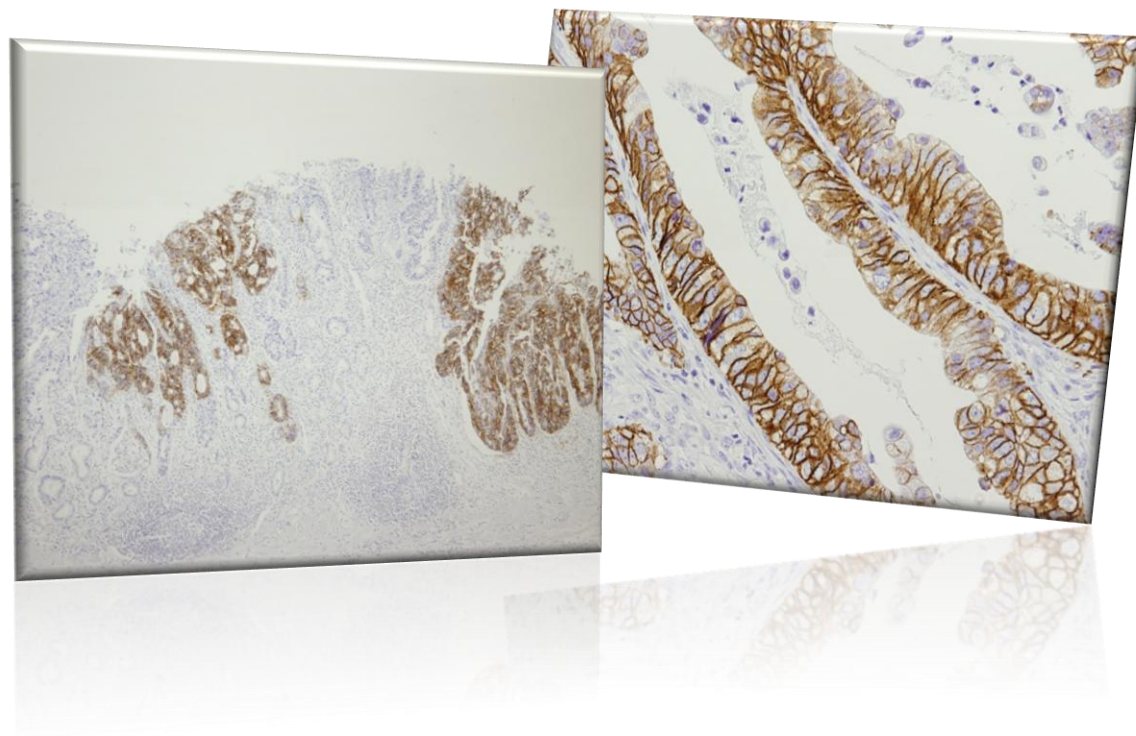


胃癌HER2検査の意義

～胃癌と乳癌の評価方法の違い～



Dako Japan inc.

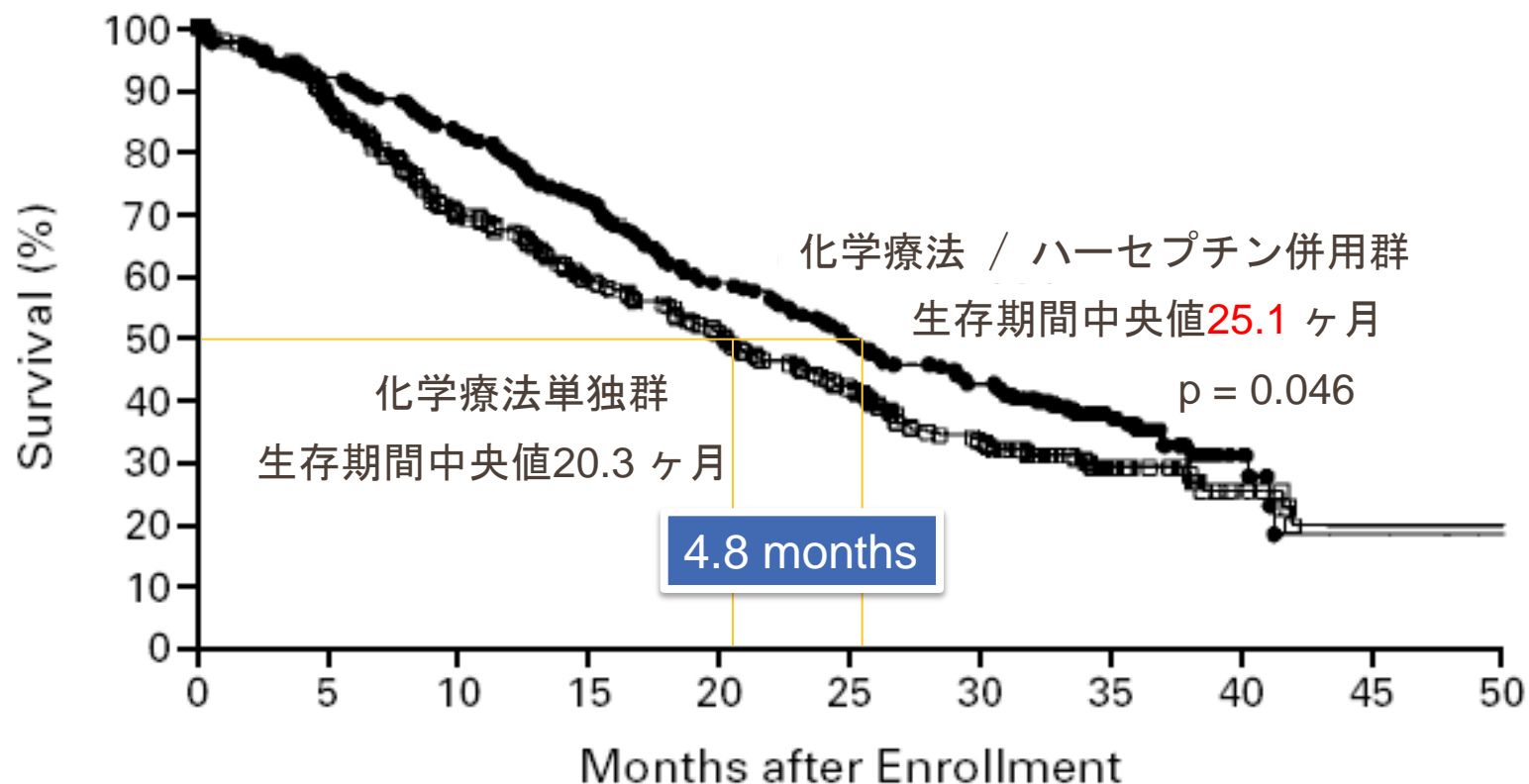
2011.August

学術担当 M.Tabuchi

Clinical Trial Phase III (Breast CA.)

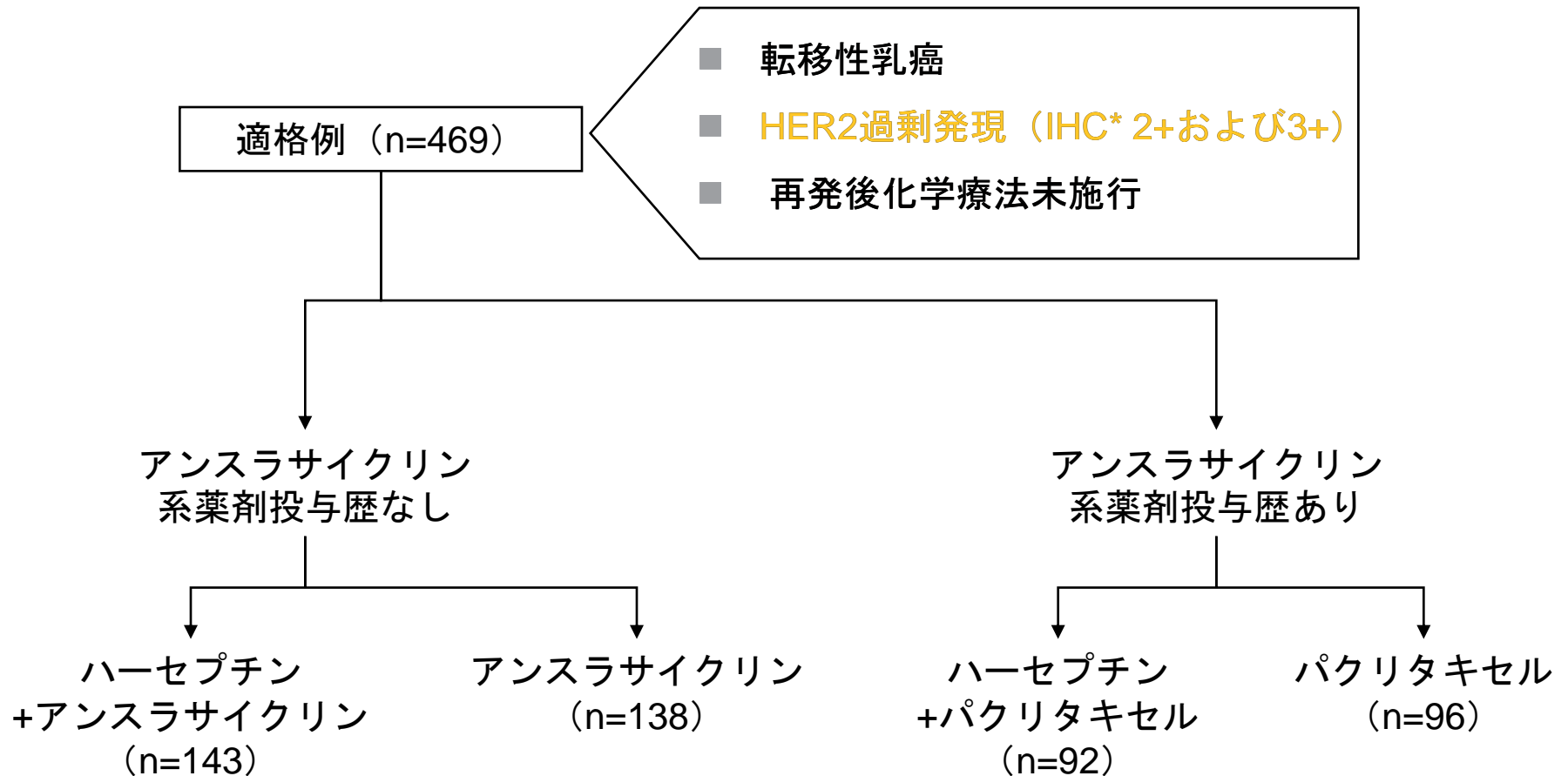


IHC2+、3+症例における、化学療法単独群及び、
化学療法/Herceptin併用群の比較



Clinical Trial Phase III

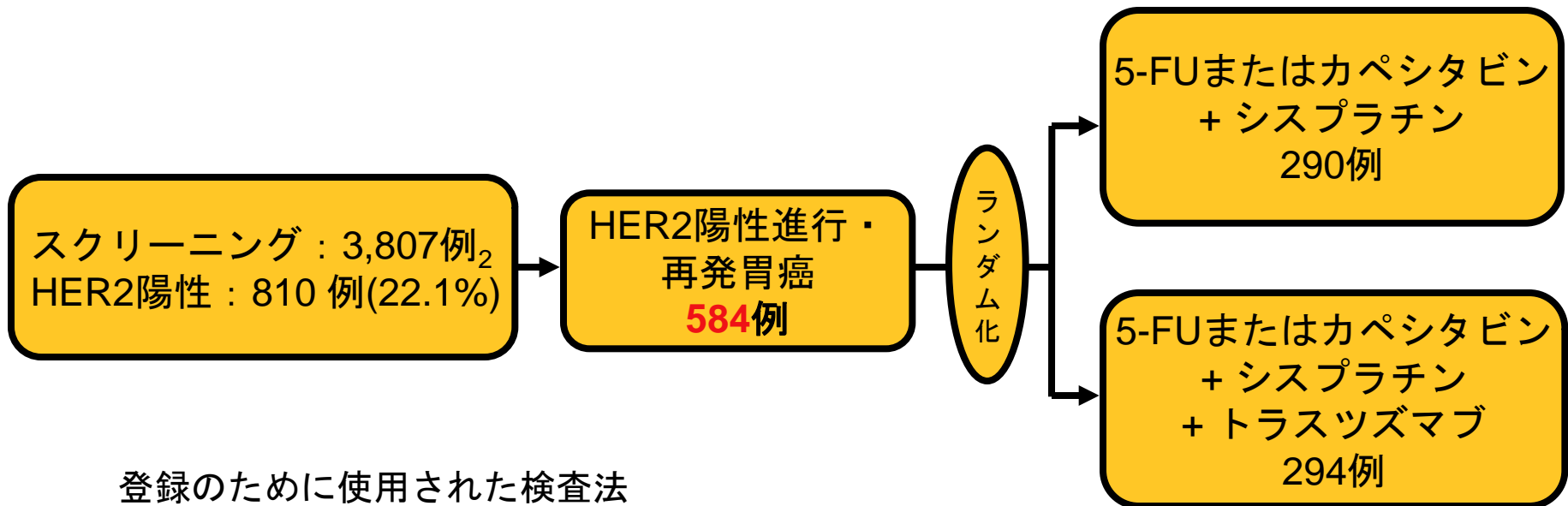
* : CTA (Clinical Trial Assay)



