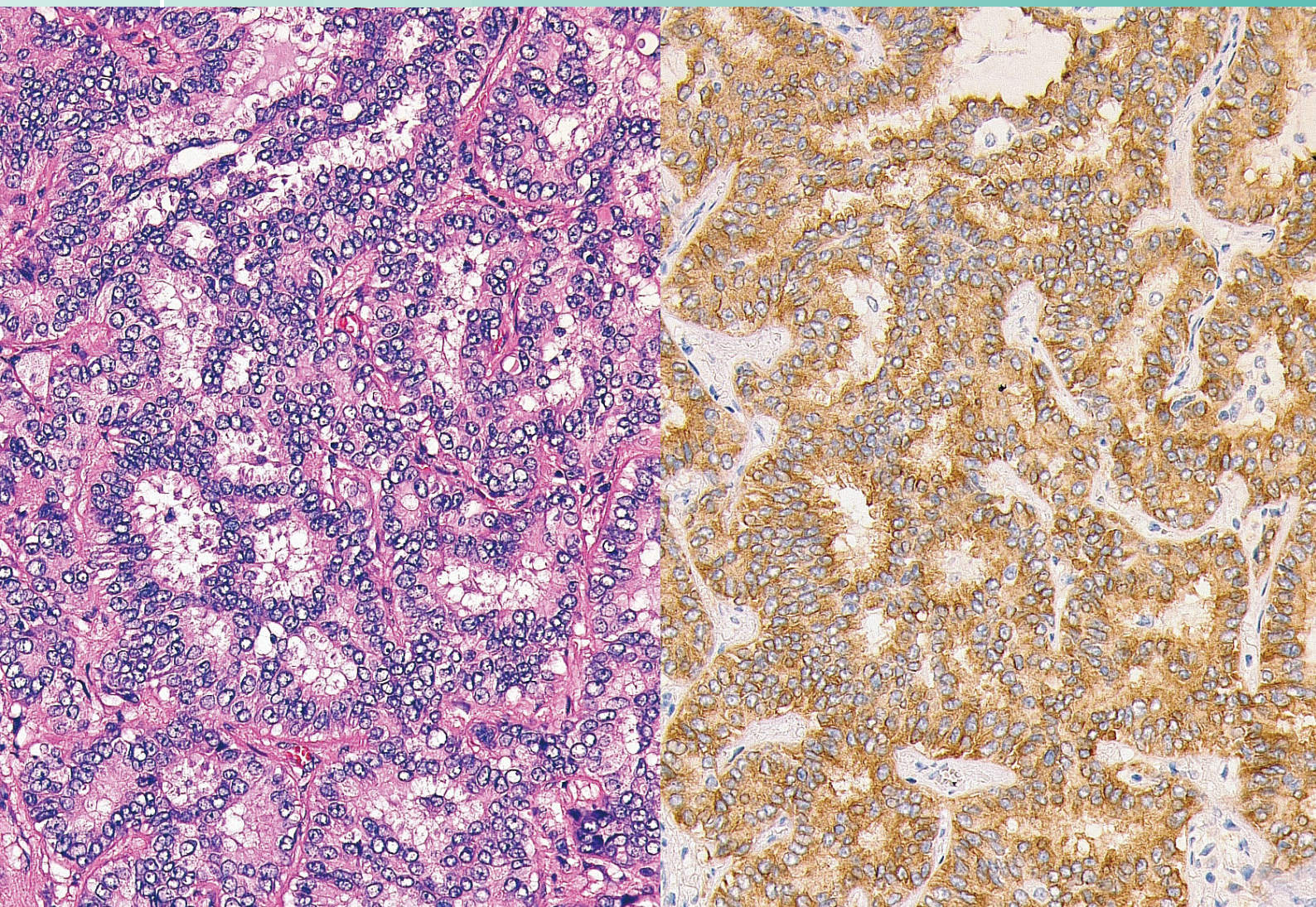


ALK

ALK **iAEP®** Kit

ATLAS



Contents

■ ヒストファイン ALK iAEP® キット	3
— 株式会社ニチレイバイオサイエンス —	
開発経緯	3
ヒストファイン ALK iAEP® キットの利用価値	3
使用目的と臨床的有用性	3
自動染色装置	3
判定基準	4
臨床性能試験	4
臨床的意義	5
染色に適した検体	6
■ i Score について	7
— 竹内 賢吾 —	
i Score による診断	7
i Score 判定例	8
■ セルブロック標本 染色例	26
— 城光寺 龍・辻本 正彦 —	

はじめに

1981年にがんによる死亡数が脳血管疾患や心疾患による死亡者数を抜いて国内第1位になって以降、がんによる死亡数は増加の一途をたどっています。国立がん研究センターの2017年がん罹患数予測によると、がん全体で約101.4万人、そのうち肺がんは、1位である大腸がん(約15.0万人)、第2位の胃がん(約13.3万人)に次ぎ約12.9万人と発表されています。肺がんは先進国で最も死亡者数の多いがんで、我が国においても顕著に増加しております。1998年以降、肺がんによる死亡者数は第1位が続いており、2017年の肺がん死亡数は約7.8万人と予測されています。

これまで、抗癌剤としては細胞毒性を示す化学療法剤が多く使用されてきましたが、近年、高い腫瘍選択性とこれに伴う低毒性プロファイルを有する分子標的治療薬が数多く開発され、実際にこれらのいくつかについては、臨床試験においてがん患者の生存期間を延長する有効性が確認されており、がん細胞に強く発現が亢進している分子やシグナル伝達系などを標的とした薬剤が開発されています。

様々ながん種の中でも、非小細胞肺癌に対する分子標的治療薬は、*EGFR*、*KRAS*、*c-MET*、*BRAF* など、遺伝子変異や遺伝子増幅による癌遺伝子の異常活性化を標的とした多くの薬剤が開発されている状況になっています。このような状況の下、非小細胞肺癌における分子標的治療薬の新たな標的として、*EML4-ALK* (echinoderm microtubule-associated protein-like 4 anaplastic lymphoma kinase) 融合遺伝子が、2007年に日本の研究グループにより同定されました⁽¹⁾。*Anaplastic lymphoma kinase* (以下、*ALK*) は、1994年、ヌクレオフォスミン(NPM: nucleophosmin) との融合分子として未分化大細胞型リンパ腫 [anaplastic large cell lymphoma (ALCL)] において同定された受容体型チロシンキナーゼです^{(2),(3)}。肺腺癌の細胞から同定された *EML4-ALK* 融合遺伝子によって作られる *EML4-ALK* 融合タンパクは二量体を形成し、そのチロシンキナーゼドメインは恒常的に活性化しており、癌化及びその後の癌細胞の増殖に関与していることが示唆されています。更に、非小細胞肺癌においては *EML4* のみならず、これまでに *KIF5B*、*KLC1*、*STRN* などの分子も *ALK* の融合パートナーとして同定され、それら遺伝子との融合遺伝子 (以下、*ALK* 融合遺伝子) の発現も報告されています⁽⁴⁾より。

ALK 融合遺伝子に起因する肺癌 (以下、*ALK* 陽性肺癌) は、*ALK* を阻害する低分子経口製剤が有効です。*ALK* のチロシンキナーゼ活性を阻害することにより、腫瘍細胞の成長と生存に必要と考えられる数々の細胞内シグナル伝達を遮断し、効果を示します⁽⁵⁾。

ALK 陽性肺癌の診断には、*ALK* 阻害剤である *XALKORI*® (一般名: クリゾチニブ) のコンパニオン診断薬として承認されたアボット ジャパン株式会社の蛍光 *in situ* Hybridization (FISH) 法を用いた診断キット「*Vysis ALK Break Apart FISH* プローブ キット」が使用されていますが、弊社では世界に先駆けて *ALK* 陽性肺癌の診断に用いていただける体外診断用医薬品承認を取得した免疫染色キットを発売致しました。

本アトラスは *ALK* 陽性肺癌を的確に診断していただけることを目的として作成致しました。ヒストファイン *ALK iAEP*® キットをご使用いただきまして、*ALK* 阻害剤による治療が対象になる患者さんと対象にならない患者さんをより早く、より確実に区別することができるようになり、医療現場における治療戦略の早期立案、治療開始時期の短縮に繋がり、患者さんの治療に貢献できましたら幸いです。

■ ヒストファイン ALK iAEP® キット

開発経緯

従来、リンパ腫などにおけるALK融合遺伝子陽性腫瘍の診断に際しては、免疫組織染色(IHC)法によるALK融合タンパクの検出は標準的な手法でありましたが、*EML4-ALK*融合遺伝子陽性肺癌においては、標準的なIHC法では検出感度が不十分であることが欧州の研究者らによって報告されました⁽⁶⁾。2009年、竹内らはiAEP®法(intercalated antibody-enhanced polymer)と名付けられた高感度IHC法を開発し、*EML4-ALK*融合遺伝子陽性肺癌におけるALK融合タンパクの検出を可能としました⁽⁷⁾。

弊社では2010年11月より、iAEP®法に基づいて開発された研究用試薬「ヒストファインALK検出キット」の販売を開始しました。その後、この研究用試薬をベースに体外診断用医薬品の承認申請に着手しました。

一方、中外製薬株式会社では、自社で開発していたALK阻害剤(有効成分名:アレクチニブ塩酸塩、治験成分記号CH5424802、以下、アレクチニブ塩酸塩)の国内第I/II相試験(以下、AF-001JP試験)において、本キットが被験者候補のALK融合遺伝子発現の有無の確認に用いられました。当該キットにより陽性(スコア3)と判定された患者さんにおいては、アレクチニブ塩酸塩による奏効率が92.3%と、極めて高い有効性が示されたことから、アレクチニブ塩酸塩のコンパニオン診断薬として、当該キットの臨床的有用性が確認されました⁽⁸⁾。

このことから、弊社はアレクチニブ塩酸塩のコンパニオン診断薬としてヒストファインALK iAEP®キットを承認申請し、2014年6月16日に体外診断用医薬品承認を取得致しました。

2022年3月現在、ヒストファインALK iAEP®キットは、アレクチニブ塩酸塩に加えて、クリゾチニブ、セリチニブ、ブリグチニブおよびロルラチニブのコンパニオン診断薬として承認されております。

ヒストファイン ALK iAEP® キットの利用価値

ALK阻害剤の効能・効果は「ALK融合遺伝子陽性の切除不能な進行・再発の非小細胞肺癌」であるため、ALK阻害剤の適応可否を診断する上でALK融合遺伝子の診断は必要不可欠です。

ヒストファインALK iAEP®キットは、IHC法を用いて、ALK融合タンパクの有無を検出し、FISH法と組み合わせることにより、ALK融合遺伝子陽性の非小細胞肺癌患者における薬剤(アレクチニブ塩酸塩、クリゾチニブ、セリチニブ、ブリグチニブ又はロルラチニブ)の適応判定を行うことができる体外診断用医薬品です。

使用目的と臨床的有用性

がん組織、細胞中に発現するALK融合タンパクの検出

(アレクチニブ塩酸塩、クリゾチニブ、セリチニブ、ブリグチニブ又はロルラチニブの非小細胞肺癌患者への適応を判定するための補助に用いる)

自動染色装置

自動染色装置を用いて染色を行う場合は下記の装置をご使用ください。

- ・ヒストステイナー 36A (届出番号 13B3X10013036000)
- ・ヒストステイナー 48A (届出番号 13B3X10013048000)
- ・ヒストステイナー AT (届出番号 13B3X10013036100)

他の自動染色装置によるヒストファインALK iAEP®キットの使用は検証されておりません。

判定基準

□ ヒストファイン ALK iAEP® キットによるALK融合タンパクのスコアリングおよび判定方法

スコア	適合条件	判定
3	陽性腫瘍細胞率>80%	陽性
2	80%≧陽性腫瘍細胞率>50%	境界域
1	50%≧陽性腫瘍細胞率>0%	境界域
0	陽性腫瘍細胞なし	陰性

判定上の注意 (9) より改変

- (1) 試薬対照スライドと比較して染色強度が強い細胞を陽性細胞としてください。
- (2) 印環細胞など高度に粘液を含有する細胞は染色されるべき細胞質の領域が少なく、ALK融合タンパク陽性であっても染色されにくいことがあります。陽性細胞が見られる検体で、高度粘液含有細胞が陰性である場合、それらは陽性腫瘍細胞率の算定には加えないでください。
- (3) 陽性腫瘍細胞率が80%を超えていても、checker board pattern (陰性～弱陽性細胞と陽性～強陽性細胞が頻繁に隣り合っている染色像。陰性細胞と陽性細胞が頻繁に隣り合っている染色像。) はスコア2としてください。

患者への適応判定上の留意事項

スコア3: 明らかな腺癌以外の組織型の場合※、既承認品のFISH法によるALK融合遺伝子の確認を行ってください。例えば、全長ALKタンパク発現等の可能性も考えられます。

※HE染色等により組織型の鑑別を行ってください。

スコア2: 既承認品のFISH法によるALK融合遺伝子の確認を行ってください。例えば、ALK融合遺伝子が陰性にもかかわらず一部もしくはすべての細胞が神経内分泌系への分化を呈している、又は、ALK融合遺伝子が陽性にもかかわらず扁平上皮への分化を呈する部などで限局性にALK融合蛋白量が低下している、などの可能性が考えられます。

スコア1: 既承認品のFISH法によるALK融合遺伝子の確認を行ってください。例えば、ALK融合遺伝子陰性の可能性が高いことが考えられます。

臨床性能試験

肺がん患者検体 (合計244検体) のホルマリン固定パラフィン包埋腫瘍切片を用いて、Vysis ALK Break Apart FISH プローブキットとの相関性を確認しました。その結果、陽性一致率は98.0%、陰性一致率は99.0%、全体一致率98.8%という高い一致率が得られ、ヒストファイン ALK iAEP® キットがALK融合遺伝子の診断に有用であり、ALK阻害剤の適応可否の診断においても臨床的に有用であることが示唆されました。

□ 肺がん患者検体のヒストファイン ALK iAEP® キットの判定とVysis ALK Break Apart FISH プローブキットの判定の相関性

スコア	判定	Vysis FISH		合計
		ALK 融合遺伝子陽性	ALK 融合遺伝子陰性	
スコア3	陽性	50例 (98.0%)	0例 (0.0%)	50例
スコア2	境界域	0例 (0.0%)	1例 ^{*1} (0.5%)	1例
スコア1	境界域	0例 (0.0%)	1例 (0.5%)	1例
スコア0	陰性	1例 ^{*2} (2.0%)	191例 (99.0%)	192例
総数		51例	193例	244例

陽性一致率 = 98.0% (50例/51例)
陰性一致率 = 99.0% (191例/193例)
全体一致率 = 98.8% (241例/244例)

*1 大細胞神経内分泌癌で70%≧60%超の腫瘍細胞に陽性反応を示しましたが、腫瘍細胞間での染色強度の差が著しいChecker board pattern (陰性・弱陽性細胞と陽性・強陽性細胞が頻繁に隣り合っている染色パターン) であり、Multiplex RT-PCRでは陰性でした。break pointより上流および下流のALK領域の発現をRT-PCRで確認したところ、全長ALKによるタンパク発現であることがわかりました。

*2 切片上の腫瘍部 (約250mm²) のFISH陽性細胞率は5.0%でしたが、一部の領域 (約0.15mm²) に限局してFISH陽性細胞率が44.0%であった症例でFISH法陽性と分類されました。

