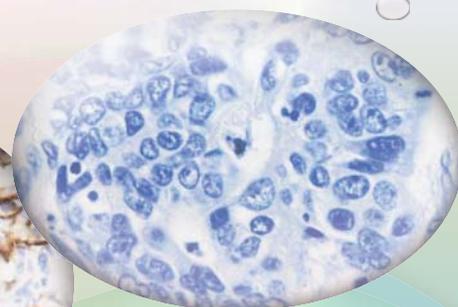
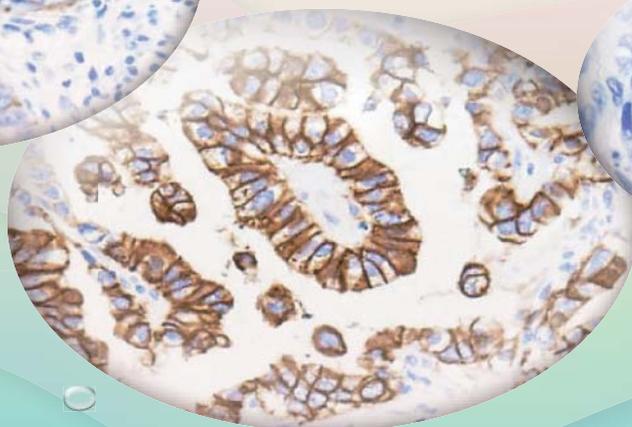
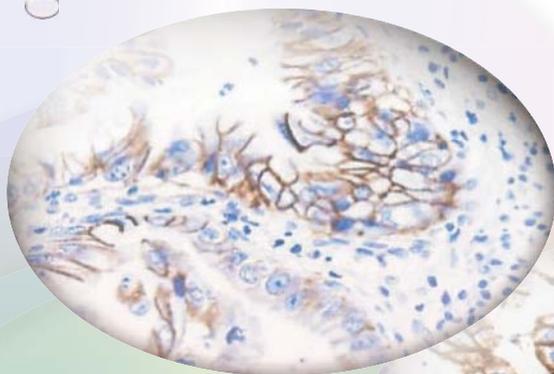


HER2 KIT ATLAS

— 胃癌 —

監修：順天堂大学大学院医学研究科 人体病理病態学 八尾 隆史 先生



はじめに

ヒストファイン HER2 キット (MONO)、ヒストファイン HER2 キット (POLY) は、免疫組織化学染色法を用いて腫瘍細胞中の HER2/*neu* 遺伝子産物 (HER2/*neu* タンパク抗原) を検出し、そのタンパクの過剰発現の有無を判定する HER2 検査試薬である。

HER2 検査および判定は乳癌患者、胃癌患者の治療方針を大きく左右することから、「施設間差なく統一された見解のもとに検査および判定方法が標準化されること。」が強く求められている。予後不良であることが多いと報告されている HER2 過剰発現が認められた乳癌の抗体治療薬ハーセプチンに、治癒切除不能な進行・再発の胃癌への適用拡大が 2011 年 3 月に認められ、適正な対象症例を選択するにあたり、IHC 法、FISH 法の検査結果においては、疾患別に判定基準が示されている。(乳癌トラスツズマブ病理部会より、乳癌 /HER2 検査ガイド。胃癌トラスツズマブ病理部会より、胃癌 /HER2 検査ガイド 胃癌編。)

本稿では、胃癌組織において、HER2 検査を実施していくにあたり、「HER2 検査ガイド 胃癌編」より、免疫組織化学染色法に関わる部分を抜粋し、HER2 検査法として、ヒストファイン HER2 キット (MONO)、ヒストファイン HER2 キット (POLY) を用いた検査結果の染色例、判定例、判定上での注意例などを示した。

Contents

1. 胃癌組織 HER2 検査のフローチャート.....	2
2. 理想的な検体.....	2
3. IHC法判定のフローチャート.....	3
4. 判定手順.....	3
5. IHC 法の判定基準.....	5
6. 胃癌と乳癌における HER2 検査法の比較.....	6
7. HER 2 キット 判定例	7
8. HER 2 キット 注意例.....	13

1. 胃癌組織 HER2 検査のフローチャート

HER2 検査ガイド／胃癌編より（胃癌トラスツズマブ病理部会作成）

ハーセプチン治療対象症例を選択する初回検査として、IHC 法を先行して実施することが推奨される。

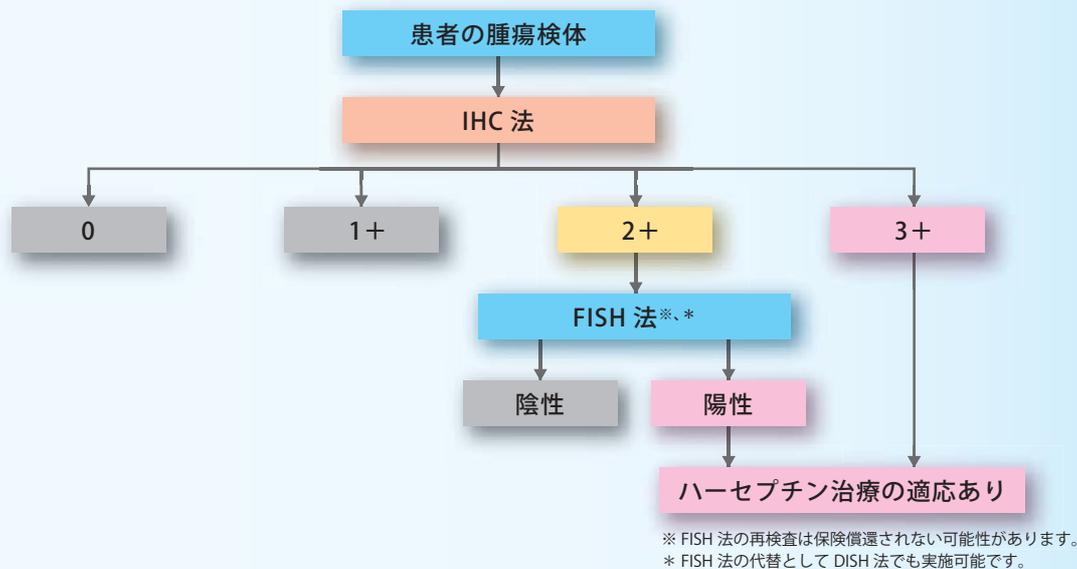
○ IHC 法を先行することを推奨する根拠

- ・ 乳癌に比べ胃癌は腫瘍そのものが不均一である頻度が高い
- ・ 腫瘍内 HER2 発現も不均一性が高い

以上のことにより、HER2 過剰発現をより確実に検出するために、FISH 法に比べ全体像が把握しやすい IHC 法が望ましい。

○ IHC 法を先行する場合

IHC 法で 0,1+,2+,3+ を判定し、IHC 法 2+ と判定された場合、FISH*法で再検査をすることが望ましいと考えられる。IHC 法 3+ および IHC 法 2+ / FISH*陽性（HER2/CEP17 比 \geq 2.0）を投与対象とする。



2. 理想的な検体

HER2 検査ガイド／胃癌編より（胃癌トラスツズマブ病理部会作成）

○ 検討対象となる胃癌組織

胃癌の原発巣または転移巣の組織が検討対象となる（切除標本および生検標本）。

ホルマリン固定パラフィン包埋組織から未染薄切切片を作製し、シランコートスライド（あるいは APS コート）またはニューシランコートスライド（あるいは MAS コート）にのせたもの。

○ 過去の検体

再発胃癌では転移巣の新たな組織採取が困難な場合がある。そのような場合は過去の手術もしくは内視鏡生検による原発巣の組織ブロックが検討対象となる。

また、6 週より長く保管した未染標本は使用せず、新たに薄切を実施し染色に供する。

○ 組織標本の準備と選択

－推奨固定液：10%中性緩衝ホルマリン

－推奨固定時間：切除標本；6 時間以上 48 時間程度

：生検標本；検体の大きさに準ずる

（固定液の浸透は、標準的には 1mm/hr と報告されている）

－薄切後の未染色スライドの放置を避ける（6 週間以内）

組織ブロックの選択は HE 染色を用いて日本病理学会認定病理専門医が行い、組織切片を作製する。切片の厚さは IHC 法ならびに FISH 法ともに 4 μ m が最適である。

FISH 法の際には試薬を有効に使用するために、あらかじめ鏡検にて癌の部分や、可能なら免疫染色で陽性の部分を選び、10mm \times 10mm 程度の面積に組織切片をトリミングしてから行うことも選択肢とする。

過去の種々の条件で作製された標本では FISH 法検査をする場合、その条件によっては必ずしもすべての標本で FISH 法検査が可能であるとは限らないことも理解しておくべきである。

