

ORIGINAL ARTICLE

自施設で施行した肺癌 ALK 検査 (IHC と FISH) の院外検査との比較検討

伊坂哲哉^{1,2}・横瀬智之¹・齋藤春洋³・村上修司³・近藤哲郎³・
尾下文浩³・伊藤宏之²・山田耕三³・中山治彦²・益田宗孝⁴

Comparison of In-house and Outsourced ALK Tests (IHC and FISH) in Patients with Lung Cancer

Tetsuya Isaka^{1,2}; Tomoyuki Yokose¹; Haruhiro Saito³; Shuji Murakami³; Tetsuro Kondo³;
Fumihiko Oshita³; Hiroyuki Ito²; Kouzo Yamada³; Haruhiko Nakayama²; Munetaka Masuda⁴

¹Department of Pathology, ²Department of Thoracic Surgery, ³Department of Thoracic Oncology, Kanagawa Cancer Center, Japan; ⁴Department of Surgery, Yokohama City University, Japan.

ABSTRACT — **Objective.** In the treatment of advanced ALK-positive lung cancer, it is important to establish a robust system for ALK testing that is both accurate and rapid. In this study, we compared the duration of examination and rate of concordance between an in-house and outsourced ALK test. **Methods.** We performed in-house ALK tests of 43 specimens (including samples for immunohistochemistry (IHC) and fluorescence *in situ* hybridization (FISH)) on which outsourced ALK tests had been conducted between May 2012 and May 2013 and compared the results of the two tests. The EnVision FLEX+ method and iAEP method were used for outsourced and in-house IHC, respectively. In cases in which IHC was determined to be positive, FISH was conducted using the split assay method at each institution. **Results.** The specimens under investigation included 20 operative specimens, 20 biopsy specimens and three cytological examination specimens. The average duration of examination was 6.2 and 12.3 days for the outsourced IHC and FISH analyses and 3.0 and 8.0 days for the in-house IHC and FISH analyses, respectively. Among the cases in which both outsourced and in-house IHC was performed, the positive and negative conformity rates for the in-house IHC versus the outsourced IHC were 100% and 86.5%, respectively. The results of IHC were discordant in five cases, all of which included operative specimens that were negative on outsourced IHC and positive on in-house IHC. One of these five cases was also positive on FISH. The findings of the in-house and outsourced FISH analyses were concordant in all cases. **Conclusions.** The in-house ALK test was associated with a shortened duration of examination compared with that observed for the outsourced ALK test, with a high rate of conformity between the two assays. However, there were several discordant cases on IHC due to differences in the detection reagents used at each institution. In addition, an iScore value of 1 or higher was classified as ALK-positive on the in-house IHC assay, and the technicians may have reviewed different regions in the same operative specimen.

(JJLC. 2014;54:173-179)

KEY WORDS — Lung cancer, ALK, FISH, IHC, iAEP method

Reprints: Tetsuya Isaka, Department of Thoracic Surgery, Kanagawa Cancer Center, 2-3-2 Nakao, Asahi-ku, Yokohama, Kanagawa 241-8515, Japan (e-mail: 1401092k@yahoo.co.jp).

Received February 23, 2014; accepted June 30, 2014.

要旨 — **目的.** 進行 ALK 肺癌治療には正確かつ迅速な ALK 検査体制を要する. 院内 ALK 検査導入に際し外部検査受託機関 (院外) と院内の ALK 検査精度と判定期間を比較検討した. **方法.** 2012/5~2013/5 に院外 ALK

検査 (IHC・FISH) を施行した 43 例に対し院内 ALK 検査を行った. 院外 IHC は EnVision FLEX+ 法, 院内 IHC は iAEP 法を用い, 陽性例に各施設で FISH (split assay 法) を行った. **結果.** 手術検体は 20 例, 結果判定

神奈川県立がんセンター¹病理診断科, ²呼吸器外科, ³呼吸器内科; ⁴横浜市立大学附属病院外科治療学.
別刷請求先: 伊坂哲哉, 神奈川県立がんセンター呼吸器外科,

〒241-8515 神奈川県横浜市旭区中尾 2-3-2 (e-mail: 1401092k@yahoo.co.jp).