臨床的意義

アレクチニブ塩酸塩の適応判定

アレクチニブ塩酸塩の国内第I/II相試験（AF-001JP試験）において、ヒストファイン ALK iAEP® キットが被験者候補のALK融合タンパク発現の有無の確認に用いられました。ヒストファイン ALK iAEP® キットで陽性（スコア3）であった125例のうち、研究機関で設定されたFISH法で陽性と判定され、試験参加の同意が得られた39例が第II相部分に登録され、奏効率は92.3%（95%CI：79.1～98.4）でした。また、逆転写ポリメラーゼ連鎖反応（RT-PCR）法を用いて陽性と判定された患者を含めた46例の奏効率は、93.5%（95%CI：82.1～98.6）でした⁽⁸⁾。

☐ AF-001JP試験の被験者候補におけるヒストファイン ALK iAEP® キットおよび研究機関で設定されたFISH法の結果の相関性

		FISH 法			
		陽 性	陰 性	判定不能	NT*
本 キ ッ ト	陽 性（スコア3）	122	1	2	0
	境 界 域（スコア2）	0	0	0	0
	境 界 域（スコア1）	0	3	0	0
	陰 性（スコア0）**	0	48	4	194
	判 定 不 能	0	0	0	10

*：検査実施せず

**：別途同意が得られた被験者候補52例についてレトロスペクティブにFISH法検査を実施

※研究機関で設定されたFISH法とVysis ALK Break Apart FISH プローブキットは、十分な相関性が得られています（ニチレイバイオサイエンス社内資料より）。

クリゾチニブ、ブリグチニブの適応判定

ヒストファイン ALK iAEP® キットの臨床性能試験の結果に基づき、ヒストファイン ALK iAEP® キットと既承認品のFISH法との同等性が評価され、本キットを非小細胞肺癌患者におけるクリゾチニブ、ブリグチニブの適応判定に用いることの有用性が示されました。

セリチニブ、ロルラチニブの適応判定

ヒストファイン ALK iAEP® キットの同等性試験の結果に基づき、ヒストファイン ALK iAEP® キットと既承認品の免疫組織染色法との同等性が評価され、本キットを非小細胞肺癌患者におけるセリチニブ、ロルラチニブの適応判定に用いることの有用性が示されました。

同等性試験

非小細胞肺癌患者の検体を対象として、ヒストファイン ALK iAEP® キットと既承認品の免疫組織染色法（IHC 法）により、それぞれ ALK 融合タンパクの判定を行い、その結果を比較しました。

☐ 本キットと既承認品（IHC 法）による判定結果の比較

		既承認品（IHC 法）		合計
スコア	判定	陽 性	陰 性	
本 キ ッ ト	3 ALK融合タンパク陽性	48例	0例	0例
	2 境界域	0例	0例	0例
	1 境界域	0例	0例	0例
	0 ALK融合タンパク陰性	0例	100例	100例
	合 計	48例	100例	148例

※試験に供した150例のうち2例は、既承認品（IHC 法）で判定保留であったため、上記の表から除いています。当該2例は、本キットでスコア3・陽性およびFISH法で陽性と判定されました。

☐ 本キットと既承認品（IHC 法）による判定の一致率

	一致率	両側90%信頼区間
陽性	100%（48例/48例）	93.9－100
陰性	100%（100例/100例）	97.0－100
全体	100%（148例/148例）	98.0－100

染色に適した検体

■ 検体の準備

検体には非小細胞肺癌を含む組織を用いて、ホルマリン固定パラフィン包埋（Formalin-Fixed Paraffin-Embedded: FFPE）したブロックを使用してください。非小細胞肺癌患者から採取した非小細胞肺癌を含む小さな組織（約 1cm×1cm×0.5cm）は、採取後すぐに固定してください。すぐに固定できない場合は生理食塩水で湿らせたガーゼで包んで冷蔵庫等で保管し、24 時間以内に、下表に従い、固定を行ってください。

固定液	固定時間
10%（緩衝）ホルマリン	6ー48時間
20%ホルマリン	

【操作上の注意】

1. 高濃度の固定液にさらしたり、長時間の固定を行ったりすると、組織崩壊や抗原変性を生じさせることがあるので、指定された固定液を使用してください。
2. 包埋の際には使用するパラフィンの融解温度を大きく超えないように注意してください。

固定後、水洗い、エタノールにて脱水、キシレンに浸して脱アルコール後、パラフィン浸透をしてパラフィン包埋ブロックを作製してください。

■ 切片および標本の準備

【パラフィン包埋切片】

切片を 4μm に薄切し、poly-L-lysine またはシラン等の切片用接着剤をコーティングしたスライドに付着させてください。37℃の乾燥器内で 24 時間乾燥させてください。

注：薄切後 9 週間以上経過した組織切片を用いて染色した場合、切片中の抗原が劣化して、偽陰性の染色結果を示す可能性があります。薄切後 9 週間以内に使用してください。

【検体標本スライドの準備】

検体標本スライドとして 1 検体あたり、2 枚準備してください。

1 枚は、試薬対照スライドとして、第一抗体のかわりに陰性コントロール（マウス IgG）を使用して染色操作を行ってください。

【検体対照スライドの準備】

ALK コントロールスライド [ホルマリン固定パラフィン包埋細胞株（セルブロック）2 種類（NCI-H2228 及び SK-BR-3）を貼付したスライド] を検体対照スライドとして用いるか、あるいは ALK 融合タンパクの陽性対照スライド（スコア 3 相当）と ALK 融合タンパクの陰性対照スライド（スコア 0 相当）を準備してください。

・陽性対照スライド（スコア3相当）

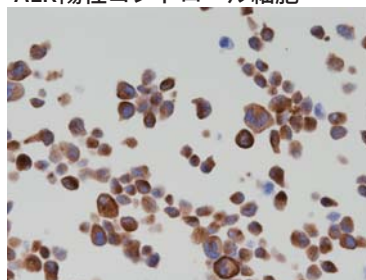
検体標本スライドと同様の方法で作製され、あらかじめ ALK 融合タンパクの発現を確認している組織、細胞スライドを準備してください。

・陰性対照スライド（スコア0相当）

検体標本スライドと同様の方法で作製され、あらかじめ ALK 融合タンパクの発現がないことを確認している組織、細胞スライドを準備してください。

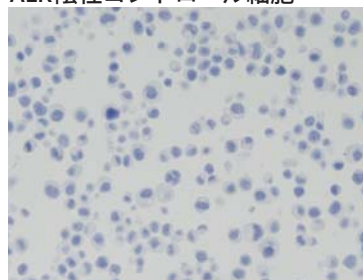
染色例

ALK 陽性コントロール細胞



細胞の細胞質に強い陽性反応を示す。

ALK 陰性コントロール細胞



すべての細胞に陽性反応を示さない。

以上の検体対照スライドを用意し、検体標本スライドおよび試薬対照スライドと並行して、検体の準備から染色処理、検鏡までの全工程を行ってください。

■ iScore について

ヒストファイン ALK iAEP® キットの添付文書にあるスコアリングおよび判定方法は、公益財団法人がん研究会がん研究所 分子標的病理プロジェクト 竹内 賢吾先生により考案されたiScoreに基づいています。

2018年3月に改訂されたALK iAEP® キットの添付文書(第4版)では、スコア3であった場合の患者への適応判定上の留意事項が、iScoreに記されている原案(指針 instruction)と同等の内容に改訂されました。

iScore による診断

iScore for ALK iAEP IHC

informative Score for anti-ALK iAEP immunohistochemistry. Ver. 4

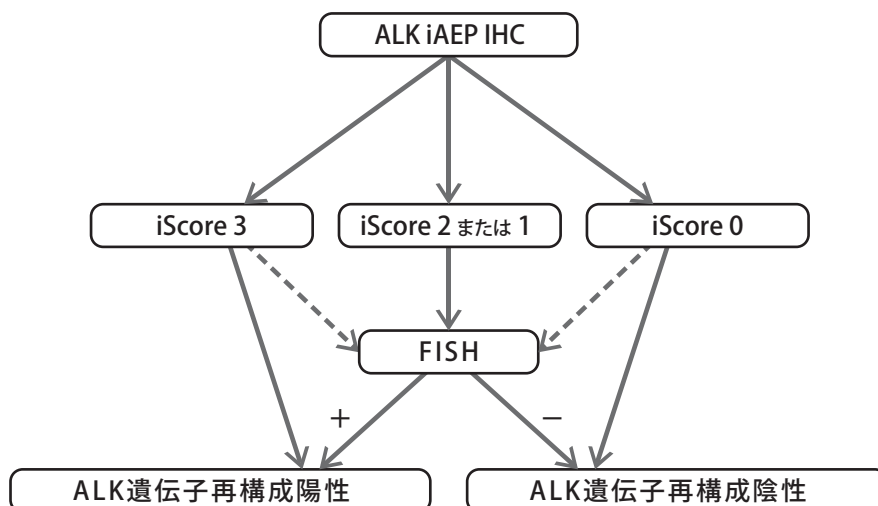
	ALK iScore 3	ALK iScore 2	ALK iScore 1	ALK iScore 0
適合条件 inclusion criteria	陽性腫瘍細胞率>80% (checker board patternの場合、iScore 2bとする)。	a. 80%≧陽性腫瘍細胞率>50% b. 陽性腫瘍細胞>80%だが checker board pattern(陽性・陰 性細胞が頻りに隣り合う)を呈す る場合	50%≧陽性腫瘍細胞率>0%	陽性腫瘍細胞なし
解釈 interpretation	腺癌ならばALK融合遺 伝子陽性。大細胞神経 内分泌癌ならば全長 ALK発現の可能性あり。 小細胞癌ならば全長 ALK発現。	ALK融合遺伝子が陰性にもか かわらず、一部あるいはすべての細 胞が神経内分泌系への分化を呈 している。あるいはALK融合遺伝 子が陽性にもかかわらず、扁平上 皮への分化を呈する部などでALK 融合蛋白量が低下している、など。	ALK融合遺伝子陰性であるが、 一部あるいはすべての細胞が 神経内分泌系への分化を呈し ている、など。	ALK融合遺伝子陰性。
指針 instruction	腺癌ならばFISH等 でのALK融合遺伝子確 認不要。確認できれば さらに確実。明らかな 腺癌以外ではFISH等 での確認を要する。	FISH等でのALK融合遺伝子有無 の確認が望ましい。	FISH等でのALK融合遺伝子 陰性確認が望ましい。	FISH等でのALK融合 遺伝子確認不要。陰性 確認できればさらに確 実。

iScoreとは、iAEP(intercalated antibody-enhanced polymer)法による免疫染色(immunohistochemistry)の結果を、適合条件(inclusion criteria)に従い評価することで、結果の解釈(interpretation)と、今後の指針(instruction)が得られるスコアリングシステムです。ここには肺癌に対する抗ALK iAEP免疫染色のiScore、すなわちALK iScoreが示されています。

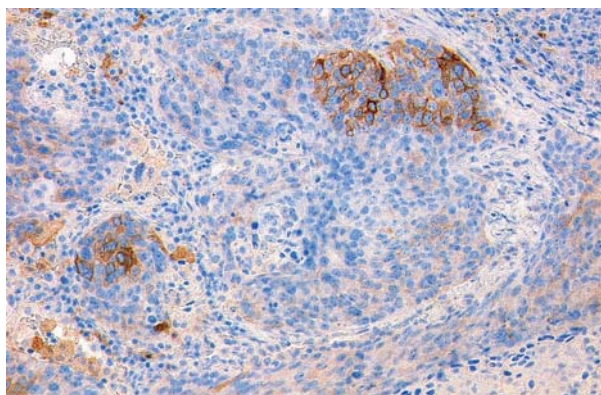
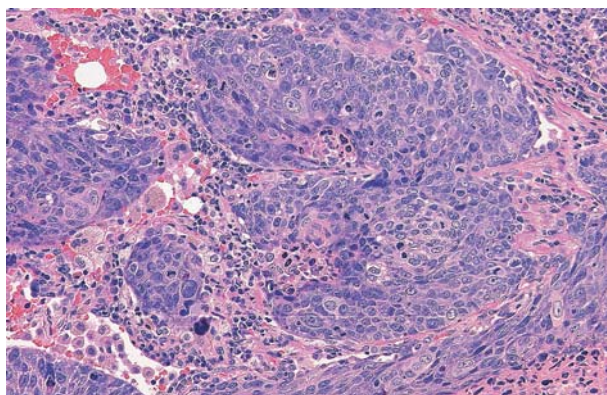
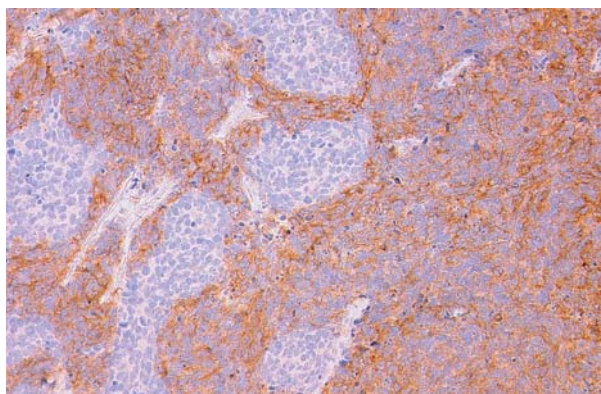
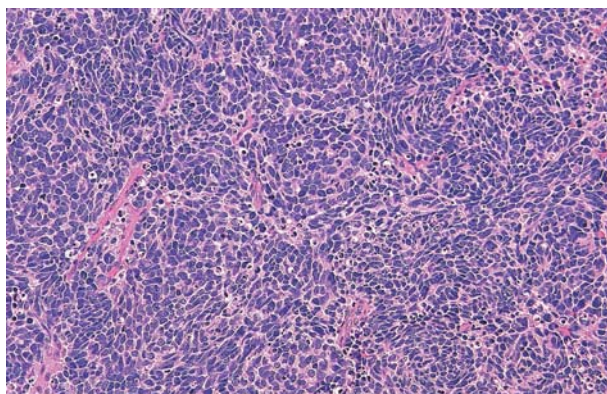
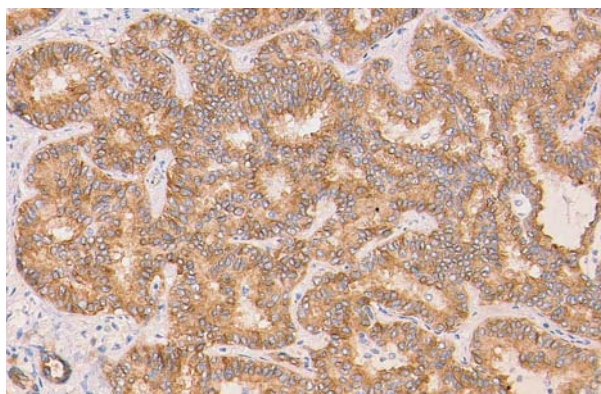
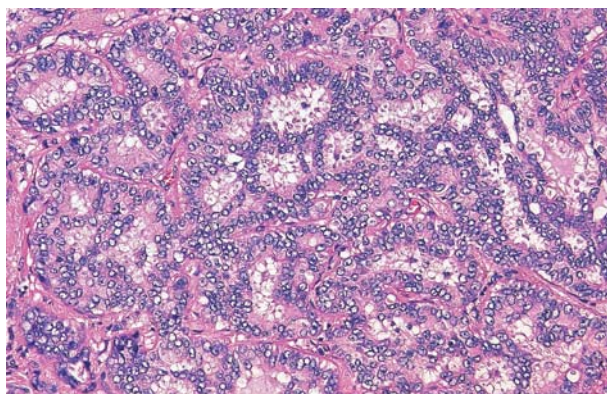
1. 陰性コントロールと比較して染色強度が強い細胞を陽性細胞とする。
2. 陽性・陰性コントロールの染色所見が異常である場合、iScoreは適用できない。
3. 印環細胞など高度に粘液を含有する細胞は染色されるべき細胞質の領域が少なく、ALK融合遺伝子陽性であっても染色されにくい。陽性細胞が見られる検体で、高度粘液含有細胞が陰性である場合、それらは陽性細胞率の算定には加えない。
4. iScore 2では、適合した条件によりaまたはbを付記する。例 iScore 2a
5. 確定を留保したい場合は、「判定不能」とするか、推定されるiScoreに「u」を付記のうえ確定困難な理由を記載する。例「ALK iScore 3u 理由: 腫瘍と思われる細胞はすべて陽性であるが、数個しか検体中に存在しないため」

Copyright (C) 2012-2014 Takeuchi. All Rights Reserved.