ToGA Trial

国際多施設共同、ランダム化、非盲検第III相比較対照試験

エントリーの条件は、**IHC3+**または**FISH+**



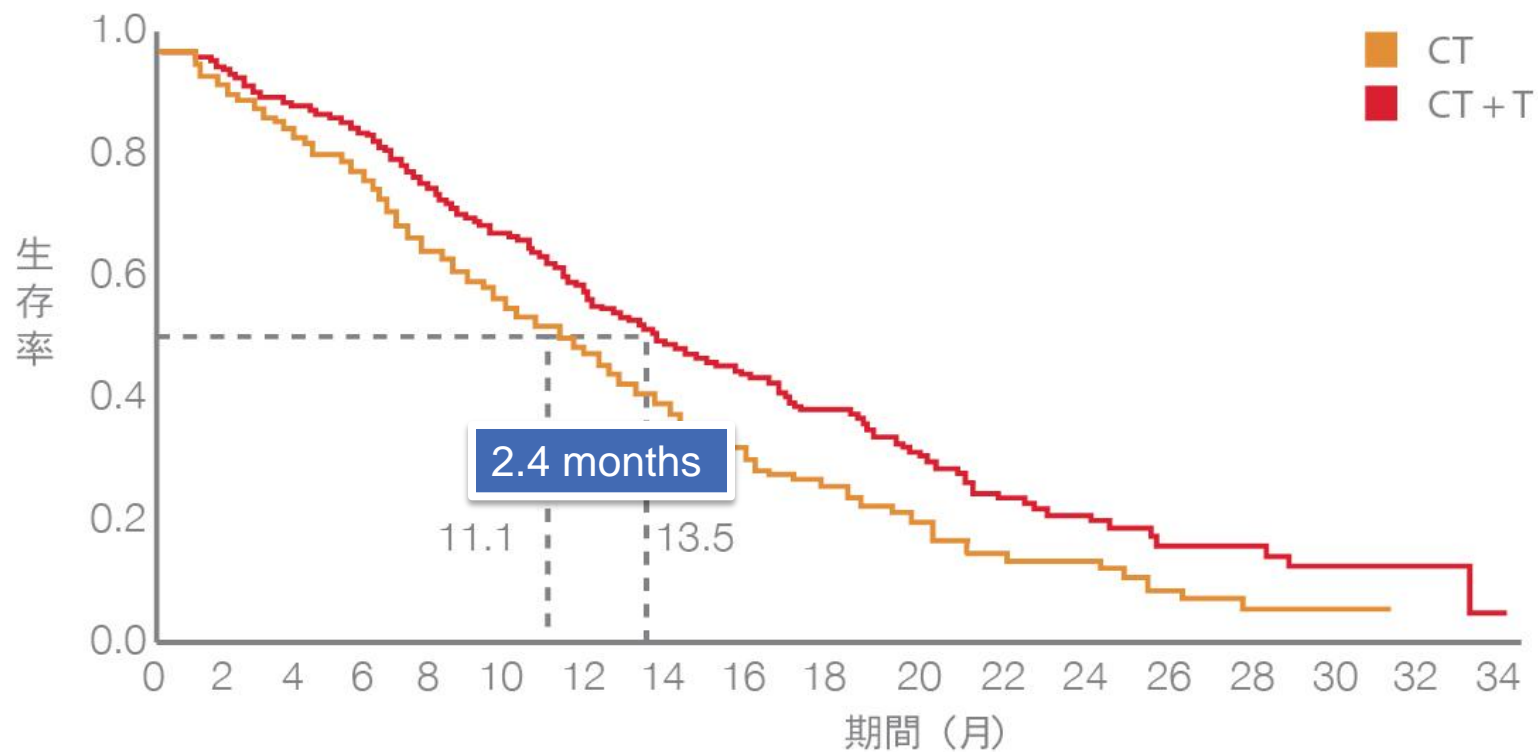
登録のために使用された検査法

IHC : Dako HercepTest™

FISH : Dako HER2 FISH pharmDx™

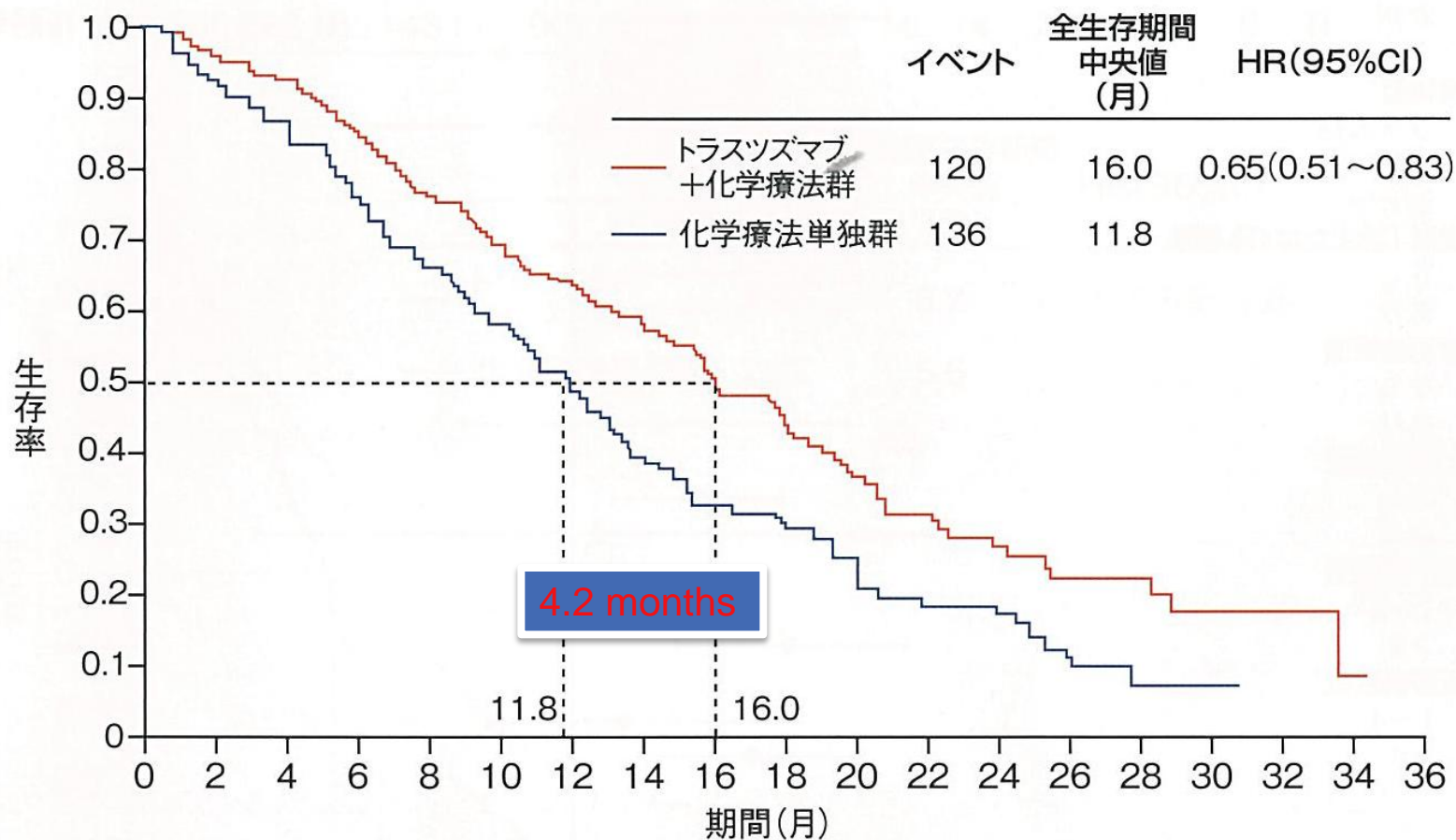
1. Van Cutsem E et al. J Clin Oncol 2009; 27: 18s, (suppl; ASCO abstr LBA2409). (<http://media.asco.org/silver>)
2. Bang Y et al. J Clin Oncol 2009; 27:15s (suppl; ASCO abstr 4556).

ToGA Trial

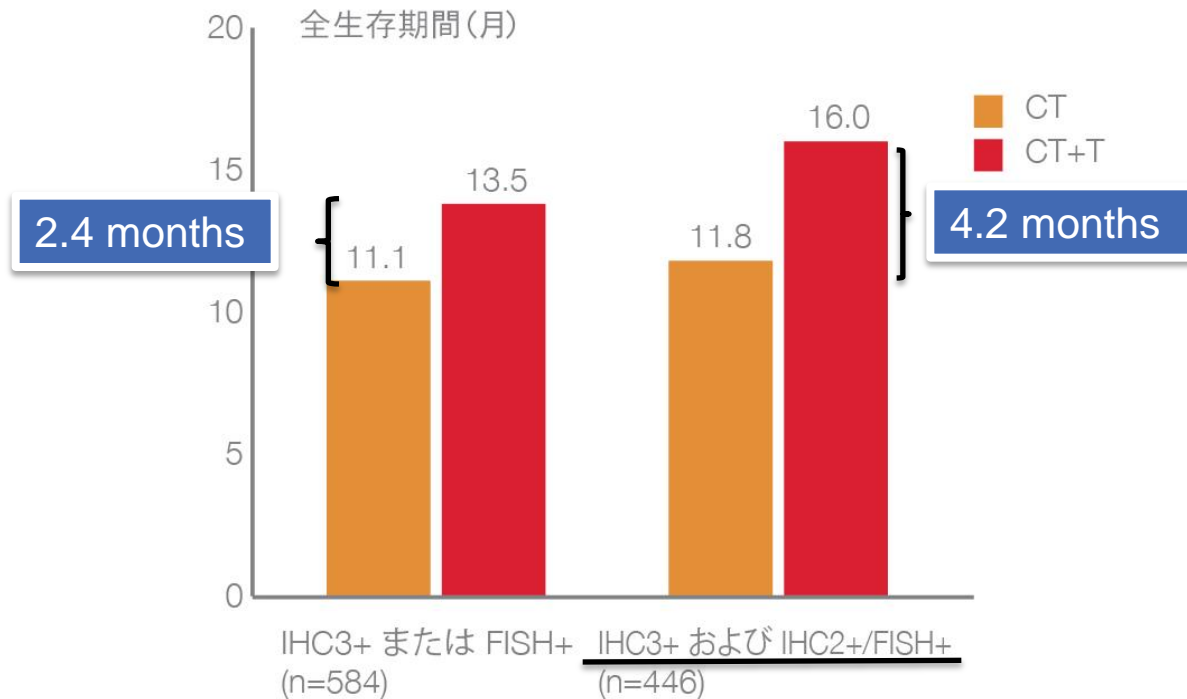


4. Van Cutsem E, et al. J Clin Oncol 2009; 27: 18s, (suppl; ASCO abstr LBA2409).

ToGA Trial (Sub analysis)



ToGA Trial (Sub analysis)



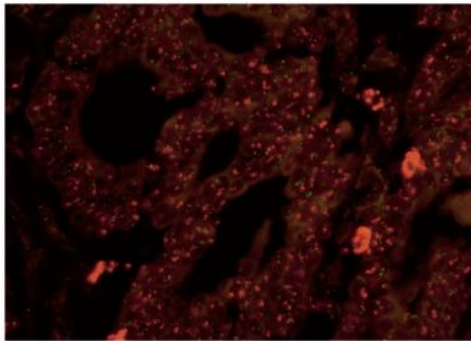
4. Van Cutsem E, et al. J Clin Oncol 2009; 27: 18s, (suppl; ASCO abstr LBA2409).

ToGA Trial

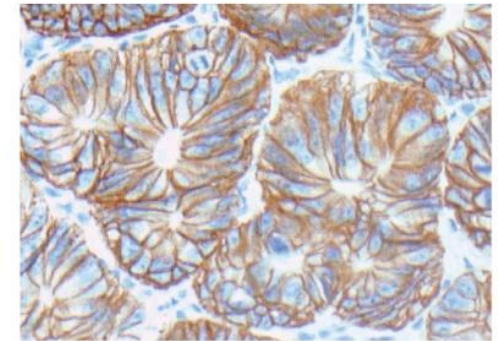


- HER2スクリーニングされた全3807例 においてHER2陽性率は**22.1%**
- HER2陽性率は欧州（23.6%）とアジア（23.5%）において差はなかった
- HER2陽性率は胃癌より胃食道接合部癌の方が高い傾向を示した（**33.2%** vs. 20.9%; $p < 0.001$ ）
- HER2陽性率は**diffuse type**/mixed typeよりも**intestinal type**の方が高い傾向を示した（**32.2%** vs. **6.1%/20.4%**; $p < 0.001$ ）

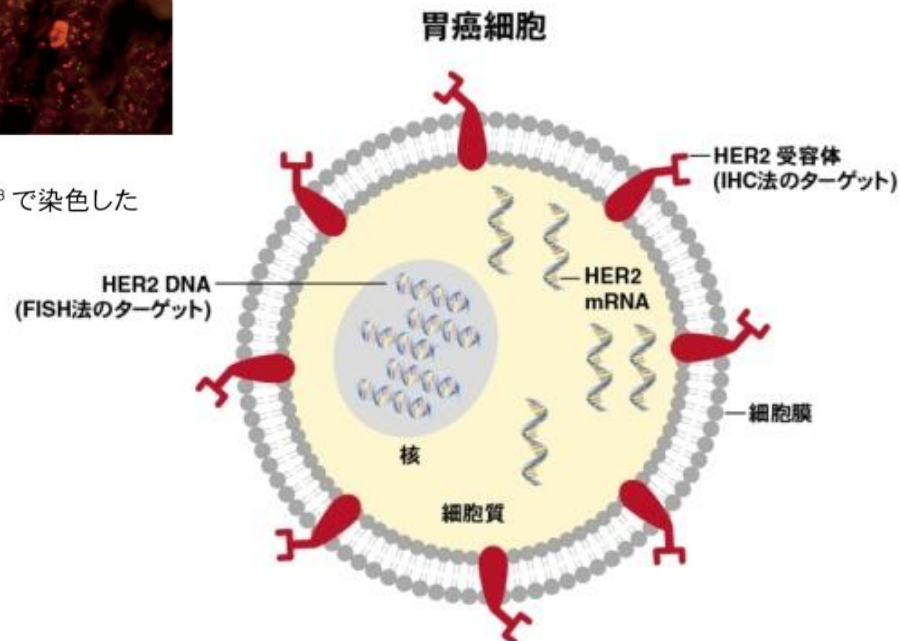
IHC法とFISH法のターゲット



FISH 法 : スコア > 2
 HER2 FISH pharmDx™*3 で染色した
 胃癌検体



IHC 法 : 陽性、スコア 3+
 ダコ HercepTest II で染色した胃癌検体



HER2 FISH pharmDx™*3 日本では胃癌適応未承認のため、胃癌でのHER2 検査へは使用できません。(2011年3月現在)

