この電子添文をよく読んでから使用してください。

体外診断用医薬品

製造販売承認番号　21400AMY00016000

** 2024 年　2 月改訂（第 10 版）
* 2022 年　3 月改訂　（第 9 版）

ja

HER-2 DNA Probe Kit
REF 02J01
472060R09C
B2J01J

HER-2 遺伝子キット

パスビジョン® HER-2 DNAプローブキット

【全般的な注意】

1. 本製品は体外診断用であり、それ以外の目的に使用しないこと。
2. 診断は、他の関連する検査結果や臨床症状等に基づいて総合的に判断すること。
3. 本書に記載された使用方法に従って使用すること。本書に記載された使用方法および使用目的以外での使用については、測定結果の信頼性は保証しない。
4. 本測定で使用する試薬類には、ヒト由来成分が含まれているものがあり、感染の危険があるので感染性のあるものとして取り扱うこと。詳細は、**【形状・構造等（キットの構成）】**または**【用法・用量（操作方法）】**を参照のこと。
* 5. 本キットは乳がん、胃がんまたは大腸がんのスクリーニングや診断に使用するものではない。
6. ハーセプチン治療の選択
   注：ハーセプチンの臨床試験におけるすべての患者は、治験中の免疫組織化学的分析法（臨床試験法：CTA）により選択され、本キットの測定により選択されていない。臨床試験で用いた検体の一部について、本キットを用いて測定を行い臨床試験法と一致した結果が得られているが、プロスペクティブな臨床試験での本キットとハーセプチンの臨床結果の実際の相関性は確立していない。
7. トレーニングの必要性
   弊社では検体の調製、操作法、HER-2 遺伝子の FISH 測定を行ったことがない測定者に対してトレーニングを提供している。すでにトレーニングを受けた施設でも、新たに測定を行う測定者がいる場合、トレーニングを受けることを推奨する。
8. 本書中の薬剤に関する記述の中には、海外での情報が含まれている。日本における最新の薬剤の効能・効果等は、薬剤の電子添文等を参照のこと。

【形状・構造等（キットの構成）】

1）LSI HER-2/*neu* スペクトラムオレンジ /CEP 17 スペクトラムグリーン DNA プローブ
　LSI HER-2/*neu* スペクトラムオレンジ DNA プローブ
　CEP 17スペクトラムグリーン DNA プローブ※
　（他の含有物：ブロッキング DNA（超音波処理したヒト胎盤 DNA）、緩衝液）
　※ 17 番染色体のセントロメアにハイブリダイゼーションする。

2）DAPI 対比染色液
　（主な含有物：DAPI（4, 6-diamidino-2-phenylindole）二塩酸、グリセロール、緩衝液）

3）NP-40
　（主な含有物：イゲパル（NP-40 代替品）［オクチルフェノキシ］ポリエトキシエタノール）

4）20X SSC塩
　（主な含有物：塩化ナトリウム、クエン酸三ナトリウム水和物）

【使用目的】

** ・乳癌又は胃癌の組織又は細胞中の HER-2/*neu* 遺伝子増幅度の測定（（HER-2/*neu*）/（CEP 17）比）（悪性腫瘍の診断補助）

** ・がん組織又は細胞中の HER-2/*neu* 遺伝子増幅度の測定（（HER-2/*neu*）/（CEP 17）比）（トラスツズマブ（遺伝子組換え）及びペルツズマブ（遺伝子組換え）の結腸・直腸癌患者への適応を判定するための補助に用いる）

【測定原理】

Fluorescence *in situ* hybridization（FISH）法

【操作上の注意】

測定試料の性質、採取法

本キットはホルマリン固定パラフィン包埋組織検体に用いるために、設計されたものである。組織の採取は、各施設が定めた手順に従って行うこと。

注）・測定の対象とする組織領域の選択は病理医が行う。
・DNA が損傷を受け FISH 法による分析がうまくいかないことがあるため、検体を酸、強い塩基、極端な熱に暴露させないこと。

【用法・用量（操作方法）】

（1）試薬の調製方法

1. 本キットの構成試薬

1）LSI HER-2/*neu* スペクトラムオレンジ /CEP 17スペクトラムグリーン DNA プローブ
　そのまま用いる。–20℃で、遮光して保存する。

2）DAPI 対比染色液
　そのまま用いる。–20℃で、遮光して保存する。

3）NP-40
　そのまま用いる。–20℃～ +25℃で保存する。

4）20X SSC塩
　–20℃～ +25℃で保存する。
　66 g の 20X SSC塩に 200 mL の精製水を加え、十分に撹拌する。pH メーターを用いて常温で pH を測定し、塩酸で pH 5.3 に調製し、精製水で全量 250 mL の 20X SSC液（3 mol/L 塩化ナトリウム、0.3 mol/L クエン酸ナトリウム、pH 5.3）とする。ポアサイズ 0.45 μm のフィルターでろ過した後、保存する。常温で 6 ヶ月まで保存できる。