受付日: 2014 年 2 月 23 日, 採択日: 2014 年 6 月 30 日.

期間は院外 IHC/FISH 6.2/12.3 日, 院内 IHC/FISH 3.0/8.0 日. 院外・院内 IHC の陽性/陰性一致率は 100/86.5%, IHC 不一致例(5 例)は全て手術検体で院外陰性・院内陽性, うち 1 例は FISH 陽性であった. 一方 FISH は全例一致した. **結論.** 院内 ALK 検査は判定期間を短縮した. 院内・院外の検査一致率は高いが, IHC 不一致

を認めた. 理由としては施設間で使用する検出試薬が違ふこと, 院内では iScore 1 以上を陽性と判定したこと, 施設間で同一手術標本の判定部位が異なる可能性などが考えられた.

索引用語 —— 肺癌, ALK, FISH, IHC, iAEP 法

目的

EML4-ALK 融合遺伝子陽性肺癌は, 2007 年に Soda らにより初めて同定された.¹ *EML4-ALK* 融合遺伝子は非小細胞肺癌の 2~6% に認められ,^{1,2} ALK 蛋白のチロシンキナーゼドメインの持続的な発現を引き起こし, 腫瘍増殖に関与している.³ Crizotinib は ALK チロシンキナーゼを阻害する薬剤であり, ALK 肺癌に対して用いられている.^{4,5} 進行 ALK 肺癌に対する一次治療において crizotinib と化学療法 (pemetrexed およびプラチナ製剤) を比較した第 III 相試験 (PROFILE 1014) では, crizotinib 群が progression-free survival (PFS) 10.9 ヶ月, overall response rate (ORR) 74%, 化学療法群が PFS 7.0 ヶ月 (ハザード比 0.454, $p < 0.0001$), ORR 45% ($p < 0.0001$) であり, crizotinib は ALK 肺癌に対し高い治療効果があることが示された. また PROFILE 1007 では, プラチナ製剤を含む治療歴がある症例を対象として, 2 次治療で crizotinib と標準化学療法との比較が行われた.⁶ その結果 crizotinib 群の PFS は 7.7 ヶ月で, 化学療法群の 3.0 ヶ月よりも有意に PFS を延長した (ハザード比 0.49, $p < 0.001$).

ALK 肺癌への ALK 阻害剤の投与機会を逸しないためには正確かつ迅速な診断を要する. Crizotinib は fluorescence *in situ* hybridization (FISH) により同定された進行 ALK 陽性非小細胞肺癌に対し, United States Food and Drug Administration (FDA) で承認されている.⁷ 現在の ALK 肺癌の診断アルゴリズムは, immunohistochemistry (IHC) 陽性例に対し FISH を行うのが標準である.¹

当院では ALK 検査 (IHC および FISH) を外部検査受託機関 (院外) で行ってきた. しかし ALK 検査を院外で行うよりも自施設で行った方が検査結果までの期間が短縮される利点があると考え, IHC を神奈川県立がんセンター病理診断科で, また FISH を神奈川県立がんセンター検査科で施行し, ALK 検査体制を立ち上げた. 今回自施設で ALK 検査を導入するにあたり, 院内・院外の IHC, FISH の検査判定期間およびその検査精度について比較・検討を行った.

方法

2012 年 5 月~2013 年 5 月の期間に提出された *EGFR* 遺伝子変異が陰性である原発性肺癌の手術検体・生検検体・細胞診検体のうち, 院外で ALK 検査 (IHC および FISH) が施行された 43 例を対象とした. 自施設で再度 ALK 検査を施行し, 院外 ALK 検査との一致率を算出した.

