

HER2 KIT MONO ATLAS

乳癌に対する HER2 タンパク過剰発現：免疫組織学的検索

川崎医科大学 病理学2 森谷卓也



HER2 KIT MONO ATLAS

HER2 KIT MONO ATLAS

HER2 KIT MONO ATLAS

HER2 KIT MONO ATLAS

NICHIREI BIOSCIENCES INC.

はじめに

本邦女性における乳癌の罹患者数は増加の一途をたどっており、さらに欧米各国とは事情がやや異なり、死亡者数も依然増加を続けている。死亡者数を減少させるためには、まず検診などによる早期発見・早期治療が重要である。さらに、一旦癌の診断がなされた場合には、患者個別に適切な治療の選択を行うことが求められている。

術後補助療法の実施を行う上で、最近では St. Gallen コンセンサス会議によるリスクカテゴリーが注目されている(本文 1.)。低、中間あるいは高リスクのカテゴリーを選定するためには、年齢、リンパ節転移の有無と転移リンパ節の個数、核異型度または組織学的悪性度、脈管侵襲(リンパ管侵襲)とともにホルモン受容体の有無、HER2 過剰発現の有無を確認する必要がある^{1, 2)}。このうち HER2 は、遺伝子増幅またはタンパク過剰発現が重要な予後不良因子であり、アンストラサイクリン系抗癌剤に対する感受性が高いなどの特徴を有するとともに、HER2 に対する分子標的治療の適応を決定する上でも重要である³⁾。特に、これまでは転移性乳癌に対する分子標的治療が実施されてきたが、平成20年2月に術後の初期治療に対する保険適応が承認されたため、検索の必要性がさらに増したものと思われる。

本稿では、ニチレイバイオサイエンス社の抗血清を用いた免疫組織染色による HER2 タンパク過剰発現有無の検索について、染色法・判定法や注意点を解説するとともに、判定の参考になるアトラスを呈示する。

Contents

1. St. Gallen国際コンセンサス会議の リスクカテゴリーとHER2	2
2. HER2/neu タンパクと分子標的療法	3
3. HER2検査の適応と検出法	4
4. 検体採取に際しての注意事項	4
5. 染色法とそのコツ	5
6. 観察の手順	7
7. 染色強度スコアの判定	9
8. 発色があっても陽性判定とはできない例	12
9. 診断のアルゴリズム	13
10. 免疫組織染色による判定の精度	14
11. おわりに	14

1. St. Gallen 国際コンセンサス会議のリスクカテゴリーと HER2

St. Gallen コンセンサス会議（2007 年）によるリスクカテゴリーは、乳癌手術症例における術後病理診断の結果をふまえて、予後予測をリスクと称し 3 段階（低、中間、高）に分けたものである。具体的には表 1 のごとくで、リンパ節転移の有無と転移陽性リンパ節の個数を基盤に、複数の因子を組み合わせで判定するしくみになっている。HER2 の判定はその中の一つの因子であり、遺伝子の過剰発現・増幅という表現をとっているが、具体的には免疫組織化学法または FISH 法が推奨されている。注釈の中に「精度管理がなされた」免疫組織化学法または FISH 法、と記載されていることも、検索法・判定法が重要である点を強調しているものと考えられ、注目に値する。術後補助療法の選択は表 2 のごとく、ホルモン受容体の検索から内分泌療法に対する反応性を 3 段階に分けて、さらにそれぞれを HER2 の状況によって 2 分し、合計 6 つのパターンに分けている。そして、それぞれの場合における推奨薬剤を呈示している²⁾。

表 1 乳癌手術症例におけるリスクカテゴリーの定義

低リスク	リンパ節転移陰性 および 以下の全てを満たす pT* 2cm 以下 ^a かつ Grade**1 かつ 高度の腫瘍辺縁部脈管侵襲なし ^b かつ ER および / または PgR *** 陽性 ^c かつ HER2/neu 遺伝子の過剰発現・増幅なし ^d かつ 年齢 35 歳以上
中間リスク ^e	リンパ節転移陰性 および 以下の少なくとも一つを満たす pT 2cm を越える または Grade2-3 または 高度の腫瘍辺縁部脈管侵襲あり ^b または ER および PgR 陰性 ^c または HER2/neu 遺伝子の過剰発現か増幅あり ^d または 年齢 35 歳未満 リンパ節転移陽性（転移陽性リンパ節 1-3 個） かつ ER および / または PgR 陽性 ^c かつ HER2/neu 遺伝子の過剰発現・増幅なし ^d
高リスク	リンパ節転移陽性（転移陽性リンパ節 1-3 個） かつ ER および PgR 陰性 ^c または HER2/neu 遺伝子の過剰発現または増幅あり ^d リンパ節転移陽性（転移陽性リンパ節 4 個以上）

* 病理学的腫瘍径（例：浸潤成分の径）

** 組織学的、および / または核異型

*** ER：エストロゲン受容体、PgR：プロゲステロン受容体

^a pT1a と pT1b（pT<1cm） かつリンパ節転移陰性であれば、核異型高度かつ若年であっても低リスクにすべきとの意見もある。

^b 2 ないしそれ以上のブロックに腫瘍塞栓を認めることなどを指し、リスクカテゴリーを上昇させる因子となりうる。その存在はリンパ節転移陰性例では中間リスクになるが、リンパ節転移陽性例のリスクカテゴリーには影響しない。

^c 髄様癌やアポクリン癌などはホルモン受容体発現を認めなくても低リスクととらえられる。

^d HER2/neu 遺伝子の過剰発現あるいは過剰増幅は、精度管理がなされた免疫組織化学法または FISH 法により検出しなければならない。

^e 中間リスクカテゴリーには、リンパ節転移陰性群とリンパ節転移陽性（1-3 個）群の両者が含まれる。

表 2 術後補助療法の選択基準

	強い内分泌反応性 ^a	不完全な内分泌反応性 ^a	内分泌非反応性 ^a
HER2 陰性	内分泌療法 ^b (+化学療法 [*]) ^c	内分泌療法 ^b (+化学療法 [*]) ^c	化学療法
HER2 陽性	内分泌療法 +トラスツズマブ ^{d,e} +化学療法 ^e	内分泌療法 +トラスツズマブ ^{d,e} +化学療法 ^e	+トラスツズマブ ^{d,e} +化学療法

- * リスクカテゴリーによって適応を考慮する。
- ^a 内分泌療法に対する反応性は別途定義されている。
- ^b 内分泌療法は予防、非浸潤性乳管癌にも有効であるため、非常に低リスクの浸潤性乳癌に対しても有効と考えられる。
- ^c 強い、または不完全な内分泌反応性のカテゴリーについては、化学療法の追加はステロイドホルモンレセプターとリスクのレベルにより決定する。
- ^d トラスツズマブは浸潤径 1cm 未満で腋窩リンパ節転移のない症例に対しては、標準治療として考慮すべきではない。このことは、強い内分泌反応性の症例には特によくあてはまり、おそらくは不完全な内分泌反応性のカテゴリーについても事実と考えられる。
- ^e トラスツズマブは、臨床試験の結果をふまえて、現時点では、化学療法と同時併用、化学療法の後、または全ての化学療法が完了した後に投与すべきであるが、パネリストの多くは、将来一部の症例に対しては、化学療法を事前または同時併用せずに投与することが望ましい状況になるであろうと予測している。

2. HER2/neu タンパクと分子標的療法

HER2 とは、ヒト上皮増殖因子受容体 2 型 (human epidermal growth factor receptor type 2) のことである。これは染色体 17q21 に位置する癌遺伝子 (癌原遺伝子) であり、別名として c-erbB-2、あるいはげっ歯類の neu 遺伝子との高い相同性から HER2/neu と呼ばれている。この遺伝子は、チロシンキナーゼ活性を有する増殖因子受容体タンパクをコードしており、乳癌症例の 15 ~ 30% で増幅が認められる。

HER2 遺伝子が過剰に増幅した乳癌細胞では、遺伝子のコピー数が増加した結果、mRNA 転写が亢進し、細胞表面に存在する受容体タンパクが増加する。HER2 タンパクは細胞膜を貫通する受容体型糖タンパクで、細胞外・膜貫通・細胞内の 3 つのドメインを有しており、遺伝子の過剰増幅を認める細胞では、受容体タンパクが増加した結果、細胞外ドメインが放出される。このタンパクは、チロシン残基のリン酸化により活性化し、シグナル伝達系を介する細胞増殖や悪性化に関与することも知られている。癌における過剰発現は、乳癌以外にも肺癌、胃癌、大腸癌、膀胱癌などで生じる。乳癌の場合、その 90% は HER2 遺伝子の過剰増幅に起因しているが、少数例では遺伝子増幅を認めないことから、転写異常、転写後のタンパク合成異常などの機序が推測されている。

