体外診断用医薬品

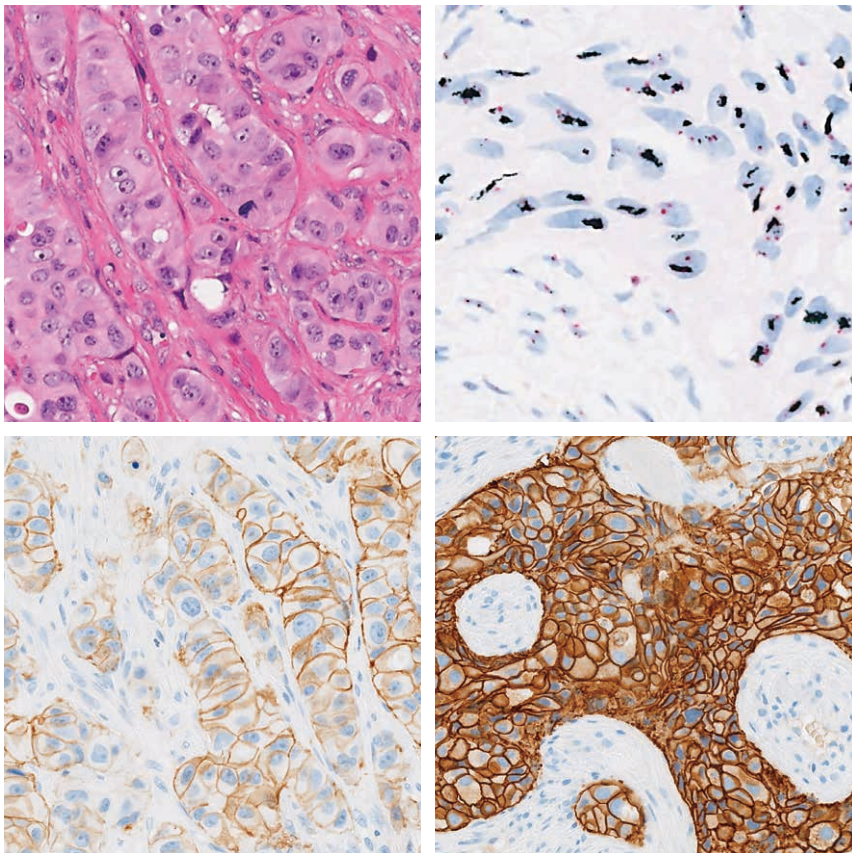
ベンタナ ultraView パスウェーHER2（4B5）
ベンタナ DISH HER2 キット

判定ガイド～唾液腺癌編～

HER2（4B5）/ DISH HER2

判定ガイド ～唾液腺癌編～

本資材では唾液腺癌におけるベンタナ ultraView パスウェーHER2（4B5）および
ベンタナ DISH HER2 キットの判定方法についてご紹介しております。
乳癌、胃癌における判定基準や染色写真は、別途、乳癌・胃癌向けのHER2検査ガイドをご用意しております。



目次

はじめに 4

ベンタナ ultraView パスウェーHER2（4B5） 5

使用目的 5

製品の使用目的 5

判定ガイドの目的 5

製品概要、試薬の準備、導入時の機器整備、機器の定期メンテナンス 5

検体処理（検体採取～包埋）、検体スライドの作成（薄切～染色前処理）、測定（操作）方法 5

測定方法 5

推奨プロトコール 5

精度管理 6

検査ワークフロー 6

検査フロー 7

染色結果の判定 8

染色の特徴 8

染色のパターンと強度 8

スコアリングアルゴリズム 9

腫瘍細胞の染色性と強度 10

参考画像 11

参考症例 12

判定に苦慮する症例（各スコアの境界域となる例） 17

アーチファクト 23

トラブルシューティング 34

ベンタナ DISH HER2 キット 35

使用目的 35

製品の使用目的 35

判定ガイドの目的 35

製品概要、試薬の準備、導入時の機器整備、機器の定期メンテナンス 36

検体処理（検体採取～包埋）、検体スライドの作成（薄切～染色前処理）、測定（操作）方法 37

測定方法 37

染色プロトコールの設定 37

精度管理 37

染色結果の判定 38

スコアリングの概要 41

シグナルの計測方法 42

スコアリングの判定基準 43

臨床症例でみる実際の染色例 44

判定上の注意 45

トラブルシューティング 47

参考文献 50

はじめに

HER2は抗HER2治療薬の効果予測因子でもあり、乳癌においては、2001年に日本で最初のヒト化モノクローナル抗体治療薬として承認されたトラスツズマブをはじめ、ペルスツズマブやT-DM1などの種々の抗HER2治療薬が承認されています。胃癌についても国際第Ⅲ相試験であるToGA試験において、標準化学療法にトラスツズマブを併用することで、生存期間の有意な延長をもたらすことが示され、日本では2011年3月にトラスツズマブがHER2陽性進行・再発胃癌に適応拡大されています。

この度、医師主導の国内第II相臨床試験であるHUON-003-01試験の成績に基づき、2021年11月にトラスツズマブがHER2陽性の根治切除不能な進行・再発の唾液腺癌への適応が拡大されました。

種々の抗HER2治療薬の投与に先立って、HER2のタンパク過剰発現および遺伝子増幅の検査が、投与対象の患者選別や治療効果予測に欠かせない検査となっています。

乳癌と胃癌ではHER2の遺伝子増幅と過剰発現が最もよく研究されてきました。乳癌では、遺伝子増幅とタンパク質過剰発現が生存期間の減少や癌転移リスクの増大に関わっていることが確認されています[1-5]。患者計27,000例以上を対象とする試験90件のメタアナリシスでも、HER2増幅とHER2タンパク質過剰発現が予後不良に関わっていることが明らかにされています[6]。胃癌および胃食道癌でも、HER2増幅とHER2過剰発現が臨床転帰の不良に関わっていることが確認されています[7-9]。

膀胱癌や乳癌、子宮頸癌、胆管細胞癌、大腸癌、子宮内膜癌、食道癌、胃癌、頭頸部癌、肝癌、肺癌、卵巣癌、唾液腺癌など、様々な種類の癌にHER2タンパク質の過剰発現が確認されています[10,11]。

唾液腺の新生物には一連の多様な腫瘍が含まれ、その大部分が良性である。唾液腺の癌は頭頸部悪性腫瘍全体の6%を占め、年間罹患率は人口100,000人当たり0.4～2.6例となっている。このような悪性腫瘍は世界保健機関（WHO）Classification of Head and Neck Tumours（2017年）に従って分類されます[12]。

唾液腺腫瘍（SGTs）の全生存期間は、現在の治療法（外科的切除と補助放射線療法）では依然短く、患者の大半が診断から3年しか生存できません。また、同時化学療法では全生存期間に関わるベネフィットを示すことができていません[13]。

悪性SGTsにみられるHER2の過剰発現や増幅の評価が関心を集めてきました。主に、代替治療法のアンメット・メディカル・ニーズが高いことが理由ですが、一部の腫瘍、特に唾液腺導管癌（SDCs）に浸潤性乳管癌との組織形態学的類似性がみられることも理由です。患者3372例から成る悪性唾液腺腫瘍16種類のメタアナリシスにより、HER2陽性の割合は唾液腺導管癌（43%）、多形腺腫由来癌（39%）、扁平上皮癌（17%）および腺癌NOS（13%）が最も高いことが確認されています[14]。

少規模な研究結果から、HER2の過剰発現や遺伝子増幅のあるSDC患者では、トラスツズマブやペルツズマブ、ラパニチブなど、乳癌と胃癌への使用が承認された抗HER2治療薬によってベネフィットが得られる可能性があることが明らかにされています[15-17]。このような抗HER2治療薬やその他の新しい抗HER2治療薬を使用し、さらに大規模なSDCsやSGTs全体の臨床試験が進行中です。このことから、SGTsのHER2発現の適切な判定には高い意義があります。

使用目的

■製品の使用目的

ベンタナ ultraView パスウェーHER2（4B5）は、ベンタナ ベンチマークシリーズ*（ロシュ社製 自動染色装置）を用いてベンタナ ultraView DAB ユニバーサルキットを使用し、ホルマリン固定パラフィン包埋された悪性SGTs切片に含まれるHER2タンパクの検出することを目的としています。本製品は、がん組織又は細胞中のHER2タンパクの検出により、トラスツズマブ（遺伝子組換え）の唾液腺癌患者への適応を判定するための補助に用います。

■判定ガイドの目的

本ガイドは以下を目的としています:

- ベンタナ ultraView パスウェーHER2（4B5）で染色されたFFPE 悪性SGTs切片におけるHER2タンパク過剰発現の判定基準を提示
- ホルマリン固定パラフィン包埋（FFPE）された悪性SGT組織切片をベンタナ ultraView パスウェーHER2（4B5）を用いて染色したさまざまな症例を提示（判定に苦慮する症例含）

注:検体作製や精度管理、染色手順等の詳細はあわせてHER2検査ガイドを参照ください。

*適応機種は、
ベンタナ ベンチマークGX（医療機器:13B1X002010000531）
ベンタナXTシステム ベンチマークXT（医療機器:13B1X00201000043）
ベンタナ ベンチマークULTRA（医療機器:13B1X00201000050）です。

製品概要、試薬の準備、導入時の機器整備、機器の定期メンテナンス

ベンタナ ultraView パスウェーHER2（4B5）（体外診断用医薬品製造販売承認番号：22300AMX01167000）は、検出キット（別売り）との組み合わせにより体外診断用医薬品として承認されています。詳細は、HER2検査ガイド（p3-5）をご参照ください。

検体処理（検体採取～包埋）、検体スライドの作成（薄切～染色前処理）、測定（操作）方法

詳細は、HER2検査ガイド（p5-8）をご参照ください。

測定方法

詳細は、HER2検査ガイド（p7）を参照してください。

推奨プロトコール

Procedure: U ultraView DAB（ULTRA）
: XT ultraView DAB v3（XT）
: BMK ultraView DAB Par（GX）

染色工程	ultraView DAB	
	ベンチマーク ULTRA	ベンチマーク XT/GX
Baking（ベーキング）	None	None
Deparaffinization（脱パラフィン）	Selected	Selected
Cell Conditioning（熱処理）	CC1 mild	CC1 mild
Enzyme（酵素処理）	None required	None required
Antibody（一次抗体）	36℃, 12min	37℃, 16min
ultraWash（追加洗浄）	Selected	Selected
Counterstain（核染色）	Hematoxylin Ⅱ, 4min	Hematoxylin Ⅱ, 4min
Post Counterstain（色出し）	Bluing, 4min	Bluing, 4min

精度管理

詳細は、HER2検査ガイド（p7）をご参照ください。結果が既知の検体であれば乳癌も自家製精度管理用コントロールスライドとしてご使用可能です。

■検査ワークフロー

ベンタナ ultraView パスウェーHER2（4B5）の評価を行う際には、各症例、3枚の連続切片が必要です。1枚目は、ヘマトキシリン・エオシン（H&E）染色用、2枚目は陰性コントロール染色用、3枚目がベンタナ ultraView パスウェーHER2（4B5）染色用です。H&E染色の評価により、その検体では評価に不適切であるとされた場合は、新たな検体にて、ベンタナ ultraView パスウェーHER2（4B5）を染色する必要があります。

対照スライド

染色工程の妥当性を確認するには、対照細胞株と既知の陽性対照組織の両者が適切に染色されなければなりません。

対照細胞株：1回のラン毎にHER-2 4 in 1コントロールスライドを含め、そのラン工程における染色の妥当性を検証するシステムレベルの対照です。しかるべき細胞株で、特にIHC 1 +とIHC 2 +の対照にはっきりと確認できない場合は、再染色をしてください。

既知の陽性対照組織：弱～中等度にHER2陽性を示す（乳癌）組織は、1回のランにおいて、染色の各工程での妥当性を検証するための対照となります。

陰性対照スライド（NRCスライド）

非特異的な染色がないかどうか確認し、結果の判定を行うために、すべての検体において適切な陰性コントロール試薬による染色を実施しなければなりません。（NRCスライド） 病理医は、ベンタナ ultraView パスウェーHER2（4B5）（HER2（4B5）スライド）によって染色したスライドを評価する前に同じ症例のNRCスライドを確認し、特異的な染色がないことを確認しなければなりません。対応するHER2（4B5）スライドが評価可能と判断されるには、NRCスライドによる染色性が適切である必要があります。

非特異的な染色があれば、びまん性の外観を呈します。過固定された組織ではそのほか、結合組織に散在性のうすい染色が観察されることもあります。NRCスライドにて非特異的に染色されることが多い細胞（壊死した細胞や変性した細胞）は、HER2（4B5）スライドでも非特異的な染色が認められる傾向にあり、結果の判定からは除外してください。

HER2（4B5）染色スライド

表1の基準に従って各HER2（4B5）スライドの組織形態ならびに、バックグラウンド染色の有無を判断します。バックグラウンド染色はFFPE組織の非特異的な染色と定義されます。

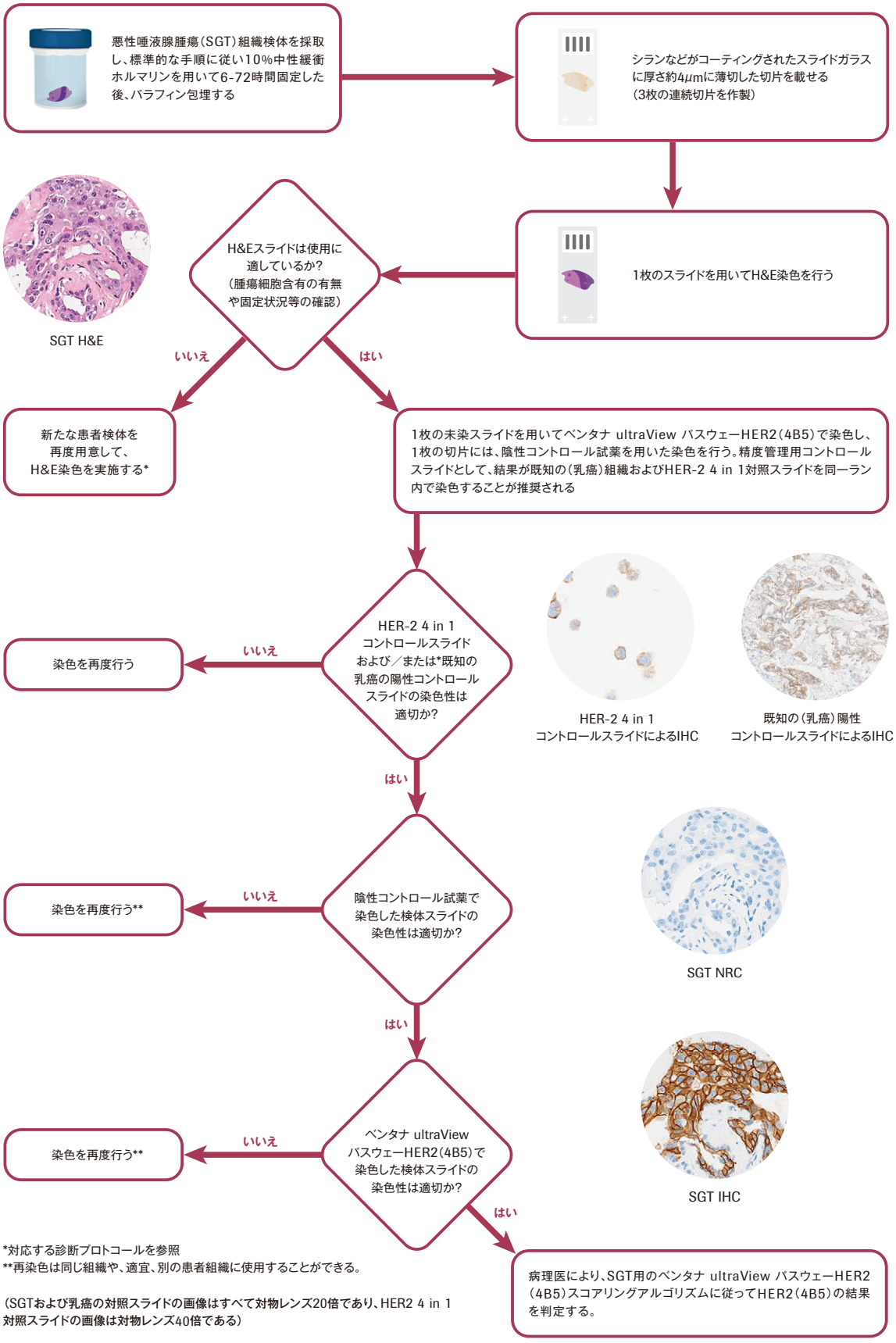
HER2（4B5）スライドを観察し、染色の全体的な適正を判定する必要があります。染色が合格基準を満たさない理由として、アーチファクト、組織の質の不良、組織の剥がれが考えられます。染色性が合格基準を満たさないスライドにおいてスコアを付けてはなりません。予備のスライド、または、可能であれば別のブロックを使用して再染色を実施する必要があります。

表2に定めたスコアリングアルゴリズムに従い、HER2（4B5）スライドの各々にHER2 IHCスコア（0、1+、2+、3+）を付けます。染色結果の判定には、壊死した細胞や変性した細胞は非特異的な染色を示すことが考えられるため、対象としてはなりません。判定対象からは除外する必要があります。

表1　ベンタナ ultraView パスウェーHER2（4B5）の形態とバックグラウンドの適/不適

	適切	不適切
形態	対象とする細胞が観察されており、形態学的診断が可能	対象とする細胞が観察されておらず、形態学的診断が困難
バックグラウンド	バックグラウンド染色によって、判定が妨げられない	バックグラウンド染色により、染色の判定が損なわれる

■検査フロー



*対応する診断プロトコールを参照
**再染色は同じ組織や、適宜、別の患者組織に使用することができる。

（SGTおよび乳癌の対照スライドの画像はすべて対物レンズ20倍であり、HER2 4 in 1 対照スライドの画像は対物レンズ40倍である）

染色結果の判定

■染色の特徴

悪性SGTsにおけるベンタナ ultraView パスウェーHER2（4B5）による免疫組織化学染色では、膜および細胞質に染色を認めます。ベンタナ ultraView パスウェーHER2（4B5）によって検出された結合物は、酵素反応により茶褐色（DAB）に染色されます。

HER2タンパクは正常なヒト組織と腫瘍性のヒト組織の両者の細胞膜に発現しています。Pressらは、凍結組織切片などを用いて、標識された抗HER2抗体を使用し、消化管、気道、生殖器系および尿路のほか、皮膚、乳房および胎盤における正常な上皮細胞に弱い染色を認めることを報告しています[8]。Taylorらは異なる抗HER2抗体を使用し、HER2タンパクの細胞質への染色を確認しましたが、乳癌に検出されるHER2 mRNAの存在とは無関係であると結論づけています[9]。細胞質のみの染色に臨床的な意味があることは確認されていません[9]。

■染色のパターンと強度

悪性SGT組織切片にて、ベンタナ ultraView パスウェーHER2（4B5）による細胞膜への染色のパターンと強度を確認します。染色がまったく認められなければ、その症例はIHC 0とスコアリングし、部分的かつ不完全な膜染色は、染色が認められた腫瘍細胞の割合（%）に応じてIHC 0ないしIHC 1+とスコアリングします。全周性の細胞膜への染色は IHC 2+ないしIHC 3+とスコアリングします。IHC 0とIHC 1+を鑑別するため対物40倍以上で、一部の症例については確認が必要になることもあります。染色された腫瘍細胞の割合（%）を確認する際には、細胞質や核への染色は考慮してはいけません。

HER2シグナルは均一に分布し、腫瘍全体に均一な強度を示すこともあれば、分布が不均一で、さまざまな強度を示すこともあります。染色が不均一である場合は、それぞれ異なるシグナル強度とシグナルパターンで染色された細胞の相対的な割合（%）を視覚的に推定してHER2 IHCスコアリングをします。

アイソタイプが一致した陰性コントロールウサギモノクローナル抗体用（518-111182）は、検体のバックグラウンド染色の有無を確認し、染色強度のベースラインを確認するために使用されます。

非特異的なバックグラウンド染色は、びまん性の染色性を示します。過固定された組織切片では、そのほか、結合組織に散在性の弱い染色が観察されることもあります。また、壊死した細胞や変性した細胞は非特異的な染色が多いため、染色結果の判定からは除外する必要があります。

■スコアリングアルゴリズム（2022年3月改訂）

悪性唾液腺腫瘍におけるベンタナ ultraView パスウェーHER2（4B5）染色の判定基準は、ASCO /CAP ガイドライン（2013）の乳癌HER2 IHCスコアリングアルゴリズムに準拠し策定されました。

ベンタナ ultraView パスウェーHER2（4B5）の染色の際は1次抗体として、ベンタナ パスウェーHER2（4B5）（518-107918）のほか、陰性コントロールウサギモノクローナル抗体用（518-111182）を使用して各症例を染色します。ベンタナ ultraView パスウェーHER2（4B5）によって染色されたSGT細胞にて、DABシグナルの有無を確認します。適切なNRCで染色されたスライドは、非特異的なバックグラウンド染色の確認や、ある特定の要素が起因して発生するバックグラウンド染色を確認するために使用します（以下の症例画像を参照）。