適切な診断をするために

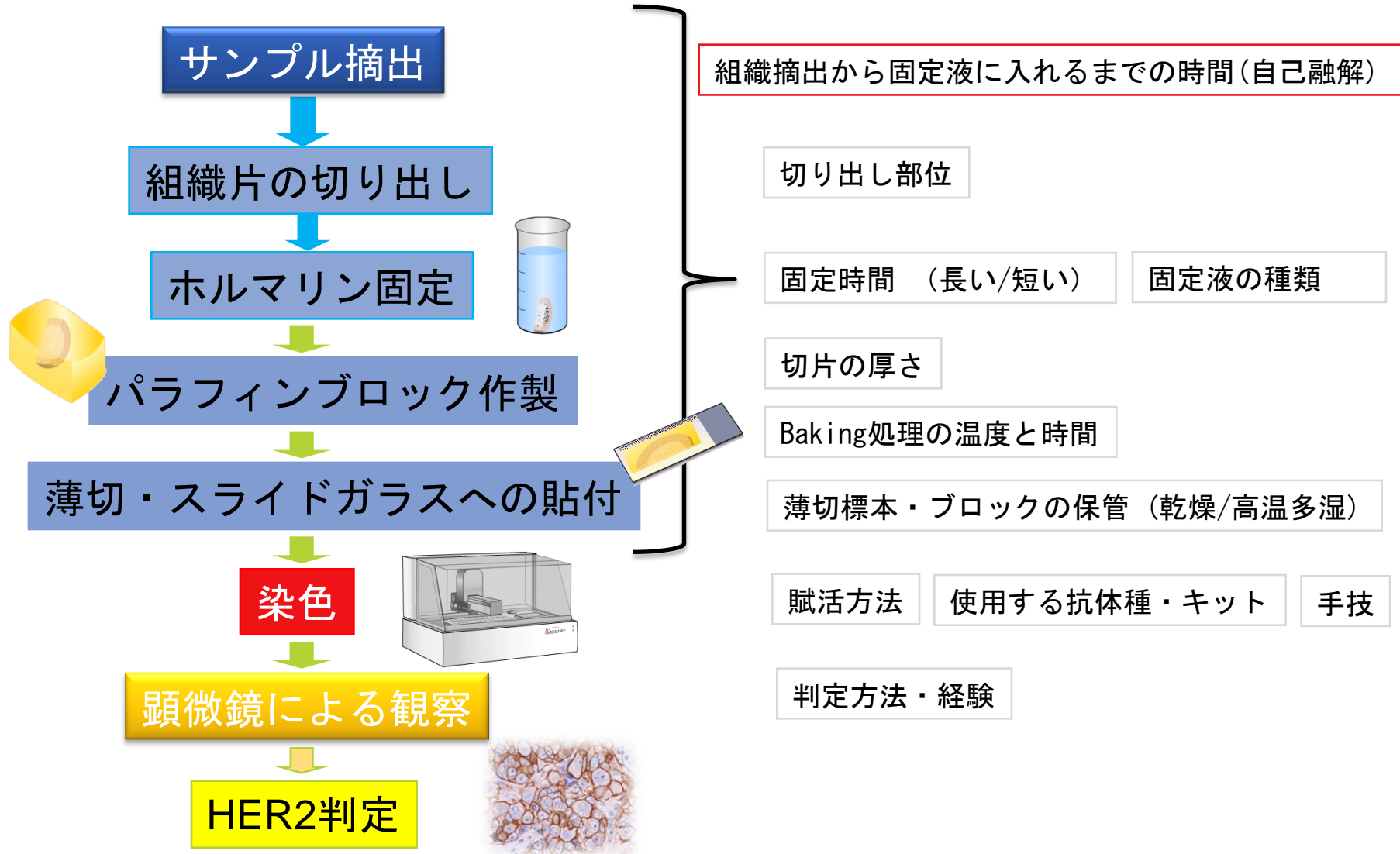


①前処理

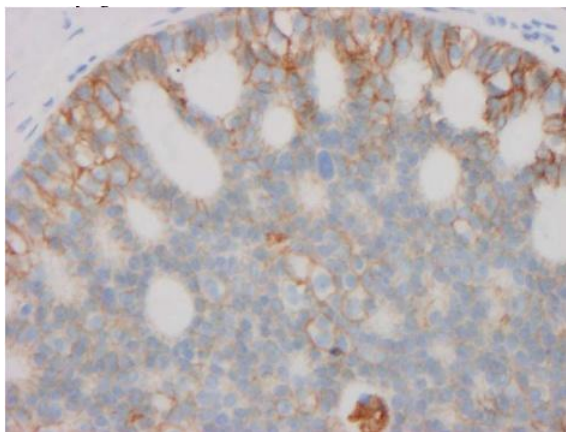
②染色

③判定

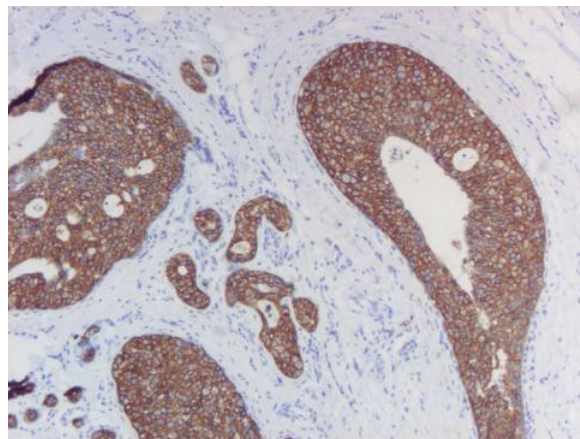
免疫染色に影響を与える因子



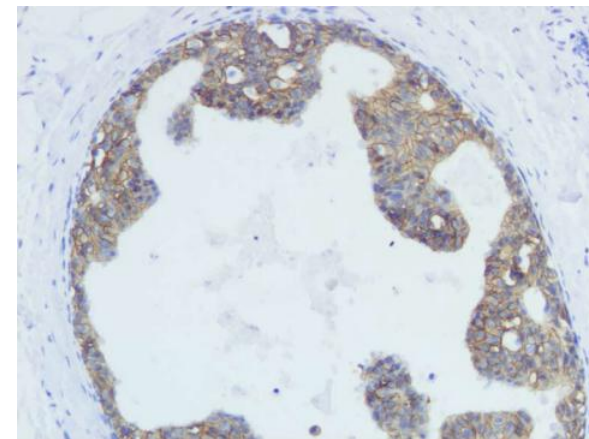
Overbakingの影響 (抗原性の減弱)



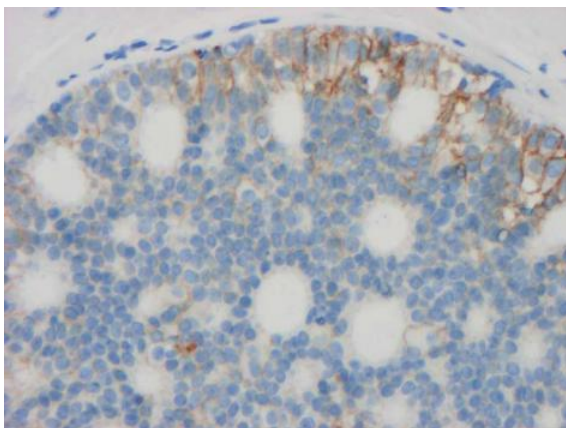
2+症例 60°C/1時間乾燥



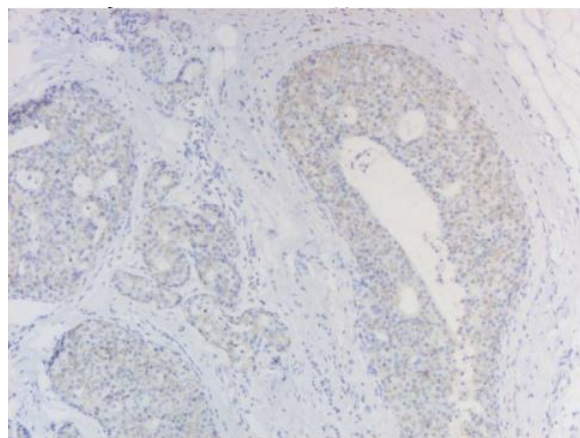
3+症例 60°C/1時間乾燥



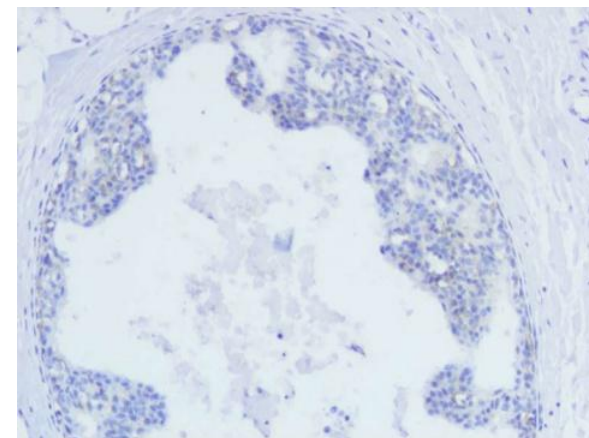
3+症例 60°C/1時間乾燥



60°C/オーバーナイト乾燥

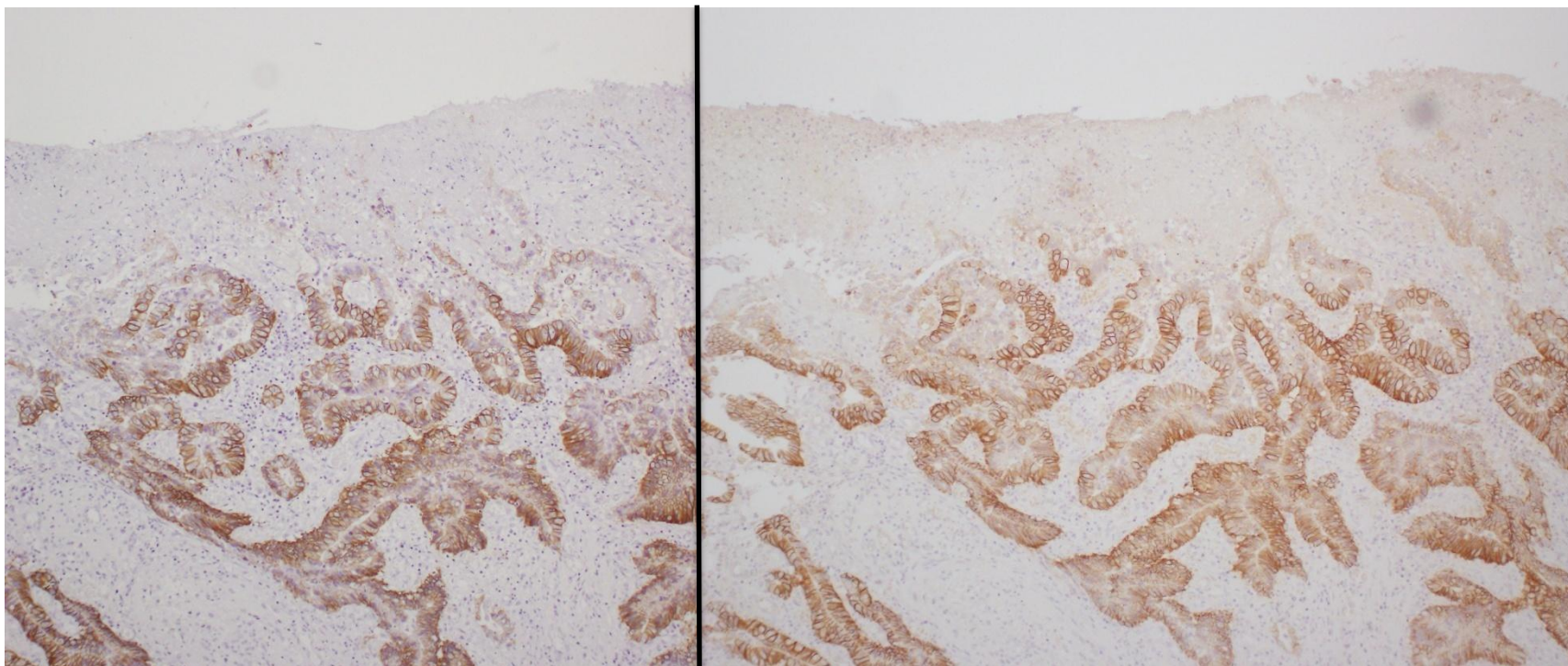


80°C/オーバーナイト乾燥



95°C/1時間30分乾燥

Overbakingの影響（非特異の増強）

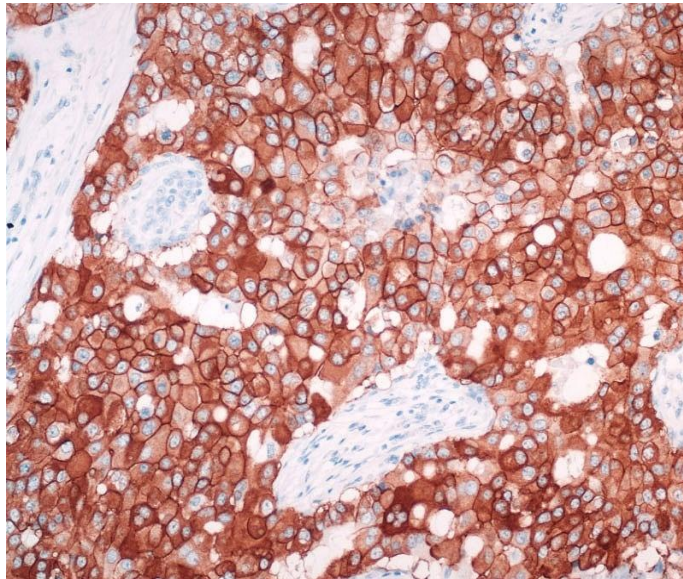


65°C/20mins

80°C/180mins

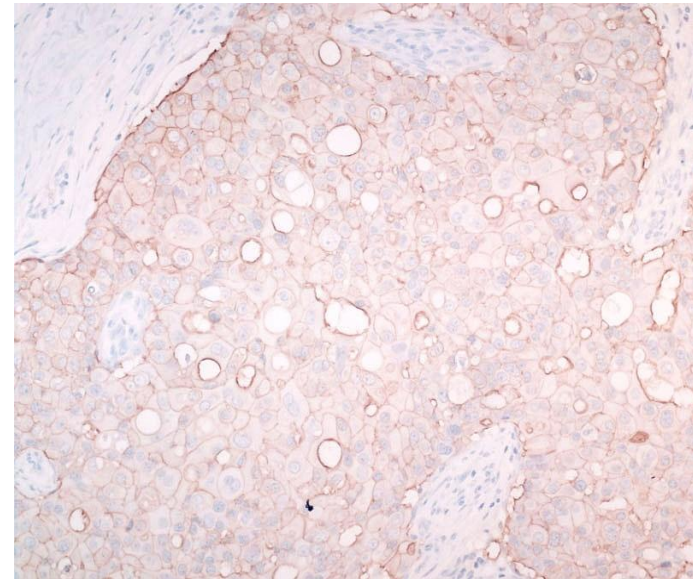
キット外の試薬を用いた場合 (1)

HercepTest™



HercepTest™の判定基準では
3+を呈する症例

Other Detection

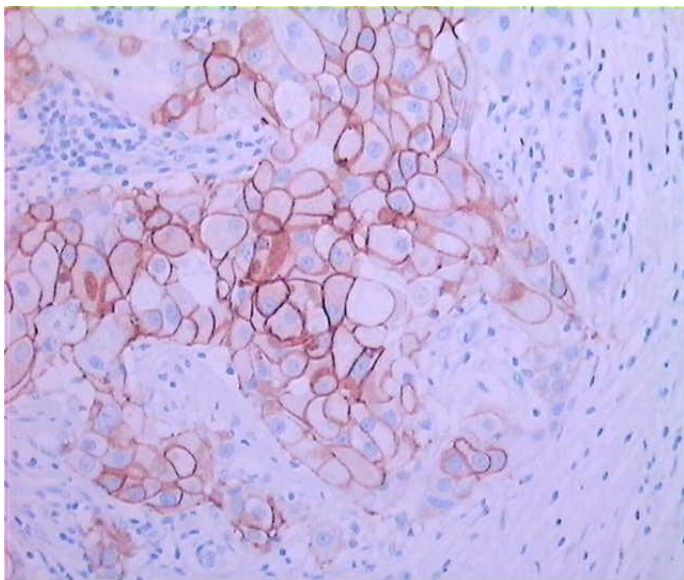


判定基準では2+にスコアが下がる例

同じ一次抗体を用いて違う検出系で検出した場合

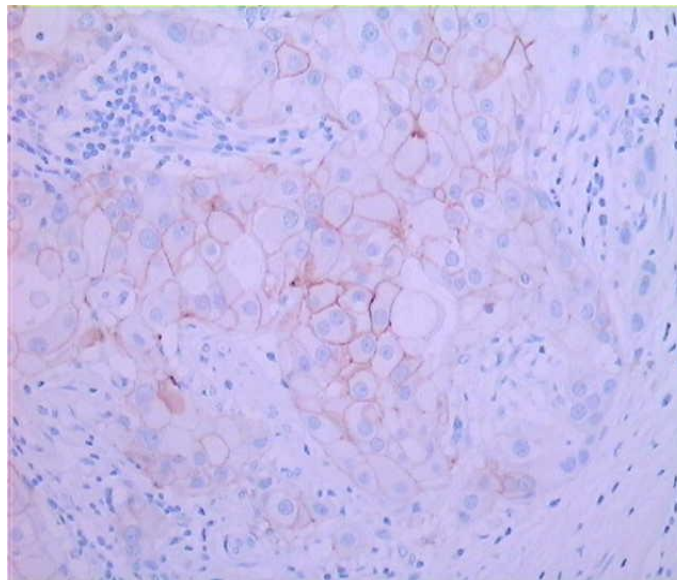
キット外の試薬を用いた場合 (2)

