成金の助成により実施した。

#### 参考文献

1. Tatum JL, et al., Hypoxia: importance in tumor biology, noninvasive measurement by imaging, and value of its measurement in the management of cancer therapy. *Int J Radiat Biol.* 2006 Oct; 82 (10) : 699-757.
2. Padhani AR, et al., Imaging oxygenation of human tumors. *Eur Radiol.* 2007 17: 861-874.
3. Lopci E, et al., PET radiopharmaceuticals for imaging of tumor hypoxia: a review of the evidence. *Am J Nucl Med Mol Imaging.* 2014 Jun 7; 4 (4) : 365-84. eCollection 2014
4. Carlin S, Zhang H, Reese M, Ramos NN, Chen Q, Ricketts SA. A comparison of the imaging characteristics and microregional distribution of 4 hypoxia PET tracers. *J Nucl Med.* 2014 Mar; 55 (3) : 515-21. doi:10.2967/jnumed.113.126615. Epub 2014 Feb 3.
5. Kimura S, Umeda IO, Moriyama N, Fujii H: Synthesis and evaluation of a novel <sup>99m</sup>Tc-labeled bioreductive probe for tumor hypoxia imaging. *Bioorg Med Chem Lett.* 21 (24) : 7359-7362, 2011.
6. Umeda IO, Tani K, Tsuda K, Kobayashi M, Ogata M, Kimura S, Yoshimoto M, Kojima S, Moribe K, Yamamoto K, Moriyama N, Fujii H: High resolution SPECT imaging for visualization of intratumoral heterogeneity using a SPECT/CT scanner dedicated for small animal imaging. *Ann Nucl Med.* 26 (1) : 67-76, 2012.

# パラフィンブロックの長期保存と採取試料の固定までの時間が与える Ki-67 免疫染色, DNA と RNA への影響

佐藤 正明<sup>1</sup>      小嶋 基寛<sup>1</sup>      永妻 晶子<sup>1</sup>  
中村 優香<sup>1</sup>      福田 幸子<sup>1</sup>      斉藤 典男<sup>2</sup>  
落合 淳志<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>国立がん研究センター東病院臨床開発センター臨床腫瘍病理分野, <sup>2</sup>同 大腸外科)

要旨: 近年既往のパラフィン包埋組織 (FFPE) が再発時の治療方針決定に利用されるようになり, 初発の組織が採取された後に再発するまでは年単位の時間が経過することも多い一方, FFPE の長期保存が与える経時的な質の劣化に関する報告は少ない。今回, 各年代の FFPE と組織採取から固定までの時間における Ki-67 と DNA, RNA を比較検討した。結果, 長期保存 FFPE の核酸は PCR 増幅成功率の低下がみられるため, 3 年以内の新しい検体を用い, 固定までの時間は組織学的な変化が観察される 6 時間以内が望ましいと考えられた。

キーワード: fixation, immunohistochemistry, DNA, RNA, formalin-fixed and paraffin-embedded

## はじめに

すべての臨床検査は, 解析前段階, 解析段階, 解析後段階の過程を経て臨床情報として報告される。固定や包埋は解析前段階に該当し, その後の結果に重要な影響を及ぼす段階である。近年, ホルマリン固定, パラフィン包埋 (FFPE) された原発腫瘍組織が, 年単位の時間を経過し再発した際の治療方針決定の目的で免疫染色や遺伝子解析等に広く利用されるようになってきている。一方, 固定液の種類, pH, 固定時間等, 解析前段階の違いにより, これらの検査結果は影響をうけるため固定条件の標準化が必要である<sup>1-3)</sup>。近年, 臓器やタンパク, 核酸ごとに固定条件のプロトコールが推奨されている<sup>4-6)</sup>。この検査ごとの標準化の流れは重要である一方, 検査の種類と推奨プロトコールが増えるほど, 多数かつ多種類の臓器を一括して扱うことを基本とする一般的な病理検査室の負担は大きい。我々は, 全国の一般的な病理検査室で広く利用できる固定液と固定時間のプロトコール作成を目的に, 解析前段階の検討を行ってきており, 均一な解析結果を提