SGTsを対象とするベンタナ ultraView パスウェーHER2（4B5）の判定方法は表2に記載。

表2　SGTsにおけるHER2 IHC判定方法

染色パターン	スコア
染色像が認められない、または不完全およびかすかな/かろうじて膜染色が認められる≦10%	0
かすかな / かろうじて部分的な膜染色が認められる＞10%	1+
強い完全な全周性の膜染色が認められる≦10% または不完全および / または弱 / 中程度の全周性の膜染色が認められる＞10%	2+
強い完全な全周性の膜染色が認められる＞10%	3+

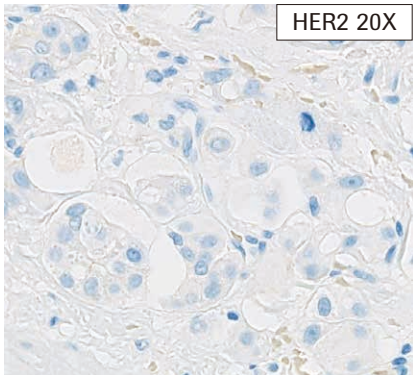
唾液腺癌においてスコア2+となり、equivocal と判定された場合には同一検体においてISH 法による再検査を行ってください。

HER2陽性の判定は、腫瘍細胞の細胞膜における染色性およびその染色強度を対象とし、細胞質における反応は判定対象外とします。腫瘍領域全体を確認し、染色強度のほか、腫瘍細胞膜への染色性（完全性）を判定します。腫瘍細胞への全周性の膜染色は IHC 2+ないしIHC 3+とスコアリングします。膜の不完全な染色は、HER2染色を認める腫瘍細胞の割合（%）に応じてIHC 0ないしIHC 1+とスコアリングします。スコアIHC 0とIHC 1+、あるいは、スコアIHC 1+とIHC 2+を鑑別するため、倍率を高くして境界例を確認することが必要になることもあります。IHC 2+と判定される染色には、くっきり、はっきりした膜染色を認め、IHC 3+と判定される症例は強度の強い明瞭な膜染色を示します。

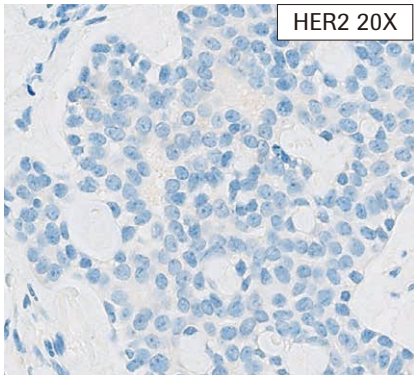
参考症例（p12～p16）セクションでは代表的な症例を取り上げています。

■腫瘍細胞の染色性と強度

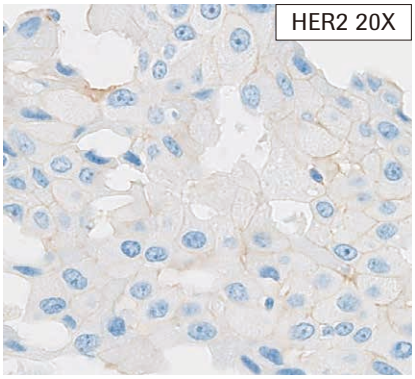
HER2 IHCスコア0および1+



HER2 0

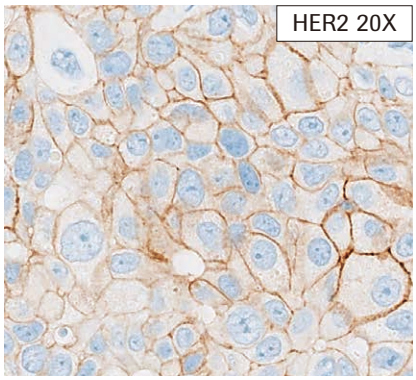


HER2 0

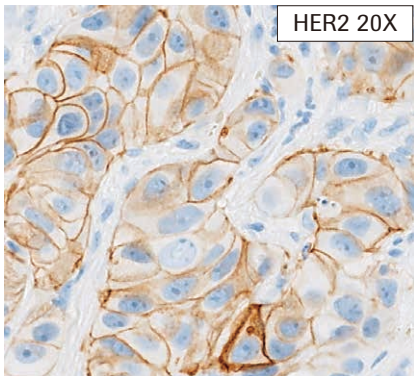


HER2 1+

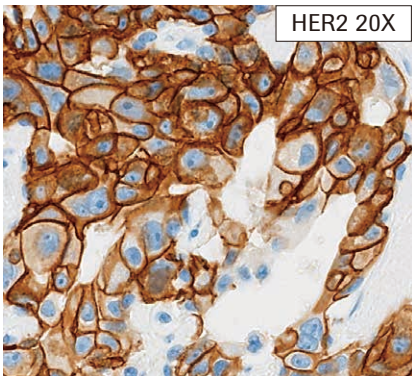
HER2 IHCスコア2+および3+



HER2 2+



HER2 2+



HER 3+

参考画像

症例一覧

参考症例

- HER2 IHCスコア0
- HER2 IHCスコア1+
- HER2 IHCスコア2+
- HER2 IHCスコア3+

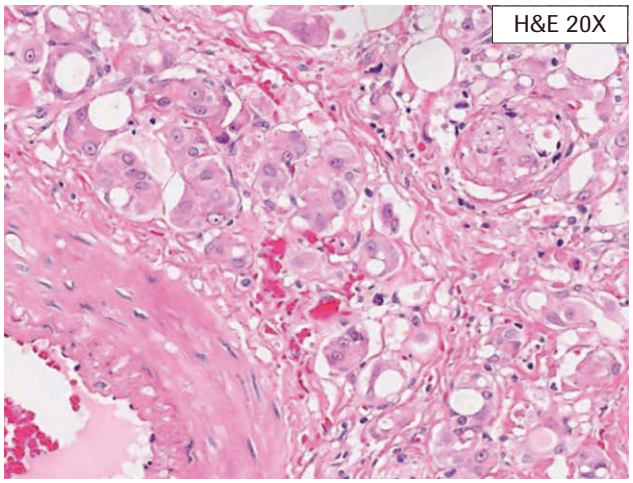
判定に苦慮する症例（各スコアの境界域となる例）

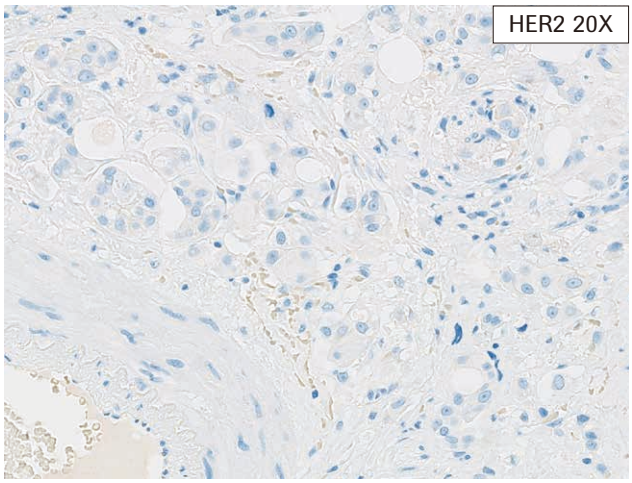
- HER2 0、1+との境界
- HER2 1+、2+との境界
- HER2 2+、1+との境界
- HER2 2+、3+との境界
- HER2 3+、2+との境界

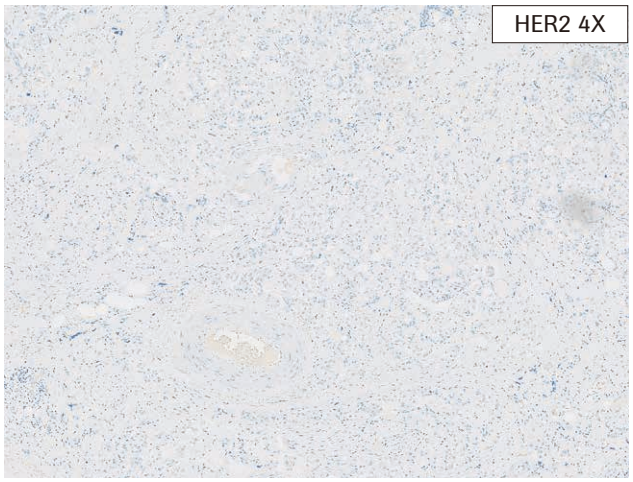
アーチファクト

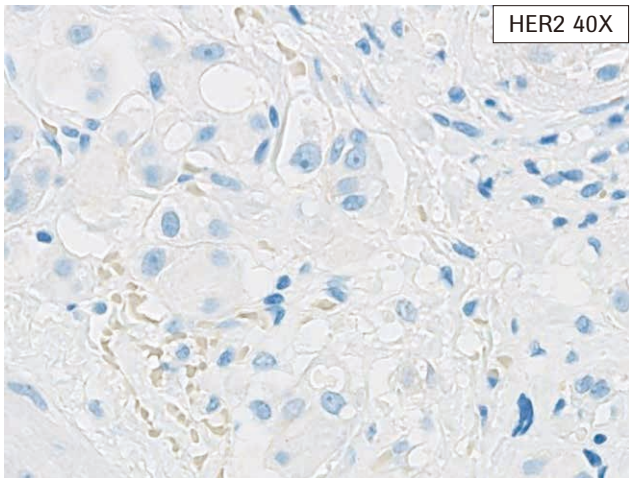
■参考症例

HER2 IHCスコア0



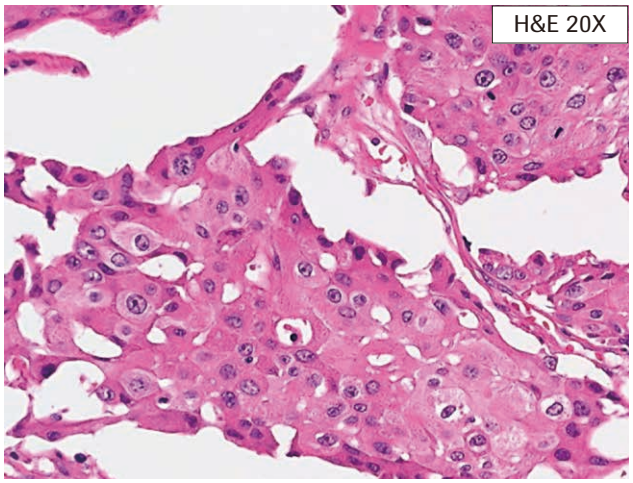


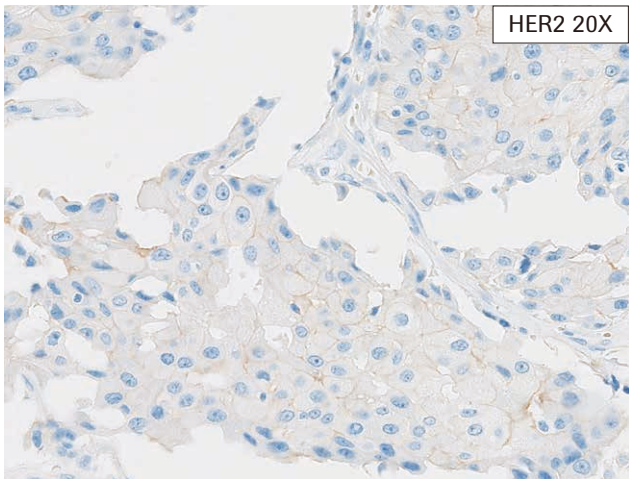


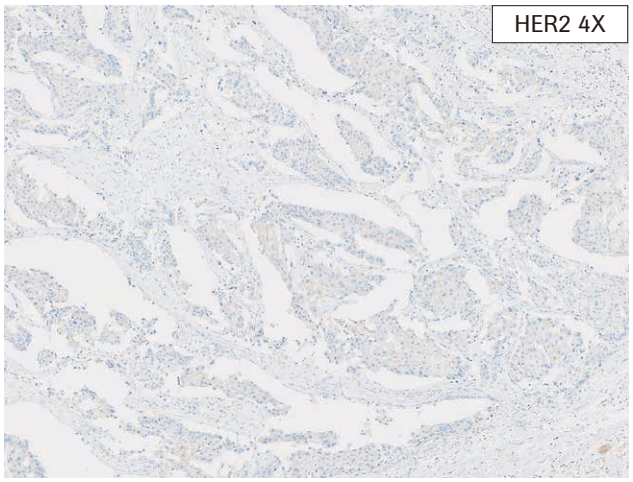


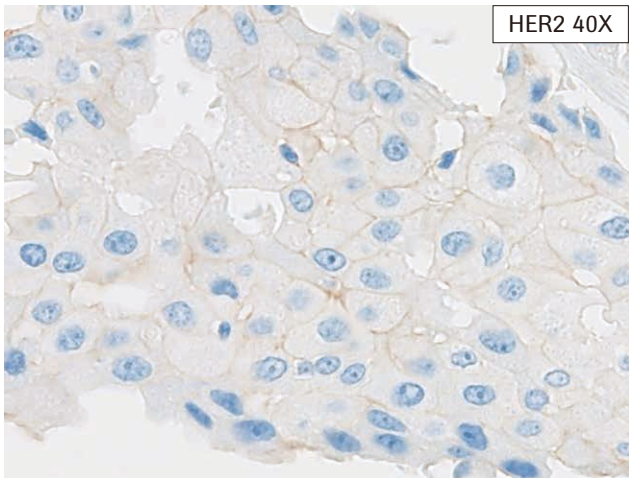
症例1： 唾液腺導管癌。対物レンズ4倍では、極めて微細な染色が観察されるものの、このように低倍率では染色の最終的な細胞内局在性が判定できない。20倍および40倍の画像では、腫瘍細胞に膜染色がまったくなく、HER2 IHCスコア0に該当する。

HER2 IHCスコア1+



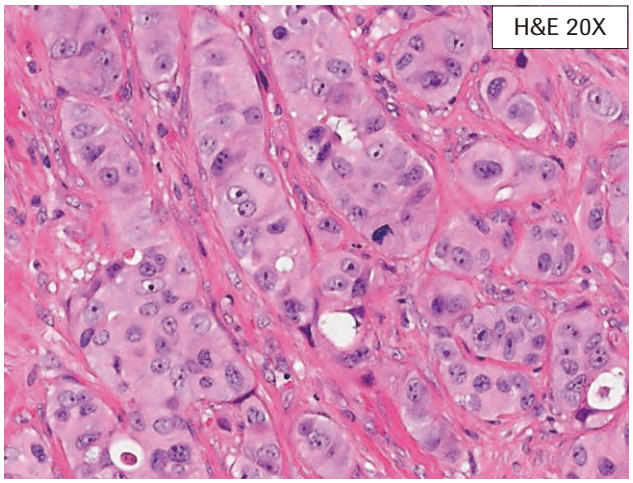


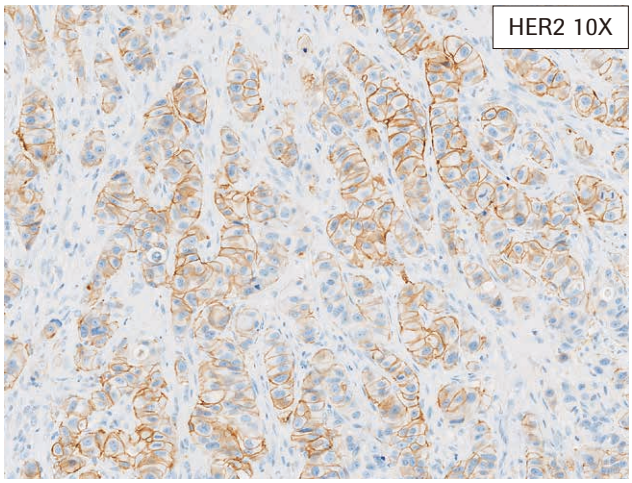


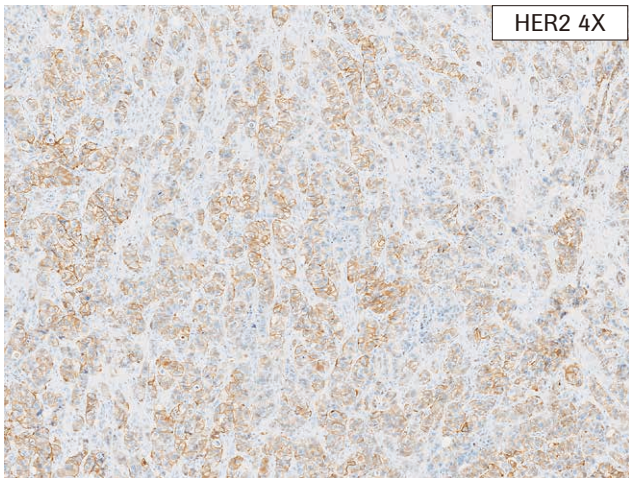


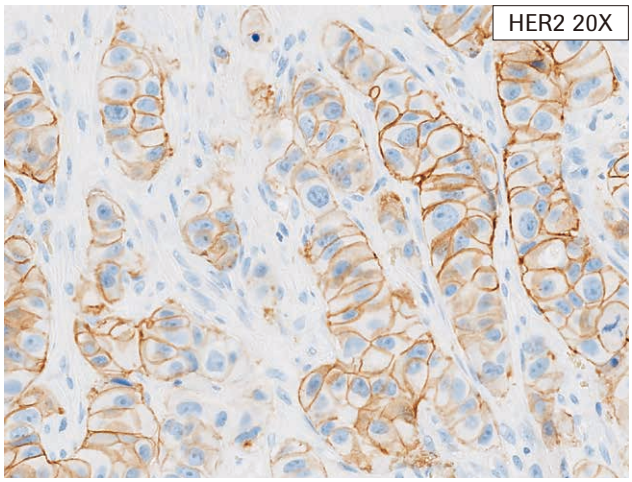
症例2： 唾液腺導管癌。対物レンズ4倍では、極めて微細な染色が観察されるものの、このように低倍率では染色の最終的な細胞内局在性が判定できない。20倍および40倍の画像では、腫瘍細胞の10%超に微～弱度の不完全な膜染色が示され、HER2 IHCスコア1+に該当する。膜染色が淡い褐色の色調を呈し、個々の腫瘍細胞が不完全な膜染色を示していることに注目する。

HER2 IHCスコア2+



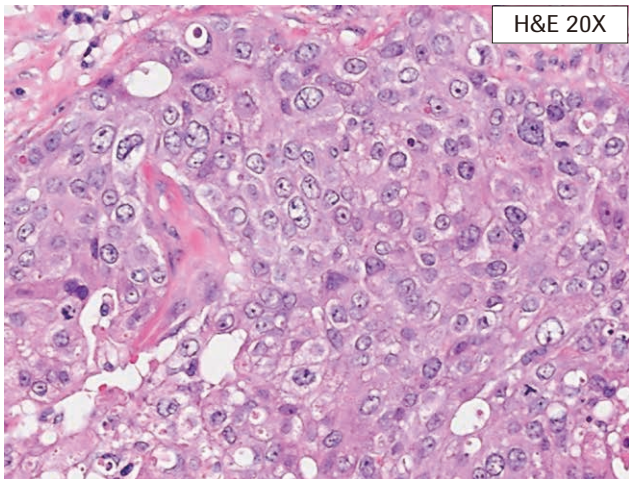


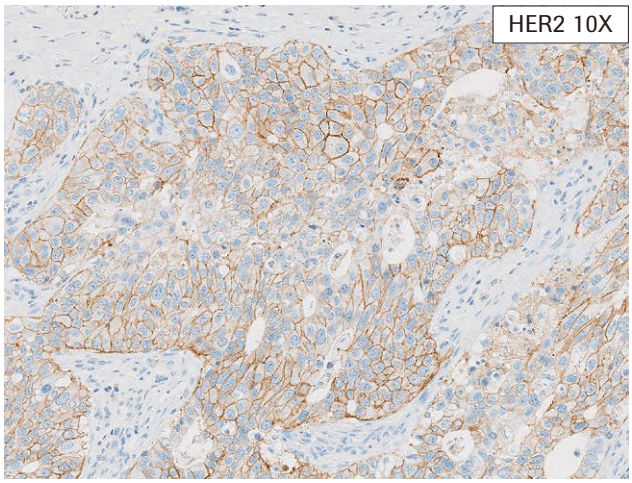


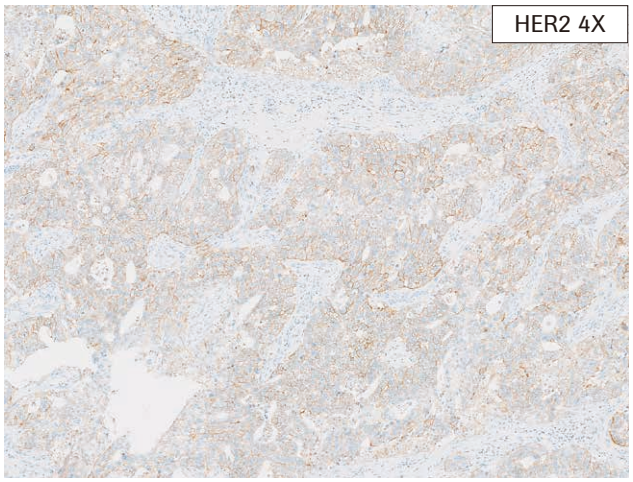


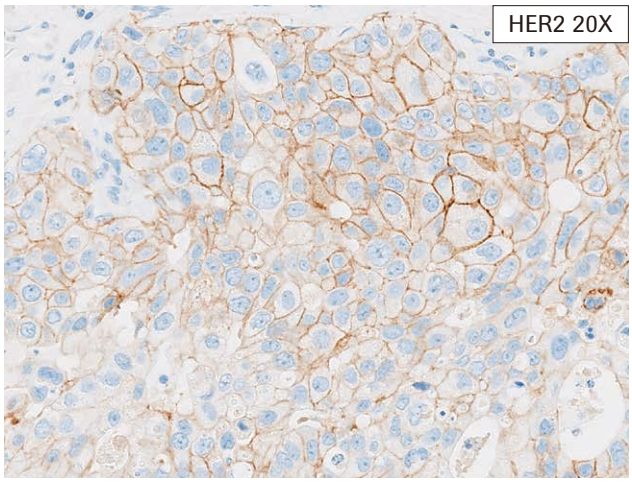
症例3： 唾液腺導管癌。対物レンズ4倍では腫瘍内に弱度～中等度の染色がびまん性に存在する。10倍および20倍の画像では、弱度および中等度の、全周性の膜染色を呈する腫瘍細胞が認められ、IHCスコア2+に該当する。

