

第3回

TRCフォーラム
招待講演

癌の微小転移診断と その臨床応用

大阪大学大学院 病態制御外科

藤原義之 先生



東ソー株式会社

TOSOH

藤原義之 (ふじわらよしゆき)

大阪大学大学院 病態制御外科

経歴

昭和62年3月 大阪大学医学部医学科 卒業
昭和62年7月1日 大阪大学医学部第二外科
昭和63年7月1日 大阪通信病院外科
平成3年7月1日 大阪大学医学部第二外科
平成4年1月1日 (財) 癌研究所生化学部 研究員
平成7年10月1日 米国 ジョンウェイン癌研究所 研究員
平成10年5月1日 大阪大学医学部第二外科
平成11年6月16日 大阪大学大学院 病態制御外科学助手

所属学会等

外科学会専門医、消化器外科学会専門医、食道学会評議員

第3回 TRCフォーラム

日 時：2003年7月4日

場 所：ホテル西洋銀座 イントラ

主 催：東ソー株式会社 科学計測事業部

大阪大学で消化器外科医をしており、主に癌の治療を行なっております。日常の診療において、従来の顕微鏡を用いた病理検査では見逃される微小転移が存在し、このために手術後の癌の再発を来すということを数多く経験しております。教室では5年前から微小転移診断を臨床に使うプロジェクトを立ち上げております。その内容とともに、TRC (transcription reverse transcription concerted reaction) 法を用いた微小転移診断のpreliminaryなデータを併せて紹介致します。

癌の微小転移診断とその臨床応用

大阪大学大学院 病態制御外科
藤原義之

1. 癌の微小転移とは

微小転移は「従来の病理学的診断では検出できない微小な転移」と定義されています。微小転移の存在を考慮し、外科医は腫瘍範囲の拡大手術を行っています。つまり、微小転移の診断ができないために、実際には転移の無い方でも拡大手術を行ってきたわけです。10年ぐらい前から微小転移を診断する方法が開発され、臨床的意義があるとの報告がされてきました。また、TMN分類（世界的な癌の取扱い規約）の第6版（2002年度版）にも、微小転移の概念が加えられ、病理学的にはリンパ節転移がないが分子レベルでは存在する場合の記載法が決められました [pN0 (mol+)]。このように癌

1. 癌微小転移とは？

「従来の病理学的診断では検出できない微小な転移」

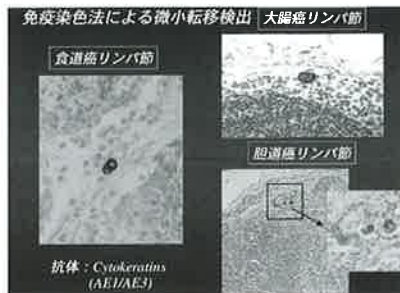
UICC (International Union Against Cancer)
TNM 分類 第6版 (2002年)

Isolated Tumor Cells (遊離癌細胞) の概念
例えば pN0 (mol+) 分子生物学的手法にて検出
pN0 (I+) 免疫染色法にて検出

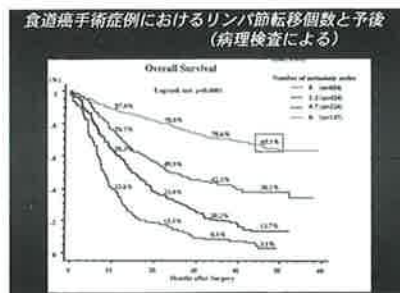
癌診療を行っていく上で無視できない存在

の診療を行っていく上で、微小転移というのは無視できない存在となっています。

これはサイトケラチンに対する抗体を用いて免疫染色を行なった顕微鏡写真です。病理学的に「転移なし」と診断されたリンパ節でも、微小な癌細胞が検出されています。



食道癌手術症例におけるリンパ節転移の個数と予後の関係のグラフです。リンパ節転移が0個のものから8個以上のもので、有意に予後が分かります。しかし、「リンパ節転移なし」と診断されたものでも5年生存率は65%しかありません。これは実際には微小転移があったことを示唆しています。²⁾



我々の施設において、病理学的検査で「リンパ節転移なし」と診断された症例を免疫染色法で検討し、その判定別に予後を調べました。このグラフのように、免疫染色の判定で生

食道癌pN0症例における微小転移の意義



存率に有意な差が認められました。(未発表データ)