出するために中性緩衝ホルマリンの使用と 1 週間以内の固定が重要であると報告してきた<sup>7)</sup>。一方で, 解析前段階に影響を与える因子はこの他にも多数考えられる。一般的に, 組織劣化を考慮すると組織採取から固定までの時間と FFPE 作製から解析までの検体保存期間は短いほうが現実を反映した結果がえられると考えられるが, 臨床的に影響がある劣化はどの程度で出現するかの検討は少ない。今回, 我々は組織採取から固定までと FFPE 作製から解析までの検体保存期間が Ki-67 陽性率と PCR, Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) の増幅成功率に与える影響に関して検討し, 当院における手術検体摘出から固定までの時間の現状を示した。

## 材料および方法

・組織採取から固定までの時間に関する検討  
組織採取から固定までの時間が病理組織標 5 本, Ki-67 (clone 30-9, ベンタナ) 免疫染色と DNA, RNA に与える影響を検討する目的で大腸癌の臨床診断で 2013 年に国立がん研究センター東病院で切除された 3 症例の腫瘍から 5 cm 以上離れた正常粘膜組織を採取した。採取された組織は 2.0×1.0 cm 大, 4 片に切り分け, 固定するまで大塚生食注 100 mL で室温放置した。1 時間, 3 時間, 6 時間, 24 時間放置した後に 10% 中性緩衝ホルマリンで 24~48 時間固定した。その後, これらの固定された組織から FFPE を作製, 室温保管 (遮光なし, 薄切後は表面をパラフィンコーティング)

Effect of Long-term storage of formalin-fixed and paraffin-embedded block, and effect of time before tissue fixation to histology, Ki-67, DNA and RNA analyses

Masaaki Sato<sup>1</sup>, Motohiro Kojima<sup>1</sup>, Akiko Nagatsuma<sup>1</sup>, Yuka Nakamura<sup>1</sup>, Sachiko Fukuda<sup>1</sup>, Norio Saito<sup>2</sup>, and Atsushi Ochiai<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Division of Pathology, Research Center for Innovative Oncology and  
<sup>2</sup>Colorectal and Pelvic Surgery Division, National Cancer Center Hospital East

後, Ki-67免疫染色, DNA, RNA の抽出を行った。

・FFPE 作製から解析までの検体保存期間に関する検討

国立がん研究センター東病院で保存されている2004年, 2007年, 2008年, 2009年, 2010年, 2013年の1~3月に切除された胃癌, 大腸癌症例各6例を抽出した。各症例に含まれる正常組織を含むFFPE (10%ホルマリン固定) を用いてKi-67免疫染色, DNA, RNAの抽出を行った。上記実験は2013年3月から2014年1月に施行した。

・免疫組織化学, DNA, RNA の抽出, PCR 増幅, DNA サイズ測定の方法

免疫染色は大腸正常粘膜組織4µmの切片を用いて, Ki-67 (30-9) で染色した。Ki-67 (30-9) 染色は推奨の染色プロトコールを用いてベンチマークウルトラ (ベントナ) で行った。染色されたスライドはバーチャルスライドスキャナ (NanoZoomer, 浜松ホトニクス) で取り込み, デジタル化した。Ki-67陽性率はhot spot法を用いて×40倍 (0.1mm<sup>2</sup>) 3視野で求めた。

DNAとRNAは, それぞれ10µmの切片を5枚使用し, QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (キアゲン) とRNeasy FFPE Kit (キアゲン) を用いて抽出した。

PCR酵素は, PrimeSTAR Max DNA Polymerase (タカラバイオ) を使用した。PCR条件は, DNA 1µL, プライマー 0.4µM, 10µL反応系, 98°C 10秒, 55°C 5

秒, 72°C 5秒, 35サイクルで増幅を行った。RT-PCRは, PrimeScript RT reagent Kit (Perfect RealTime, タカラバイオ) を使用し, random 6 mers を用いて, 37°C 15分, 85°C 5秒, 1サイクルで, total RNA から逆転写反応を行ってcDNAを調整した。増幅の成功は電気泳動により確認し成功率を算出した。使用したプライマーの配列は表1に示す<sup>8,9)</sup>。

DNAのサイズ分布を比較するために, 2100バイオアナライザー (アジレント・テクノロジー) を用いて, Agilent High Sensitivity DNA キットで測定した。