HercepTest™



HercepTest™の判定基準では
3+を呈する症例

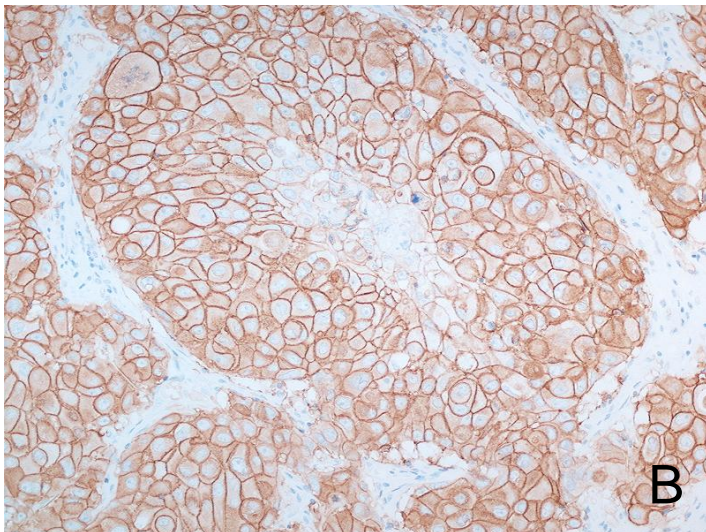
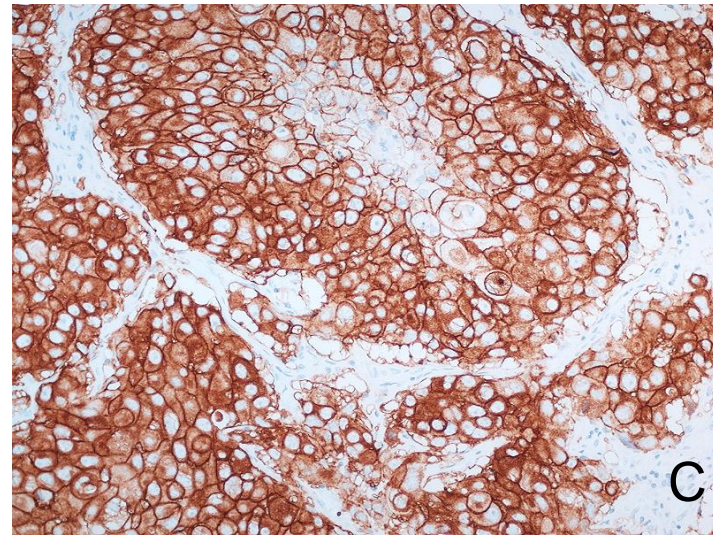
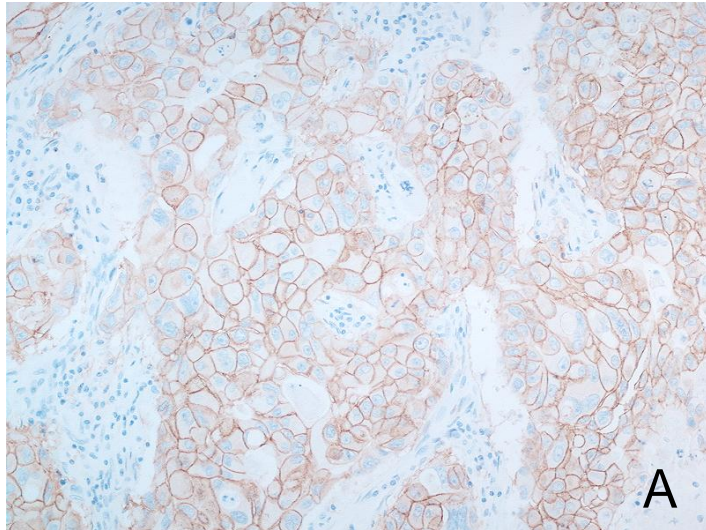
Other Substrate (DAB)



発色基質のDABを他社製品に替え
たもの

他の条件は同一で、発色基質だけを変えた場合

異なる抗原賦活処理法を用いた場合



A : マイクロウェーブ処理、500W, 5分間

B : 温浴処理、95°C, 40分間 (推奨法)

C : オートクレーブ処理、121°C, 15分間

前処理条件（HercepTest推奨）

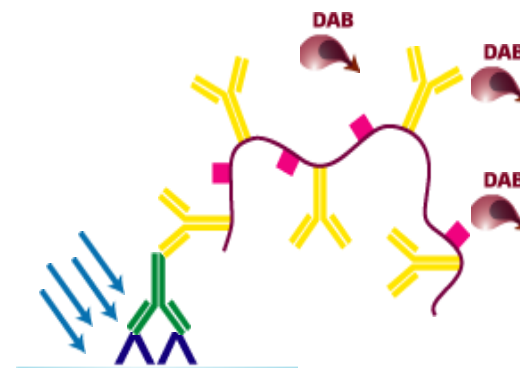
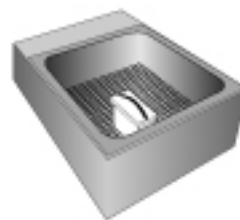
- 固定液に浸漬するまでの時間を出来るだけ短縮
- 判定対象となる腫瘍を含む組織をカセットに入る適切な大きさに切り出し、ホルマリン系固定液（10%ホルマリン、10%中性緩衝ホルマリン）に浸漬
- 固定時間：**切除材料 24~48時間（乳癌） 18~24時間（胃癌）**
生検材料 6~8時間（胃癌）
- 薄切後は速やかに染色を実施（IHC：4um, FISH：6um）
- 切り置く場合は、フィルムやパラフィンでカバーし、冷暗所に保存（但し、極力切り置きは避ける）
- コーティングスライドを使用。またはBakingにより剥がれを防止（但し、Overbakingは避け、**65°C・20~30分を限度**とする）
- IHCには、HEにて診断を付けた同一ブロックの切片を使用

免疫染色の手順



抗原賦活処理

調製した抗原賦活液での**温浴処理**
(95°C, 40分間熱処理および常温放置20分間)



内因性パーオキシダーゼのブロッキング
ブロッキング試薬の反応 (常温, 5分間)

一次抗体の反応

抗HER2抗体および陰性コントロールの反応
(常温, 30分間)

ポリマー試薬の反応

ポリマー試薬の反応 (常温, 30分間)

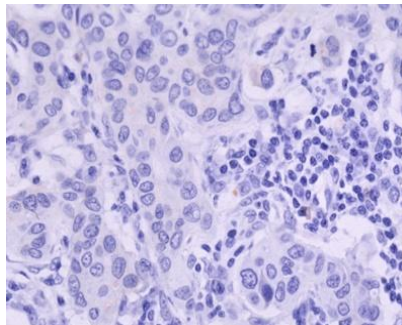
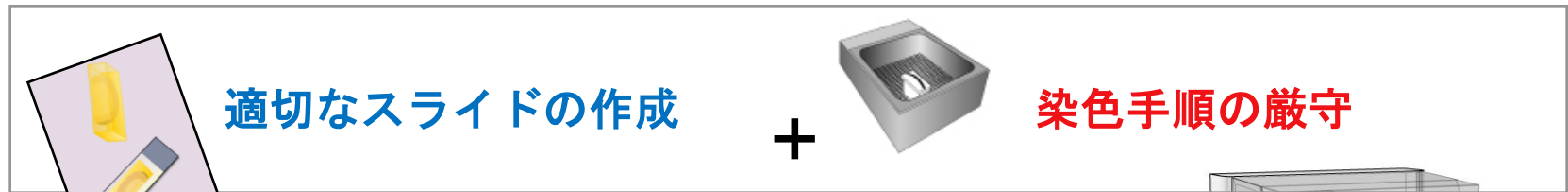
基質溶液 (DAB) の反応

調製した基質溶液による反応 (常温, 10分間)