3. IHC 法判定のフローチャート

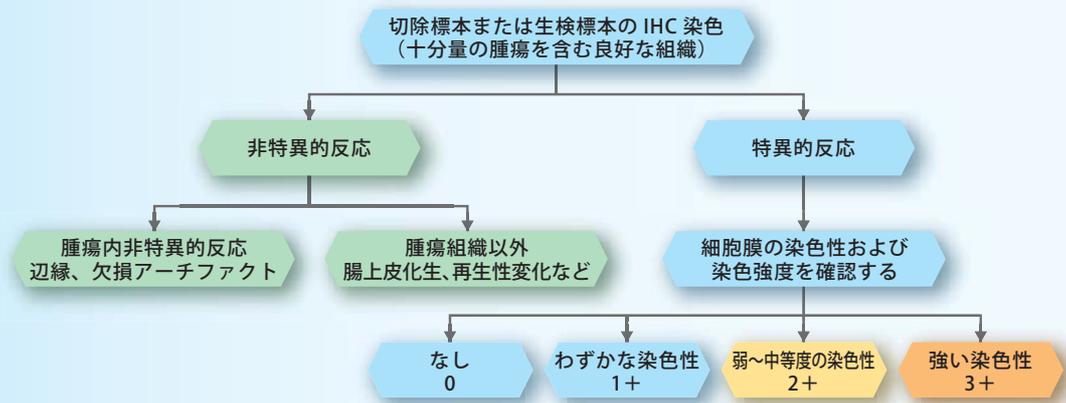
HER2 検査ガイド／胃癌編より（胃癌トラスツズマブ病理部会作成）

IHC 法の判定は、以下のフローチャートに基づき実施する。

<標本観察手順>

■乳癌判定と同様の手順で行う

1. 陽性および陰性コントロールスライドの特異染色性および染色強度を観察し、染色手順および構成試薬の性能を確認する。
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. 光学顕微鏡の 2～4 倍対物レンズを使用して、腫瘍全体における細胞膜の染色を確認する。次に 10 倍～20 倍対物レンズに切り替えて、膜への染色強度を評価する。必要な場合は 40 倍で確認する。



4. 判定手順

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 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（SR 細胞株、タンパク発現量 0 相当）が含まれている。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することは可能と思われる。

2) 陽性所見を示す検体標本スライドを選択し、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。

判定は、腫瘍部分の胃癌細胞のみを対象としている。非腫瘍部位の染色も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、同一症例内の腫瘍部であっても染色性が乖離していることがあるので注意する。

4) 光学顕微鏡の 4 倍対物レンズでの観察

光学顕微鏡の 4 倍対物レンズを使用して、検体標本内の腫瘍細胞の細胞膜の陽性染色像を観察し、陽性細胞率（10% 以上か否か）または陽性クラスターの局在を観察する。なお、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。

<切除標本>

10%未満 →スコア 0
10%以上 →スコア 1+ ～ 3+

<生検標本>

クラスターがない →スコア 0
クラスターが 1 つ以上ある →スコア 1+ ～ 3+

5) 光学顕微鏡の 10 倍対物レンズでの観察

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再度確認し、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。

細胞膜の陽性所見では、完全な側方 (II 字型) あるいは側方・基底膜側の細胞膜 (U 字型)、細胞膜の全周 (O 字型) に局在していることを確認し、染色強度を確認する。

<切除標本>

中程度~かすかな染色強度 →スコア 1+ ~ 2+
強い染色強度 →スコア 3+

<生検標本>

中程度~かすかな染色強度 →スコア 1+ ~ 2+
強い染色強度 →スコア 3+

6) 光学顕微鏡の 20 ~ 40 倍対物レンズでの観察

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。必要な場合は、対物レンズ 40 倍で検索する。

<切除標本>

弱~かすかな染色強度 →スコア 1+
中~弱程度の染色強度 →スコア 2+

<生検標本>

弱~かすかな染色強度 →スコア 1+
中~弱程度の染色強度 →スコア 2+

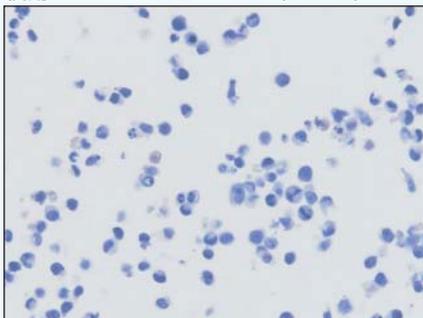
ここで重要なことは、細胞の詳細を観察する前に、検索部位全体を着実にスクリーニングしておくことである。観察倍率に過度にこだわる必要はない。しかし、陰性と思われた場合には、さらに拡大して確認すべきである。後述のように、切除標本では 10% 以上の陽性染色範囲、生検標本では 1 つ以上の陽性クラスターをもって判定を行っているため、それぞれの染色部位を把握しなければならない。特に、切除標本では小範囲が強く染色されている場合には、同一症例の腫瘍内の HER2 発現の不均一性が高いのが、胃癌組織での特徴であるため注意が必要である。また、非腫瘍部位の染色や細胞質への染色、検体作製過程や生物学的要因に起因して起こりうる非特異染色にも注意し、判定を行うことが必要である。

判定 2+ の症例や、判定に苦慮する症例は、FISH 法 /DISH 法にて遺伝子増幅の確認をすることを推奨する。

○ HER2 コントロールスライド 染色例

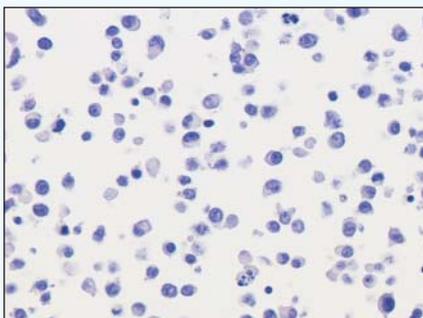
■ 陰性コントロール細胞株 /SR

使用キット：HER2 キット (MONO)



プロテアーゼ処理 (+)

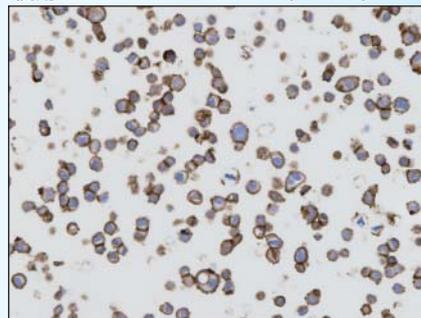
使用キット：HER2 キット (POLY)



* 温浴処理 (+)
全ての細胞に陽性反応を示さない。

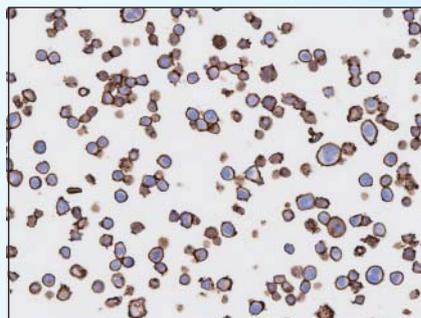
■ 陽性コントロール細胞株 /SK-BR-3

使用キット：HER2 キット (MONO)



プロテアーゼ処理 (+)

使用キット：HER2 キット (POLY)



* 温浴処理 (+)
大部分の細胞の細胞膜に強い陽性反応を示す。

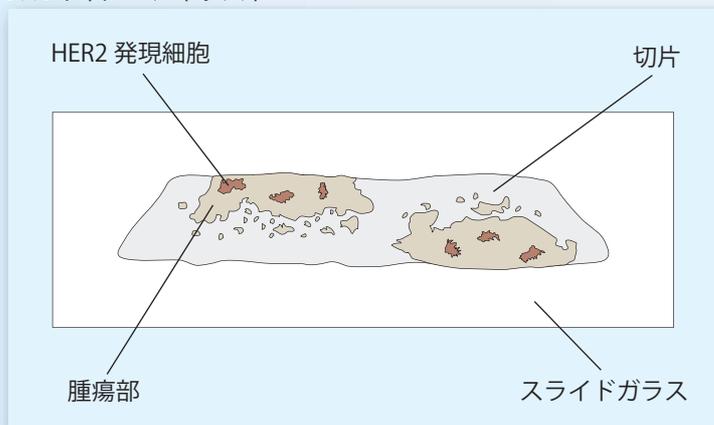
*: 95-99°C 40 分間

5. IHC 法の判定基準

HER2 検査ガイド／胃癌編より（胃癌トラスツマブ病理部会作成）

胃癌における判定方法は乳癌の場合と同様、細胞質における反応は判定の対象外とし、細胞膜における染色性およびその染色強度によって判定する。手術標本の判定においては 10% のカットオフ値（腫瘍細胞の 10%以上が陽性）が適用されている。一方、内視鏡生検標本の判定には切除標本とは異なり染色割合のカットオフ値を設定せず、5 個以上の癌細胞のクラスターが確認できれば陽性とする。