院内・院外 IHC ではともに 4 μ m の formalin fixed paraffin embedded (FFPE) 組織切片を用い, 一次抗体として 5A4 モノクローナル抗体を用いた. 院内 IHC では intercalated antibody-enhanced polymer (iAEP) 法 (Nichirei Biosciences Inc., Tokyo, Japan) を, 院外 IHC では EnVision FLEX + 法 (Dako Denmark A/S, Denmark) を用いて IHC を施行した. 評価法は院内 IHC では iScore を用いて 4 段階 (0 = 陽性腫瘍細胞なし, 1 = 50% \geq 陽性腫瘍細胞率 > 0%, 2 = 80% \geq 陽性腫瘍細胞率 > 50%, 3 = 陽性腫瘍細胞率 > 80%) で評価し,^{8,9} iScore 1 以上を ALK 陽性と判定した. 院外 IHC では陽性腫瘍細胞率 = 0% か, または陽性腫瘍細胞率 > 0% かの 2 段階評価で行い, 後者を ALK 陽性と判定した.

院内および院外のいずれにおいても, IHC 陽性例に対し 4 μ m の FFPE 組織切片を用いて, split assay 法による FISH (Vysis LSI ALK (2p23) Dual Color, Break Apart Rearrangement Probe; Abbott Molecular Inc., Chicago, IL, USA) を行った. 3' 側 (赤色) と 5' 側 (緑色) がシグナル 2 個分以上離解した場合を "split signal あり" と判定した. FISH 陽性率 (%) は 20 個の腫瘍細胞中に占める split signal を有する腫瘍細胞または単一の赤色 signal を有する腫瘍細胞の割合を示し, 陽性率 15% 以上を ALK 陽性と判定した.

ALK 結果の判定期間とは, 院外では検査依頼日から検査結果が当院に届くまでの期間とした. 一方院内では ALK 検査依頼日から病理診断科で IHC の結果報告が可能となった日, もしくは FISH の結果が神奈川県立がんセンター検査科より病理診断科に届くまでの期間とした.

結果

Table 1 に ALK 検査を行った 43 例の患者背景を示した。検体材料は手術検体 20 例，生検検体 20 例，細胞診検体 3 例であった。年齢中央値は 65 (38~82) 歳で男性は 26 例 (60.5%)，腺癌は 37 例 (86.0%) であった。院外 IHC の結果判定期間は平均 6.2 (4~12) 日，IHC と FISH の合計判定期間は平均 12.3 (9~16) 日であった。院内 IHC の結果判定期間は平均 3.0 (1~8) 日，IHC と FISH の合計判定期間は約 8.0 日であった。

ALK 検査を施行した 43 例の内訳を Figure 1 に記した。院内・院外 IHC ともに陽性であった 6 例に対し，院

Table 1. Patient Characteristics Among the Cases in Which ALK Tests Were Performed

N = 43	
Median age (years)	65 (38-82)
Male (%)	26 (60.5)
Histopathological diagnosis	
Adenocarcinoma	37
LCNEC	1
Pleomorphic carcinoma	1
SCLC	1
NSCLC	3
Samples under examination	
Operative specimen	20
Biopsy specimen	20
Cytology specimen	3

LCNEC, large-cell neuroendocrine carcinoma; SCLC, small-cell lung carcinoma; NSCLC, non-small cell lung carcinoma.

内・院外 FISH を施行した。院内 IHC 陽性，院外 IHC 陰性であった 5 例中，検体が十分量なかった 1 例を除いた 4 例に対して院内 FISH を施行した。

Table 2 には院内・院外 IHC を施行した 43 例の結果を示した。院外 IHC 陽性 6 例は全て院内 IHC 陽性であった (陽性一致率 100%)。また院外 IHC 陰性 37 例中 32 例は院内 IHC が陰性であった (陰性一致率 86.5%)。不一致は 5 例 (11.6%) 認め，全例院外 IHC 陰性，院内 IHC 陽性であり，いずれも手術検体であった。

