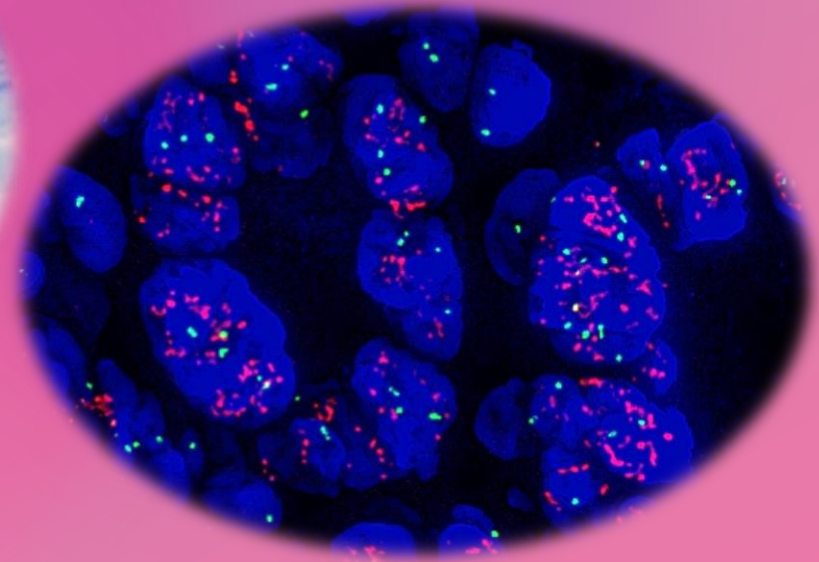
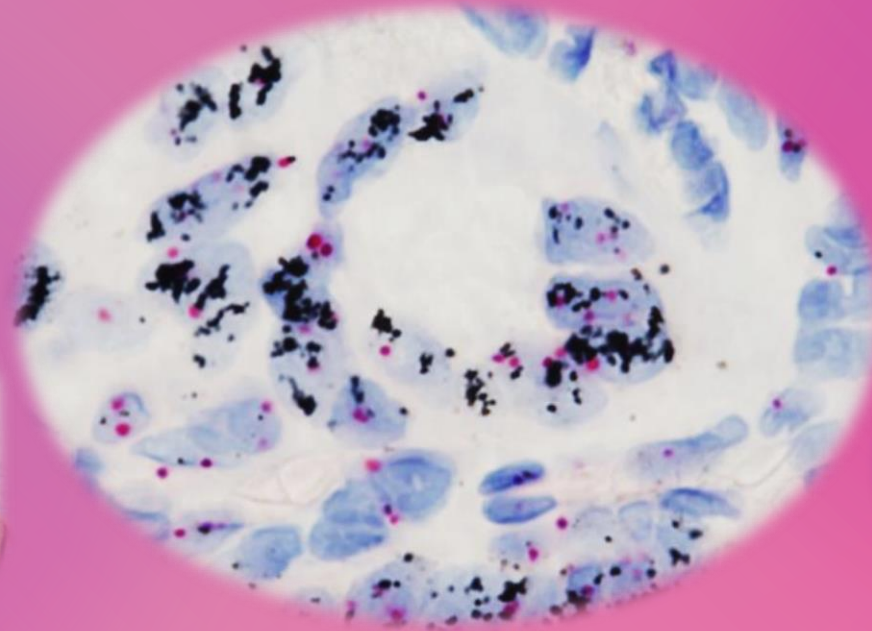
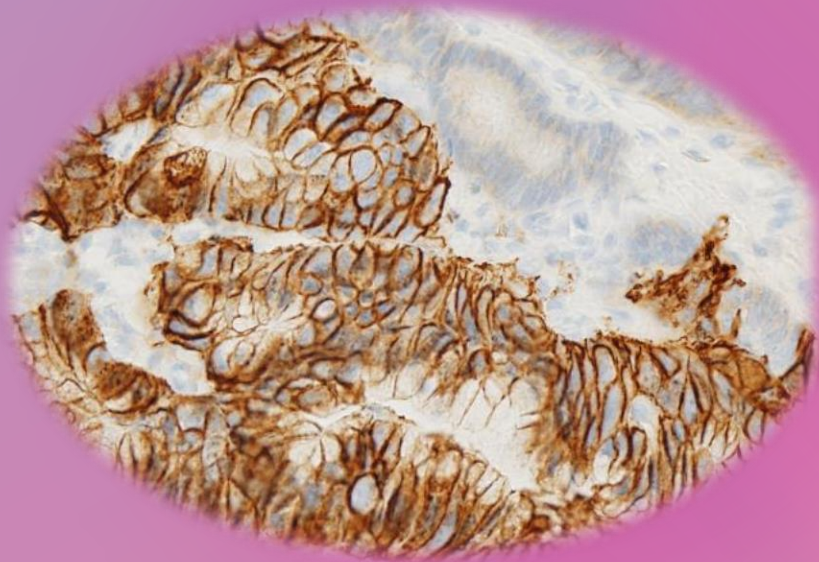


病理検査室におけるHER2 DISHの実践 ～免疫染色との比較～



帝京大学ちば総合医療センター 病理部

安達 純世

第2回 病理細胞検査研究班合同研修会 COI開示

筆頭演者；安達 純世

今回の演題に対して開示すべきCOIはありません

本日の内容

◆ 当院でのHER2遺伝子検査について

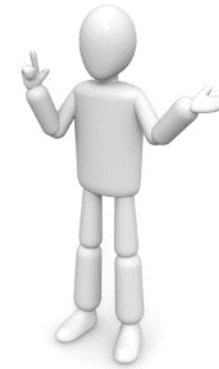
FISH法 ・ DISH法の導入
それぞれのメリット・デメリット

◆ DISH法の実践

免疫染色との比較
カウントの仕方と注意点
FISH法も！

◆ まとめ

HER2 ; human epidermal growth factor receptor type 2
FISH法 ; fluorescence *in situ* hybridization
DISH法 ; dual color *in situ* hybridization
IHC法 ; immunohistochemistry



本日の内容

◆当院での*HER2*遺伝子検査について

FISH法 ・ DISH法の導入 / それぞれのメリット・デメリット

◆DISH法の実践

免疫染色との比較

カウントの仕方と注意点

FISH法も！

◆まとめ



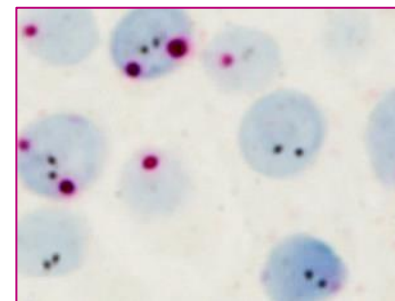
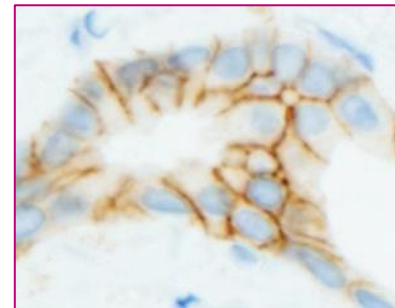
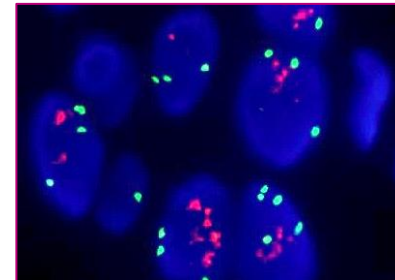
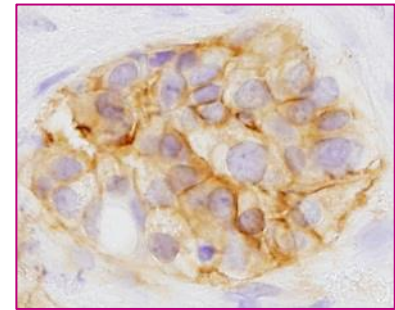
◇当院でのHER2検査について

2003年 HER2免疫染色 用手法

2007年 FISH法 導入

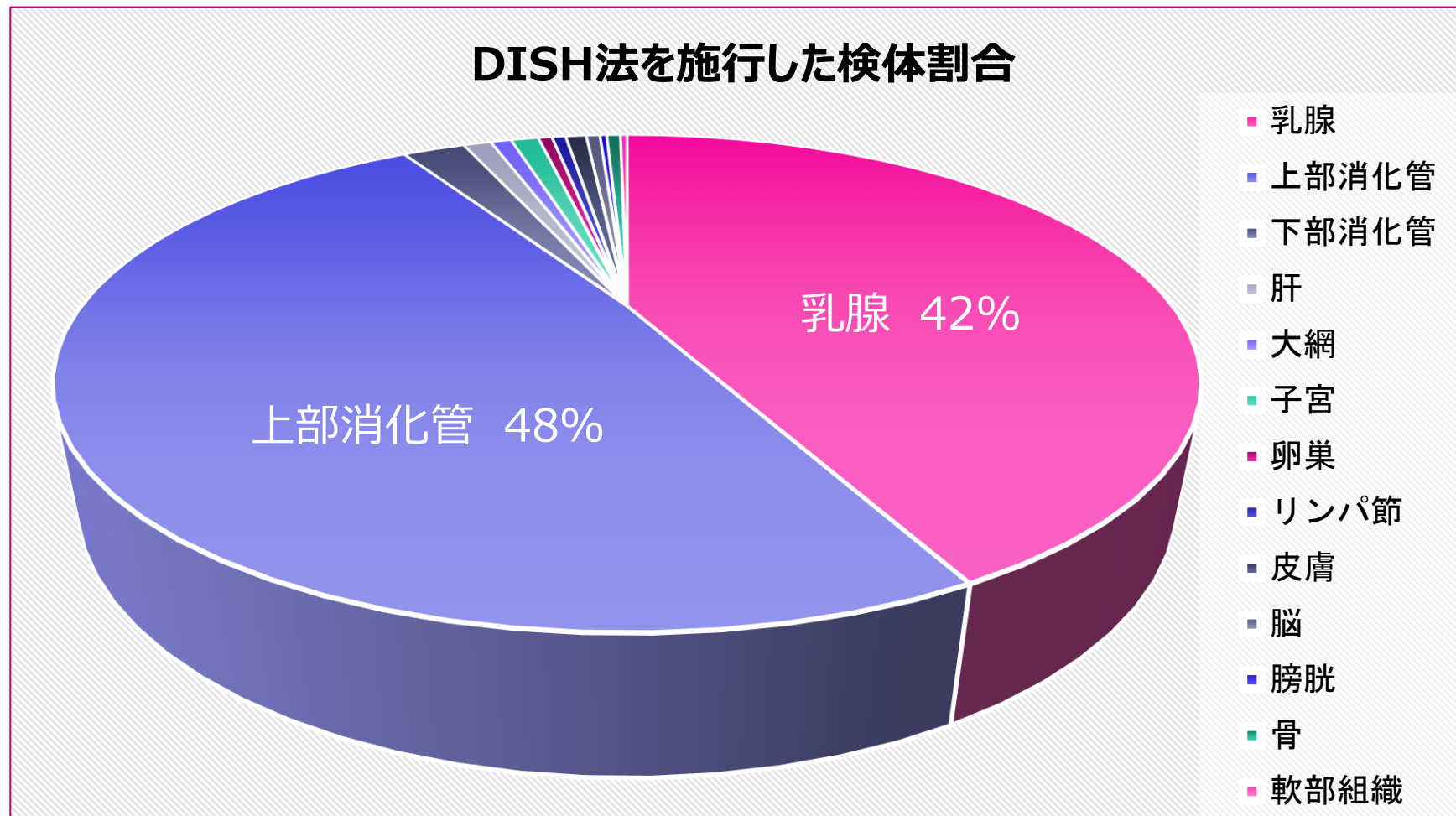
2009年 HER2免疫染色 自動染色機

2011年 DISH法 導入

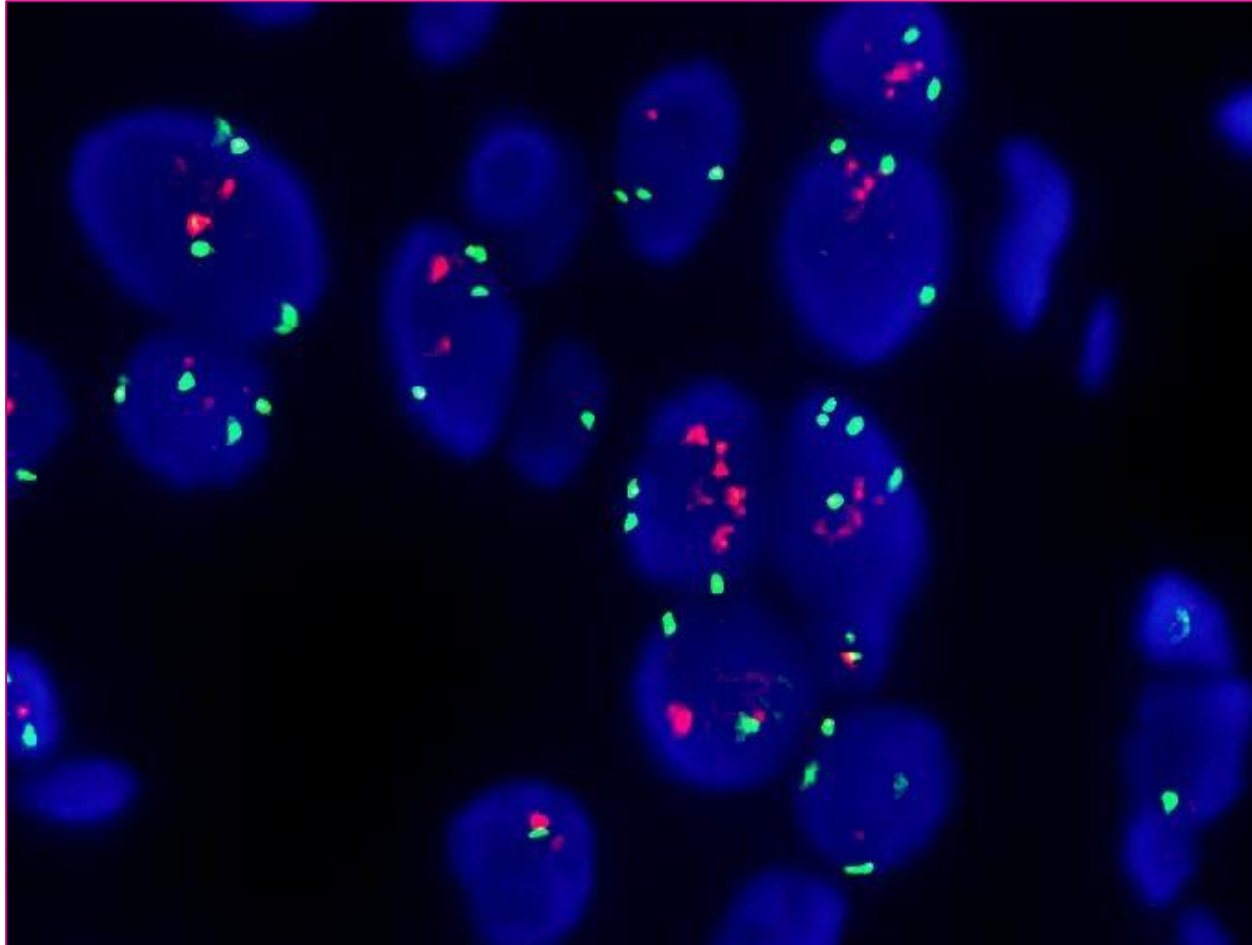


◇HER2遺伝子検査について (DISH法)

2011年～2022年 9月末まで約400件



◇*HER2*遺伝子検査について（FISH法）

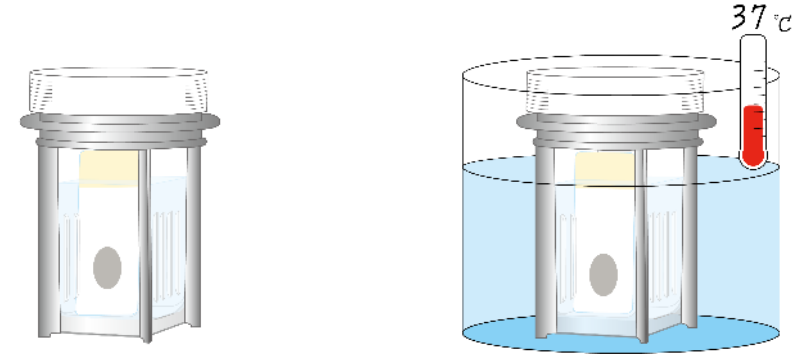


HER2のFISH法

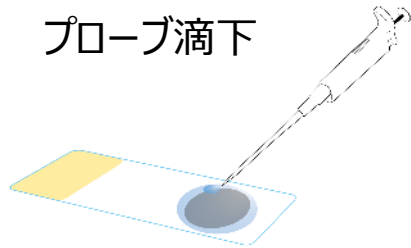
パスビジョン®HER-2 DNAプローブキット
デュアルプローブ使用 ((HER-2/*neu*)/(CEP17))

1日目 (⑤まで約2時間半)

- ①脱パラフィン
- ②前処理 プレトリートメント
- ③酵素処理 プロテアーゼ溶液
- ④再固定 10%中性緩衝ホルマリン液
- ⑤変性 ハイブリダイゼーション装置使用 (overnight)



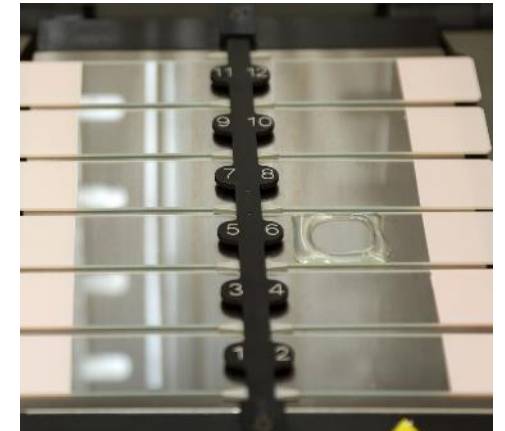
プローブ滴下



カバーガラス周囲をペーパーバンドで囲む



Dako hybridizer

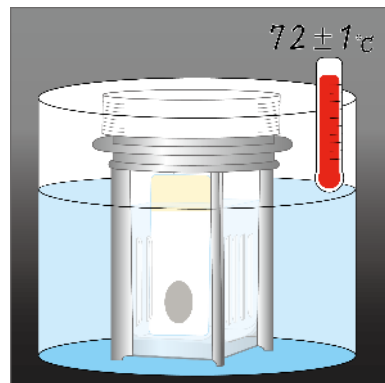


HER2のFISH法

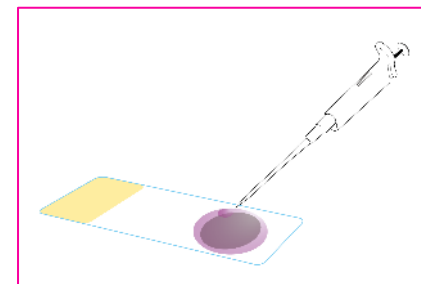
パスビジョン®HER-2 DNAプローブキット
デュアルプローブ使用((HER-2/*neu*)/(CEP17))

2日目 (約 1 時間半)

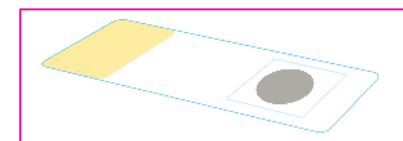
- ①ポストハイブリダイゼーション洗浄液中でカバーガラスをはがす
- ②ポストハイブリダイゼーション洗浄液
- ③洗浄
- ④対比染色



対比染色 DAPI



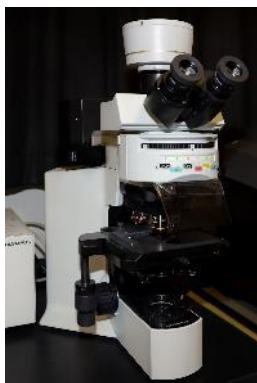
カバーガラス周囲を
マニキュアで囲み
遮光して保存



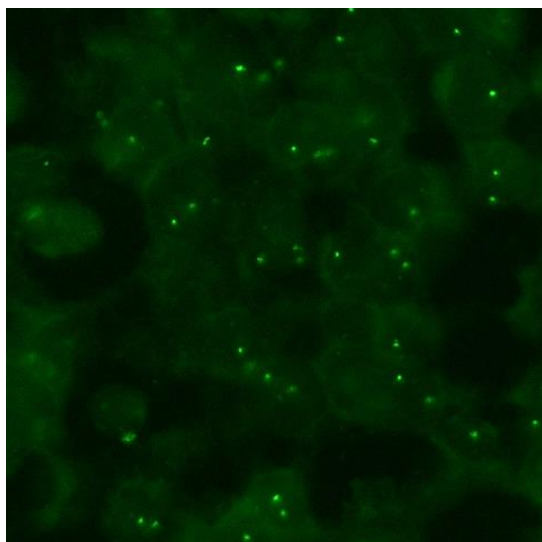
HER2のFISH法

観察・撮影（○時間 症例により時間もかかる）

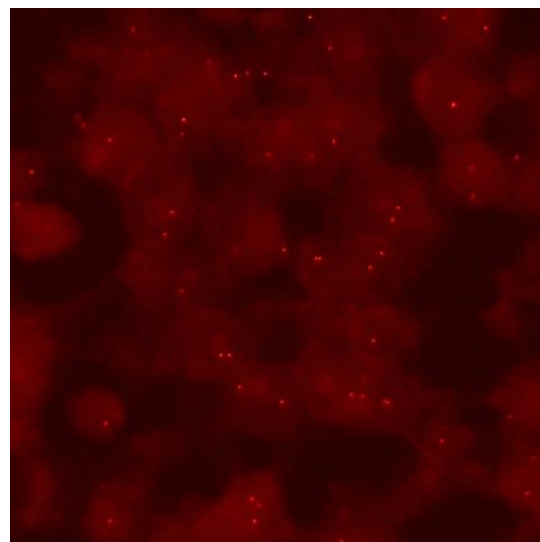
OLYMPUS 蛍光顕微鏡 BX51



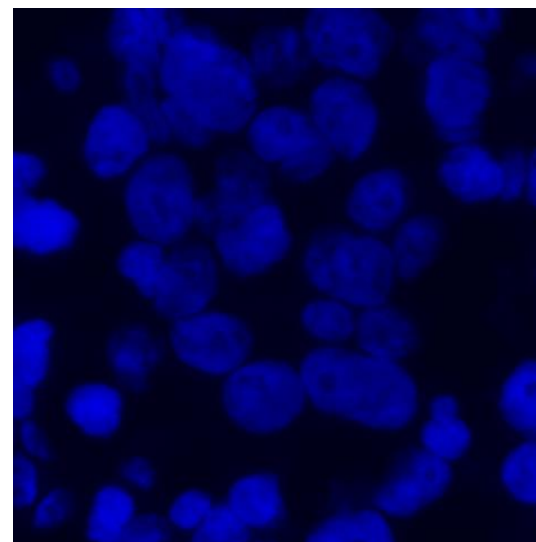
KEYENCE オールインワン蛍光顕微鏡 BZ-X700



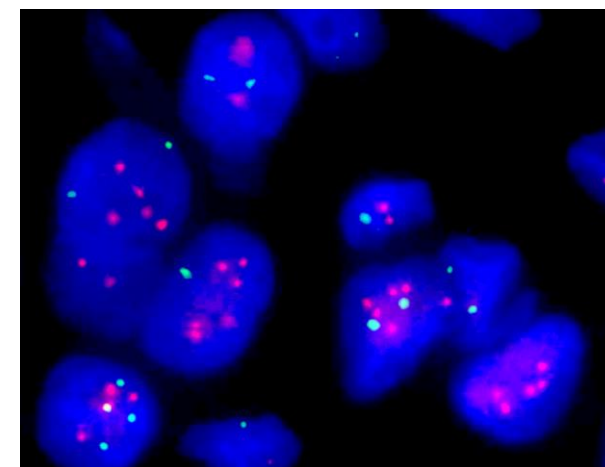
緑 ; CEP17



赤 ; HER2



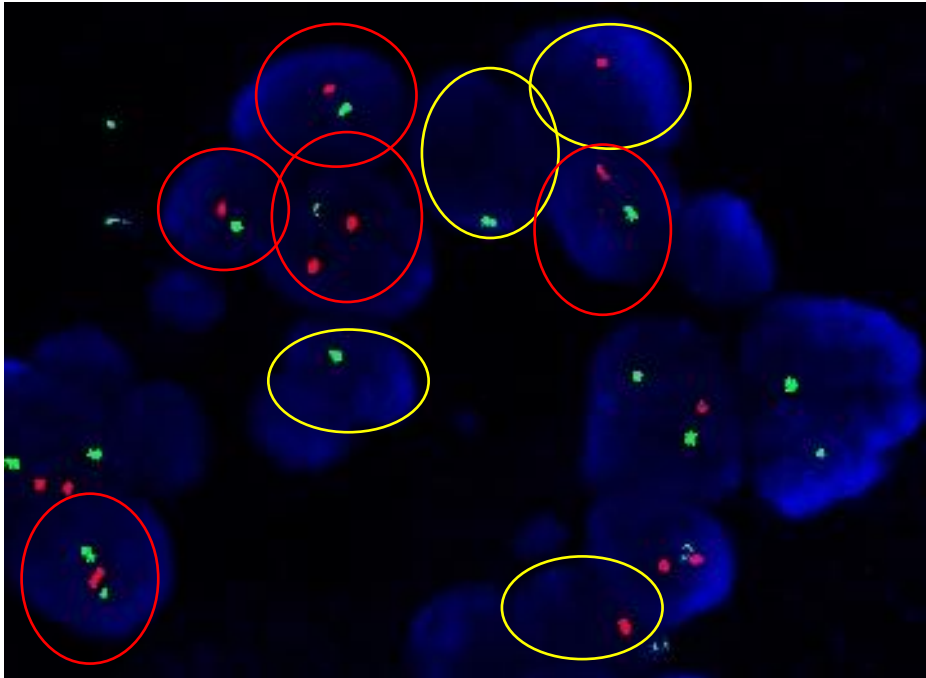
青 ; 核



HER2のFISH法

20個の癌細胞でHER2シグナル総数及びCEP17シグナル総数を計測し、 $HER-2neu/CEP17$ 比を算出

- ◆ ターゲットシグナルの認識
- ◆ 最適な観察領域と計測する核の選択
- ◆ シグナルを数える
シグナルの無い核や1色だけのシグナルしかない核は記録しない



評価のためのガイド

| | | |
|---|--|---|
| 1 | | 核が重なり合っていて、両方の核のすべてのエリアが見えるわけではないが、重なり合ったエリアにシグナルはない。この時は各々の核の中の2個のオレンジ色と2個のグリーン色のシグナルを数える。 |
| 2 | | 2個のオレンジ色と2個のグリーン色のシグナルを数える。このケースでは1個のオレンジ色のシグナルは拡散型である。 |
| 3 | | カウントしてはいけないケース。核が重なり合っていて、全ての核のエリアが見えておらず、いくつかのシグナルは重なり合ったエリアの中にある。 |
| 4 | | 2個のオレンジ色と2個のグリーン色のシグナルを数える。1個のオレンジ色のシグナルが2つに分かれて見える（分離型）。 |
| 5 | | オレンジ色のシグナルを1個に、グリーン色のシグナルを2個に数える。1個のグリーン色のシグナルと1個のオレンジ色のシグナルが分かれている。 |
| 6 | | オレンジ色のシグナルを2個に、グリーン色のシグナルを1個に数える。 |
| 7 | | オレンジ色のシグナルを3個に、グリーン色のシグナルを1個に数える。 |
| 8 | | オレンジ色のシグナルを4個に、グリーン色のシグナルを2個に数える。 |