10%のイメージイラスト



手術材料において腫瘍部（淡褐色部）の約 10%（茶色部）に免疫染色陽性反応が認められるイメージ。実際には散在性のもの、focal なものがある。

染色強度スコア	切除標本の染色パターン	生検標本の染色パターン	HER2 過剰発現判定
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が一切片に 10%未満である	陽性染色なし、あるいは細胞膜の陽性染色がある癌細胞なし	陰性
1+	弱／ほとんど識別できないほどかすかな細胞膜の染色がある癌細胞が一切片に 10%以上認められる 癌細胞は細胞膜のみが部分的に染色されている	癌細胞の染色割合に関係なく、弱／ほとんど識別できないほどかすかな細胞膜の陽性染色がある癌細胞クラスター（集塊）* が 1 つ以上あり	陰性
2+	弱～中程度の完全な側方あるいは側方・基底膜側の細胞膜の陽性染色がある癌細胞が一切片に 10%以上認められる	癌細胞の染色割合に関係なく、弱～中程度の完全な側方あるいは側方・基底膜側の細胞膜の陽性染色がある癌細胞クラスター（集塊）* が 1 つ以上あり	境界域 (Equivocal)
3+	強い完全な側方あるいは側方・基底膜側の細胞膜の陽性染色がある癌細胞が一切片に 10%以上認められる 全周性に認められない場合もある	癌細胞の染色割合に関係なく、強い完全な側方あるいは側方・基底膜側の細胞膜の陽性染色がある癌細胞クラスター（集塊）* が 1 つ以上あり	陽性

* 5 個以上の癌細胞の集塊と定義される

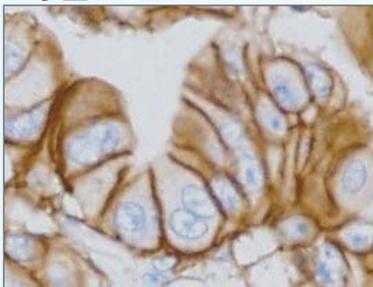
○ 胃癌組織 IHC 法の染色パターン

II 字型



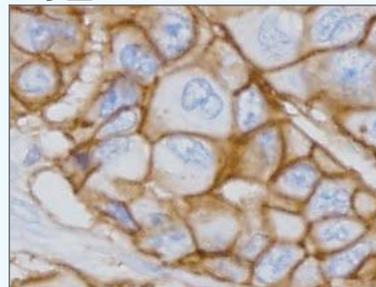
腫瘍細胞の側方に陽性染色がみられる

U 字型



腫瘍細胞の側方・基底膜側に陽性染色がみられる

O 字型



腫瘍細胞の細胞膜に完全な（全周）陽性染色がみられる

6. 胃癌と乳癌における HER2 検査法の比較

HER2 検査ガイド/胃癌編より（胃癌トラスツマブ病理部会作成）

胃癌と乳癌では、標本作製に関わるプロセス、染色方法、検査試薬については同様であり、判定方法も概ね乳癌で用いる基準と同様であるが、以下の3点の違いに注意すべきである。

1. 過剰発現している HER2 タンパクの局在が乳癌では細胞膜全周性であるが、胃癌では癌細胞の側方あるいは側方と基底側の細胞膜にみられ、内腔側には見られない。
2. 乳癌での判定は 2007 年 ASCO/CAP（米国臨床腫瘍学会 American Society of Clinical Oncology/ 米国病理医会 College of American Pathologists）ガイドラインに従って行うが、胃癌では 2007 年ガイドライン導入前の乳癌の判定基準で判定している。
3. 乳癌のコア針生体標本は手術標本と同一の基準で判定するが、胃癌の内視鏡生検標本では独自の基準で判定している。

○ 胃癌と乳癌における HER2 検査法の比較

項目	胃癌	乳癌
標本作成に関わるプロセス	胃癌と乳癌で共通	
至適固定液	10%中性緩衝ホルマリンを用いる	
推奨固定時間	切除標本：6時間以上 48時間程度 生検標本：検体の大きさに準じる (固定液の浸透は、標準的には 1mm/hr と報告されている)	6時間以上 48時間程度
染色方法・検査試薬	胃癌と乳癌で共通	
スコアリングの方法	胃癌と乳癌で共通 腫瘍細胞膜の染色強度に基づく、0～3+のスコアリングは基本的に胃癌と乳癌で共通	
HER2 発現様式		
腫瘍内の均一性	同一症例の腫瘍内 HER2 発現の不均一性が高い	腫瘍内で HER2 発現が認められる場合、その均一性は 80%以上
腫瘍細胞における発現状況	腫瘍細胞の側方あるいは側方・基底膜側の細胞膜に HER2 が発現していることが多い (U シェイプ)	細胞膜に全周性に発現
HER2 検査フローチャート	① IHC 法 切除標本：陽性染色がある癌細胞が全体の 10% 以上 生検標本：陽性染色がある癌細胞クラスター（集塊）*1 個以上 ② FISH 法：HER2/CEP17 \geq 2.0 で陽性 ③ IHC 法を先行して実施することを推奨している	① IHC 法：陽性染色がある癌細胞が全体の 30% 以上 ② FISH 法：HER2/CEP17 \geq 2.2 で陽性 (1.8～2.2 では境界域として再検査) ③ IHC 法を先行させても、FISH 法を先行させてもよい

* 5 個以上の癌細胞の集塊と定義される

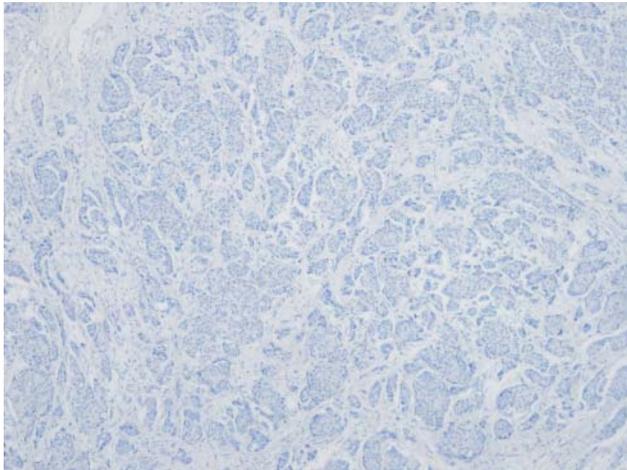
7. HER2 キット 判定例

ヒストファイン HER2 キット (MONO) 染色例

スコア 0

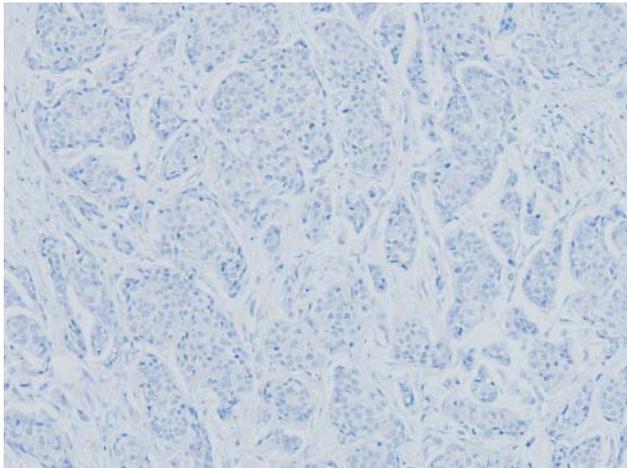
症例 1

対物レンズ：×4



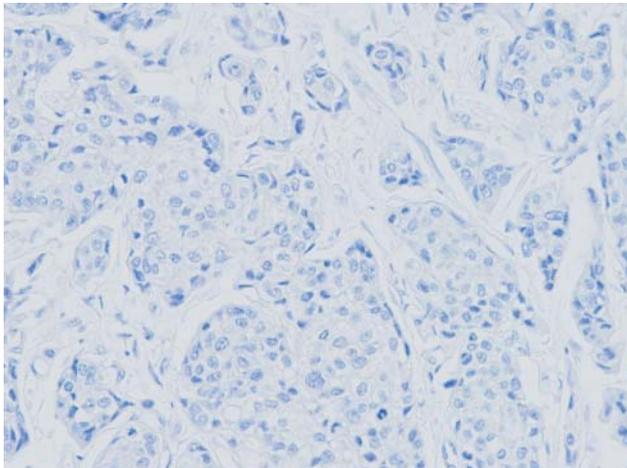
腫瘍細胞の中で陽性細胞はみられない。

対物レンズ：×10



腫瘍細胞の中で陽性細胞はみられない。

対物レンズ：×20



腫瘍細胞の中で陽性細胞はみられない。

スコア 1+

症例 2

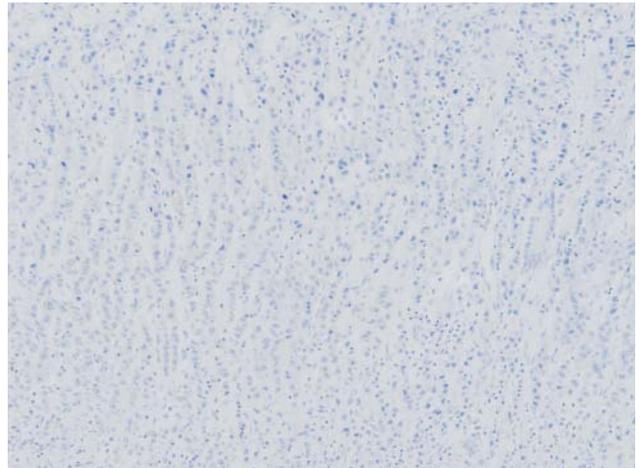
(FISH 0.9)