HER2 に対するヒト化モノクローナル抗体であるトラスツズマブは、95% がヒト由来、5% がマウス由来の IgG である。HER2 タンパクを抗原として特異的に結合することにより、癌細胞の増殖を抑制する作用を持つ。従って、十分な治療効果を得るためには、HER2 タンパクが過剰発現していることが重要である。過剰発現例に対する単剤での奏効率は 15 ~ 35% 程度だが、タキサン系抗癌薬との併用によって効果が増大することなども明らかにされている ⁴⁾。

3. HER2 検査の適応と検出法

HER2 の検索を行う適応として、米国癌学会（ASCO）によるガイドライン（2000 年）⁵⁾ では、すべての原発性乳癌症例に対して、HER2 過剰発現による免疫染色の判定をすべきであると述べており、その時期は原発巣診断時または再発診断時としている。日本のトラスツズマブ病理部会⁶⁾ では、原発性乳癌診断時を推奨している。すなわち、初発乳癌の原発巣、あるいは状況により、転移巣の生検標本や手術標本におけるホルマリン固定・パラフィン包埋標本が検討対象となる。また、転移性乳癌では、過去に手術された原発巣、または転移巣の標本も対象となりうる。本検査法が導入されてから、ある程度の時間が経過しているため、すでに原発巣を検索済みの症例が多く、再発時からさかのぼって原発巣の検索を行う機会は徐々に減少しているように思われる。

検査は、癌組織中の HER2 タンパク、または癌細胞核内の HER2 遺伝子に対して実施される。タンパク発現の測定には免疫組織染色法、エンザイム・イムノアッセイ（EIA）法、ウエスタンブロット法などが、遺伝子増幅の測定法にはサザンブロットや FISH（蛍光 in situ hybridization）法、CISH（chromogenic in situ hybridization）法⁷⁾、SISH（silver-enhanced in situ hybridization）法などがあるが、最も頻用されているものが免疫組織染色法と FISH 法⁸⁾ で、本邦では両者ともに保険収載されている。血清中の HER2 タンパクを ELISA 法で検出したり、血清・癌組織・分泌物から EIA 法を実施する方法などもある。

現在、体外診断用医薬品として承認されている免疫組織染色用のキットは限られている。その内、ニチレイバイオサイエンス社からは、ヒストファイン HER2 キット（POLY）または（MONO）として販売されている。ヒストファイン HER2 キット（POLY）の構成成分には、細胞内ドメインを認識するポリクローナル抗体が使用され、ヒストファイン HER2 キット（MONO）の構成成分には、細胞外ドメインを認識するモノクローナル抗体（クローン名：SV2-61 γ ）が使用されている。

4. 検体採取に際しての注意事項

通常は、ホルマリン固定・パラフィン包埋標本を用いて免疫組織染色が実施される。凍結切片や細胞診検体、組織抽出液、血清を用いた検査については、標準的な手法ではなく、その意義に関しても十分なコンセンサスは得られていない。

トラスツズマブ病理部会では、検体採取と染色前の準備として、以下に示す 5 項目を推奨条件としている⁶⁾（但し、→ 以下は筆者が附記した内容である）。標準化された正確な検査結果を得るために、これらの事項は極めて重要である。

- 1) 固定液は 10%中性緩衝ホルマリンが最も望ましい。アルコール系の固定液は望ましくない。
- 2) 固定時間は 48 時間以内を推奨する。→ 特に手術標本で検討する際には、癌巣が十分に固定されるよう工夫が必要である。標本に割を入れて固定する方法もあるが、組織が変形を来す可能性があるため、病巣の一部を別途切り出して固定したり、点滴セットや注射器を用いてホルマリンを注入固定すると有効である。固定に不備があると、それ以降の検索が全く無効になりかねないので、特に気を遣うべきである。
- 3) 薄切スライドは未染色状態での保存を避けること。また、薄切後 6 週間以内に染色すること。
- 4) スライドガラスのコーティングはシランによるものを勧める。
- 5) 切片の厚さは 4 μ m を目指すこと。→ 染色後、発色の強さが判定結果に影響を与えることから、標本の厚さを一定に保つことが望ましい。

5. 染色法とそのコツ

ニチレイバイオサイエンス社から発売されているヒストファイン HER2 キット (MONO) には、用手法用と専用の自動免疫組織化学染色機器を用いるヒストステイナー用がある。用手法用は 20 テスト及び 40 テスト、ヒストステイナー用は 40 テストのみ供給されており、双方とも、キットの有効期限は製造後 9 か月である。また、別途コントロールスライドも入手可能である。

具体的な染色手順を表3に示す。ここで重要な点は、染色の手順は、メーカーから推奨された方法を忠実に遵守することである。指定以外の試薬を用いたり、定められた条件から逸脱して染色を行った場合には、結果の保証が困難になる。このことは、他社の抗血清で染色した場合も同様のことが言える。

染色に際しては、常に陽性および陰性のコントロールを置く。別売のコントロールスライドを利用することが最も望ましいが、各施設でコントロール症例を準備することも可能である。



用手法用キット(20 テスト)Code: 427041

ヒストファイン HER2 キット (MONO) キットの構成

製造販売承認番号 21600AMZ00563000

構成試薬	成分	用手法用		ヒストステイナー用
		コード		
		427041	427042	727041
		20テスト	40テスト	40テスト
抗原賦活化液	プロテアーゼ	4mL×1本	4mL×2本	8mL×2本
ブロッキング試薬 I	3V/V% 過酸化水素水	4mL×1本	4mL×2本	8mL×2本
第一抗体	抗ヒト HER2/neu 遺伝子産物モノクローナル抗体 (SV2-61 γ) (動物種: マウス)	2mL×1本	2mL×2本	8mL×1本
陰性コントロール	マウスイムノグロブリン	2mL×1本	2mL×2本	8mL×1本
酵素・第二抗体 標識ポリマー	ペルオキシダーゼ標識抗マウス IgG ポリクローナル抗体 (Fab) (動物種: ヤギ)	4mL×1本	4mL×2本	8mL×2本
発色基質	3,3'-ジアミノベンジジン・4HCl	0.5mL×1本	0.5mL×2本	4mL×1本
基質緩衝液	トリス塩酸緩衝液	0.5mL×1本	0.5mL×2本	4mL×1本
発色試薬	0.6V/V% 過酸化水素水	0.5mL×1本	0.5mL×2本	4mL×1本
PBS (粉末)	リン酸緩衝塩	191g×1本	191g×2本	—*

* ヒストステイナー用キットには、PBS (粉末) が含まれておりません。別売の PBS (ヒストステイナー用) Code:715224 をご使用ください。

ヒストファイン HER2 キット (MONO) コントロールスライド Code:427051

ホルマリン固定パラフィン包埋細胞株 2 種類を貼付したスライド ・陽性コントロール細胞株 SK-BR-3 (HER2/neu タンパク発現量: 3+) / ・陰性コントロール細胞株 HeLa (HER2/neu タンパク発現量: 0) / スライド	5 スライド	1 ケース
--	--------	-------

ヒストステイナーのラインナップ



ヒストステイナー 36A



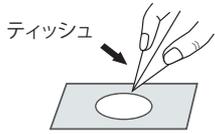
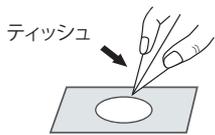
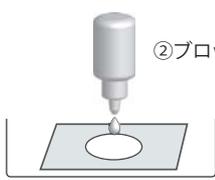
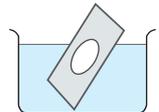
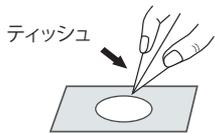
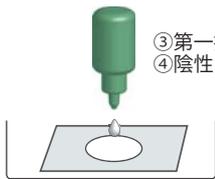
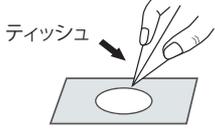
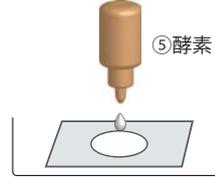
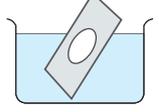
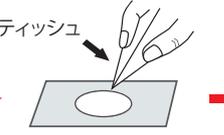
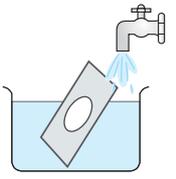
ヒストステイナー 48A