● グリーン色のプローブ：CEP17 ● オレンジ色のプローブ：LSI HER-2/neu

パスビジョン®HER-2 DNAプローブキットより抜粋

HER2のFISH法

- ✓ 試薬・phの調整
- ✓ 各処理液の浸漬時間・温度管理
- ✓ 観察・撮影に時間がかかる
- ✓ 長期保存できない
- ✓ 結構大変なんです



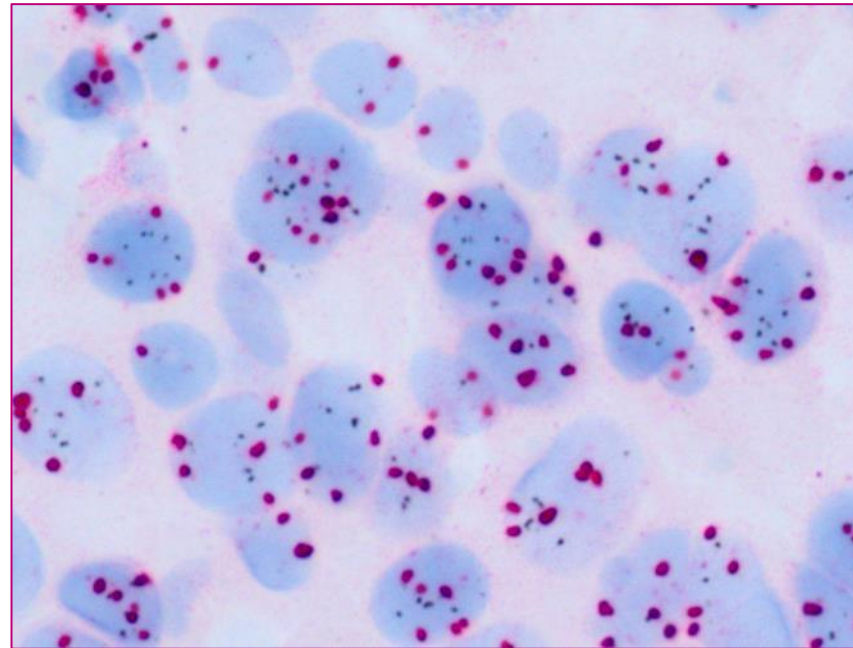
◇HER2のDISH法

ベンタナ インフォーム Dual ISH HER2 キット

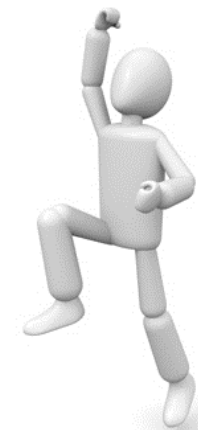


写真は現在のベンタナ ベンチマーク ULTRA
以前は ベンチマーク LT

- ①スキムミルク浸漬（現在はしていない）
- ②自動免疫染色装置 ベンタナ 試薬セット
- ③スライドガラスセット
- ④あとはお任せ
- ⑤洗浄・乾燥・封入



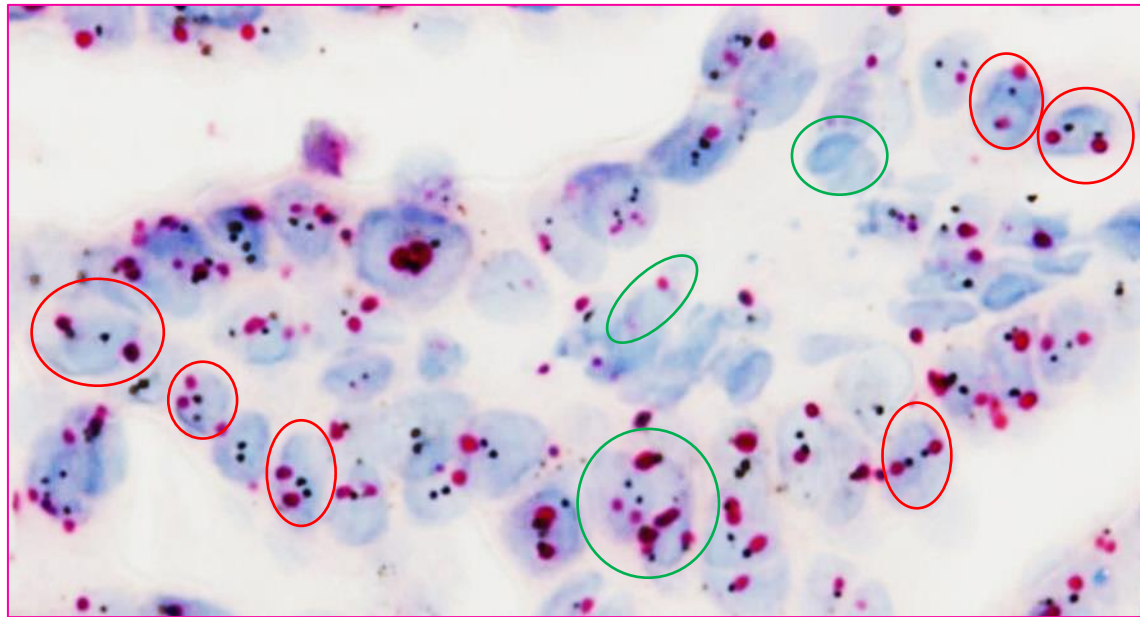
黒 ; HER2 赤 ; CEP17



HER2のDISH法

20個の癌細胞でHER2シグナル総数及びCEP17シグナル総数を計測し、HER2/CEP17比を算出

- ◆ 核の大きさが極端に大きいまたは小さくない
- ◆ 他の細胞との重なりがごくわずかであるか全くない
- ◆ 非特異的な染色が計数に影響を与えない腫瘍細胞の核
- ◆ 浸潤部における黒と赤のシグナル数が多い腫瘍細胞の核



黒 ; HER2 赤 ; CEP17

シグナルの出現パターン別計測方法

| | | | |
|--|---|--|--|
| | 核が重なっている細胞は計測対象から外す。 | | 複数のシグナルのクラスターは正常細胞のシグナル1個の大きさを基準にシグナル数を決定する。この細胞については、黒色(HER2)のシグナルは小さいクラスター1個でシグナル6個、単独のシグナルが2個、あわせて8個に数える。計測結果にクラスターを認めたことを記録する。 |
| | シグナルの認められない細胞は計測対象から外す。 | | この細胞については、黒色(HER2)のシグナルは大きいクラスターが1個でシグナル12個、単独のシグナルを4個、あわせて16個、赤色(CEP17)のシグナルを2個に数える。計測結果にクラスターを認めたことを記録する。 |
| | 二色のシグナルが認められない細胞は計測対象から外す。 | | 二色のシグナルが接近して認められる場合には、対物60Xのレンズで確認して、黒色(HER2)のシグナルを1個に赤色(CEP17)のシグナルを1個に数える。この細胞については、黒色(HER2)のシグナルを4個に赤色(CEP17)のシグナルを2個に数える。 |
| | シグナルが核の外に認められる細胞は計測対象から外す。 | | 黒色(HER2)のシグナルのクラスターに重なって、不鮮明な赤色(CEP17)のシグナルを認める場合、対物60Xのレンズで赤色(CEP17)のシグナルを確認する。 |
| | 黒色(HER2)のシグナルを1個に赤色(CEP17)のシグナルを1個に数える。 | | 核内に黒色のダスト状のバックグラウンドを認めた場合、明らかにシグナルと確認できるもののみを数える。 |
| | 黒色(HER2)のシグナルを2個に赤色(CEP17)のシグナルを2個に数える。 | | シグナル様の不鮮明な赤色のドットを認めた場合、シグナルとの鑑別に注意が必要であり、染色強度の違いで鑑別する。この細胞については、黒色(HER2)のシグナルを2個と赤色(CEP17)のシグナルを2個とする。 |
| | 黒色(HER2)のシグナルを1個に赤色(CEP17)のシグナルを2個に数える。同色の2個のシグナルが、シグナルの直径と同じ距離、または直径よりも短い距離に位置する場合は、1個のシグナルとして数える。 | | |

○シユ ベンタナ DISH HER 2 キット判定ガイドより抜粋

◇HER2遺伝子検査法の比較

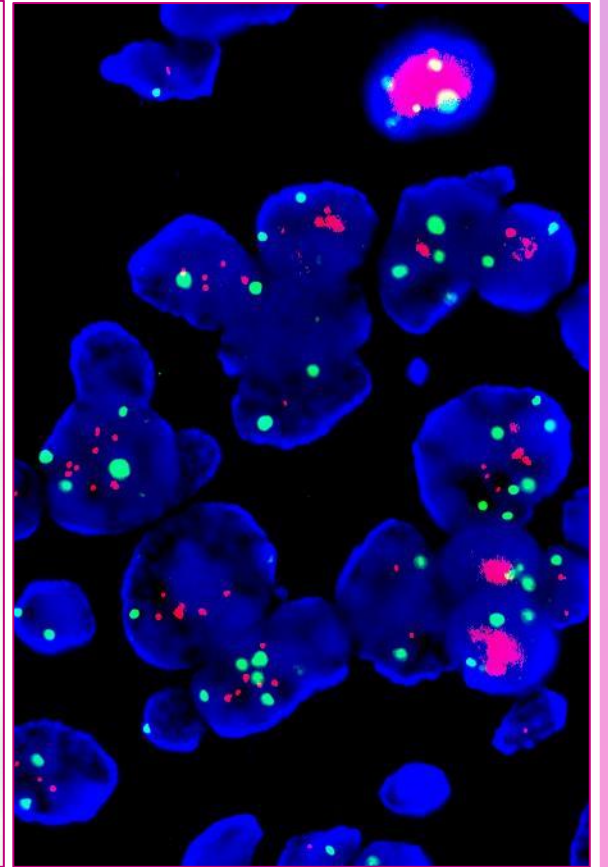
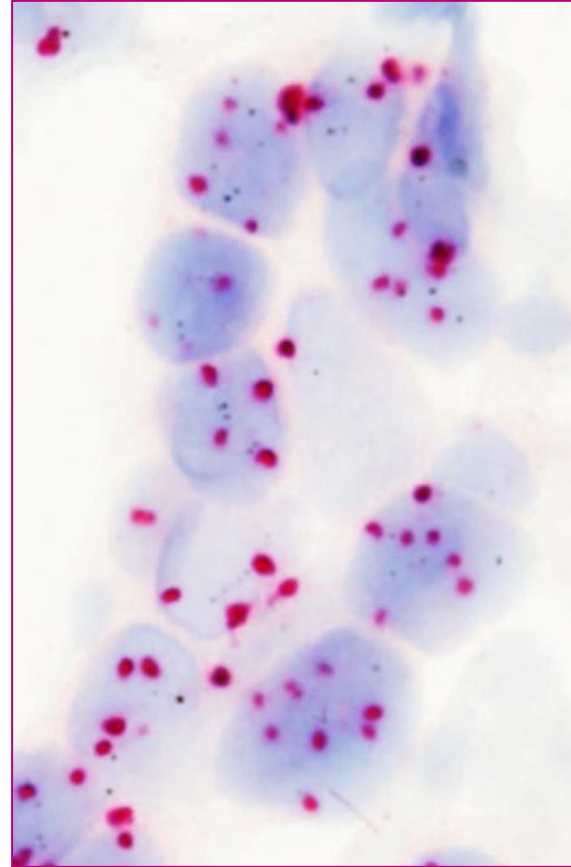
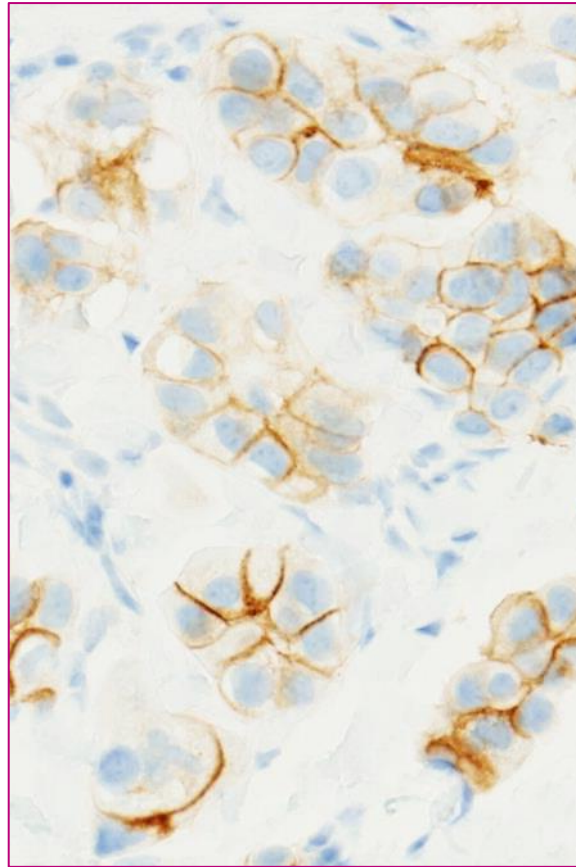
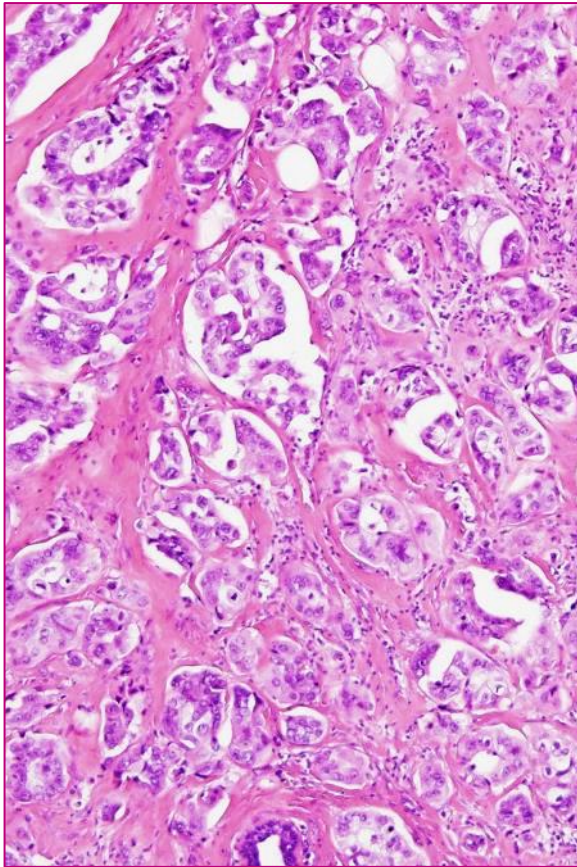
| | DISH法 | FISH法 |
|-----------|------------|----------|
| 染色方法 | 自動染色機 13時間 | 用手法 2日間 |
| 観察方法 | 光学顕微鏡 | 蛍光顕微鏡 |
| 腫瘍細胞の抽出 | 容易 | 困難な場合もある |
| シグナルのカウント | 容易ではある | 容易ではある |
| 長期保存 | 可能 | 不可能 |

Invasive micropapillary carcinoma

Nuclear grade 3

IHC法 ; 2+

HER2 /CEP17比 <2.0

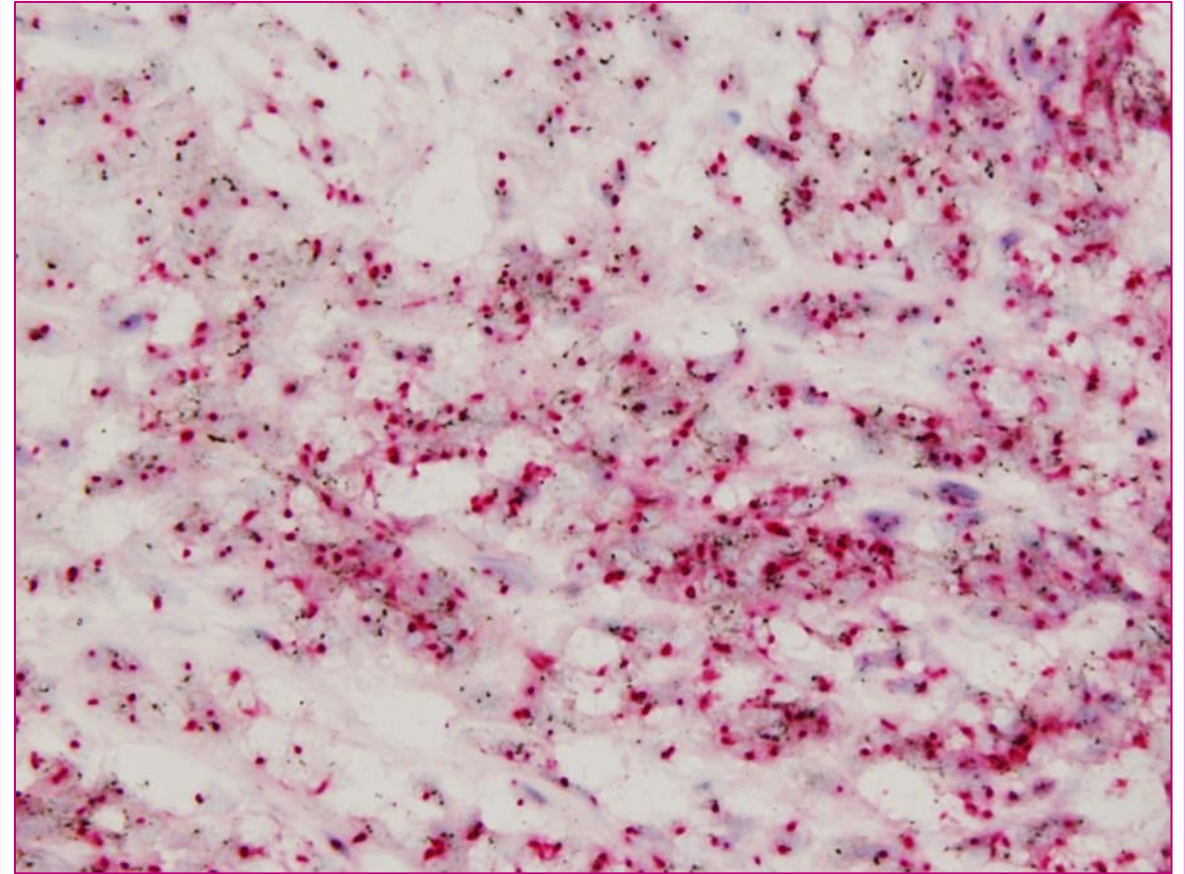
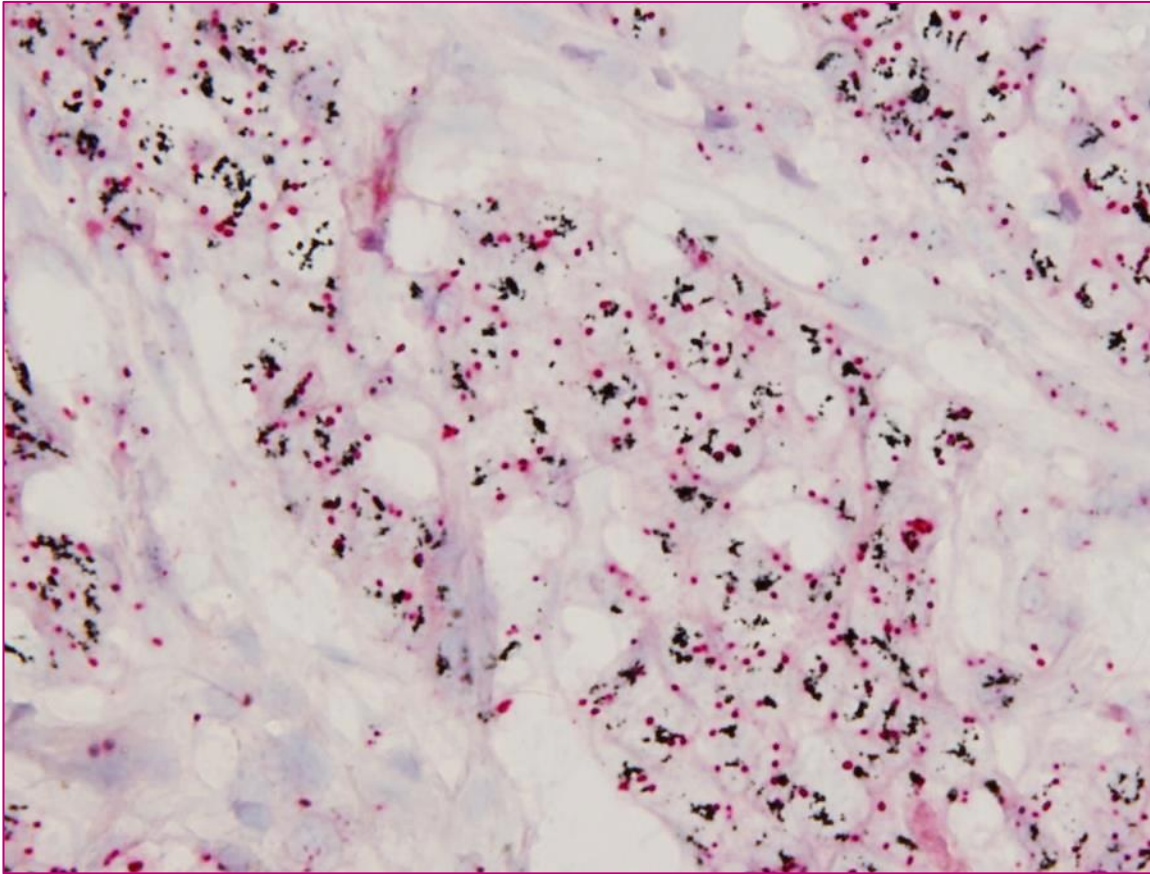