HER2 IHCスコア2+



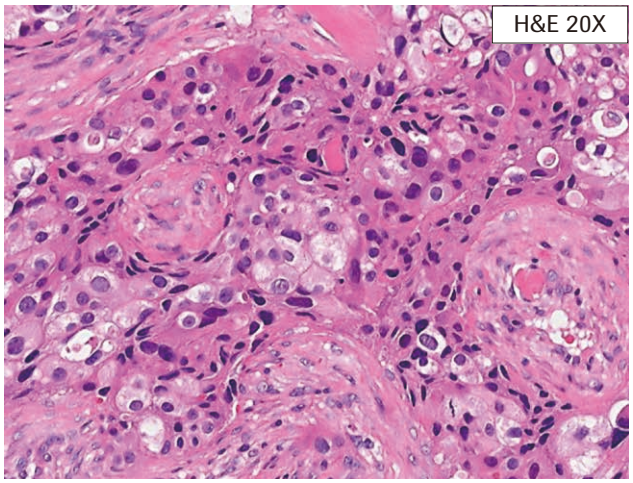


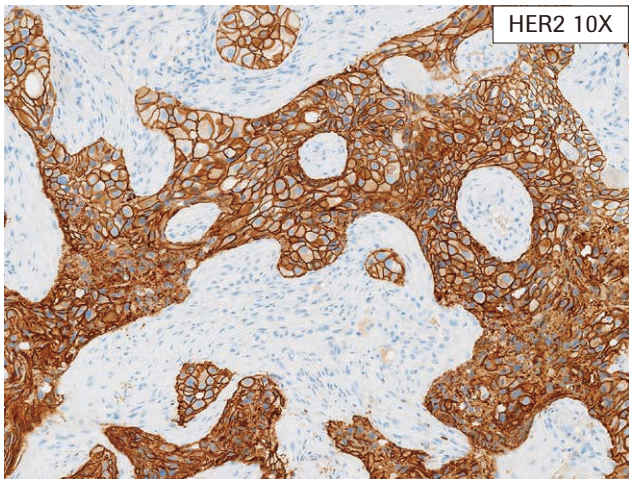


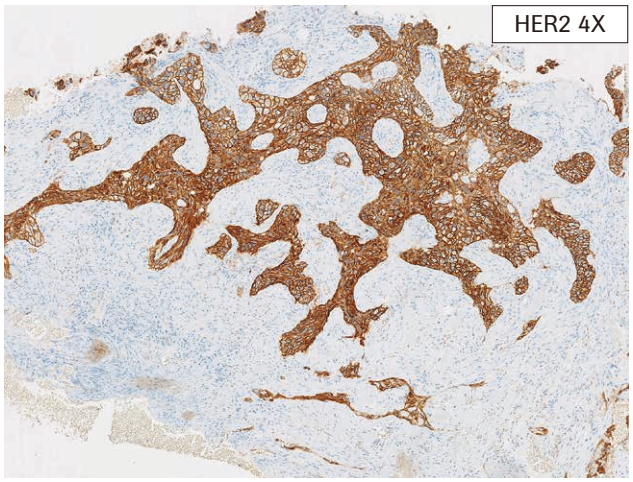


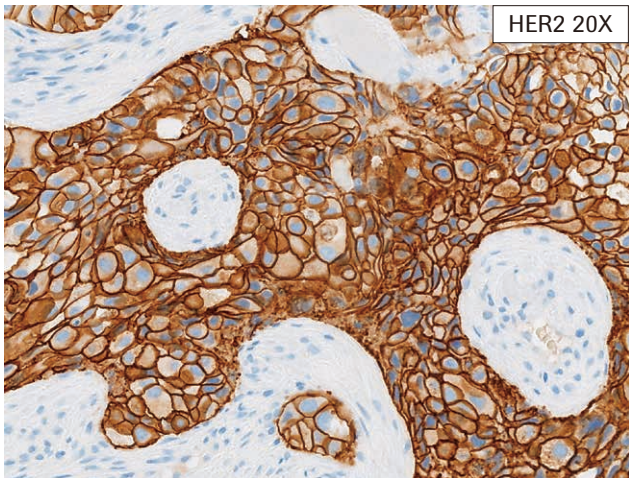
症例4： 唾液腺導管癌。対物レンズ4倍では、腫瘍内に弱い染色がびまん性に認められる。散在した中等度の膜染色も観察される。10倍および20倍の画像では、10%を超える腫瘍細胞に弱度～中等度の全周性の膜染色が認められる。そのほか、弱い不完全／部分的な膜染色を呈する腫瘍細胞が確認される。判定はIHCスコア2+に該当し、前の症例と比較すると全体的に強度が低い。

HER2 IHCスコア3+









症例5： 唾液腺導管癌。対物レンズ4倍では、ほぼすべての腫瘍細胞内に、はっきりした強い全周性の膜染色が認められる。10倍および20倍では、腫瘍細胞の100%に均一な強いの全周性の膜染色が示され、HER2 IHCスコア3+に該当する。膜染色が極めて暗い褐色であり、極めて強いことに注目する。

■判定に苦慮する症例（各スコアの境界域となる例）

スコア「1+」と「2+」の境界や、「2+」と「3+」の境界に該当する症例や発現の異なるレベルが混合しており、膜染色の割合（%）を視覚的に推定することが難しくなっている症例が含まれます。ここでは、そのような症例を提示します。

1. あきらかな「1+」および「2+」の症例を参考にし、境界例を判定する。

2. 20倍および40倍の対物レンズを使用し、スコア1+と2+の鑑別を行う。スコア3+か2+かで悩む場合は、 4倍および20倍の対物レンズを使用し、確認する。

SGTにおけるスコアリングは、全周性の膜染色も不完全な膜染色も考慮し判定する必要がある。（表2参照）。

3. スライドの全域を注意深く観察し、適切な処理、染色された領域でスコアリングを実施する。

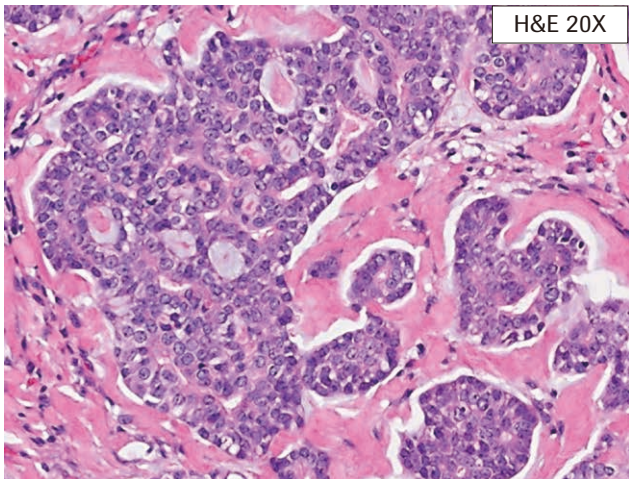
4. 以上を実施しても判定できない場合は、別の切片を再染色するか、別のブロックを用いての再染色を考慮する。

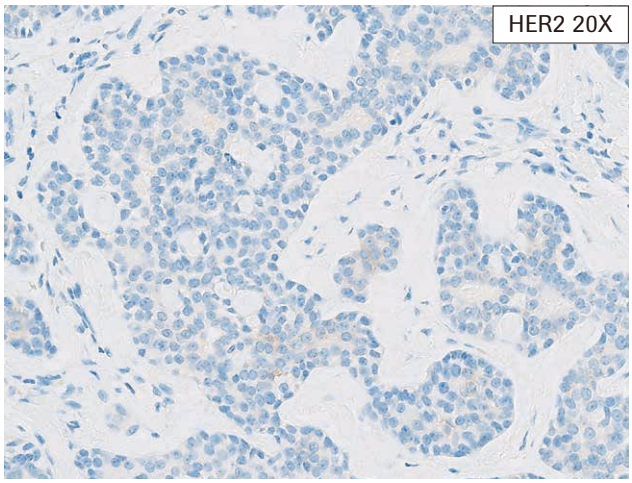
5. 結果に疑問が残る場合は、in situ Hybridization法など、別の方法を考慮する。

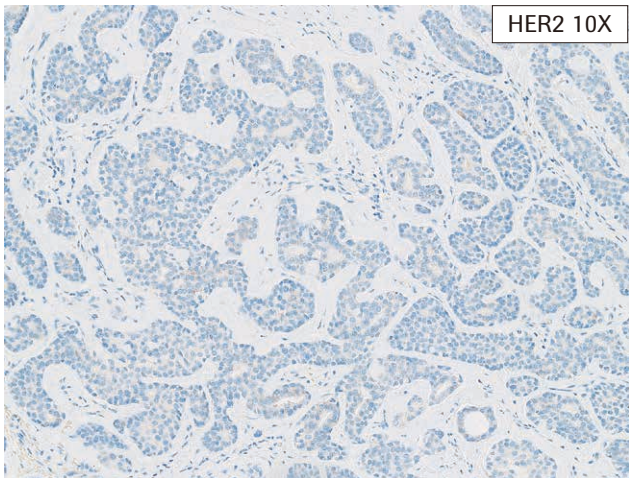
判定に苦慮する症例（各スコアの境界域となる例）

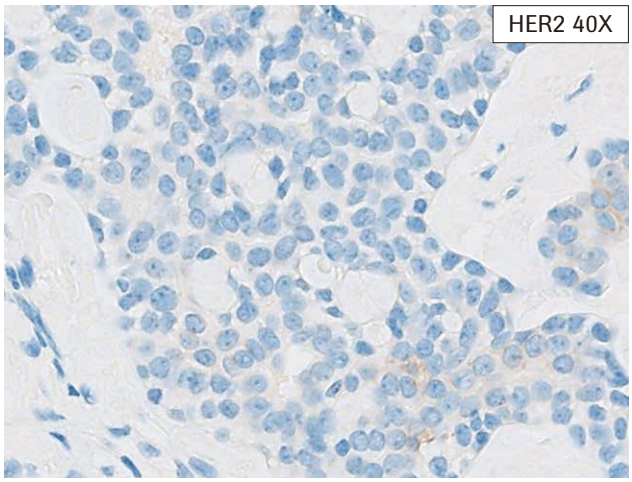
- HER2 0、1+との境界
- HER2 1+、2+との境界
- HER2 2+、1+との境界
- HER2 2+、3+との境界
- HER2 3+、2+との境界

HER2 IHCスコア0、1+との境界



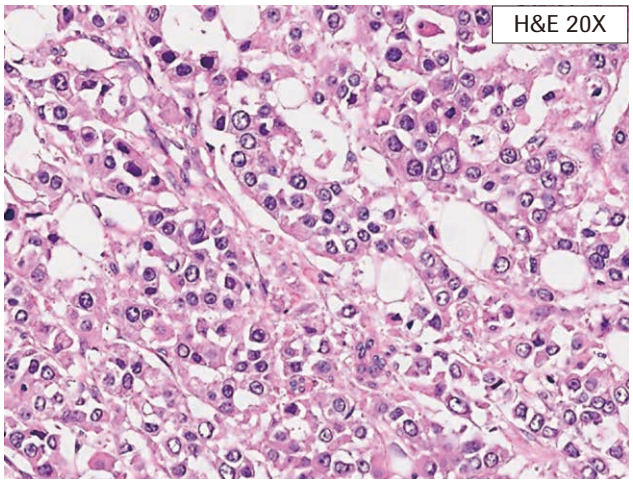


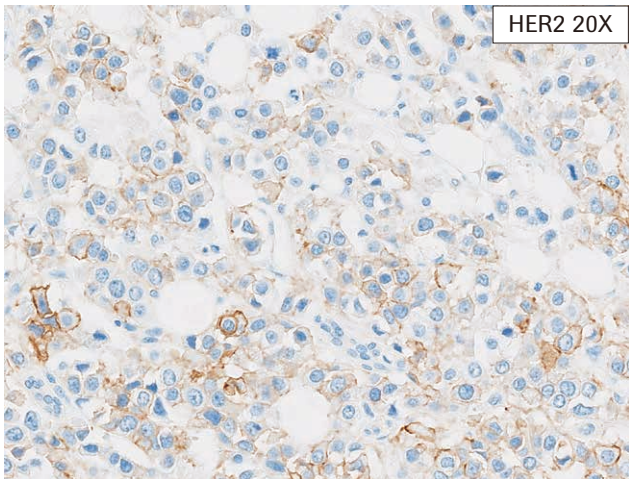


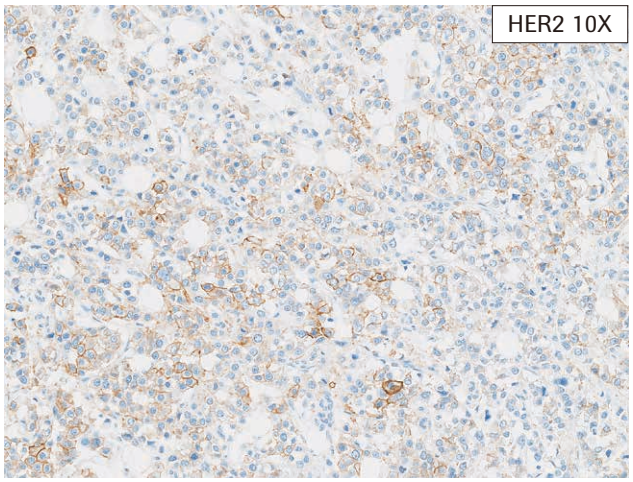


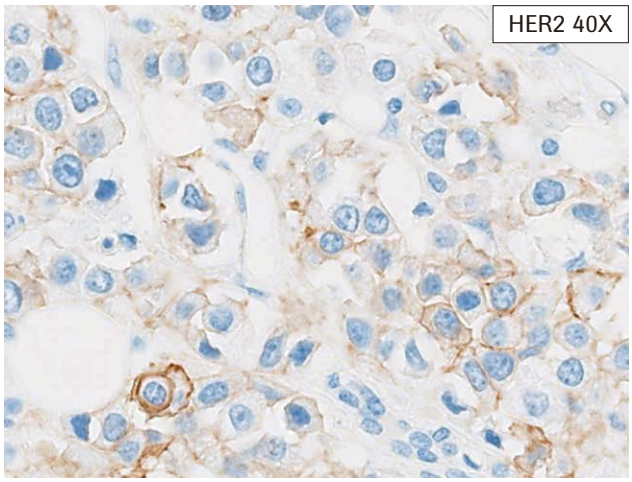
症例6： 腺様嚢胞癌。対物レンズ10倍および20倍では腫瘍細胞内に微～弱度の染色が認められるものの、細胞内局在性が容易に判定できない。40倍では微～弱度の膜染色が認められるが、腫瘍細胞の10%以下である。判定はHER2 IHCスコア0+、1+との境界に該当する。

HER2 IHCスコア1+、2+との境界



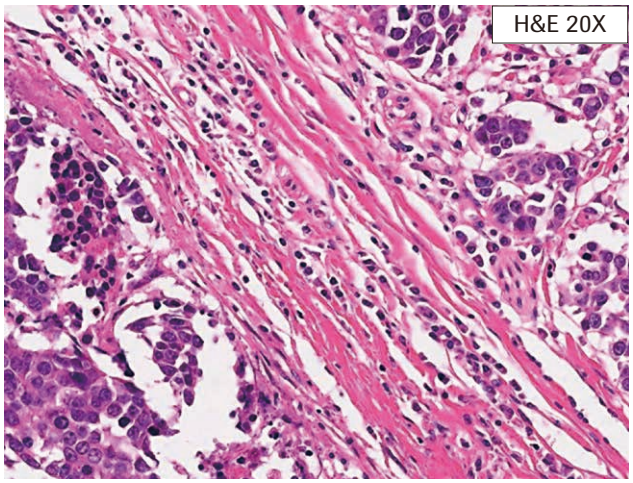


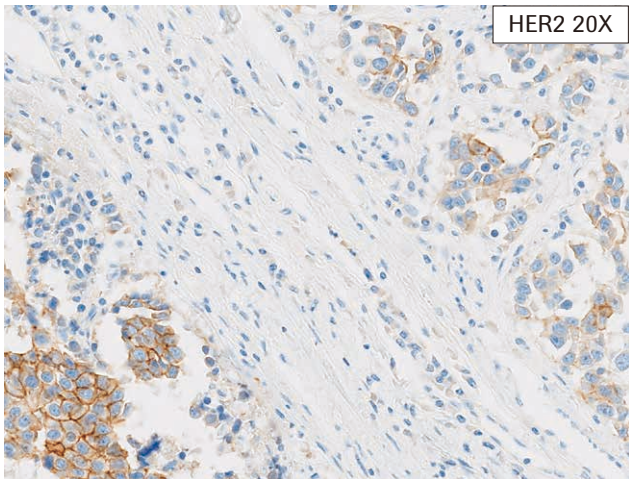


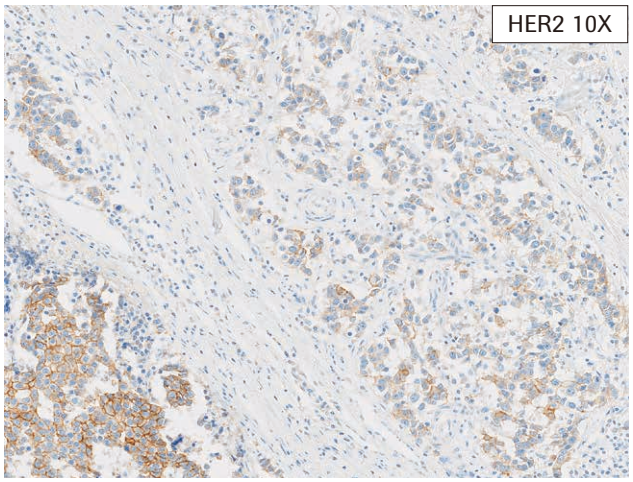


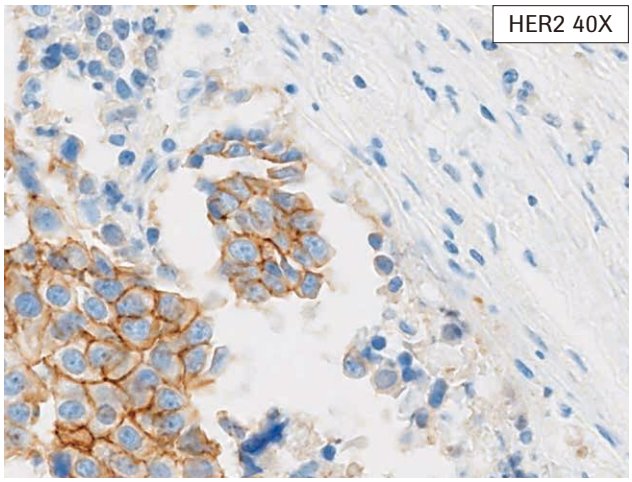
症例7： 唾液腺導管癌。対物レンズ10倍、20倍および40倍では弱度、局所的に中等度の膜染色が認められる。弱～中等度の全周性の膜染色が認められるが（20倍および40倍が最もよく見える）、腫瘍細胞の10%以下である。腫瘍細胞の大部分が弱度の不完全な膜染色を呈する。判定はHER2 IHCスコア1+、2+との境界に該当する。