2. 微小転移検出法とその問題点

微小転移の検出には、正常細胞では少量の発現、または全く発現しないが、癌細胞で高頻度、高発現する分子や遺伝子をマーカーとします。繁用されている方法は、タンパク質を調べる免疫染色法とmRNAを測定するRT-PCR法です。

免疫染色法は、比較的手技が簡単でコストが安価であるものの、判定基準が一定ではないという問題があります。我々の研究室を含めた12施設での検討から、微小転移に関する免疫染色の陽性と陰性を比較したところ、予後に有意の差が認められないという結果が得られたことがあります。実際には、病理医の判定基準が一定でないことが原因でした。

一方、RT-PCR法には、手技が煩雑で高価であり、さらに、感度が機器・試薬・プライマーによって異なるという問題があります。

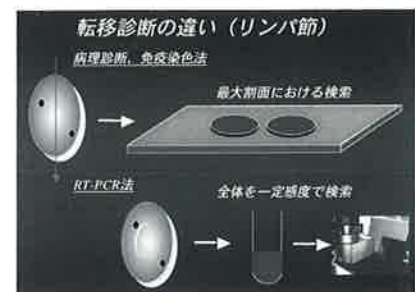
2. 微小転移検出法とその問題点

癌細胞で高発現し、正常組織で発現していない分子、遺伝子をマーカーとして用いる。

現在、繁用されている方法は

1. 免疫染色法 比較的手技が簡単、安価、判定基準が一定ではない。
2. RT-PCR法 手技が煩雑、高価、感度が機器、試薬、primerで異なる。

二つの方法の違いを示します。免疫染色法は、病理診断と同様に、リンパ節の最大割面上に癌細胞があるか無いかを顕微鏡で検査します。従って、偏在するような小さな癌転移に関しては全て見逃されてしまいます。一方、RT-PCR法はリンパ節を潰

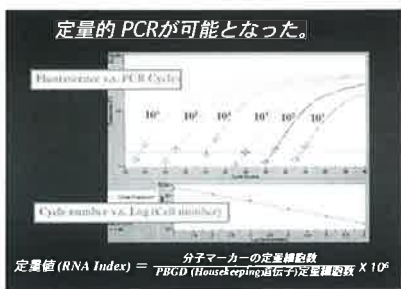


し、全体を一定の感度で検索するため、癌転移の見逃しは少なくなります。

しかし、PCR法にも偽陽性が存在するという問題があります。サイトケラチン20の発現を正常人の血液とリンパ節で見比べてみると、従来のPCRでは、35サイクルでは発現を全く認めませんが、40サイクルでは偽陽性が出てきます。また、RT酵素を変えても感度が一桁違ってきます。さらに、結果の再現性に乏しく、同じ検体を測定しても陽性になったり、陰性になったりします。¹¹⁾

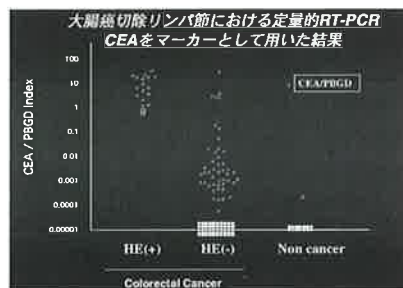


従来のPCRはこのような問題を抱えていました。よって、臨床応用を考え、定量的なPCRを行うこと、迅速化が必要ということで、5年前に当時発売されたばかりのLightCyclerを採用しました。本システムはガラスキャピラリーを用い、空調による高速サーマルサイクリングが可能で短時間でPCRが行え、さらに、リアルタイム蛍光検出により定量的解析ができます。



実際に、大腸癌で切除したリンパ節を半割して、一方を病理診断で、他方を定量的RT-PCRで診断しました。病理診断で陽性だった一群はCEA mRNAが非常に高値を示してい

ます。病理診断で陰性と診断された一群では、CEA mRNA量が低いのですが、病理診断陽性例と同じぐらい高値を示しているものや中程度のものがあります。一方、癌患者以外から取ったリンパ節では、CEA mRNAは低値を示しています。このように定量性があることからカットオフを設定することで判定がより正確に出来る利点があります。¹²⁾