ヒストステイナー 72A

注: 上記写真は本体のみであり、パソコン、プリンタ等は省略しています。

表3 ヒストファインHER2キット(MONO) 用手法用の染色手順

脱パラフィン		
キシレンによる脱パラフィン、エタノールによる親水化の後、PBSで洗浄する。		
抗原賦活化液による処理(プロテアーゼ処理)		
染色結果に大きな影響を及ぼす為、処理の温度、時間等を正確に行う。		
 <p>①抗原賦活化液</p> <p>注)18-25℃に戻してから使用する。</p> <p>ティッシュ</p> <p>切片の周囲の余分な水分を拭き取る。</p>	 <p>切片が完全に覆われるように、①抗原賦活化液を滴下し、湿潤箱中で反応させる。(18-25℃、5分間)</p>	 <p>PBSでよくすすぐ。(常温、3分間、3回)</p>
ブロッキング試薬Ⅰによる処理(3%過酸化水素水による内因性ペルオキシダーゼ処理)		
 <p>ティッシュ</p> <p>切片の周囲の余分な水分を拭き取る。</p>	 <p>②ブロッキング試薬Ⅰ</p> <p>切片が完全に覆われるように、②ブロッキング試薬Ⅰを滴下し、湿潤箱中で反応させる。(常温、5分間)</p>	 <p>PBSでよくすすぐ。(常温、3分間、3回)</p>
第一抗体[抗ヒトHER2/neu遺伝子産物モノクローナル抗体(SV2-61γ)(動物種:マウス)]または陰性コントロール[マウスIgGグロブリン]の添加・反応		
 <p>ティッシュ</p> <p>切片の周囲の余分な水分を拭き取る。</p>	 <p>③第一抗体または④陰性コントロール</p> <p>切片が完全に覆われるように、③第一抗体または④陰性コントロールを滴下し、湿潤箱中で反応させる。(常温、30分間)</p>	 <p>PBSでよくすすぐ。(常温、5分間、3回)</p>
酵素・第二抗体標識ポリマー[ペルオキシダーゼ標識抗マウスポリクローナル抗体(Fab)(動物種:ヤギ)]の添加・反応		
 <p>ティッシュ</p> <p>切片の周囲の余分な水分を拭き取る。</p>	 <p>⑤酵素・第二抗体標識ポリマー</p> <p>切片が完全に覆われるように、⑤酵素・第二抗体標識ポリマーを滴下し、湿潤箱中で反応させる。(常温、30分間)</p>	 <p>PBSでよくすすぐ。(常温、5分間、3回)</p>
基質溶液の調製・添加・反応		
注) 試薬の取り扱いに気をつけ、使い捨て手袋等を用いる。		
 <p>⑥発色基質 ⑦基質緩衝液 ⑧発色試薬</p> <p>調製</p> <p>基質溶液</p> <p>精製水1mLに⑥発色基質1滴と⑦基質緩衝液1滴加えよく混合する。⑧発色試薬1滴を加え再び混合する。(遮光して保存し、30分以内に使用)</p>	 <p>ティッシュ</p> <p>切片の周囲の余分な水分を拭き取る。</p> <p>切片が完全に覆われるように、調製した基質溶液を滴下し、湿潤箱中で反応させる。(常温、10分間)</p>	 <p>流水でよくすすぐ。(常温、5分間)</p>
対比染色		
対比染色試薬(ヘマトキシリン)にスライドを浸した後、流水でよくすすぐ。		
封入		
水洗、脱水、キシレンによる透徹後、非水溶性封入剤で封入する。		

6. 観察の手順

判定は、以下のように一定の手順で行う（トラスツズマブ病理部会による判定方法⁶⁾に準じ、具体的事項をさらに補足したものである）。

1) コントロールの確認

まず最初に、陽性および陰性コントロール標本を観察して、染色の妥当性を評価する。ヒストファイン HER2 キットのコントロールスライドは、培養細胞が用いられており、陽性（SK-BR-3 細胞株、タンパク発現量 3+ 相当）と陰性（HeLa 細胞株、タンパク発現量 0 相当）が含まれている（図 1、2）。注意すべき点として、このスライドで観察するのは、液体中に浮遊した培養細胞であり、陽性強度判定の参考として用いるのは好ましくない。あくまでも染色の妥当性に関する評価のみにとどめるべきである。一方、自前のコントロール症例であれば、強度についても参考には可能と思われる。

2) 陽性所見を示す検体組織スライドを選択し、HER2 タンパク染色像を確認する。

3) HE 染色標本で観察すべき部位を確認する（図 3）。

判定は、浸潤部分の乳癌細胞のみを対象としている。非浸潤癌の癌細胞は検索対象から除外されるため、正しい部位を判定しているのかを確認するために、HE 染色標本を同時にチェックしなければならない。ときに、同一症例内の非浸潤部と浸潤癌巣の染色性が乖離していることがあるので注意する（図 4）。

4) 弱拡大での観察

光学顕微鏡の 4 倍対物レンズを使用して、検体組織内の癌細胞の HER2 タンパク陽性染色像、陽性染色の強度、陽性細胞率（HER2 陽性細胞が 10% 以上か否か）を観察する。次に対物レンズを 10 倍に切り替え、陽性所見が細胞膜か細胞質に局在するかを確認する（図 5）。細胞質のみに陽性所見がみられるものは、陰性と判定する。陽性であったほとんどの検体組織において、対物レンズ 10 倍で細胞膜に局在する陽性像が確認できるが、陽性像が確認できない場合は、さらに対物レンズ 20 倍で検索する。

ここで重要なことは、細胞の詳細を観察する前に、検索部位全体を着実にスクリーニングしておくことである。観察倍率に過度にこだわる必要はない。多くの場合、対物 4 倍ないし 10 倍で、スコア 2+ 以上の陽性像を十分確認可能であるが、陰性と思われた場合には、さらに拡大して確認すべきである。また、同一腫瘍浸潤巣内の染色強度が、部位により異なる症例も存在する（図 6）。後述のように、10% 以上の染色範囲をもって判定を行っているため、それぞれの染色強度の部位が占める割合を把握しなければならない。特に、小範囲が強く染色されている場合には、非浸潤癌成分である可能性も含め、慎重に観察する。染色性に疑問がある場合（例えば標本の一側のみが強く染色されている場合など）には、再検も考慮する。

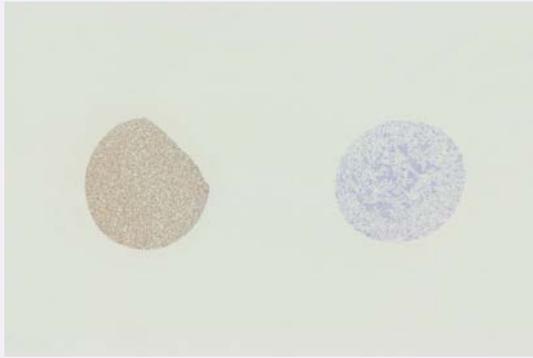


図1 コントロールスライド

左：スコア3+相当 SK-BR-3 細胞株
右：スコア0相当 HeLa 細胞株

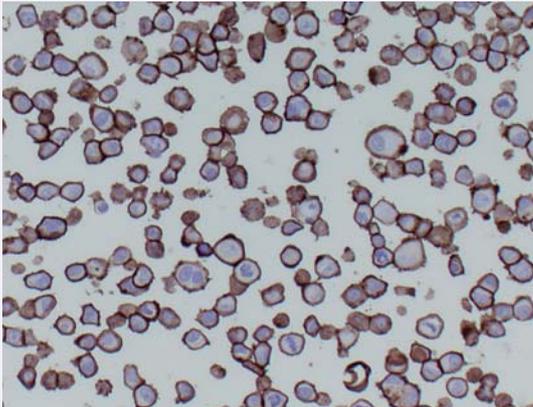
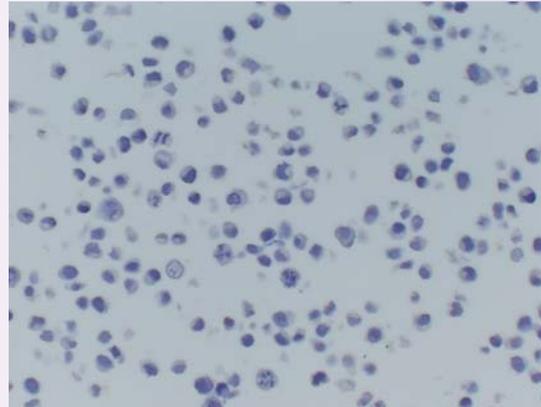