HER2 IHCスコア2+、1+との境界



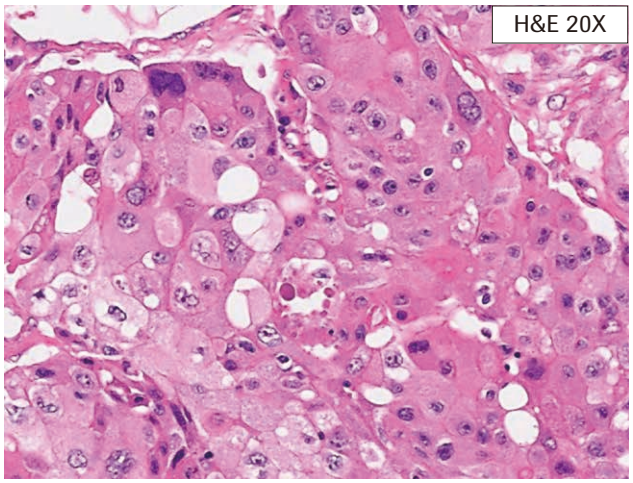


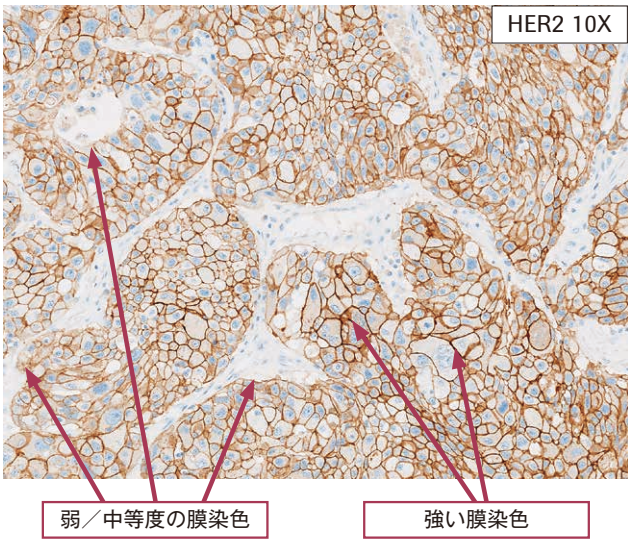


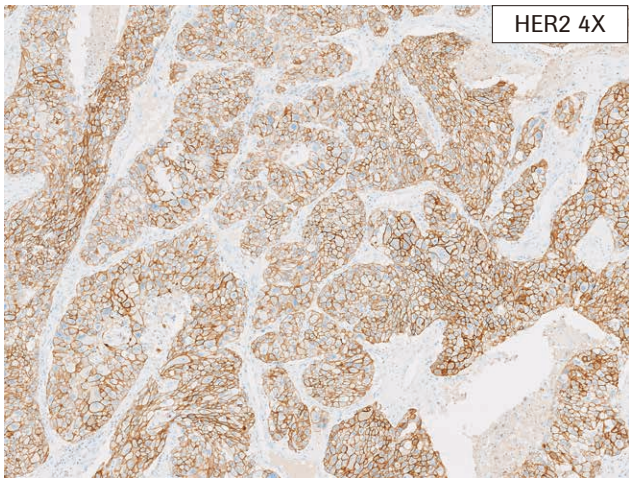


症例8： 唾液腺導管癌。対物レンズ10倍および20倍では、弱～中等度の膜染色を呈する腫瘍細胞が認められる。中等度の膜染色は全周性に認められる。これは20倍と40倍で最もよく観察でき、腫瘍細胞の10%強に中等度の全周性の膜染色が認められる。したがって、判定結果はHER2 IHC 2+、1+との境界に該当する。

HER2 IHCスコア2+、3+との境界

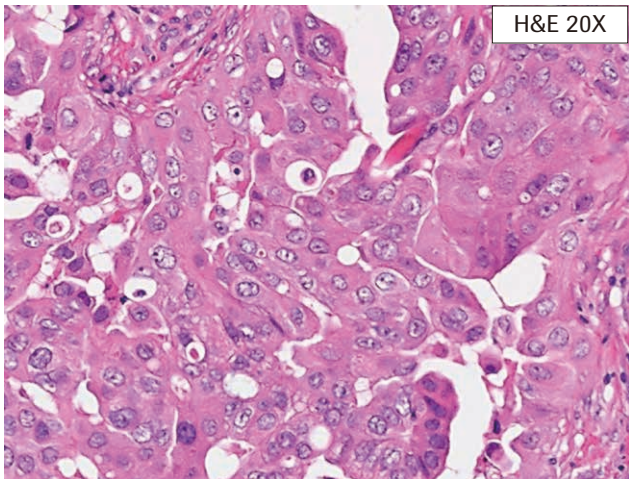


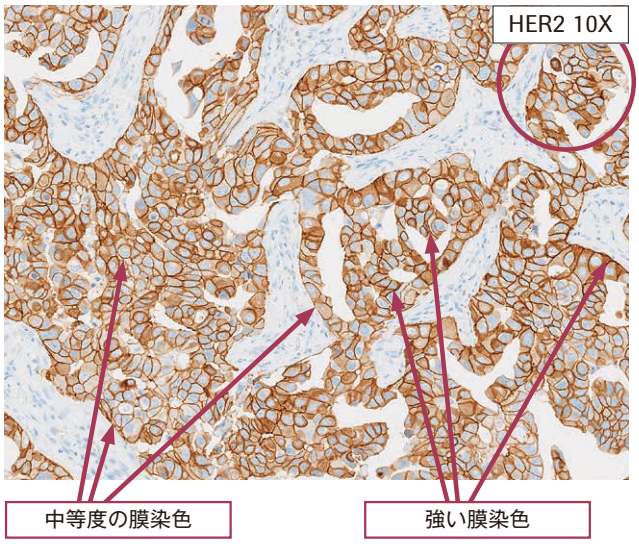


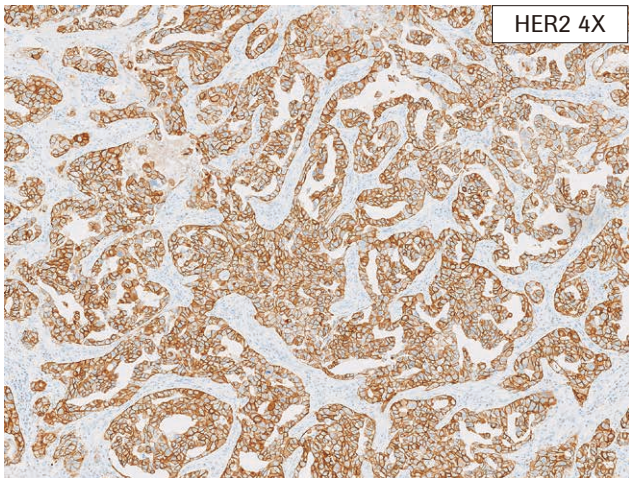


症例9： 唾液腺導管癌。対物レンズ10倍では、ほぼすべての腫瘍細胞に弱／中等度～強いの全周性膜染色が認められる。強い全周性の膜染色は極めて暗い褐色～ほぼ黒色の色調が特徴であるのに対し、弱／中等度は淡い褐色～明るい褐色の色調を呈する。強く染色された腫瘍細胞と弱／中等度に染色された腫瘍細胞が混在しているため、極めて難しい症例である。しかも、強いの全周性の膜染色を呈する腫瘍細胞の割合（%）は10%に極めて近いものの、わずかに下回っている。判定結果はIHCスコア2+、3+との境界に該当する。

HER2 IHCスコア3+、2+との境界



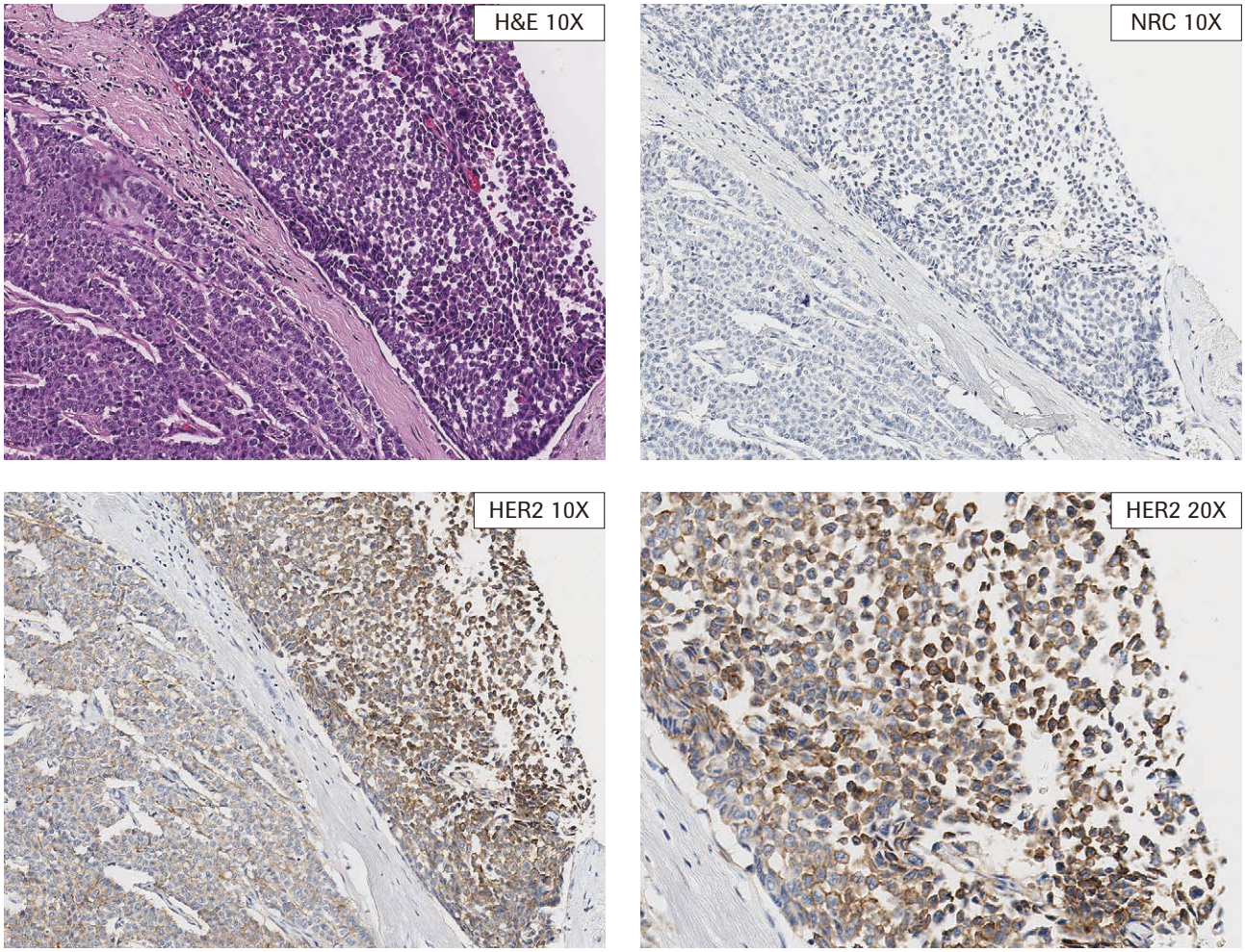




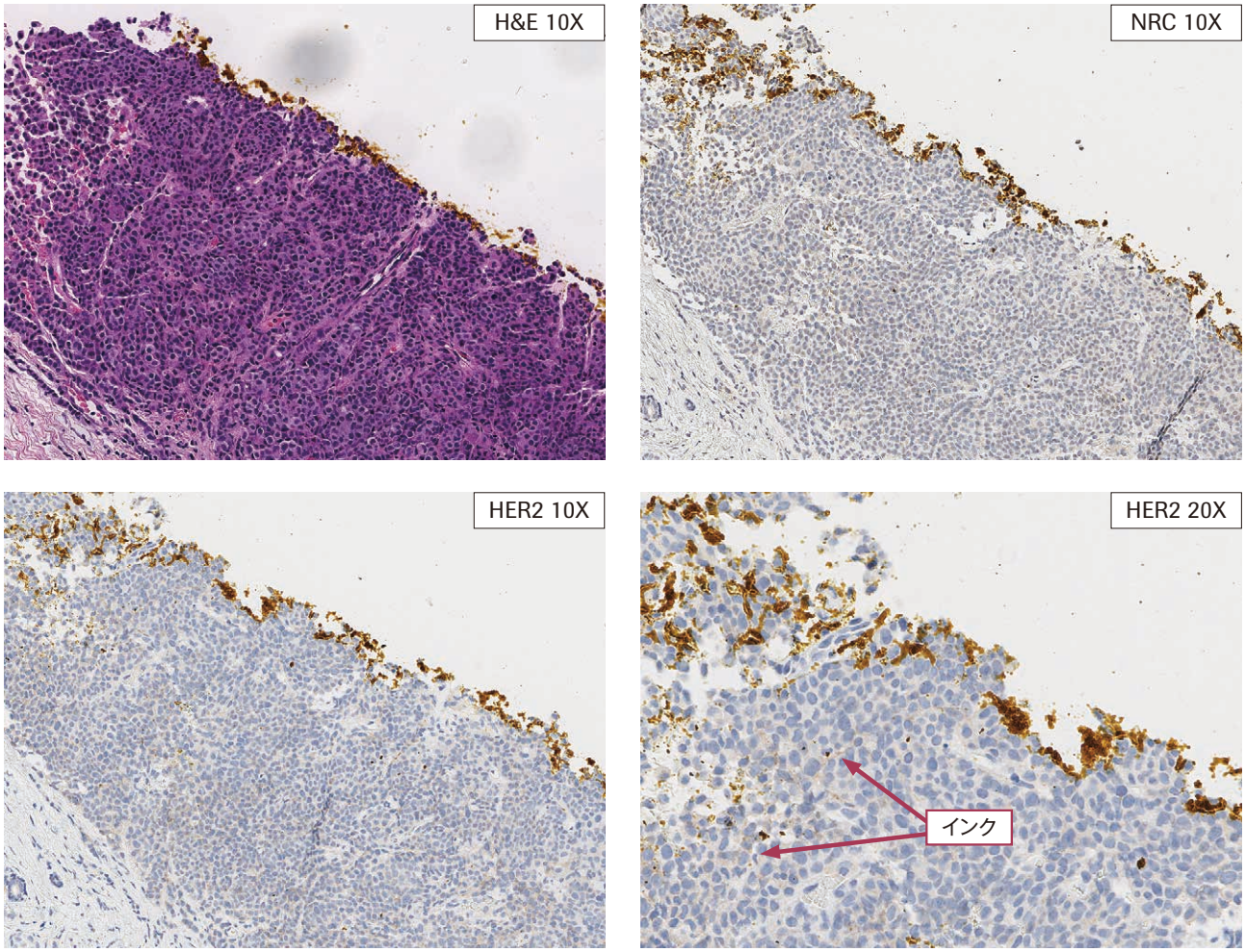
症例10： 唾液腺導管癌。画像では、ほぼすべての腫瘍細胞に全周性の膜染色が認められる。中等度～強い膜染色を呈した腫瘍細胞が混在している（矢印と楕円によって例を示す）。これはIHCスコア2+と3+の鑑別が難しい。強い染色性を示す膜は、典型的な3+の症例に見られるものほど厚みはなく、腫瘍細胞の10%余り（15%）に強い膜染色が認められるため、IHCスコア3+、2+との境界に該当する。

■アーチファクト

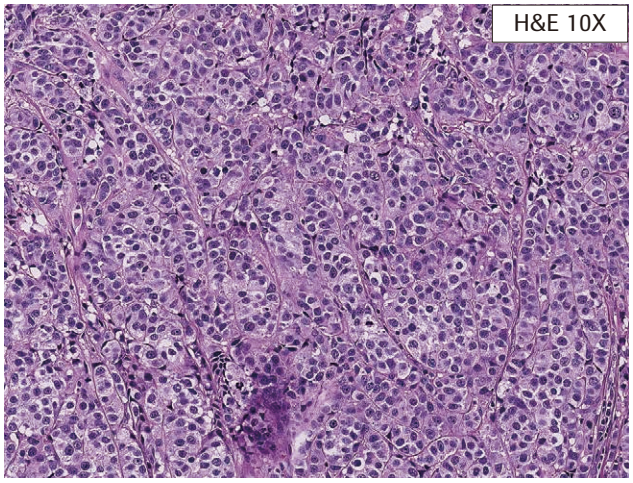
陰性コントロール試薬（NRC）やベンタナ ultraView パスウェーHER2（4B5）（HER（4B5））によって染色した際に観察される可能性があるアーチファクトを取り上げます。以下のようなアーチファクトが存在し、ベンタナ ultraView パスウェーHER2（4B5）染色の判定の妨げとなる場合は再染色が必要と思われます。必ずNRCを確認の上、非特異的なバックグラウンド染色が許容範囲内であることを確認してください。

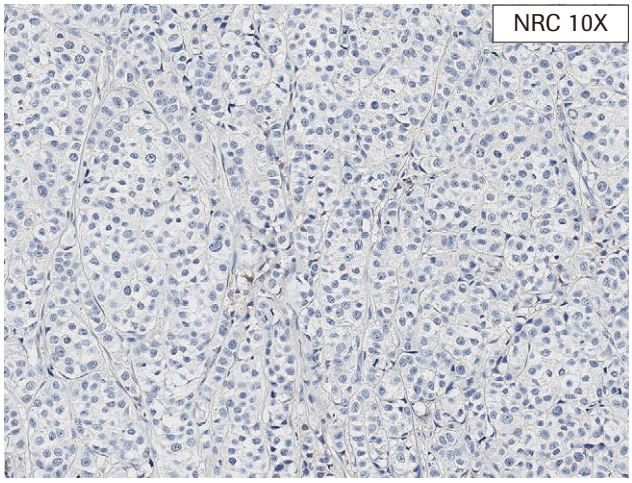


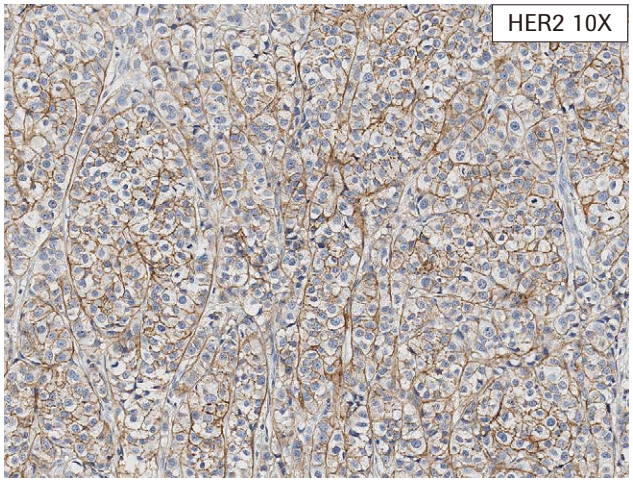
アーチファクト例1　この症例では浸潤性腫瘍が認められる。H&E染色で見ると、この領域の腫瘍細胞は壊死していると思われる。腫瘍組織の外縁の細胞は、濃く染色されているように見えるが、壊死した腫瘍や、壊死している領域ではスコアリングしてはならない。

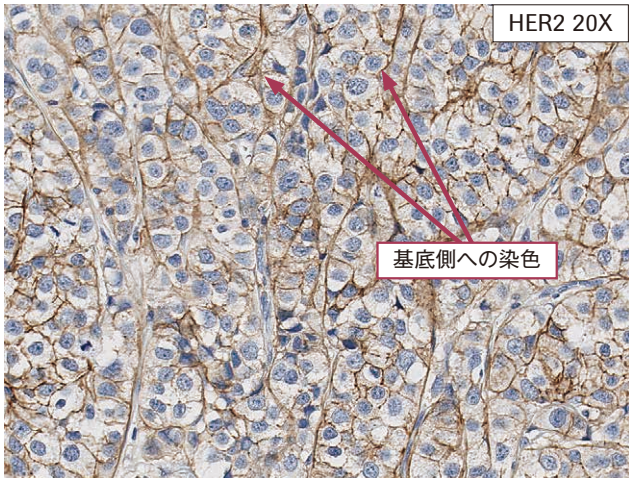


アーチファクト例2　この症例は、黄色い外科用インクがみられる生検検体である。低倍率では、インク（特に黄色のもの）がHER2染色のように見える可能性がある。外科用インクから真のHER2染色を鑑別するため、高倍率での観察が必要となる。