DISH法は自動染色機お任せで楽ではありますが…

乳腺

背景が赤く染まっている

胃



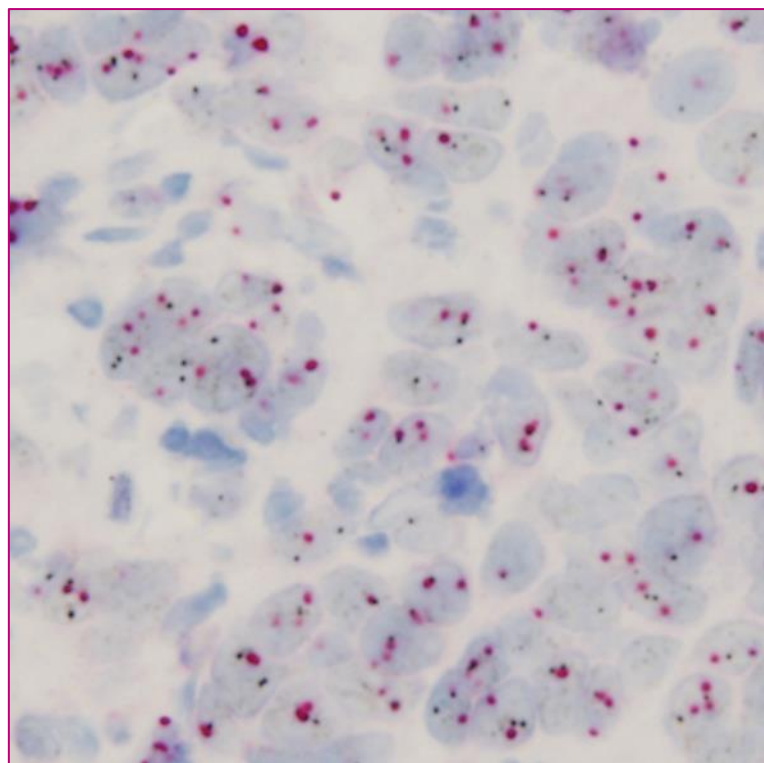
シグナルのカウントに影響なければ判定してよい

DISH法は自動染色機にお任せで楽ではありますが…



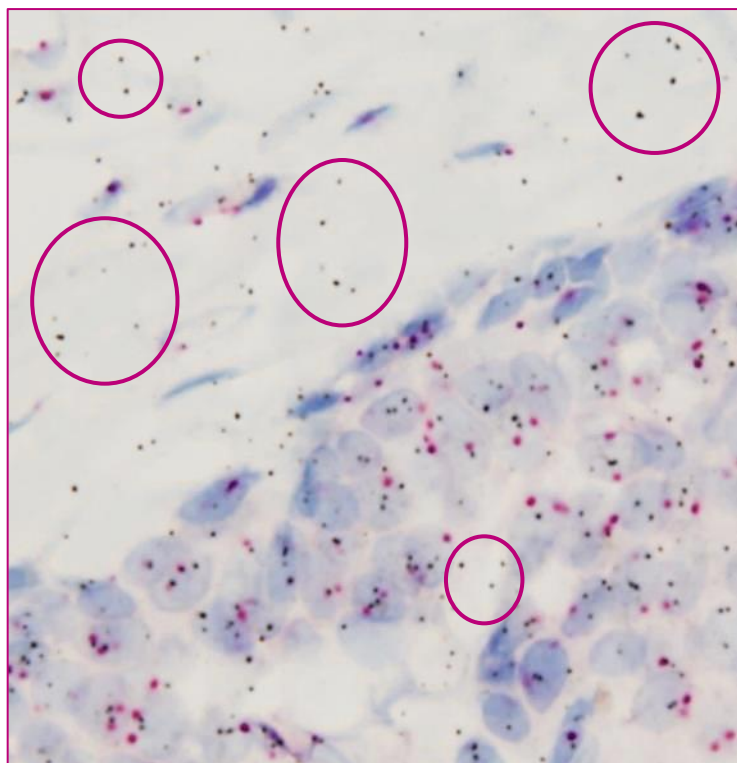
背景（細胞外）に黒色顆粒がある

全体に砂をまいたような細顆粒

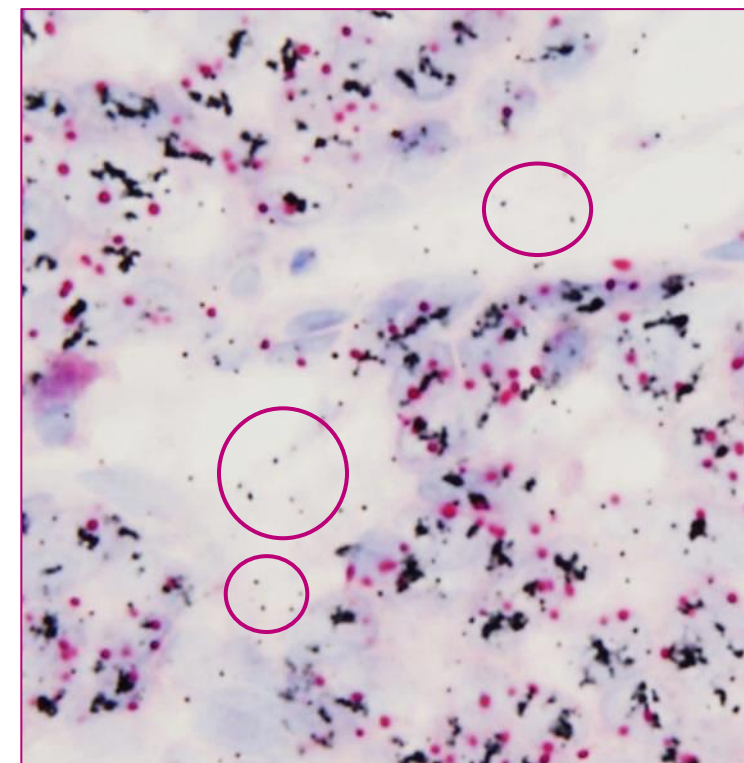


判定可能

シグナルと判別不能な顆粒



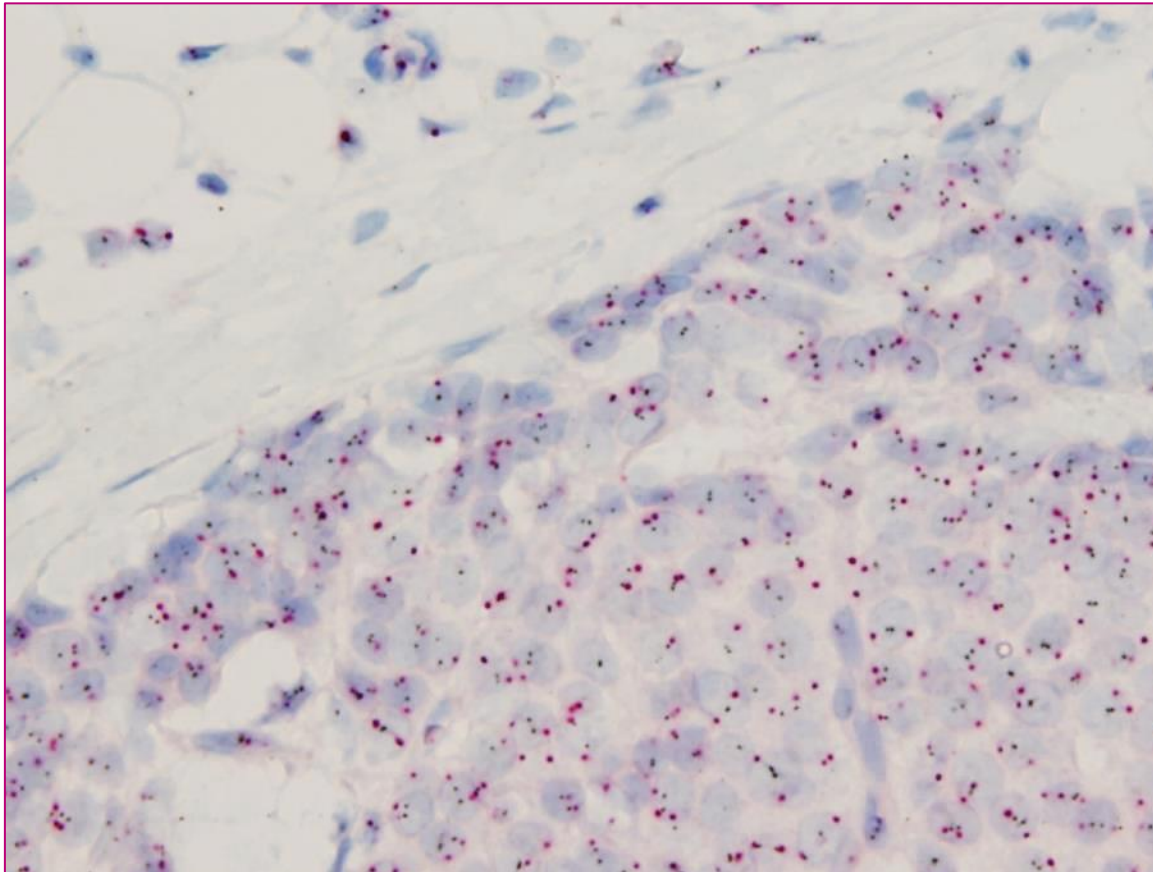
判定不可能



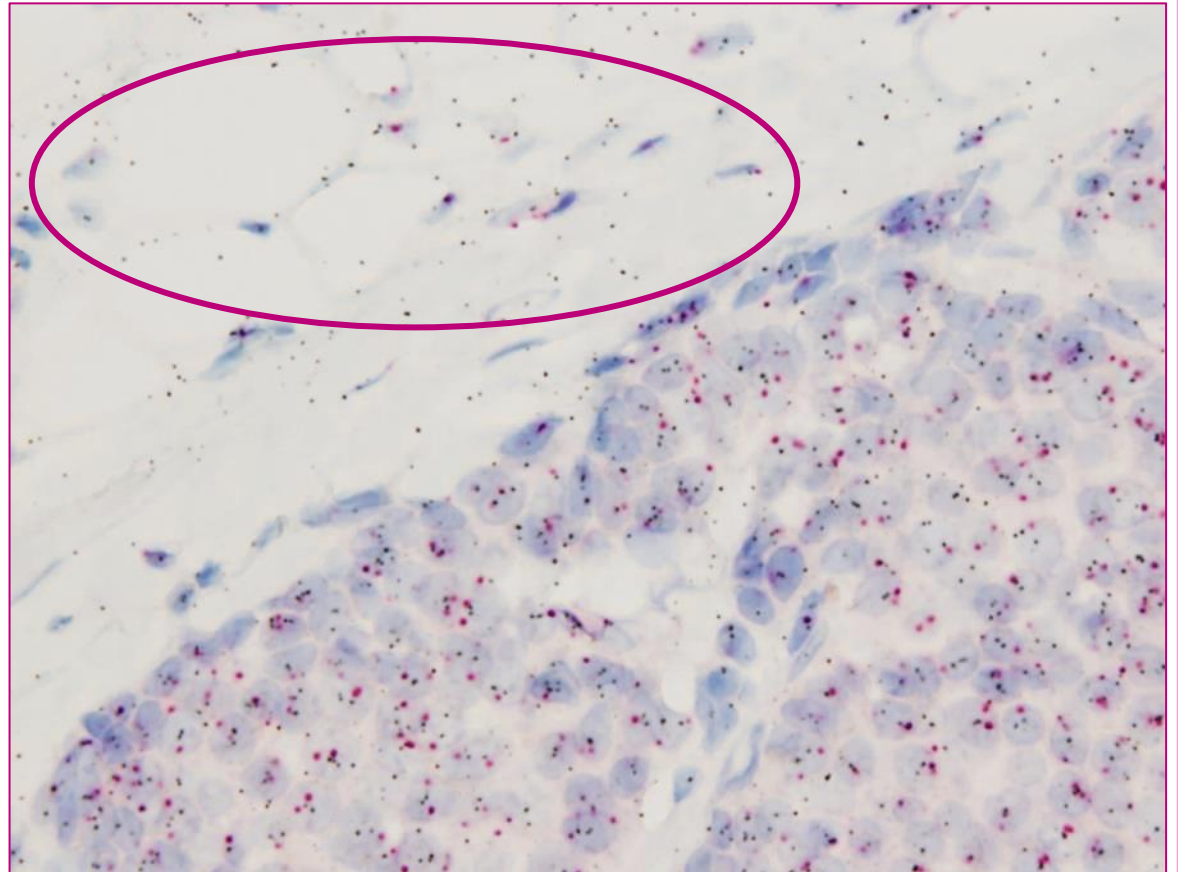
判定可能

コーティングガラスの検討

A社 ; 細胞外への顆粒なし



B社 ; 細胞外への顆粒あり



プロトコール見直し 1

| Selectable Procedure Step | BenchMark ULTRA instrument | 帝京ちば ULTRA instrument |
|---------------------------|---|---|
| Cell condictioning | Selected Cell Conditioning CC2 86°C Mild CC2 8min standerd CC2 12min Extended CC2 8min | Selected Cell Conditioning CC2 86°C Mild CC2 12min standerd CC2 12min Extended CC2 12min |
| ISH-Protease 3 | 16 min | 16 min |
| Denaturation | 20 min | 20 min |
| Hybridization | 6 hours | 6 hours |
| Stringency wash | 76°C | 72°C |
| SISH Multimer | 32 min | 20 min |
| Silver Chromogen | 4 min | 4 min |
| Red ISH Multimer | 24 min | 32 min |
| Red Chromogen | 8 min | 8 min |
| Counterstain | Hematoxylin-8min | Hematoxylin-8min |
| Post Counterstain | Bluing Reagent-4min | Bluing Reagent-4min |

プロトコル見直し 2

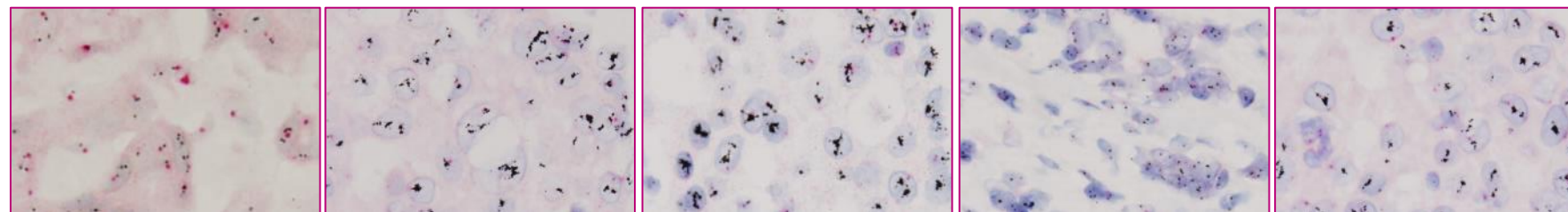
プロトコルの条件変更と期待される効果

| 変更項目と可変範囲 | 効果対象 | 反応時間:短縮 反応温度:低下 | ← | → | 延長 上昇 |
|--|----------|--------------------|---|---|----------|
| Cell Conditioning (CC2) 処理時間: 8-16 min × 1-3 cycles | シグナル | 弱い | ← | → | 強い |
| | バックグラウンド | 低い | ← | → | 高い |
| | 核染色 | 濃い | ← | → | 薄い |
| | 細胞形態 | ダメージ弱い | ← | → | ダメージ強い |
| ISH Protease 3 処理時間: 4-32 min | シグナル | 弱い | ← | → | 強い |
| | バックグラウンド | 低い | ← | → | 高い |
| | 核染色 | 濃い | ← | → | 薄い |
| | 細胞形態 | ダメージ弱い | ← | → | ダメージ強い |
| Stringency Wash温度: 72-76°C | バックグラウンド | 高い | ← | → | 低い |
| SISH Multimer: 12-60 min Silver Chromogen: 4-12 min | シグナル | 弱い | ← | → | 強い |
| | バックグラウンド | 低い | ← | → | 高い |
| Red Multimer: 12-60 min Red Chromogen: 4-12 min | シグナル | 弱い | ← | → | 強い |
| | バックグラウンド | 低い | ← | → | 高い |

Roche HER2検査ガイドより抜粋

賦活化・洗浄時間・染色時間の見直し

| プロトコールNo. | 111 従来法 | 800 | 801 | 802 | 803 |
|-------------------------|----------|----------|----------|--------|----------|
| Baking | - | - | - | - | - |
| Depara | - | - | Ext | Ext | Ext |
| CC2 | 12-12-12 | 12-12-12 | 12-12-12 | 8-12-8 | 12-12-12 |
| Protease3 | 16 | 16 | 16 | 16 | 16 |
| Deneturation | 20 | 20 | 20 | 20 | 20 |
| Hybridization | 6h | 6h | 6h | 6h | 6h |
| Wash | 72°C | 76°C | 76°C | 76°C | 76°C |
| SISH Multimer-Chromogen | 20-4 | 32-4 | 32-8 | 32-8 | 28-4 |
| Red Multimer-Chromogen | 32-8 | 32-8 | 24-8 | 24-8 | 24-8 |
| Hemato-Bluing | 8-4 | 8-4 | 8-4 | 8-4 | 8-4 |



新しく生まれかわった ベンタナ DISH HER2 キット

オリゴプローブの採用と非内因性物質をハプテンとして標識

- ◆ 染色時間の短縮 ; ULTRA 乳癌 8h36m, 胃癌 8h24m
- ◆ バックグラウンドの軽減
- ◆ 信頼性の高いクリアなシグナル
- ◆ 初回成功率の改善

| | | |
|------------|------|--------------------|
| 518-114800 | ベンタナ | HER2 DNA カクテルプローブ |
| 518-114817 | ベンタナ | Silver ISH DNP キット |
| 518-114824 | ベンタナ | Red ISH DIG キット |

ベンチマーク各機種および材料における推奨プロトコール

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

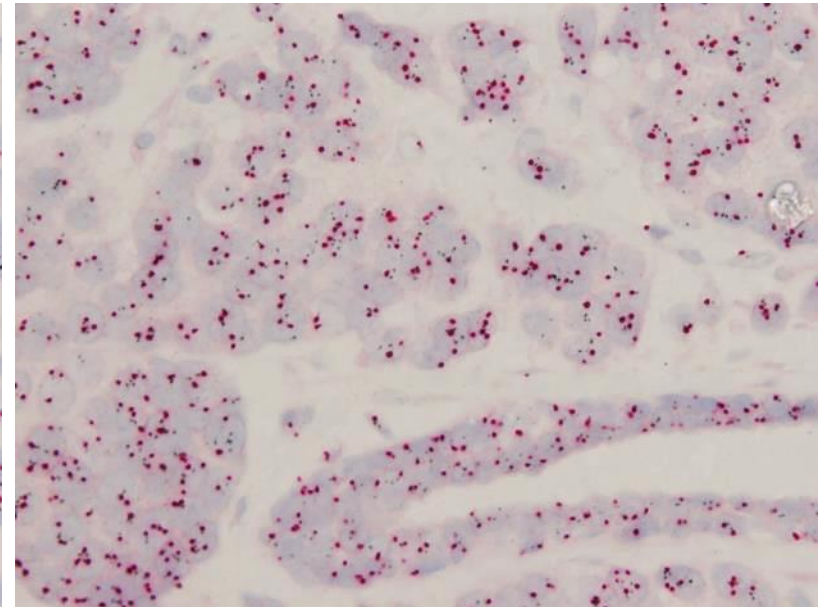
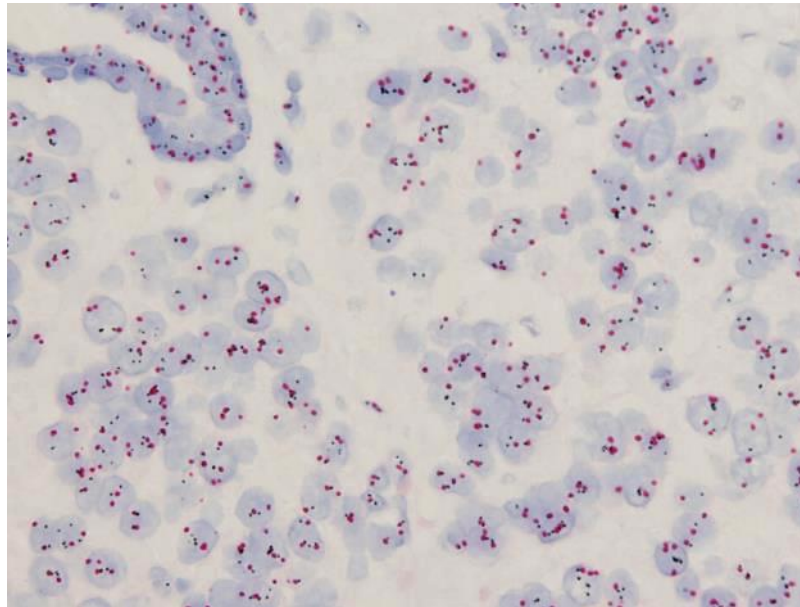
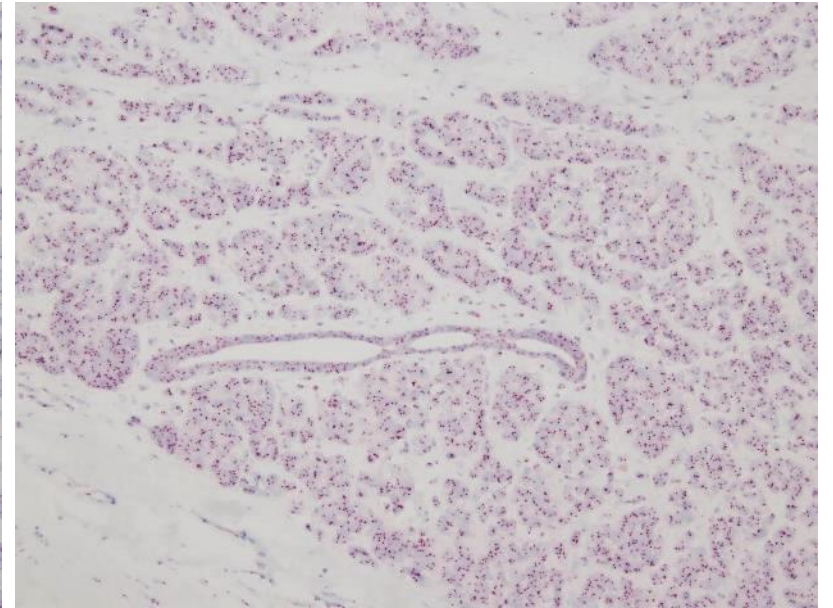
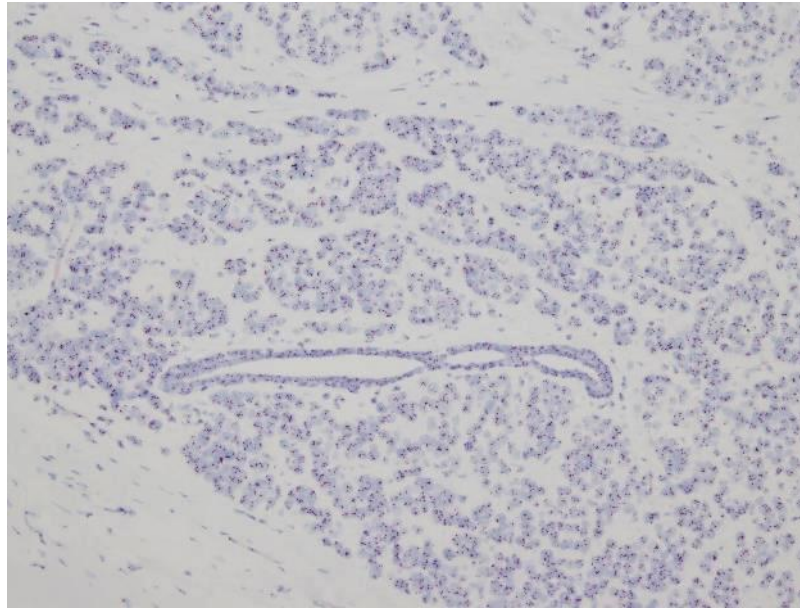
従来法 ; CC1での熱処理はしていない. 洗浄は72°C.