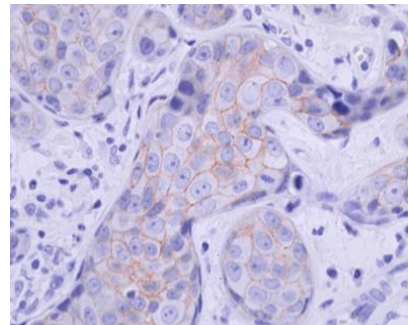


標準試薬

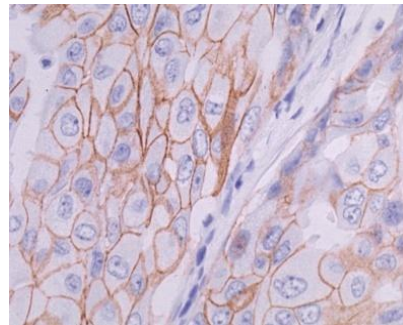
HercepTest™による標準化



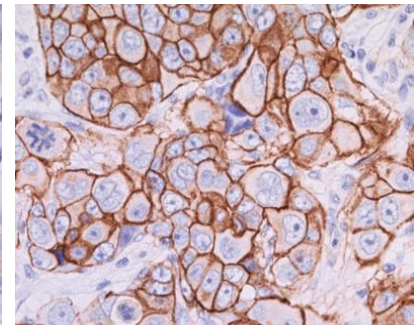
Score 0



Score 1+



Score 2+



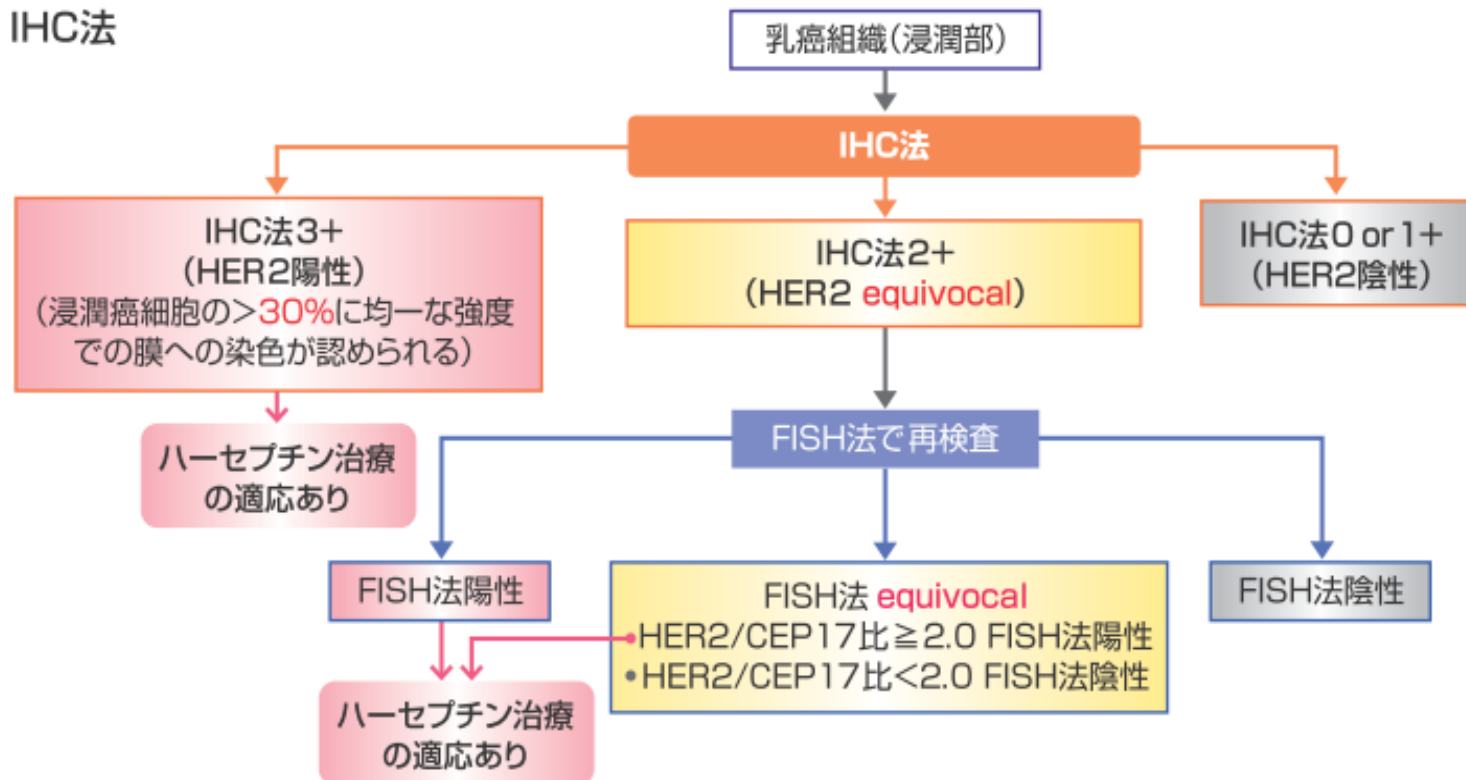
Score 3+

判定基準に則りスコア化

ハーセプチン治療適応の選択

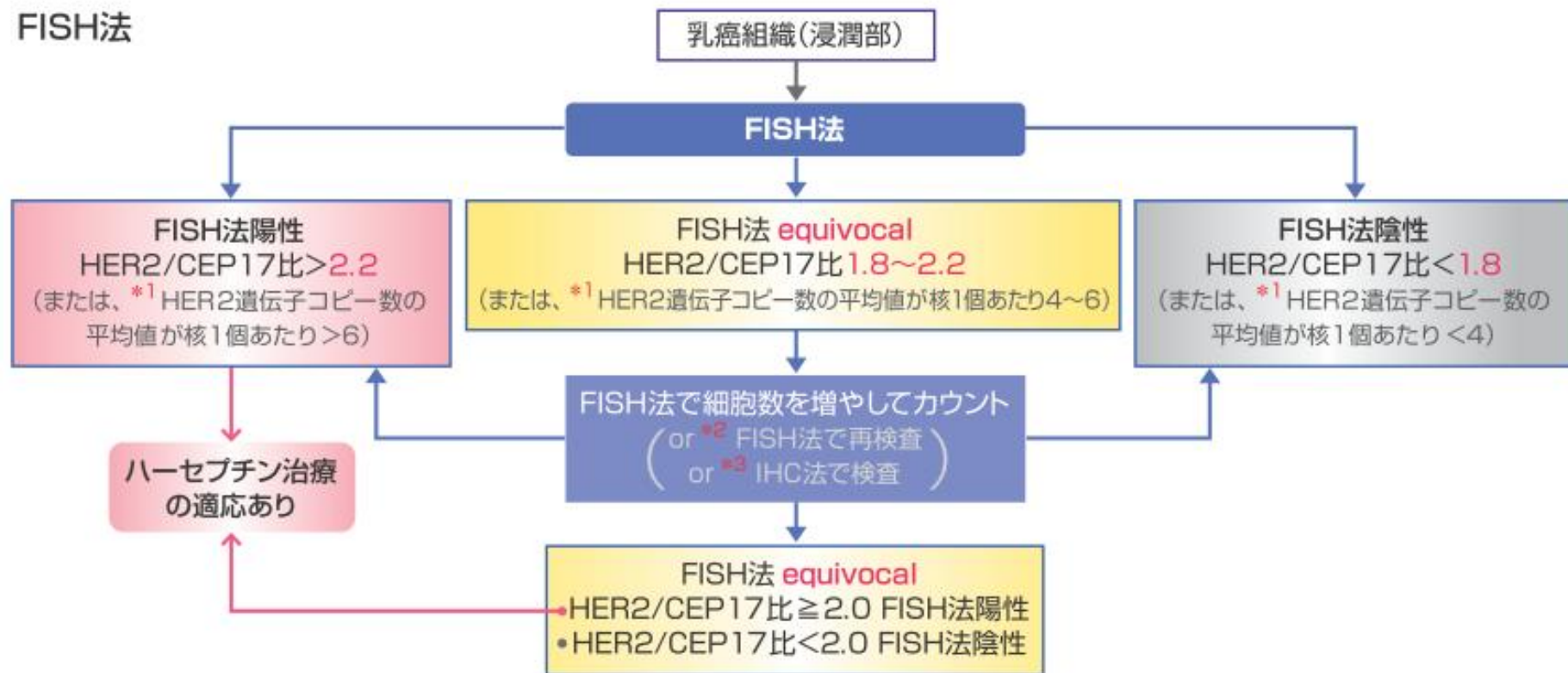
HER2検査フローチャート

IHC法



HER2検査フローチャート

FISH法



*1 本邦においては*1の判定を用いるような体外診断用医薬品は承認されていない

*2 FISH法の再検査は保険償還されない可能性がある

医療診療報酬点数表(平成20年4月版)より抜粋

・HER2遺伝子標本作製

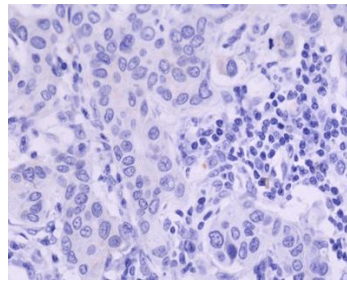
HER2遺伝子標本作製は、乳癌の術後の患者又は乳癌の転移が確認された乳癌患者に対して、抗HER2ヒトモノクローナル抗体抗悪性腫瘍剤の投与の適応を判断することを目的として、FISH法により遺伝子増幅標本作製を行った場合に、当該抗悪性腫瘍剤の投与方針の決定までの間に1回を限度として算定する。

なお、本検査と「N002」免疫染色(免疫抗体法)病理組織標本作製の「3」を併せて実施した場合は、主たるもののみ算定する。

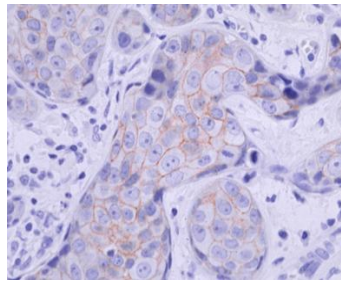
*3 FISH法で細胞数を増やしてカウントした後も判定結果があいまいな場合に、IHC法による確定診断が推奨される

HER2検査判定法

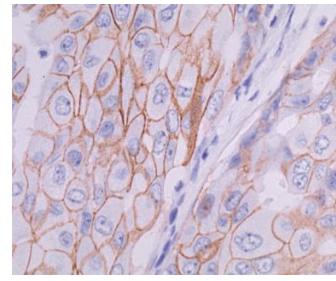
- IHC法：腫瘍細胞の膜の染色性・染色強度を評価しスコア化



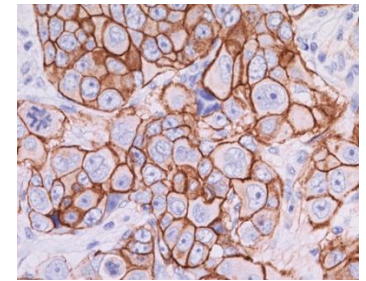
スコア0



スコア1+



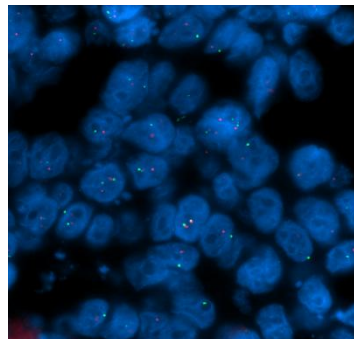
スコア2+



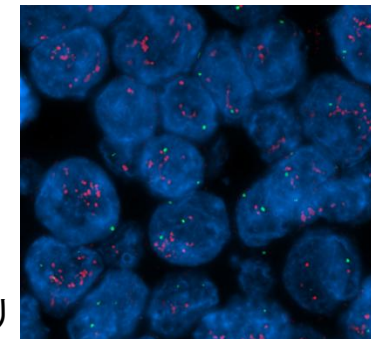
スコア3+

- FISH法：腫瘍細胞**20**個での**HER2(Red)**と**CEP17(Green)**のシグナル比算出

シグナル比 <2
遺伝子増幅なし



シグナル比 ≥ 2
遺伝子増幅あり



Breast CA.



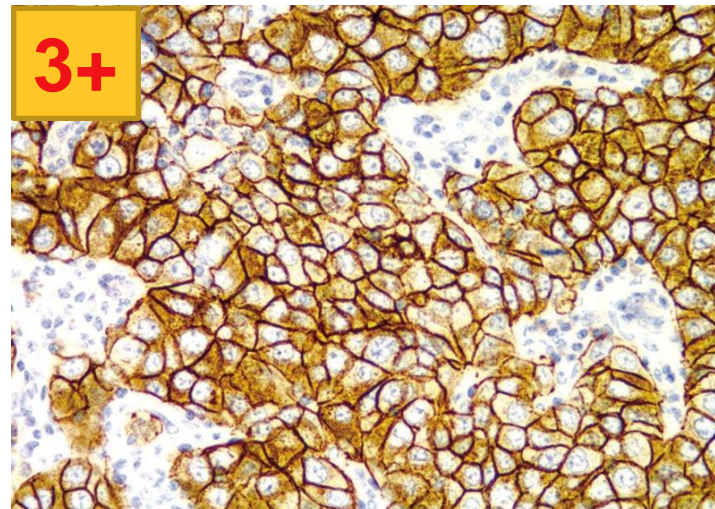
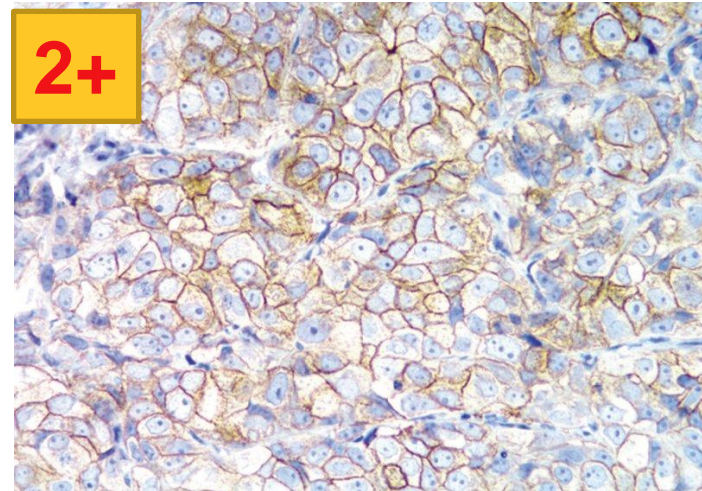
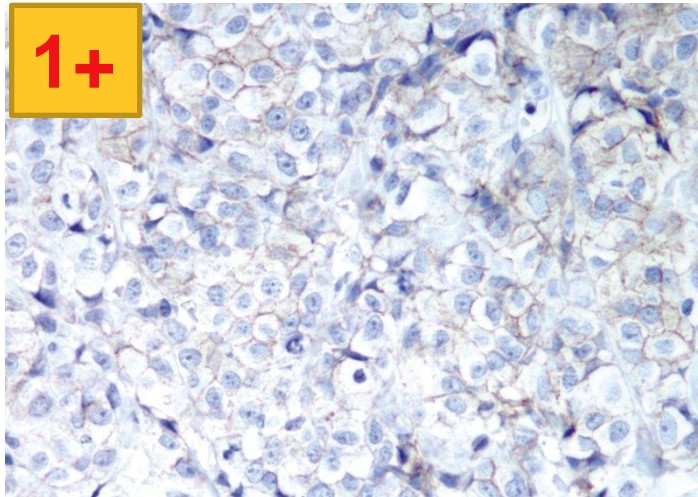
判定（乳癌）

判定基準

スコア	HER2タンパク 過剰発現	染色パターン
0	なし	検体組織中の腫瘍細胞の中でHER2陽性を呈している細胞がない、 または <u>10%に満たないもの</u>
1+	なし	検体組織中の腫瘍細胞の中でHER2陽性を呈している細胞が10%以上あるが、 腫瘍細胞の一部の膜に局限した弱い染色強度を有するもの
2+	あり*	検体組織中の腫瘍細胞の中でHER2陽性細胞が10%以上あり、 腫瘍細胞の 膜に局限した 中程度の染色強度を有するもの
3+	あり	検体組織中の腫瘍細胞の中でHER2陽性細胞が10%以上あり、 腫瘍細胞の 膜に局限した 強度の染色性を示すもの

*: FISH法によるHER2遺伝子増幅の確認が推奨

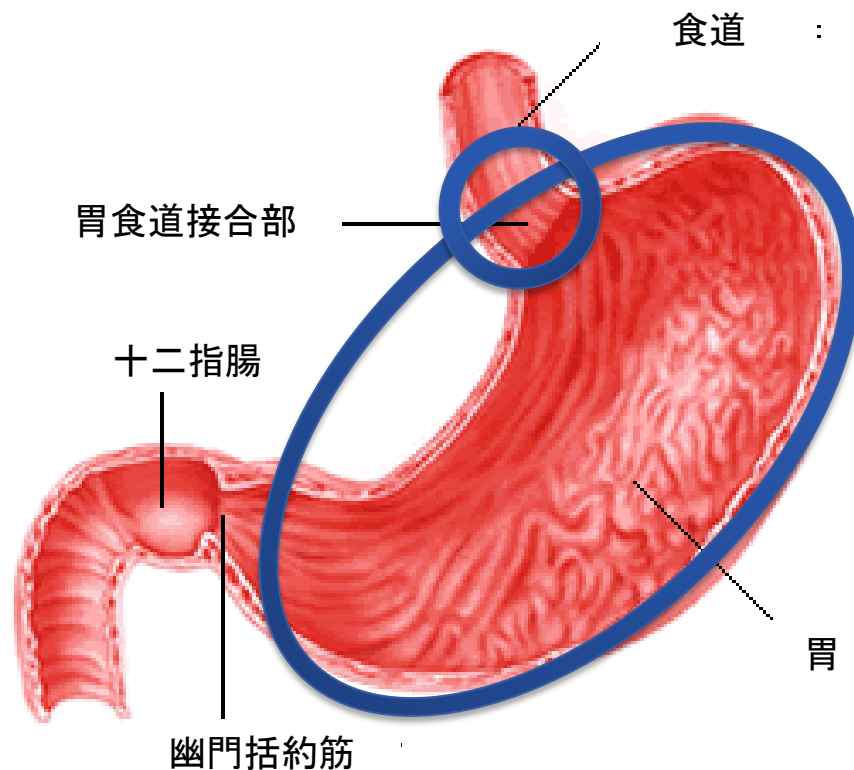
乳癌の陽性像



Gastric CA.



対象は胃食道接合部を含む胃癌



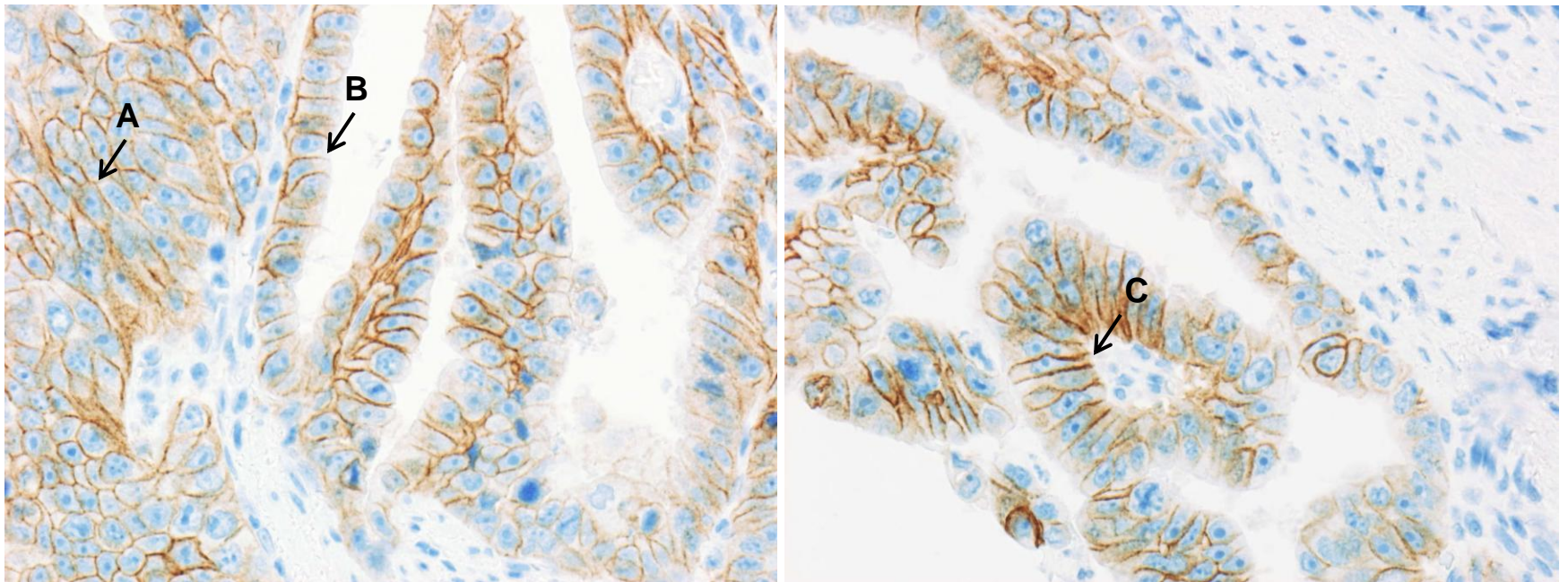
胃(Gastric) および胃・食道接合部(EGJ)の腺癌

判定（胃癌）

胃癌 トラスツズマブ病理部会 HER2検査ガイド胃癌編

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 <u>10%未満</u> 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が1つ以上あり* *5個以上の癌細胞の集塊と定義される	陰性
2+	弱～中程度の完全な基底側または側方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～中程度の完全な基底側または側方の細胞膜の陽性染色がある癌細胞クラスターが1つ以上あり	境界域 (Equivocal)
3+	強い完全な基底側または側方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、強い完全な基底側または側方の細胞膜の陽性染色がある癌細胞クラスターが1つ以上あり	陽性