なお, 本検討はあらかじめ倫理委員会の承認を得て行い, 国立がん研究センターの包括同意書に同意が得られた患者を対象として施行した (倫理審査委員会承認研究課題番号021-080)。

結果

・FFPE 作製から解析までの検体保存期間に関する検討

DNAとcDNAのPCR成功率は, FFPEの保存期間が長くなるにつれて低下する傾向がみられた。大腸と胃のDNAは, 2013年と比較して2010年は同等に高いPCR成功率であったが, 2009年から低下がみられた。2008年以前では, 142bpと307bpで低いPCR成功率となり, 500bpのPCRでは増幅されなかった (図1a, b)。大腸の142bpのcDNAのPCR成功率は,

表1: プライマー情報

プライマー	配列	増幅産物 (bp)
DNA		
ACTB 142-F	5'-CCTGTGTTATCTTGGAGGTCCCCTGAAG-3'	142 bp
ACTB 142-R	5'-ACCGTĀGAGTGGTCACTCAATGAAG-3'	
ACTB 307-F*	5'-CTTGAGGAGGTGGGAAGGGACTATTGG-3'	307 bp
ACTB 307-R*	5'-CCCCTACCCCAACTTGACTTTGATTCCA-3'	
GAPDH 500-F*	5'-GAAAAGGACATTTCCACCGCAAAATGGC-3'	500 bp
GAPDH 500-R*	5'-GGTCAGAAATTAAC TGGACAGGGCAAGC-3'	
cDNA		
ATP5F1-F	5'-GAAGCAGGCTTCCATCCAACA-3'	142 bp (1)
ATP5F1-R	5'-TCGTTCCCGTAAGTAACTTCCAA-3'	
GAPDH 142-F	5'-GCACCGTCAAGGCTGAGAAC-3'	142 bp (2)
GAPDH 142-R	5'-ATGGTGGTGAAGACGCCAGT-3'	
TBP 161-F*	5'-GGGCACCACTCCACTGTAT-3'	161 bp
TBP 161-R*	5'-CACGAAGTGCAATGGTCTTT-3'	
TBP 252-F*	5'-GGGAGCTGTGATGTGAAGTTT-3'	252 bp
TBP 252-R*	5'-TGAGAGCCATTACGTCGTCT-3'	

ACTB, β-actin; GAPDH, glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase; TBP, TATA-binding protein; ATP5F1, ATP synthase, H<sup>+</sup> transporting, mitochondrial Fo complex, subunit B1.

\*: 文献より

2013年と比較して2008年までは高めに推移したが、2007年と2004年で低下する傾向を示した。2010年以前で161bpはほとんど増幅されず、252bpではまったく増幅されなかった(図1c)。胃のcDNAのPCR成功率は、ばらつきはあるが、2013年と比較して2010年ですでに低下しており、252bpでは増幅されなかった(図1d)。同様にDNAサイズの分布の検討において、2013年の大腸癌の検体では10,380bp近傍から蛍光が減弱したのに対して、2009年の検体では300bp付近にピークが出現し、2004年では200bp付

近にピークが出現しており、徐々に分解されていることが示された(図1e, f, g)。2004年の胃のDNAのサイズは150bp付近にピークがみられ、胃のDNAが大腸より分解されていることを示した(図1g, h)。