□ iScore に基づいたALK検査アルゴリズム



iScore 判定例



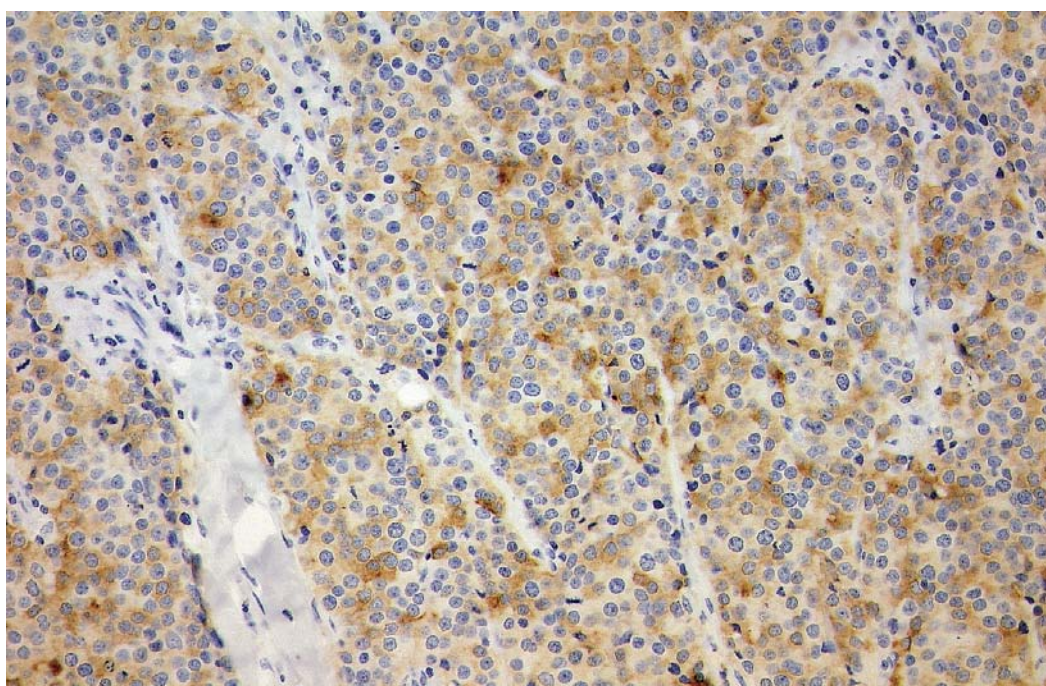
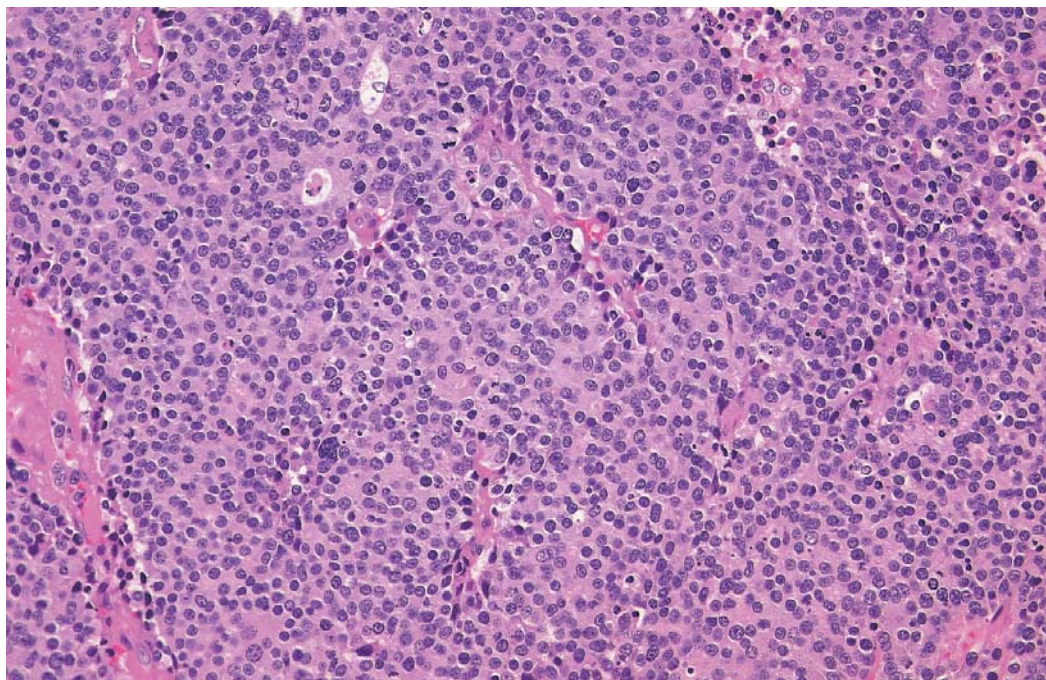
上段 腺癌 ALK iScore 3. ALK split FISH陽性. EML4-ALK 陽性.

中段 小細胞癌 ALK iScore 2. ALK split FISH陰性. EML4-ALK 陰性.

下段 扁平上皮癌 ALK iScore 1. ALK split FISH陰性. EML4-ALK 陰性.

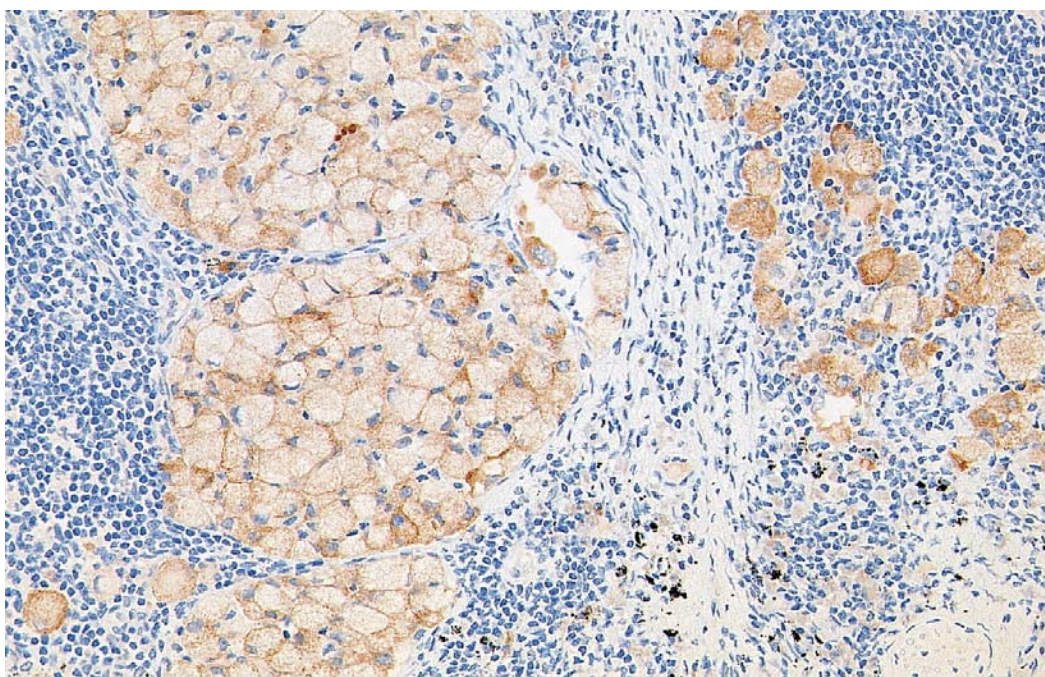
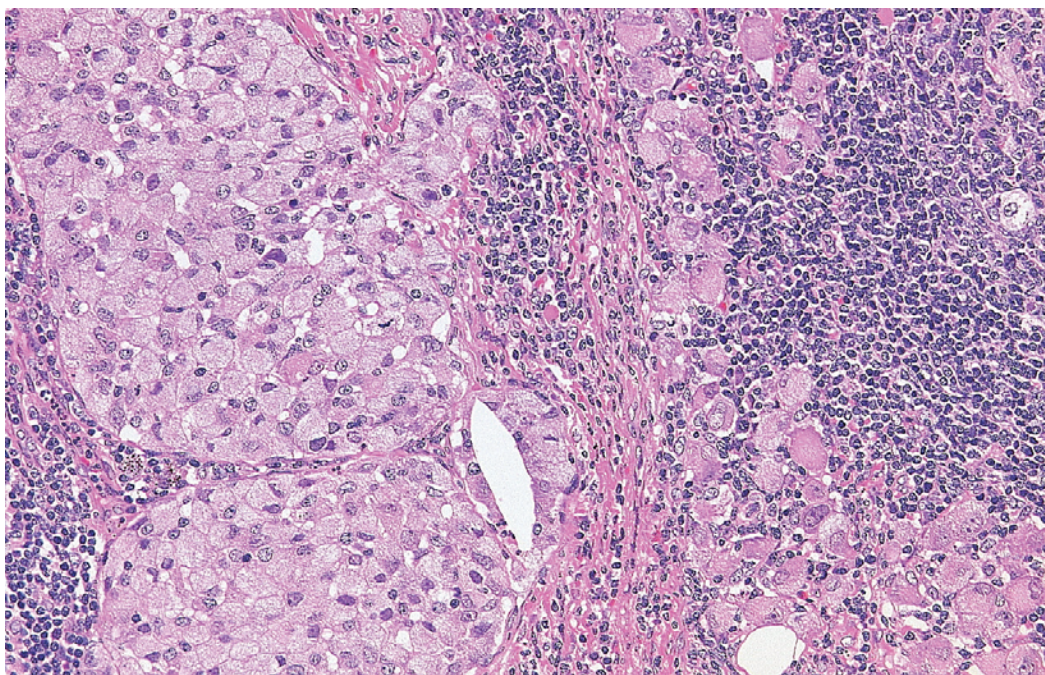
ALK 融合遺伝子はひとつの癌におけるすべての腫瘍細胞に存在する。したがって、iAEP 法などの感度が適切に設定された抗ALK免疫染色においては、すべての腫瘍細胞が染色される。同一癌内における染色強度は組織像に応じて強弱を呈することがあるが、基本的にALK 融合遺伝子陽性肺癌において抗ALK免疫染色陰性細胞は混在しない。逆に言えば、陽性細胞と陰性細胞が混在する場合、ALK 融合遺伝子は陰性である可能性が高い。すなわち、抗ALK免疫染色の強度はALK 融合遺伝子の有無とは相関しない（融合遺伝子の数とは相関するかもしれない）。したがってiScoreでは、より主観的な判断になりやすい染色強度は判定基準に含めず、陽性腫瘍細胞の割合のみを判定基準としている。

分化度の低い癌では、ときに一部の腫瘍細胞が抗ALK免疫染色陽性所見を呈することがあり、生理的な全長ALK発現によると思われる。生理的な発現では通常、陰性細胞が混在する。大細胞神経内分泌癌では、ALK iScore 3となる症例とならない症例が存在し、前者の場合ALK 融合遺伝子陽性となる。扁平上皮癌や小細胞癌では通常、ALK iScore 3になることはなく、ALK 融合遺伝子も検出されない（上段,中段⁽¹⁰⁾より,下段⁽¹¹⁾より）。



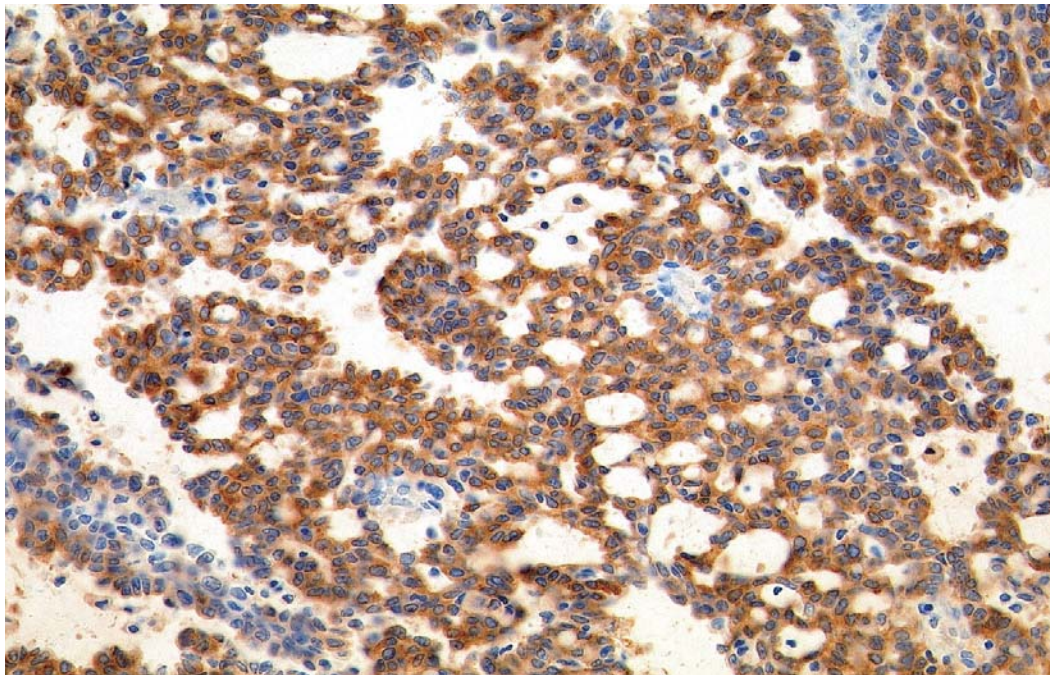
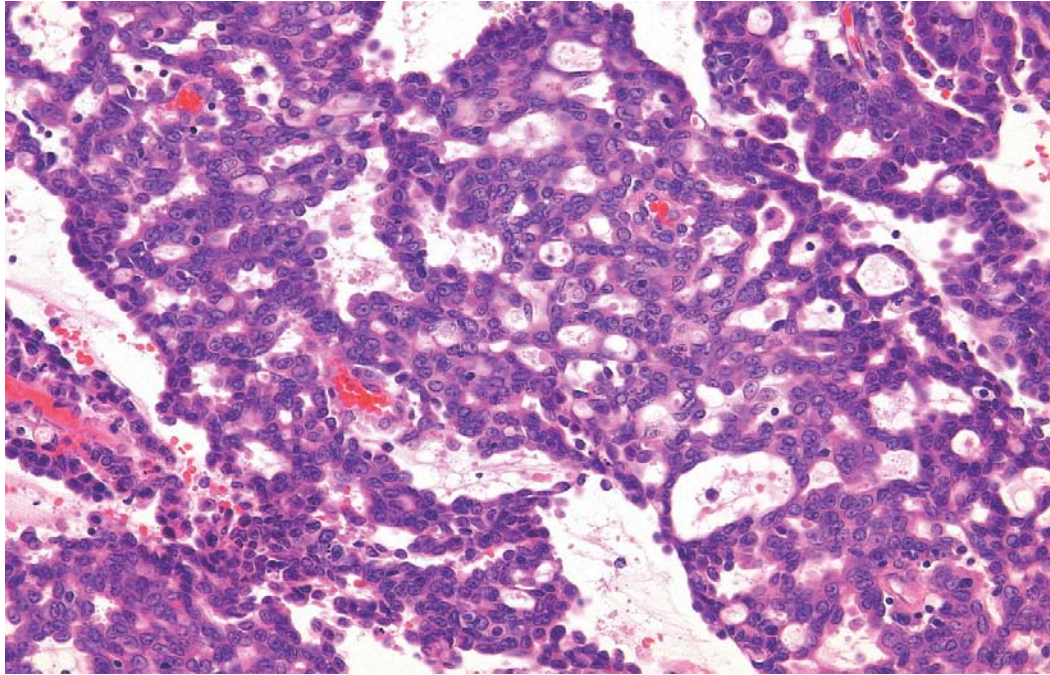
大細胞神経内分泌癌 ALK iScore 2. ALK split FISH陰性.