Roche HER2 検査ガイドより抜粋

New kit

従来のキット

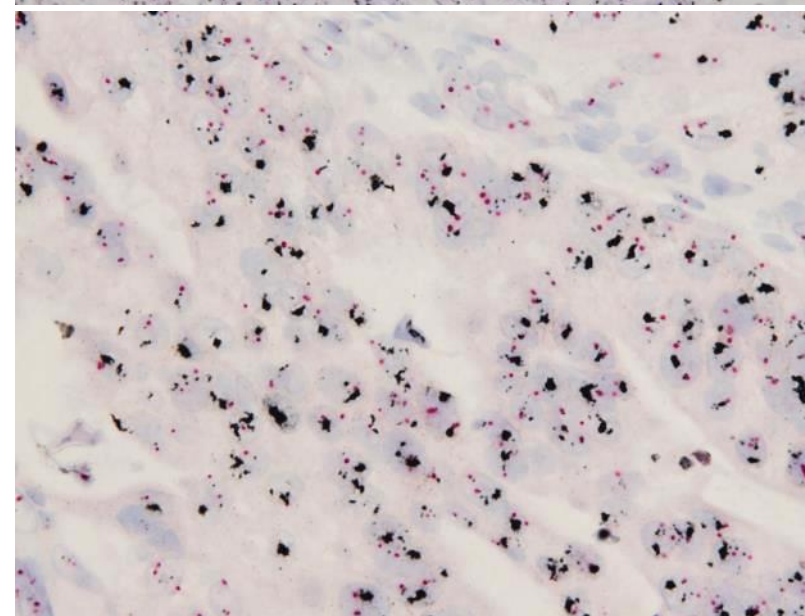
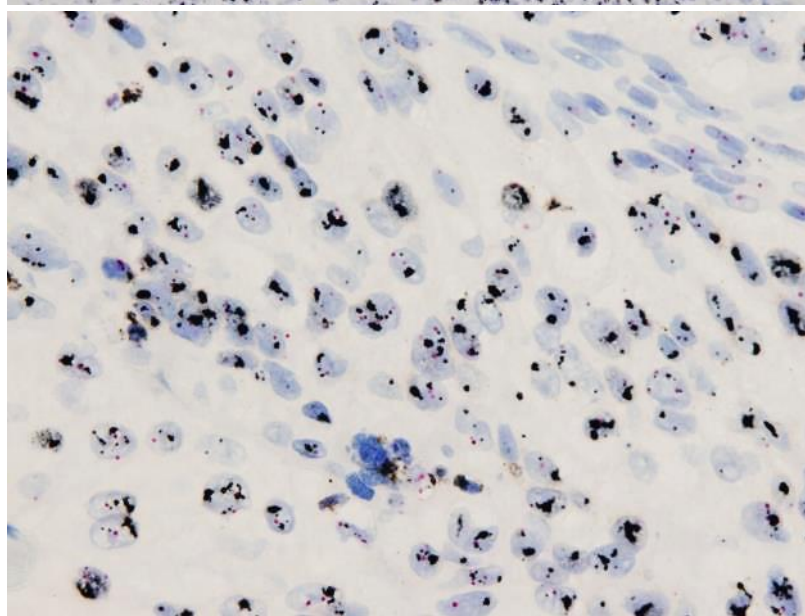
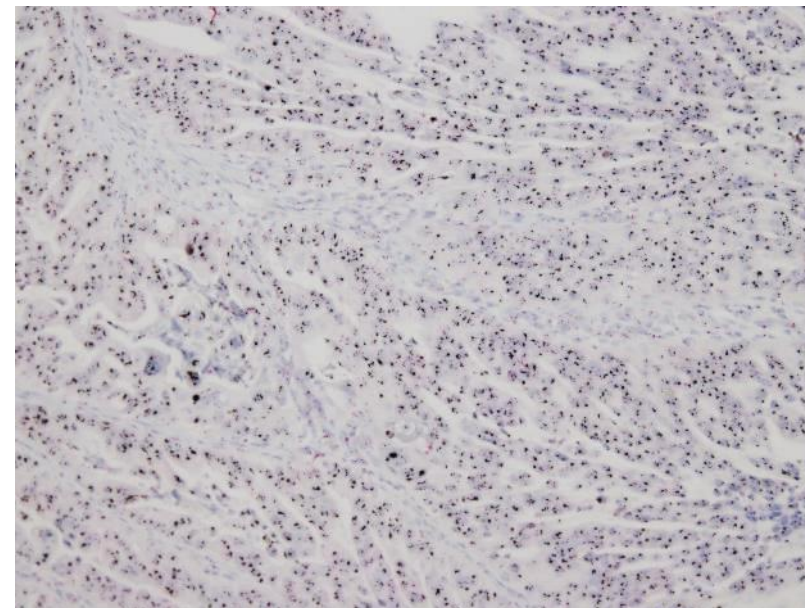
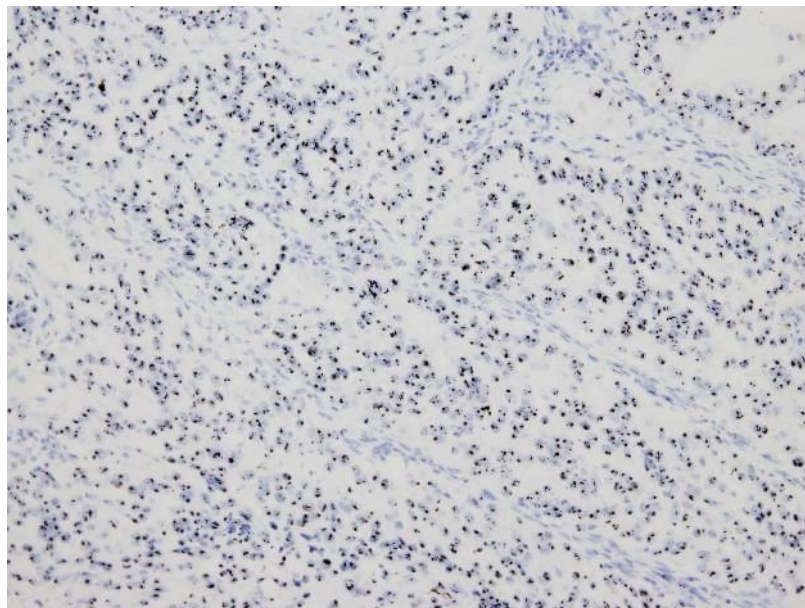
- Breast cancer 手術検体
推奨条件 1



New kit

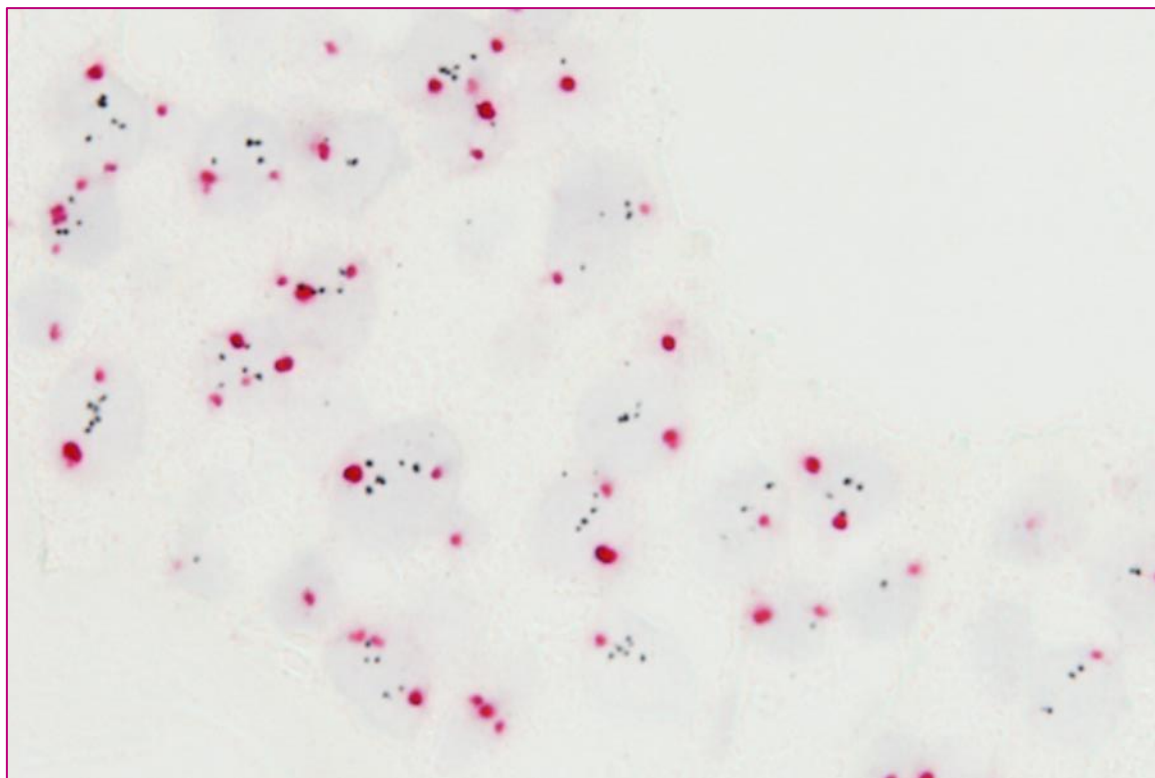
従来のキット

- Gastric carcinoma
*HER2*遺伝子増幅あり

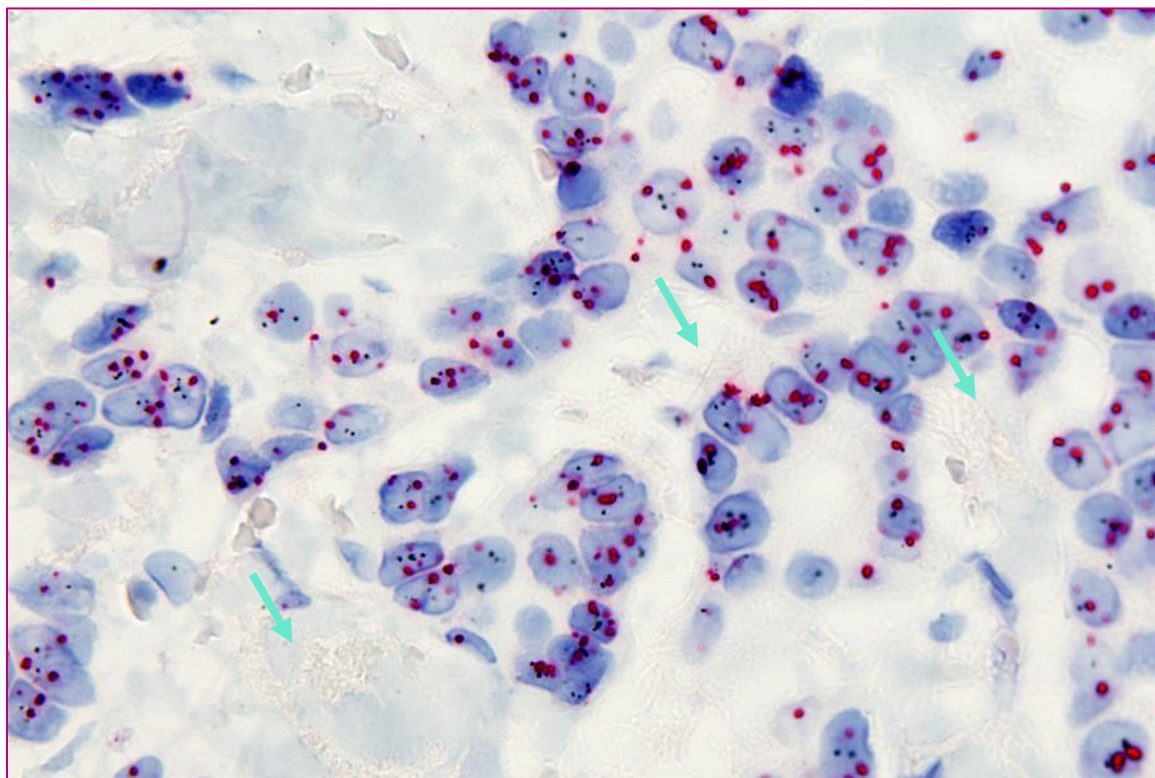


DISH法の注意点

- ◆ 薄切切片が薄すぎる ⇒ 4 μ mで薄切
核染が弱いため腫瘍細胞の見分けが付きにくい
シグナルも弱いものある



- ◆ 針状結晶・ひび割れ様 ⇒ 完全に乾燥させる
脱水不良のためシグナルが滲んだりもする



小活 1

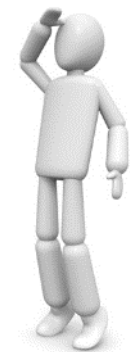
◆現在、*HER2*遺伝子検査は主にDISH法で行っている

自動免疫染色機 ベンタナ ベンチマークULTRA

ベンタナ DISH *HER2* キットを使用

◆ベンタナ DISH *HER2*キットは背景が清明になり、シグナルが見やすい

◆薄切切片は4 μ mで！



本日の内容

◆ 当院での*HER2*遺伝子検査について

FISH法 ・ DISH法の導入 / それぞれのメリット・デメリット

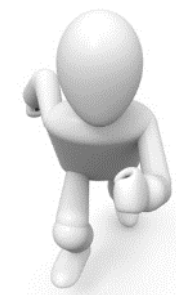
◆ DISH法の実践

免疫染色との比較

カウントの仕方と注意点

FISH法も！

◆ まとめ



HER2のIHC法

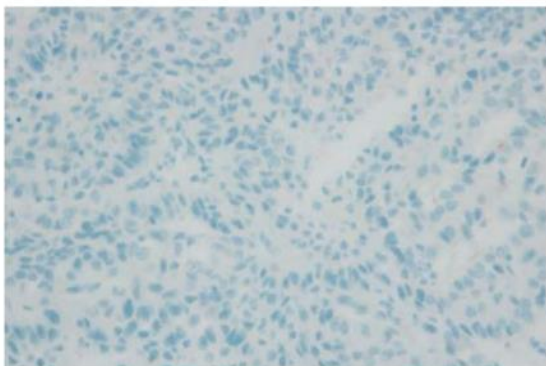
ベンタナ ultraView パスウェーHER2(4B5)

■乳癌におけるスコアリングの判定基準

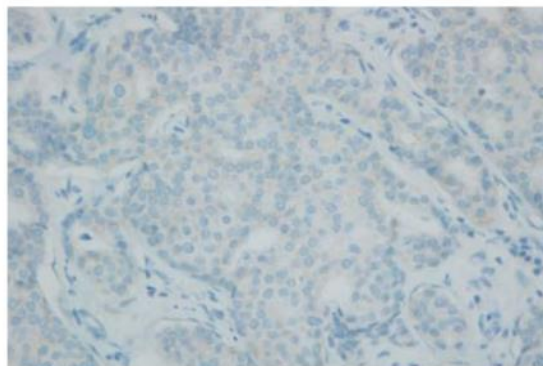
乳癌は、浸潤部分における腫瘍細胞の陽性所見のみを検索対象とし、非浸潤部分の腫瘍細胞は検索対象から除外します。陽性所見が細胞膜に局在していることを確認し、細胞質のみ染色されている場合は陰性と判定します。検体組織内の腫瘍細胞における染色像、強度、陽性率の結果より、スコア0～3+にスコアリングします。

| 染色パターン | スコア | 判定 |
|--|-----|--------------------|
| 強い完全な全周性の膜染色が認められる >10% | 3+ | 陽性 |
| 不完全および / または弱 / 中程度の全周性の膜染色が認められる >10%、 または 強い完全な全周性の膜染色が認められる ≤10% | 2+ | 境界域 (equivocal) |
| かすかな / かるうじて部分的な膜染色が認められる >10% | 1+ | 陰性 |
| 染色像が認められない、 または 不完全およびかすかな / かるうじて膜染色が認められる ≤10% | 0 | |

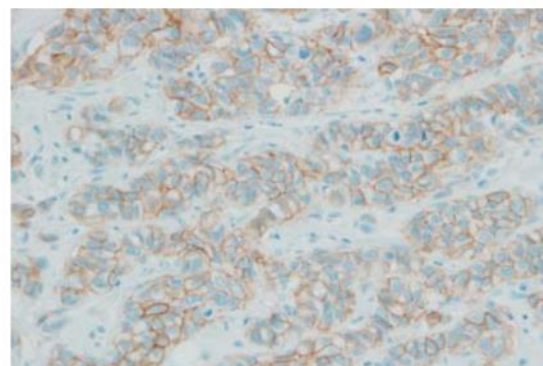
HER2検査ガイド乳癌編(第四版)より抜粋



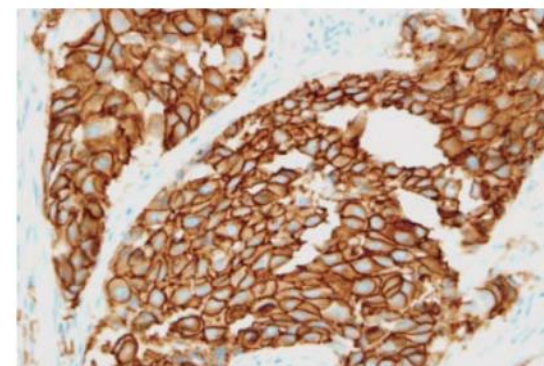
Score 0



Score 1+



Score 2+



Score 3+

Roche HER2検査ガイドより抜粋

HER2のIHC法

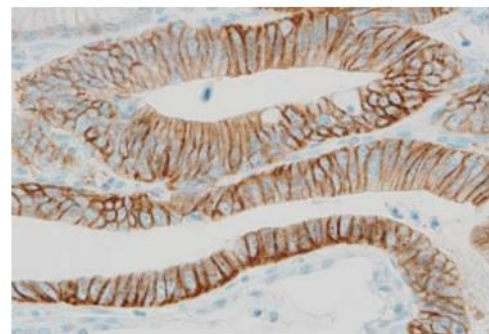
ベンタナ ultraView パスウェーHER2(4B5)

■胃癌におけるスコアリングの判定基準

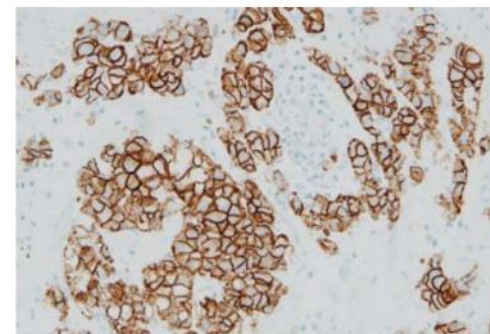
胃癌では、腫瘍内の不均一性 (Heterogeneity) がしばしば認められるため、はじめに腫瘍全体を観察してください。陽性所見が細胞膜に局在していることを確認し、細胞質のみ染色されている場合は陰性と判定します。全周性ではなく基底膜および側方側の細胞膜のみに陽性反応が認められる場合もあります。検体組織内の腫瘍細胞における染色像、強度、陽性率の結果より、スコア0～3+にスコアリングします。

| 切除標本の染色パターン | 生検標本の染色パターン | スコア | 判定 |
|--|--|-----|-----------------|
| 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 \geq 10% 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(5個以上の集塊)が1つ以上あり | 3+ | 陽性 |
| 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 \geq 10% | 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(5個以上の集塊)が1つ以上あり | 2+ | 境界域 (equivocal) |
| 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 \geq 10% 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(5個以上の集塊)が1つ以上あり | 1+ | 陰性 |
| 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% | 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 | 0 | |

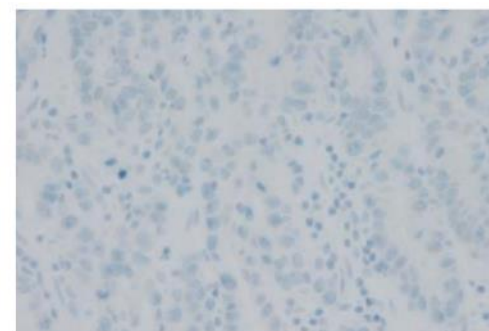
HER2検査ガイド胃癌編(第三版)より抜粋



側方または側方・基底膜側の細胞膜への染色



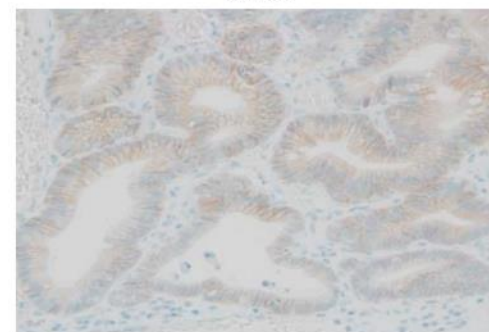
全周性の染色



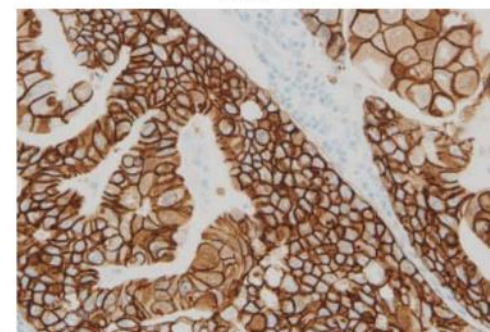
Score 0



Score 1+



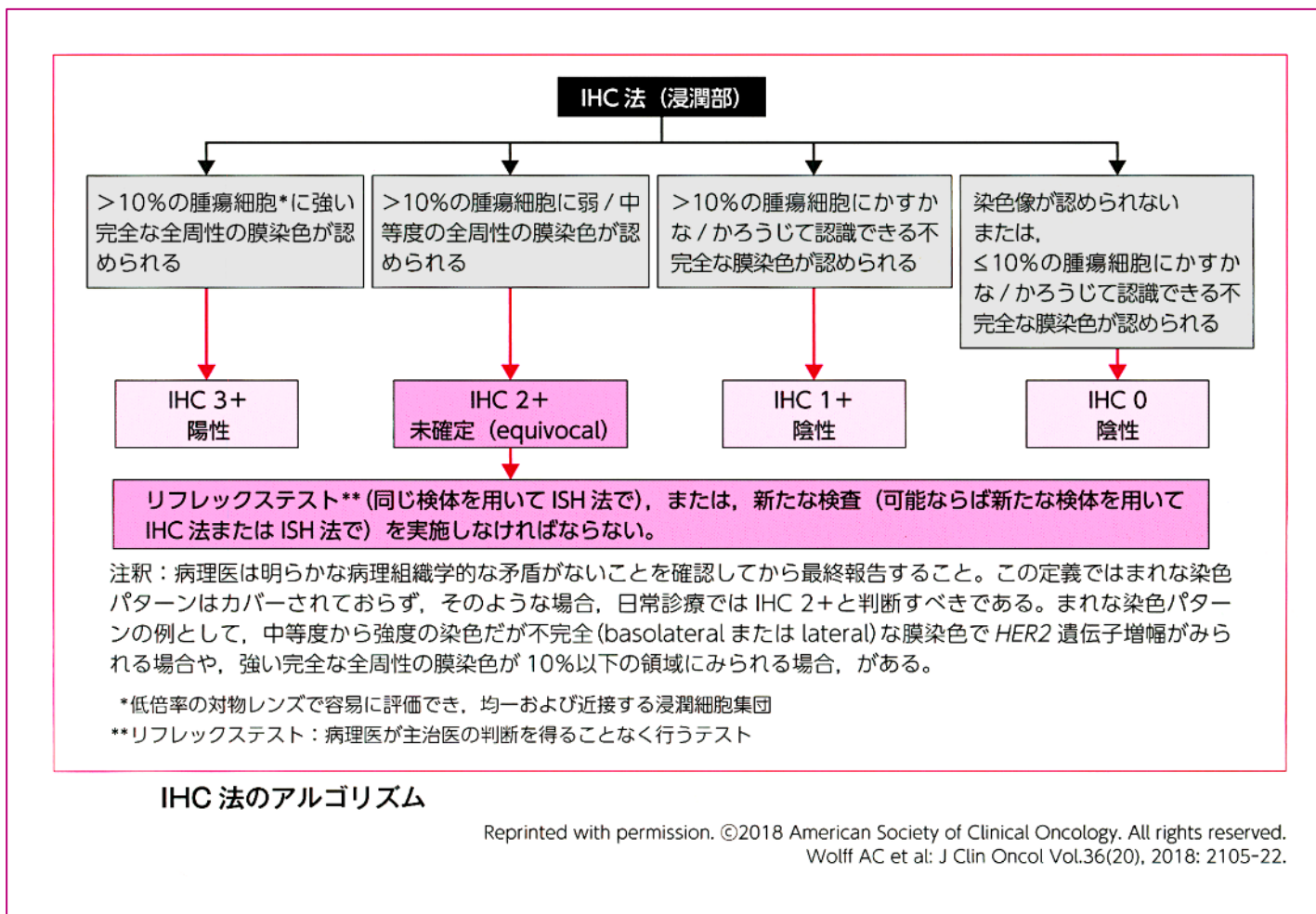
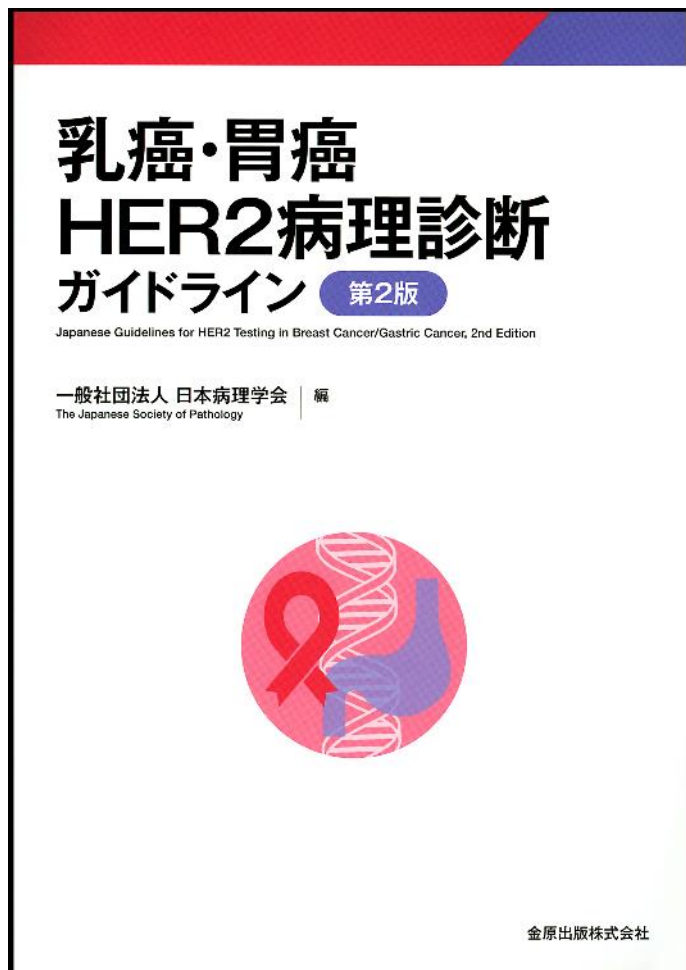
Score 2+