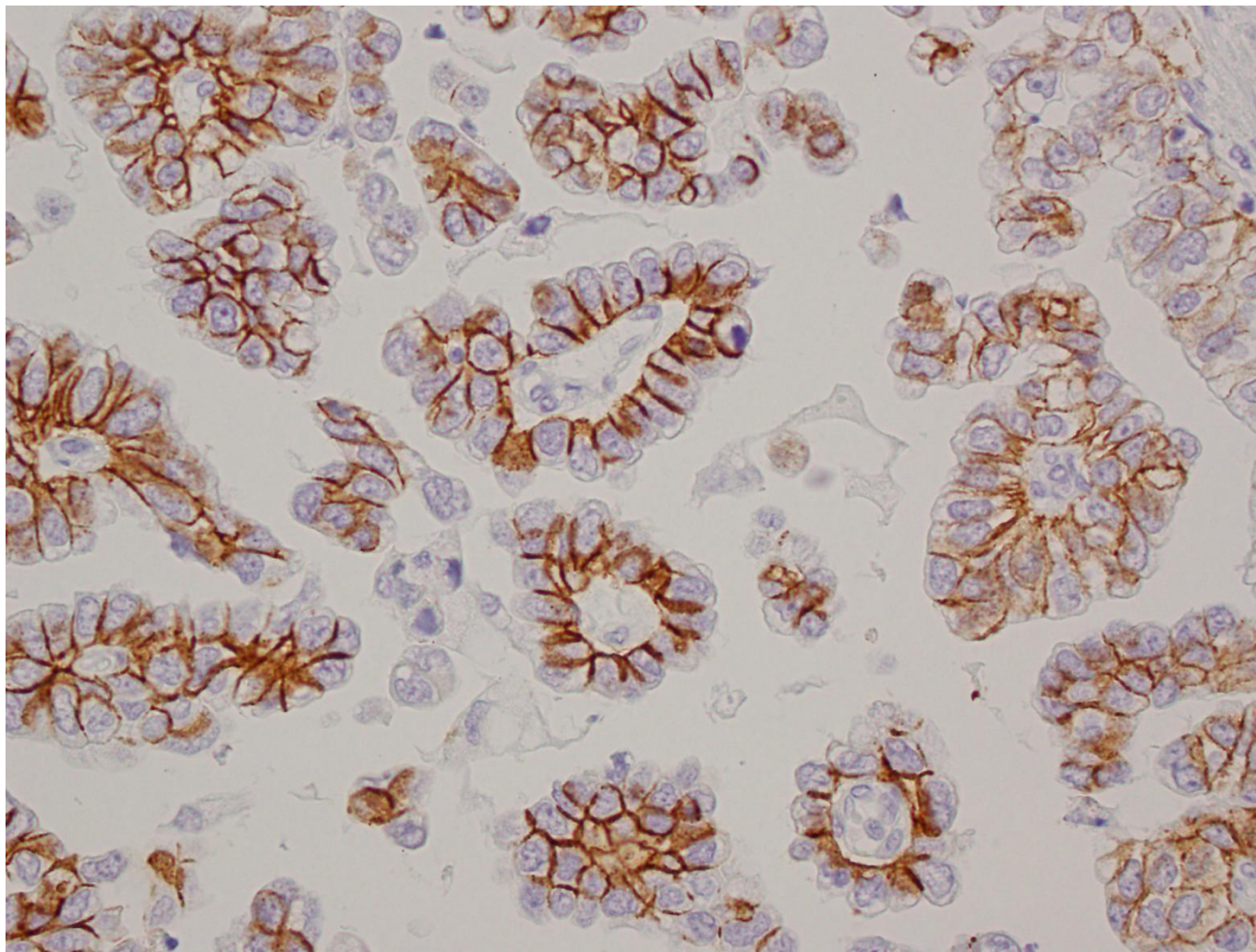
胃癌における陽性像



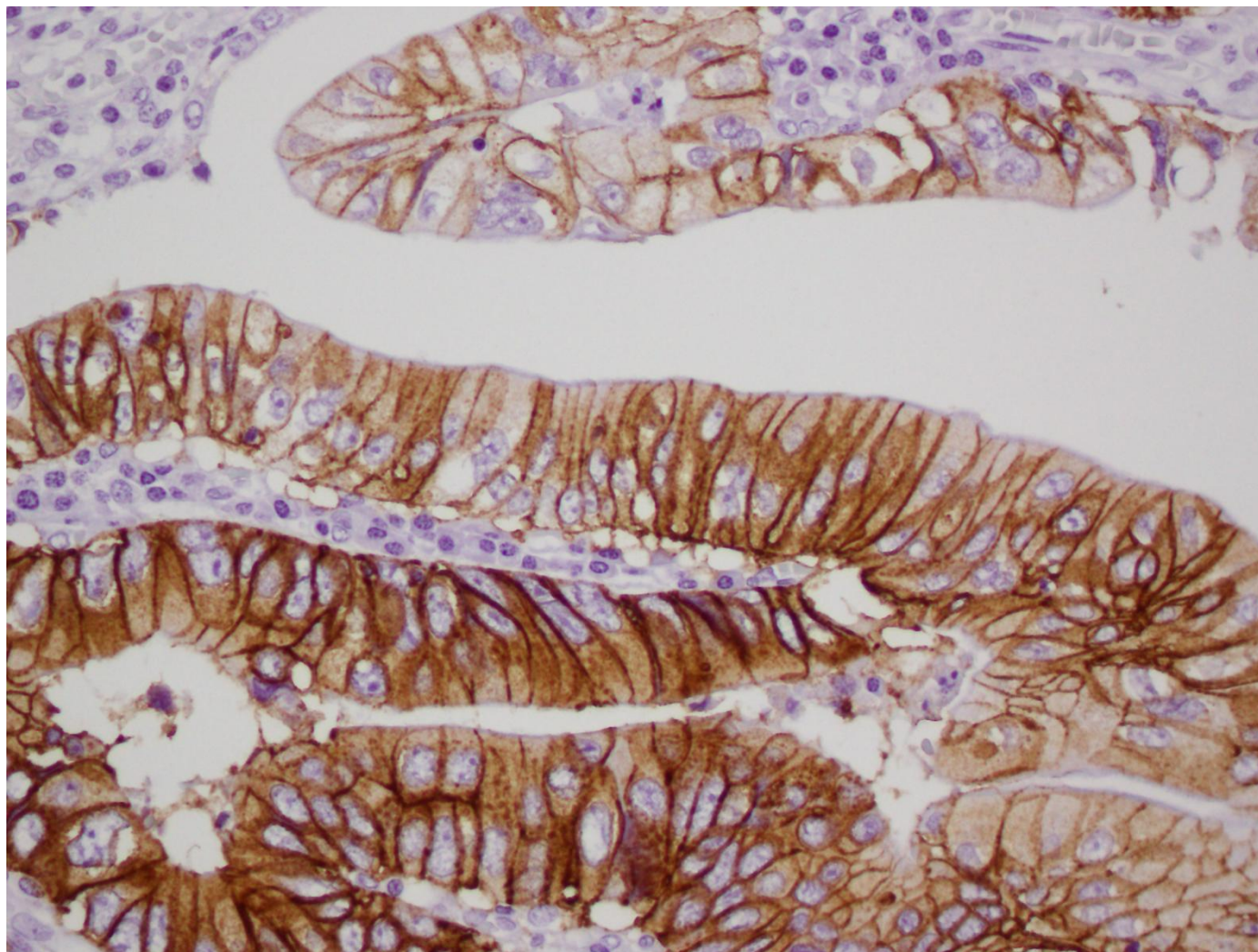
胃癌、スコア3+

HercepTest™ において、完全な (A) 、基底側 (B) 、側方側 (C) のHER2 細胞膜染色
40倍

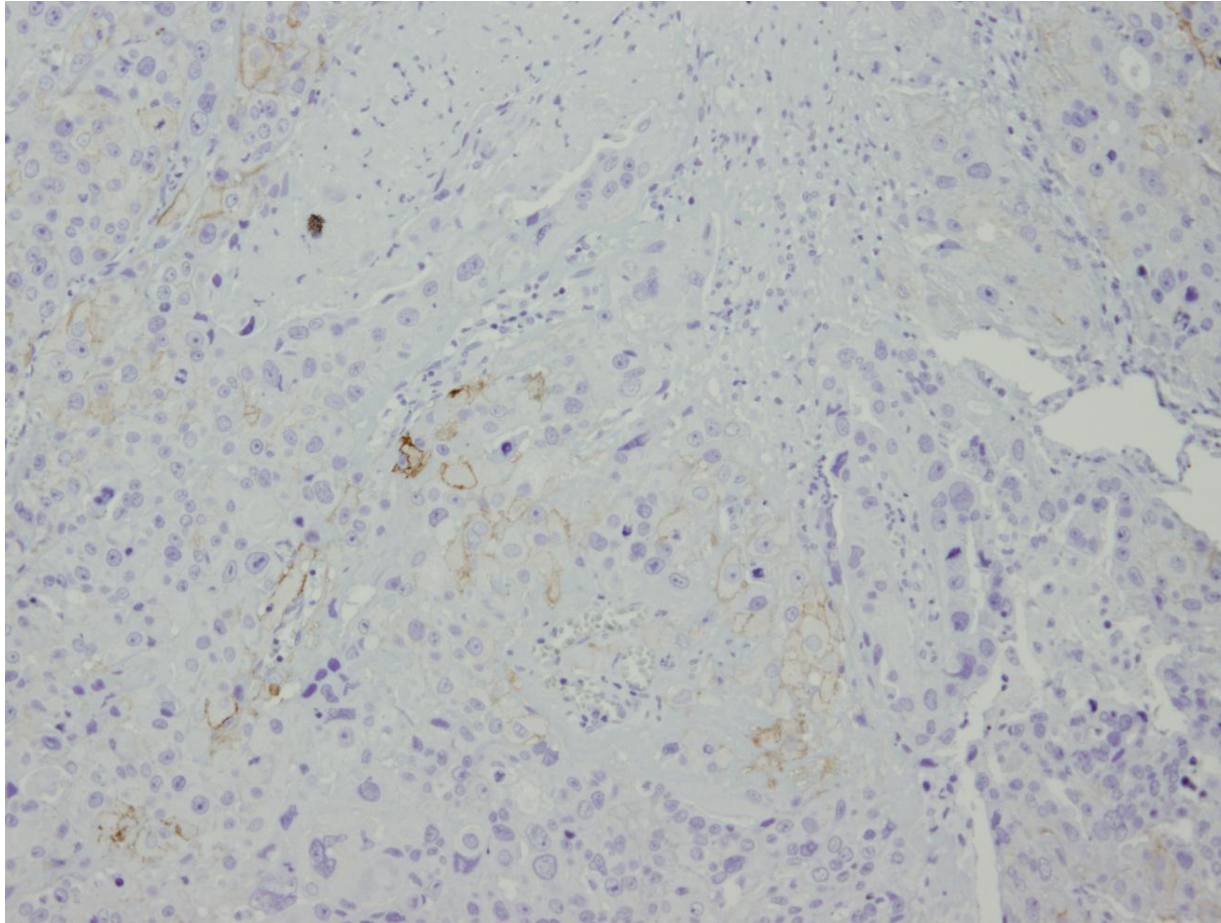
陽性とする膜染色パターン



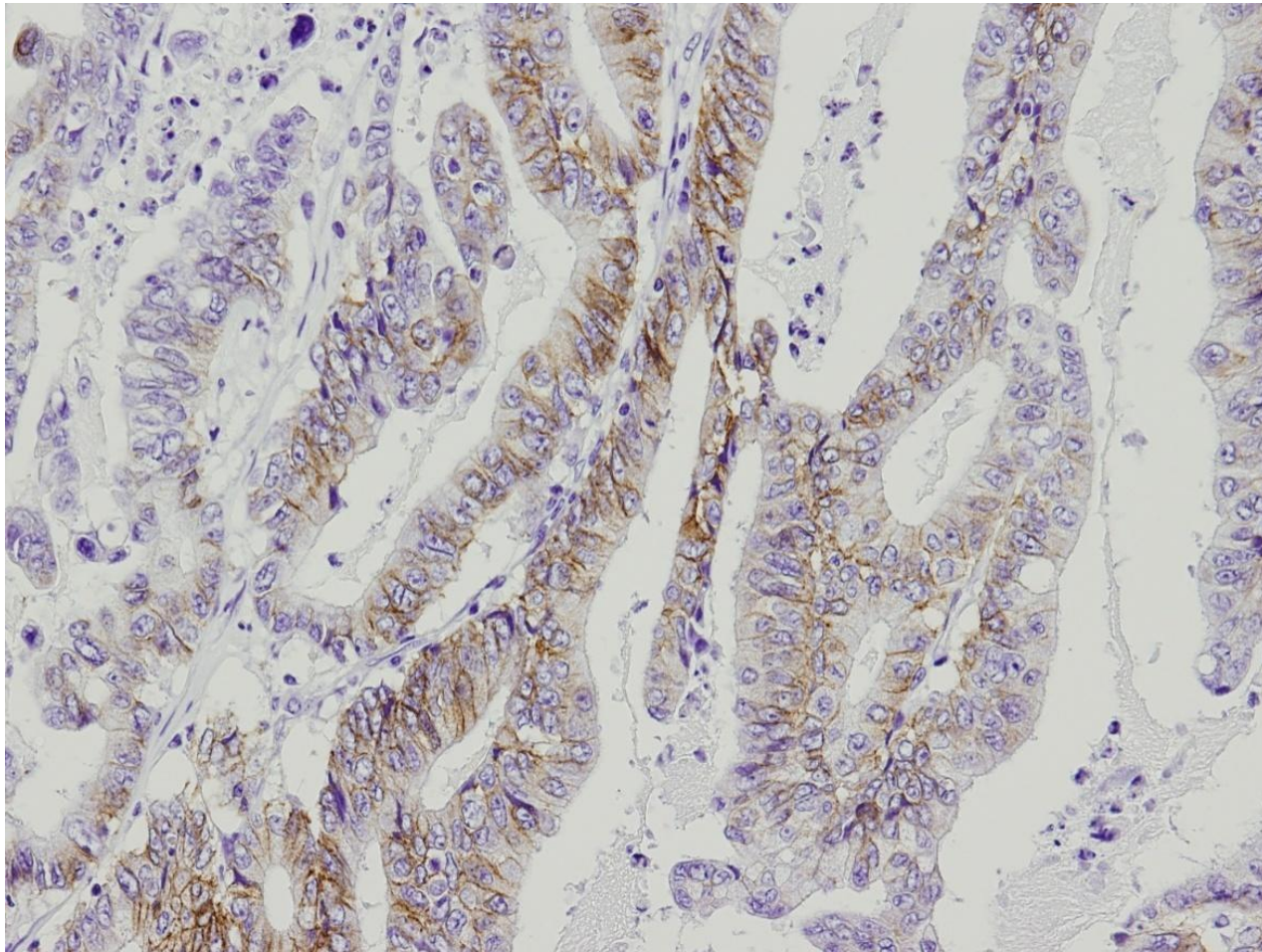
陽性とする膜染色パターン



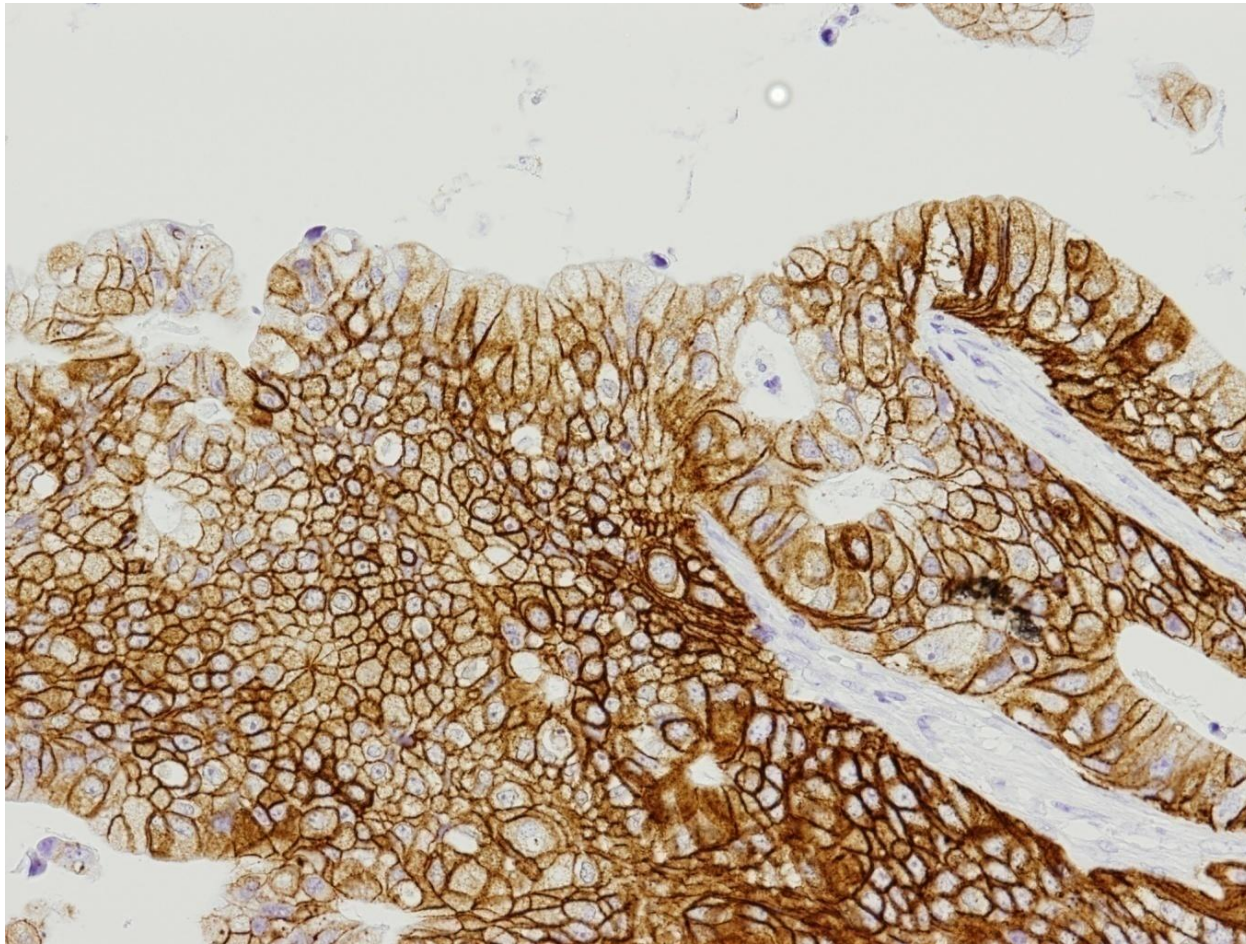
Score 1+



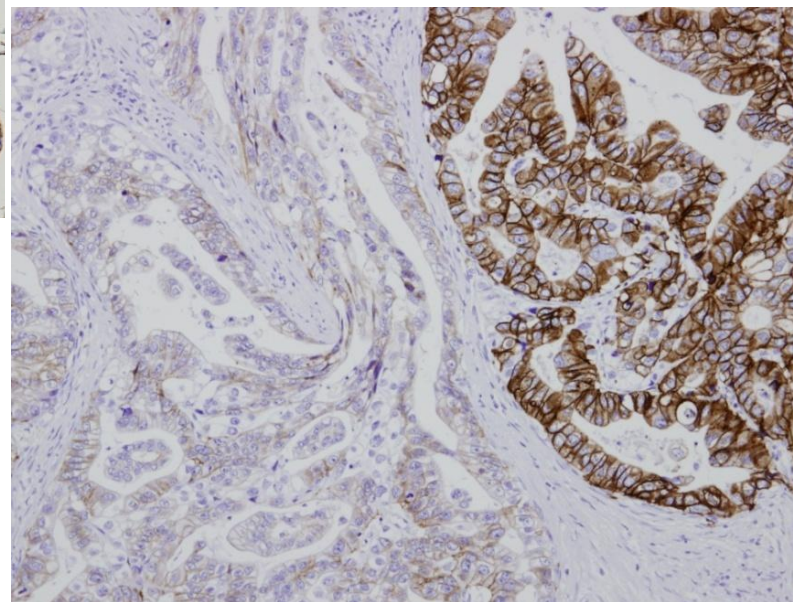
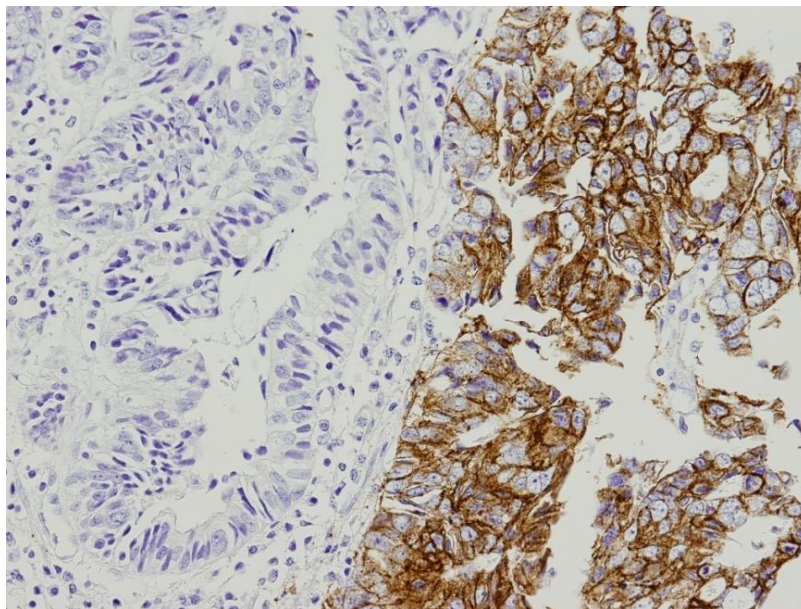
Score 2+