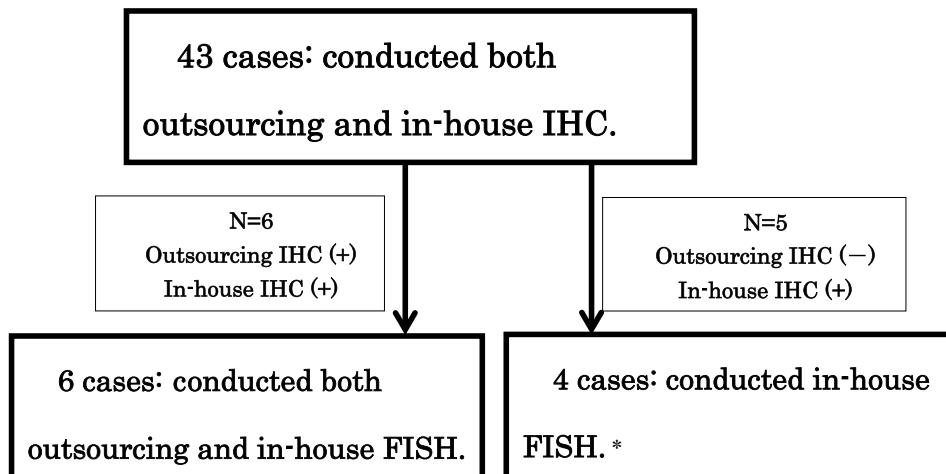
Table 3 には院内 IHC 陽性であった 11 例中，検体が微量のため FISH が施行できなかった 1 例を除いた 10 例の iScore，FISH の結果，および院外 IHC の結果を示した。iScore 3，2，1 であった症例はそれぞれ 4 例，3 例，3 例認め，そのうち FISH 陽性は 4 例 (100%)，2 例 (66.7%)，1 例 (33.3%)，院外 IHC 陽性は 4 例 (100%)，2 例 (66.7%)，0 例 (0%) であった。

Table 4 には 5 例の不一致例 (院外 IHC 陰性，院内 IHC 陽性) の iScore および院内 FISH の結果を示した。不一致例はいずれも iScore は 1 点または 2 点であったが，5 例中 1 例 (Case 4) において院内 FISH が陽性であった。本症例 (Case 4) の IHC および FISH の結果を Figure 2 に示した。IHC では iScore 1 であったため陽性と判定し，FISH では split signal を全体の 17% (赤丸部) 認めたため FISH 陽性と判定した。

Table 5 では IHC 陽性例に対し院内・院外 FISH を行った 6 例の結果を示した。院内・院外 FISH はいずれも陽性で全て一致した (陽性一致率 100%)。

結論

自施設で ALK 検査を施行することで院外よりも結果



* FISH was not conducted in one case due to the small sample.

Figure 1. Breakdown of the patients who underwent in-house and outsourced ALK tests.

判定期間を短縮することができた。その理由の1つとして、院内検査は検査開始日の設定がないことが挙げられる。すなわち院内検査では被検体が病理部または検査科に到着した日より検査が直ちに開始できる体制ができていて、一方院外検査では被検体の到着日より検査が開始されるわけではないため、その分結果判定期間の遅延が生じると考えられた。また院外へ被検体を搬送するのに要する時間も、結果判定の遅延の原因と考えられた。

本検討より院内 IHC と院外 IHC との陽性一致率、陰性一致率は高く、院内 IHC を ALK 肺癌検出のスクリーニング法として用いることは妥当と考えられた。しかし一方で院外 IHC 陰性、院内 IHC 陽性となる不一致例が5

例 (11.6%) 生じた。この5例は全て手術検体であり、うち1例は院内 FISH が陽性であった (Table 4, Figure 2)。院内・院外 ALK-IHC 判定の不一致が生じる理由としては以下の3つが考えられた。① IHC に用いる ALK 検出試薬 (iAEP 法と EnVision FLEX+法) が施設間で違うこと、②院内 IHC では iScore 1 以上を ALK 陽性と判定していること、③施設間で同一手術標本の判定部位が異なる可能性。

IHC で用いられる iAEP 法と EnVision FLEX+法はいずれも免疫組織化学酵素抗体法を基礎とした手法である。iAEP 法は抗 ALK (clone : 5A4) マウス・モノクローナル抗体を反応させ、ブリッジ試薬である intercalating reagent を一次抗体とジアミノベンジジン (DAB) ポリマー試薬との間に介在させることにより ALK 融合蛋白の染色感度および検出感度を上げる方法である。⁸ 一方 EnVision FLEX+法では iAEP 法と同様に一次抗体として抗 ALK (clone : 5A4) マウス・モノクローナル抗体を