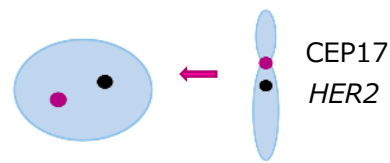
Score 3+

Roche HER2検査ガイドより抜粋

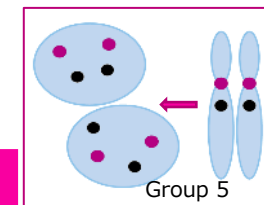
乳癌HER2検査のアルゴリズム



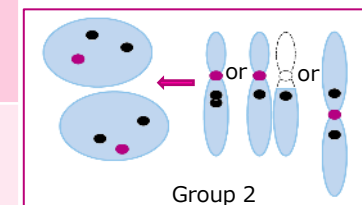
HER2検査結果の判定基準



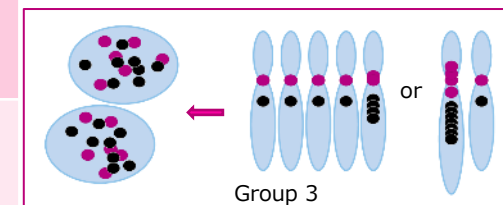
| 検査法 | 判定 | 基準 |
|------------------|----|--|
| デュアルプローブを用いたISH法 | 陰性 | HER2/CEP17比 < 2.0, かつ 1細胞当たりのHER2遺伝子平均コピー数 < 4.0 (グループ5) |
| | 陰性 | HER2/CEP17比 ≥ 2.0, かつ 1細胞当たりのHER2遺伝子平均コピー数 < 4.0 (グループ2) かつ、同時にIHC 0, 1+ または 2+ |
| | | HER2/CEP17比 < 2.0, かつ 1細胞当たりのHER2遺伝子平均コピー数 ≥ 6.0 (グループ3) かつ、同時にIHC 0, または 1+ |
| | | HER2/CEP17比 < 2.0, かつ 1細胞当たりのHER2遺伝子平均コピー数 ≥ 4.0 ~ < 6.0 (グループ4) かつ、同時にIHC 0, 1 または 2+ |
| | 陽性 | HER2/CEP17比 ≥ 2.0, かつ 1細胞当たりのHER2遺伝子平均コピー数 < 4.0 (グループ2) かつ、同時にIHC 3+ |
| | | HER2/CEP17比 < 2.0, かつ 1細胞当たりのHER2遺伝子平均コピー数 ≥ 6.0 (グループ3) かつ、同時にIHC 2+ または 3+ |
| | | HER2/CEP17比 < 2.0, かつ 1細胞当たりのHER2遺伝子平均コピー数 ≥ 4.0 ~ < 6.0 (グループ4) かつ、同時にIHC 3+ |
| | 陽性 | HER2/CEP17比 ≥ 2.0で 1細胞当たりのHER2遺伝子平均コピー数 ≥ 4.0 (グループ1) |



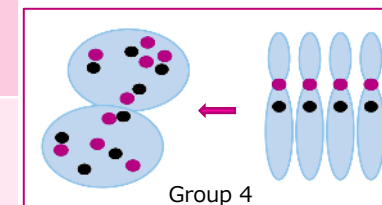
HER2/CEP17比 2/2=1.0 HER2遺伝子平均コピー数=2.0



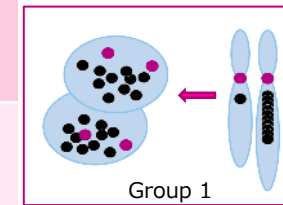
HER2/CEP17比 2/1=2.0 HER2遺伝子平均コピー数=2.0



HER2/CEP17比 8/6=1.3 HER2遺伝子平均コピー数=8.0

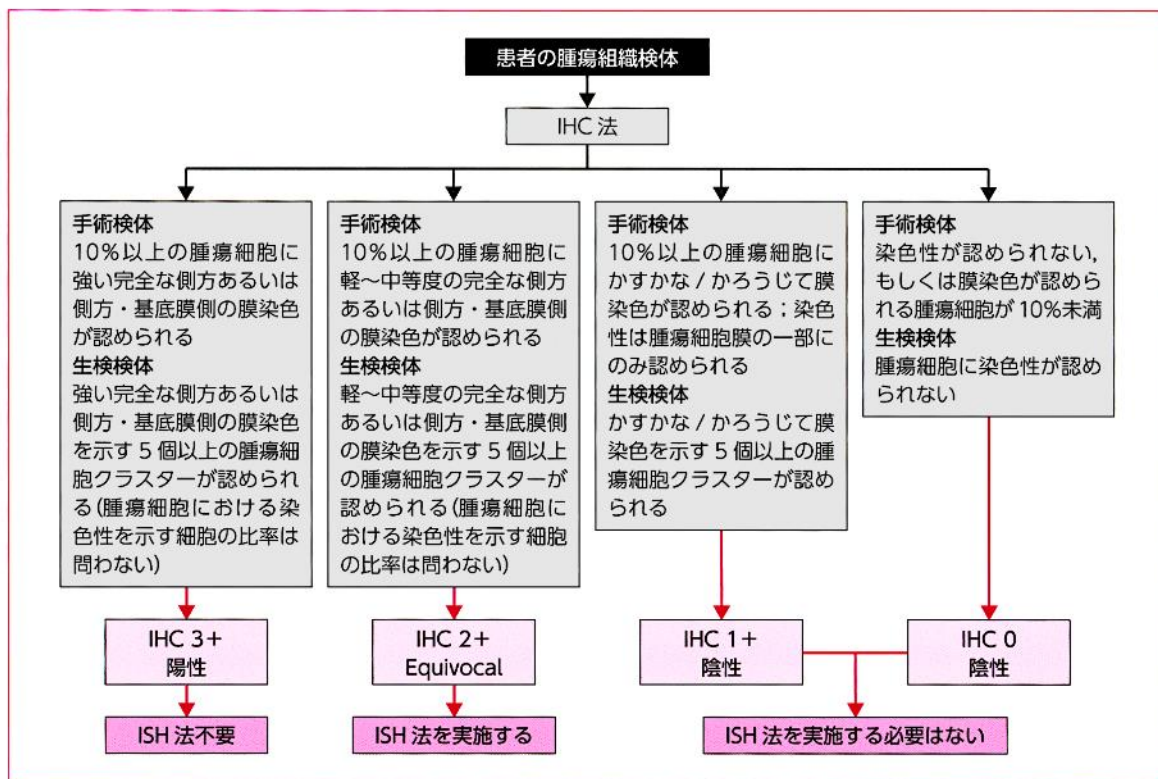


HER2/CEP17比 4/4=1.0 HER2遺伝子平均コピー数=4.0



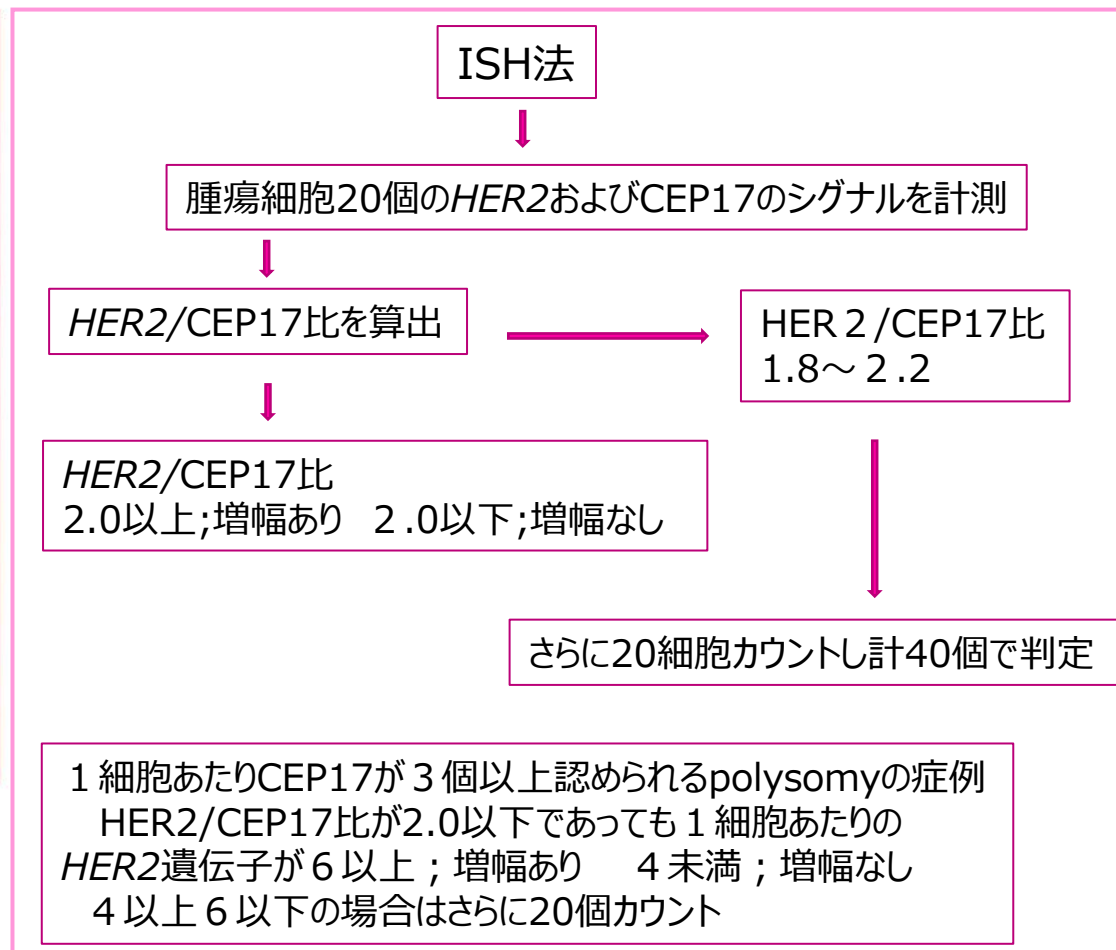
HER2/CEP17比 10/2=5.0 HER2遺伝子平均コピー数=10.0

胃癌HER2検査のアルゴリズム



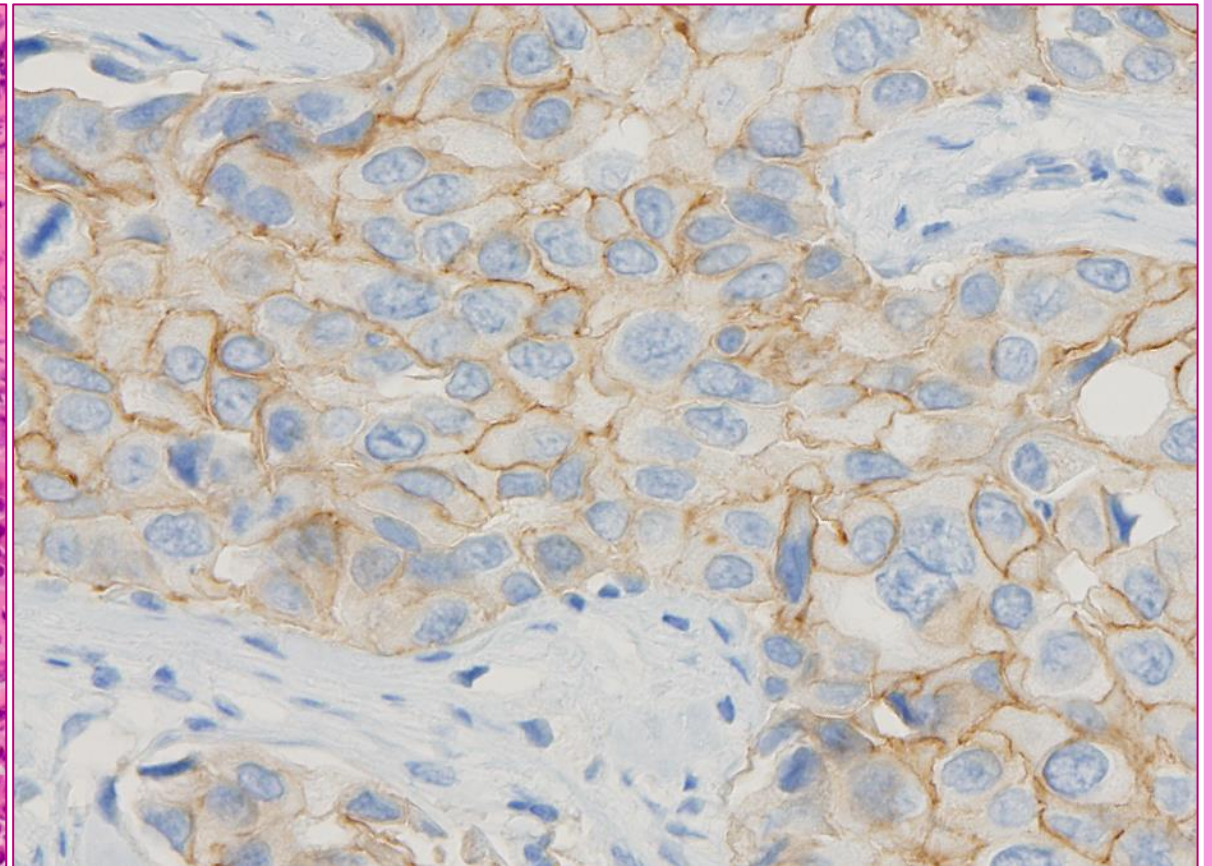
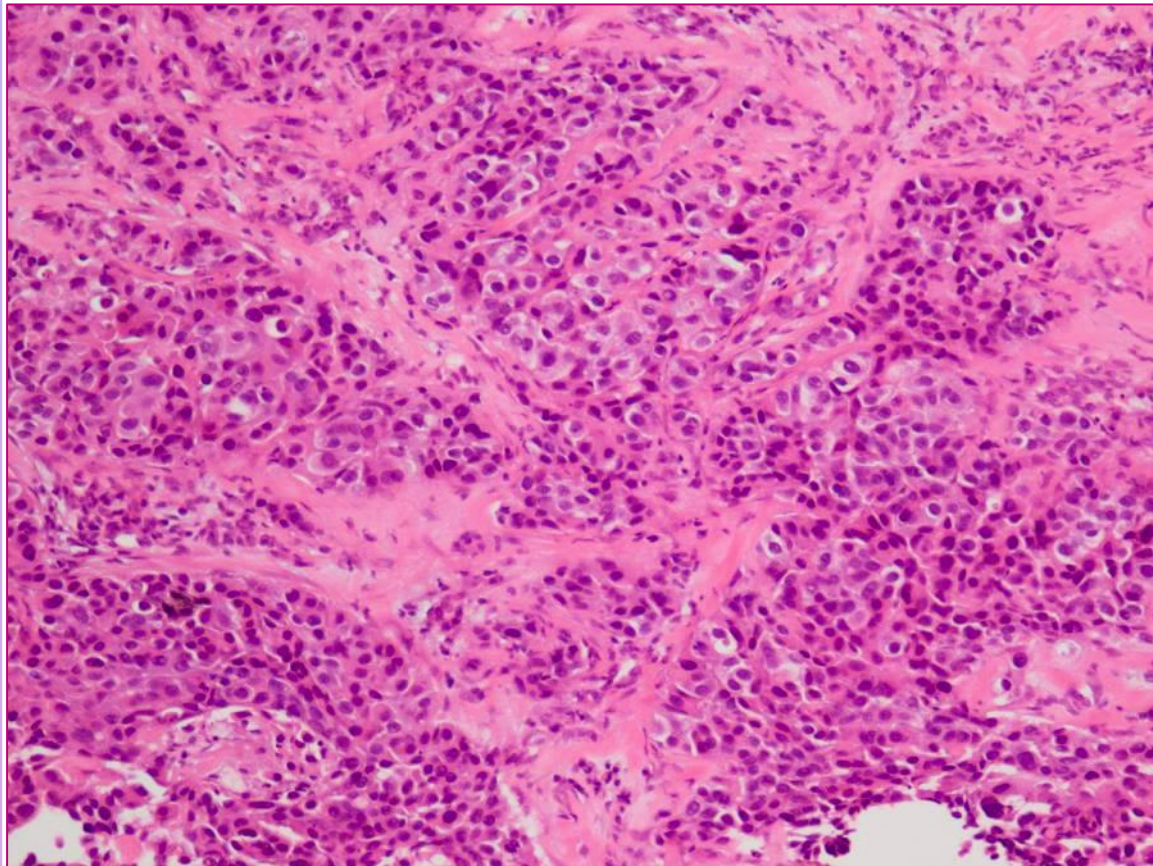
胃癌 HER2 診断アルゴリズム

Reprinted with permission. ©2017 American Society of Clinical Oncology. All rights reserved. Bartley AN et al: J Clin Oncol Vol.35(4), 2017: 446-64.



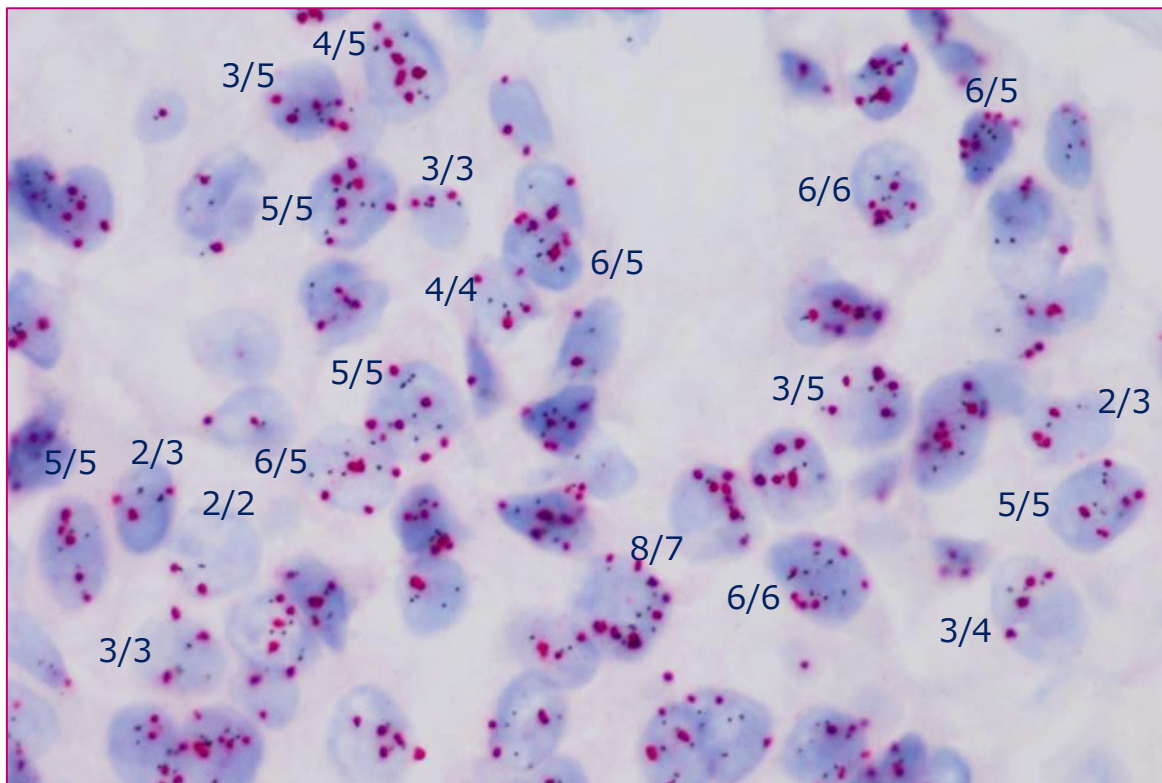
Invasive ductal carcinoma

IHC法 ; 2+



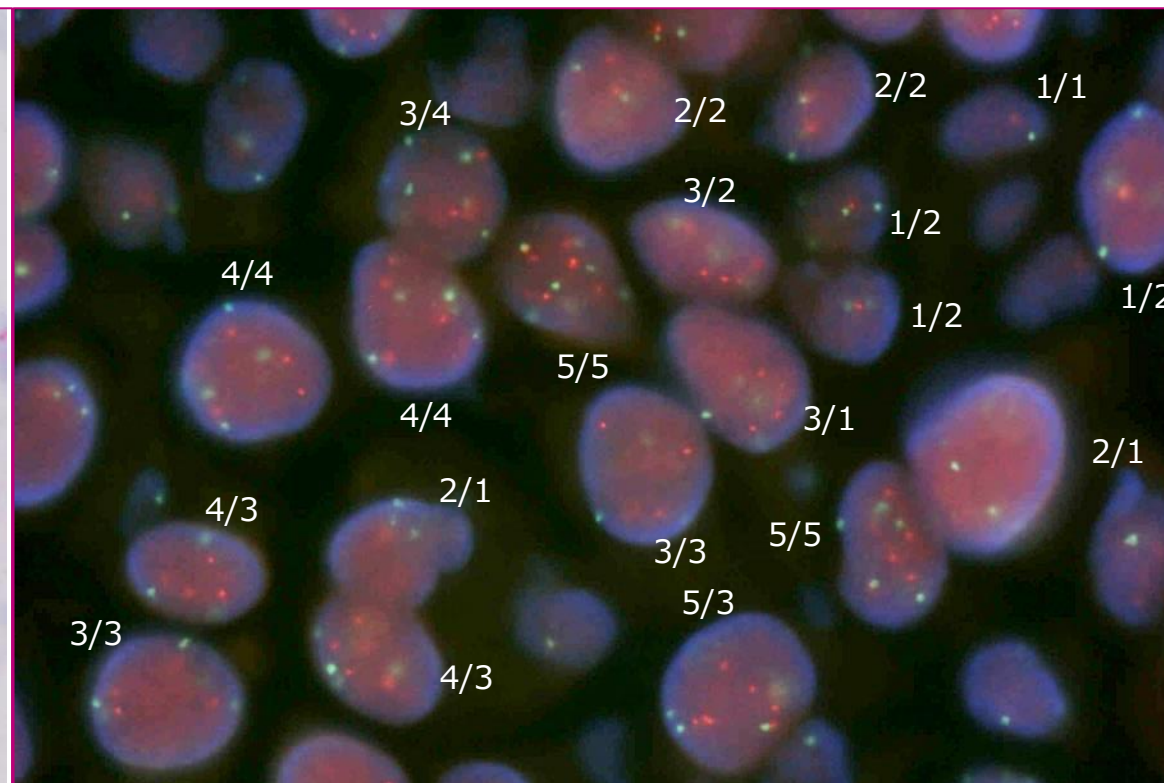
DISH法

HER2 シグナル 87個 CEP17 シグナル91個
HER2/CEP17比 $0.96 < 2.0$
1細胞当たりのHER2遺伝子平均コピー数 $4.4 \geq 4.0 \sim < 6.0$
判定；陰性