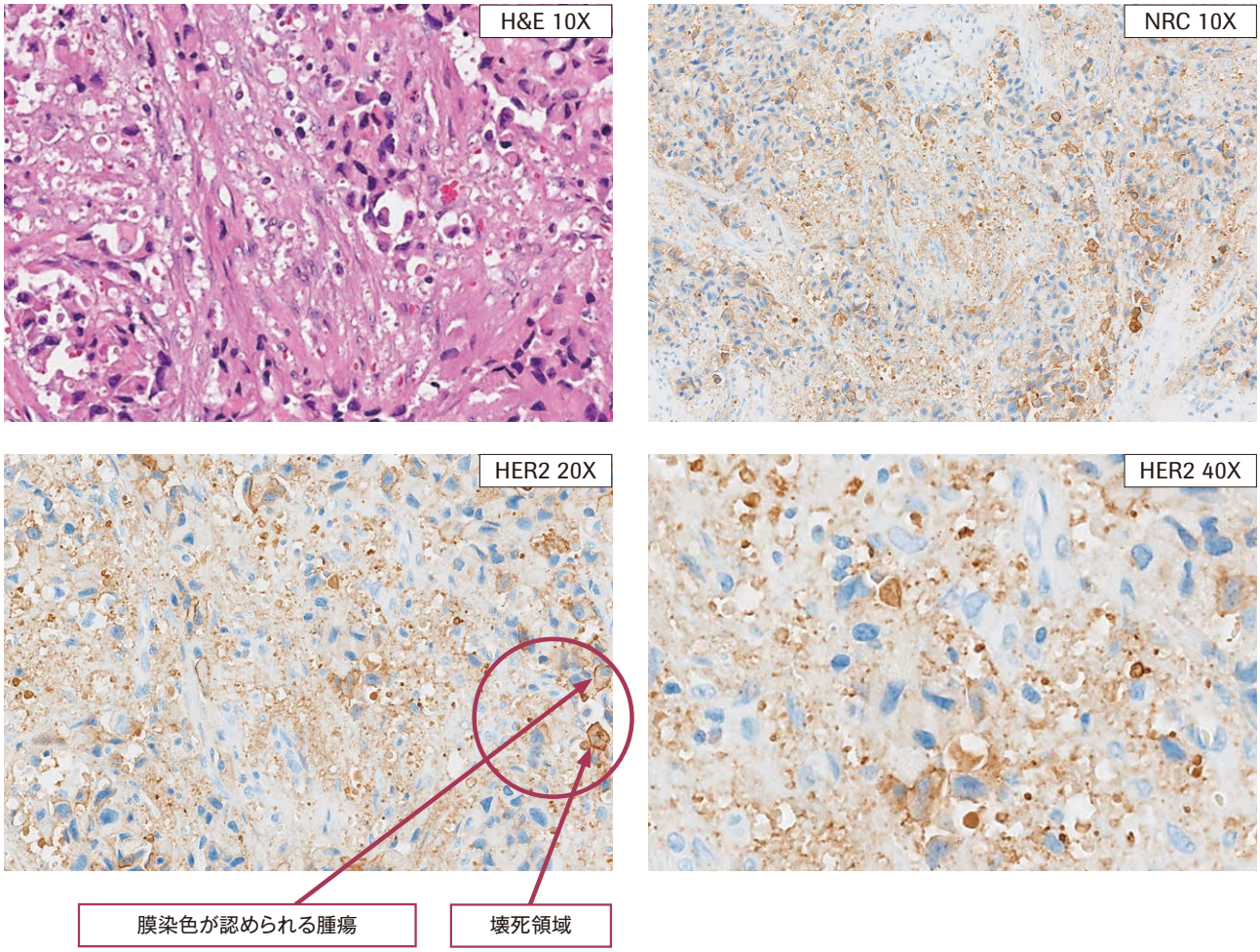




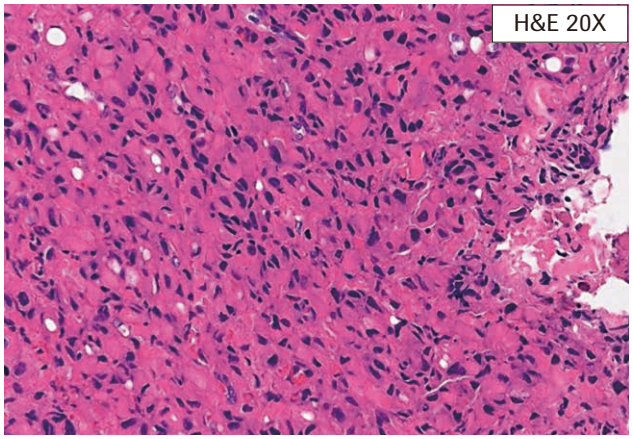


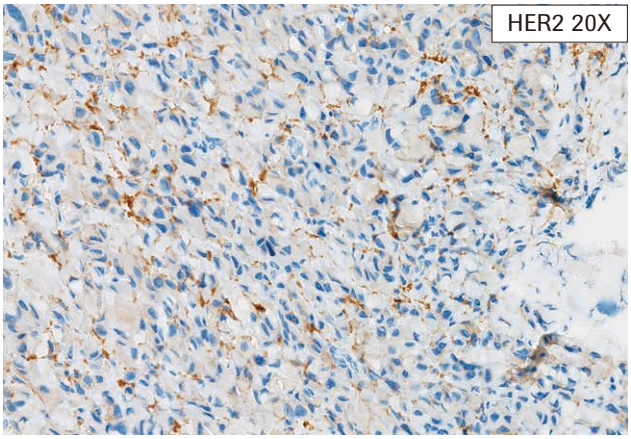


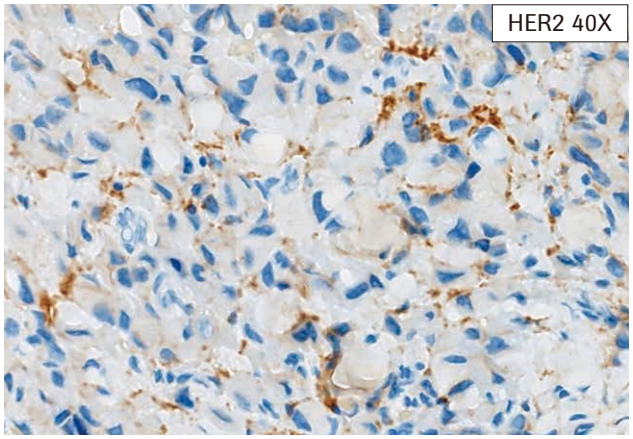
アーチファクト例3　この症例は、低倍率で観察できる明らかなHER2染色を示す。高倍率では、染色の多くが基底側への染色であることがわかる。基底側の膜染色が存在する場合、スコアリングの際、腫瘍細胞の別の側面の膜染色（HER2染色の外側の弧）を確認する必要がある。真の部分的かつ全周性の膜染色が存在している場合のみ、HER2スコアリングに含める。



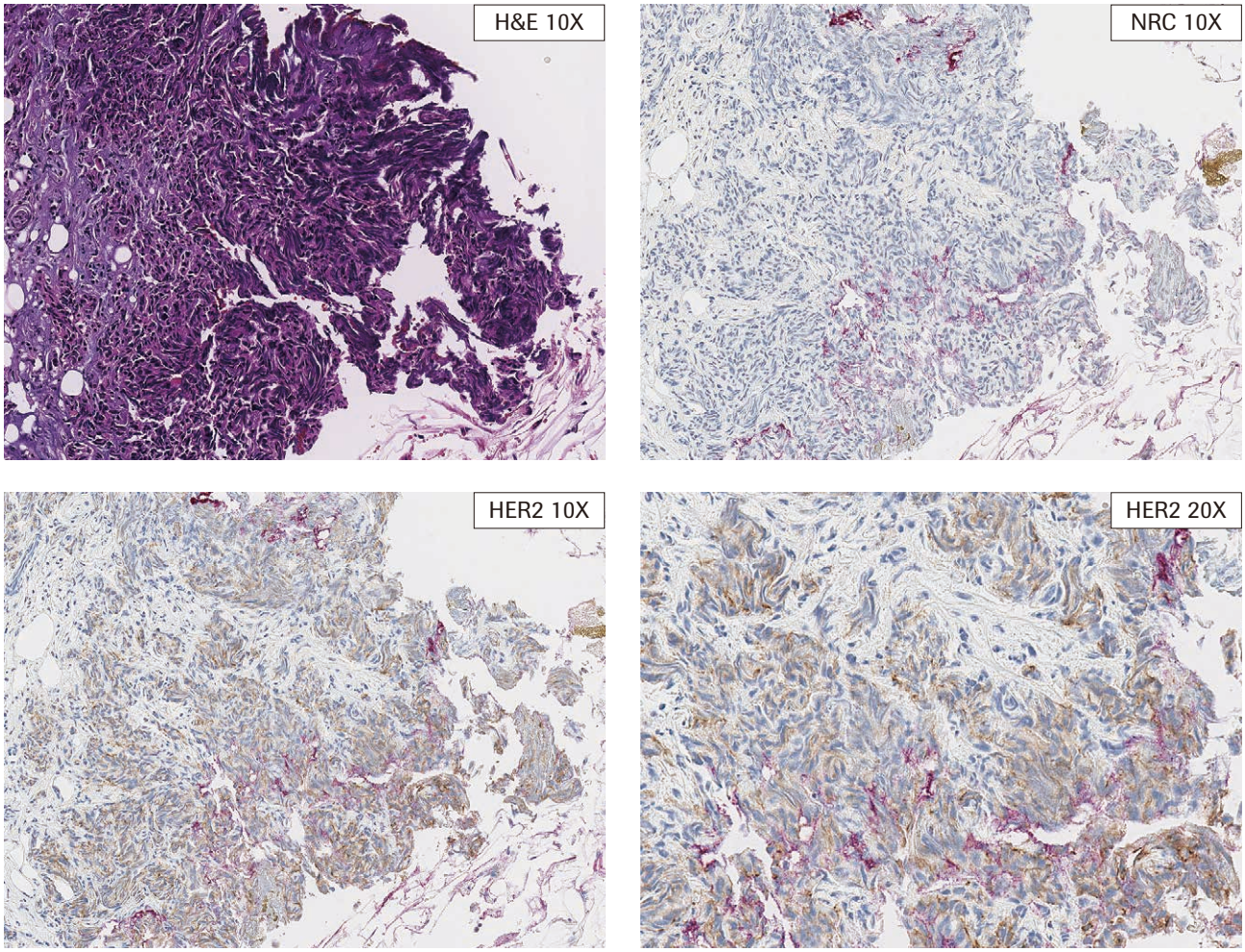
アーチファクト例4　この症例は腫瘍巣に隣接して壊死領域を認める。壊死領域では非特異的な粒状のDABシグナルを呈しており、HER2 IHCスコア判定に含めてはならない。少数の腫瘍細胞だけが真の膜染色（矢印）を呈していることにも注目。



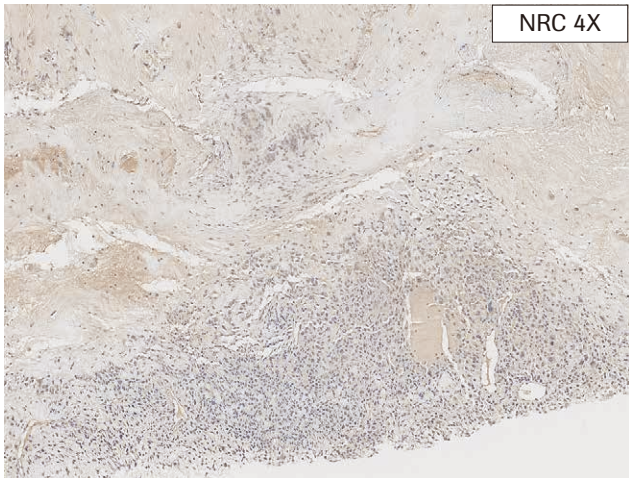


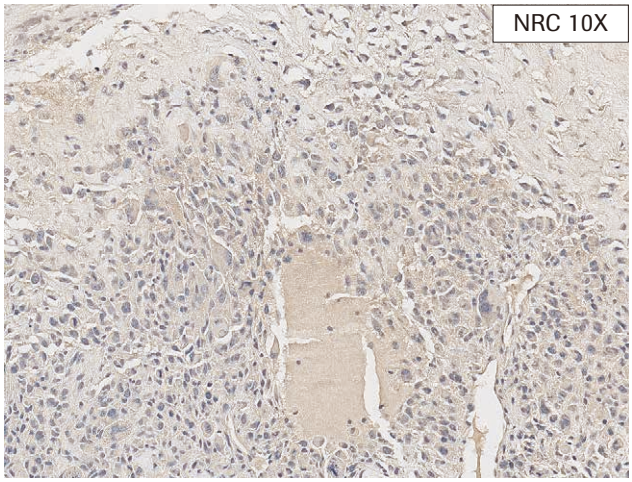


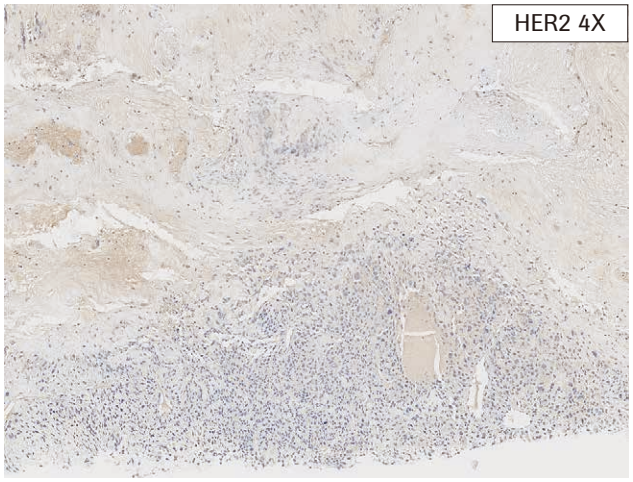
アーチファクト例5　この症例は個々の腫瘍細胞に隣接した非特異的染色を示す。染色の一部は点状または粒状に認められ、低倍率では特異的（部分的／不完全）な腫瘍細胞の膜染色と間違えるおそれがある。しかし、高倍率では、その染色は、腫瘍細胞膜の一部ではなく、腫瘍細胞と腫瘍細胞の間にあることが確認できる。したがって、この染色はHER2 IHCスコアに含めてはならない。

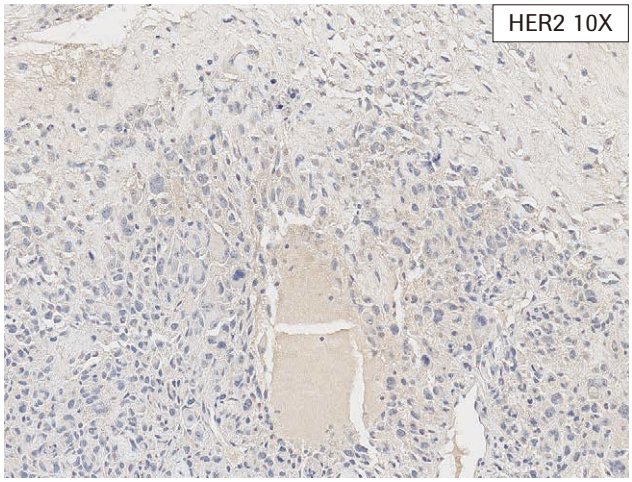


アーチファクト例6　この症例は、組織の縁に沿って細胞の核の断面が「流れ」ており、明らかな電気焼灼／熱アーチファクトのある症例を示す。検体には赤色のインクも認められ、電気焼灼／熱アーチファクト、挫滅の影響のある腫瘍細胞の膜ではスコアを付けないこと。このように破壊された膜は非特異的に染色すると考えられるため、真のHER2タンパクの発現を表すものではない。

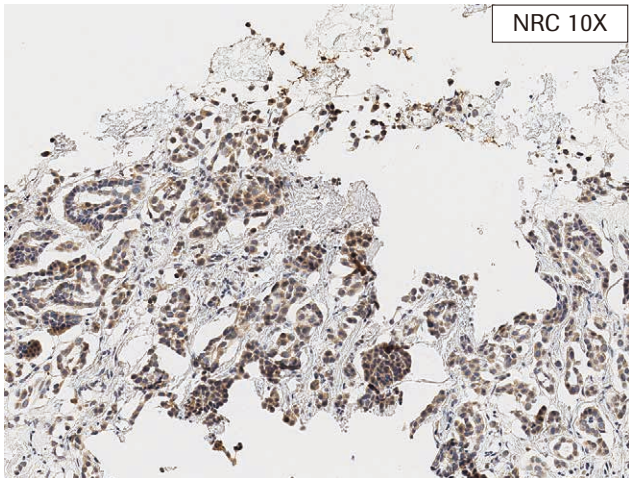


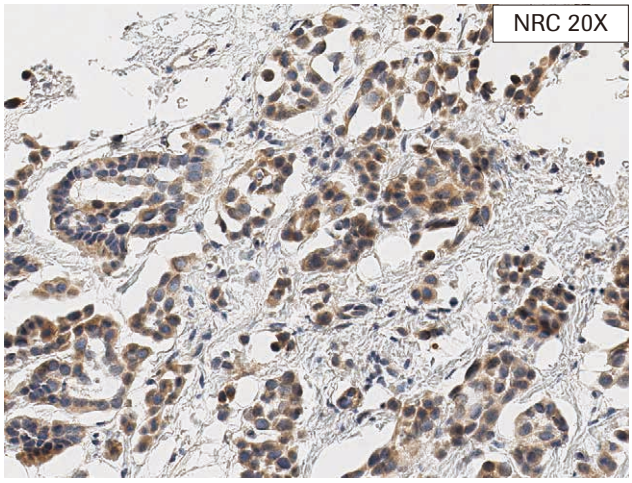


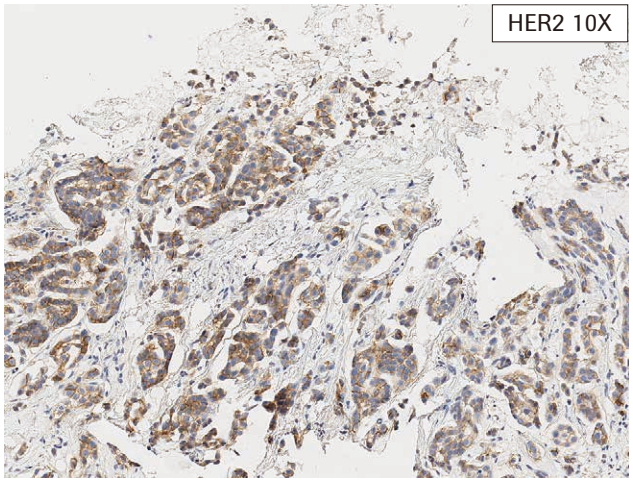


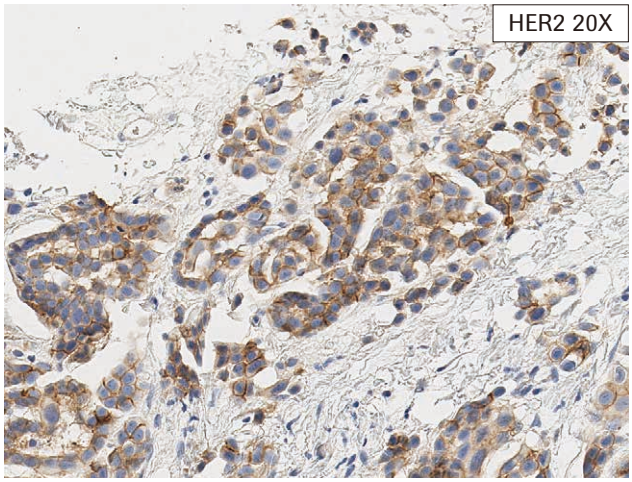


アーチファクト例7　この症例はバックグラウンド染色および血清への染色を認めるNRCを示す。HER2（4B5）のバックグラウンド染色はNRCに見られるバックグラウンド染色をいくぶん下回ることが多い。バックグラウンド染色によって微～弱度の腫瘍細胞の膜染色の判定が難しい場合、その症例は判定不能とみなされる。HER2（4B5）およびNRCの染色を再度実施すること。その他（例:プレアナリティカル）の要因により、同様な結果になることもある。

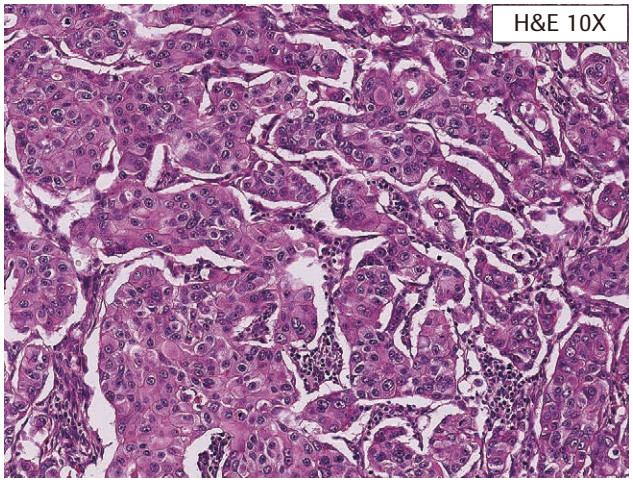


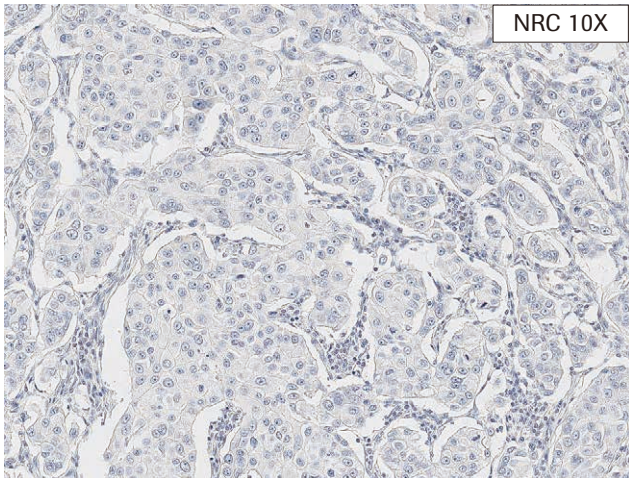


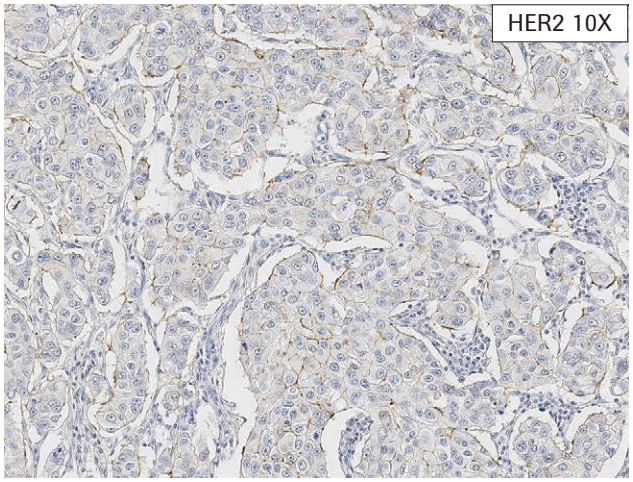


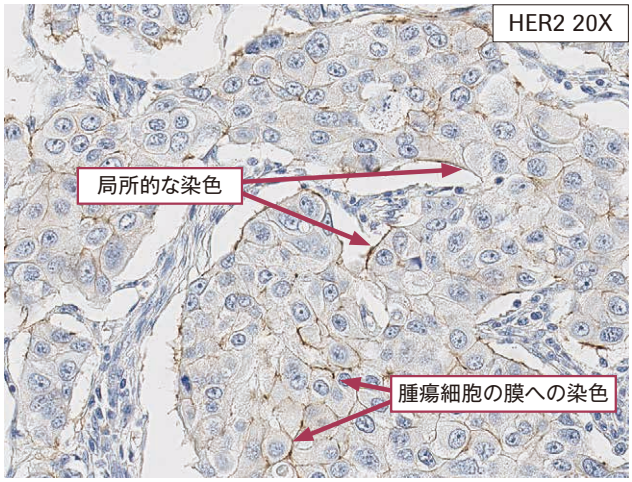


アーチファクト例8　この症例は、陰性コントロール試薬にて許容されない特異的な膜染色を認める。同じRUNでベンタナ ultraView パスウェーHER2（4B5）を染色した症例は評価してはならない。この症例のHER2（4B5）およびNRCの染色を再度実施する必要がある。NRCが依然、特異的な膜染色を呈する場合、その症例は判定不能である。