Ki-67(30-9)陽性率は、2004年から2013年において、明らかな差はみられなかった。

・組織採取から固定までの時間に関する検討

通常の組織観察において、固定までの時間が1時間と3時間では標本に影響がみられなかったが、6時間では粘膜の表層上皮で剥脱がみられた。24時間で、

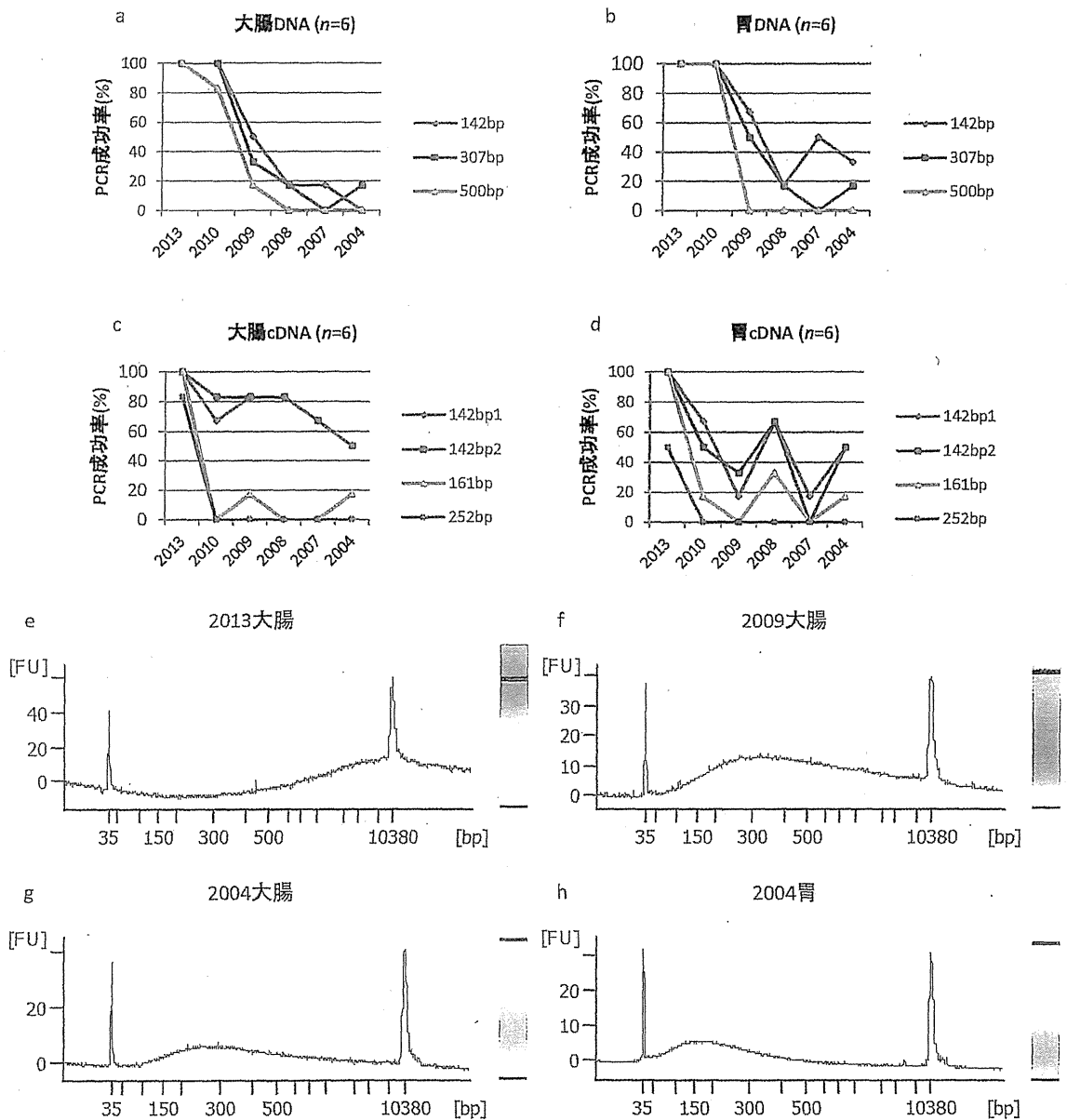


図1: パラフィンブロックにおける長期保存の核酸への影響。a, b: 2013~2004年に作製したパラフィンブロックから抽出したDNAのPCR成功率。c, d: 2013~2004年に作製したパラフィンブロックから抽出したRNA由来cDNAのPCR成功率。e~h: 2013, 2009, 2004年のパラフィンブロックから抽出したDNAのサイズ分布。