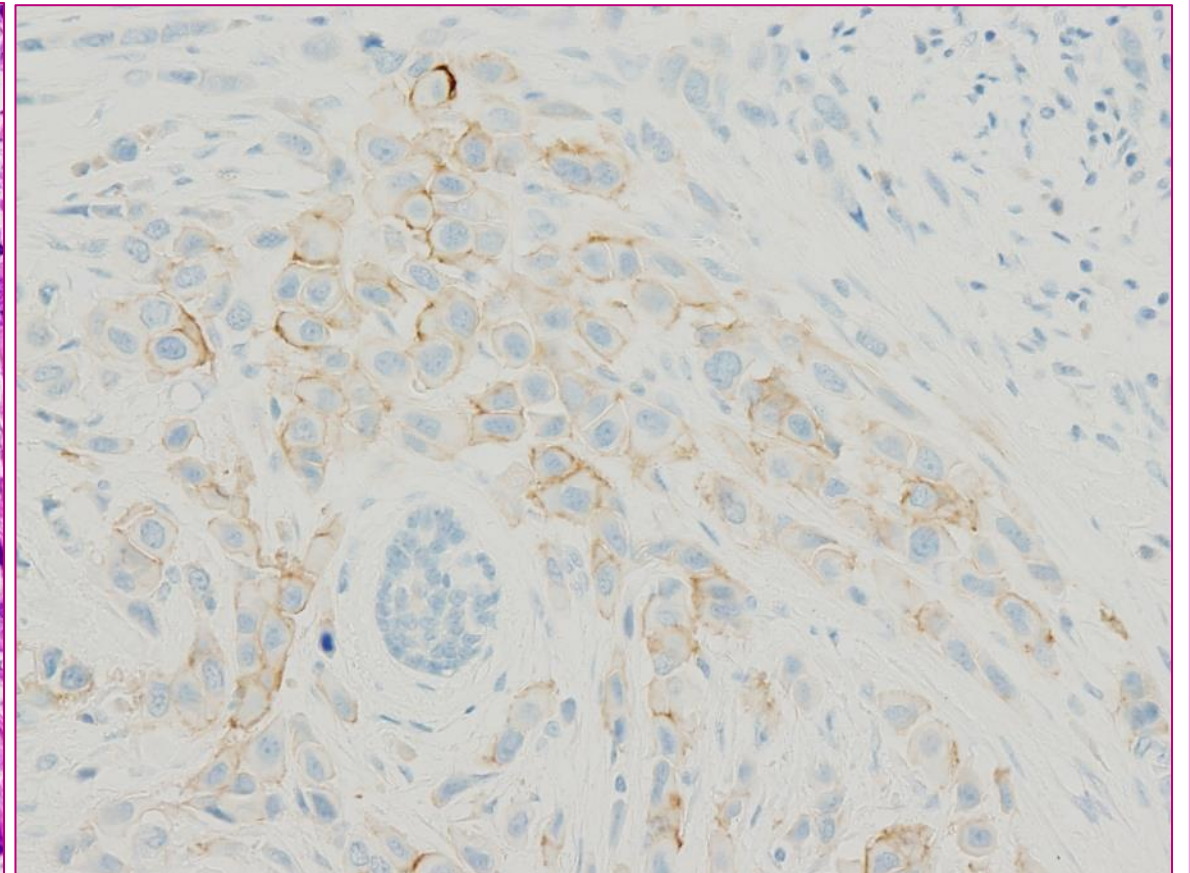
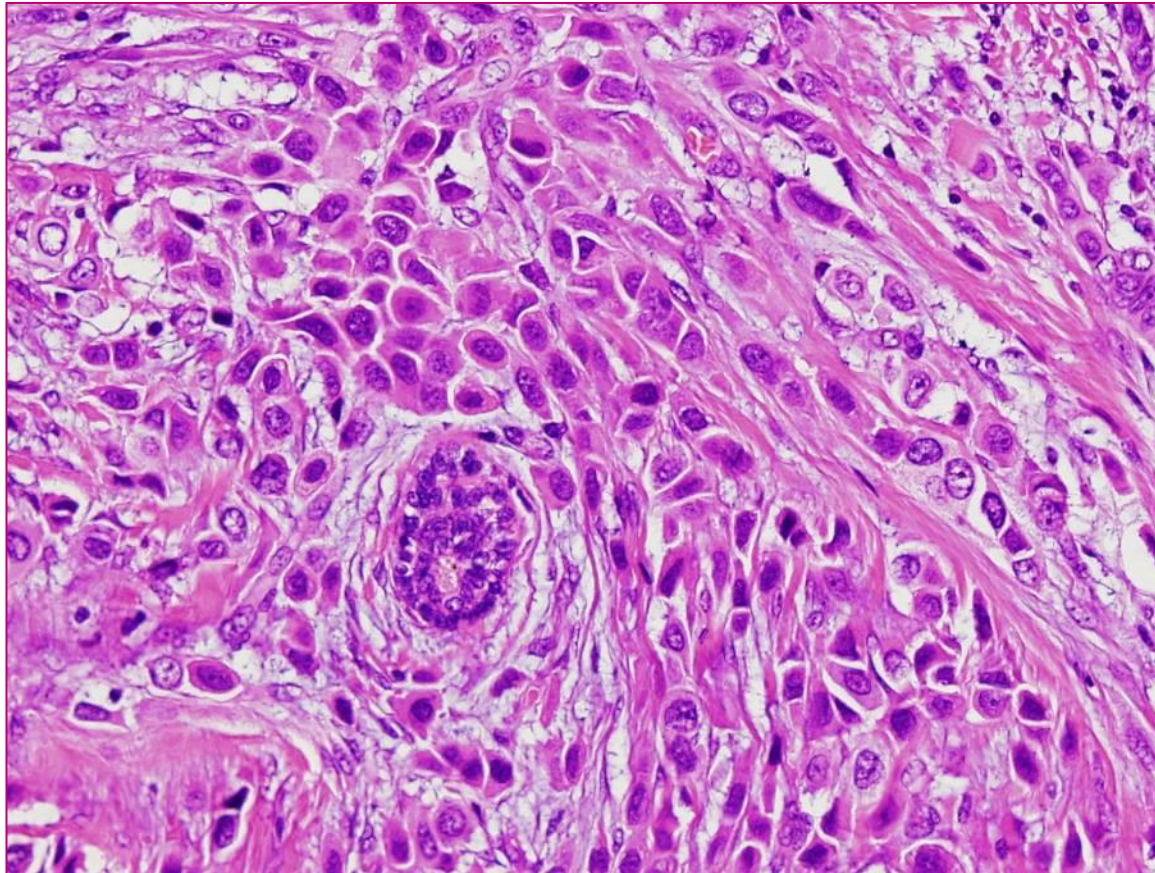
FISH法

HER2 シグナル 58個 CEP17 シグナル53個
HER2/CEP17比 $1.09 < 2.0$
1細胞当たりのHER2遺伝子平均コピー数 $2.9 < 4.0$
判定；陰性



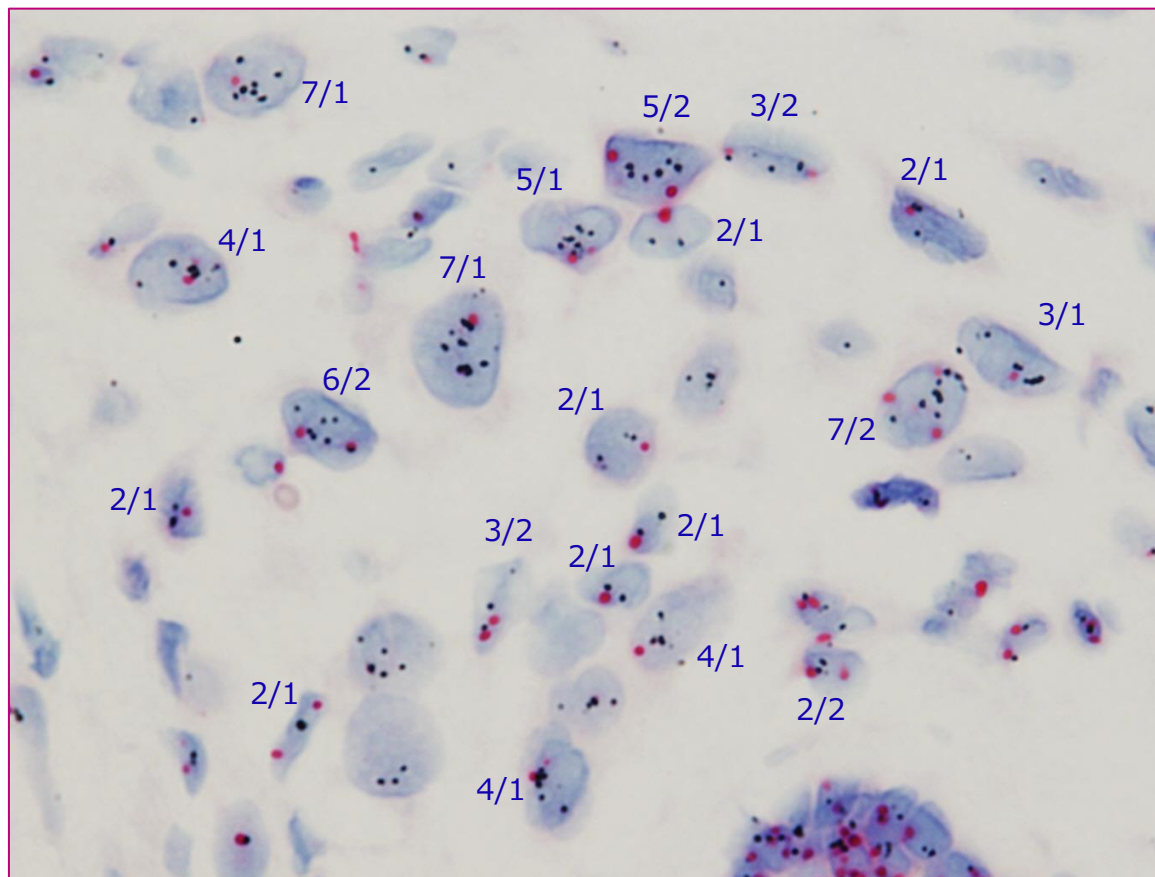
Invasive ductal carcinoma

IHC法 ; 2+



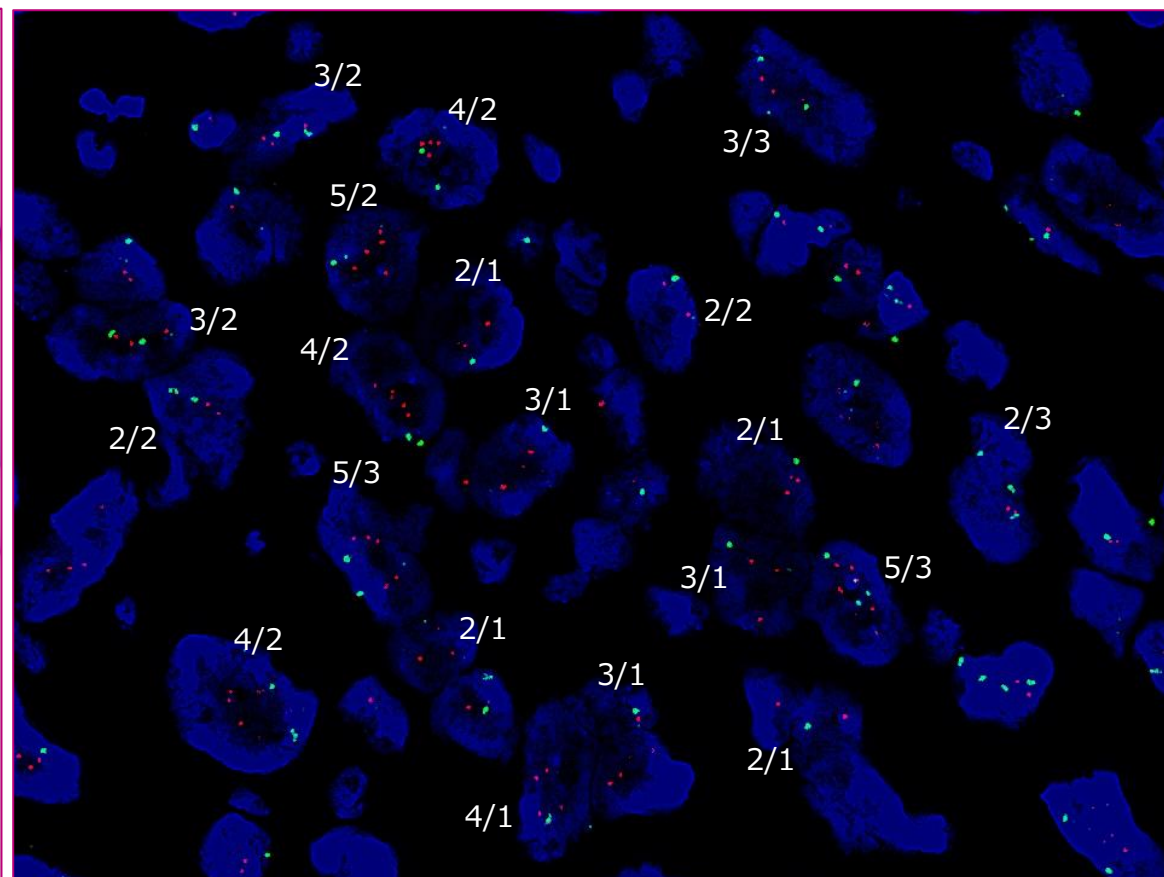
DISH法

HER2 シグナル 74個 CEP17 シグナル26個
HER2/CEP17比 2.8 > 2.0
1細胞当たりのHER2遺伝子平均コピー数 3.7 < 4.0
判定；陰性



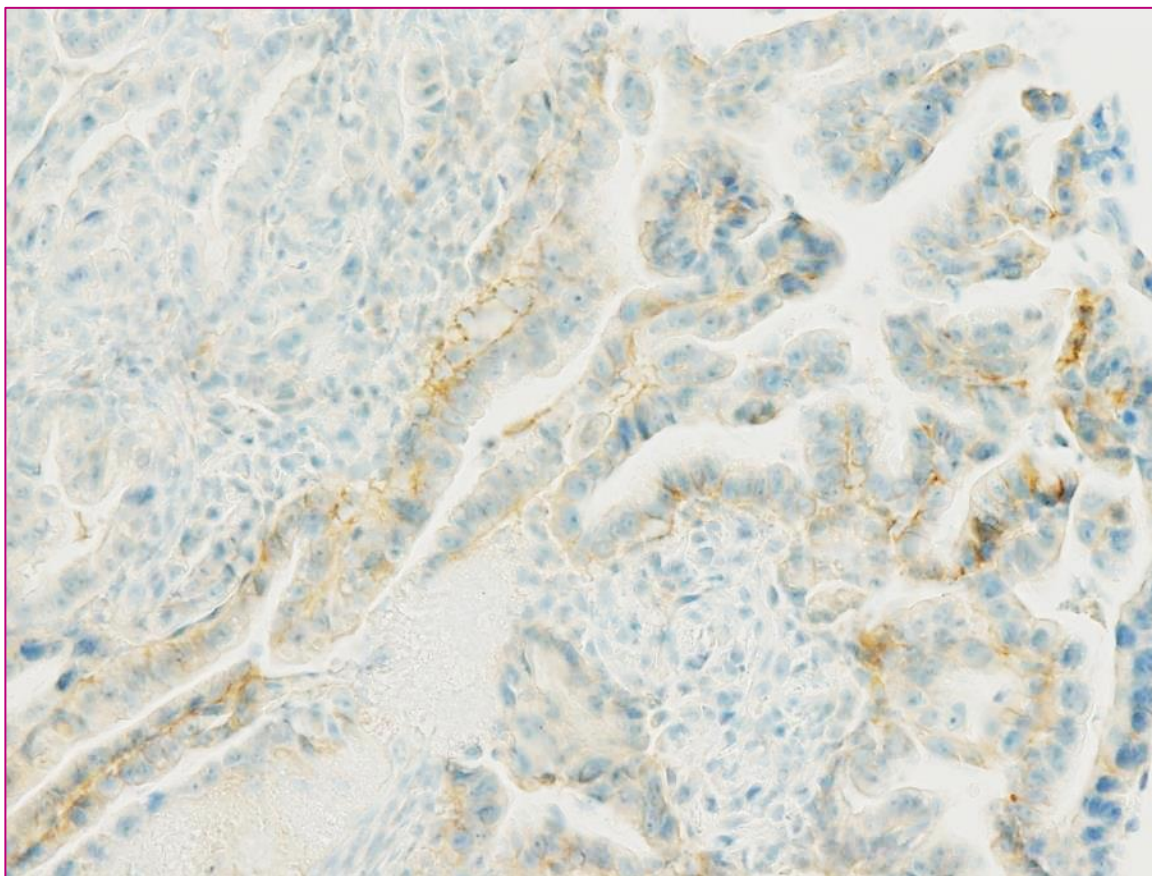
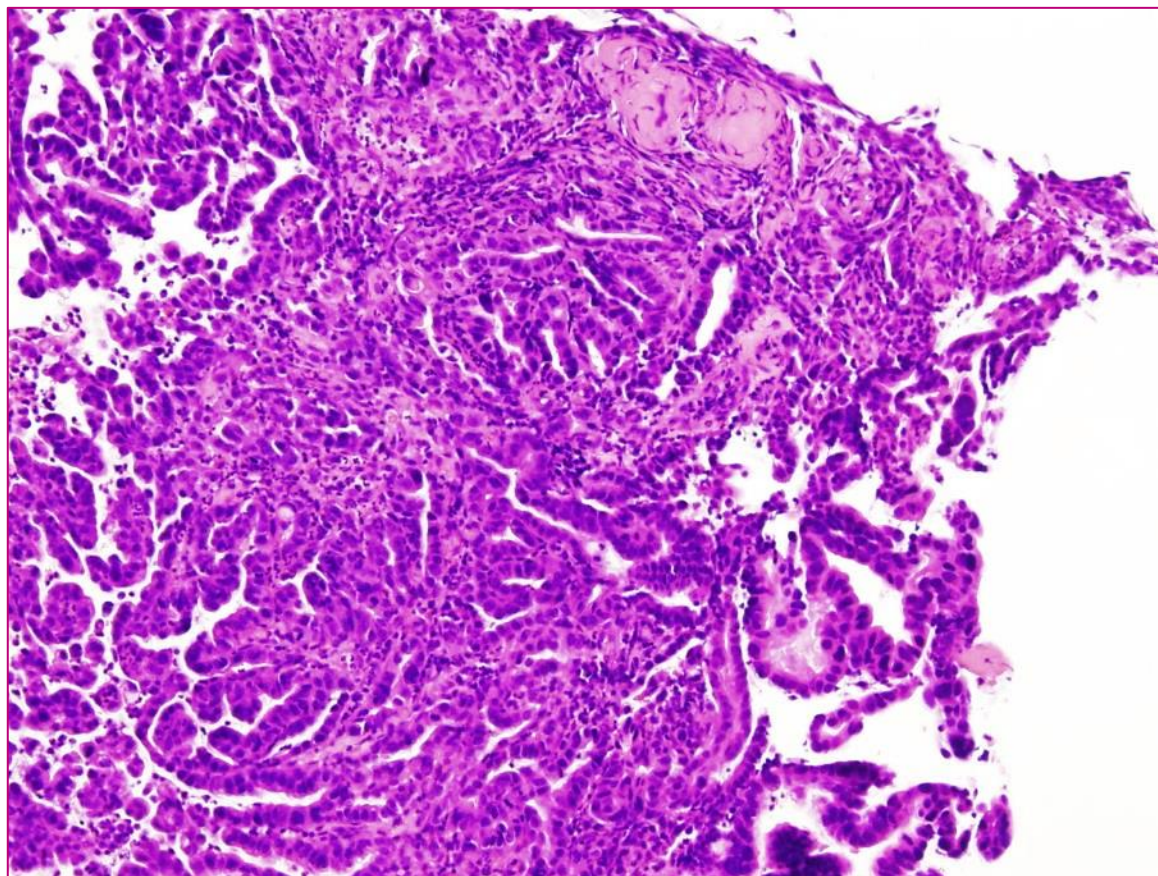
FISH法

HER2 シグナル 61個 CEP17 シグナル36個
HER2/CEP17比 1.7 < 2.0
1細胞当たりのHER2遺伝子平均コピー数 3.1 < 4.0
判定；陰性



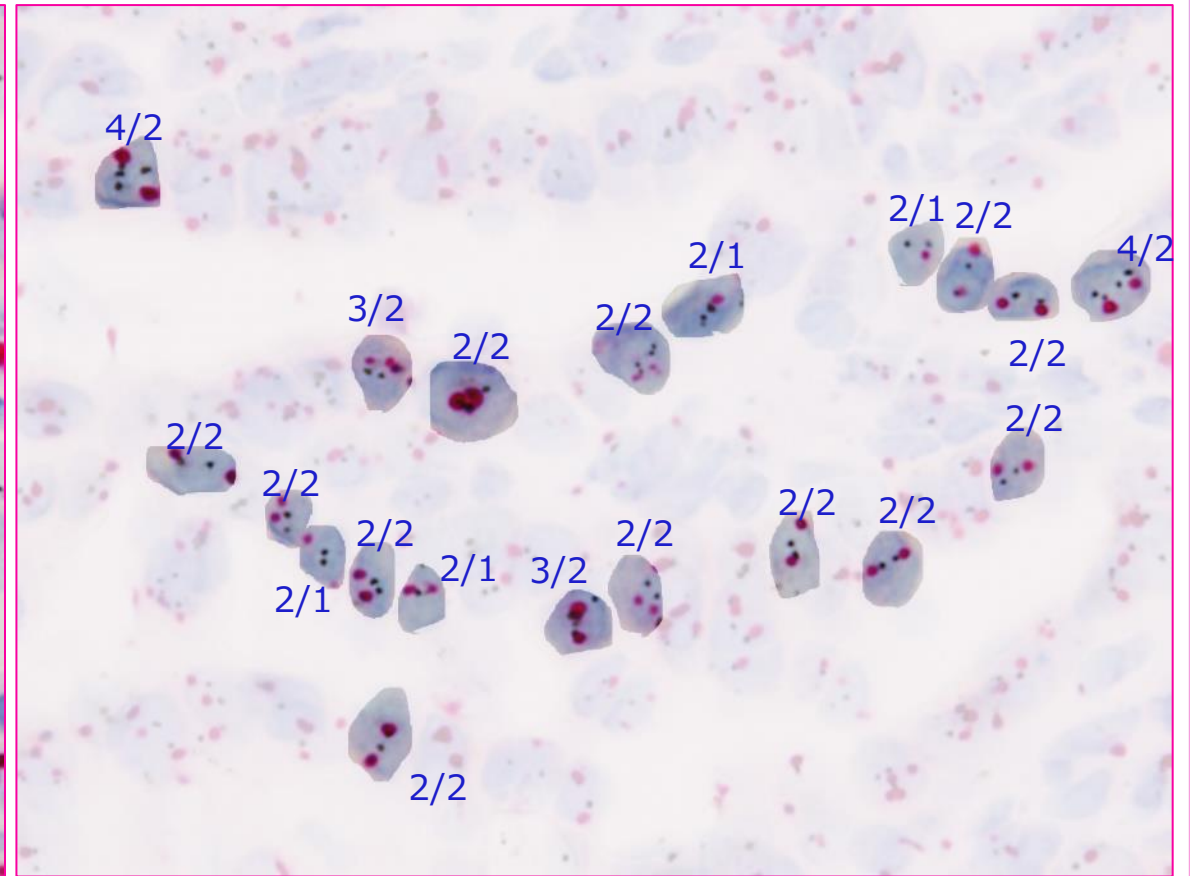
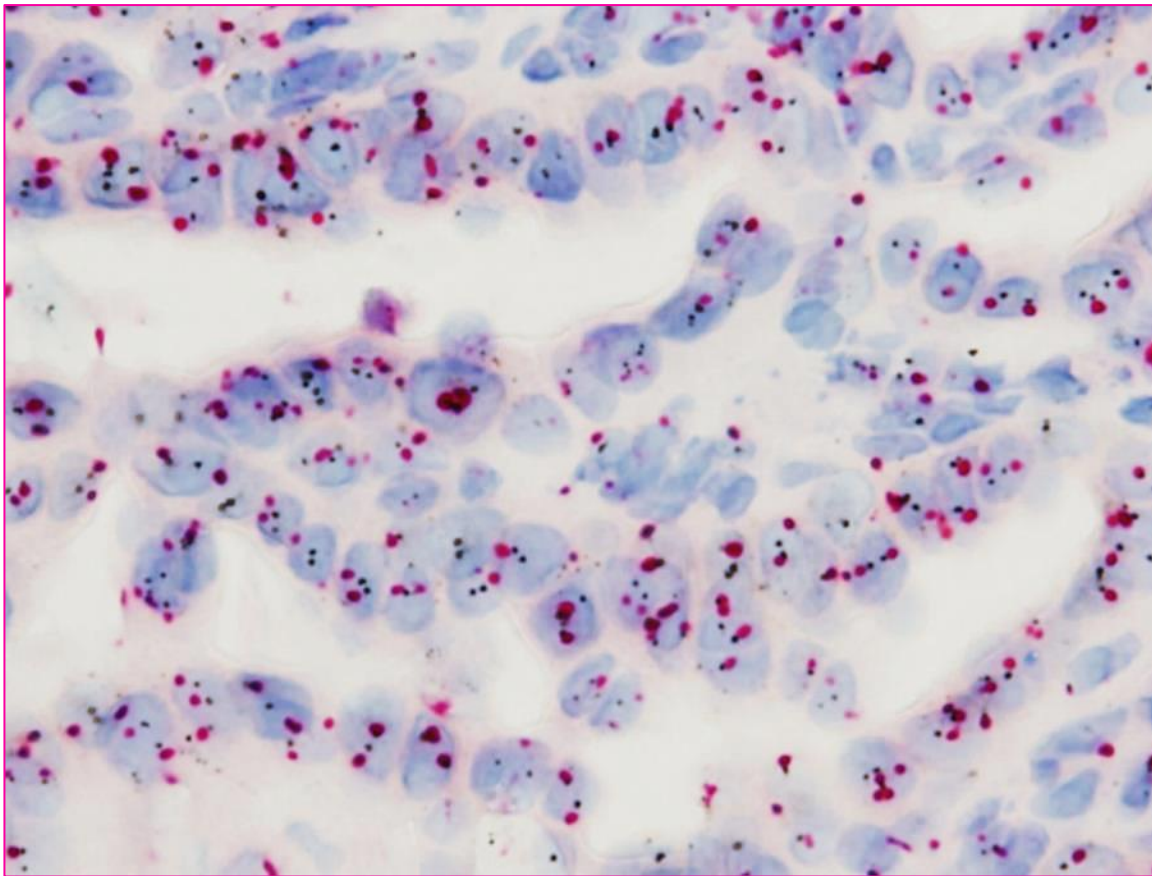
Gastric carcinoma (生検)