対物レンズ：×4



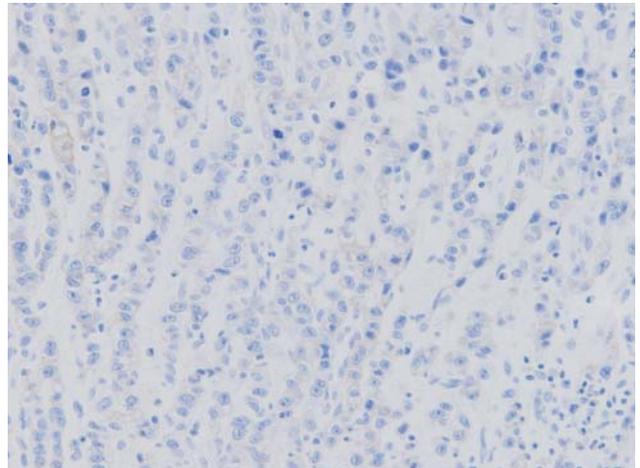
腫瘍細胞の中で明らかな陽性細胞はみられないがわずかに染色がみられる。

対物レンズ：×10



腫瘍細胞の一部の細胞の細胞膜にわずかな陽性染色が疑われる。

対物レンズ：×20



腫瘍細胞の一部の細胞に細胞膜へのわずかな染色がみられる。

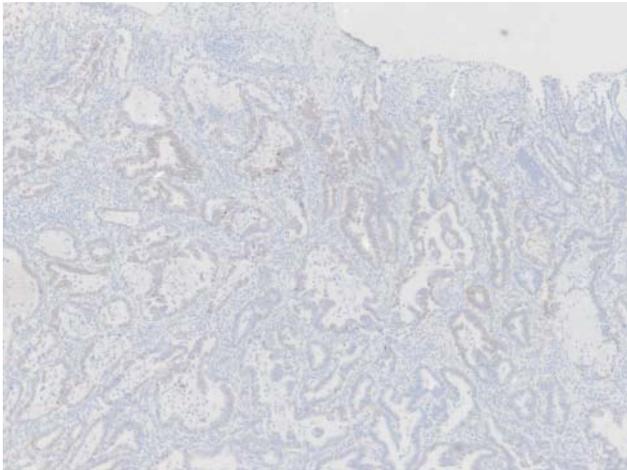
ヒストファイン HER2 キット (MONO) 染色例

スコア 2+

症例 3

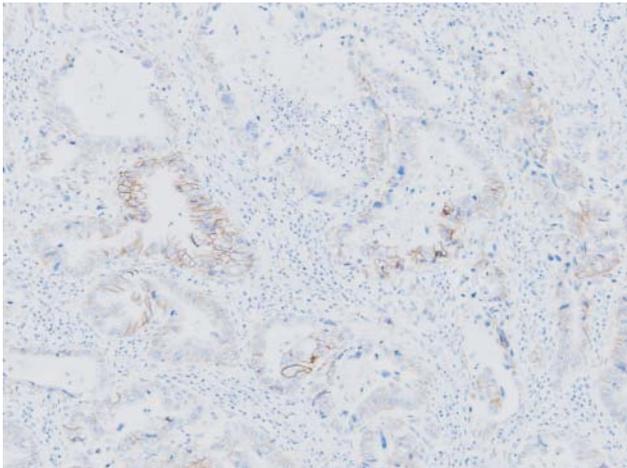
(FISH 2.3)

対物レンズ：×4



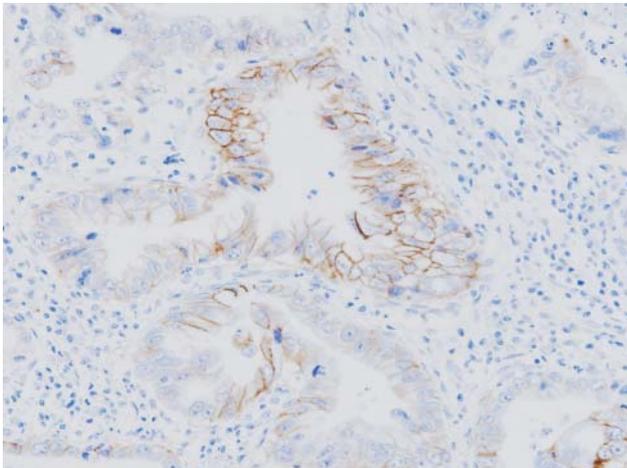
腫瘍細胞の中で陽性細胞がみられる。ただし、細胞膜への陽性像はあきらかではない。

対物レンズ：×10



腫瘍細胞の細胞膜に陽性染色がみられる。

対物レンズ：×20

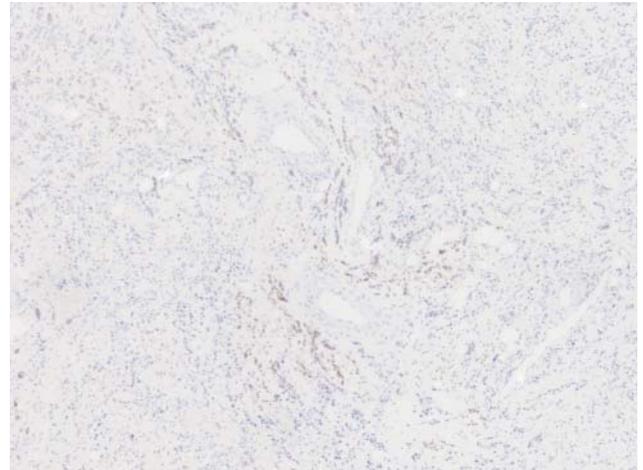


腫瘍細胞の細胞膜の側方・基底膜側にあきらかな陽性染色がみられる。

症例 4

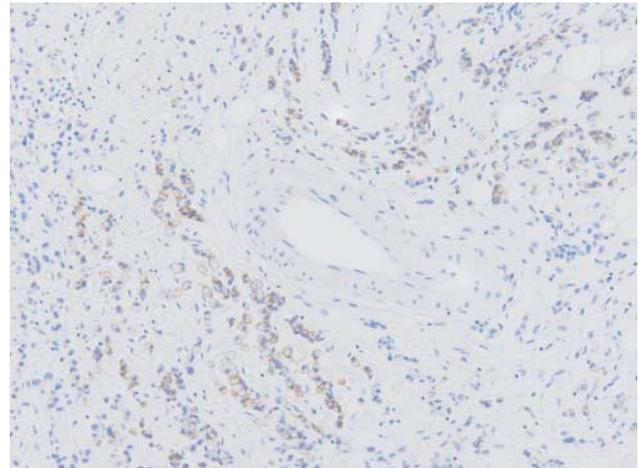
(FISH 1.5)