視野や観察者によっては、陽性腫瘍細胞>80%と判断されるかもしれないが、「checker board patternの場合、iScore 2bとする」という規定により、いずれにせよALK iScore 2となる。全長ALK発現症例においては通常、免疫染色陰性細胞が混在する。したがって、本例における抗ALK免疫染色陽性所見も全長ALK発現により、ALK融合遺伝子は陰性である。ただし、大細胞神経内分泌癌にはALK融合遺伝子陽性例も存在し、その場合はALK iScore 3となる。

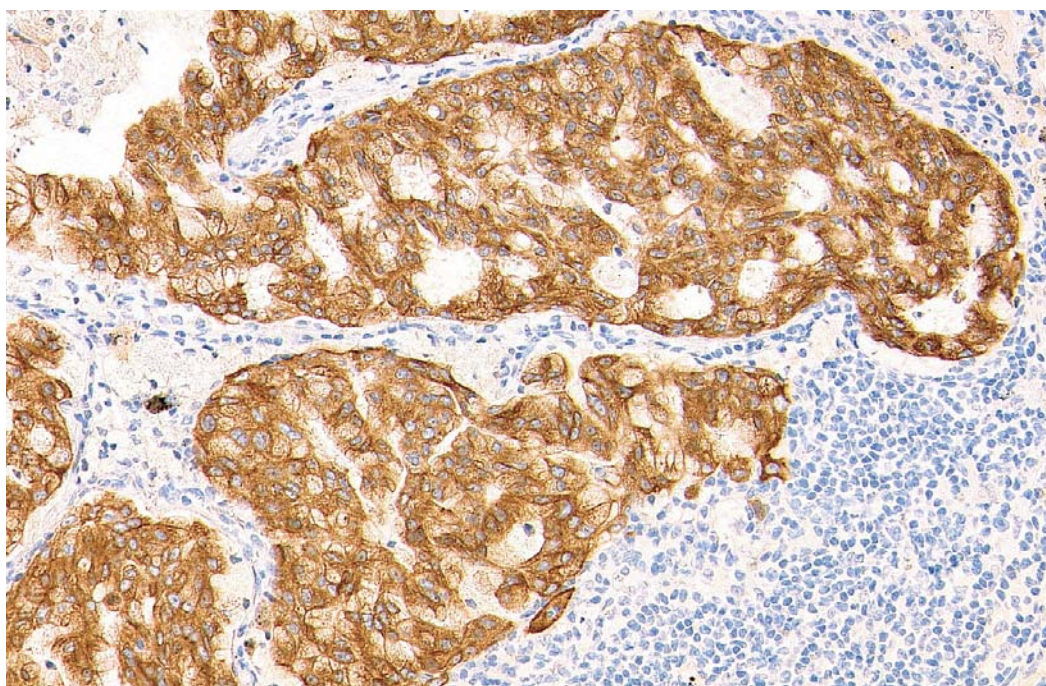
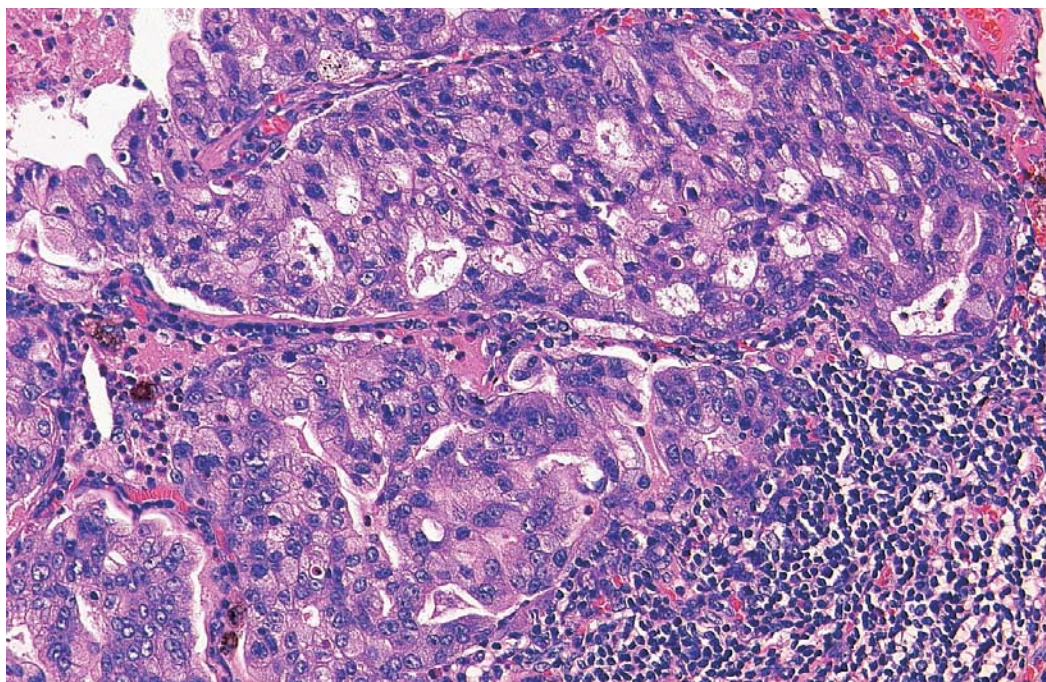


腺癌 (signet-ring cell) ALK iScore 3. *ALK* split FISH陽性. *EML4-ALK*陽性.

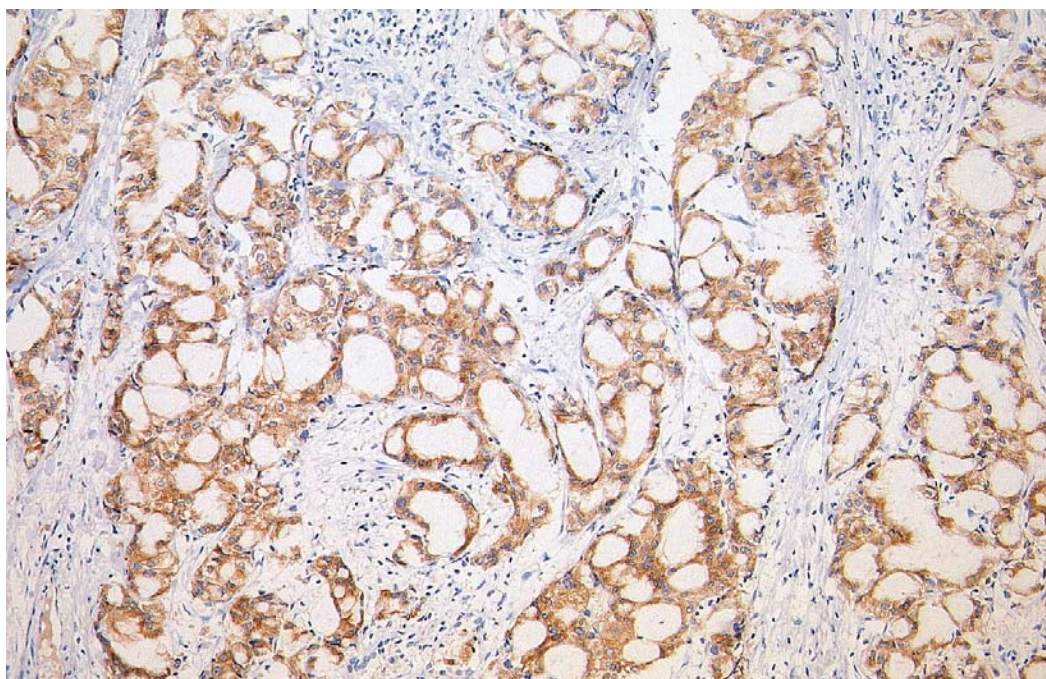
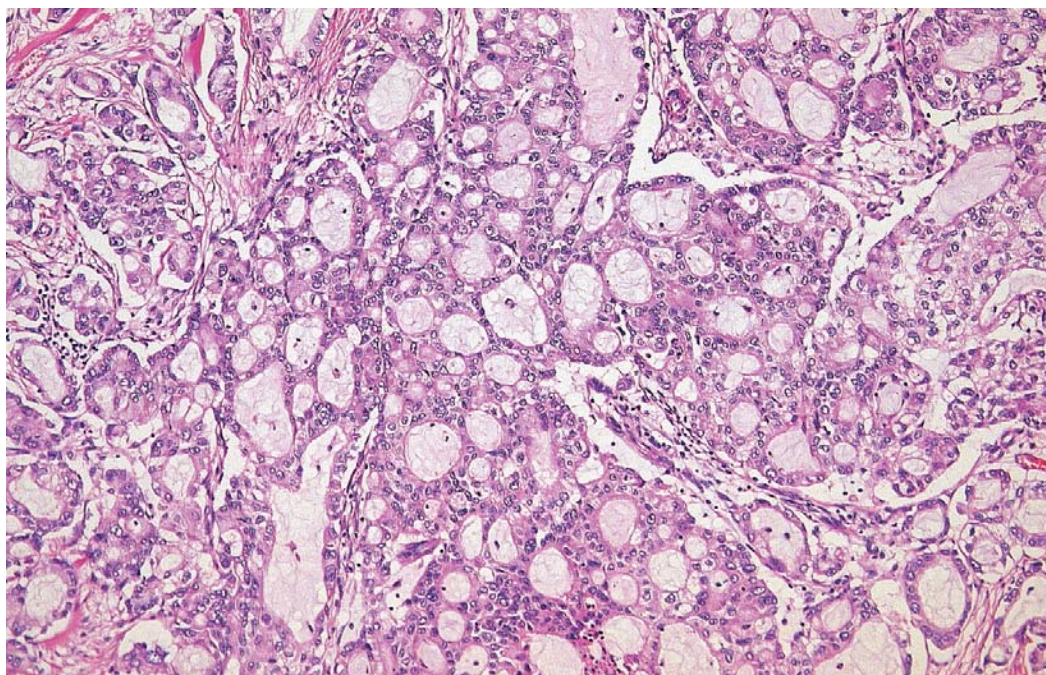
印環細胞など高度に粘液を含有する細胞は染色されるべき細胞質の領域が少なく, *ALK* 融合遺伝子陽性であっても染色されにくい. 陽性細胞が見られる検体で, 高度粘液含有細胞が陰性である場合, それらは陽性細胞率の算定には加えない.



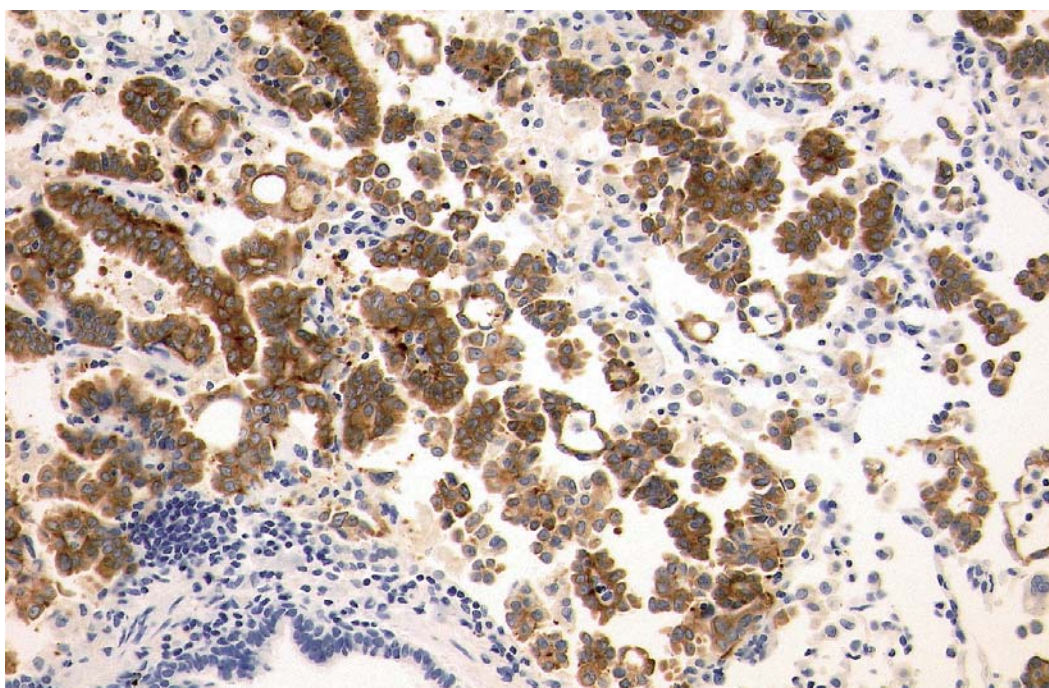
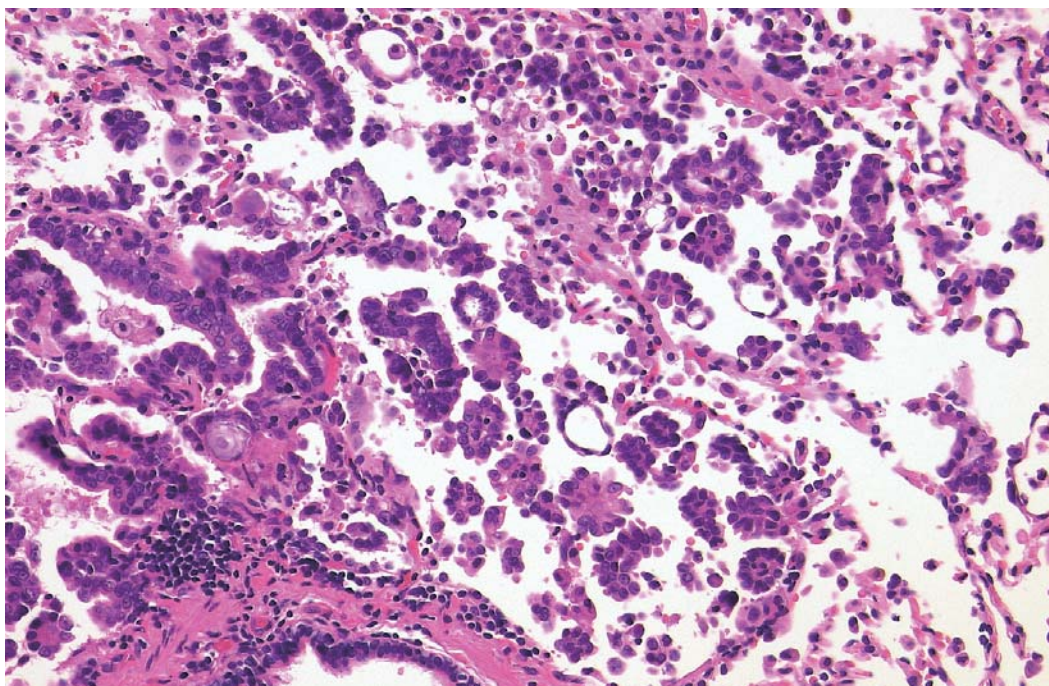
腺癌 (acinar / mucinous cribriform pattern) ALK iScore 3. *ALK* split FISH陽性. *EML4-ALK* 陽性.