図2 コントロールスライドの観察
a：陽性コントロール



b：陰性コントロール

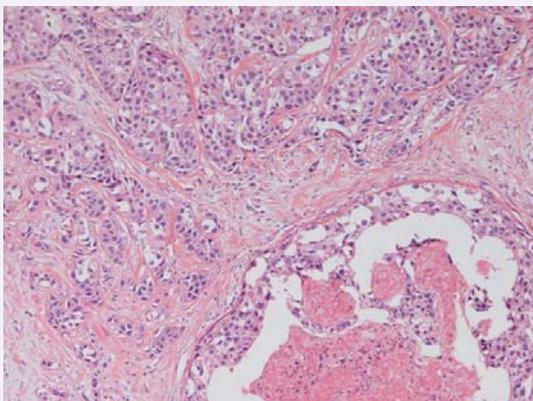


図3 HE染色で、浸潤癌成分の局在を観察する。

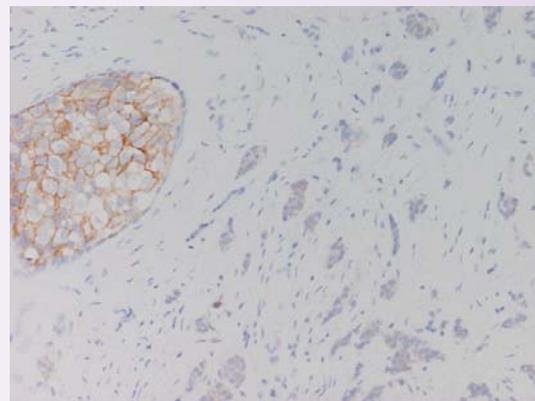


図4 非浸潤癌成分は濃く染色されているが、浸潤部の染色性が弱い例。本症例の判定は陰性（スコア1+）である。

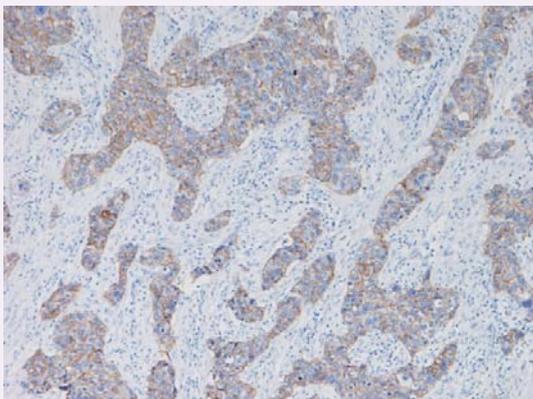


図5 対物10倍での観察。細胞膜が染色されていることを確認可能である。疑わしい場合や明瞭な染色性が得られていない場合には、倍率をあげて確認する。

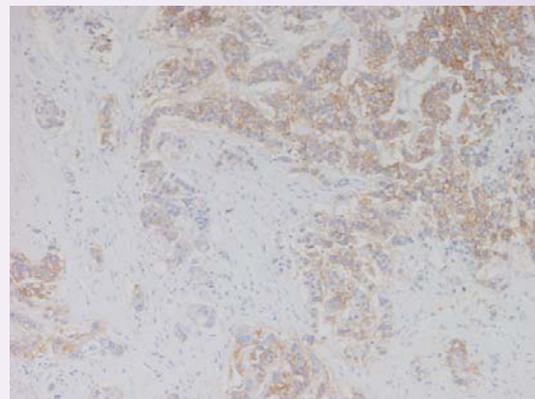


図6 腫瘍内の染色性に不均一性を生じることがある。染色の不備でなければ、浸潤癌成分のうち細胞膜の染色性が、最も強い部位の面積に注目する。

7. 染色強度スコアの判定

HER2 タンパク過剰発現の判定は、浸潤癌巣における、癌細胞の細胞膜における染色性を観察し、その染色強度をスコア化する。細胞膜における反応性に関しては、表 4 のようにスコア 0～スコア 3+ のカテゴリーに分類する。

具体的な染色結果：

ヒストファイン HER2 キット (MONO) を用いた染色結果の例を、スコアごとに図 7～22 に示した (注：判定がわかりやすいように、撮影は対物 40 倍視野で行った)。もちろん、それぞれのスコアは不連続的なものではないので、各スコアの中間的な症例も存在するが、標本全体を観察して慎重に決定する。

選択した染色法、抗血清の種類により、色合いや強度の様子は微妙に異なるので注意すべきである。しかし、今回、用手法用のキットを用いた用手法による染色とヒストステイナー用のキットを用いた自動免疫組織化学染色機器(ヒストステイナー 36A)による染色を比較してみたが、機械の方が若干強く、かつ明るい色調を呈しているようには見えるものの、症例ごとのスコアは同等であった (図 23、24)。

表 4 染色強度スコアの判定基準 (トラスツズマブ病理部会⁶⁾による)

スコア	染色パターン
0	細胞膜に陽性染色なし、あるいは細胞膜の陽性染色がある癌細胞<10% (細胞質に局限する陽性染色は判定対象外)
1+	ほとんどが識別できないほど、かすかな細胞膜の染色がある癌細胞≥10% 癌細胞は細胞膜が部分的に染色されている
2+	弱～中等度の完全な細胞膜の陽性染色がある癌細胞≥10%
3+	強い完全な細胞膜の陽性染色がある癌細胞≥10%

スコア 0 の例 癌細胞に染色性は得られていない。(図 7～図 10)

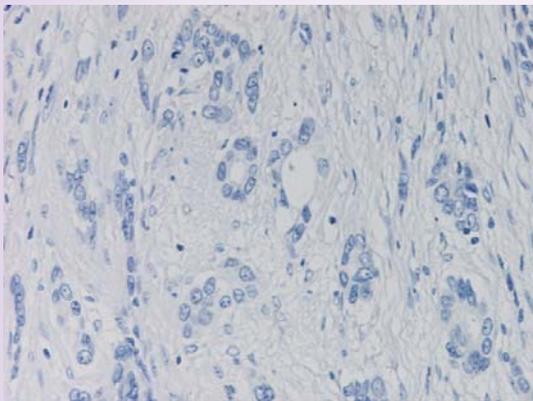


図 7

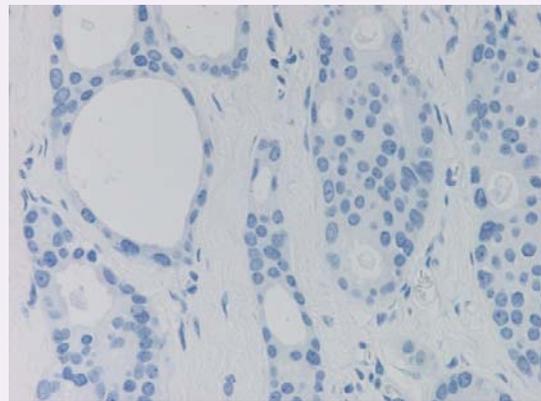


図 8

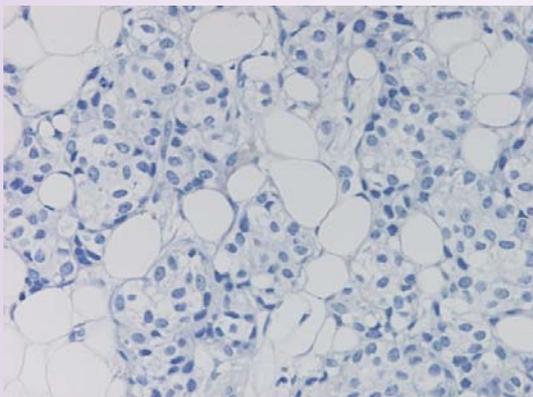


図 9

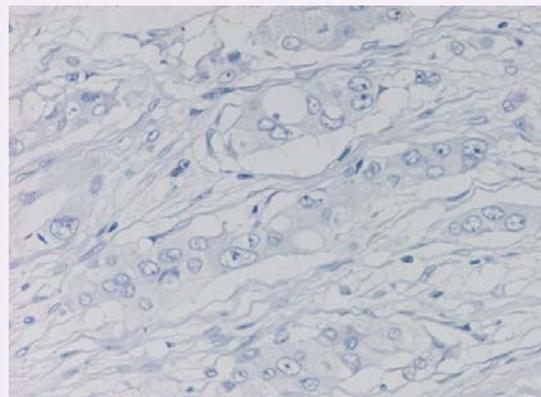


図 10

スコア 1+ の例

細胞膜はかすかな染色性を認める。あるいは細胞膜の染色性は部分的である。(図 11～図 14)