5）変性溶液（70％ホルムアミド /2X SSC、pH 7.0 ～ 8.0）
　ホルムアミド※、20X SSC液、精製水を混合して変性溶液とする。
　49 mL のホルムアミド、7 mL の 20X SSC液（pH 5.3）、14 mL の精製水をよく撹拌する。精製水で全量 70 mL とする。pH メーターで pH を測定し（常温）、pH 7.0 ～ pH 8.0 の間にあることを確認して使用する。
　調製後の試薬は、1 週間まで保存できる。試薬は毎回使用前に pH をチェックする。使用しないときは、2 ～ 8℃で密栓容器にて保存する。

6）ポストハイブリダイゼーション洗浄緩衝液（2X SSC/0.3% NP-40）
　20X SSC液を精製水で希釈し、pH7.0 ～ pH7.5 のポストハイブリダイゼーション洗浄緩衝液を調製する。
　100 mL の 20X SSC液（pH 5.3）、3 mL の NP-40、847 mL の精製水を混合し、良く撹拌する。pH メーターを用いて常温で pH を測定し、1 mol/L NaOH で pH 7.0 ～ pH 7.5 に pH を調製し、精製水を加えて全量 1 L にする。ポアサイズ 0.45 μm のフィルターでろ過する。
　その日の測定終了後に使用した溶液は廃棄する。未使用溶液は室温にて 6 ヶ月まで保存できる。

※ ホルムアミドは別途用意する。

2. その他の試薬

1）エタノール溶液
　100％エタノールと精製水を用いて、70％、85％、100％（v/v）エタノール溶液を作製する。
　蒸発のない限り、または溶液が希釈されない限り、エタノール溶液は 1 週間使用可能である。使用しないときは、室温で密栓容器にて保存する。

2）パラフィンプレトリートメントキット

・前処理溶液
　パラフィンプレトリートメントキットの構成試薬。そのまま用いる。使用に当たってはコプリンジャーに 50 mL の前処理溶液を入れ、温浴槽で 80 ± 1℃に加温する。使用日の測定終了後に廃棄する。

・プロテアーゼ
　パラフィンプレトリートメントキットの構成試薬。プロテアーゼ溶液作製時に使用する。

・プロテアーゼ溶液緩衝液
　パラフィンプレトリートメントキットの構成試薬。プロテアーゼ溶液作製時に使用する。

　プロテアーゼ溶液の調製：
　プロテアーゼ溶液緩衝液を pH メーターで pH 2.0 であることを確かめる。必要であれば 1 mol/L HCl もしくは 1 mol/L NaOH を使って pH を調整する。コプリンジャーに 50 mL のプロテアーゼ溶液緩衝液を入れ、温浴槽で 37 ± 1℃まで加温する。使用する直前に 25 mg のプロテアーゼを加え、よく混合し、プロテアーゼ溶液とする。使用日の測定終了後に廃棄する。

・洗浄緩衝液
　パラフィンプレトリートメントキットの構成試薬。使用に当たっては、100 mL の洗浄緩衝液を pH メーターで pH 7.0 であることを確かめる。必要であれば 1 mol/L HCl もしくは 1 mol/L NaOH を使って pH を調整する。2 個のコプリンジャーに各 50 mL の洗浄緩衝液を入れる。使用日の測定終了後に廃棄する。

（2）必要な器具・器材・試料等

1. コントロールスライドおよび試薬

・プローブチェック HER-2/*neu* 正常コントロールスライド
（ProbeChek HER-2/*neu* Normal Control Slides）（製品番号：2J05-30（30-805093））
（正常シグナル比、HER-2/*neu*：CEP 17 比は 0.75 ～ 1.25）：顕微鏡用スライドグラスに貼り付けたホルマリン固定パラフィン包埋培養ヒト乳がん細胞株（MDA-MB-231、LSI HER-2/*neu*：CEP 17 比は正常）、枚数：5 枚、コントロールスライドは湿気を避けるために乾燥剤とともに密閉容器中に 15 ～ 30℃で保存する。
毎回の検査において、プローブチェック HER-2/*neu* 正常コントロールスライドの HER-2/*neu*：CEP 17 比が 0.75 ～ 1.25 の範囲内であることを確認する。