Table 2. Results of the In-house and Outsourced IHC Assays

	In-house IHC positive	In-house IHC negative	Total
Outsourcing IHC positive	6*	0	6
Outsourcing IHC negative	5†	32*	37
Total	11	32	43

* Among the 43 cases in which both outsourced and in-house IHC was conducted, the positive and negative conformity rates for in-house IHC versus outsourced IHC were 100% (6/6) and 86.5% (32/37), respectively, with five cases in which the results of IHC were discordant.

† All five cases of discordant results included operative specimens.

IHC, immunohistochemistry.

Table 3. Results of the In-house FISH Analyses for Each iScore Among the In-house IHC-positive Cases

iScore of in-house IHC positive cases	N (total 10)	In-house FISH positive cases (%)	Outsourcing IHC positive cases (%)
iScore 1	3	1 (33.3)	0 (0)
iScore 2	3	2 (66.7)	2 (66.7)
iScore 3	4	4 (100)	4 (100)

IHC, immunohistochemistry; FISH, fluorescence *in situ* hybridization.

Table 4. iScore and FISH Results in the Five Cases with Discordant In-house and Outsourced IHC Findings

Case	Specimen	Outsourcing IHC	In-house IHC		In-house FISH	
			(+/-)	iScore	(+/-)	Positive rate (%)
1	operative	(-)	(+)	1	could not evaluate*	
2	operative	(-)	(+)	1	(-)	8
3	operative	(-)	(+)	2	(-)	6
4†	operative	(-)	(+)	1	(+)	17
5	operative	(-)	(+)	1	(-)	6

* FISH was not conducted in Case 1 due to the small sample.

† All five cases of discordant findings included operative specimens that were negative on outsourced IHC and positive on in-house IHC, with one cases (Case 4) that was positive on in-house FISH.

IHC, immunohistochemistry; FISH, fluorescence *in situ* hybridization.

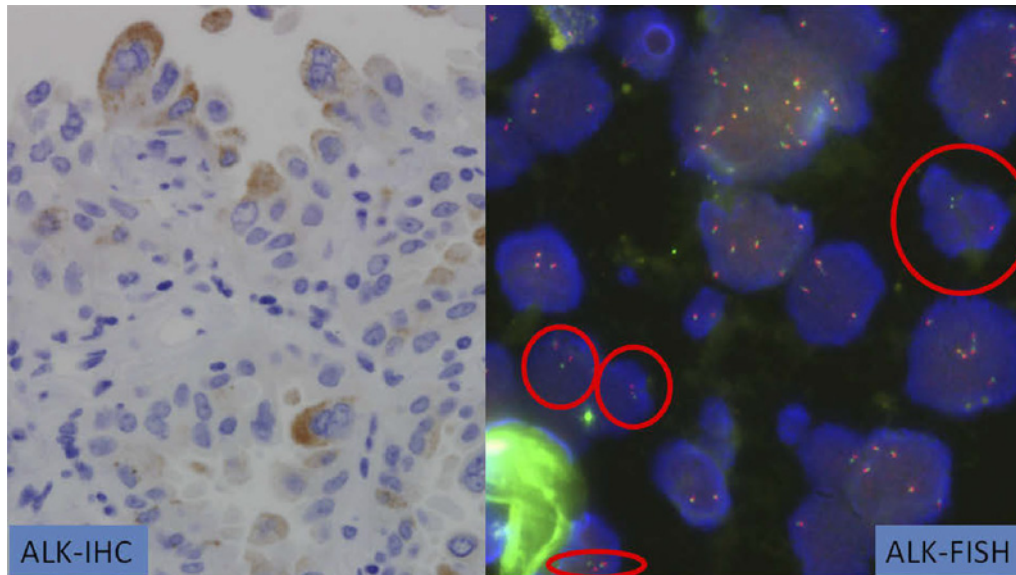


Figure 2. Among the five cases with discordant IHC findings (all of which were negative on outsourced IHC and positive on in-house IHC), one case (Case 4) was found to be FISH-positive. The sample was considered to be IHC-positive (iScore 1+) because 37% of the tumor cells exhibited a cytoplasmic reaction (left) and FISH-positive because 17% of the tumor cells demonstrated splitting of red and green signals (red circle) (right).