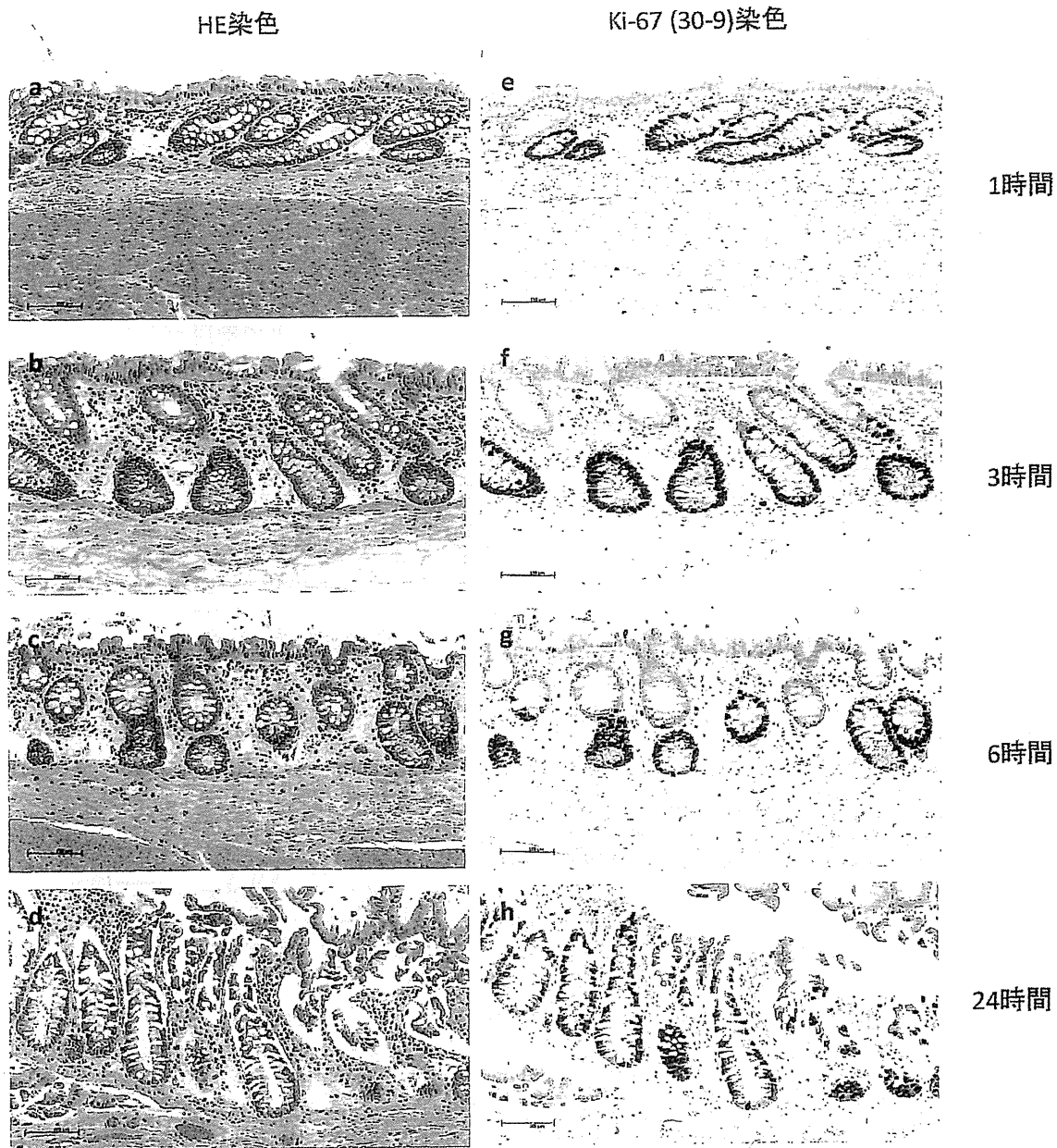


図2：組織採取から固定までの時間の病理組織標本への影響。a~d：HE染色。e~h：Ki-67 (30-9)染色。a, e：固定までの時間1時間。b, f：固定までの時間3時間。c, g：固定までの時間6時間。d, h：固定までの時間24時間。バー：100  $\mu$ m。

剥脱の範囲は腺管全体にまで及んだ。粘膜筋板、粘膜下層においては、組織学的変化は乏しかった(図2)。

Ki-67 (30-9)の染色性は良好で、明らかな違いはみられなかった。500 bpまでのDNAと252 bpまでのcDNAのPCRはすべて増幅された。

当院における現状調査(2013年4月~7月)において、ほとんどのケースでは組織採取から3時間以内に固定されていたが、固定までの時間が6時間のケースもみられた(図3)。