・プローブチェック HER-2/*neu* 増幅コントロールスライド
（ProbeChek HER-2/*neu* Cut-Off Control Slides）（製品番号：2J04-30（30-805042））
（HER-2/*neu*：CEP 17 比 1.6 ～ 2.0 は弱増幅）（カットオフコントロールとして用いる）顕微鏡用スライドグラスに貼り付けたホルマリン固定パラフィン包埋培養ヒト乳がん細胞株（Hs578T、HER-2/*neu* は弱増幅）、枚数：5 枚、コントロールスライドは湿気を避けるために乾燥剤とともに密閉容器中に 15 ～ 30℃で保存する。
毎回の検査において、プローブチェック HER-2/*neu* 増幅コントロールスライドの HER-2/*neu*：CEP 17 比が 1.6 ～ 2.0 の範囲内であることを確認する。

・パラフィンプレトリートメントキット（Vysis Paraffin Pretreatment Reagent Kit）
（パスビジョン HER-2 DNA プローブキット用）（製品番号：2J02-32（32-801200））
以下の構成試薬を含む
・前処理溶液（Vysis Pretreatment Solution）（チオシアン酸ナトリウム（NaSCN））：50 mL × 5
・プロテアーゼ（Vysis Protease）（ペプシン（Activity 1：3000 ～ 1：3500））：25 mg × 5
注：ペプシンは、その重量の 3000 ～ 3500 倍の凝固卵白アルブミンを分解する。
・プロテアーゼ緩衝液（Vysis Protease Buffer）（NaCl 溶液、pH 2.0）：50 mL × 5
・洗浄緩衝液（Vysis Wash Buffer）（2X SSC、pH 7.0）：250 mL × 2

・VP2000 プロセッサー使用時に必要
・前処理溶液（Pretreatment Reagent）：500 mL（製品番号：2J06-30（30-801250））
・プロテアーゼ緩衝液（Protease Buffer）：500 mL（製品番号：2J07-30（30-801255））
・プロテアーゼ I（Protease I）：250 mg × 2（製品番号：2J08-32（32-801260））
・10％中性緩衝ホルマリン溶液（4％ホルムアルデヒド-PBS 溶液）
・Hemo-De
・ヘマトキシリン溶液・エオジン溶液（HE）
・蛍光顕微鏡油浸オイル：15 ～ 30℃で保存
・ホルムアミド（特級）
・エタノール（100％）：常温保存
・濃塩酸（12 mol/L）
・1 mol/L 水酸化ナトリウム
・精製水（蒸留、脱イオン水または Milli-Q 水）：常温保存
・ペーパーボンド
・乾燥剤

注：保存条件が示されていない試薬類については製造元の推奨する条件で保存すること。

2. 器具・装置

・シラン処理または正に荷電した清潔な顕微鏡用スライドグラス
・スライド加温器（スライドウオーマー）（45 ～ 50℃）
・カバーグラス（22 mm × 22 mm）
・微量ピペット（1 ～ 10 μL）および滅菌済みピペットチップ
・ポリプロピレン製微量遠心チューブ（0.5 または 1.5 mL）
・タイマー
・ミクロトーム
・マグネティックスターラー
・ボルテックス ミキサー
・微量遠心機
・メスシリンダー（100 mL、200 mL、500 mL）
・温浴槽（37 ± 1℃、72 ± 1℃および 80 ± 1℃）
・蛋白質を含まない精製水を使った温浴槽（40 ± 2℃）
・気相恒温槽（インキュベーター）（37 ± 1℃および 56℃）
・ダイアモンドペン
・湿潤箱
・ピンセット
・コプリンジャー（5 枚用）
・適切なフィルターが装着された蛍光顕微鏡（**3. 顕微鏡装置および付属品**の項参照）
・pH メーター
・較正済み温度計
・顕微鏡用スライドボックス（蓋付き）
・濾過用フィルター（ポアサイズ：0.45 μm）
・VP2000 プロセッサー：自動前処理装置（必要に応じ用意する）
・ThermoBrite もしくは HYBrite：FISH 染色装置（スライド変性 / ハイブリダイゼーションシステム）（必要に応じ用意する）

3. 顕微鏡装置および付属品

顕微鏡：
ハイブリダイゼーションの結果を観察するには落射型の蛍光顕微鏡が必要である。もし既存の蛍光顕微鏡があるなら、その顕微鏡が蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーション（FISH）で測定する標本に使えるかどうかを前もって確認することが必要である。一般的な DNA 染色、例えば DAPI、Propidium Iodide およびキナクリンに使われる顕微鏡は FISH アッセイには適さないことがある。顕微鏡はいつも清潔に保ち、製造業者による定期的な調整を推奨する。