Table 5. Results of the In-house and Outsourced FISH Assays

	In-house FISH positive	In-house FISH negative	Total
Outsourcing FISH positive	6*	0	6
Outsourcing FISH negative	0	0	0
Total	6	0	6

*The results of the in-house and outsourced FISH analyses were concordant in all six cases.

FISH, fluorescence *in situ* hybridization.

反応させる。そして一次抗体と西洋ワサビペルオキシダーゼを多数標識した標識ポリマーにマウスリンカー試薬を反応させ、ペルオキシダーゼの酸化作用でDABを発色させてALK蛋白を検出する。一般的に肺癌のALK発現は、ALK再編成を有するanaplastic lymphomaと比較して低いため、¹⁰ iAEP法、EnVision FLEX+法を用いた増感法を要する。両者の原理は類似しているが、各手法の一次抗体と高分子ポリマーとを介在させる試薬およびキット内の各試薬の濃度などが異なる。

IHCで用いられる一次抗体には、ALK1、5A4、D5F3、SP8などがあり、そのうちALK1と5A4抗体とreverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) およ

びFISHとの間には良好な相関関係が示されている。¹¹⁻¹⁸ しかしこれらの一次抗体間でその相関性の違いを比較検討した報告は少ない。^{8,15} 過去の報告によるとD5F3抗体とALK1抗体とを比較し、前者がよりRT-PCRやFISHの結果との相関性が高かった。¹⁵ またTakeuchiらは5A4のマウス・モノクローナル抗体を用いてiAEP法を行うことで、他の一次抗体と比較してRT-PCRの結果と相関性が高かったと報告している。⁸ 5A4抗体とFISHとの相関性については、Paikらは5A4抗体によるIHCの感度は100%、特異度は95.8%と報告し、¹⁶ またPaikらは別の報告において感度は100%、特異度は96.2%と報告している。¹⁹ iAEP法とEnVision FLEX+法はいずれもFISHと相関性が高く、ALK蛋白の検出感度が高いとされているが、両者を直接比較検討した論文は、我々が知る限りはない。現在FISHとIHCとの不一致例がALK阻害剤による肺癌治療で問題になっているが、増感法の差が不一致を生じさせている可能性もあるため、両検査法でのFISHの相関性を、同一症例群を用いて検討すべきと考えられた。

IHC不一致の2つ目の理由は、院内IHCではiScore 1以上をALK陽性と判定していることである。現時点では複数のIHCの評価法および判定基準が存在し、^{1,7,9,17,18} 定まった基準がない。iScoreを用いる場合、iScore 3を陽性とするすることでFISHの結果と完全に一致するとされている。^{1,9} 本検討ではiScore 3の症例は院外IHCと完全

に一致したが、iScore 1, 2 の症例は院外 IHC と完全には一致しなかった (Table 3)。しかし院内 IHC 陽性 (iScore 1)、院外 IHC 陰性、院内 FISH 陽性となる ALK 陽性肺癌 (Table 4, Case 4) が検出されたことから、iScore 1 であっても FISH を確認する意義はあると考えられる。IHC 弱～中等度陽性症例において FISH との不一致が問題となっているが、²⁰ iAEP 法において iScore 1 以上を ALK 陽性と判定することが EnVision FLEX+ 法による判定結果と不一致が生じる要因の 1 つになっている可能性がある。それぞれの増感法において、明確な IHC 判定基準を設けることが必要と考えられた。

3 つ目の理由としては、同一の手術標本であっても、施設ごとで判定者によって判定する部位が異なる可能性が挙げられる。本検討では手術検体材料でのみ不一致が生じた。生検検体や細胞診検体では検体量が少ないため観察範囲が狭いが、手術検体では観察範囲が広いので、判定者により判定部位およびその評価がばらつく可能性がある。FISH との相関性を高めるためには、手術検体材料での IHC の評価が他の検体材料と同じ測定法・評価法で良いかを再検討する必要があると考えられた。