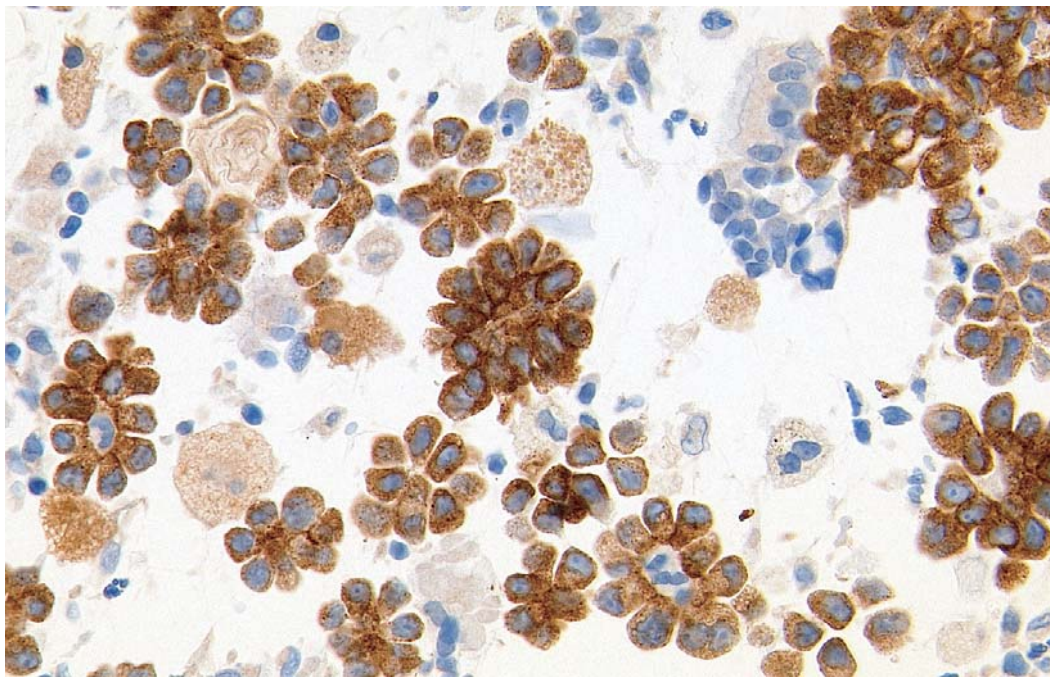
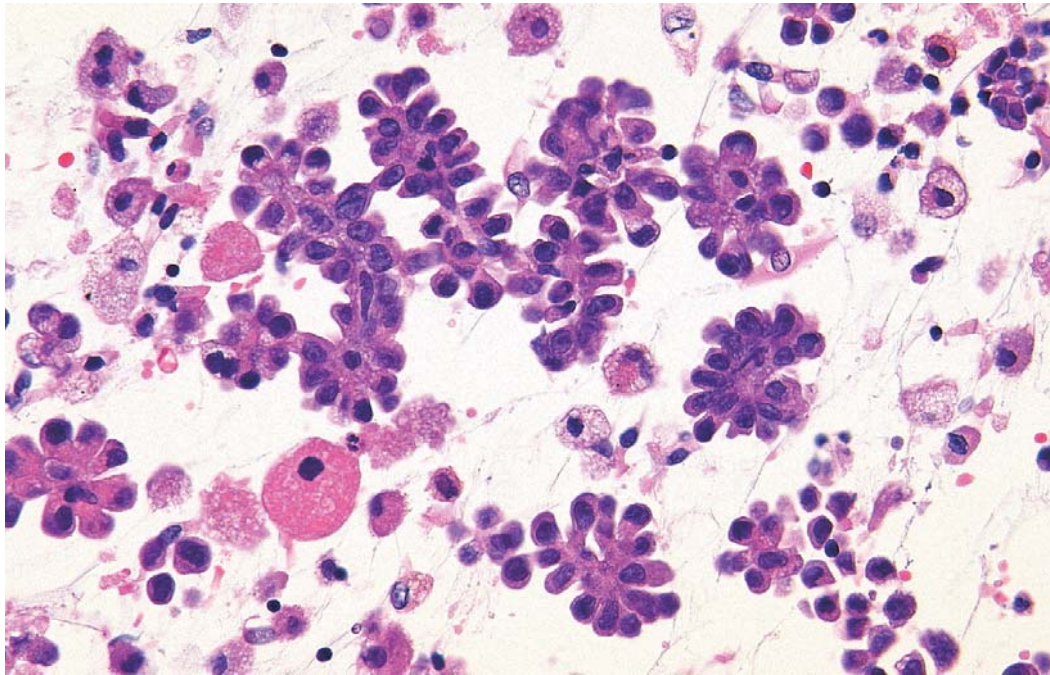
腺癌 (acinar / mucinous cribriform pattern) ALK iScore 3. *ALK* split FISH 陽性. *EML4-ALK* 陽性.



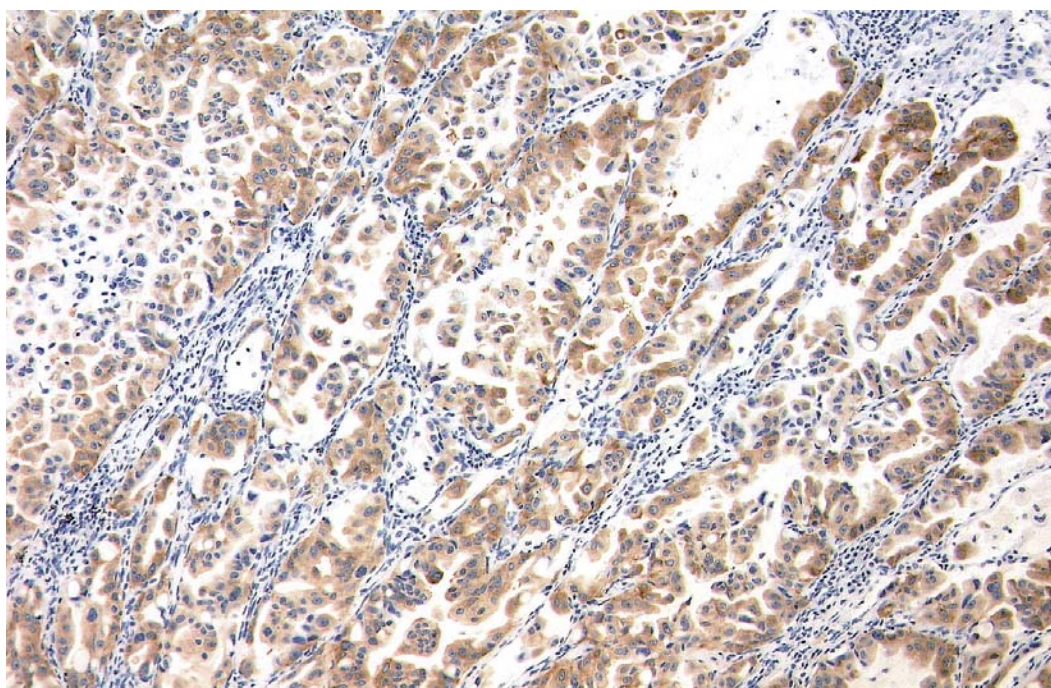
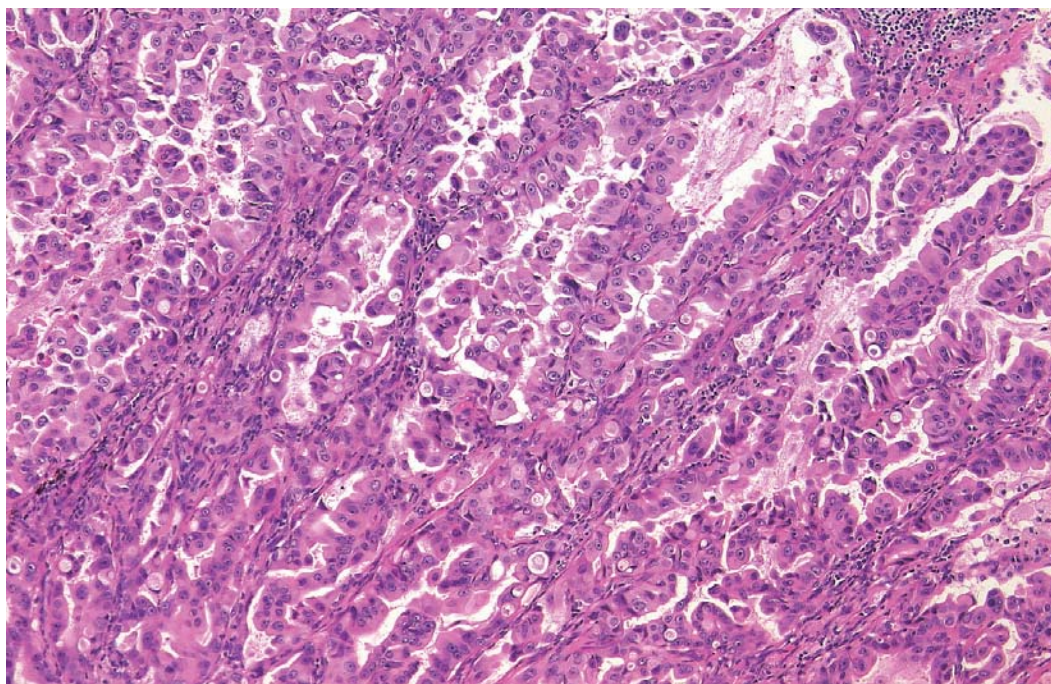
腺癌 (acinar / mucinous cribriform pattern) ALK iScore 3. *ALK* split FISH陽性. *EML4-ALK* 陽性.



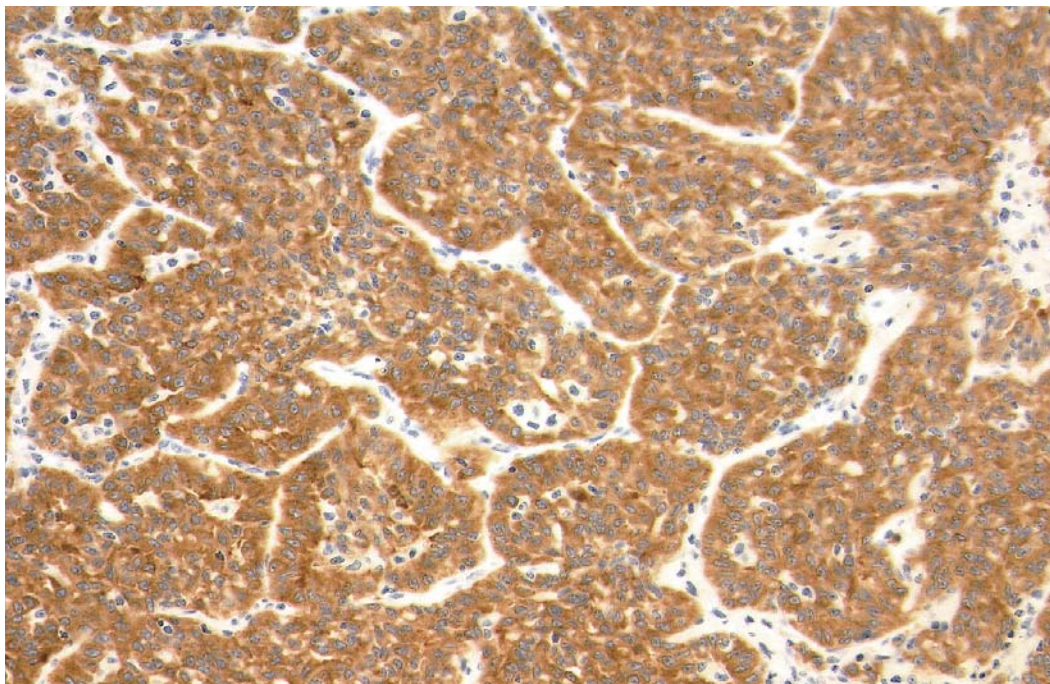
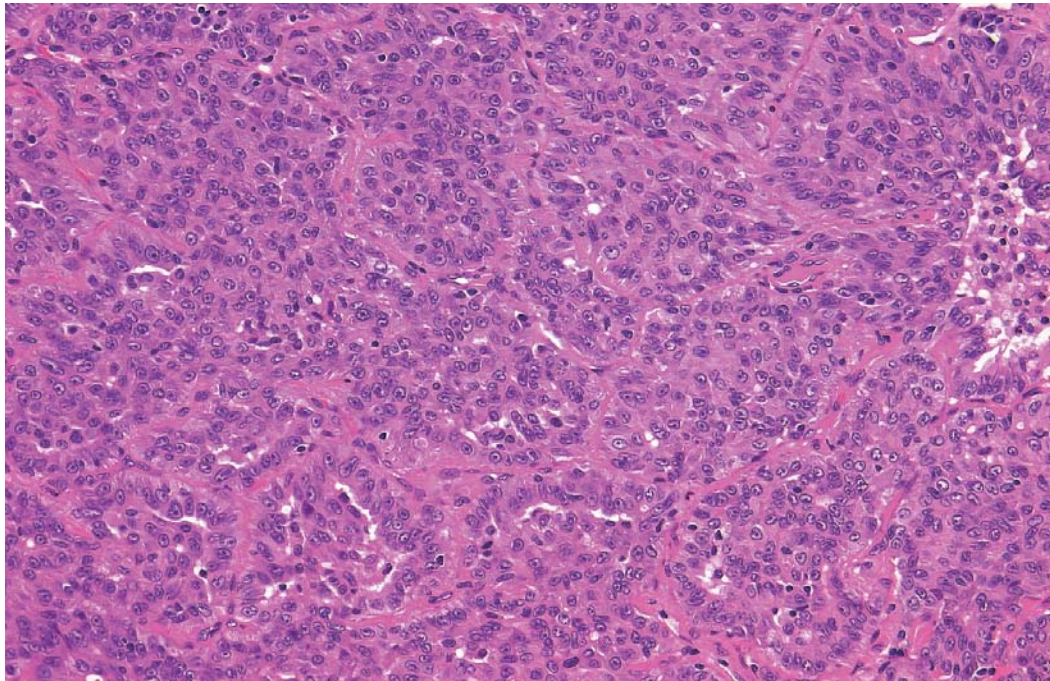
腺癌 (micropapillary pattern) ALK iScore 3. ALK split FISH陽性. *EML4-ALK* 陽性.
砂粒体 (石灰化) もみられる.