注意：*in situ* 測定試薬を使ってうまくいかない場合に推定される原因として、ハイブリダイゼーション測定はうまくいっているのに、最適でない蛍光顕微鏡の使用や間違ったフィルターの使用によることがしばしばある。

励起光の光源：
励起光の光源として最大約 200 時間の寿命のある 100 W 水銀ランプを推薦する。そのランプの使用時間を記録し、使用期限が切れる前に交換する。ランプがその機器に純正（または、準ずるもの）であるかどうかを確認する。

対物レンズ：
100 W の水銀ランプ付の顕微鏡を使用するときは、計算上の口径が 0.75 以上の油浸蛍光対物レンズを使用する。25 倍の対物レンズに 10 倍の接眼レンズを取り付けたタイプがターゲットエリアの決定に適している。40 倍の対物レンズに 10 倍の接眼レンズを取り付けたタイプがスキャニングに適している。FISH の解析には、63 倍または 100 倍の油浸用色消しレンズの付いた対物レンズを用いる。

油浸用オイル：
油浸用対物レンズに用いるオイルは、無蛍光または低自家蛍光の蛍光顕微鏡用のものを使用する。

フィルター：
CEP および LSI DNA プローブキットのために至適化され、殆どの顕微鏡で使用可能なマルチバンドパスフィルターセットを推奨する。

パスビジョンキットに推奨されるフィルターセット
・DAPI/ グリーン / オレンジトリプルバンドパスフィルター（Triple Bandpass Filter Set, DAPI/Green/Orange v2）
・DAPI/ オレンジデュアルバンドパスフィルター（Dual Bandpass Filter Set, DAPI/9-Orange）
・DAPI/ グリーンデュアルバンドパスフィルター（Dual Bandpass Filter Set, DAPI/Green）
・グリーン / オレンジデュアルバンドパスフィルター（Dual Bandpass Filter Set, Green/Orange v2）

ハイブリダイゼーション領域への LSI HER-2/*neu* および CEP 17 プローブは、各々オレンジ色とグリーン色の蛍光で標識している。他の DNA は DAPI 染色でブルー色の蛍光を発する。

（3）測定（操作）法

1. 操作方法

1）ホルマリン固定パラフィン包埋組織から 4 ～ 6 μm（胃がん組織は 4 μm とすること）の厚さの組織切片スライドを作成する。
2）組織切片スライドに所定の前処理を行い、乾燥させ、検体組織切片スライドとする。
3）検体組織切片スライドを変性溶液中で所定温度で所定時間浸漬する。
4）エタノールで脱水し、乾燥させた後、所定量の LSI HER-2/*neu* スペクトラムオレンジ /CEP 17 スペクトラムグリーン DNA プローブを添加し、所定温度で所定時間インキュベーションし反応させる。
5）反応後、スライドグラスを所定温度に加温したポストハイブリダイゼーション洗浄緩衝液で所定時間洗浄する。
6）スライドを乾燥させ、所定量の対比染色液を滴下し、蛍光顕微鏡で所定数の細胞核についてそれぞれの HER-2/*neu* のオレンジ色のシグナル（蛍光）数と CEP 17 のグリーン色のシグナル（蛍光）数を数える。
7）（HER-2/*neu* シグナル数）/（CEP 17 シグナル数）比を計算する。

1）検体の取扱いとスライドの調製

1. 検体の処理
組織を採取後、適当な大きさに切り出し（できるだけ組織片は 2 × 2.5 × 0.5 cm 程度以内の大きさ）、ただちに組織片の 5 ～ 50 倍量の 10％中性緩衝ホルマリン液に浸し固定する。組織片の場合、固定時間は、24 ～ 48 時間とする。
組織片は、固定後水洗いして、70％エタノール、80％エタノール、90％エタノール、100％エタノールで脱水する。さらに中間剤（キシレン）に浸漬して、脱アルコールした後、パラフィン包埋する。

2. ホルマリン固定パラフィン包埋組織からの切片スライドの作製
ハイブリダイゼーションエリアを識別するために、同じ組織片から作製した連続切片の 10 枚に 1 枚を HE 染色する。1 回の測定には 22 mm × 22 mm のエリアを使用する。大きな切片の場合、10 μL 以上のプローブが 1 回の測定に必要となる。
組織は 4 ～ 6 μm の厚さの切片とすること（胃がん組織は 4 μm とすること）。ホルマリン固定パラフィン包埋組織は、各施設の通常の手順に従って取り扱い、保存する。正確な測定結果を得るため、測定するすべての検体を同じ手順に従って取り扱うこと。