しかしこれらの原因によって生じる IHC 間不一致の症例が、実際に ALK 阻害剤に奏効するのかが本質的な問題と考えられる。2013 年 5 月 27 日に日本肺癌学会バイオマーカー委員会より提起された「FISH 法と高感度 IHC 法の不一致についてのお知らせと対応」において、不一致は 2.1% (48/2337 例) に認められ、不一致症例は crizotinib への奏効性が低い可能性が示唆された。今回、院内・院外 IHC 不一致例 (5 例) に対して crizotinib は使用していないため評価はできなかった。各増感法および各判定基準による IHC の結果が、ALK 阻害剤の奏効性にどのように影響するかを検討する必要があると考えられた。

今回用いた Vysis break-apart FISH probe kit は高感度・高特異度な ALK rearrangement 検出法であり、FDA により現在承認されている。⁷ 本検討では FISH 判定は院内・院外で完全に一致し (Table 5)、院内 FISH は再現性の高い ALK 肺癌検出法であることが示された。しかし今回院内 IHC 陽性・院外 IHC 陰性となった 5 例中、院内 FISH 陰性を 3 例認めた (Table 4)。院内 IHC と院内 FISH の不一致の理由としては全長 ALK を陽性とした可能性、検体の質の問題、腫瘍細胞が検体中に含まれていなかった可能性などが考えられる。⁹ 今後はこのような症例に対し再度 FISH を行うか、または RT-PCR で確認する必要があると考えられた。

本検討より院内 ALK 検査は ALK 判定までの期間を短縮できたことが示された。また院内・院外 ALK 検査 (IHC, FISH) の一致率は高く、院内で ALK 検査は施行

可能と考えられた。今後 PROFILE1014 の結果を受けて crizotinib が ALK 肺癌の一次治療として用いられる可能性があり、院内で短期間に精度の高い ALK 検査が達成できることは、ALK 肺癌の臨床治療選択において利点となりうる事が考えられる。しかし院内 IHC と院外 IHC の間に一部不一致例を認めた。この不一致の理由を今後さらに症例集積した上で検討すると同時に、不一致例の ALK 阻害剤の奏効性を評価することが必要不可欠と考えられた。

本論文内容に関連する著者の利益相反：なし

謝辞：本論文作成にあたり、札幌医科大学医学部附属フロンティア医学研究所の佐久間裕司先生、および神奈川県立がんセンター検査科の関口博信氏よりご協力をいただきましたことを、心より感謝申し上げます。

REFERENCES

1. Takamochi K, Takeuchi K, Hayashi T, Oh S, Suzuki K. A rational diagnostic algorithm for the identification of ALK rearrangement in lung cancer: a comprehensive study of surgically treated Japanese patients. *PLoS One*. 2013;8:e69794.
2. Inamura K, Takeuchi K, Togashi Y, Hatano S, Ninomiya H, Motoi N, et al. EML4-ALK lung cancers are characterized by rare other mutations, a TTF-1 cell lineage, an acinar histology, and young onset. *Mod Pathol*. 2009;22:508-515.
3. Martinez P, Hernández-Losa J, Montero MÁ, Cedrés S, Castellví J, Martínez-Martí A, et al. Fluorescence in situ hybridization and immunohistochemistry as diagnostic methods for ALK positive non-small cell lung cancer patients. *PLoS One*. 2013;8:e52261.
4. Tuononen K, Sarhadi VK, Wirtanen A, Rönty M, Salmenkivi K, Knuutila A, et al. Targeted resequencing reveals ALK fusions in non-small cell lung carcinomas detected by FISH, immunohistochemistry, and real-time RT-PCR: a comparison of four methods. *Biomed Res Int*. 2013;2013:757490.
5. Takeuchi K, Soda M, Togashi Y, Suzuki R, Sakata S, Hatano S, et al. RET, ROS1 and ALK fusions in lung cancer. *Nat Med*. 2012;18:378-381.
6. Shaw AT, Kim DW, Nakagawa K, Seto T, Crinó L, Ahn MJ, et al. Crizotinib versus chemotherapy in advanced ALK-positive lung cancer. *N Engl J Med*. 2013;368:2385-2394.
7. Shaw AT, Solomon B, Kenudson MM. Crizotinib and testing for ALK. *J Natl Compr Canc Netw*. 2011;9:1335-1341.
8. Takeuchi K, Choi YL, Togashi Y, Soda M, Hatano S, Inamura K, et al. KIF5B-ALK, a novel fusion oncokinas identified by an immunohistochemistry-based diagnostic system for ALK-positive lung cancer. *Clin Cancer Res*. 2009;15:3143-3149.
9. 竹内賢吾. ALK. 臨床検査. 2013;57:271-276.