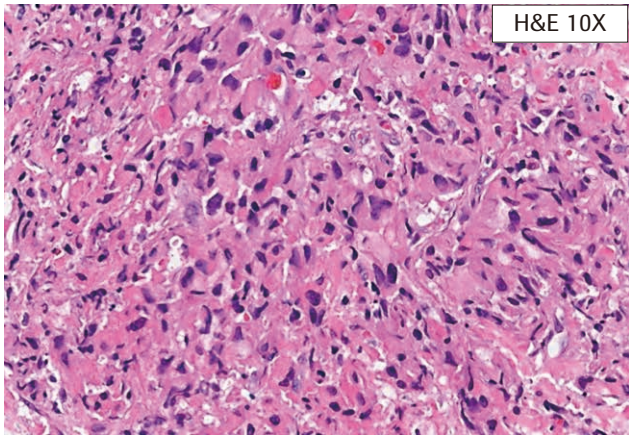


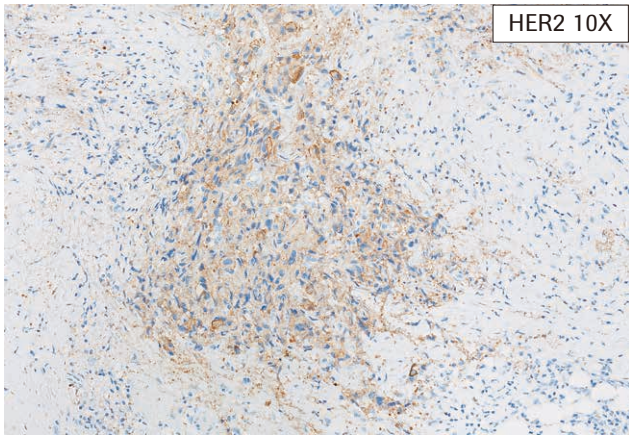


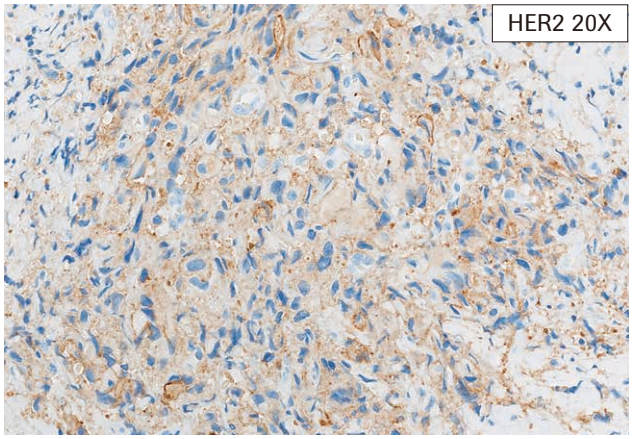


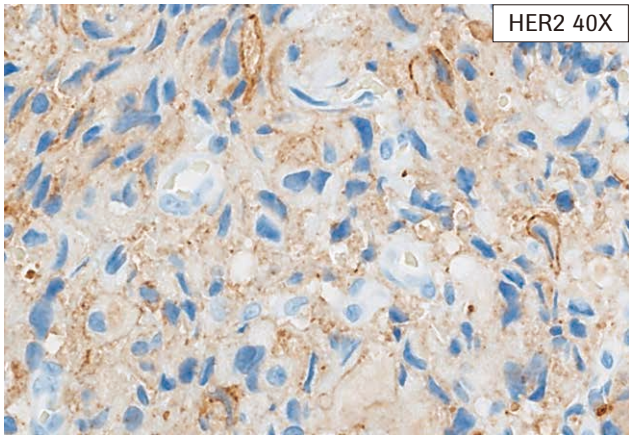


アーチファクト例9　この症例は、間質から腫瘍巣や帯が分離した浸潤性腫瘍を示す（retraction artifact）。この空隙／腫瘍の縁に沿って腫瘍細胞の膜に局所的に染色が認められる。スコアリングの対象とするには、腫瘍細胞膜に沿って別の場所に膜染色が認められなければならない。

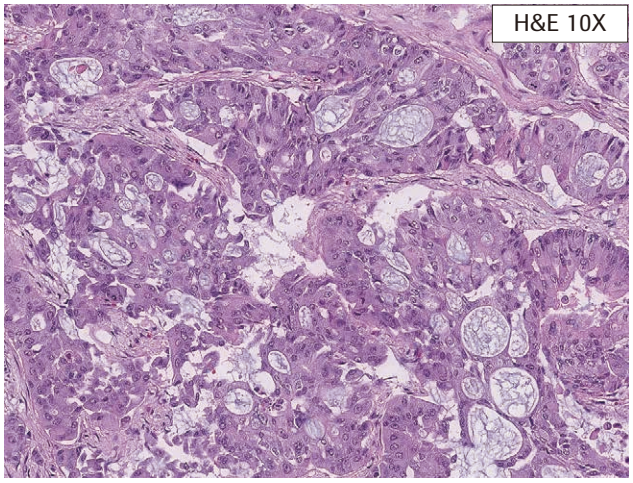


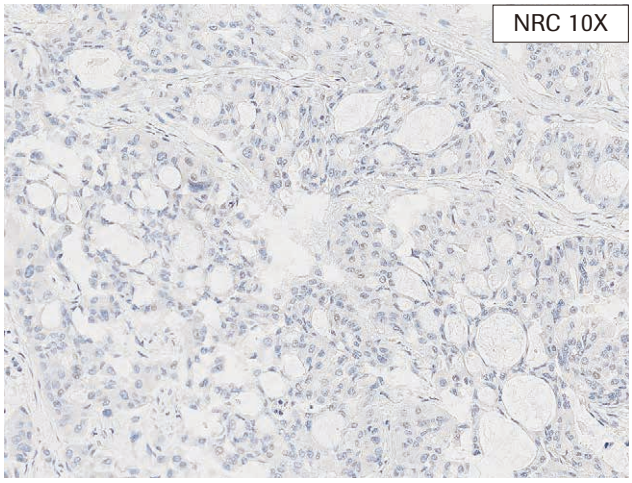


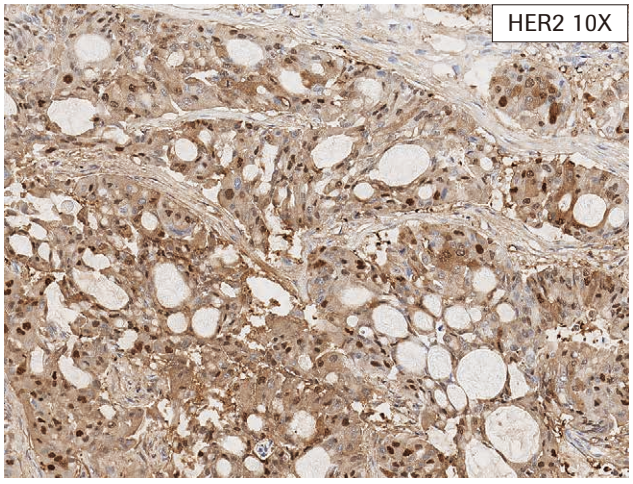


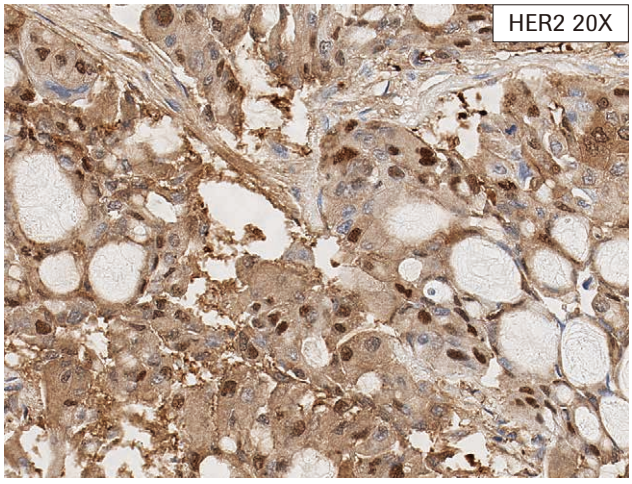


アーチファクト例10　この症例には粒状の細胞質への染色が多数に認められるため、解釈が難しい。そのほか、膜染色を呈する腫瘍細胞が散在しており、その一部にも粒状の染色が確認される。HER2 IHCスコアの判定では、膜染色を呈する腫瘍細胞のみ評価する必要がある。









アーチファクト例11　この症例は、細胞質および核に明らかな染色を認める浸潤性腫瘍を示す。腫瘍の大部分に明らかな細胞質や核に染色を認める場合、その症例をスコアリングしてはならない。

トラブルシューティング

詳細は、HER2検査ガイド（p12）をご参照の上、トラブルシュートを行ってください。

使用目的

■製品の使用目的

ベンタナ DISH HER2キットは、Silver *in situ* Hybridization法（SISH法）をベースとしたDual Color *in situ* Hybridization法（DISH法）により、ベンタナ ベンチマークシリーズ*（ロシュ社製 自動染色装置）を用いて、組織または細胞中のHER2遺伝子およびHER2遺伝子が局在する17番染色体のセントロメア（Chr17）を、それぞれ黒色と赤色のシグナルとして検出します。検出されたシグナルは光学顕微鏡下で、腫瘍組織の形態学的特徴との同時観察が可能です。

本製品は、がん組織又は細胞中のHER2 遺伝子増幅度の測定（トラスツズマブ（遺伝子組換え）の唾液腺癌患者への適応を判定するための補助）に用いられます。

■判定ガイドの目的

本ガイドは以下を目的としています:

- ベンタナ DISH HER2 キットで染色されたFFPE 悪性SGTs切片におけるシグナルの計測方法とスコアリングの判定基準
- HER2およびChr17の単一シグナル、複数シグナル、HER2シグナルのクラスターなど、ベンタナ DISH HER2キットで染色された SGT組織における様々な染色例を提示（観察される可能性があるアーチファクトの例を含）

注:検体作製や精度管理、染色手順等の詳細はあわせてHER2検査ガイドを参照ください。

注:組織が入手困難なため、SGTs以外の症例を用いて特定の要点を説明する場合もあります。

*適応機種は、
ベンタナ ベンチマークGX（医療機器:13B1X002010000531）
ベンタナXTシステム ベンチマークXT（医療機器:13B1X00201000043）
ベンタナ ベンチマークULTRA（医療機器:13B1X00201000050）です。

製品概要、試薬の準備、導入時の機器整備、機器の定期メンテナンス

ベンタナ DISH HER2キット（体外診断用医薬品製造販売承認番号：30300EZX00043000）は、カクテルプローブと2種類の検出キット（別売り）との組み合わせにより体外診断用医薬品として承認されています。詳細は、HER2検査ガイド（p13-16）をご参照ください。

HER2遺伝子の増幅:SGTの典型的な症例

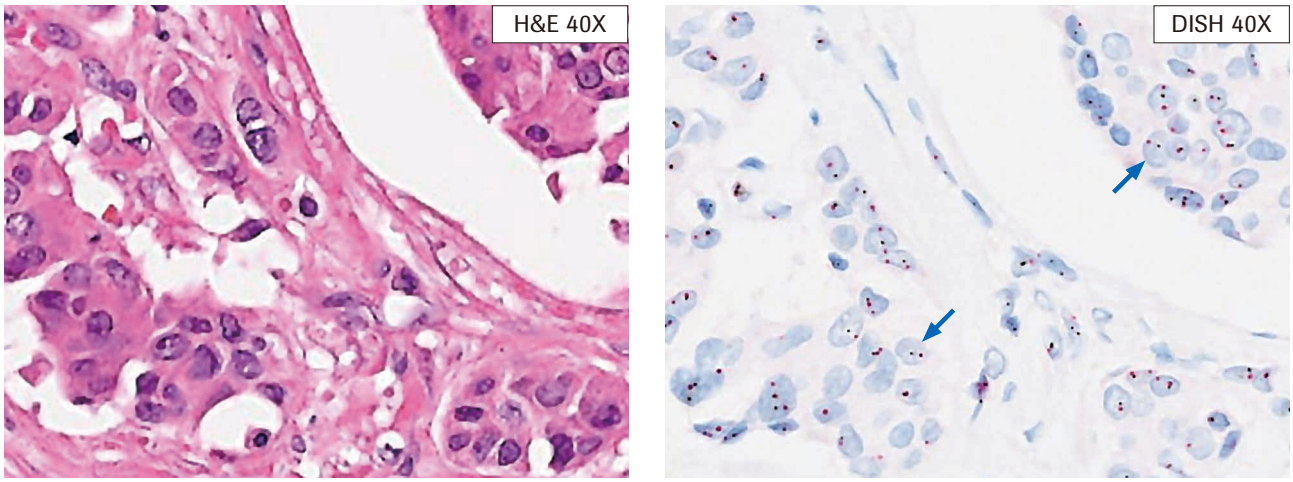


図1　唾液腺導管癌。増幅なし。
明瞭な黒いシグナルと赤いシグナルが腫瘍細胞1個当たり1～2コピー認める。

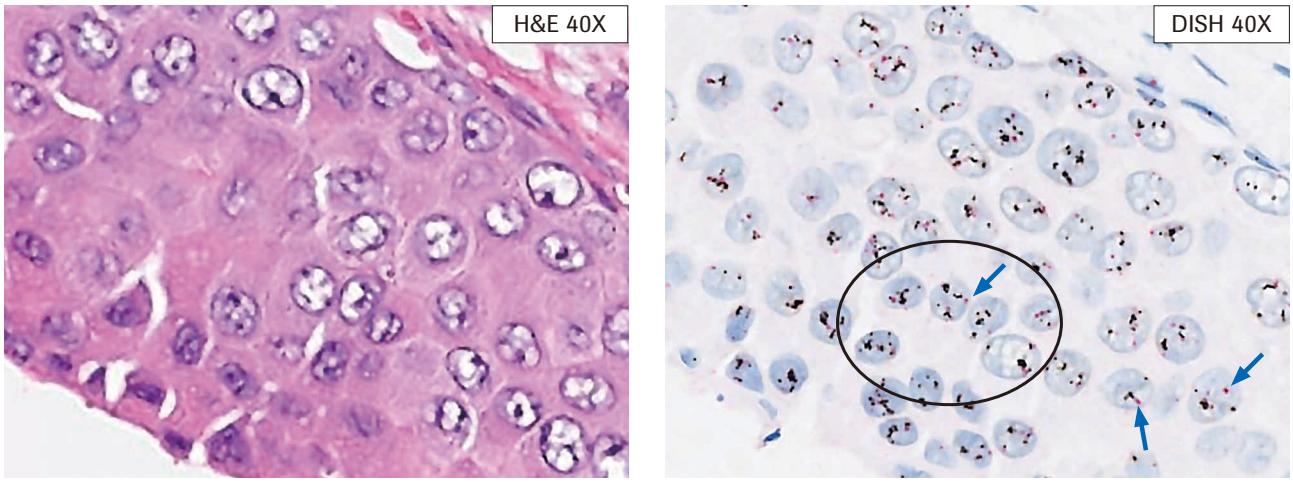


図2　唾液腺導管癌。増幅あり。
複数の腫瘍細胞の核にHER2の黒い小～中サイズのクラスターおよび、単一シグナルの増加を認める（楕円で囲んだ部分）。腫瘍細胞1個当たり1～2コピーのChr17赤シグナル（矢印）が確認される。

検体処理（検体採取～包埋）、検体スライドの作成（薄切～染色前処理）

詳細は、HER2検査ガイド（p16-17）をご参照ください。

測定方法

詳細は、HER2検査ガイド（p18-19）を参照してください。

染色プロトコールの設定

Procedure: U VENTANA HER2 DISH DNA PRB CKT（ULTRA）
: XT VENTANA HER2 DISH DNA PRB CKT（XT）
: GX VENTANA HER2 DISH DNA PRB CKT（GX）

ベンチマーク各機種および材料における推奨プロトコール

染色工程	ベンチマークULTRA	ベンチマークXT/GX
Baking	Not selected	Not selected
Cell Conditioning 1 (CC1)	16 min	16 min
Cell Conditioning 2 (CC2)	24 min	24 min
ISH-Protease 3	20 min	20 min
Stringency Wash Temp	74℃	76℃

詳細は、HER2検査ガイド（p20-21）を参照してください。

精度管理

詳細は、HER2検査ガイド（p22）をご参照ください。結果が既知の検体であれば乳癌も自家製精度管理用コントロールスライドとしてご使用可能です。

染色結果の判定

■標本の適・不適

HER2シグナルとChr17シグナルを計測して判定する前に、標的領域（病変組織）が適切に染色され、以下に示す基準を満たしているかどうか確認することが極めて重要です。計測には不適切である場合はトラブルシューティング（p27-28）を参照し、再染色を実施してください。

基準1. インターナルコントロールが確認されること

非腫瘍細胞のHER2シグナルとChr17シグナルは同一スライド上のインターナルコントロールとなります。20倍や40倍、60倍の対物レンズで観察し、100倍の対物レンズの使用は推奨されない。シグナルは、標的領域の中や周囲の正常細胞、たとえば、間質線維芽細胞や血管内皮細胞、リンパ球、良性上皮細胞に細胞1個当たり1～2コピー認められる（図3～5）。薄切の影響のため、スライド上の全細胞や全領域において単離したHER2シグナルやChr17シグナルを観察することは通常、不可能である。しかし、正確な計測には、標的領域の内側にある正常細胞や、標的領域に隣接する正常細胞に単離したシグナルが見えることが必要である。標的領域が適切であると判断されるには、正常細胞の核に少なくとも1個の黒シグナルと少なくとも1個の赤シグナルが含まれている必要がある（同じ細胞に黒シグナルと赤シグナルが存在していなくてもよい）。特定の標的領域が弱すぎて計測できない場合は、同じスライド上で異なる標的領域を計測できることが多い。比較的広い領域がいずれも不適切な染色の場合、計測することはできない。

基準2. 標的領域の腫瘍細胞内の計測が可能であること

20倍や40倍、60倍の対物レンズを使用し、腫瘍細胞の核にHER2（黒）シグナルとChr17（赤）シグナルが含まれる浸潤部の標的領域をふたつ以上特定する。腫瘍内の不均一性や組織薄切の影響があるため、すべての腫瘍細胞の核にシグナルが含まれていることはない。しかし、計測可能な領域が標的領域に含まれていることが重要である。特定の標的領域の染色が弱すぎて計数できない場合は、同じスライド上で異なる標的領域を計測できることが多い。比較的広い領域がいずれも不適切な染色の場合、計測することはできない。
図3～5は、適切に染色されている十分なインターナルコントロール細胞を認め計測が可能な症例。

図6は、インターナルコントロールの細胞の核に染色がみられないため、不適切な症例。この症例は計測できないため、再染色が必要。

図7と図8は、インターナルコントロールの細胞の核および腫瘍細胞の核に黒か赤シグナルが認められないため、不適切な症例。このような症例は再染色が必要。

基準3. バックグラウンド染色によって計測が妨げられないこと

黒あるいは赤いバックグラウンド染色が認められた場合は、特異的な黒シグナルや赤シグナルの計測が妨げられるかどうか確認する必要がある。黒いバックグラウンドは一般的には、特異的なシグナルとは識別が可能であり黒いダストのように見える（図16）。