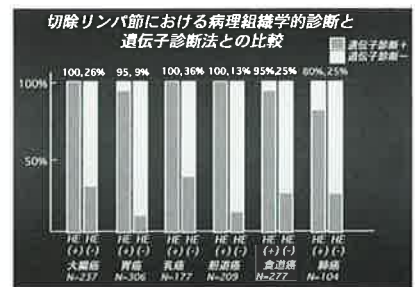
我々の施設で採用している微小転移診断のための遺伝子マーカーです。正常細胞では発現が少なく、癌細胞で高発現しているマーカーを各種癌で数種類選択し、それらを組合わせて微小転移診断する方法を確立しました。¹³⁾ 胃癌から肺癌まで、CEAはほとんどの癌に有効なマーカーです。しかし、腫瘍heterogeneityのため、CEAだけの測定ですと見落としもできます。そこで、他のマーカーも組合せて行っています。病理診断で転移なしと診断されたリンパ節のうち、これらのマーカーを用いたRT-PCRを行うと、9%~36%の頻度で微小転移が見つかりました。

微小転移診断のための遺伝子マーカー

癌の種類	Multiple-marker	微小転移陽性率 (%) 検査リンパ節数
胃癌	CEA, CK-20, Mage-3	9 % / 306
大腸癌	CEA, CK-20	26 % / 237
食道癌	CEA, SCC, Mage-3	25 % / 277
乳癌	Mammaglobin-A, -B, CEA	36 % / 177
胆道癌	CEA, Mammaglobin-B	13 % / 209
肺非小細胞癌	LUNX, CEA	21 % / 104

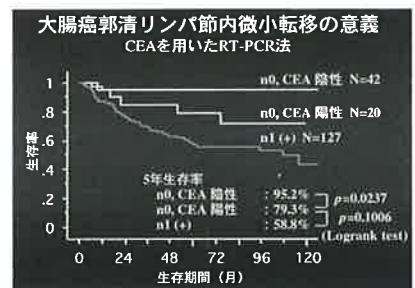
これは病理診断陽性/陰性別に遺伝子診断での陽性率を比較したものです。大腸癌、乳癌、胆道癌では病理診断で陽性だったものは遺伝子診

断で100%陽性となっています。しかし、胃癌のように病理診断で陽性であっても遺伝子診断で100%になっていないものもあり、遺伝子診断でも100%にならないことがあることも、認識しておく必要があります。

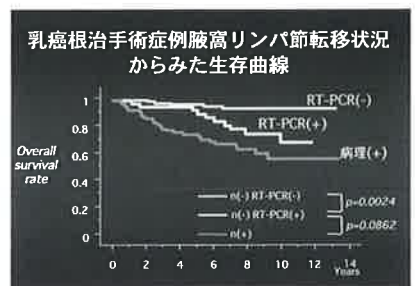


3. 微小転移診断の臨床的意義

これは大腸癌手術時に切除したリンパ節をRT-PCR法で検索し、その結果を患者の予後と比較したグラフです。病理診断陽性、病理診断陰性で遺伝子検査陽性、病理診断・遺伝子検査ともに陰性で予後を整理すると、このように有意の差が認められます。¹³⁾

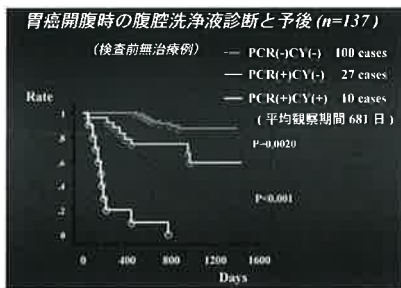


同様に、乳癌根治手術症例で腋窩リンパ節を調べたものです。病理陰性のものを遺伝子診断で陽性と陰性に分けますと有意差を持って予後に差が出てきます。¹⁴⁾



これは胃癌の術後の予後を示したものです。進行胃癌では癌細胞が胃壁から腹腔内に脱落し、腹膜に高頻度に転移します。胃癌手術の時に腹腔内を生理食塩水で洗い、その中の癌細胞の有無を検査します。これは胃癌取扱規約に載っている重要な検査です。顕微鏡検査により腹腔内に癌細胞が検出された場合、予後は著しく悪くなっています。一方、癌細胞が無いと診断されても、遺伝子診断で陽性と陰性に分けると予後に有意差が出てきます。¹⁵⁾