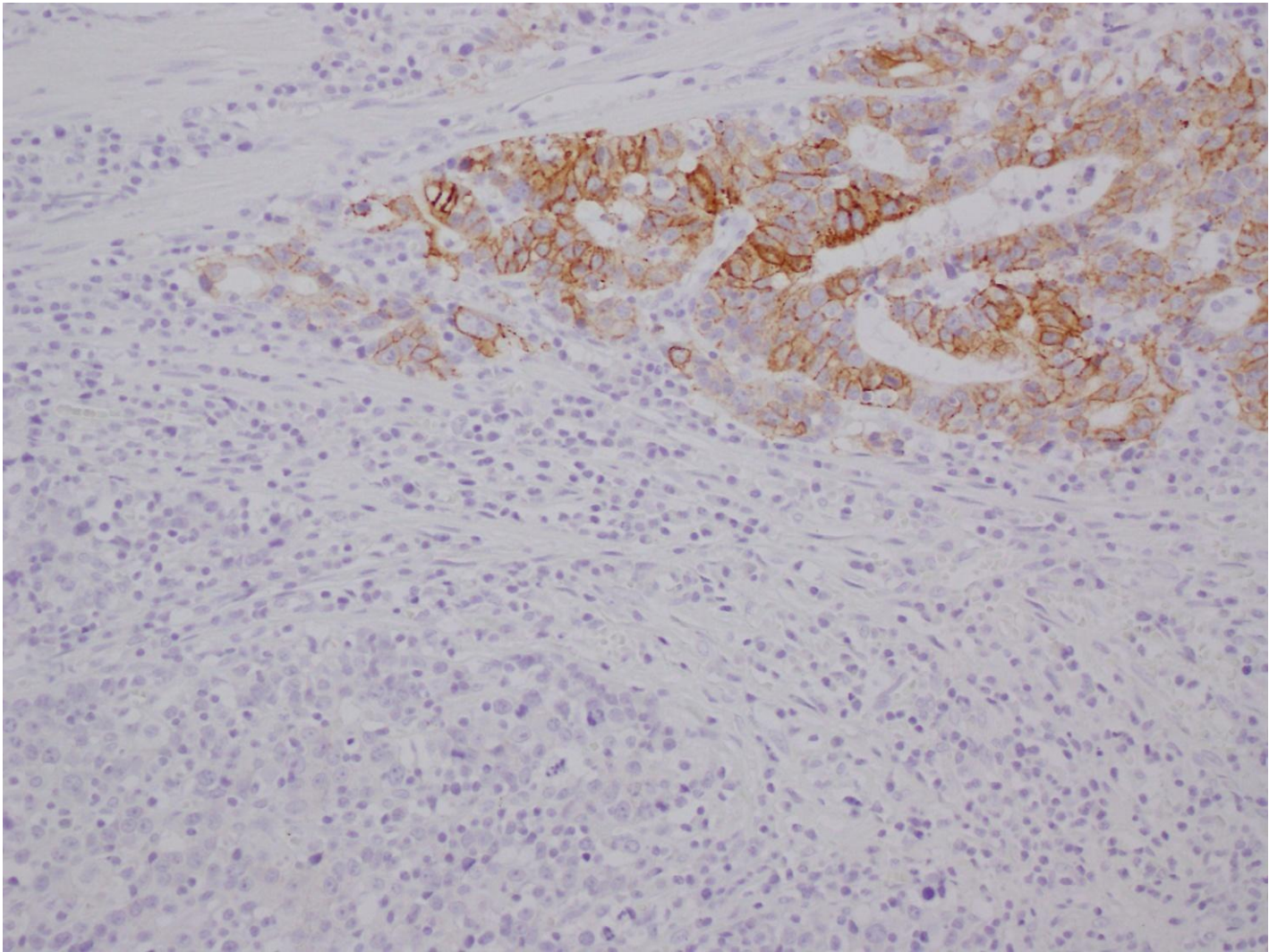
Score 3+



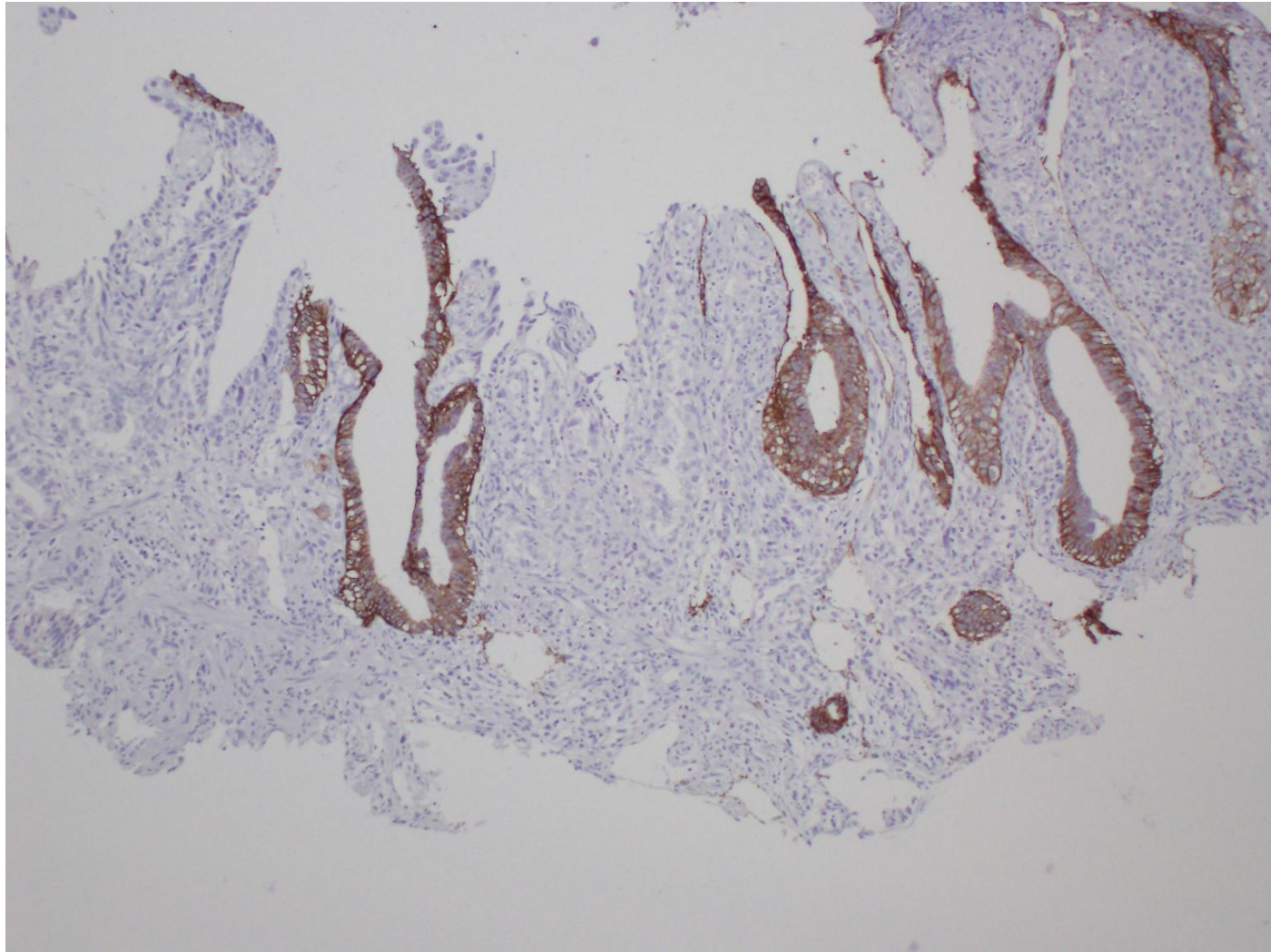
不均一性



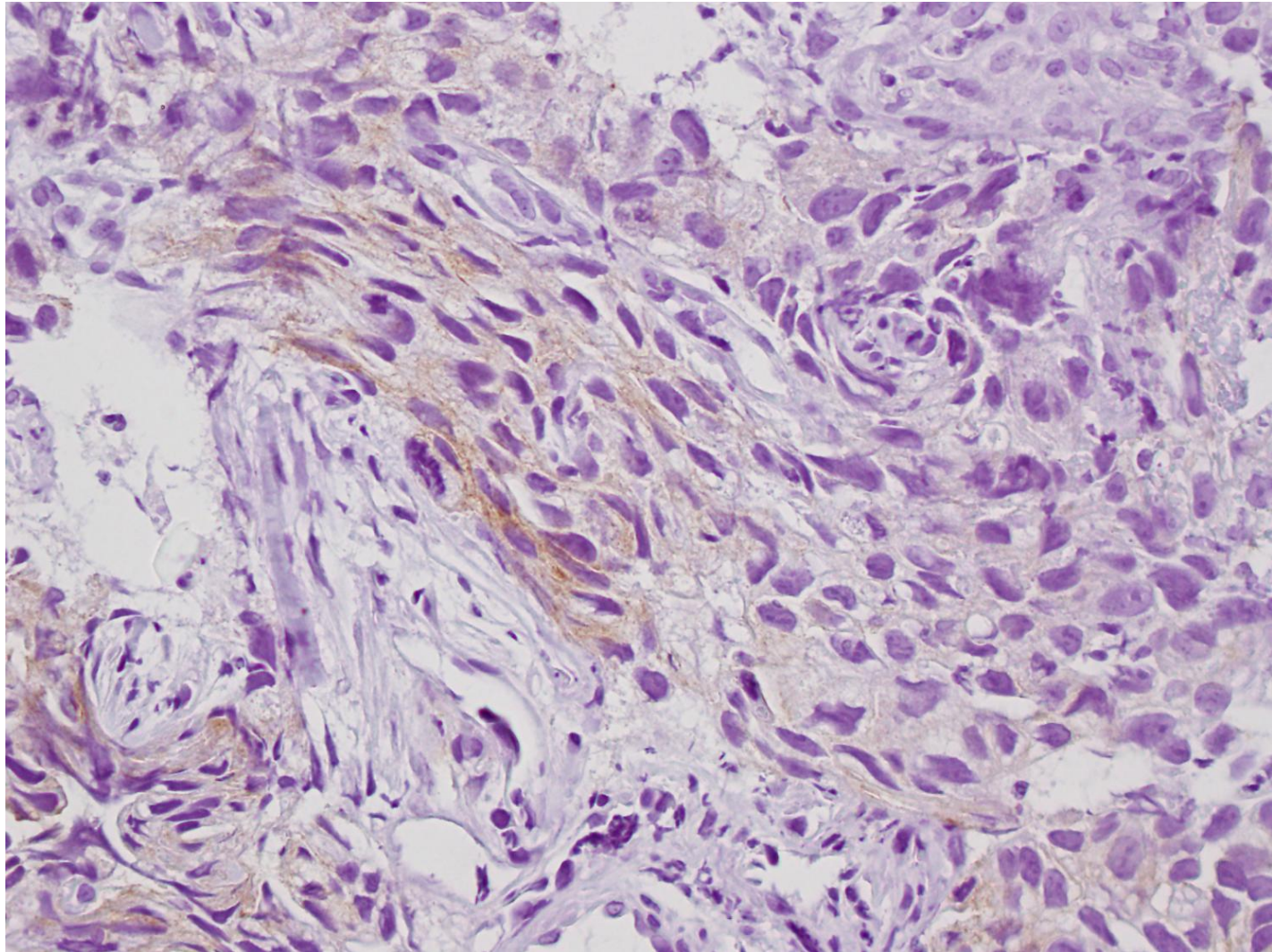
不均一性



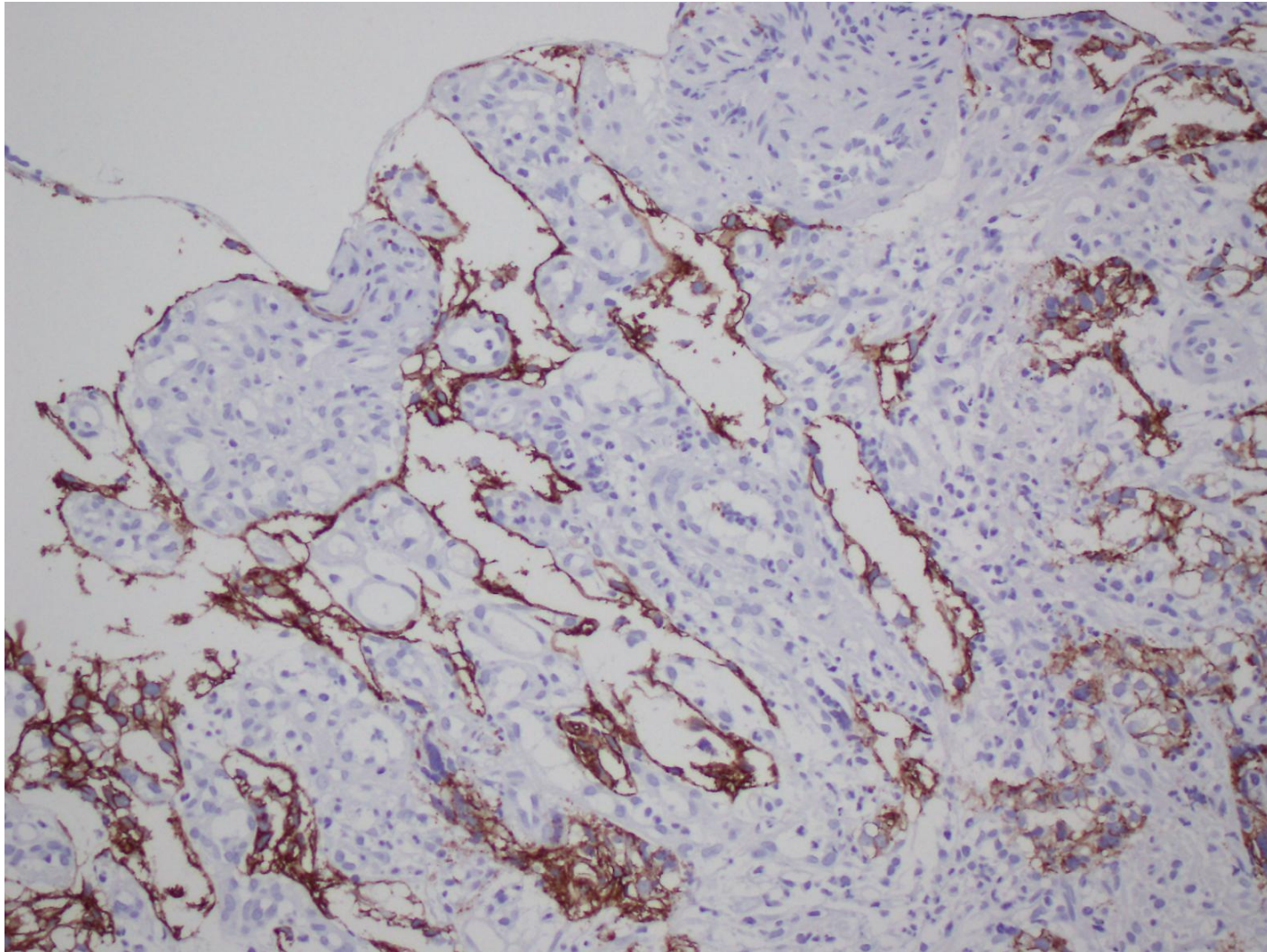
不均一性



Artifact 1

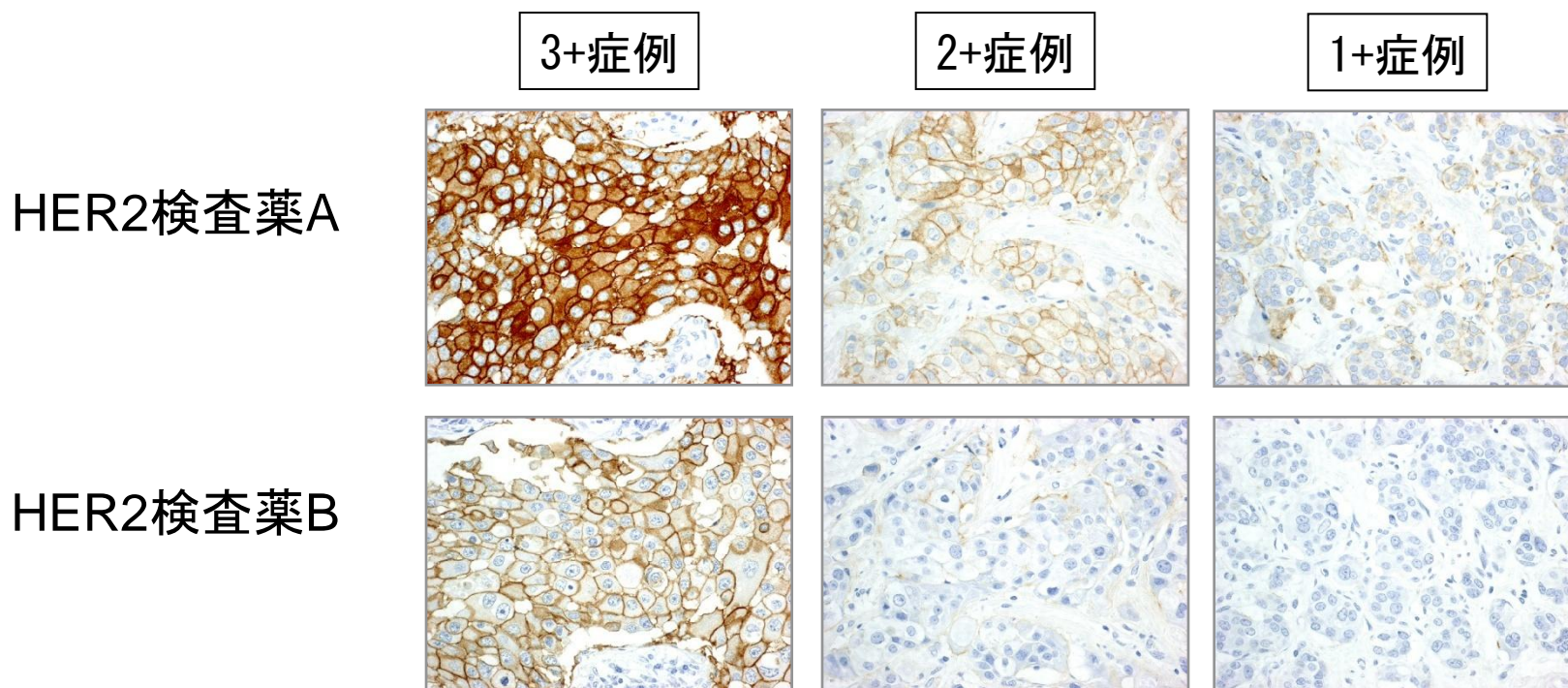


Artifact 2



異なるHER2検査薬での染色性

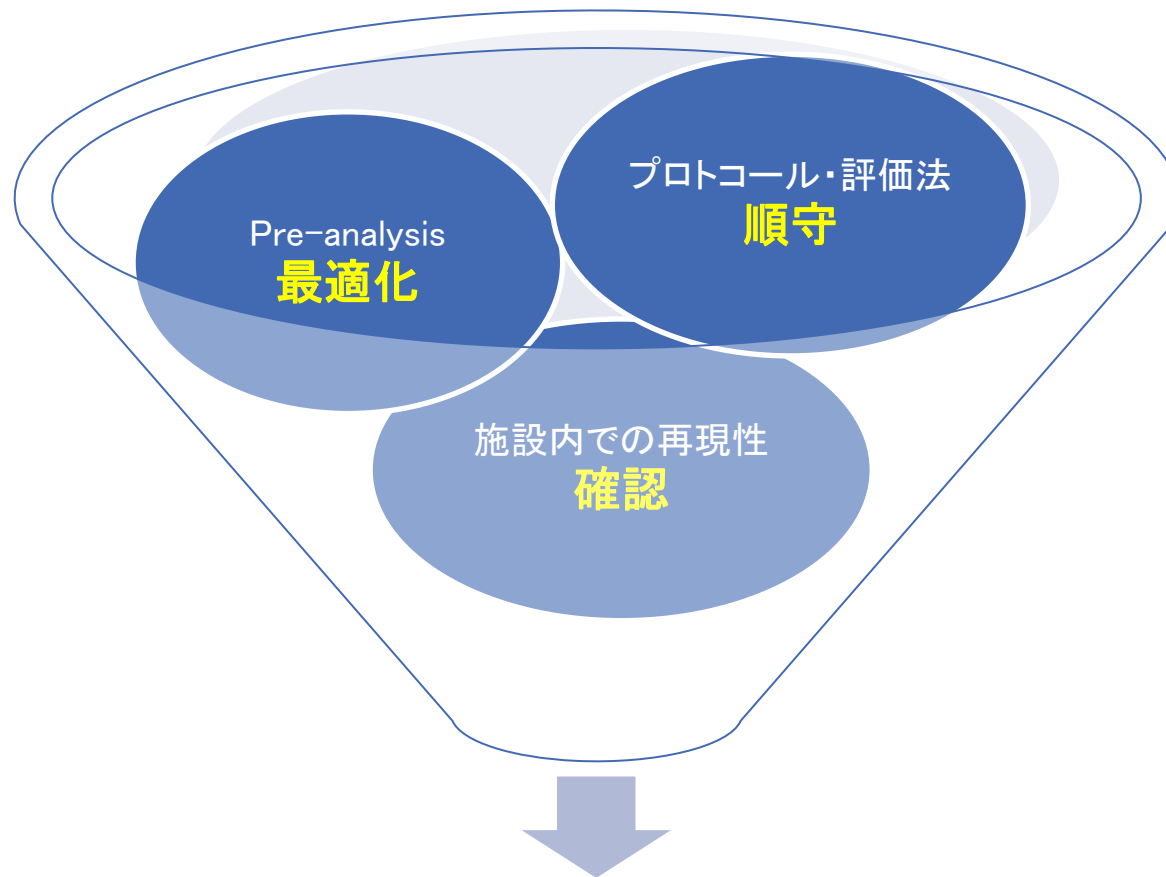
検査薬（体外診断用医薬品）間での差異



いずれのHER2検査薬も同じ評価方法・判定基準を採用しているが、結果の判定には注意を要する。

乳癌と胃癌の違い

	乳癌	胃癌
IHC 陽性率(2+/3+)	25~30%	22%±
IHCとFISHの一致率	高い(85~90%)	中程度(ToGAでは83%)
IHC(1+) のFISH陽性率	5%	15%
対象部位	浸潤部のみ	浸潤の是非は問わない
腫瘍内不均一性 (Heterogeneity)	稀	高頻度
判定クライテリア	標本材料を問わない	生検と手術材料で異なる
細胞膜への陽性像	全周性 O Shape	U, I, O Shape (Lateralが重要)
FISHの対象細胞	ランダムな20個	IHC(2+)の20個
Her2発現と予後との関係	予後不良	不明 (未だ結論に至っていない)



Right Screening

(ハーセプチン適応対象)



Thank you for your attention !