赤いバックグラウンド染色は赤色のかすみ状（ヘイズ）や、稀に特異的なシグナルと比較して弱い非特異的なシグナル様に認められることがある（図17）。

計測には不適切な標本の再染色についてはトラブルシューティング（p27-28）を参照。

インターナルコントロールとなる細胞の核への適切な染色

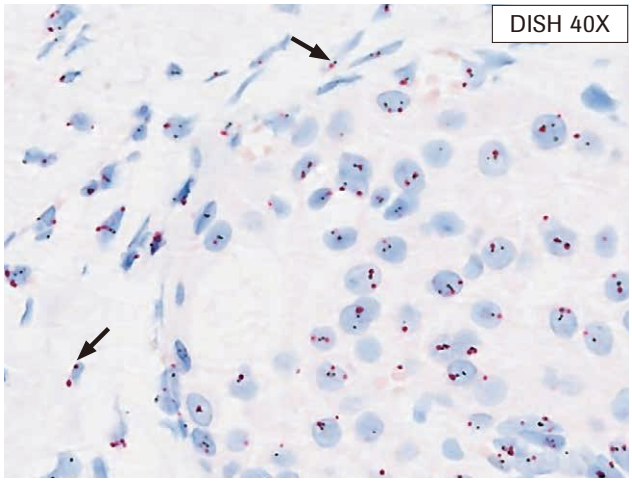


図3　粘表皮癌。増幅なし。矢印は線維芽細胞（インターナルコントロール）核内のシグナルを示す。

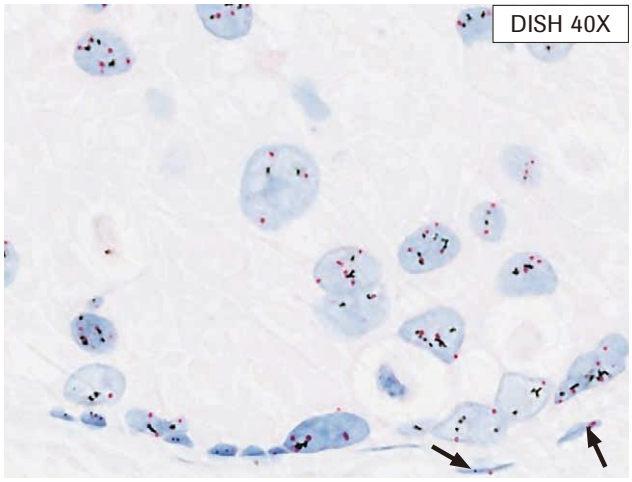


図4　唾液腺導管癌。HER2の複数シグナル。矢印はインターナルコントロール細胞核内のシグナルを示す。

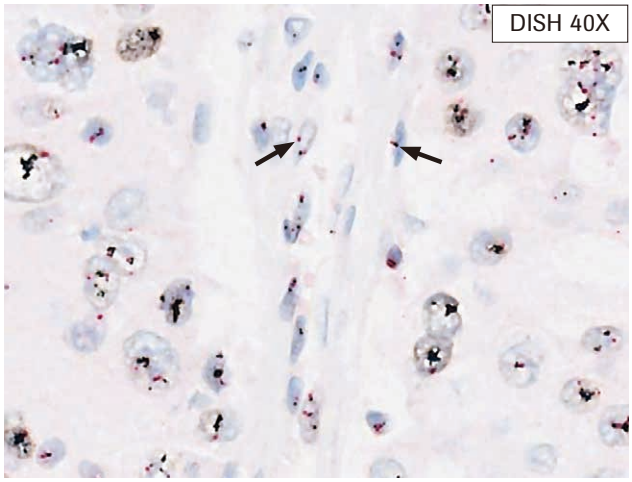


図5　唾液腺導管癌。増幅あり。矢印はインターナルコントロール細胞核内のシグナルを示す。

黒あるいは赤シグナルがみられないため不適切

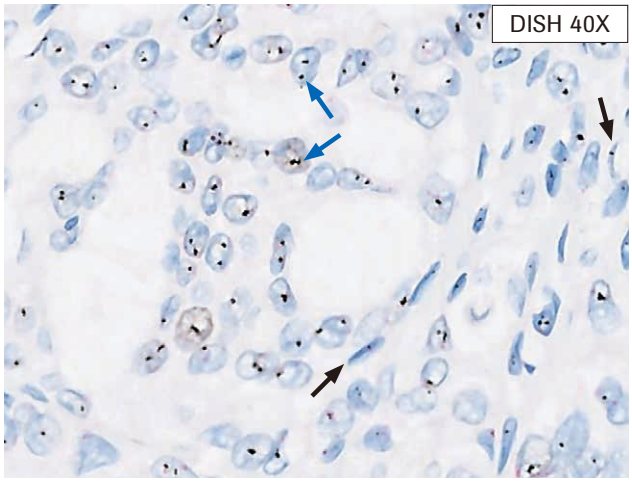


図6　唾液腺導管癌。インターナルコントロールの細胞の核と腫瘍細胞の核の赤シグナルが弱い／ないため、判定不能な症例。黒色矢印はインターナルコントロールの細胞の核を、青色矢印は腫瘍細胞の核を示す。

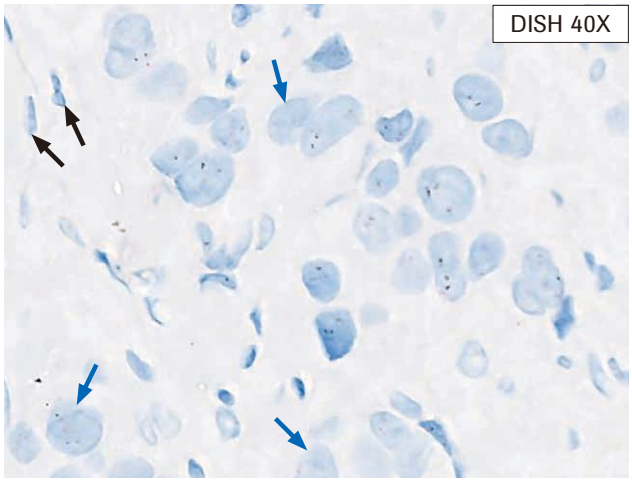


図7　唾液腺導管癌。インターナルコントロールの細胞の核と腫瘍細胞の核に黒と赤シグナルが認められないため、判定不能な症例。黒色の矢印はインターナルコントロールの細胞の核を、青色の矢印は腫瘍細胞の核を示す。

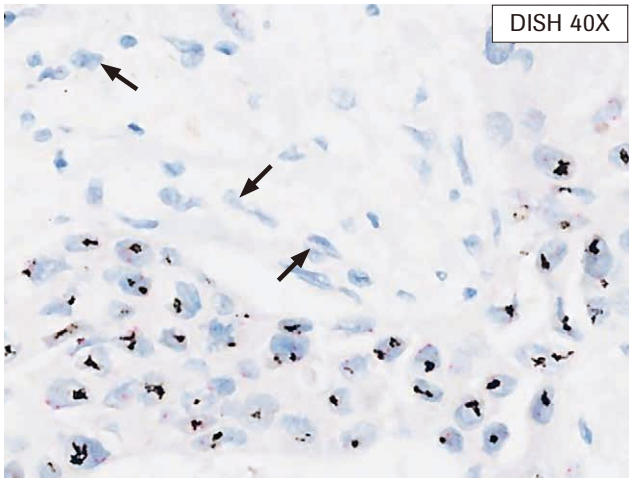


図8　唾液腺導管癌。インターナルコントロールの細胞の核（矢印）に黒、赤シグナルともに認められないため、判定不能な症例。腫瘍細胞にはクラスターで強い黒シグナルが認められるものの、赤シグナルは弱いか、まったくみられない。そのため判定不能。

■スコアリングの概要

検体スライドのインターナルコントロールが適切に染色されていること、精度管理用コントロールスライドの染色性が適切であることが確認された後、黒（HER2）と赤（Chr17）の両シグナルを含む代表的な腫瘍細胞のみを計測します。次の1）～4）に該当する領域ではシグナル計数を実施してはなりません。

1）黒シグナルや赤シグナルが弱いか、まったくない。

2）インターナルコントロール細胞への染色がない。

3）圧縮されたり、重なり合ったりした核を含んでいる。

4）赤や黒の著しいバックグラウンド染色や壊死のある核を含んでいる。また、標的領域の腫瘍細胞の核の一般集団を代表していない核ではシグナル計測を実施してはならない。たとえば、極端に大きい核（サイズが視野内の他の癌細胞の核の2倍以上）や、小さい核（サイズが他の癌細胞の核の約1/2）は計数してはならない。最後に、浸潤部における黒と赤のシグナル数が多い腫瘍細胞の核を計測します。不均一なHER2増幅が認められる標本については判定上の注意（p45）で詳しく取り上げる。

ベンタナ DISH HER2 キットで染色したスライドにスコアを付けるには、以下の手順で実施します:

1. H&E染色スライドにて、浸潤性唾液腺癌が含まれる領域を特定する。

2. H&Eに対応するDISH染色スライドを観察し、以下の条件に該当するSGT標的領域を特定する。

   - 選択した領域における大部分の細胞が、黒と赤のシグナルの非特異的なバックグラウンド染色によって見えにくくなっていない。
   - 計測しようとする腫瘍領域に隣接する領域にインターナルコントロール細胞がある。
   - 間質線維芽細胞、血管内皮細胞、リンパ球、その他の非腫瘍性細胞など、様々な正常細胞に1～2コピーのHER2シグナルとChr17シグナルが認められる。

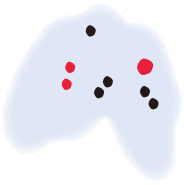
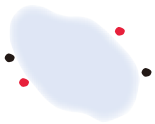
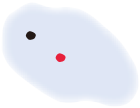
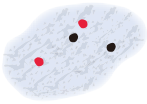
3. 浸潤領域内の、以下の要件を満たす20個の核をカウントし、HER2シグナル総数及びChr17シグナル総数からHER2/Chr17比を算出する。

   - 核の大きさが、極端に大きいまたは小さくない。
   - 他の細胞との重なりがごくわずかであるか、まったくない腫瘍細胞の核。
   - 著しい過固定や、核内に空胞を認めない腫瘍細胞の核、または、スライド上の非特異的な染色が計数に影響を与えないを腫瘍細胞の核。
   - 浸潤部における黒と赤のシグナル数が多い腫瘍細胞の核。

■シグナルの計測方法

光学顕微鏡の20～60倍の対物レンズを使用して、個々の腫瘍細胞の核のHER2シグナル数とChr17シグナル数を数えます。複数のシグナルがクラスターを形成している場合、小さいクラスターはシグナル6個、大きいクラスターはシグナル12個と数えます。シグナルの出現パターンとその計測方法については下記の表を参照してください。

表1　シグナルの出現パターン別計測方法

	核が重なっている細胞は 計測対象から外す。		複数のシグナルのクラスターは正常細胞のシグナル1個の大きさを基準にシグナル数を決定する。この細胞については、黒色（HER2）のシグナルは小さいクラスター1個でシグナル6個、単独のシグナルが2個、あわせて8個に、赤色（Chr17）のシグナルを2個に数える。 **計測結果にクラスターを認めたことを記録する。**
	シグナルの認められない細胞は 計測対象から外す。		この細胞については、黒色（HER2）のシグナルは大きいクラスターが1個でシグナル12個、単独のシグナルを4個、あわせて16個、赤色（Chr17）のシグナルを2個に数える。 **計測結果にクラスターを認めたことを記録する。**
	二色のシグナルが認められない細胞は 計測対象から外す。		二色のシグナルが接近して認められる場合には、対物60Xのレンズで確認して、黒色（HER2）のシグナルを1個に赤色（Chr17）のシグナルを1個に数える。 この細胞については、黒色（HER2）のシグナルを4個に赤色（Chr17）のシグナルを2個に数える。
	シグナルが核の外に認められる細胞は 計測対象から外す。		黒色（HER2）のシグナルのクラスターに重なって、不鮮明な赤色（Chr17）のシグナルを認める場合、対物60Xのレンズで赤色（Chr17）のシグナルを確認する。
	黒色（HER2）のシグナルを1個に 赤色（Chr17）のシグナルを1個に数える。		核内に黒色のダスト状のバックグランドを認めた場合、明らかにシグナルと確認できるもののみを数える。
	黒色（HER2）のシグナルを2個に 赤色（Chr17）のシグナルを2個に数える。		シグナル様の不鮮明な赤色のドットを認めた場合、シグナルとの鑑別に注意が必要であり、染色強度の違いで鑑別する。 この細胞については、黒色（HER2）のシグナルを2個と赤色（Chr17）のシグナルを2個とする。
	黒色（HER2）のシグナルを1個に 赤色（Chr17）のシグナルを2個に数える。 同色の2個のシグナルが、シグナルの直径と同じ距離、または直径よりも短い距離に位置する場合は、1個のシグナルとして数える。		

■スコアリングの判定基準

20個の腫瘍細胞について各々の核におけるHER2シグナルとChr17シグナルの数を計測します。計測したHER2シグナル総数及びChr17シグナル総数からHER2/Chr17比を算出し、以下のとおり判定します。

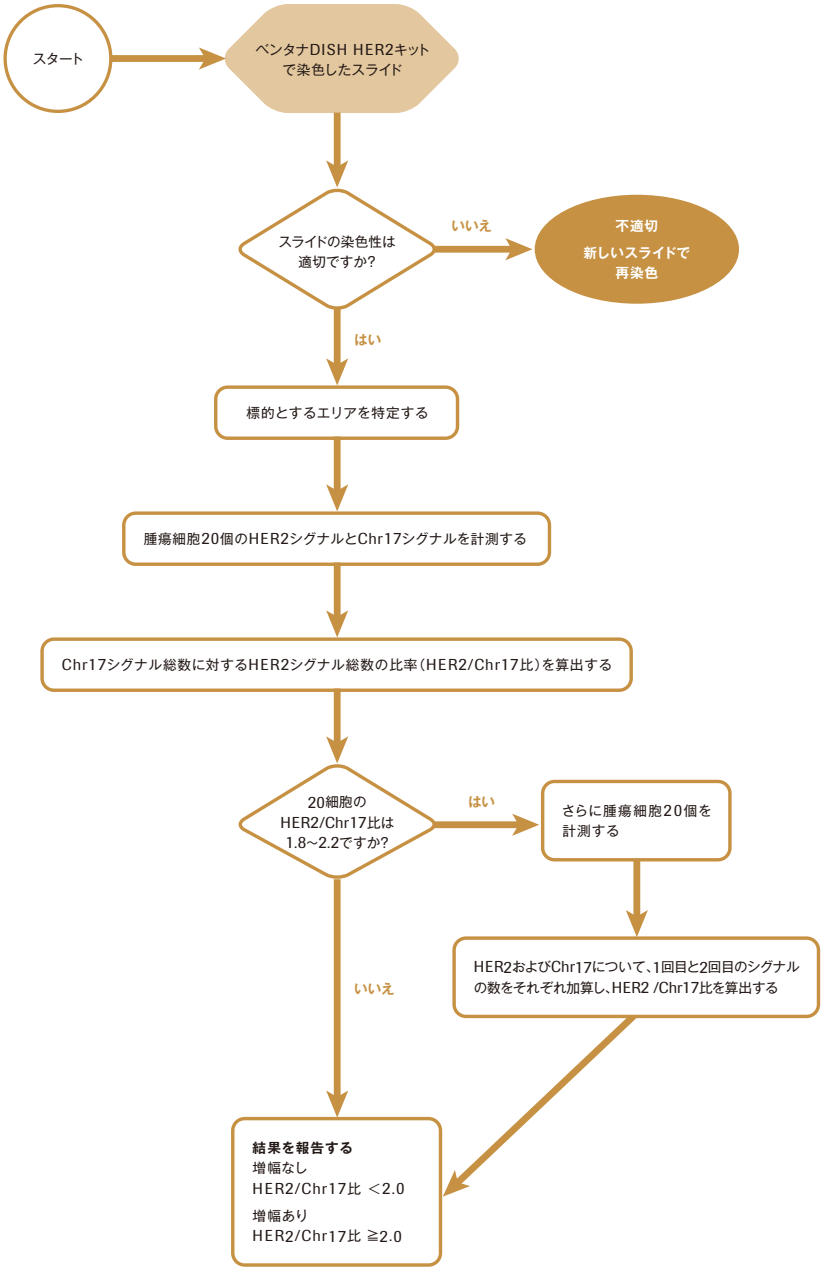
・HER2/Chr17比≧2.0:増幅あり

・HER2/Chr17比<2.0:増幅なし

20個の腫瘍細胞で計測したHER2/Chr17比が1.8-2.2になった場合には、さらに別の20細胞で各シグナルを計測し、40細胞でのHER2/Chr17比を算出し、判定に用いることが望ましいです。

以下にスコアリングアルゴリズムのフローチャートを示します。

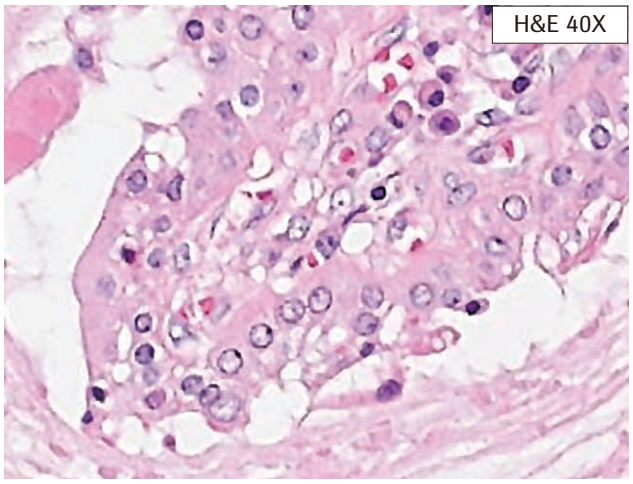
スコアリングアルゴリズムのフローチャート



■臨床症例でみる実際の染色例

以下の画像（図9～11）は、ベンタナ DISH HER2 キットで染色したSGT症例で観察される様々な染色パターンをお示しします。染色を行う場合には、精度管理用コントロールスライドの染色を行い、インターナルコントロールとなる細胞の核の染色性を確認の上、判定してください（精度管理p37を参照）。

唾液腺癌における代表的な染色例



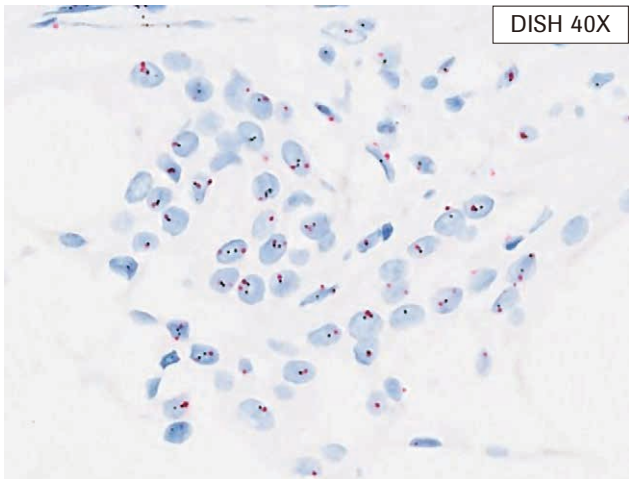
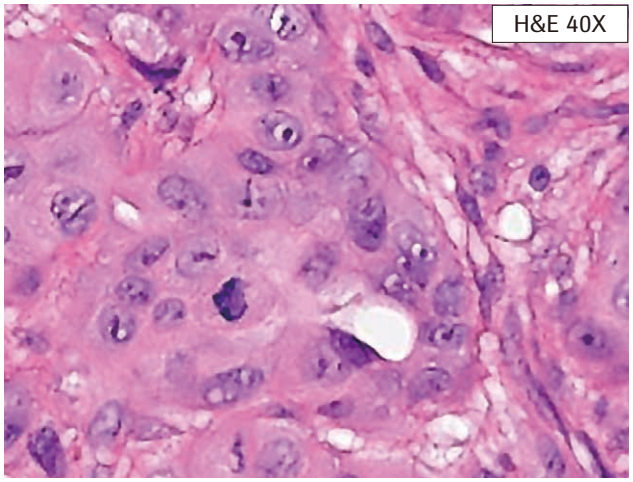