このように、mRNAを用いた遺伝子検査で検出される微小転移には、臨床的意義が存在することがわかってきました。



4. 微小転移診断法の臨床応用について

この微小転移診断法の臨床応用には三つの方向性が考えられます。

一つは癌の性格診断です。切除したリンパ節、あるいは血液や骨髄中における微小癌細胞を検出し、その癌が転移する性格であるか否かを診断して、補助療法（抗癌剤治療など）の必要性を判断します。ただし、微小転移に対する補助療法は確立していませんので、今後の検討が必要です。

二つ目は手術中に癌の進展度を迅速診断することであり、リンパ節の郭清範囲の決定に利用します。現在、外科領域でトピックになっている Sentinel node（原発巣から癌細胞が最初に流れていくリンパ節）の検査です。Sentinel nodeを調べて転移が無ければ、その患者さんはリンパ節転移が無いと判断し、リンパ節の切除を省略できるという仮説があります。乳癌やメラノーマで最初に導入

された方法ですが、今では、我々の教室を含めて、消化器癌への応用が検討されています。

三つ目は、胃癌に関してですが、残存する微小転移の診断です。腹腔内の微小癌細胞を検査し、腹膜再発が予想される場合、補助療法を追加します。

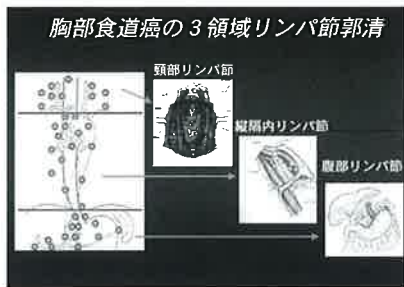
このうち、我々が実際にやっているのは二つめの術中迅速微小転移診断と三つめの胃癌の腹腔内残存微小転移診断です。

癌微小転移診断の臨床導入

- 癌の性格診断 → 予後因子
切除したリンパ節中の微小転移
血液、骨髄中の微小癌細胞
補助療法の追加?
- 術中迅速癌進展度診断
リンパ節郭清範囲の決定
Sentinel node navigation surgery
- 残存微小転移診断
腹腔内微小癌細胞 → 腹膜再発予測

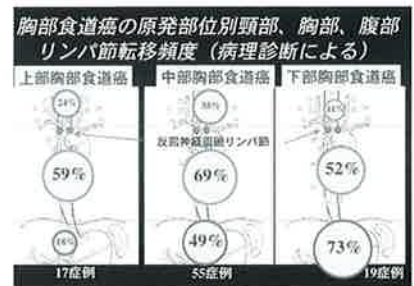
(術中微小転移診断：食道癌)

食道癌は悪性度が高く、初期段階から頸部、縦隔内、腹部のリンパ節に転移しやすい傾向にあります。全ての領域（3領域）のリンパ節を切除するのが標準術式となっています。しかし、この手術は、非常に侵襲が大きく、特に頸部の郭清では嚥下障害が出現したり、声帯に關与する神経を損傷することにより声がかすれたりします。



食道癌の原発部位別に頸部、胸部、腹部のリンパ節の転移頻度を示しています。丸の数字は転移する確率で、どの部位でも3領域に渡って転移の確率が高く、全ての部位を郭清する必要があります。しかし頸胸境界部に位置する106番のリンパ節を術中に診断して、ここに転移が無けれ

ば頸部の郭清をやめるという検討をしています。



方法はLightCyclerを用いた定量的遺伝子検査法で、CEA、SCC、MAGE-3の3種類のmRNAを遺伝子マーカーとして組合せました。まず開胸し、106番のリンパ節を切除します。これを半割して半分を病理診断、半分を遺伝子診断に用いました。

50例を実施したところ、病理診断が陽性だった11例のうち10例（91%）で遺伝子診断陽性でした。また、病理診断陰性の39例中、15例（38%）が遺伝子診断で陽性でした。

術中迅速診断結果（病理診断 V.S. 遺伝子診断）

病理診断	遺伝子診断	例数
+	+	10
+	-	1
-	-	15
-	+	3
Sum		29

病理診断陽性 91%
病理診断陰性 38%
遺伝子診断陽性

これは、頸部リンパ節も含めた3領域郭清症例で、106番リンパ節の術中診断の結果を頸部転移と比較したものです。106番リンパ節術中診断で病理診断陰性13例において頸部転移が認められたものが3例ありました。一方、遺伝子診断を用いると、頸部転移の認められた9例すべてを陽性と判定でき、転移の見落としが少なくなることがわかります。