#### 考 察

今回の検討から、FFPEを長期保存すると、抽出したDNAのPCR成功率が低下することが示された。DNAにおける2100バイオアナライザーの測定結果も、FFPEの年代が古くなるにつれて、グラフの山が左側にシフトしているため、分解が進行し、それに従ってPCRの成功率も低下していると考えられる。文献的には過去数十年前のFFPEからの遺伝子増幅に成功した報告もされている。一方、臨床検査においてはすべての検体において安定した評価を行う必要性があり、3



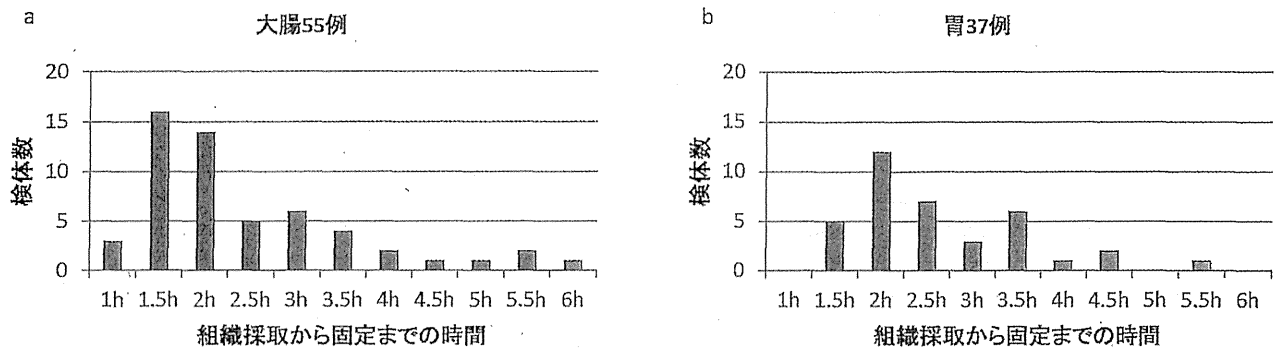


図3: 国立がん研究センター東病院における組織採取から固定までの時間。a: 大腸 55 例。B.: 胃 37 例。

年以上経過した FFPE で PCR 成功率が低下し, DNA の断片化が進行している結果は注目すべきと考える<sup>10)</sup>。PCR 条件やプライマーの配列を検討することにより, PCR を用いた遺伝子増幅の成功率は改善する可能性が考えられるが, 一定の結果が得られるかは明らかでなく, 断片化の少ない検体を使用することは重要と考える<sup>11)</sup>。DNA の分解率と RNA の品質維持期間は胃と大腸で異なり, 胃は大腸より DNA の分解率が高く, RT-PCR に対する mRNA の品質維持期間も短い傾向がみられた。組織採取から固定までの時間はほぼ6時間以内と思われるが, 今回の結果には内因性, 外因性の複数の原因があると思われ, 今後検討する必要がある。免疫染色では, Ki-67 (30-9) の染色性に明らかな低下がみられなかったことから, 少なくとも本抗体 (30-9) は長期保存 FFPE でも使用可能と考えられる。一方で, 抗体による影響の差も考えられ, さらなる検討が必要と考える。

組織採取から固定までの時間に関する検討において, その時間が長くなると, まず組織形態像の変化が出現することが判明した。組織採取から6時間で, 表層上皮の剥脱が認められ, 次第に程度が悪化した。組織採取から固定までの時間が長くなると, 標本の観察が困難となり, 診断に影響を及ぼすことが考えられる。これまでの固定液や固定時間の研究と同様, 固定までの時間も固定条件の重要な要素と考えられてきたが, 固定までの時間の明確な目安は提案されていなかった。特に手術検体は組織採取された後にリンパ節のクリアランスなどで固定までの時間が必要なことがある。我々の施設の調査においても, 組織採取から固定まで長時間かかる事があり, その現状も踏まえると組織採取後6時間以内での固定開始が実践的な目安として推奨されると考える。一方, 乳癌領域では1時間以内の固定を推奨している文献があり, 他の臓器および抗体を用いた検討をしていくべきと考える<sup>12,13)</sup>。また,