1）ミクロトームで 4 ～ 6 μm（胃がん組織は 4 μm とすること）の厚さのパラフィン切片を作製する。
2）組織切片を蛋白を一切含まない加温精製水（40 ± 2℃）に浮かべる。
3）組織切片をオルガノシランコートしたスライドグラス[注)] の処理側にのせる。

注）オルガノシランコートをしたスライドは、スライドの前処理、FISH 染色操作中に切片がスライドから剥がれることが少ない。

4）スライドを風乾する。
（プローブチェック HER-2/*neu* 正常コントロールスライドおよび増幅コントロールスライド[注)] の処理はここから始める）

注）プローブチェックコントロールスライド（正常および増幅）は検査毎に毎回使用する。コントロールスライドについては、2. 品質管理の項に記載した。

5）スライドを 56℃で一晩放置する。

2）スライドの前処理

本キットでの染色操作の前に、スライドを脱パラフィン処理し、検体を固定する。この処理にパラフィンプレトリートメントキットを用いる。

1. 脱パラフィン
- 検体スライドを Hemo-De に常温 10 分間浸漬する。
- 検体スライドを新しい Hemo-De に常温 10 分間浸漬する。同じ操作を繰り返す。
- 検体スライドを 100%エタノールに常温 5 分間浸漬し、脱水する。同じ操作を繰り返す。
- 検体スライドを風乾する（または 45 ～ 50℃のスライドウオーマー上で乾燥させる）

2. 検体スライドの前処理
- 検体スライドを 0.2 mol/L HCl に 20 分間浸漬する。
- 検体スライドを精製水に 3 分間浸漬する。
- 検体スライドを洗浄緩衝液に 3 分間浸漬する。
- 検体スライドを 80 ± 1℃の前処理溶液に 30 分間浸漬する。
- 検体スライドを精製水に 1 分間浸漬する。
- 検体スライドを洗浄緩衝液に 5 分間浸漬する。同じ操作を繰り返す。

3. 酵素処理
- 検体スライドを取り出し、ペーパータオルにスライドグラスの下端をつけて余分な洗浄緩衝液を取り除く。
- 検体スライドを 37 ± 1℃に加温したプロテアーゼ溶液に 10 ～ 60 分間浸漬する（胃がん組織の場合、60 分間浸漬すること）。
- 検体スライドを洗浄緩衝液に 5 分間浸漬する。同じ操作を繰り返す。
- 検体スライドを風乾する（または 45 ～ 50℃のスライドウオーマー上で 2 ～ 5 分間乾燥させる）。

4. 検体の固定
- 検体スライドを 10%中性緩衝ホルマリンに常温 10 分間浸漬する。
- 検体スライドを洗浄緩衝液に 5 分間浸漬する。同じ操作を繰り返す。
- 検体スライドを風乾する（または 45 ～ 50℃のスライドウオーマー上で 2 ～ 5 分間乾燥させる）。
- 「3）FISH 染色操作」のステップへ進む。

自動前処理装置 VP2000 を用いた「スライドの前処理」

i. 脱パラフィン
- 検体スライドを Hemo-De に常温 5 分間浸漬する。
- 検体スライドを新しい Hemo-De に常温 5 分間浸漬する。同じ操作を繰り返す。
- 検体スライドを 95%エタノールに常温 1 分間浸漬し、脱水する。同じ操作を繰り返す。

ii. 検体スライドの前処理
- 検体スライドを 0.2 mol/L HCl に 20 分間浸漬する。
- 検体スライドを精製水に 3 分間浸漬する（流水下）。
- 検体スライドを 80℃の前処理溶液に 30 分間浸漬する。
- 検体スライドを精製水に 3 分間浸漬する（流水下）。

iii. 酵素処理
- 検体スライドを 37℃に加温したプロテアーゼ溶液に 10 ～ 60 分間浸漬する（胃がん組織の場合、60 分間浸漬すること）。
- 検体スライドを精製水に 3 分間浸漬する（流水下）。

iv. 検体の固定
- 検体スライドを 10%中性緩衝ホルマリンに常温 10 分間浸漬する。
- 検体スライドを精製水に 3 分間浸漬する（流水下）。
- 検体スライドを 70%エタノールに常温 1 分間浸漬し、脱水する。同じ操作を、85%エタノール、100%エタノールで繰り返す。
- 検体スライドを VP2000 の air drying station 中で 28℃にて 3 分間乾燥させる。
- 「3）FISH 染色操作」のステップへ進む。