対物レンズ：×4



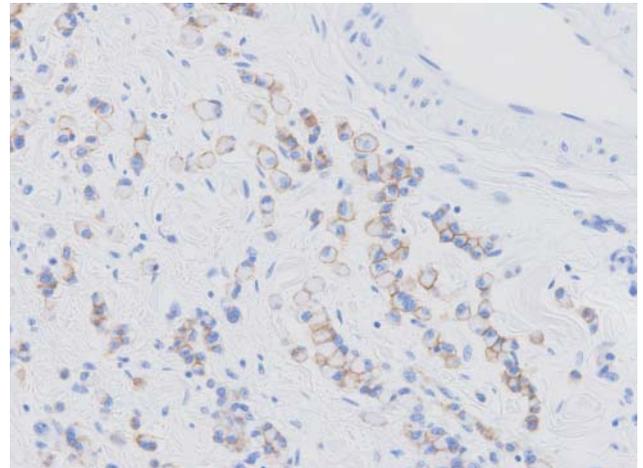
腫瘍細胞の中で陽性細胞がみられる。ただし、細胞膜への陽性像はあきらかではない。

対物レンズ：×10



腫瘍細胞の細胞膜に陽性染色がみられる。

対物レンズ：×20



腫瘍細胞の細胞膜の全周性にあきらかな陽性染色がみられる。

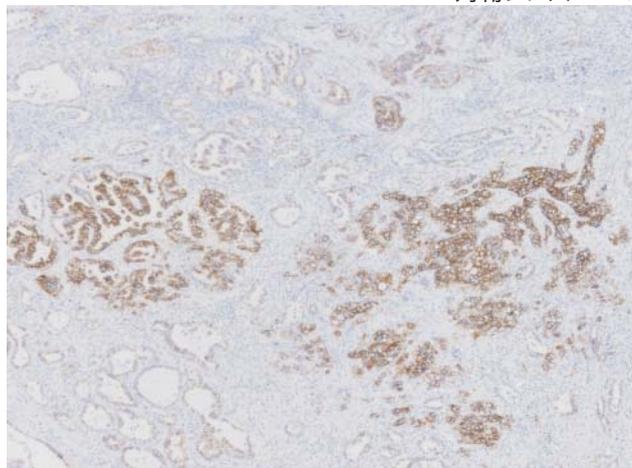
ヒストファイン HER2 キット (MONO) 染色例

スコア 3+

症例 5

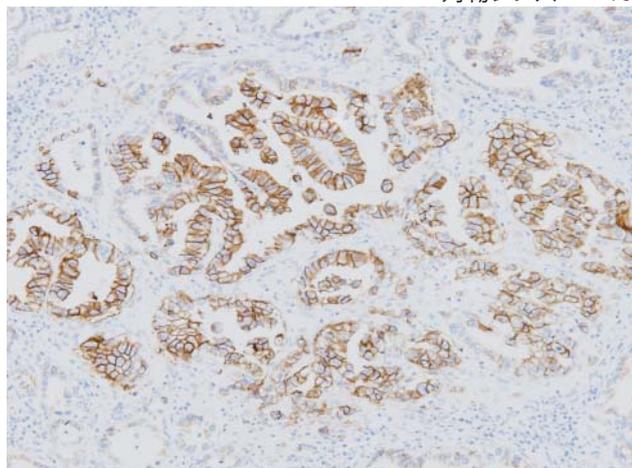
(FISH 2.5)

対物レンズ：×4



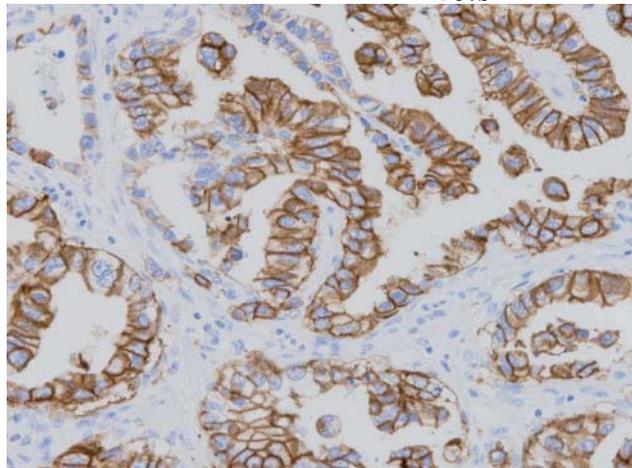
腫瘍細胞の多くの細胞に陽性染色がみられる。

対物レンズ：×10



腫瘍細胞の多くの細胞の細胞膜の側方・基底膜側にあきらかな陽性染色がみられる。

対物レンズ：×20

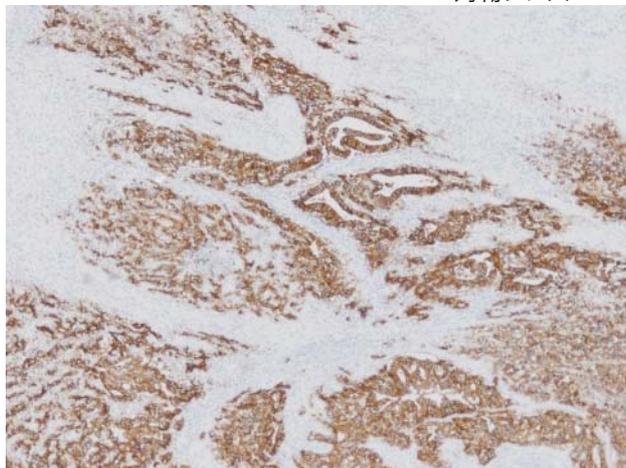


腫瘍細胞の多くの細胞の細胞膜の側方・基底膜側にあきらかな陽性染色がみられる。

症例 6

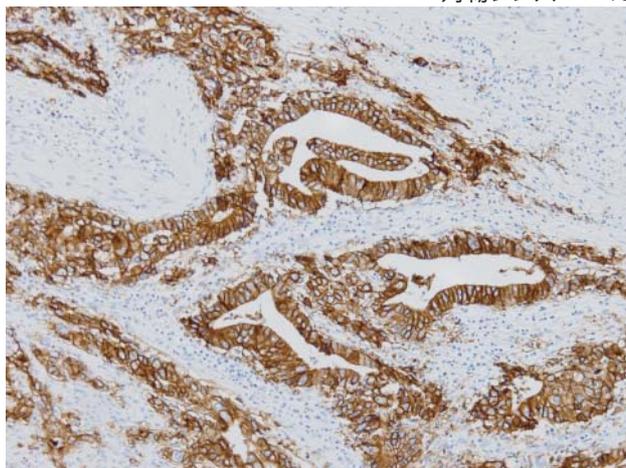
(FISH 3.7)