組織採取から固定までの時間が臨床的に影響を与えることを認識してもらい, 速やかな固定が行われることを希望する。

#### まとめ

FFPE は, 作製後 DNA, RNA の劣化が進むことが判明した。病理診断において一定の結果を報告するために DNA では3年以内の使用が推奨される。また, 病理標本の劣化を考慮し, 組織採取から6時間以内に組織を固定することが推奨される。

#### 文献

- 1) Zarbo RJ, The oncologic pathology report. Quality by design. Arch Pathol Lab Med. 2000; 124: 1004-1010.
- 2) Matsuda Y, Fujii T, Suzuki T, Yamahatsu K, Kawahara K, Teduka K, et al. Comparison of fixation methods for preservation of morphology, RNAs, and proteins from paraffin-embedded human cancer cell-implanted mouse models. J histochem Cytochem. 2011; 59: 68-75.
- 3) Nykänen M, Kuopin T. Protein and gene expression of estrogen receptor alpha and nuclear morphology of two breast cancer cell lines after different fixation methods. Exp Mol Pathol. 2010; 88: 265-271.
- 4) Wolff AC, Hammond ME, Schwartz JN, Hagerty KL, Allred DC, Cote RJ, et al. American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer. Arch Pathol Lab Med. 2007; 131: 18-43.
- 5) Dowsett M, Nielsen TO, A'Hern R, Bartlett J, Coombes RC, Cuzick J, et al. Assessment of Ki67 in breast cancer: recommendations from the International Ki67 in Breast Cancer working group. J Natl Cancer Inst. 2011; 103: 1656-1664.

- 6) Nofech-Mozes S, Vella ET, Dhesy-Thind S, Hanna WM. Cancer care ontario guideline recommendations for hormone receptor testing in breast cancer. *Clin Oncol.* 2012 ; 24 : 684-696.
- 7) Sato M, Kojima M, Nagatsuma AK, Nakamura Y, Saito N, Ochiai A. Optimal fixation for total pre-analytic phase evaluation in pathology laboratories. A study including immunohistochemistry, DNA, and mRNA assays. *Pathol Int.* 2014 ; 64 : 209-216.
- 8) Ludyga N, Grünwald B, Azimzadeh O, Englert S, Höfler H, Tapio S, *et al.* Nucleic acids from long-term preserved FFPE tissues are suitable for downstream analyses. *Virchows Arch.* 2012 ; 460 : 131-140.
- 9) Takano EA, Mikeska T, Dobrovic A, Byrne DJ, Fox SB. A multiplex endpoint RT-PCR assay for quality assessment of RNA extracted from formalin-fixed paraffin-embedded tissues. *BMC Biotechnol.* 2010 ; 10 : 89.
- 10) Wang W, Kumar P, Schwarz M, Malone G, Haworth A, Kumar S. PCR amplification of 40 year-old paraffin-embedded tumour tissues : Comparison of four different DNA extraction and purification methods. *Int J Oncol.* 1994 ; 5 : 453-457.
- 11) Dietrich D, Uhl B, Sailer V, Holmes EE, Jung M, Meller S, *et al.* Improved PCR performance using template DNA from formalin-fixed and paraffin-embedded tissues by overcoming PCR inhibition. *PLoS One.* 2013 ; 8 : 10 : e77771. doi: 10.1371/journal.pone.0077771
- 12) Fitzgibbons PL, Dillon DA, Alsabeh R, Berman MA, Hayes DF, Hicks DG, *et al.* Template for reporting results of biomarker testing of specimens from patients with carcinoma of the breast. *Arch Pathol Lab Med.* 2014 ; 138 : 595-601.
- 13) Yildiz-Aktas IZ, Dabbs DJ, Bhargava R. The effect of cold ischemic time on the immunohistochemical evaluation of estrogen receptor, progesterone receptor, and HER2 expression in invasive breast carcinoma. *Mod Pathol.* 2012 ; 25 : 1098-1105.

別刷請求先 :

〒 277-8577 千葉県柏市柏の葉 6-5-1

国立がん研究センター東病院臨床開発  
センター臨床腫瘍病理分野  
落合 淳志

(論文受付 2014年 8月 19日)

(採用決定 2014年 11月 17日)