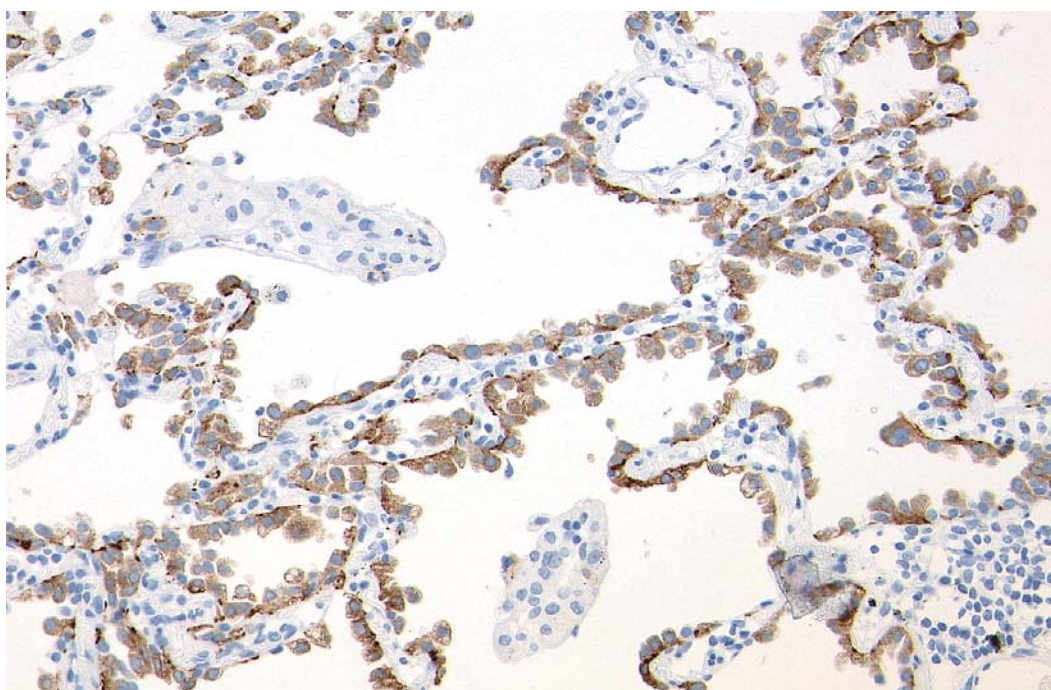
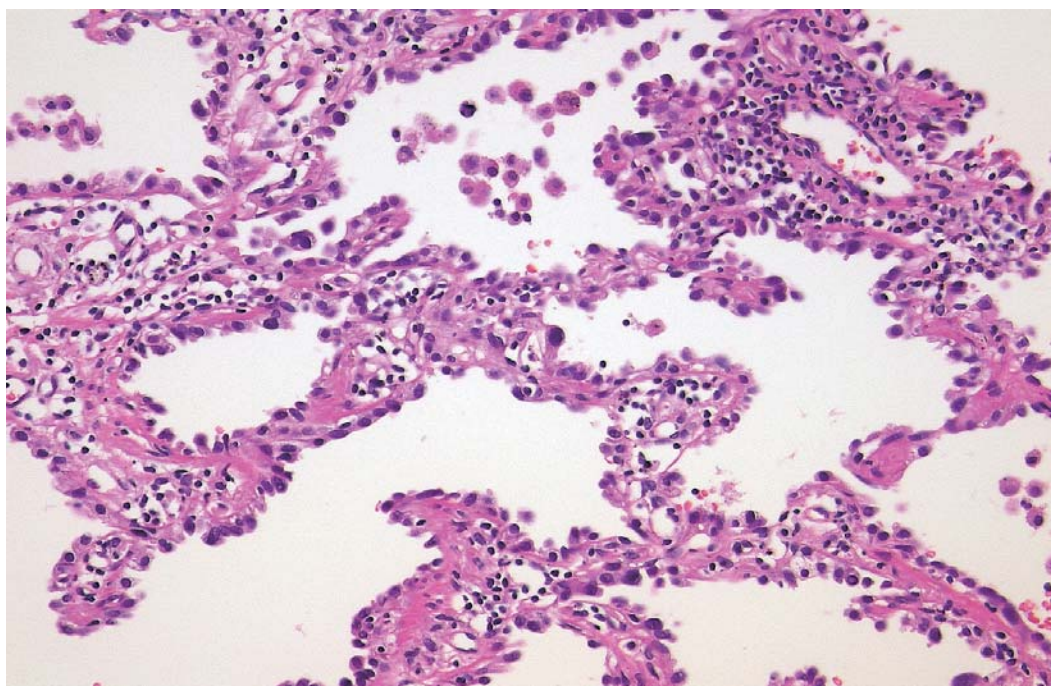
腺癌 (micropapillary pattern) ALK iScore 3. ALK split FISH陽性. EML4-ALK 陽性.
EML4-ALKに対する抗ALK免疫染色においては, 細胞質がびまん性に染色されるが, ときに微細顆粒が見られることがある. マクロファージの非特異的染色に注意.



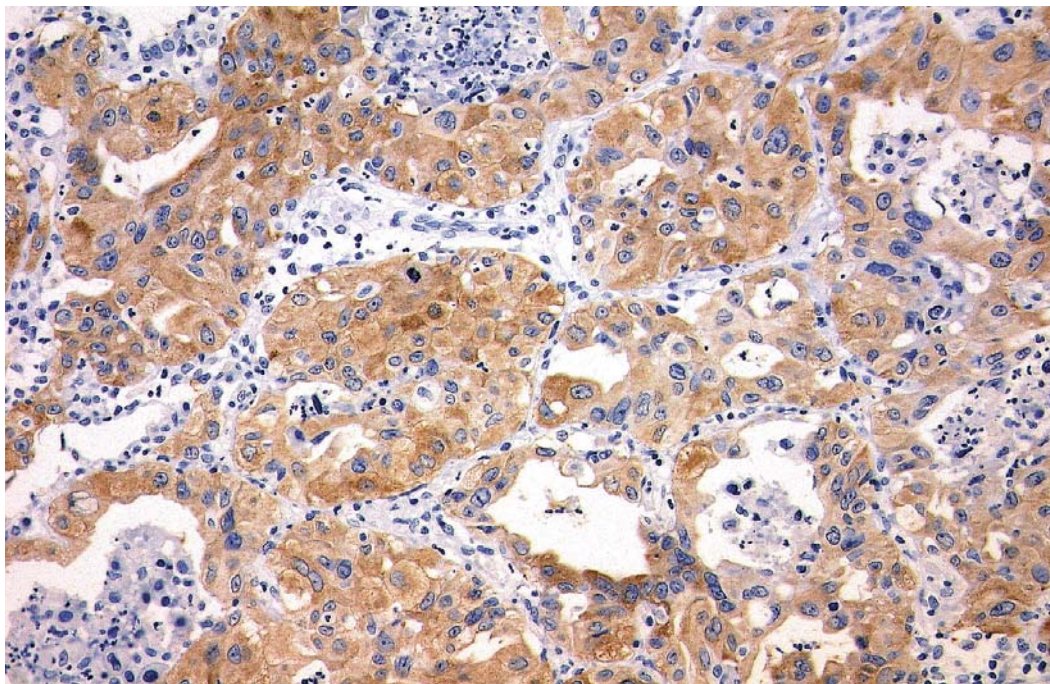
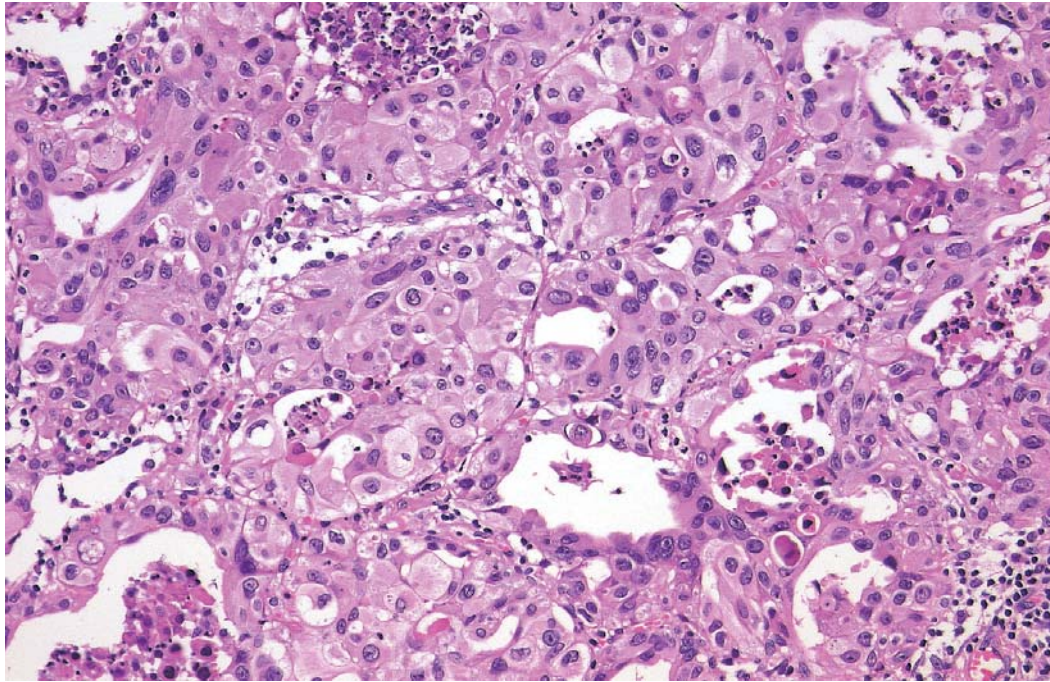
腺癌 (papillary pattern) ALK iScore 3. *ALK* split FISH陽性. *EML4-ALK* 陽性.



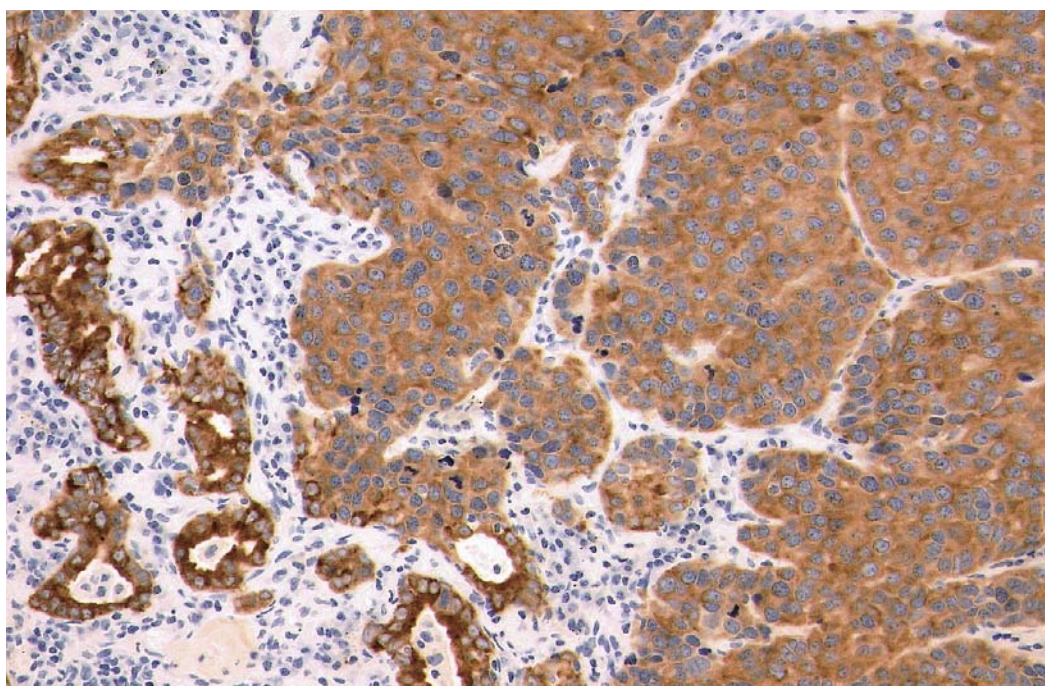
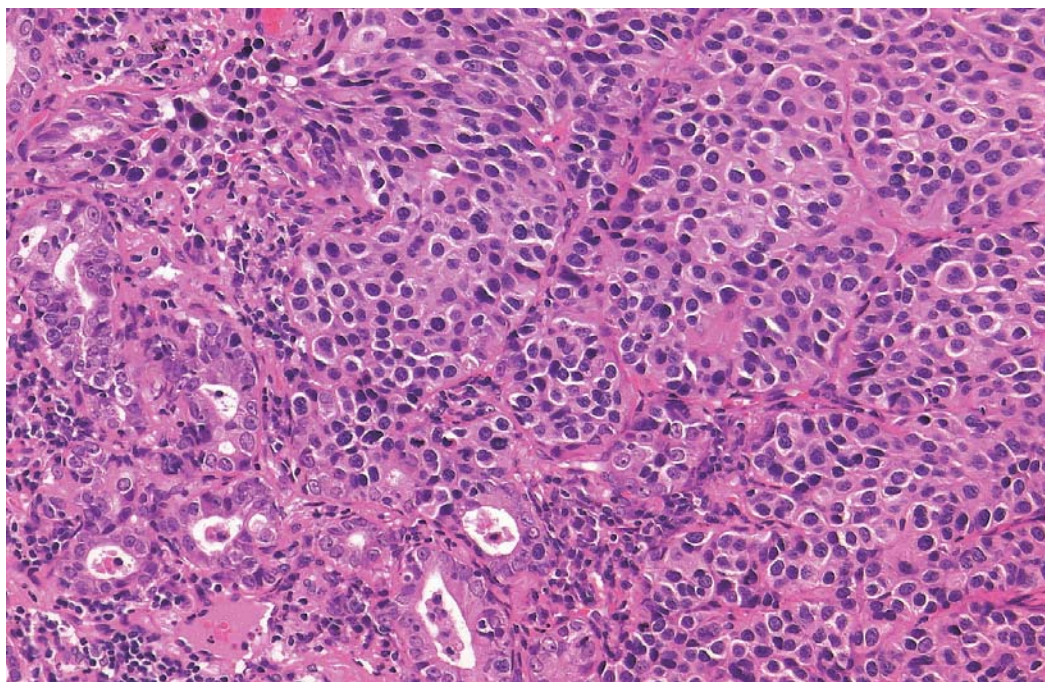
腺癌 (solid + acinar pattern) ALK iScore 3. *ALK* split FISH陽性. *EML4-ALK* 陽性.