対物レンズ：×4



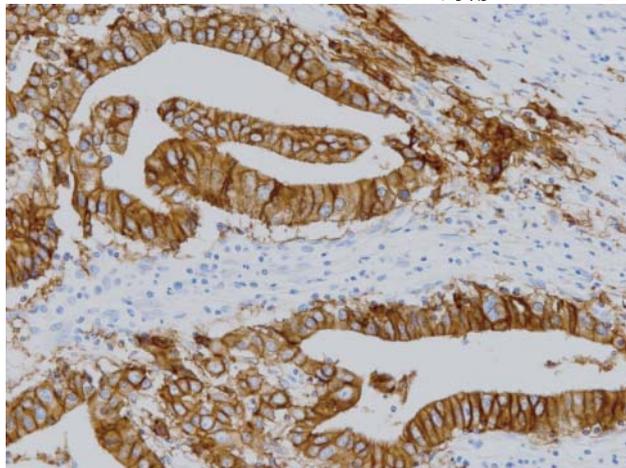
腫瘍細胞の多くの細胞に陽性染色がみられる。

対物レンズ：×10



腫瘍細胞の多くの細胞の細胞膜の側方・基底膜側、全周性にあきらかな陽性染色がみられる。

対物レンズ：×20



腫瘍細胞の多くの細胞の細胞膜の側方・基底膜側、全周性にあきらかな陽性染色がみられる。

ヒストファイブ HER2 キット (POLY) 染色例

スコア 0

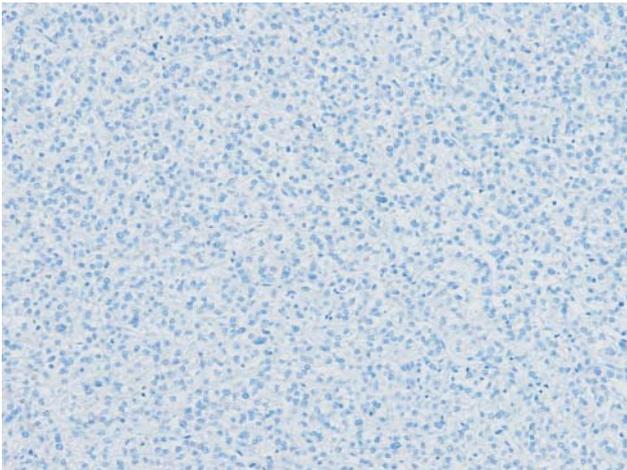
症例 1

対物レンズ：×4



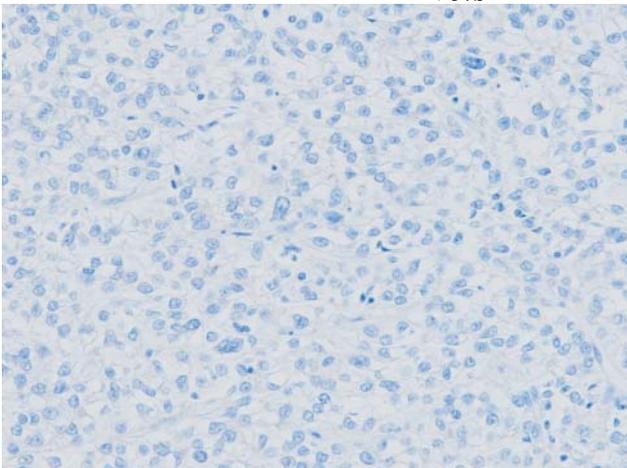
腫瘍細胞の中で陽性細胞はみられない。

対物レンズ：×10



腫瘍細胞の中で陽性細胞はみられない。

対物レンズ：×20



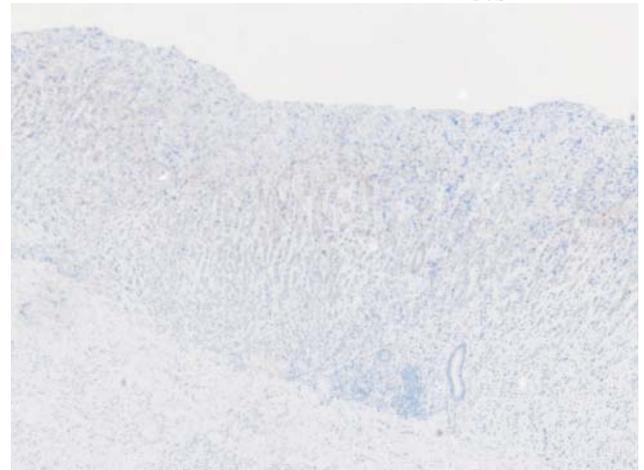
腫瘍細胞の中で陽性細胞はみられない。

スコア 1+

症例 2

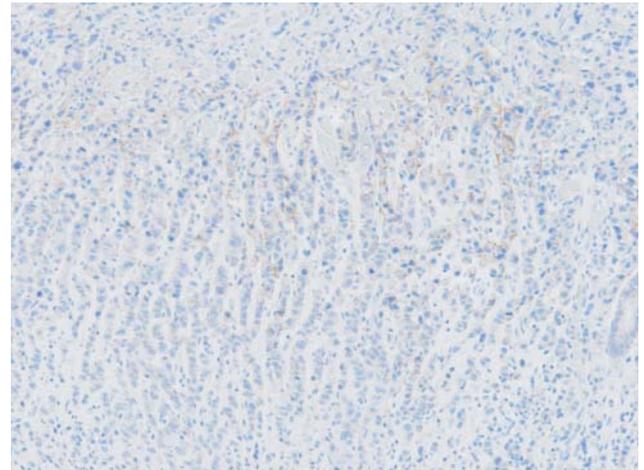
(FISH 0.9)

対物レンズ：×4



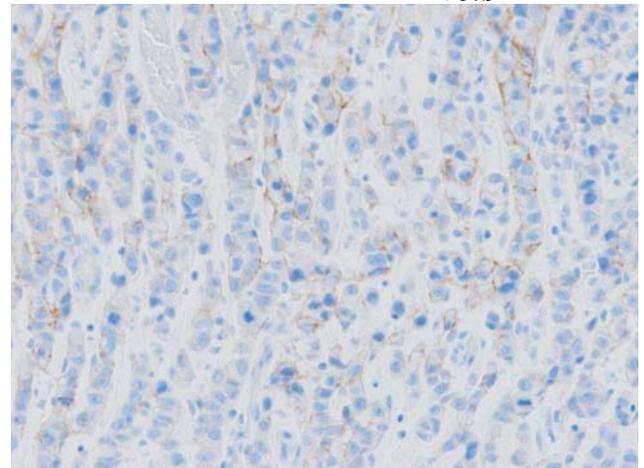
腫瘍細胞の中で明らかな陽性細胞はみられないがわずかに染色がみられる。

対物レンズ：×10



腫瘍細胞の一部の細胞の細胞膜にわずかな陽性染色が疑われる。

対物レンズ：×20



腫瘍細胞の一部の細胞の細胞膜にわずかな陽性染色がみられる。

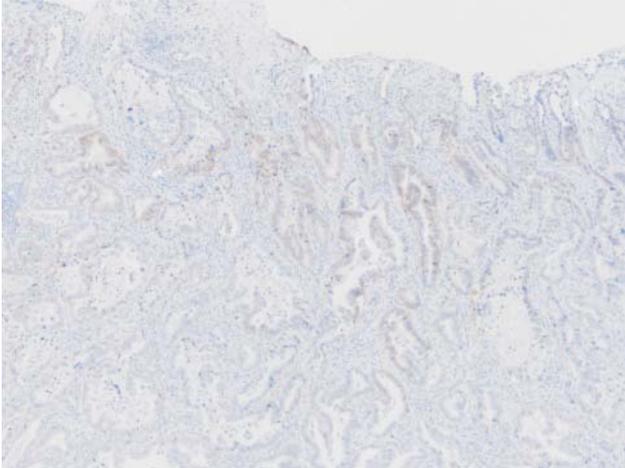
ヒストファイン HER2 キット (POLY) 染色例

スコア 2 +

症例 3

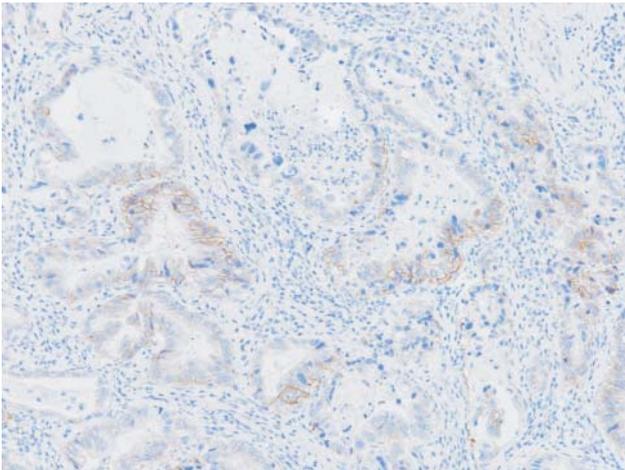
(FISH 2.3)

対物レンズ：×4



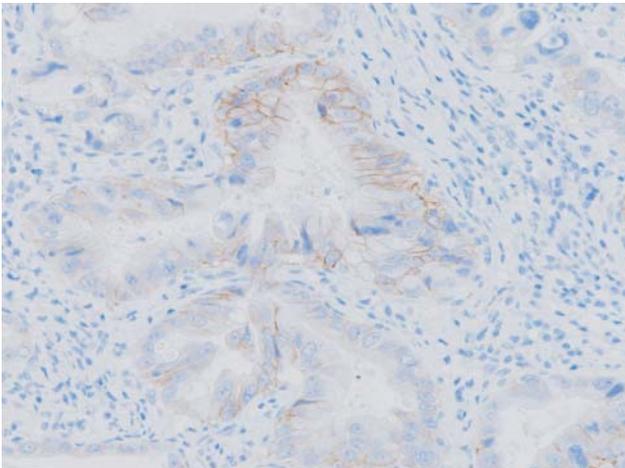
腫瘍細胞の中で陽性細胞がみられる。ただし、細胞膜への陽性像はあきらかではない。

対物レンズ：×10



腫瘍細胞の細胞膜に陽性染色がみられる。

対物レンズ：×20

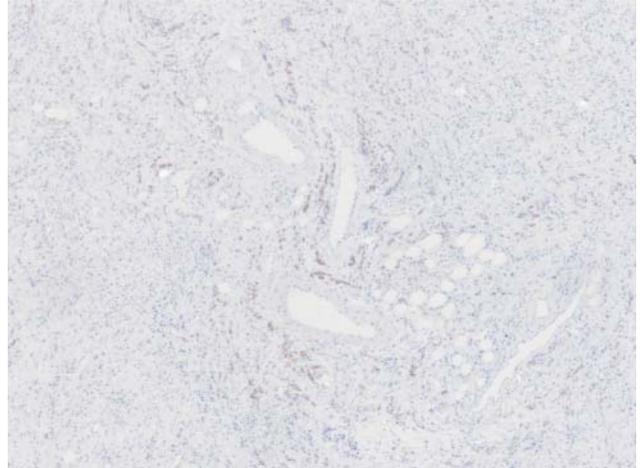


腫瘍細胞の細胞膜の側方・基底膜側にあきらかな陽性染色がみられる。

症例 4

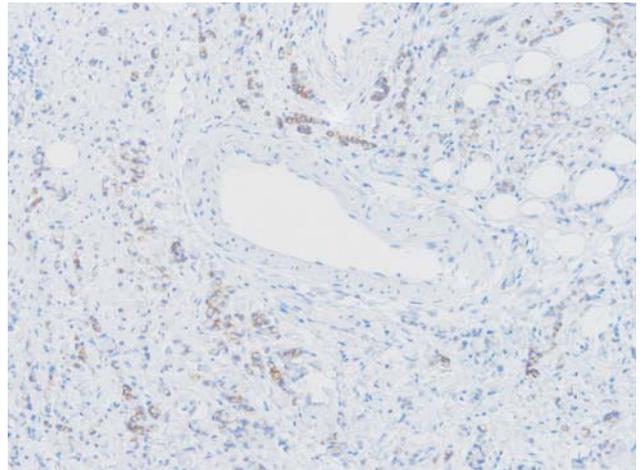
(FISH 1.5)