3）FISH 染色操作

1. プローブの準備
1）プローブを室温に戻して粘度を充分に下げ、正確なピペッティングが出来るようにする。
2）ボルテックスミキサーで混和する。各々のチューブを卓上遠心機で 2 ～ 3 秒遠心して、内容物をチューブの底に落とし、再び穏やかに混和する。
3）「3. ハイブリダイゼーション」のステップで使用する。

2. 検体 DNA の変性

プローブを準備するタイミングは、検体 DNA を変性するタイミングに注意深く合わせて行い、同時にハイブリダイゼーションのステップに進めるようにすること。

1）検体スライドの作製前に水で湿らせたペーパータオルを底に敷いた湿潤箱（気密性容器で、その側面をペーパータオルでテーピングしたもの）を 37 ± 1℃インキュベーター内で予備加温する。
2）変性溶液の pH が常温で pH 7.0 ～ 8.0 であることを確かめる。変性溶液をコプリンジャーに入れ、溶液が 72 ± 1℃になるまで温浴槽で加温する（72 ± 1℃の温浴槽に少なくとも 30 分間置く）。使用前に溶液温度を確かめる。
3）ハイブリダイゼーション領域がどの部分か分かるように、検体スライドの裏側に領域を囲むようにダイアモンドペンでマークする。
4）検体スライドを 72 ± 1℃の変性溶液[注)] の入ったコプリンジャー中に 5 分間浸漬し、検体 DNA を変性する（コプリンジャー当たりスライド 5 枚以下）。コプリンジャーには一度にスライドを 6 枚以上入れて変性しないようにする。

注）毎回、使用の前に溶液温度を確認する。

5）ピンセットを使って、検体スライドを変性溶液から取り出し、すぐに常温の 70%エタノール中に入れる。ホルムアミドを除くためにスライドを振盪する。検体スライドを 1 分間浸漬する。
6）検体スライドを 70%エタノールから取り出し、85%エタノール中に入れ、ホルムアミドを除くためにスライドを振盪する。検体スライドを 1 分間浸漬する。100%エタノールで同じ操作を繰り返す。
7）ペーパータオルに検体スライドグラスの下端をつけてエタノールを取り除き、ペーパータオルでスライドグラスの裏側を拭く。
8）検体スライドをドライヤーで風乾する（45 ～ 50℃のスライドウオーマーで 2 ～ 5 分間乾燥させる）。

3. ハイブリダイゼーション
1）検体スライドのハイブリダイゼーション領域に LSI HER-2/*neu* スペクトラムオレンジ /CEP 17 スペクトラムグリーン DNA プローブを 10 μL 添加する。すぐに 22 mm × 22 mm のカバーグラスをプローブの上に被せ均一にプローブを広げる。ハイブリダイゼーション領域に気泡が入らないようにする。
使用しない LSI HER-2/*neu* スペクトラムオレンジ /CEP 17 スペクトラムグリーン DNA プローブは、すぐに再凍結して保存する。
2）ペーパーボンドでカバーグラスをシールする。
3）前もって加温した湿潤箱に検体スライドを入れ、蓋をして 37 ± 1℃のインキュベーターで 14 ～ 18 時間のハイブリダイゼーションを行う。
4）「4. スライドグラスの洗浄」のステップへ進む。

ThermoBrite もしくは HYBrite を用いた FISH 染色操作
（検体 DNA の変性 / ハイブリダイゼーションの同時処理）

i. プローブの準備
1）プローブを常温に戻して粘度を充分に下げ、正確なピペッティングが出来るようにする。
2）ボルテックスミキサーで混和する。各々のチューブを卓上遠心機で 2 ～ 3 秒遠心し、内容物をチューブの底に沈殿させる。再び、穏やかに混和する。

ii. 検体 DNA の変性とハイブリダイゼーション
1）検体スライドのハイブリダイゼーション領域に LSI HER-2/*neu* スペクトラムオレンジ /CEP 17 スペクトラムグリーン DNA プローブを 10 μL 添加する。すぐに 22 mm × 22 mm のカバーグラスをプローブの上に被せ均一にプローブを広げる。
ハイブリダイゼーション領域に気泡が入らないようにする。
使用しない LSI HER-2/*neu* スペクトラムオレンジ /CEP 17 スペクトラムグリーン DNA プローブは、すぐに再凍結して保存する。
2）ペーパーボンドでカバーグラスの周囲をシールする。スライドの下底が清浄であることを確認する。
3）ペーパータオルを水で湿らし、ヒーティング面に沿った溝に置く。
4）ThermoBrite もしくは HYBrite をオンにする。
5）プログラムを Melt Temp 85℃、Melt time を 1 分（変性）、Hybridization Temperature を 37℃、Hybridization Time を 14 ～ 18 時間にセットする。
6）入力信号が出たら、スライドを装置のヒーティング面に置く。スライドがヒーティング面に平らに置かれていることを確認する。
7）ThermoBrite もしくは HYBrite のカバーを閉じ、プログラムを動作させる。
8）「4. スライドグラスの洗浄」のステップへ進む。