3領域LN郭清例における106recLN術中診断と頸部LN転移との関係

106recLN	106LN転移	例数
+	+	6
+	-	5
-	-	3
-	+	10
術中迅速診断陽性		9
術中迅速診断陰性		9
遺伝子診断陽性		10
遺伝子診断陰性		6

遺伝子診断で106recLN転移と一致すれば、頸部LN転移と一致する

食道扁平上皮癌50症例を対象にした検討で、病理診断と遺伝子診断が両方陽性だったものは6例に頸部リンパ節転移がありました。病理診断陰性で遺伝子診断陽性だったものにも、転移（3例）や再発（1例）がありました。しかし、遺伝子診断陰性のものには、転移や再発は認められませんでした。このように、遺伝子診断陰性であれば頸部リンパ節転移や再発はなく、頸部リンパ節の切除は省略が可能であることがわかりました。¹⁶⁾

また、過去には、病理診断のみの診断しか実施せず、頸部に再発した症例があります。そのうち2例を遺伝子診断で再検すると106番のリンパ節に転移があったことが判明し、遺伝子診断を導入していれば再発はなかっただろうと考えられる症例も経験しています。

術中迅速遺伝子診断結果とその転移

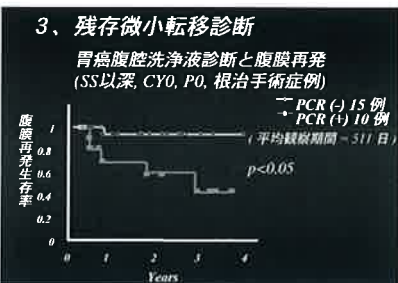
病期診断	食道扁平上皮癌 50 症例			
	陽性 11 症例		陰性 39 症例	
遺伝子診断	陽性 1 症例	陽性 10 症例	陽性 15 症例	陰性 24 症例
LN 転移	3 領域 1 症例	3 領域 10 症例	3 領域 8 症例	2 領域 5 症例 3 領域 19 症例
頸部 LN 転移	0 例	6 例	3 例	0 例
頸部再発			10 例	0 例

頸部 LN 転移・再発

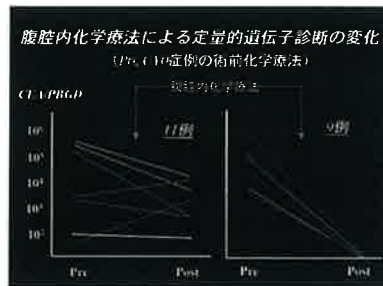
遺伝子診断 (+) 10/25 (40.0%)
遺伝子診断 (-) 0/25 (0%)

(残存微小転移診断：胃癌)

胃癌患者の開腹時の腹腔洗浄液を検査し、病理診断は陰性であった25例に対して、遺伝子診断の結果と腹膜再発の関係をみた結果です。遺伝子診断陰性の15例での再発は1例のみでしたが、遺伝子診断陽性だった10例のうち6例に腹膜で再発が起きています。これは従来の病理検査では分からなかったものです。



遺伝子診断陽性の場合、根治手術を行ったとしても高頻度に腹膜再発がおこることがわかりました。従って、我々は術前に腹腔洗浄液を採取し、遺伝子診断陽性ならば腹腔内に癌細胞が残っている確率が高いと考え、術前に腹腔内に抗癌剤を投与します。それから開腹手術を行い、腹腔洗浄液を採取し再度遺伝子診断を行ない治療効果を見てみました。このグラフは、手術前に遺伝子検査陽性で、化学療法を行うとCEAmRNA定量値は大体下がることを示しています。開腹手術時に陽性だったのが11例、陰性化したものが9例ありました。



その予後を比較すると、化学療法の前で遺伝子診断の結果が陽性から陰性になった場合には、予後が改善されることがわかります。それに対し、化学療法後も陽性なのは再発する可能性が高い結果となっています。このことは、定量的遺伝子診断の推移を見ることにより、抗癌剤の効果判定ができる可能性があることを示しています。



5. PCRからTRCへ

ここまでお話ししたPCR法には、時間的制約があること、実験手技が煩雑であること、サーマルサイクラーの温度変化に伴う増幅効率の不均一性などがあります。これらの問題点の解決に向け、TRC法を用いた癌微小転移診断法を確立しました。