対物レンズ：×4



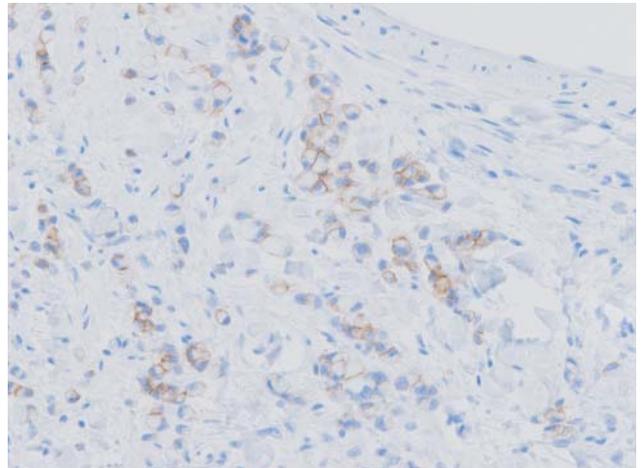
腫瘍細胞の中で陽性細胞がみられる。ただし、細胞膜への陽性像はあきらかではない。

対物レンズ：×10



腫瘍細胞の細胞膜に陽性染色がみられる。

対物レンズ：×20



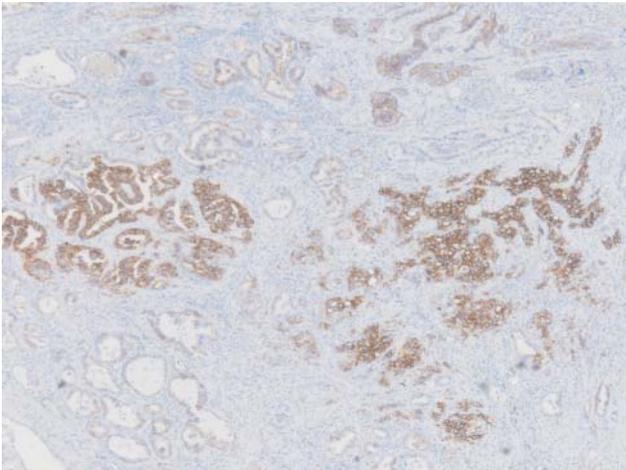
腫瘍細胞の細胞膜の全周性にあきらかな陽性染色がみられる。

スコア 3+

症例 5

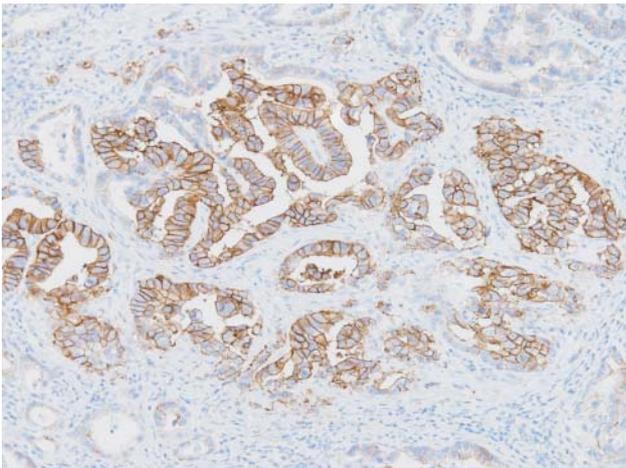
(FISH 2.5)

対物レンズ：×4



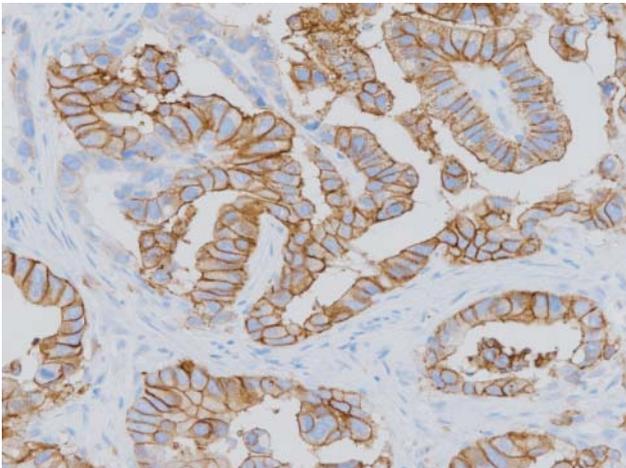
腫瘍細胞の多くの細胞に陽性染色がみられる。

対物レンズ：×10



腫瘍細胞の多くの細胞の細胞膜の側方・基底膜側にあきらかな陽性染色がみられる。

対物レンズ：×20

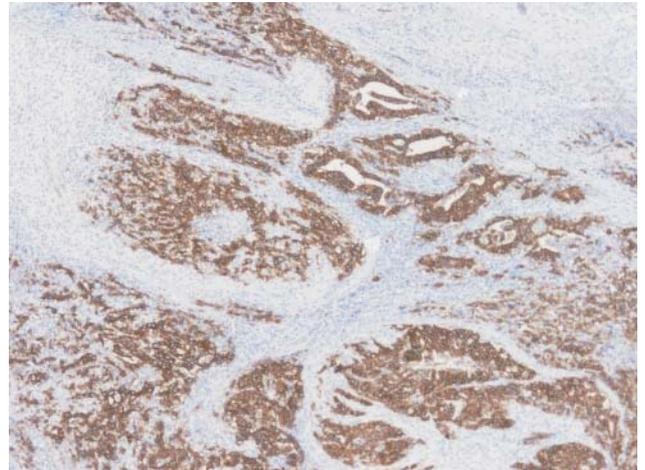


腫瘍細胞の多くの細胞の細胞膜の側方・基底膜側にあきらかな陽性染色がみられる。

症例 6

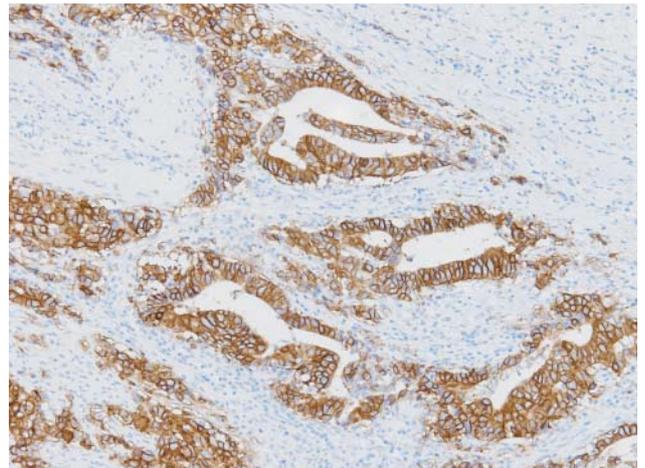
(FISH 3.7)

対物レンズ：×4



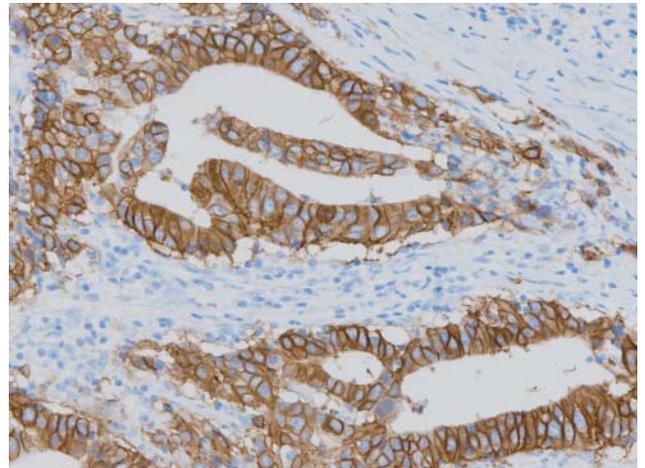
腫瘍細胞の多くの細胞に陽性染色がみられる。

対物レンズ：×10



腫瘍細胞の多くの細胞の細胞膜の側方・基底膜側、全周性にあきらかな陽性染色がみられる。

対物レンズ：×20



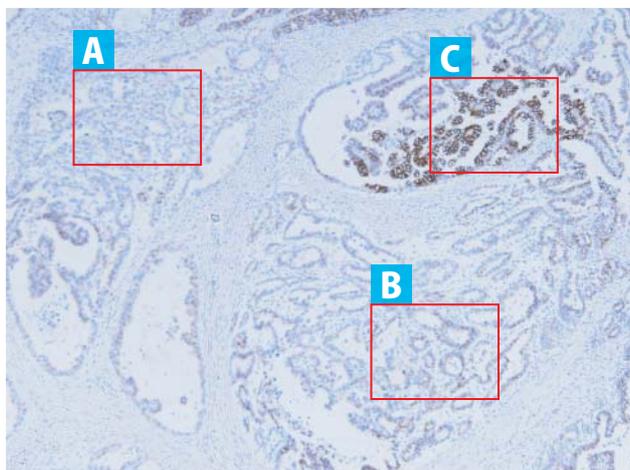
腫瘍細胞の多くの細胞の細胞膜の側方・基底膜側、全周性にあきらかな陽性染色がみられる。