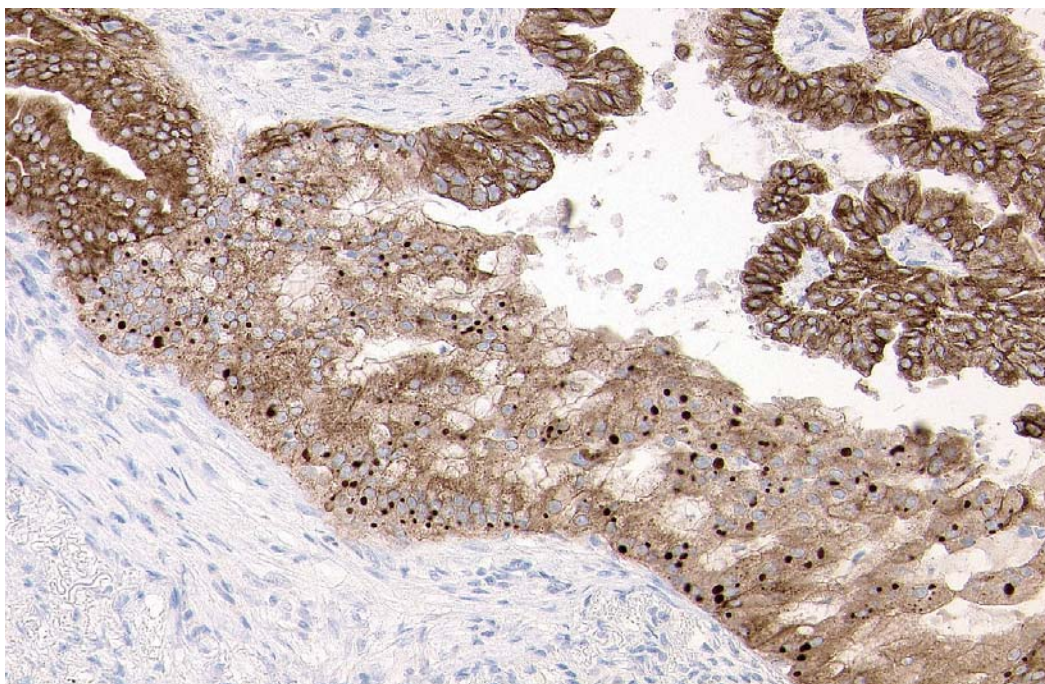
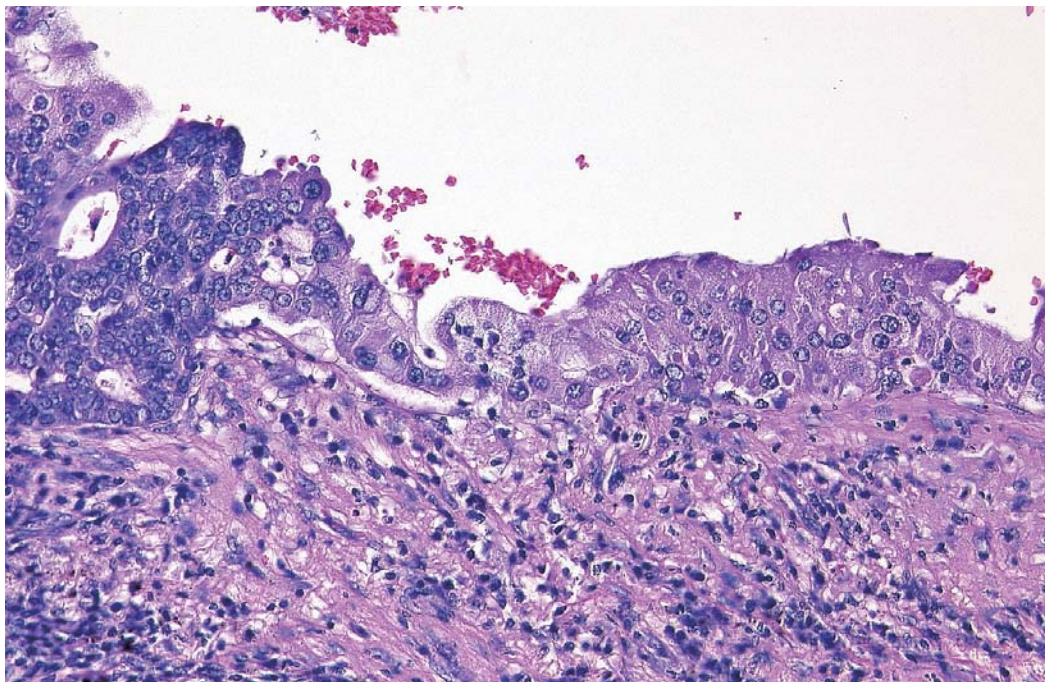
上皮内腺癌 (気管支肺胞上皮癌) ALK iScore 3. *ALK* split FISH陽性. *KLC1-ALK* 陽性.
(下段 (12) より)



腺癌 ALK iScore 3. *ALK* split FISH陽性. *KIF5B-ALK* 陽性.

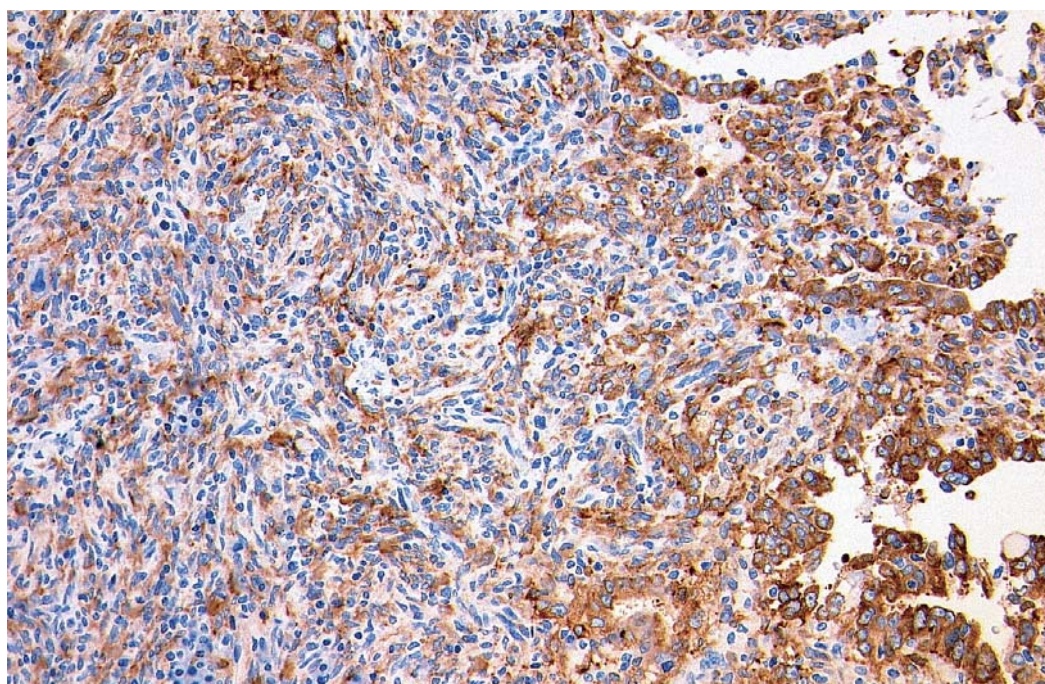
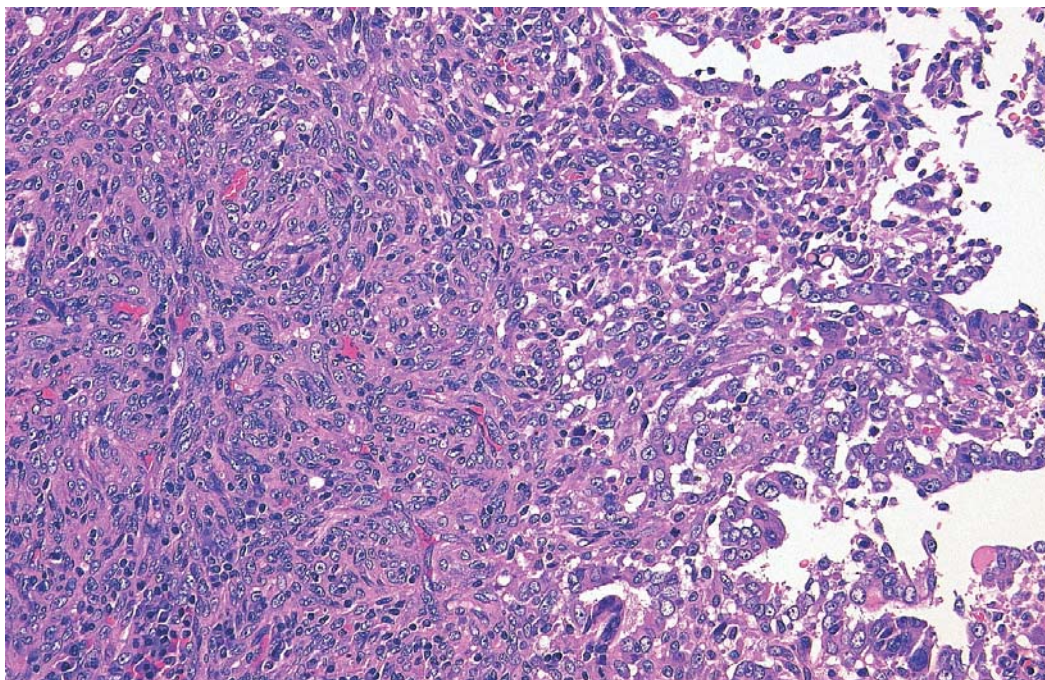


腺癌 (solid + acinar pattern) ALK iScore 3. *ALK*split FISH陽性. *EML4-ALK*陽性.
 充実部に比べ、左下の腺房様構造において発現強度が高い。iScoreでは染色強度は評価せず、陽性腫瘍細胞の割合のみを判定基準としているので、本例はALK iScore 3となる。



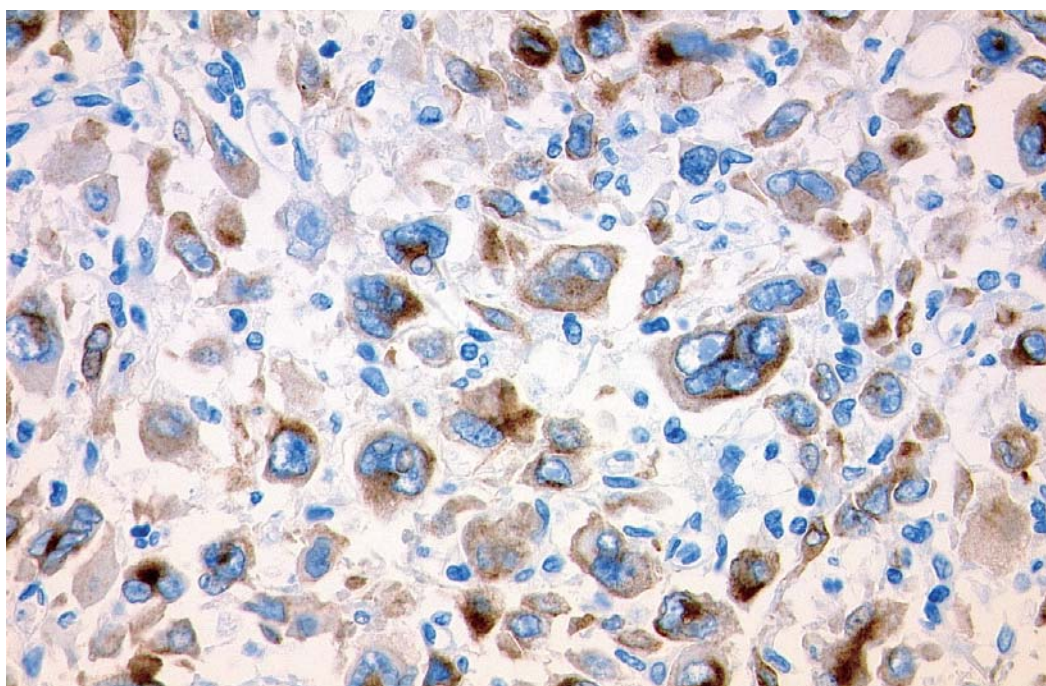
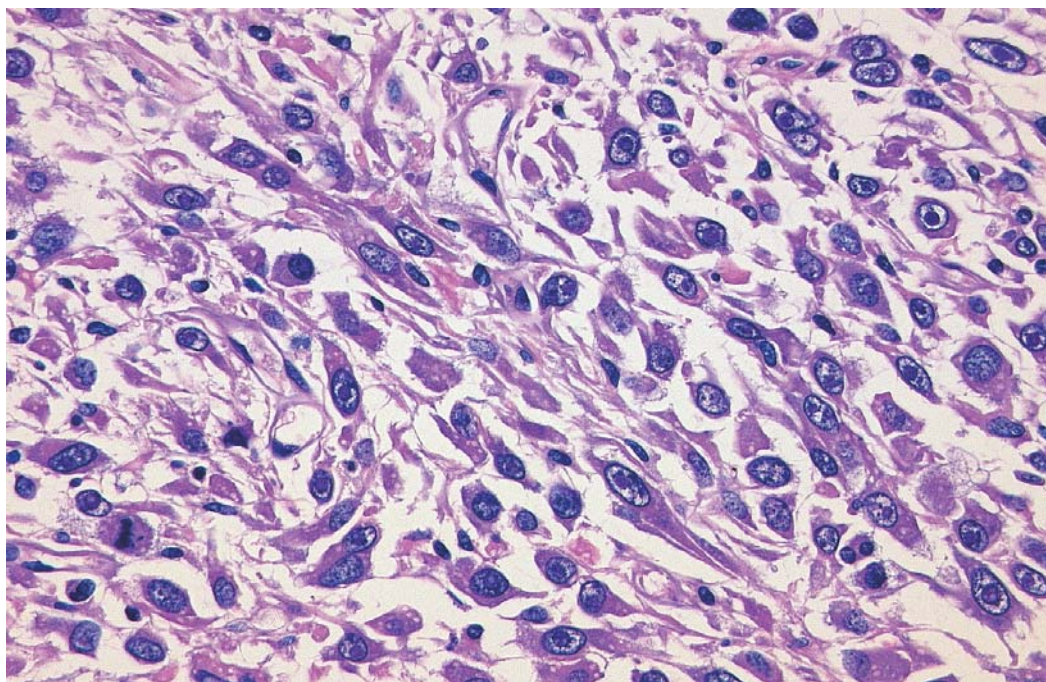
腺癌 ALK iScore 3. ALK split FISH陽性.

抗ALK免疫染色パターンないし強度が、腫瘍細胞の部位により異なる非定型例。免疫染色所見に対応して、HE染色における細胞形態も異なっている。iScoreでは染色強度を判定基準に含まない
のでiScore 3となる。



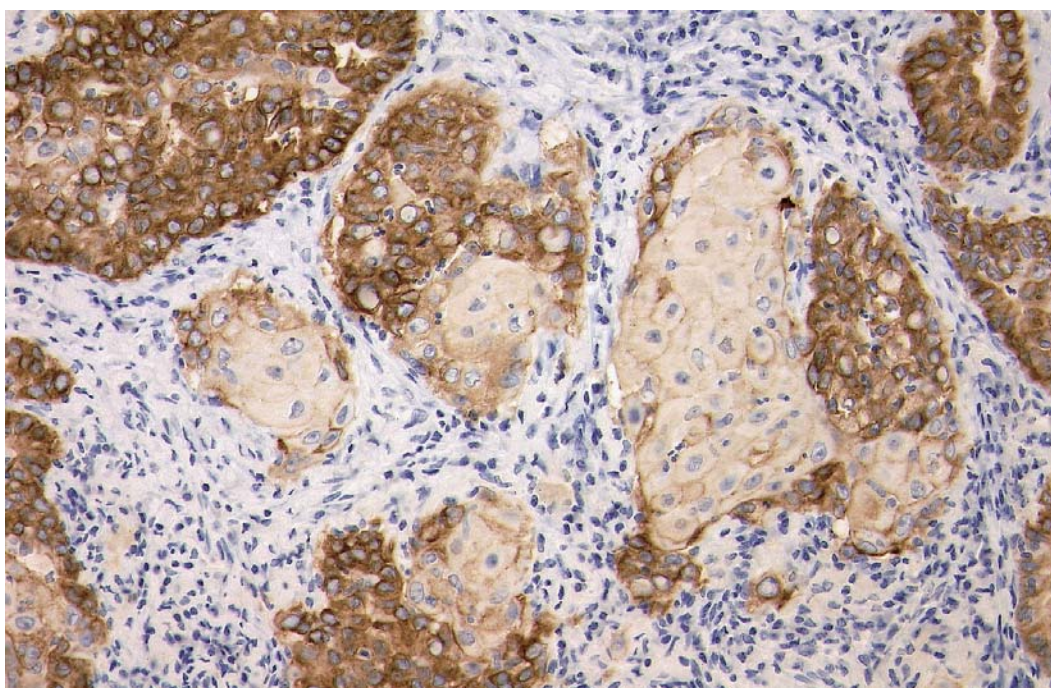
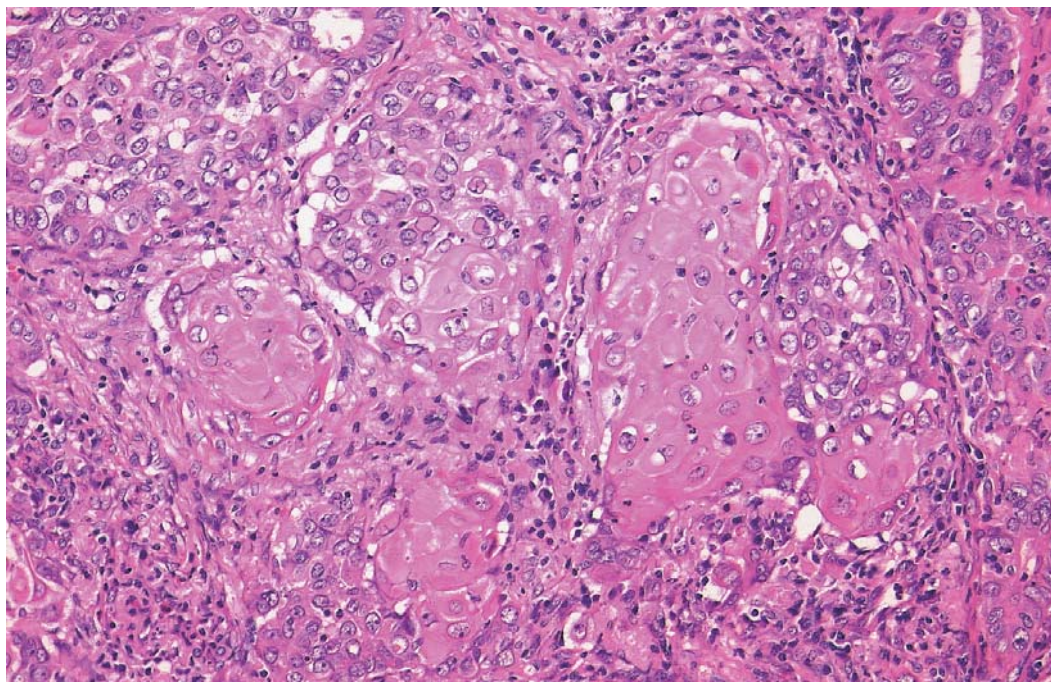
肉腫様癌（多形癌）ALK iScore 3. ALK split FISH陽性.