PCRを基盤にした癌微小転移診断の問題点

- 1) 時間的制約
- 2) 実験手技の煩雑さ
- 3) 微妙なThermal cyclerの温度変化にともなう増幅効率の不均一性

今回全く新しいRNA増幅システム TRC (転写、逆転写増幅法、Transcription-Reverse transcription Concerted Reaction) を導入し、さらに迅速で簡易な遺伝子診断の手技を確立したので報告する。

TRCとPCRの比較です。迅速性は、LightCyclerを用いたPCR法で全工程180分かかります。食道癌の手術は長い手術なのでそれでも間に合いますが、手術時間が短い胃癌や大腸癌には応用できません。一方、TRCはRNA抽出が50分、TRC反応が30分、全工程80分で結果が出ますので比較的短い手術でも手術中に結果を出すことができます。ただ、RNA抽出に関しては、もう少し短くなる余地があると思われます。手技の簡略性については、TRCは2種類の試薬を混ぜるだけと非常に簡略です。この簡便性は検査手技として確立する上で非常に重要なことです。

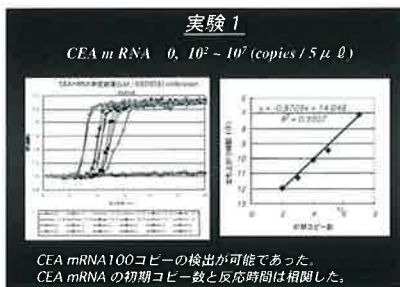


増幅反応に関しても42℃と一定温度で増幅され、増幅されたRNAを蛍光プローブで検出します。

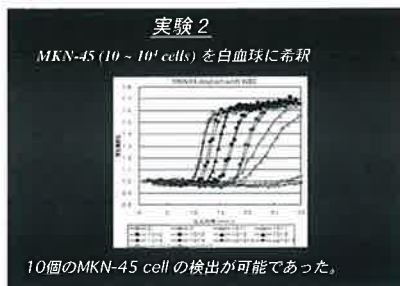


TRCを用いた癌微小転移診断をCEA mRNAをマーカー遺伝子として検討しました。

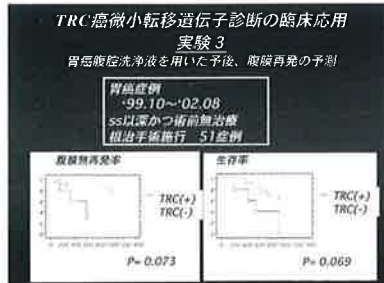
まず、CEA mRNA (全長) の希釈系列を用いてTRCの定量性と感度を検討しました。CEA mRNA100コピーまで検出可能でした。また、CEA初期コピー数と反応時間には相関があり、右側の図のように検量線が作成できます。



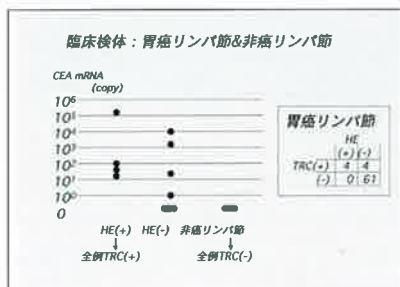
次に、胃癌の細胞株MKN-45を白血球で希釈して、検出限界を検討しました。10個の胃癌細胞の検出が可能でした。



実際の臨床材料として胃癌腹腔洗浄液を用いた予後・腹膜再発の予測の検討をおこないました。根治手術を行った51症例の検討では、TRC陽性では腹膜の再発率も高く、予後も悪いという結果でした。



次に、胃癌のリンパ節転移診断について検討しました。胃癌手術で切除されたリンパ節を用いて病理診断とTRC結果を比較しました。病理診断にて転移ありとされたリンパ節は、すべてTRC陽性であり、病理診断陰性であったリンパ節の中にTRC陽性のリンパ節がありました。一方、癌以外の手術で切除されたリンパ節では、TRCは陰性となりました。TRCにより、微小転移を検出できていることが示唆されました。



【対象】

腹腔鏡下胃切除術症例で、色素法を施行した8症例中 Sentinel node が同定された、7症例、13サンプル

症例	進行度	リンパ節 No.	病理 (HE)	TRCによる CEA mRNA copy 数
1	T3,N1,StageIIA	3	(+)	0
2	T1,N0,StageIA	4d	(-)	1,74
		4d	(+)	0
3	T1,N0,StageIA	4d	(-)	0
		3	(-)	0
4	T1,N0,StageIA	6	(-)	0
5	T1,N0,StageIA	3	(-)	0
		3	(-)	0
6	T1,N0,StageIA	1	(-)	0
7	T1,N0,StageIA	3	(-)	0