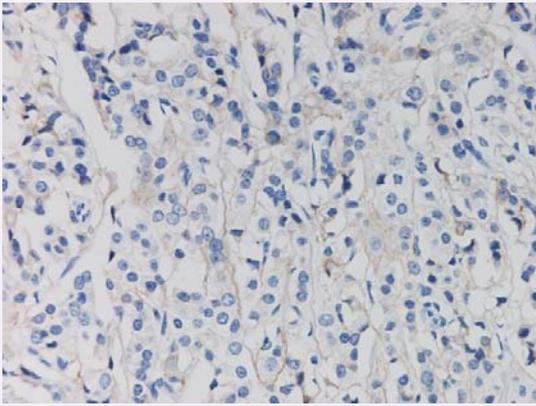


図 11

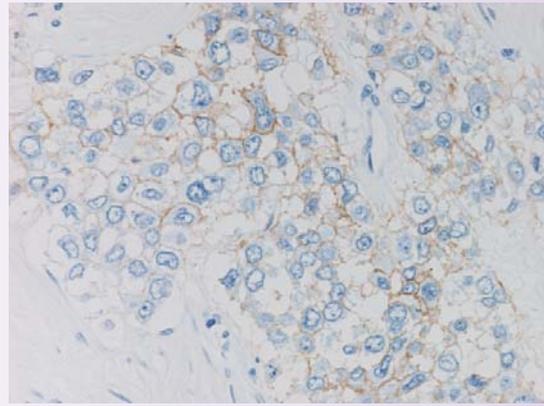


図 12

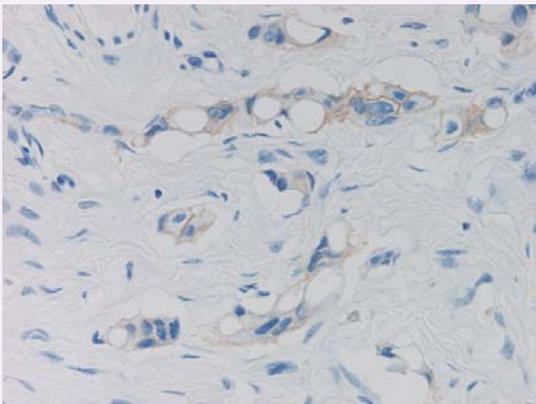


図 13

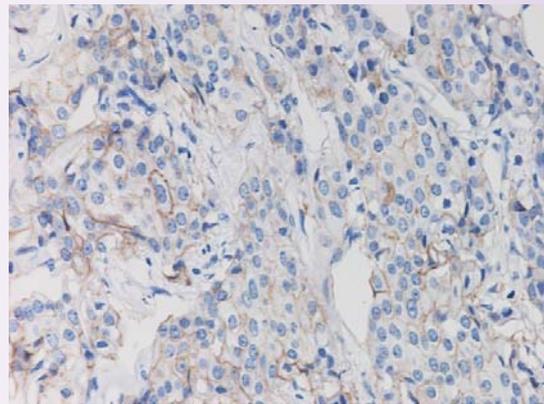


図 14

スコア 2+ の例

細胞膜が完全に染色されるが、その程度は弱～中等度にとどまる。(図 15～図 18)

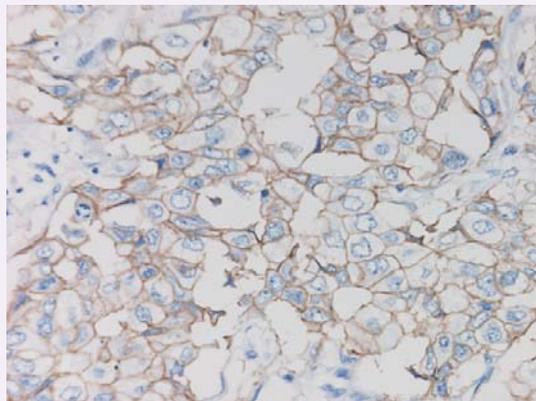


図 15

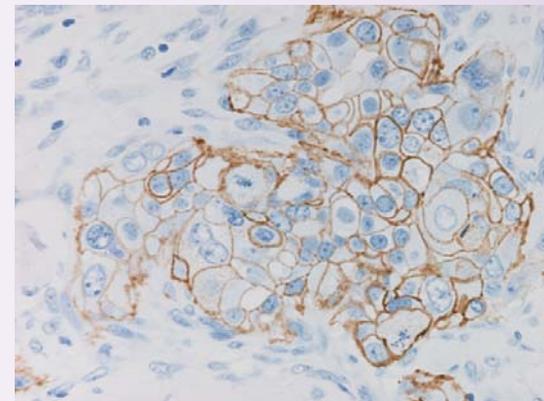


図 16

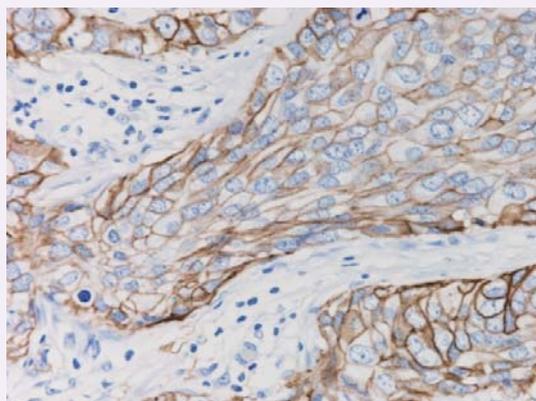


図 17

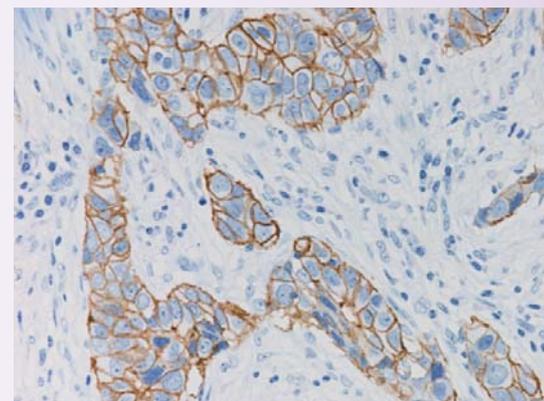


図 18

スコア 3+ の例

細胞を完全に縁取るように、細胞膜が強く染色される。魚を捕る網のような像 (fishnet pattern とも呼称される) を呈する。(図 19～図 22)