IHC法 ; 1+



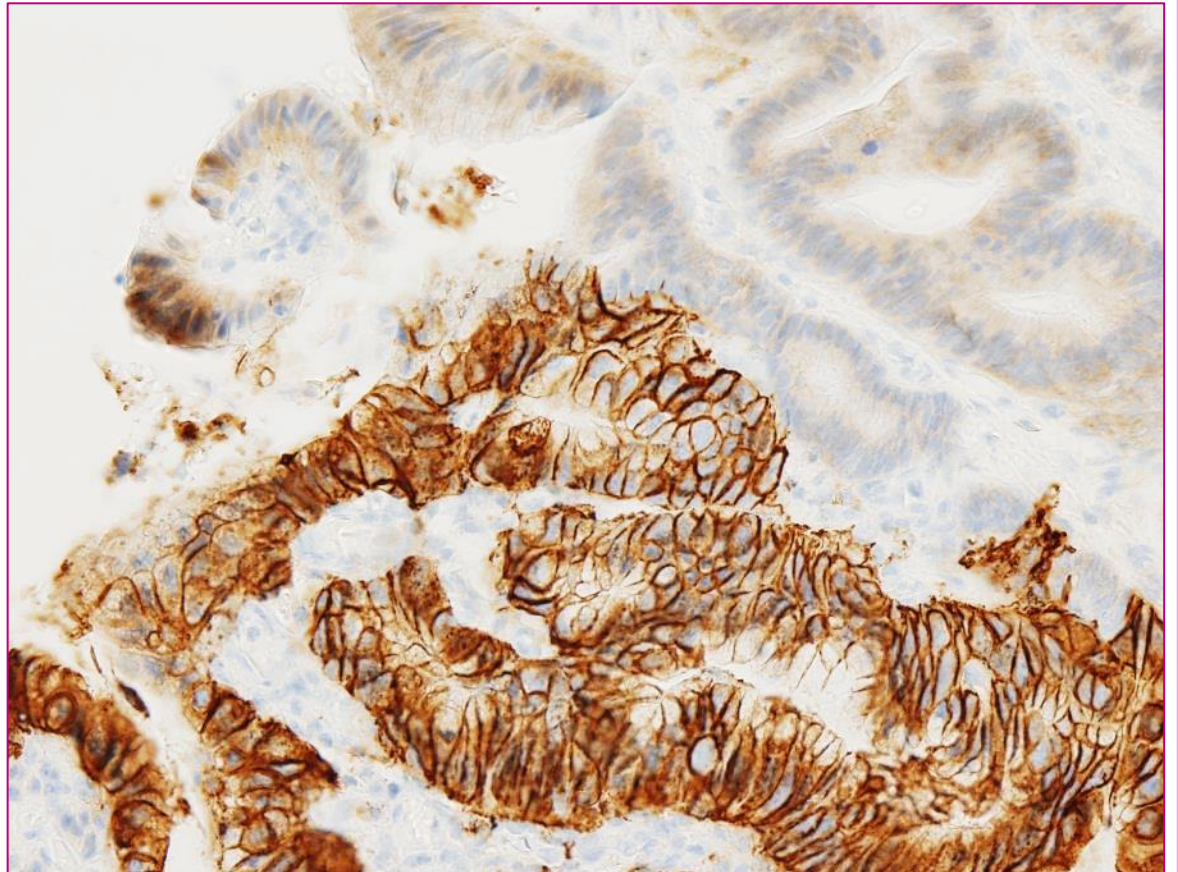
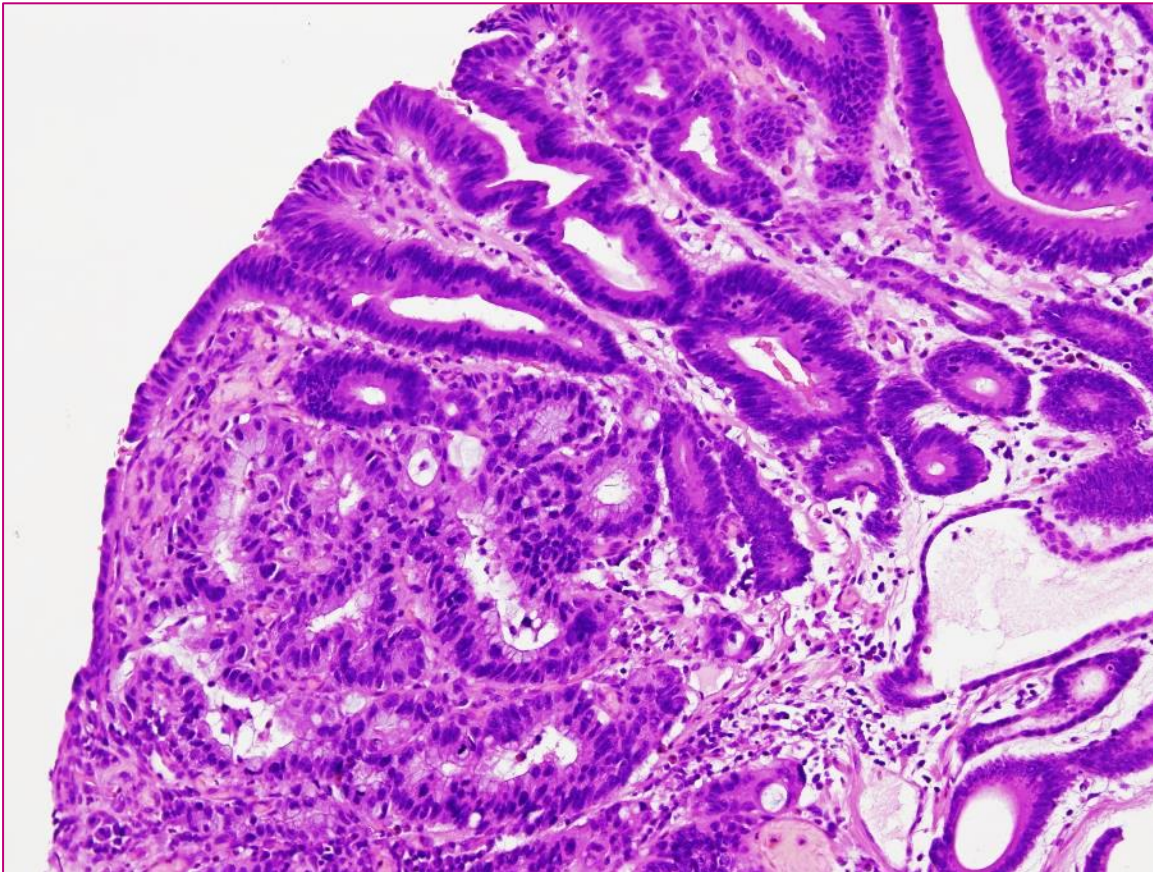
DISH法

腫瘍細胞20個のシグナルをカウント
HER2 シグナル 46個 CEP17 シグナル 36個
HER2/CEP17比 $1.3 < 2.0$
かつ1個細胞当たりのHER2遺伝子平均コピー数 $2.3 < 4.0$
判定；陰性



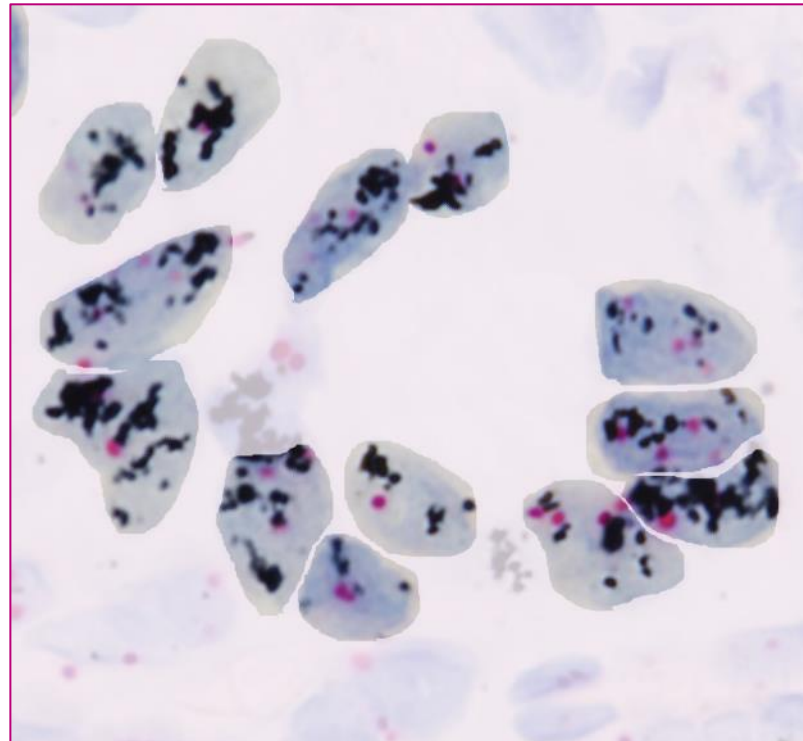
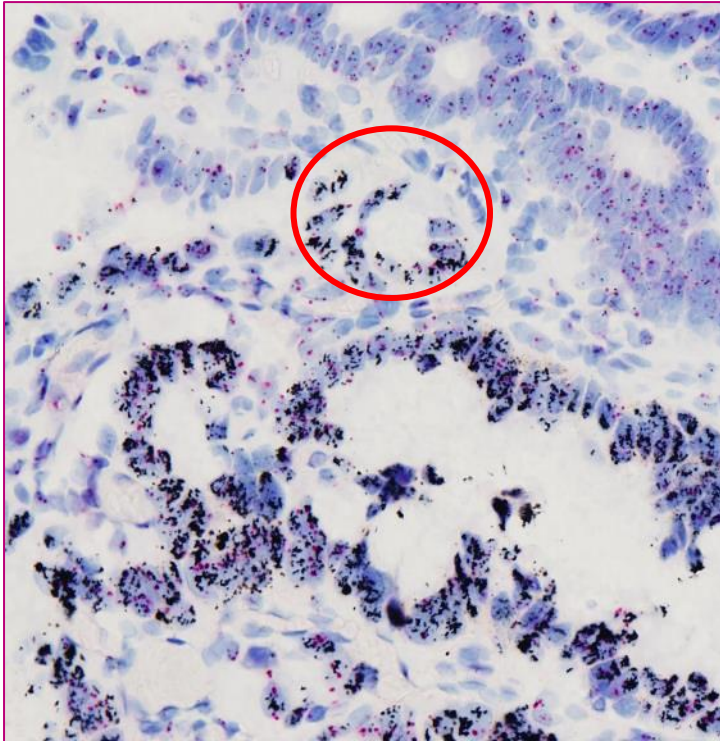
Gastric carcinoma (切除検体)

IHC法 ; 3 +



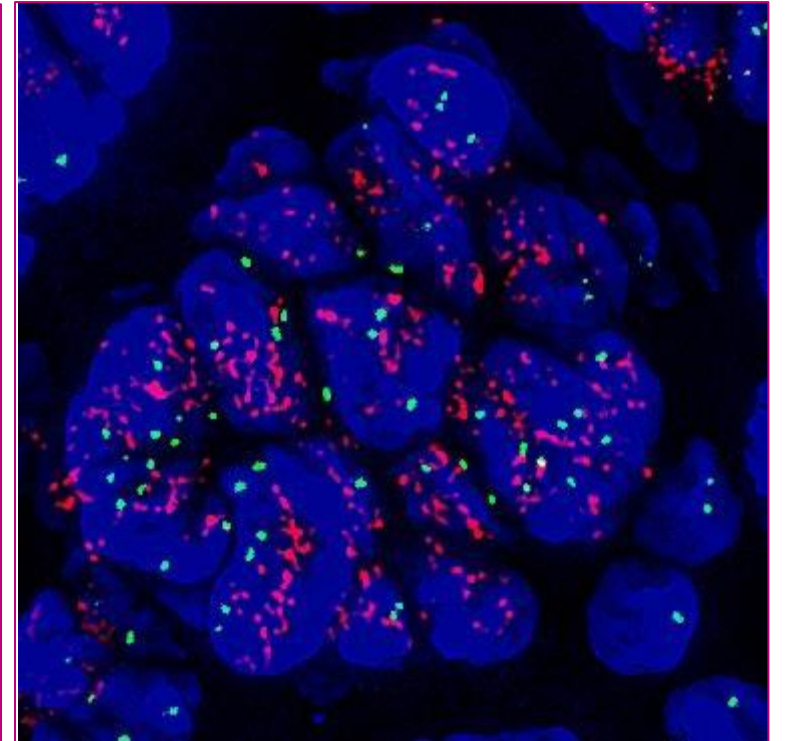
DISH法

1細胞あたりのHER2遺伝子15~30個
判定；陽性



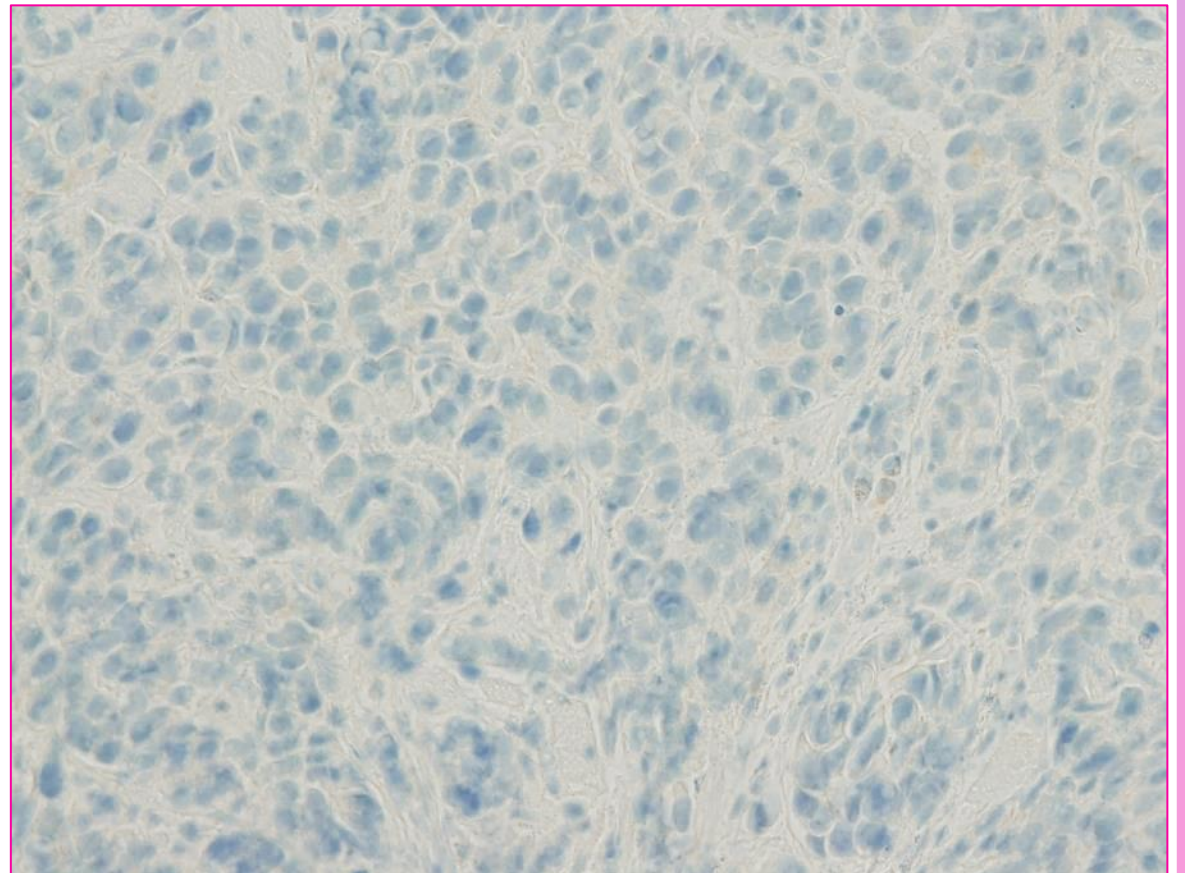
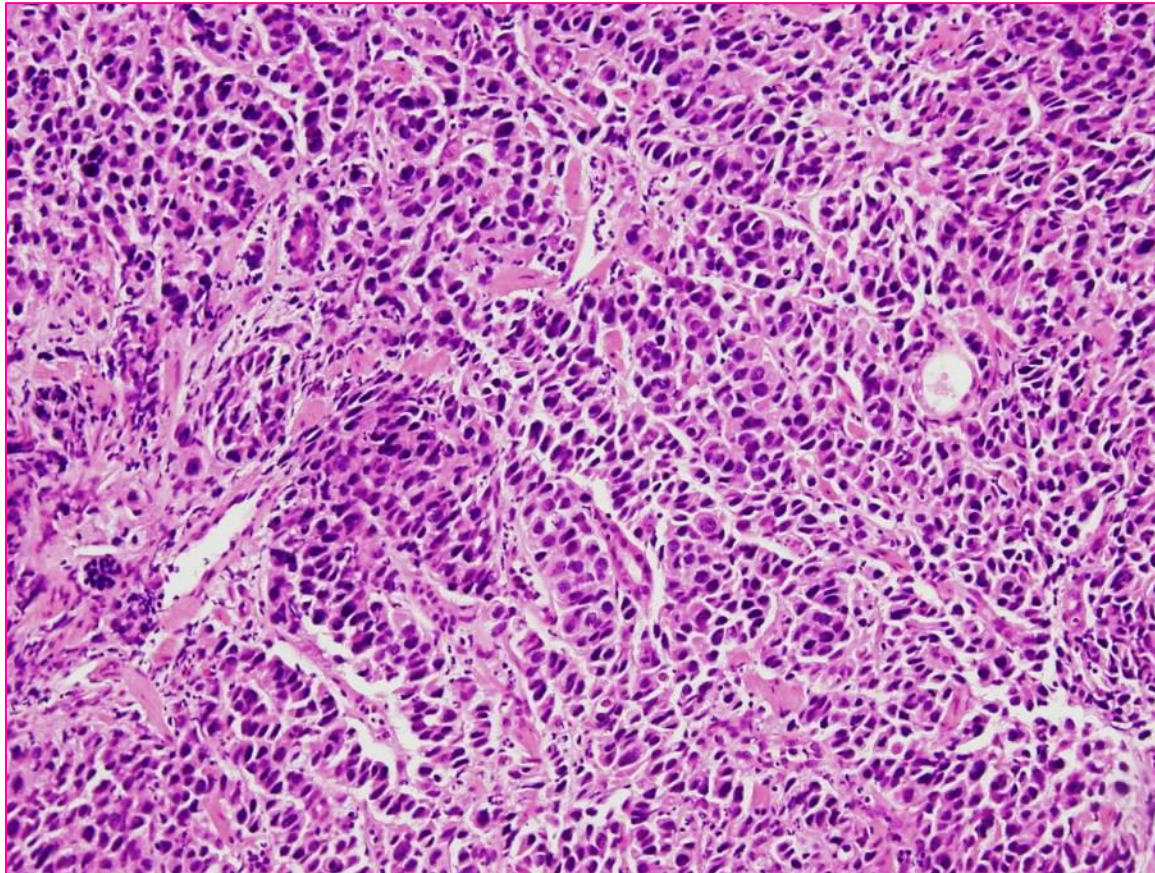
FISH法

1細胞あたりのHER2遺伝子15個以上
判定；陽性



Gastric carcinoma (生検)

IHC法; score 0



DISH法

腫瘍細胞20個中

HER2 シグナル 80個(→小クラスターと数えた場合) CEP17 シグナル 50個

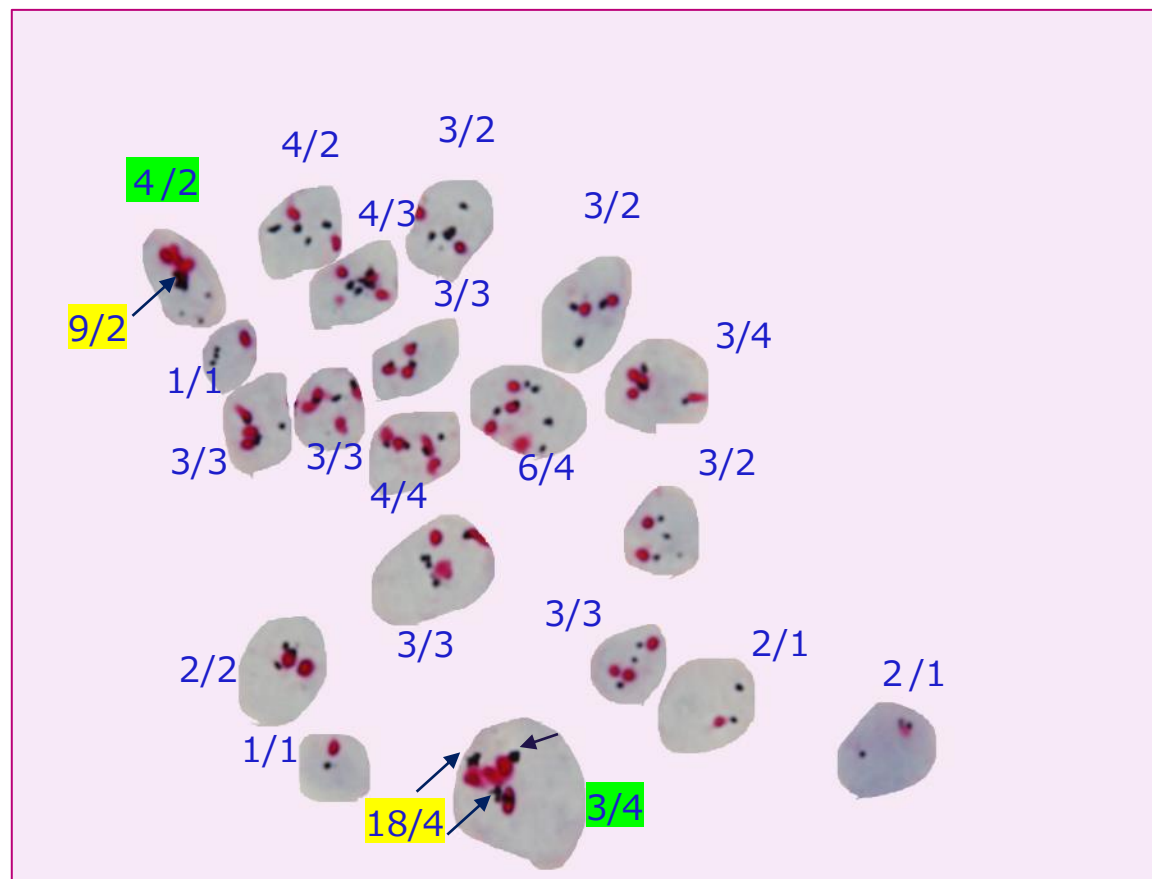
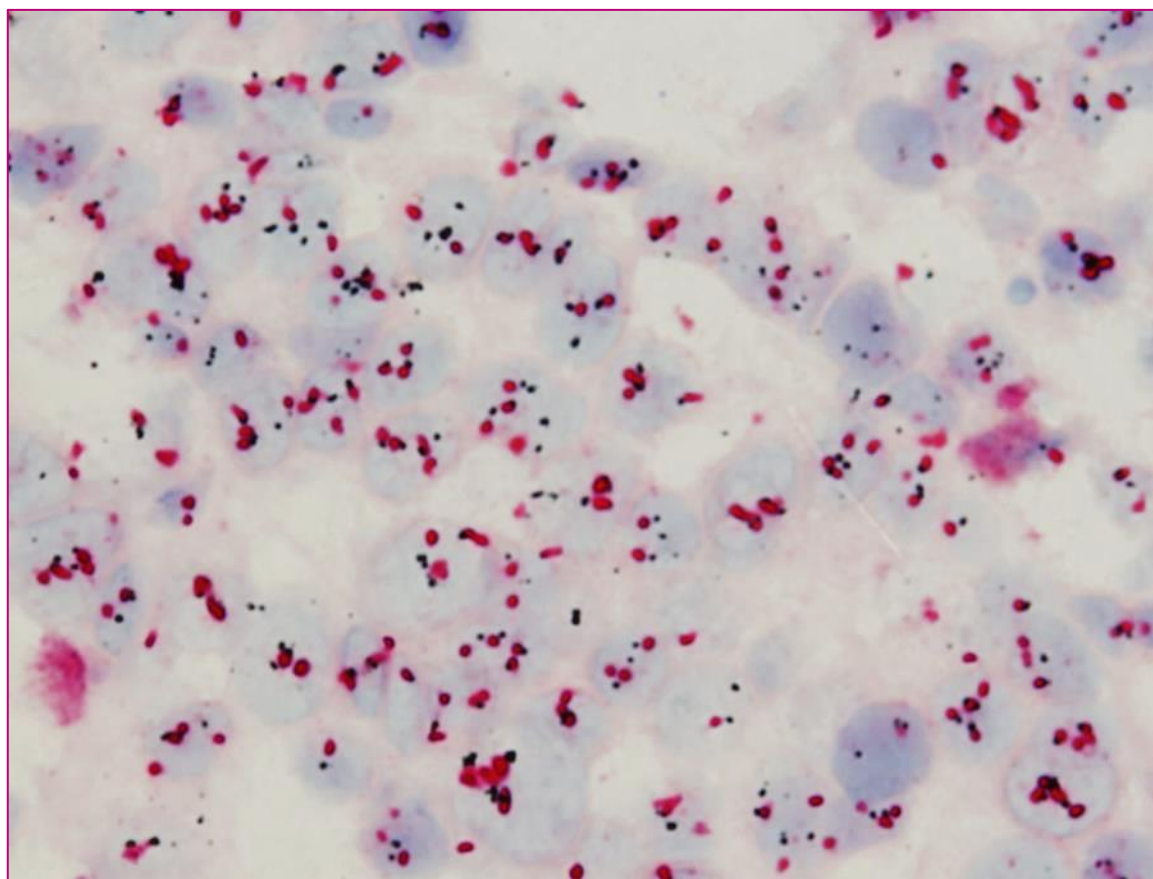
HER2/CEP比 $1.6 < 2.0$ かつ 1 個細胞当たりのHER2遺伝子平均コピー数 $4.0 \geq 4 \sim < 6$