術中迅速リンパ節転移診断では、これまでに、7例で実施しています。胃癌のセンチネルノードを緑色の色素で検出し、ピックアップして、それを半割してTRC反応を行いました。全工程が80分で、全例が術中に結果が返ってきました。結果に関しても病理診断を上回る結果となっておりますが、有用性については今後の検討が必要と考えています。



まとめですが、今回我々はPCRとは異なる新しいRNA増幅システムTRCを用いた癌微小転移遺伝子診断法を確立しました。この方法を用いた胃癌腹腔洗浄液遺伝子診断は予後・腹膜再発の予測に有用でした。また、従来のRT-PCRと比較して迅速性・簡略性に優れており、胃癌の術中迅速リンパ節転移診断が可能となりました。

- 1) 今回我々は、PCRとは異なる新しいRNA増幅検出システム (TRC) を用いた癌微小転移遺伝子診断法を確立した。
- 2) この方法を用いた胃癌腹腔洗浄液遺伝子診断は、予後・腹膜再発の予測に有用であった。
- 3) 胃癌の術中迅速リンパ節転移診断が可能となった。
- 4) 従来のPCRを基盤とした遺伝子診断と比較し、迅速性、簡略性、反応の安定性に優れており、今後、癌微小転移診断法の一般化に貢献するものと思われる。

最後に、RT-PCRとTRCの比較をしました。検査の簡略性および迅速性はTRCの方が優れています。定量性、再現性に関しては現在検討中ですが、(逆転写反応工程がない分) TRCが優れていると考えています。実験機器として考えると、プライマーが自由に設計できる、反応条件も検討できる、という点でPCRの方が有用です。しかし、PCRは細かい調整ができるために実施者によって性能が変わってしまいます。臨床の現場では、TRCの方が有用ではないかと考えています。