明らかな腺癌部分は容易に判定できるが、紡錘形細胞に転化した部位では陽性腫瘍細胞の算定が困難かもしれない。非定型例としてFISH等でALKの再構成の有無を確認すべきである。



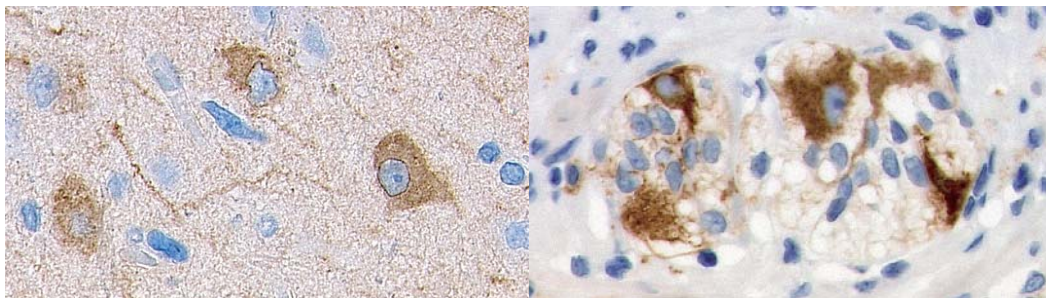
肉腫様癌（多形癌）ALK iScore 3. *ALK* split FISH陽性.

図に示した巨細胞癌の部位とともに明らかな腺癌の像を呈する部も混在しており、両者ともにALK iScore 3であった。非定型例としてFISH等で*ALK*の再構成の有無を確認すべきである。



腺扁平上皮癌 ALK iScore 3. ALK split FISH陽性.

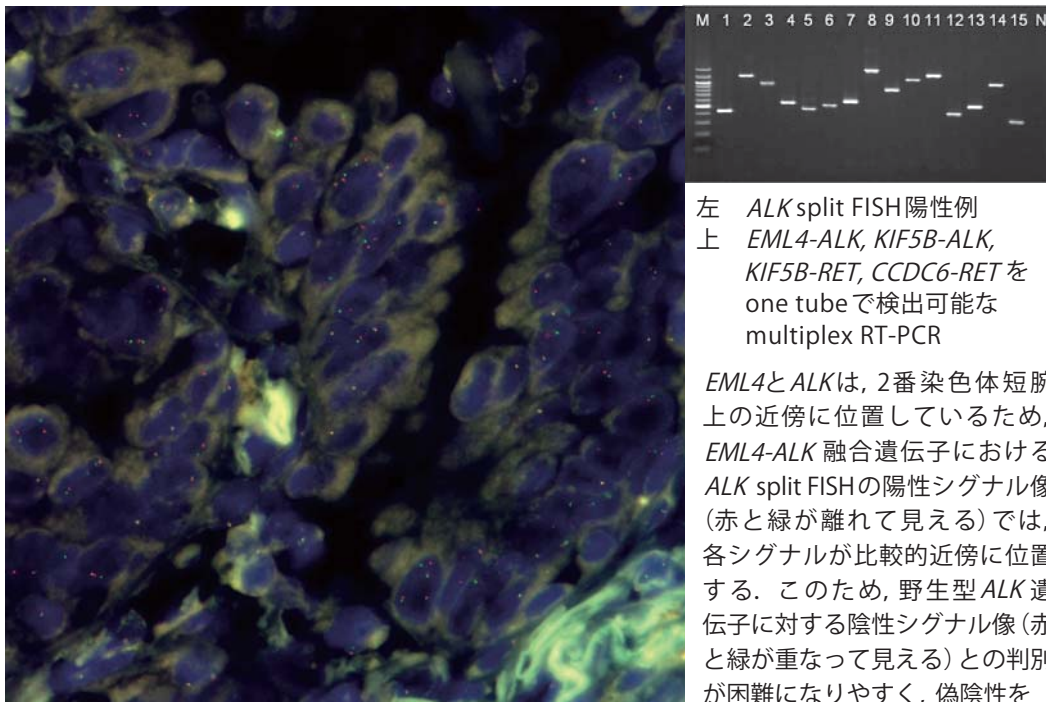
扁平上皮への分化傾向を呈する部で、染色強度が落ちている。このような症例では、サンプリングの仕方や、減弱の程度・面積によりALK iScore 2または1になるかもしれない。いずれにせよ、非定型例としてFISH等でALKの再構成の有無を確認すべきである。



左 大脳

右 大腸 (アウエルバッハ神経叢)

正常神経細胞は全長ALKを発現しているが発現レベルは低い (神経系への分化傾向を呈する小細胞癌や大細胞神経内分泌癌における全長ALK発現も同様の生理的機序と思われる)。したがって、通常の抗ALK免疫染色では検出しがたいがiAEP法であれば検出しうる。すなわち、ALK肺癌が入手できていない施設において、神経細胞は抗ALK iAEP 免疫染色法の陽性コントロールとなり得る。



左 ALK split FISH陽性例
上 *EML4-ALK*, *KIF5B-ALK*,
KIF5B-RET, *CCDC6-RET*を
one tubeで検出可能な
multiplex RT-PCR

*EML4*と*ALK*は、2番染色体短腕上の近傍に位置しているため、*EML4-ALK* 融合遺伝子における*ALK* split FISHの陽性シグナル像 (赤と緑が離れて見える) では、各シグナルが比較的近傍に位置する。このため、野生型*ALK* 遺伝子に対する陰性シグナル像 (赤と緑が重なって見える) との判別が困難になりやすく、偽陰性を

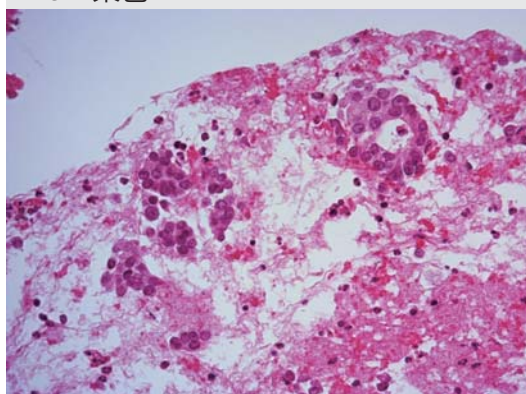
招く可能性がある。また、FISHプローブの設計によっては、陰性シグナル像において各シグナルが若干離れて見える場合もあり、偽陽性を招く可能性がある。左図は、偽陽性となる可能性が軽減するような設計を施したプローブを用いている。

EML4-ALK には、*EML4* 上の切断点の位置によって、多数の融合バリエントがある。したがって、多数の融合バリエントに対応できるプライマー設定にしなければ、それだけ感度が低下する。また、*ALK* の融合パートナーは複数知られているため、それらに対応したプライマー設定をしない限り、その融合パートナーには対応できず感度が低下する。これは *RET* 融合遺伝子においても同様である。上図では、7本のプライマーを用いた1回のmultiplex RT-PCRにより、*EML4-ALK*, *KIF5B-ALK*, *KIF5B-RET*, *CCDC6-RET* におけるあらゆる融合バリエントを検出できることが示されている。

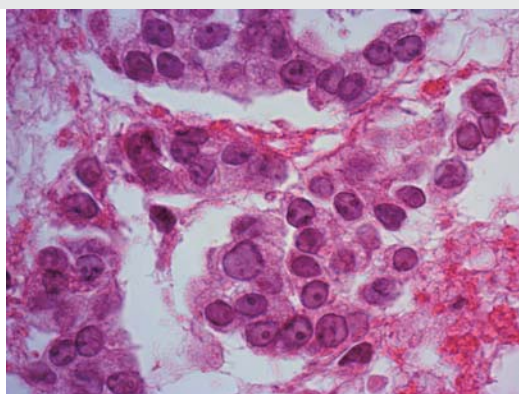
1, *EML4-ALK*, E13;A20 (432 bp). 2, E20;A20 (1185 bp). 3, E6;A20 (913 bp). 4, E14;ins11del49A20 (546 bp). 5, E2;A20 (454 bp). 6, E13;ins69A20 (501 bp). 7, E14;del14A20 (570 bp). 8, *KIF5B-ALK*, K17;A20 (1,483 bp). 9, K24;A20 (814 bp). 10, *KIF5B-RET*, K15;R12 (1,104 bp). 11, K16;R12 (1,293 bp). 12, K22;R12 (420 bp). 13, K23;R12 (525 bp). 14, K24;R11 (999 bp). 15, *CCDC6-RET*, C1;R12 (352 bp). M, マーカー (100-bp ラダー). N, 鋳型無しコントロール⁽¹³⁾より。

■ セルブロック標本 染色例

H&E 染色

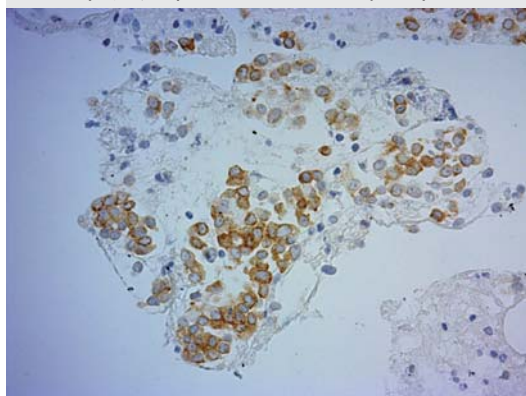


×20

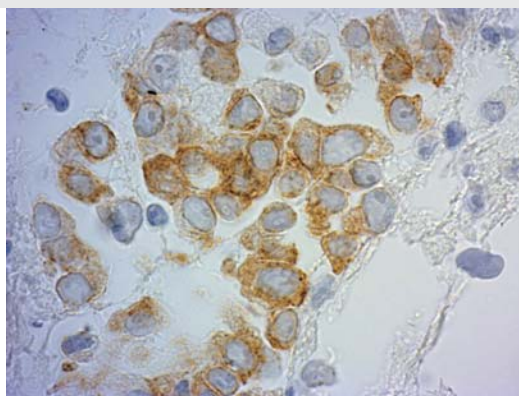


×60

ヒストファイン ALK iAEP® キット



×20



×60

腺癌。ALK split FISH陽性。

EBUS下穿刺吸引細胞診検体を15%ホルマリンで2時間固定し、セルブロック標本を作製した。

謝 辞

本アトラスの作成にあたり、多大なるご協力を頂きました公益財団法人がん研究会がん研究所分子標的病理プロジェクトプロジェクトリーダー 竹内 賢吾先生、一般財団法人大阪府警察協会 大阪警察病院 病理診断科部長 辻本 正彦先生、公益財団法人日本生命済生会付属日生病院 病理診断科 城光寺 龍先生および各施設関係者の皆様にこの場を借りて深謝の意を表します。

ALK iAEP® Kit

■ 参考文献

- (1) Soda M, Choi YL, Enomoto M, et al. Identification of the transforming EML4-ALK fusion gene in non-small-cell lung cancer. *Nature*. 2007 Aug 2;448(7153):561-6.
- (2) Morris SW, Kirstein MN, Valentine MB, et al. Fusion of a kinase gene, ALK, to a nucleolar protein gene, NPM, in non-Hodgkin's lymphoma. *Science*. 1994 Mar 4;263(5151):1281-4.
- (3) Shiota M, Fujimoto J, Semba T, et al. Hyperphosphorylation of a novel 80 kDa protein-tyrosine kinase similar to Ltk in a human Ki-1 lymphoma cell line, AMS3. *Oncogene*. 1994 Jun;9(6):1567-74.
- (4) 竹内 賢吾 1.腫瘍のコンパニオン診断 b. ALK 病理と臨床 [臨時増刊号] 2014 vol.32
- (5) U.S. Food And Drug Administration Approves Pfizer's XALKORI (crizotinib) As First And Only Therapy Specifically For Patients With Locally Advanced Or Metastatic ALK-Positive Non-Small Cell Lung Cancer ファイザー社Press Releases August 26, 2011
- (6) Martelli MP, Sozzi G, Hernandez L, et al. EML4-ALK rearrangement in non-small cell lung cancer and non-tumor lung tissues. *Am J Pathol*. 2009 Feb;174 (2):661-70.
- (7) Takeuchi K, Choi YL, Togashi Y, Soda M, Hatano S, Inamura K, et al. KIF5B-ALK, a novel fusion oncokine identified by an immunohistochemistry -based diagnostic system for ALK-positive lung cancer. *Clin Cancer Res*. 2009 May 1;15(9):3143-9.
- (8) Seto T, Kiura K, Nishio M, Nakagawa K et al. CH5424802 (RO5424802) for patients with ALK-rearranged advanced non-small-cell lung cancer (AF-001JP study): a single-arm, open-label, phase 1-2 study. *Lancet Oncol*. 2013 Jun;14(7):590-8. doi: 10.1016/S1470-2045(13)70142-6. Epub 2013 Apr 30.
- (9) 竹内賢吾.ALK.臨床検査.2013.57.271-6
- (10) 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.,
- (11) Takeuchi K. Interpretation of anti-ALK immunohistochemistry results. *J Thorac Oncol*. 2013;8:e67-68.
- (12) Togashi Y, Soda M, Sakata S, Sugawara E, Hatano S, Asaka R, Nakajima T, Mano H, Takeuchi K. KLC1-ALK: a novel fusion in lung cancer identified using a formalin-fixed paraffin-embedded tissue only. *PLoS One*. 2012;7:e31323.
- (13) Takeuchi K, Soda M, Togashi Y, Suzuki R, Sakata S, Hatano S, Asaka R, Hamanaka W, Ninomiya H, Uehara H, Lim Choi Y, Satoh Y, Okumura S, Nakagawa K, Mano H, Ishikawa Y. RET, ROS1 and ALK fusions in lung cancer. *Nat Med*. 2012;18:378-381.

製造販売元 **株式会社ニチレイバイオサイエンス**

本 社 〒104-8402
東京都中央区築地 6-19-20
TEL. 03(3248)2208 FAX. 03(3248)2243

関西支所 〒530-0043
大阪市北区天満 1-3-21
TEL. 06(6357)2128 FAX. 06(6357)2330

学術問合せ TEL. 03(3248)2208 FAX. 03(3248)2243

ホームページ <http://www.nichirei.co.jp/bio/>