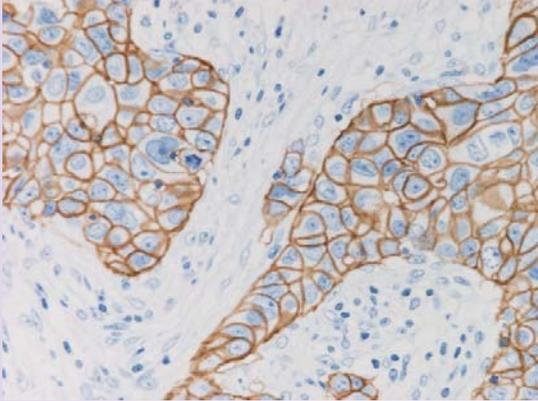


図 19

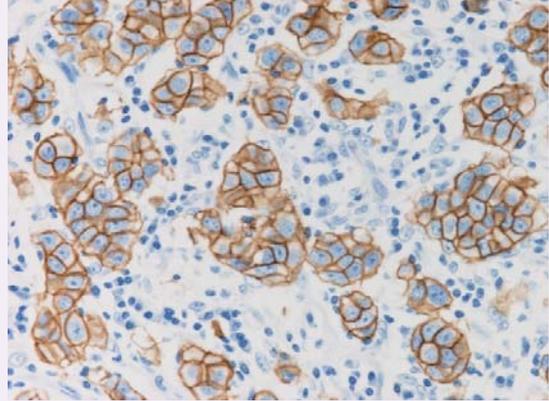


図 20

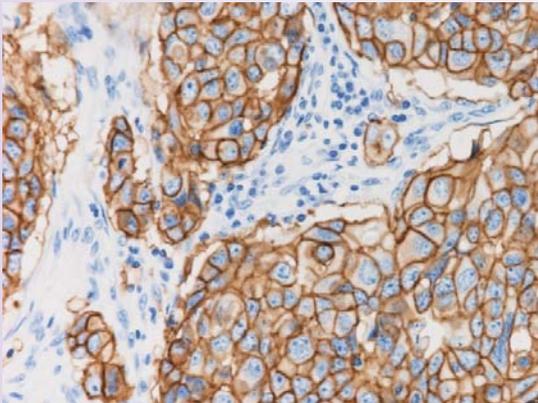


図 21

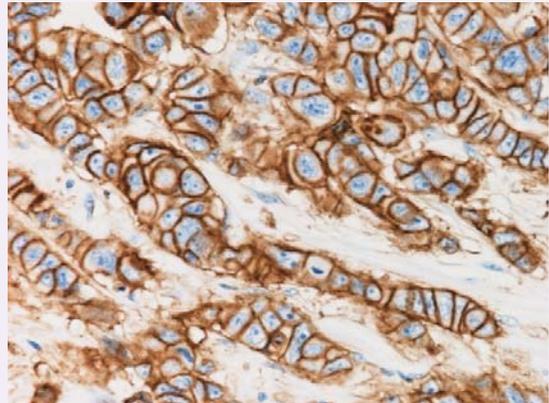


図 22

用手法と自動免疫組織化学染色機器 (ヒストステイナー 36A) による染色の比較

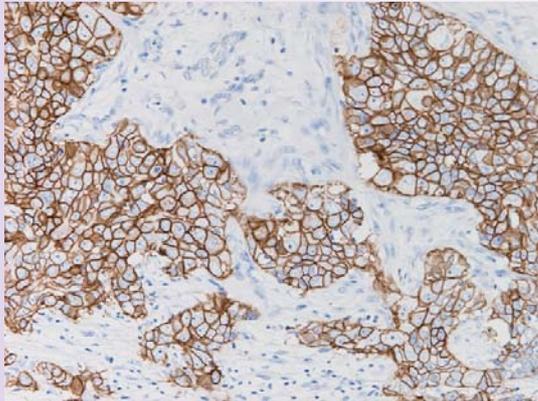


図 23 ヒストファイン HER2 キット (MONO) 用手法を用いた染色の結果 (スコア 3+)。

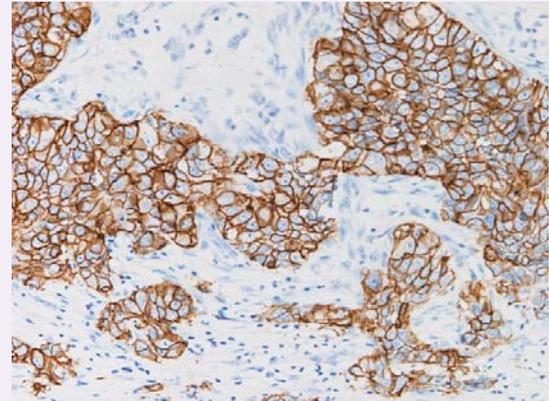


図 24 図 23 の症例について、ヒストステイナー用のキットを用いて、自動免疫組織化学染色機器 (ヒストステイナー 36A) で染色したもの。ほぼ同等の染色性が得られている。

8. 発色があっても陽性判定とはできない例

- (a) 明らかな壊死巣に発色が見られる場合 (図 25、26)。
- (b) 細胞質のみが染色されている場合 (図 27)。
- (c) 組織が崩れており、陽性判定に確信が持てない場合 (図 28)。→ 固定から染色までに至る過程を検証する必要がある。
- (d) 正常あるいは良性の乳管上皮などに、陽性像が得られるように見える場合 (図 29)。→ 染色過程を検証する必要がある。
- (e) 明らかに、標本内の染色性にムラがある場合 (染色までの過程に問題があると思われる場合)。
- (f) 非浸潤癌、および浸潤癌の非浸潤癌成分である場合。→ 原則的に判定対象とはしない(図 4, 30)。