RT-PCR (LightCycler) と TRC の比較

	RT-PCR	TRC
検査法の簡略性	X	O
迅速性	O	OO
定量性	O	OOO
再現性	O	OOO
実験機器として	OO	O
検査機器として	O	OO

文献

1. L.H. Sobin and Ch. Wittekind, TNM classification of malignant tumours, Sixth edition, Wiley-Liss, 2002
2. The Japanese Society for Esophageal Diseases, Comprehensive Registry of Esophageal cancer in Japan, Second edition, 2001
3. 藤原義之 他 術中迅速遺伝子診断法の確立と外科治療への臨床応用 消化器外科 23: 1675-1682, 2000
4. Miyake Y, Fujiwara Y, Ohue M, Yamamoto H, Sugita Y, Tomita N, Sekimoto M, Shiozaki H, Monden M. Quantification of micrometastases in lymph nodes of colorectal cancer using real-time fluorescence polymerase chain reaction. *Int J Oncol* 2000 Feb;16 (2):289-93
5. Aihara T., Fujiwara Y., Ooka M., Sakita I., Tamaki Y., Monden M. Mammaglobin B as a novel marker for detection of breast cancer micrometastases in axillary lymph nodes by reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *Breast Cancer Research and Treatment* 58: 137-40, 1999
6. Aihara T., Fujiwara Y., Miyake Y., Okami J., Okada Y., Iwao K., Sugita Y., Tomita N., Sakon M., Shiozaki H., Monden M. Mammaglobin B gene as a novel marker for lymph node micrometastasis in patients with abdominal cancers. *Cancer Letters* 150: 79-84, 2000
7. Okami J., Dohno K., Sakon M., Iwao K., Yamada T., Yamamoto H., Fujiwara Y., Nagano H., Umeshita K., Matsuura N., Nakamori S., Monden M. Genetic detection for micrometastasis in lymph node of biliary tract carcinoma. *Clin. Cancer Res* 2000 Jun;6 (6):2326-32
8. Miyamoto A., Fujiwara Y., Sakon M., Nagano H., Sugita Y., Kondo M., Eguchi H., Dono K., Umeshita K., Nakamori S., Monden M., Development of a multiple marker RT-PCR assay for detection of micrometastases of hepatocellular carcinoma *Dig. Dis. Sci.* 45: 1376-1382, 2000
9. Iwao K., Watanabe T., Fujiwara Y., Takami K., Kodama K., Higashiyama M., Yokouchi H., Ozaki K., Monden M., Tanigami A., Isolation of a novel human lung-specific gene, LUNX, a potential molecular marker for detection of micrometastasis in non-small cell lung cancer. *Int. J. Cancer* 91: 443-437, 2001
10. Okada Y, Fujiwara Y, Yamamoto H, Sugita Y, Yasuda T, Doki Y, Tamura S, Yano M, Shiozaki H, Matsuura N, Monden M. Genetic detection of lymph node micrometastases in patients with gastric carcinoma by multiplemarker reverse transcriptase-polymerase chain reaction assay. *Cancer*. 2001 Oct 15;92 (8):2056-64
11. Ooka M, Tamaki Y, Sakita I, Fujiwara Y, Yamamoto H, Miyake Y, Sekimoto M, Ohue M, Sugita Y, Miyoshi Y, Ikeda N, Noguchi S, Monden M. Bone marrow micrometastases detected by RT-PCR for mammaglobin can be an alternative prognostic factor of breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 2001 May;67 (2):169-75
12. Miyake Y, Yamamoto H, Fujiwara Y, Ohue M, Sugita Y, Tomita N, Sekimoto M, Matsuura N, Shiozaki H, Monden M. Extensive micrometastases to lymph nodes as a marker for rapid recurrence of colorectal cancer: a study of lymphatic mapping. *Clin Cancer Res.* 2001 May;7 (5):1350-7
13. Noura S, Yamamoto H, Ohnishi T, Masuda N, Matsumoto T, Takayama O, Fukunaga H, Miyake Y, Ikenaga M, Ikeda M, Sekimoto M, Matsuura N, Monden M. Comparative detection of lymph node micrometastases of stage II colorectal cancer by reverse transcriptase polymerase chain reaction and immunohistochemistry. *J Clin Oncol.* 20 (20) : 4232-41, 2002
14. Masuda N, Tamaki Y, Sakita I, Ooka M, Ohnishi T, Kadota M, Aritake N, Okubo K, Monden M. Clinical significance of micrometastases in axillary lymph nodes assessed by reverse transcription-polymerase chain reaction in breast cancer patients. *Clin Cancer Res.* 6 (11):4176-85, 2000
15. Sugita Y, Fujiwara Y, Taniguchi H, Mori T, Ishii T, Niwa H, Okada Y, Takiguchi S, Yasuda T, Yano M and Monden M. Quantitative molecular diagnosis of peritoneal lavage fluid for prediction of peritoneal recurrence in gastric cancer. *Int J Oncol.* 23, 1419-1424, 2003
16. Yoshioka S, Fujiwara Y, Sugita Y, Okada Y, Yano M, Tamura S, Yasuda T, Takiguchi S, Shiozaki H, Monden M. Real-time rapid reverse transcriptase-polymerase chain reaction for intraoperative diagnosis of lymph node micrometastasis: clinical application for cervical lymph node dissection in esophageal cancers. *Surgery.* 132 (1):34-40, 2002
17. Ishiguro T, Saitoh J, Horie R, Hayashi T, Ishizuka T, Tsuchiya S, Yasukawa K, Kido T, Nakaguchi Y, Nishibuchi M, and Ueda K, Intercalation activating fluorescence DNA probe and its application to homogeneous quantification of a target sequence by isothermal sequence amplification in a closed vessel, *Analytical Biochem.* 314, 77-86, 2003



TOSOH

製造販売元

東ソー株式会社

バイオサイエンス事業部

東京本社 営業部 ☎(03) 5427-5181 〒105-8623 東京都港区芝3-8-2
大阪支店 バイオサイエンス ☎(06) 6344-3857 〒530-0004 大阪市北区堂島浜1-2-6
名古屋支店 バイオサイエンス ☎(052) 211-5730 〒460-0003 名古屋市中区錦1-17-13
福岡支店 ☎(092) 781-0481 〒810-0001 福岡市中央区天神1-13-2
仙台支店 ☎(022) 266-2341 〒980-0014 仙台市青葉区本町1-11-1
カスタマーサポートセンター ☎(0467) 76-5384 〒252-1123 神奈川県綾瀬市早川2743-1
バイオサイエンス事業部ホームページ <http://www.tosoh.co.jp/science/>



R100 環境・資源保護のため100%再生紙を使用しています。 3505GK-[品番992207]B