10. Kutok JL, Aster JC. Molecular biology of anaplastic lymphoma kinase-positive anaplastic large-cell lymphoma. *J Clin Oncol.* 2002;20:3691-3702.
11. Zhang YG, Jin ML, Li L, Zhao HY, Zeng X, Jiang L, et al. Evaluation of ALK rearrangement in Chinese non-small cell lung cancer using FISH, immunohistochemistry, and real-time quantitative RT-PCR on paraffin-embedded tissues. *PLoS One.* 2013;8:e64821.
12. Takeuchi K, Choi YL, Soda M, Inamura K, Togashi Y, Hatano S, et al. Multiplex reverse transcription-PCR screening for EML4-ALK fusion transcripts. *Clin Cancer Res.* 2008;14:6618-6624.
13. Boland JM, Erdogan S, Vasmatzis G, Yang P, Tillmans LS, Johnson MR, et al. Anaplastic lymphoma kinase immunoreactivity correlates with ALK gene rearrangement and transcriptional up-regulation in non-small cell lung carcinomas. *Hum Pathol.* 2009;40:1152-1158.
14. Hofman P, Ilie M, Hofman V, Roux S, Valent A, Bernheim A, et al. Immunohistochemistry to identify EGFR mutations or ALK rearrangements in patients with lung adenocarcinoma. *Ann Oncol.* 2012;23:1738-1743.
15. Mino-Kenudson M, Chirieac LR, Law K, Hornick JL, Lindeman N, Mark EJ, et al. A novel, highly sensitive antibody allows for the routine detection of ALK-rearranged lung adenocarcinomas by standard immunohistochemistry. *Clin Cancer Res.* 2010;16:1561-1571.
16. Paik JH, Choe G, Kim H, Choe JY, Lee HJ, Lee CT, et al. Screening of anaplastic lymphoma kinase rearrangement by immunohistochemistry in non-small cell lung cancer: correlation with fluorescence in situ hybridization. *J Thorac Oncol.* 2011;6:466-472.
17. Yi ES, Boland JM, Maleszewski JJ, Roden AC, Oliveira AM, Aubry MC, et al. Correlation of IHC and FISH for ALK gene rearrangement in non-small cell lung carcinoma: IHC score algorithm for FISH. *J Thorac Oncol.* 2011;6:459-465.
18. Kim H, Yoo SB, Choe JY, Paik JH, Xu X, Nitta H, et al. Detection of ALK gene rearrangement in non-small cell lung cancer: a comparison of fluorescence in situ hybridization and chromogenic in situ hybridization with correlation of ALK protein expression. *J Thorac Oncol.* 2011;6:1359-1366.
19. Paik JH, Choi CM, Kim H, Jang SJ, Choe G, Kim DK, et al. Clinicopathologic implication of ALK rearrangement in surgically resected lung cancer: a proposal of diagnostic algorithm for ALK-rearranged adenocarcinoma. *Lung Cancer.* 2012;76:403-409.
20. Thunnissen E, Bubendorf L, Dietel M, Elmberger G, Kerr K, Lopez-Rios F, et al. EML4-ALK testing in non-small cell carcinomas of the lung: a review with recommendations. *Virchows Arch.* 2012;461:245-257.