さらに20個の腫瘍細胞をカウントする

HER2 シグナル 60個(→小クラスターと数えない場合) CEP17 シグナル 50個

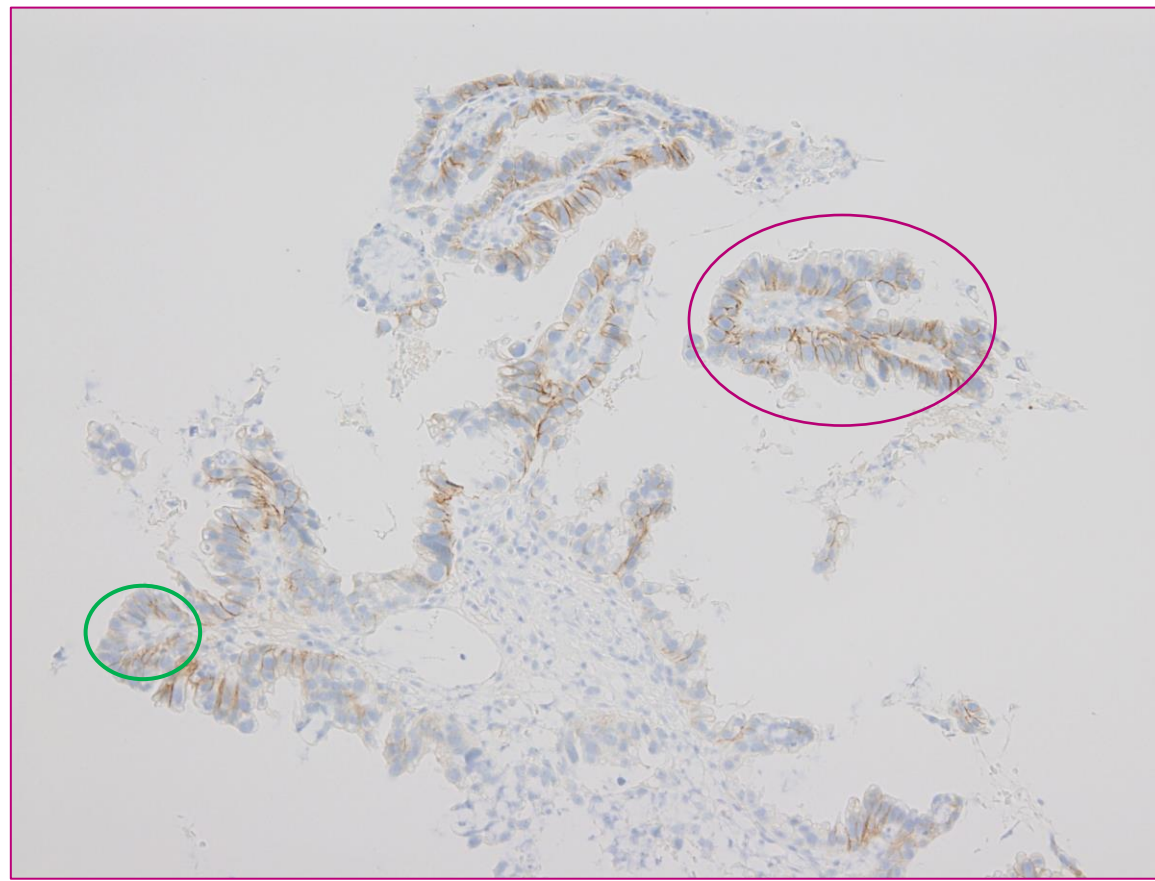
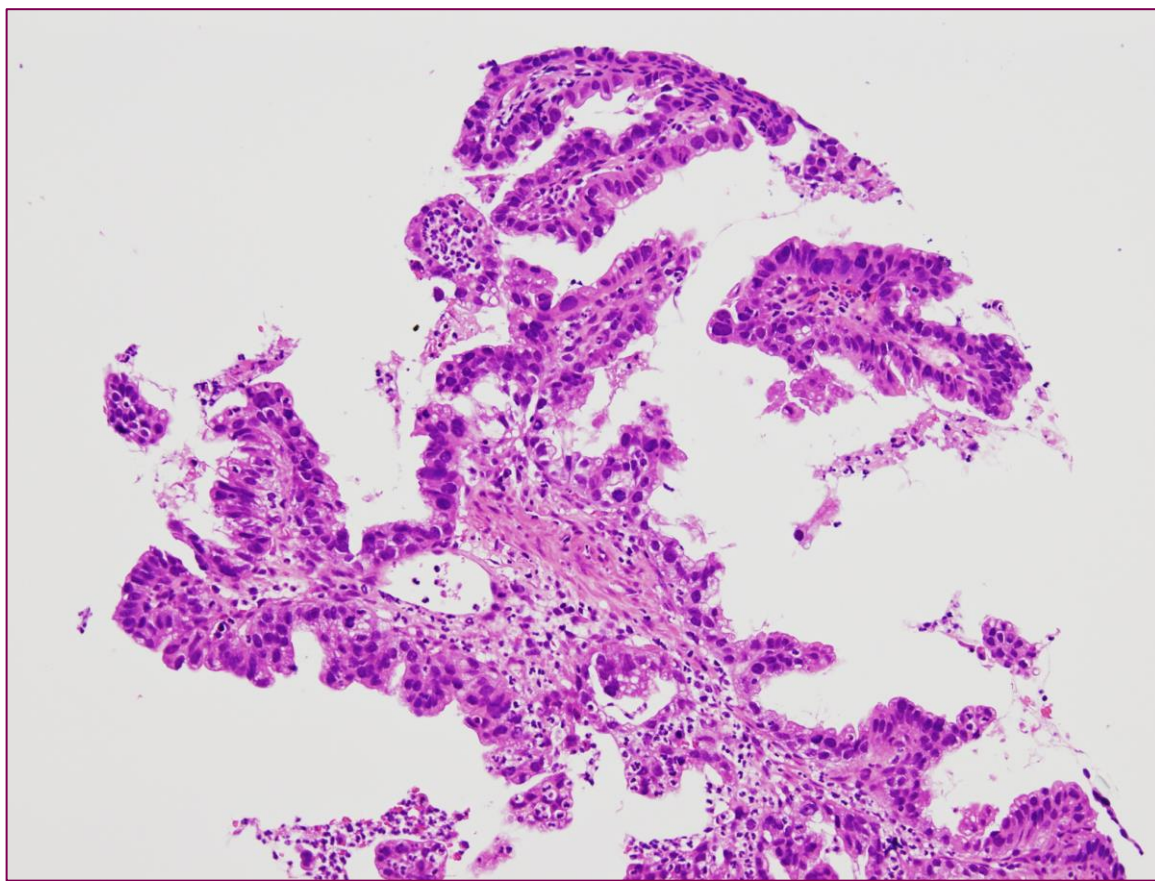
HER2/CEP比 $1.2 < 2.0$ かつ 1 個細胞当たりのHER2遺伝子平均コピー数 $3 < 4$

判定 ; 陰性



Gastric carcinoma (生検)

IHC法 ; 2 +



DISH法

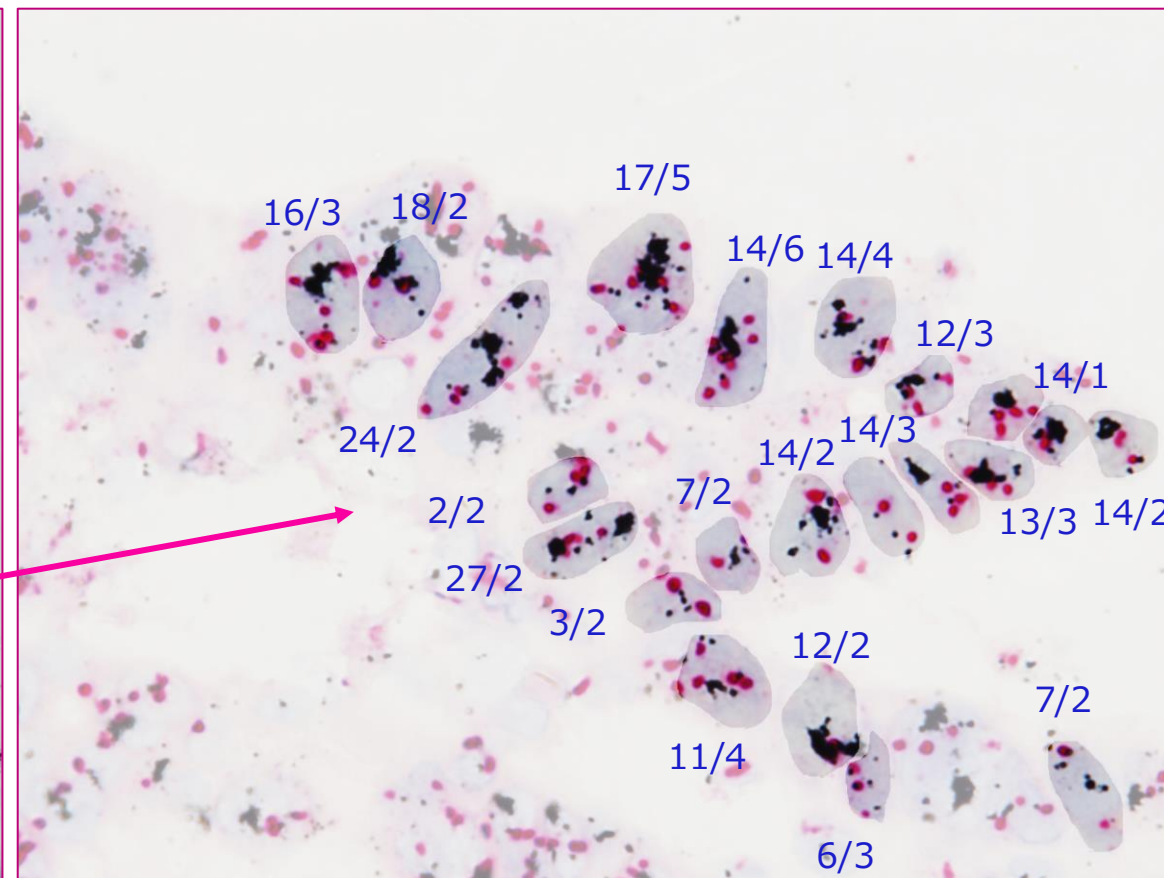
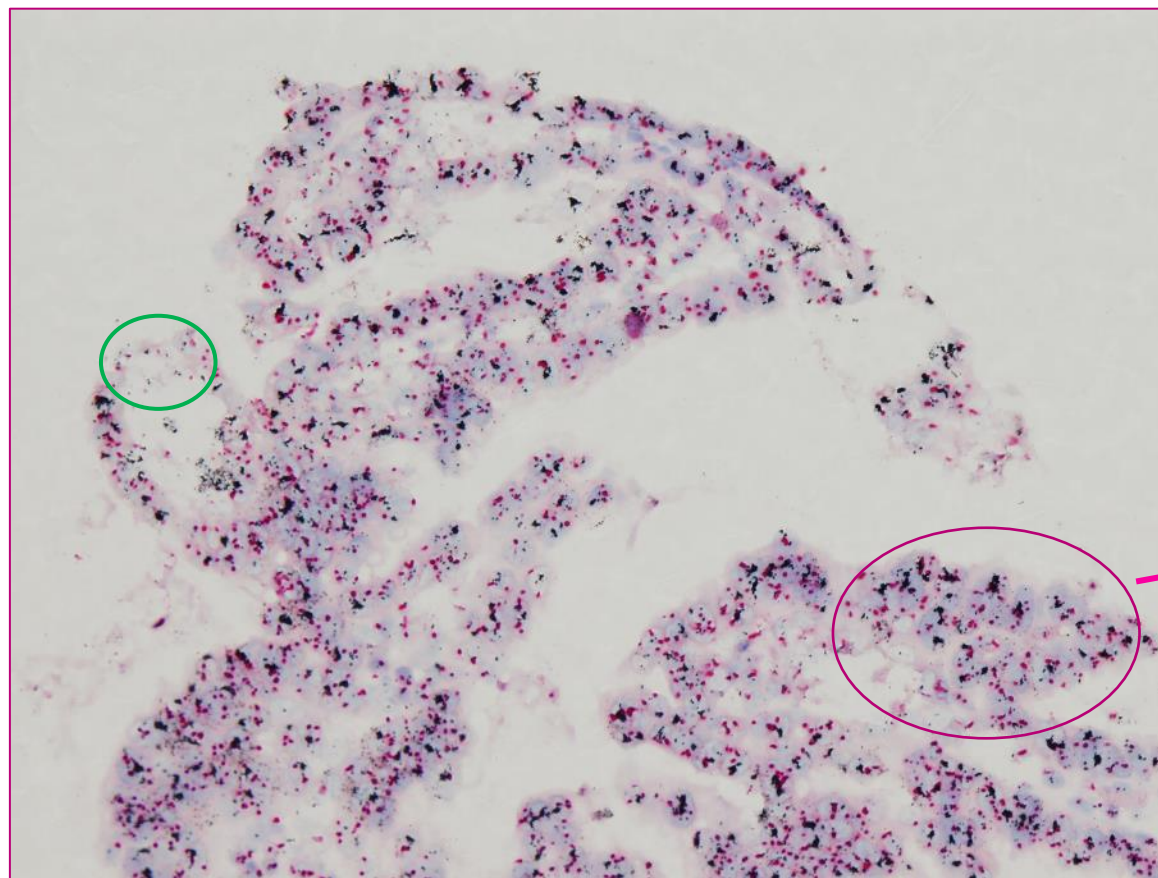
腫瘍細胞20個中

HER2 シグナル 259個 CEP17 シグナル 55個

HER2/CEP17比 $4.7 \geq 2.0$

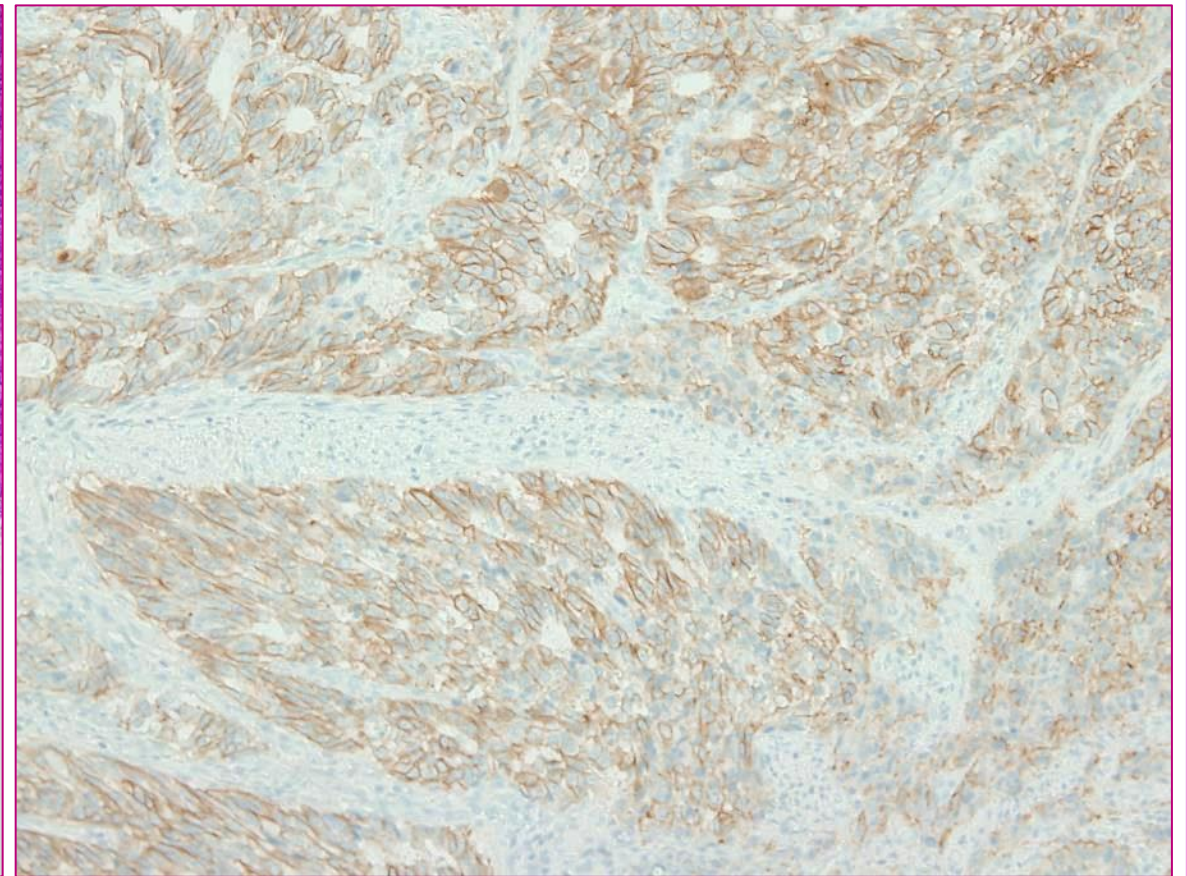
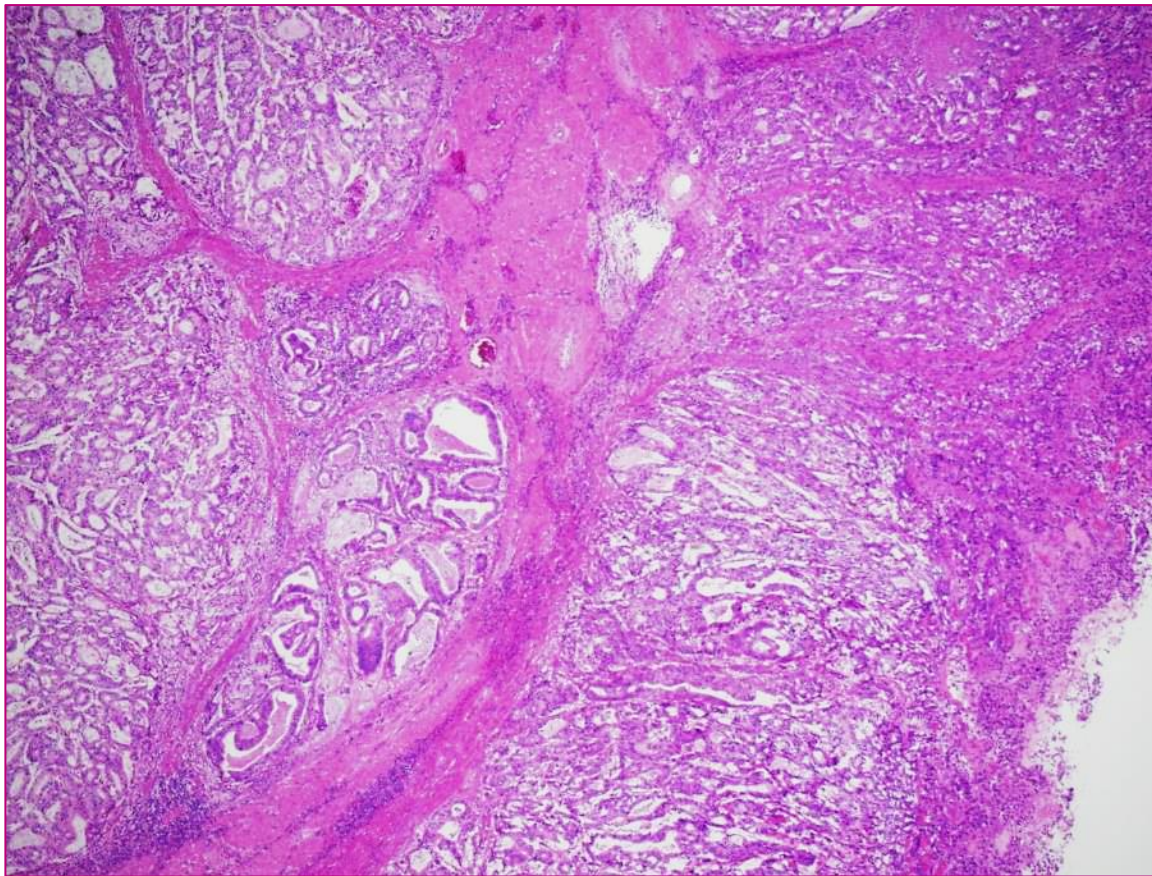
1 個細胞当たりのHER2遺伝子平均コピー数 13

判定；陽性



Esophagogastric junctional carcinoma (切除検体)

IHC法; 2 +



小活 2

- ◆ IHC法で 2 +(equivocal)と判定された症例を対象にDISH法・FISH法を行う
- ◆ IHC法の判定とDISH法・FISH法の結果が乖離する症例もある
- ◆ 特に消化管の生検などはIHC法で微妙な染色結果の場合もしばしばみられ、DISH法などで遺伝子増幅の有無を確認している



小活 3

シグナルのカウントにはトレーニングが必要

- ◆腫瘍細胞を確実に抽出する
- ◆重なるの少ない腫瘍細胞を選ぶ
- ◆各シグナルの多い部位・細胞をカウントする
- ◆あとから見直せるように画像として残しておくとい



まとめ

- ◆ベンタナ DISH HER2キットは自施設内で行える遺伝子検査
簡便・再現性・長期保存・TATの短縮
- ◆シグナルのカウントは複数人で
トレーニングが必要・細胞の重なりがなく $HER2/CEP17$ 比の高そうな部位の選択
シグナルを取りすぎないなど注意も必要
- ◆精度管理も重要
染色性・カウントの仕方・内部精度管理も大切



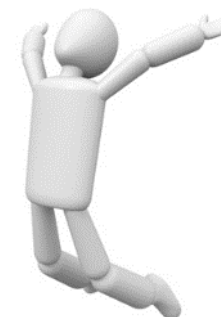
まとめ

◆カウントの自動化は現状では難しい

腫瘍細胞の選別・炎症細胞や間質細胞の除外
重なるシグナル・1個しかないシグナルのカウントの除外など…

◆タスクシフト/タスクシェア

診断業務の補助として関わることも可能



ご視聴
ありがとうございました