8. HER2 キット注意例

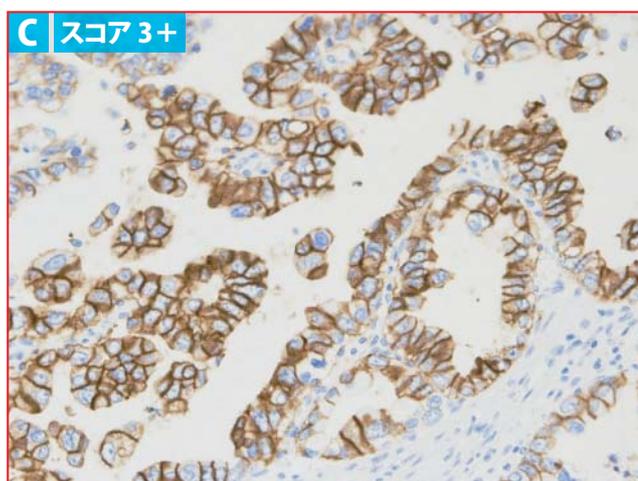
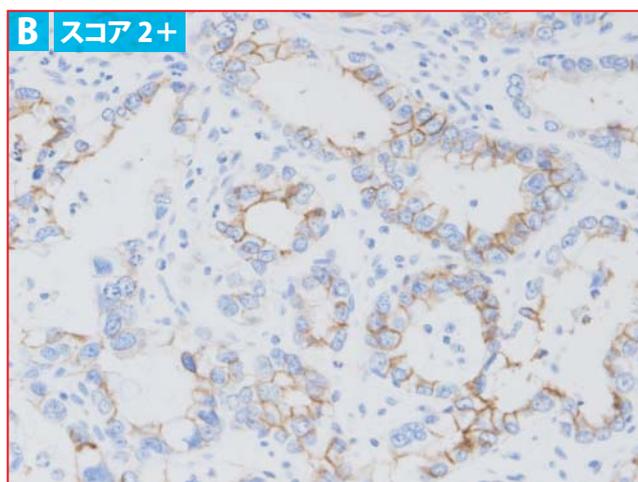
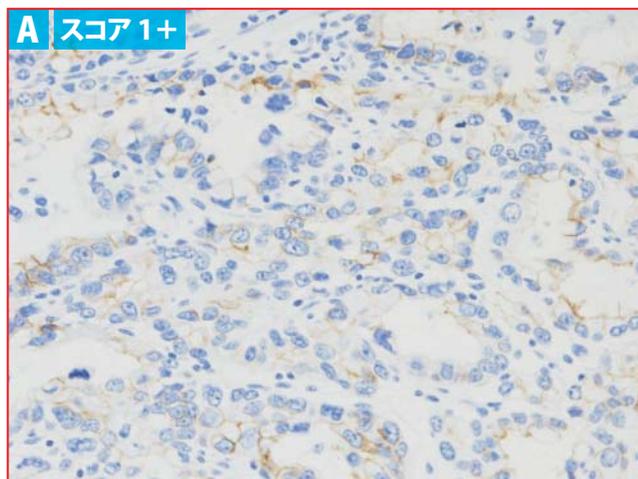
HER2 発現の不均一性 染色例

症例 7

(FISH 2.5)



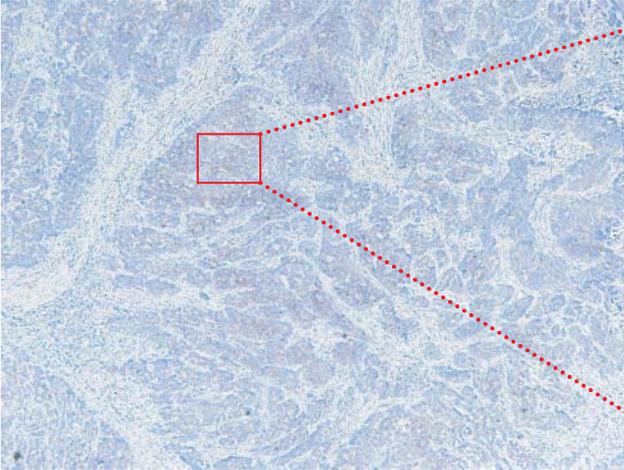
A部分のスコアは1+、B部分視野のスコアは2+、C部分視野のスコアは3+ かつ陽性染色の細胞が10%以上、腫瘍細胞の細胞膜の全周に強い染色がみられる。本症例はスコア3+と判定する。



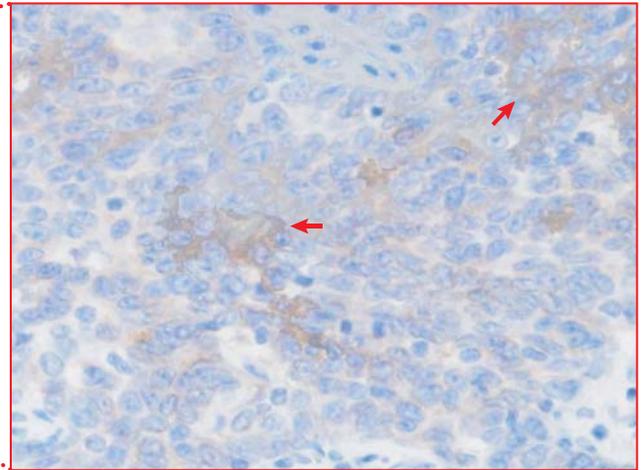
スコアリング対象外 染色例

症例 8

■細胞質のみの染色

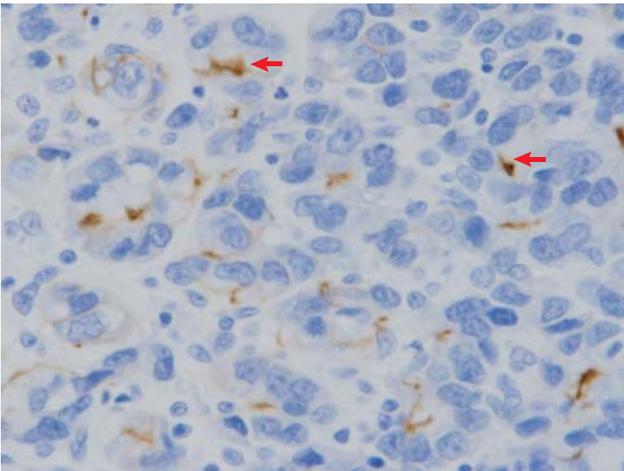


細胞質にのみ染色がみられる。陽性染色の判定はしないこと。



症例 9

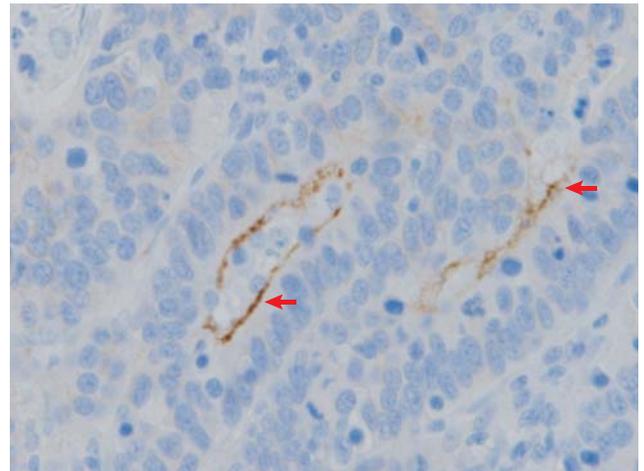
■微小腺腔のみの染色



微小腺腔にのみ顆粒状に染色がみられる。陽性染色の判定はしないこと。

症例 10

■管腔のみの染色



管腔にのみ染色がみられる。陽性染色の判定はしないこと。

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/>