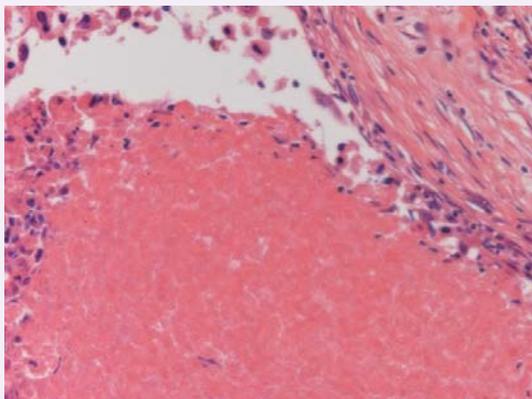


図 25

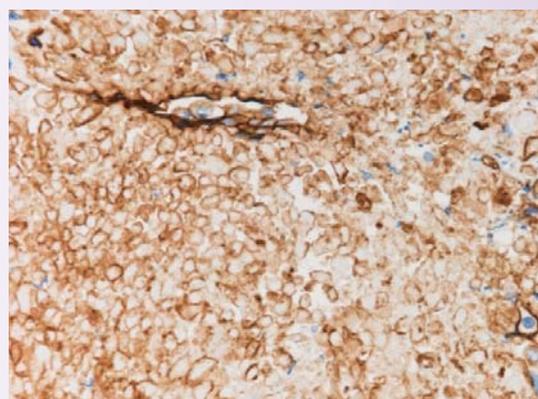


図 26

図 25・図 26：壊死巣 (図 25) に HER2 の発色 (図 26) を認めている。陽性判定はできない。HE 染色標本との対比が必須である。

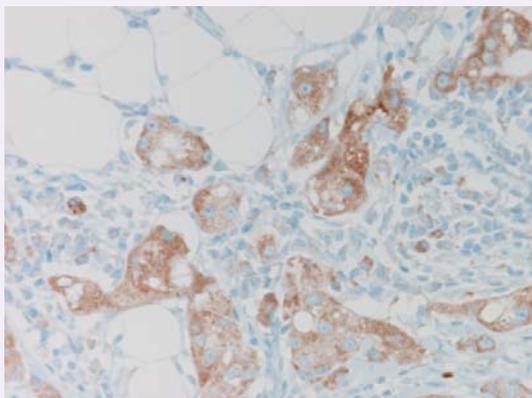


図 27 細胞質に染色性を有し、細胞膜が染まっていない。陽性判定とはしない。

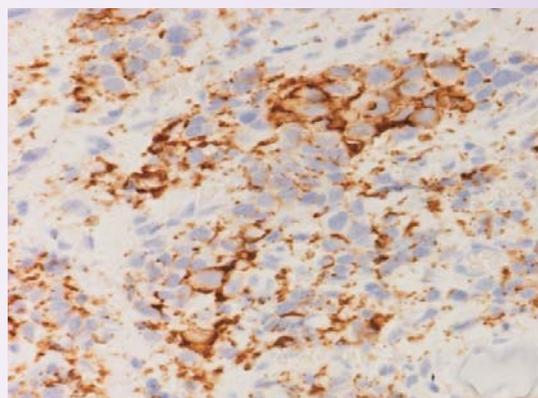


図 28 癌細胞の細胞質・細胞膜に顆粒状陽性像が見られる。標本の作製過程に何らかの問題を有している可能性があり、陽性判定を保証できない例。

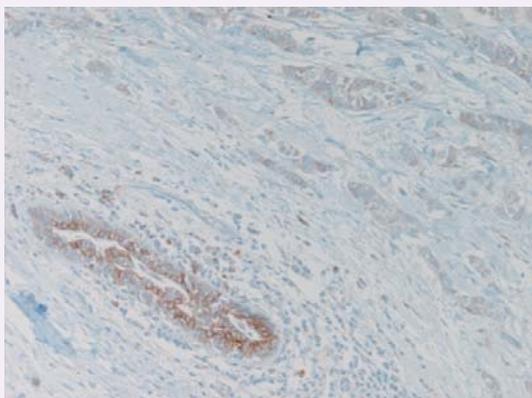


図 29 既存の乳管上皮が陽性に染色されている。癌細胞が陽性であっても、染色過程を検証すべきである。

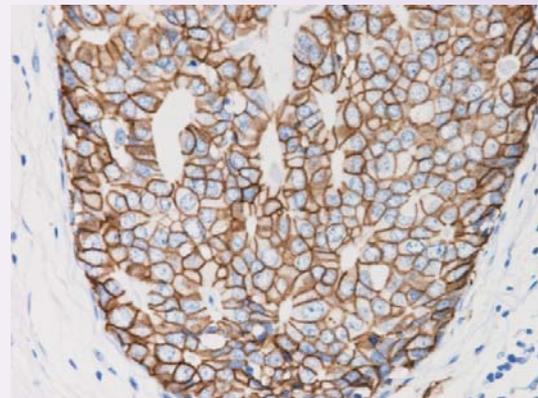


図 30 非浸潤性乳管癌。細胞膜が強陽性を示すが、原則的に判定の対象とはしない。

9. 診断のアルゴリズム

判定後のフローチャートについては、図 31 のように、最初に FISH 法を選択した場合には、免疫組織染色が実施されることはない。一方、免疫組織染色法を実施した場合には、3+ はトラスツズマブの治療適応あり、1+/0 は治療適応なし、と判断し、2+ の場合には、FISH 法を実施して確認することを推奨している。また、FISH 法の実施が不可能な場合には、他の科学的根拠および臨床的因子を考慮し、判断することとしている^{6,9)}。

すなわち、現時点では、浸潤癌病巣の 10% 以上の面積を占める最強度の染色性をもってスコア判定を行っていることから、10% 以上がスコア 3+ の染色性を示すものは、免疫組織染色のみにより、HER2 陽性と判断される。しかし、ASCO/CAP (2007 年) によるガイドラインでは、均質な強い膜染色性が 30% を越える範囲に存在する場合 (3+, >30%) を陽性の判定基準として推奨しており⁸⁾、今後、本邦における判定基準にも変化が現れる可能性がある (図 32)¹⁰⁾ (注:このガイドラインでは、FISH 法における HER2/CEP 比の陽性判定基準にも改変が加えられている)。

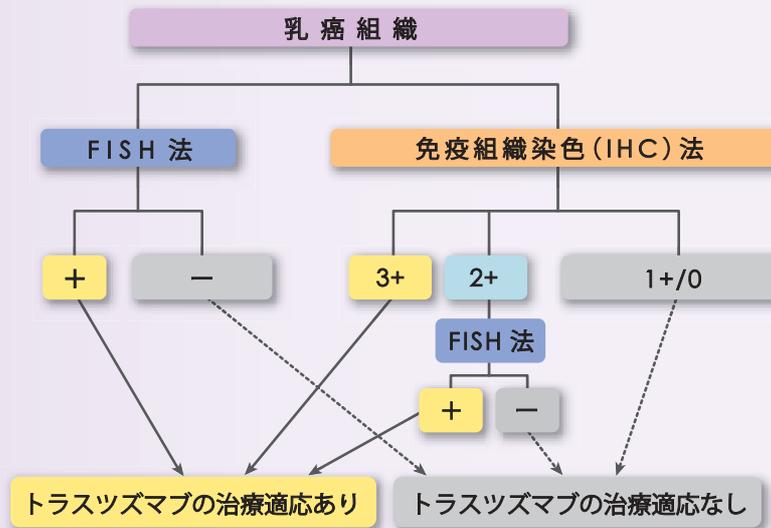


図 31 HER2 検査フローチャート (トラスツズマブ病理部会による: 図案は改編)

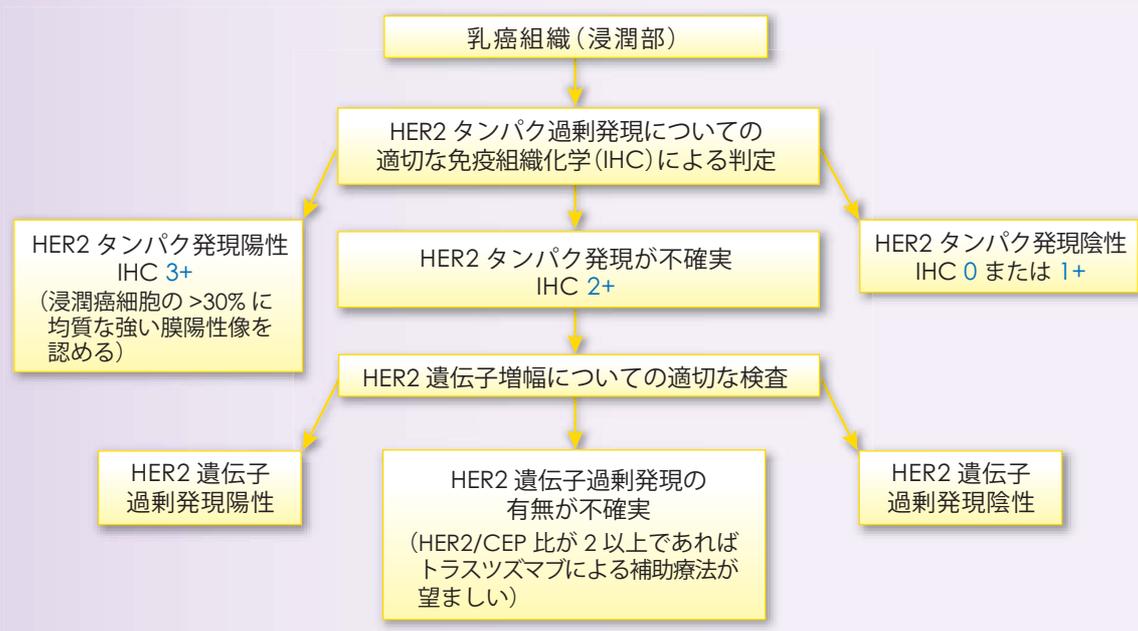


図 32 2007 年 ASCO で改訂された推奨アルゴリズム (注: 本邦では未導入)

10. 免疫組織染色による判定の精度

FISH法の結果との対比に関しては、ヒストファインHER2キット(MONO)とFISH法との対比では、表5のような結果であった¹¹⁾。すなわち、スコア3+の95%がFISH法でも陽性であり、一方、スコア0または1+では、FISH陽性例は極めて少数であった。それらは、他社のHER2抗血清でもほぼ同様に、3+は絶対的なHER2陽性、0/1+はほぼ陰性にとらえても良く、診断アルゴリズムを検証した結果となっていた。一方、スコア2+に関しては、FISH法との整合性が必ずしも良好ではなく、確認が必要であるとされてきたが、検討例は少ないものの、83.3%がFISH陽性となり、同時に行った他社の抗血清と比べても高頻度で、本抗血清による2+の染色結果は、ほぼ陽性であると解釈できる可能性が示唆された。

Kitanoらによる検討でも、SV2-61 γ (ヒストファインHER2キット(MONO))を用いた免疫組織染色でスコア2+となったのは、50例中2例(4.0%)と少なく、われわれの検討結果に類似していた。さらに、スコア2+の2例中1例はFISH陽性、他の1例はFISH陰性であったが、検討症例全体でFISHとの整合性を見ると、感度1.00、特異度0.97、FISHとの相関性0.98、陽性反応的中度0.92、陰性反応的中度1.00で、他の抗血清の結果と比べても極めて高い整合性を示していた(表6)¹²⁾。

また、最近では術前化学療法の治療選択における参考としたり(注:トラスツズマブは術前化学療法の治療薬としては承認されていない)、術前から癌の性質を明らかにする目的で、針生検標本の段階から、ホルモン受容体やHER2に対する検索を行う機会も増加しつつある。このときに得られた判定結果が、腫瘍全体(手術材料における再判定結果)をどの程度反映しているかは、われわれの検討では88%程度(11G針では100%、16G針では86%)¹³⁾、他の文献でも多くが80%~100%の範囲で¹⁴⁾、判定結果の一致率は高い。判定不一致の原因として、腫瘍内の染色性が不均一である場合が挙げられるが、スコア3+症例ではあまり問題はなく、特に2+症例の際に、結果の乖離を生じやすいことが指摘されている¹⁵⁾。