4. スライドグラスの洗浄

1）ポストハイブリダイゼーション洗浄緩衝液（2X SSC/0.3% NP-40）をコプリンジャーに入れる。ポストハイブリダイゼーション洗浄緩衝液が72 ± 1℃[注)]になるまで温浴槽で予備加温する（72 ± 1℃の温浴槽に少なくとも 30 分間置く）。

注）何回か処理する場合、ポストハイブリダイゼーション洗浄緩衝液の温度を 72 ± 1℃に戻しておく。

2）ポストハイブリダイゼーション洗浄緩衝液を入れたコプリンジャーをもうひとつ用意し、こちらは常温にする。いずれの溶液も一日しか使用出来ない。

3）ピンセットでペーパーボンドのシールを取り除く。

4）検体スライドを常温のポストハイブリダイゼーション洗浄緩衝液の中に入れる。カバーグラスは自然に溶液中で剥がれるのでポストハイブリダイゼーション洗浄緩衝液に入れる前に無理にカバーグラスを剥がさないようにする。

5）溶液中でカバーグラスを慎重にはずして取り出し、検体スライドから余分な溶液を取り去り、検体スライドを 72 ± 1℃[注)] に加温したポストハイブリダイゼーション洗浄緩衝液に 2 分間浸す（コプリンジャー当たりスライドは 5 枚以内）。

注）73℃を超える温度で 2 分を超える時間は推奨できない。

6）コプリンジャーから検体スライドを取り出し、立てかけて、遮光下（締め切った引き出しや締め切ったキャビネット中の棚等）で風乾する。

7）10 μL の DAPI 対比染色液を検体スライドのターゲットエリアに添加し、カバーグラスを被せる。シグナルの計測まで検体スライドは遮光して保存する。

5. 染色スライドの保存

カバーグラスを被せたスライドは、遮光して –20℃で保存する。蛍光顕微鏡で観察する前にスライドを常温に戻す。

4）シグナルの計測

1. スライドの染色状態の確認

次の判定基準にしたがってスライドの染色状態を確認する。判定基準から外れた検体については、**トラブルシューティングガイド**を参照し、再度染色スライドを作製し直す。

・プローブシグナルの強度：
明るく、明瞭な、識別可能な、判定しやすいシグナルである必要がある。シグナルは、明るく小さくまとまっており、楕円形であるか、紡錘形のいずれか。

・バックグランド：
バックグランドは、暗いか黒。蛍光性の粒子やかすみがない状態のもの。

2. ターゲットシグナルの認識

指定されたフィルターを使用する（顕微鏡および付属品の項を参照）。焦点深度を合わせ、ターゲットとするシグナルのサイズおよび形状とノイズ（破砕物）を識別する。がん細胞のハイブリダイゼーションシグナルのみを計測する。一般にがん細胞は正常細胞、リンパ球や上皮細胞より大きい。

同じ組織片からの切片スライドの 10 枚毎に 1 枚を HE で染色し、ハイブリダイゼーションエリアを同定する。FISH 染色をした後、そのエリアを確認する。

3. 最適な観察領域と計測する核の選択

25X の対物レンズを用いてハイブリダイゼーションエリアを観察し、HE 染色でがん細胞であることを確認してターゲットエリアを決める。個々に分離したシグナルを持つ核のみを計測する。以下は計測しない。

- ネクローシス部分や核の境界があいまいな部分
- 強度の弱いシグナル
- 非特異的なシグナル
- バックグランドが高いシグナル
- 核の境界を決定するための対比染色が不十分な核

4. シグナルを数える

40X の対物レンズを使っていくつかのがん細胞のあるエリアをスキャンし、細胞の形状が不均一なものをがん細胞と見なす。核が適当に分布しているエリアを選ぶ。ハイブリダイゼーションシグナルが弱いエリアは避ける。63X または 100X の対物レンズを使って選択したエリアの左上の 4 分円から数え始め、左から右へスキャンし、下記 1）から 4）および図 1 に従って各々の評価可能な間期のがん細胞の核膜内のシグナルを数える。

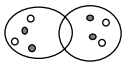
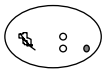
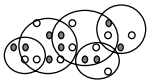
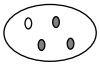
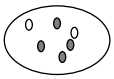
1）核内のすべてのシグナルを見つけることができるように、上下にフォーカスを合わせる。