図9　粘表皮癌。単一のHER2シグナルを認める、増幅なし。



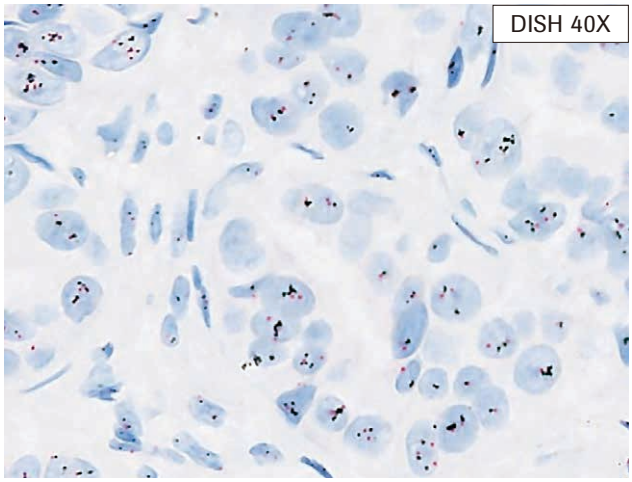


図10　唾液腺導管癌。複数のHER2シグナルと小クラスターを認める、増幅あり。

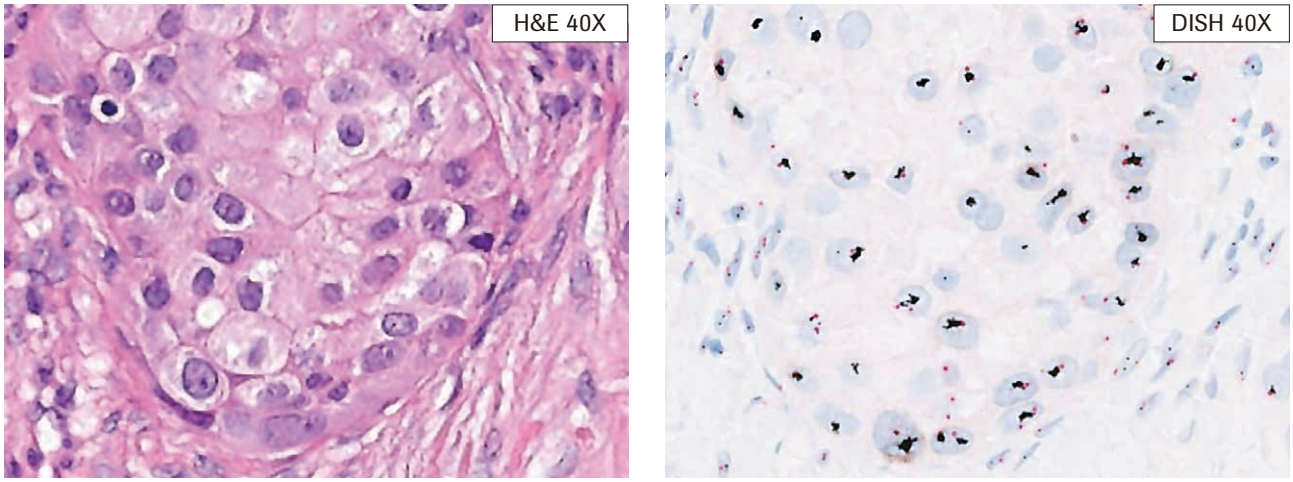


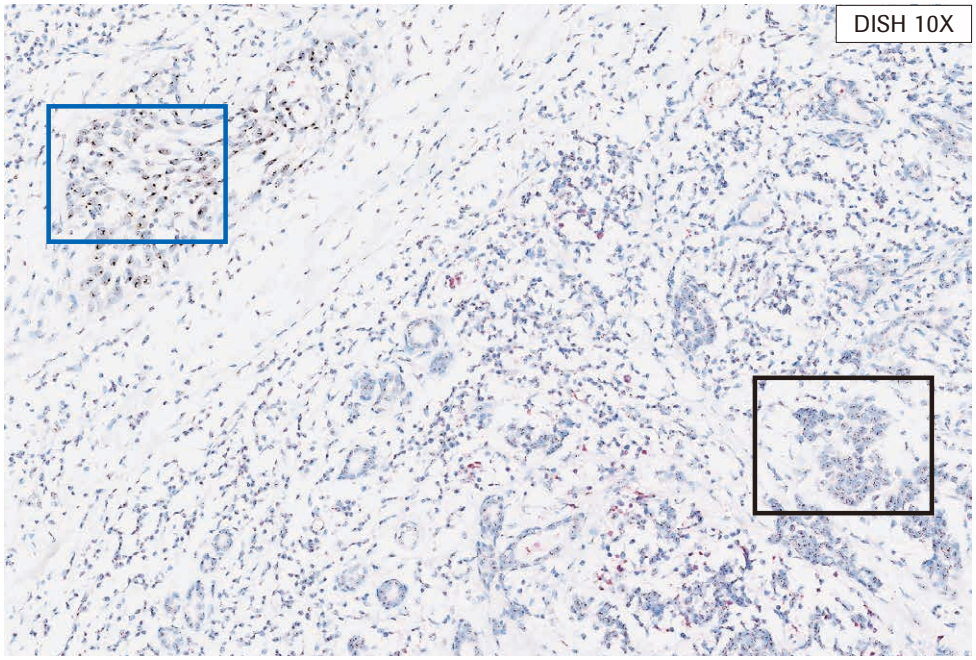
図11　唾液腺導管癌。複数のHER2シグナルと大クラスターを認める、増幅あり。

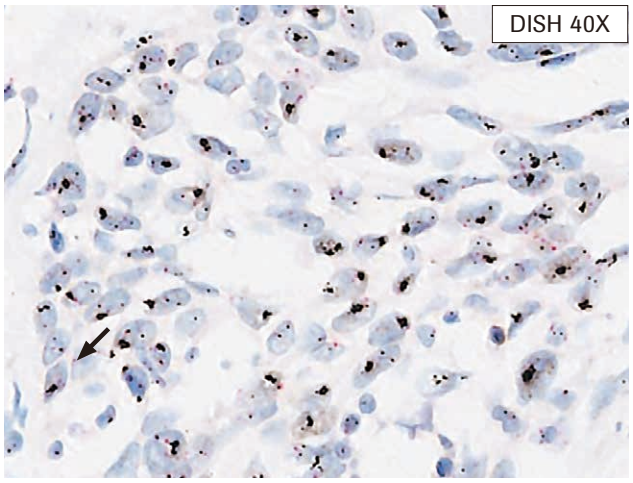
■判定上の注意

ヘテロジェナイティ

組織標本には、HER2シグナルが遺伝的に不均一な癌細胞の核が含まれていることもあります。そのような症例では、HER2の増幅がある核とHER2の増幅がない核が混合している可能性があります（図12）。これは同じ病変内にある癌細胞間や、異なる2つのエリアの病変間で観察されることがあります。この場合、HER2シグナルの数が多い核を選択して計測します。その際、Chr17シグナルが確認できる細胞を選択することも大切です。また、不均一性（ヘテロジェナイティ）が認められたことを報告することが推奨されます。

ヘテロジェナイティ





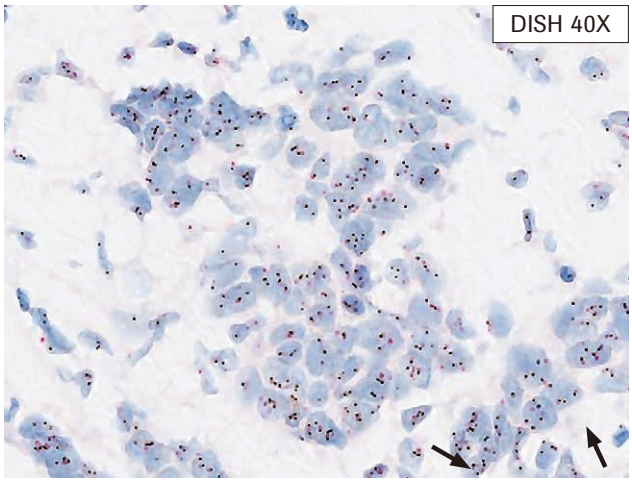


図12　唾液腺導管癌。画像は同じ腫瘍内の不均一なHER2増幅を示します。上段10倍画像左上（青色の線で囲んだ部分）のほか、左下の40倍画像には中～大サイズのクラスター状の複数のHER2シグナルが確認され、「増幅あり」に該当します。一方、上段10倍画像の右下（黒色の線で囲んだ部分）のほか、右下の40倍画像にはHER2シグナルは1～2コピーしか認められず、「増幅なし」に該当します。この標本では「増幅なし」のエリアではなく、「増幅あり」のエリアを選択し、シグナル計測を実施する必要があります。

トラブルシューティング

詳細は、HER2検査ガイド（p27-30）をご参照の上、トラブルシュートを行ってください。

非特異的染色とバックグラウンド染色

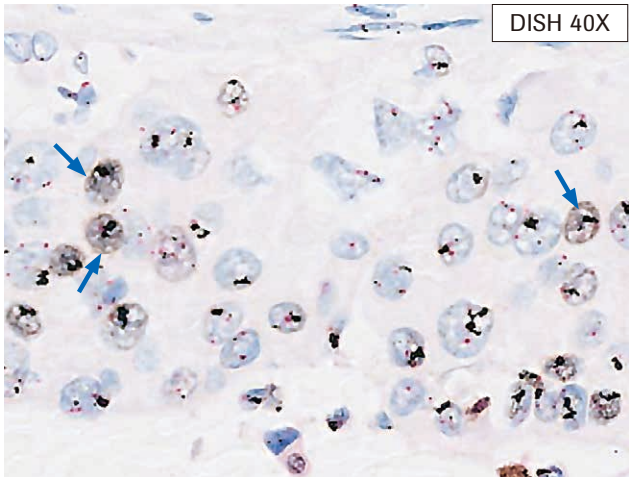


図13　核にSISHの「ダスト」が認められる例。 散在した腫瘍細胞の核（青の矢印）に暗い灰色～黒色の「曇り」が認められ、赤色シグナルが部分的に見えにくくなっていると考えられます。この視野内の他の腫瘍細胞の核には、SISH「ダスト」がなく、容易に計数できるシグナルが認められる。

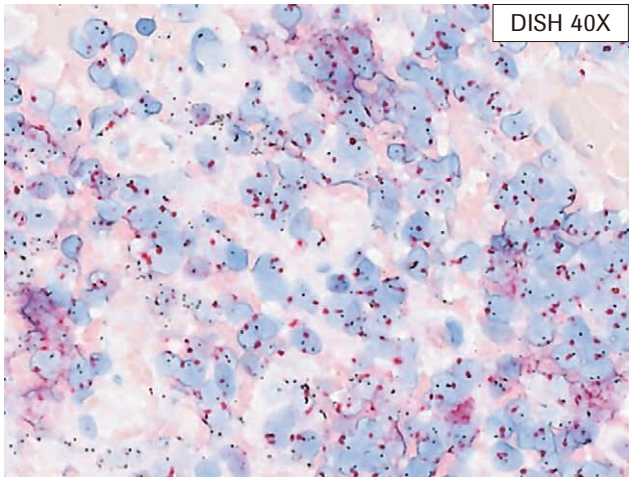


図14　非特異的な赤色の曇り／バックグラウンド。視野全体にみられる淡いピンクの色調が特徴です。重要なのは、それでも赤色と黒色のシグナルが容易に観察され、計測できることである。

沈着物（Precipitation）がある

核の上や周囲に著しい褐色または黒色の沈降の領域が観察される場合、同じスライド上に、計測が可能な標的領域となる領域がほかにある可能性もある。そのようなエリアがなければ、2枚目のスライド（用意できる場合）による再染色を推奨します（図15～17）。沈着物はスライドラベルの貼り方が悪いことが原因となっていることもあります。スライドのバーコードラベルはスライドガラスの縁にかからないようにして貼付する必要があります。スライドラベルの重ね貼りや貼り直しは避けてください。装置とディスペンサーを正しくセットしており、バルク試薬が十分に充填されているかどうか点検してください。また、酢酸銀は経時的に酸化することがわかっているため、ディスペンサーのキャップを閉めた状態で保存されていたかどうか確認してください。

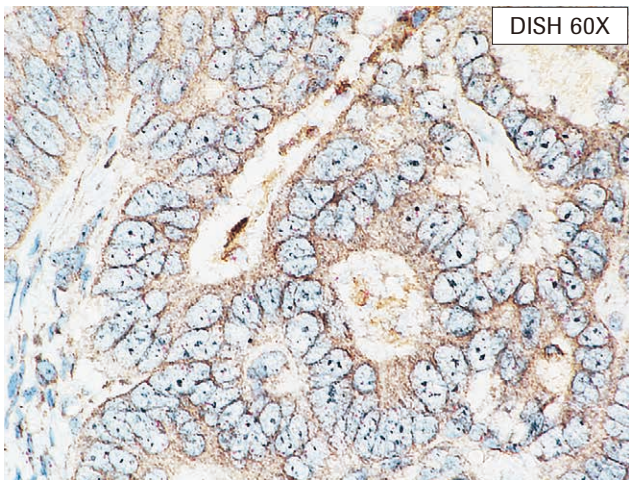


図15　核の周囲に中等度の沈着物が認められる。ここではシグナルが計数不能である。

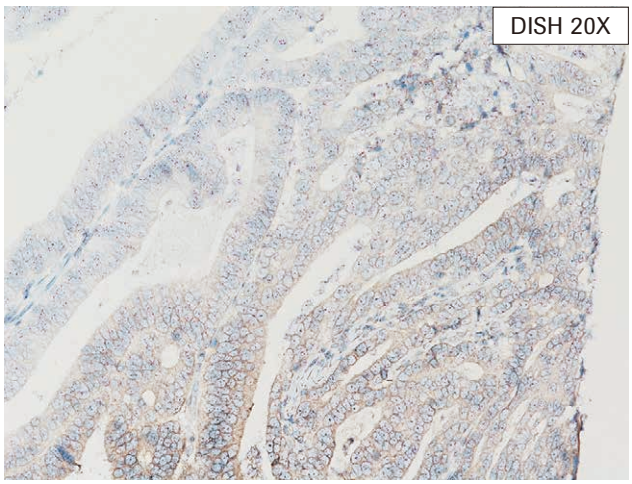


図16　沈着物が認められる領域と、隣接する領域

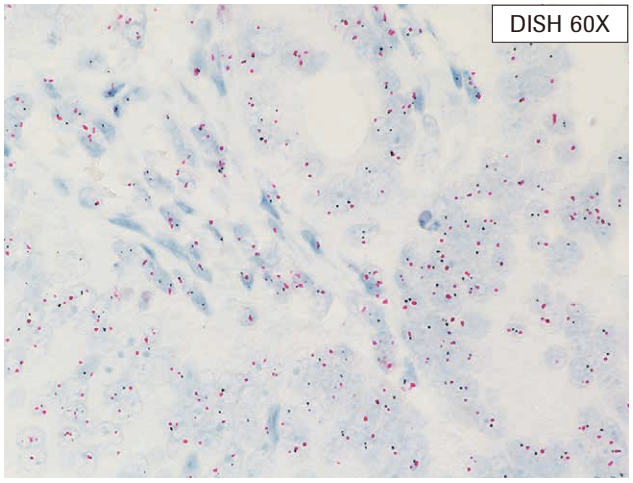


図17　沈着物が認められる領域に隣接している領域（図16左上部分）ここには計数可能なシグナルが存在する。

核のバブリング

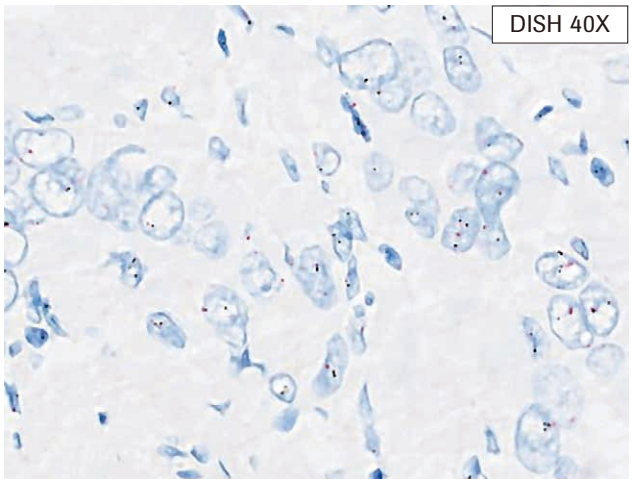
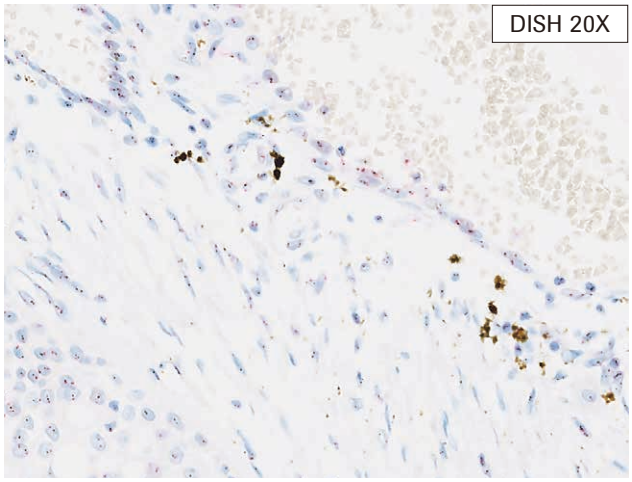


図18　唾液腺導管癌における「核バブリング」。固定不十分（たとえば、ホルマリンで 1～3時間）が原因で核のバブリングが発生することもある。これは、それほどはっきり分離していない「ファジー」な核バブルである。厚い組織切片ほど高頻度に核バブリングがみられる。画像では、HER2とChr17のシグナルを観察するには影響のない程度に核の中央に透明化と空胞形成が認められる。

細胞内色素沈着



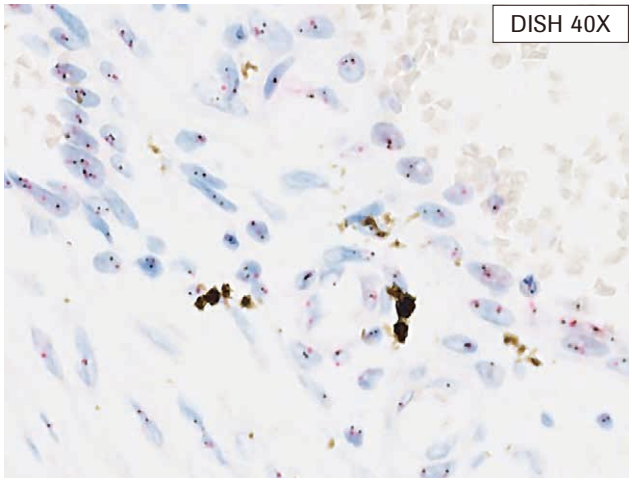


図19　唾液腺導管癌。画像では間質内に非特異的な暗黄色～金褐色の粗い粒状の沈着物が認められる。これらを真のSISHシグナルと混同してはならない。このようなエリアでの計測は避け、核が見えにくくなっていない細胞を選択すること。

1. Slamon DJ, Godolphin W, Jones LA, et al. Studies of the HER- 2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer. Science. 1989; 244:707-712.
2. Slamon DJ, Clark GM, Wong SG, Levin WJ, Ullrich A, McGuire WL. Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. Science. 1987; 235:177-182.
3. Ross JS, Fletcher JA. The HER-2/neu oncogene in breast cancer: prognostic factor, predictive factor, and target for therapy. Oncologist. 1998; 3:237-252.
4. Ross JS, Fletcher JA, Linette GP, et al. The HER-2/neu gene and protein in breast cancer 2003: biomarker and target of therapy. Oncologist. 2003;8:307-325.
5. Gabos Z, Sinha R, Hanson J, et al. Prognostic significance of human epidermal growth factor receptor positivity for the development of brain metastasis after newly diagnosed breast cancer. J Clin Oncol. 2006; 24:5658-5663.
6. Ross JS. Fluorescence in situ hybridization is the preferred approach over immunohistochemistry for determining HER2 status. Clin Chem. 2011; 57:980-982.
7. DePotter CR, Van Daele S, Van de Vijver MJ, et al. The expression of the neu oncogene product in breast lesions and in normal fetal and adult human tissues. Histopathology. 1989; 15(4):351-362.
8. Press MF, Cordon-Cardo C, Slamon DJ. Expression of the HER2/neu proto-oncogene in normal human adult and fetal tissues. Oncogene. 1990; 5:953-962.
9. Taylor SL, Platt-Higgins A, Rudland PS, Winstanley JH, Barraclough R. Cytoplasmic staining of c-erbB-2 is not associated with the presence of detectable c-erbB-2 mRNA in breast cancer specimens. Int J Cancer. 1998; 76:459-463.
10. Yan M, Parker BA, Schwab R, Kurzrock R. HER2 aberrations in cancer: implications for therapy. Cancer Treat Rev. 2014; 40:770-780.
11. Yan M, Schwaederle M, Arguello D, Millis SZ, Gatalica Z, Kurzrock R. HER2 expression status in diverse cancers: review of results from 37,992 patients. Cancer Metastasis Rev. 2015; 34:157-164.
12. El-Naggar AK, Chan JKC, Grandis JR, Takata T, Slootweg PJ (eds). WHO Classification of Head and Neck Tumours. 4th Edition, Volume 9. 2017; IARC Pubs, WHO Press.
13. Can NT, Lingen MW, Mashek H, et al. Expression of hormone receptors and Her-2 in benign and malignant salivary gland tumors. Head Neck Pathol. 2018; 12: 95-104.
14. Egebjerg K, Harwood CD, Woller NC, Kristensen CA, Mau- Sorensen M. HER2 positivity in histological subtypes of salivary gland carcinoma: a systematic review and meta- analysis. Front Oncol. 2021; 11:1-12.
15. Kurzrock R, Bowles DW, Kang H, et al. Targeted therapy for advanced salivary gland carcinoma based on molecular profiling: results from MyPathway, a Phase IIa multiple basket study. Ann Oncol. 2020; 31: 412-421.
16. Uijen MJM, Lassche G, van Engen-van Grunsven ACH, et al. Systemic therapy in the management of recurrent or metastatic salivary duct carcinoma: a systematic review. Cancer Treat Rev. 2020; 89:1-10.
17. Nakaguro M, Tada Y, Faquin WC, Sadaw PM, Wirth LJ, Nagao T. Salivary duct carcinoma: updates in histology, Cytology, Molecular Biology, and Treatment. Cancer Cytopathol. 2020; 128(10):693-703.

ロシュ・ダイアグノスティックス株式会社
〒108-0075 東京都港区港南1-2-70
http://www.roche-diagnostics.jp
カスタマーソリューションセンター **0120-600-152**

「VENTANA」は、ロシュ社の登録商標です。

321120301B