さらに、転移・再発巣におけるHER2過剰発現の程度は、多くの症例で原発巣と一致していることが知られており(表7)¹⁶⁻¹⁸⁾、再発乳癌(化学療法後の症例などを含む)においても、原発巣における検索結果を利用可能と考えられる。

表5 ヒストファインHER2キット(MONO)による染色結果とFISH法によるHER2遺伝子過剰発現との対比

染色スコア	0	1+	2+	3+
症例数	71	8	6	20
FISH陽性(%)	3(4.2)	0(0)	5(83.3)	19(95.0)

注)症例は連続性に選択されたものではないため、染色スコアごとの症例数分布にはバイアスがかかっている。

表6 SV2-61 γ を用いた免疫組織染色の判定とFISH法との整合性

染色結果	FISH法	
	陰性	陽性
陰性 スコア0 スコア1+	38	0
陽性 スコア2+ スコア3+	1	11
統計	感度 1.00 特異度 0.97 FISHとの相関性 0.98	陽性反応的中度 0.92 陰性反応的中度 1.00

表7 原発巣と転移巣におけるHER2免疫組織染色の結果一致率
(ニチレイバイオサイエンス社 c-erbB-2ポリクローナル抗体)

報告者(報告年)	原発巣(陽性症例率)	転移巣(陽性率)	転移巣での陽性化率(%)	転移巣での陰性化率(%)
Shimizuら(2000年)	8/21(38%)	8/21(38%)	0/13(0%)	0/8(0%)
久住ら(2000年)	5/19(26%)	7/31(22%)*	0/23(0%)*	1/8(12.5%)*

*転移巣の数で集計

11. おわりに

以上、乳癌におけるHER2タンパク過剰発現の免疫組織学的検査について、現状と検索や判定における注意点を述べた。今後、治療法のさらなる進歩によって、診断の適応や検査方法、判定方法が、今後とも変化してゆく可能性も十分考えられる。まさに、日進月歩の領域であり、多くの乳がん患者さんにとって、さらに役立つ検査法へと発展してゆくことが望まれる。

参考文献

- 1) Goldhirsch, A, Wood, WC, Gelber, RD, Gelber RD, Coates AS, Thürlimann B, Senn HJ; 10th St. Gallen conference. Progress and promise: highlights of the international expert consensus on the primary therapy of early breast cancer 2007. Ann. Oncol. 2007, 18: 1133-1144.
- 2) 森谷卓也:乳癌手術例のリスクカテゴリー. St. Gallen 2007コンセンサス会議から. 病理と臨床2008, 26: 178-179.
- 3) Smith I, Procter M, Gelber RD, Gelber RD, Guillaume S, Feyereislova A, Dowsett M, Goldhirsch A, Untch M, Mariani G, Baselga J, Kaufmann M, Cameron D, Bell R, Bergh J, Coleman R, Wardley A, Harbeck N, Lopez RI, Mallmann P, Gelmon K, Wilcken N, Wist E, Sánchez Rovira P, Piccart-Gebhart MJ; HERA study team. 2-year follow-up of trastuzumab after adjuvant chemotherapy in HER2-positive breast cancer: a randomised controlled trial. Lancet 2007, 369(9555): 29-36.
- 4) Buzdar AU, Ibrahim NK, Francis D, Booser DJ, Thomas ES, Theriault RL, Pusztai L, Green MC, Arun BK, Giordano SH, Cristofanilli M, Frye DK, Smith TL, Hunt KK, Singletary SE, Sahin AA, Ewer MS, Buchholz TA, Berry D, Hortobagyi GN; Significantly higher pathologic complete remission rate after neoadjuvant therapy with trastuzumab, paclitaxel, and epirubicin chemotherapy: results of a randomized trial in human epidermal growth factor receptor 2-positive operable breast cancer. J Clin Oncol. 2005, 23:3676-85.
- 5) 2000 Recommendation: c-erbB-2 overexpression should be evaluated on every primary breast cancer either at the time of diagnosis or at the time of recurrence. Measures of c-erbB-2 amplification may also be of value.
- 6) トラスツズマブ病理部会:HER2検査ガイド.-ハーセプチンの適正な症例選択のための- 改訂第二版 2003年6月
- 7) Kumamoto H, Sasano H, Taniguchi T, Suzuki T, Moriya T, Ichinohasam R. Chromogenic in situ hybridization analysis of HER-2/neu status in breast carcinoma: application in screening of patients for trastuzumab (Herceptin) therapy. Pathol Int 2001, 51: 579-584.
- 8) Wolff AC, Hammond ME, Schwartz JN, Hagerty KL, Allred DC, Cote RJ, Dowsett M, Fitzgibbons PL, Hanna WM, Langer A, McShane LM, Paik S, Pegram MD, Perez EA, Press MF, Rhodes A, Sturgeon C, Taube SE, Tubbs R, Vance GH, van de Vijver M, Wheeler TM, Hayes DF; American Society of Clinical Oncology; College of American Pathologists. American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer. J Clin Oncol. 2007, 25: 118-145.
- 9) Yaziji H, Goldstein LC, Barry TS, Werling R, Hwang H, Ellis GK, Gralow JR, Livingstone RB, Gown AM. HER-2 testing in breast cancer using parallel tissue-based methods. JAMA 2004, 291:1972-1977.
- 10) Antonio C, Wolff, M, Elizabeth H, Hammond, Jared N, Schwartz, Karen L, Hagerty, D, Craig Allred, Richard J, Cote, Mitchell Dowsett, Patrick L, Fitzgibbons, Wedad M, Hanna, Amy Langer, Lisa M, McShane, Soonmyung Paik, Mark D, Pegram, Edith A, Perez, Michael F, Press, Anthony Rhodes, Catharine Sturgeon, Sheila E, Taube, Raymond Tubbs, Gail H, Vance, Marc van de Vijver, Thomas M, Wheeler, Daniel F, Hayes. American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists Guideline Recommendations for Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 Testing in Breast Cancer. Arch Pathol Lab Med—Vol 131, January 2007, 18-42.
- 11) 森谷卓也, 富士裕美, 高橋弥生, 石田孝宣, 平川 久, 岩間憲行, 木村道夫, 大内憲明, 笹野公伸. HER2過剰発現に対する免疫組織学的検査法. 抗体の種類による特性の検討. 第14回日本乳癌学会学術総会プログラム, 2006, p286.
- 12) Kitano Y, Umemura S, Ohbayashi H, Takenaga M, Osamura RY; Assessment of a new anti-HER2 monoclonal antibody, SV2-61gamma: a best concordance with HER2 FISH. Appl Immunohistochem Mol Morphol. 2007;15:389-93.
- 13) Usami S, Moriya T, Amari M, Suzuki A, Ishida T, Sasano H, Ohuchi N. Reliability of prognostic factors in breast carcinoma determined by core needle biopsy. Jpn J Clin Oncol 2007, 37: 250-255.
- 14) Rakha EA, Ellis IO. An overview of assessment of prognostic and predictive factors in breast cancer needle core biopsy specimens. J Clin Pathol 2007, 60: 1300-1306.
- 15) Chivukula M, Bhargava R, Bryfsky A, Surti U, Dabbs DJ. Clinical importance of HER2 immunohistologic heterogeneous expression in core-needle biopsies vs resection specimens for equivocal (immunohistochemical score 2+) cases. Mod Pathol 2008, 21: 363-368.
- 16) Gong Y, Booser DJ, Sneige N. Comparison of HER-2 status determined by fluorescence in situ hybridization in primary and metastatic breast carcinoma. Cancer 2005, 103: 1763-1769.
- 17) Shimizu C, Fukutomi T, Tsuda H, Akashi-Tanaka S, Watanabe T, Nanasawa T, Sugihara K. c-erbB-2 protein overexpression and p53 immunoreaction in primary and recurrent breast cancer tissues. J Surg Oncol. 2000, 73:17-20.
- 18) 久住綾子, 三浦弘守, 森谷卓也. 乳癌再発転移巣におけるHER2/neu発現についての免疫組織科学的検討. 臨床病理2000, 48補: 159.

HER2 KIT MONO ATLAS

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/>