2）同じサイズの 2 個のシグナルで、シグナルの直径と同じ距離またはそれより短い距離しか離れていないものは 1 個のシグナルとして数える。

3）**シグナルの無い核や 1 色のみのシグナルしかない核は記録しない。**各々の色について、それぞれ 1 個以上の FISH シグナルを持つ核のみを記録する。

4）個々の核について、LSI HER-2/*neu* のシグナル数と CEP 17 のシグナル数を計測する。（注：2 つのシグナルの色の識別には、DAPI/9-Orange、DAPI/Green、Green/Orange v2 と DAPI/Green/Orange v2 フィルターセットの交換が必要な場合がある）。計測を記録する（LSI HER-2/CEP 17 シグナル比の決定を参照すること）。

図 1　2 色のシグナルをカウントするためのガイド

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、すべ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（スプリット型）。
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。

シンボル：○ グリーン色のプローブ、CEP 17　● オレンジ色のプローブ、LSI HER-2/*neu*

5）LSI HER-2/CEP 17 シグナル比の決定

LSI HER-2/*neu* と CEP 17 のシグナル比の決定では、同じ 20 個の核を計測し、LSI HER-2/*neu* シグナル数の合計を、CEP 17 シグナル数の合計で割り、LSI HER-2/*neu* と CEP 17 のシグナル数の比を求める。

1）20 個の核における、LSI HER-2/*neu* と CEP 17 のシグナル数を計測し、記録する。（データシートの例を参照）

2）LSI HER-2/*neu* のシグナル数を加算する。この合計は LSI HER-2/*neu* シグナル数値の合計（データシートの例では 252）となる。

3）CEP 17 のシグナル数を加算する。この合計は CEP 17 シグナル数の合計（データシートの例では 44）となる。

4）次の比を算出して結果とする。LSI HER-2/*neu* のシグナル数の合計（ステップ 2）/CEP 17 シグナル数の合計（ステップ 3）
データシートの例では 252/44 の比は 5.73 となり、HER-2/*neu* 増幅陽性となる。
LSI HER-2/*neu* と CEP 17 のシグナル比がカットオフ値付近の値（1.8 ～ 2.2）の場合は、新たに 20 個の核を計測して、合計 40 個の核のシグナル数から再度比を算出すること。

5）結果は次のとおり報告する。
比が 2 未満の場合、HER-2/*neu* 遺伝子増幅確認できず、とする
比が 2 以上の場合、HER-2/*neu* 遺伝子増幅を確認、とする
注：カットオフ値付近の場合（1.8 ～ 2.2）は、解釈に注意が必要である。

データシートの例

	HER-2/*neu*	CEP 17
1	5	1
2	6	1
3	10	1
4	11	1
5	14	1
6	17	1
7	6	2
8	11	2
9	15	2
10	14	2
11	16	2
12	20	2
13	8	3
14	10	3
15	12	3
16	14	3
17	18	3
18	19	3
19	11	4
20	15	4
合計	**252**	**44**

2. 品質管理

コントロールスライド

- 正常および増幅プローブチェックコントロールスライドは患者の検体スライドと同時に測定し、本キットの測定性能をモニターし、シグナル計測の精度を評価するために用いる。コントロールスライドは、スライドの前処理のステップから測定操作に組み込む。コントロールスライドは毎日の FISH 検査の際に、また新しいロットの本キットを使う時に使用する。コントロールスライドとして、プローブチェック HER-2/*neu* 正常コントロールスライドとプローブチェック HER-2/*neu* 増幅コントロールスライドを使用する。また、個々の測定者は、CLIA high-complexity の要件に従い作製および検証されたコントロールの使用を選択することができる。
- プローブチェック正常コントロールスライドは正常な（LSI HER-2/*neu*）/（CEP 17）比を有する標本で、（HER-2/*neu*）/（CEP 17）のコピー数の比は 0.75 から 1.25 である。プローブチェック増幅コントロールスライドは、HER-2/*neu* が少し増幅しており（カットオフ値の付近）、（HER-2/*neu*）/（CEP 17）のコピー数の比は 1.6 から 2.0 である。
- コントロールスライドの染色状態の確認およびシグナルの計測は、**4）シグナルの計測**に従って行う。コントロールスライドの染色状態が判定基準内であり、LSI HER-2/*neu* と CEP 17 のシグナル比が規格の範囲内であることを確認すること。これらの要件を満たさない場合、FISH 試験の結果を報告すべきではない。

LSI HER-2/*neu* と CEP 17 のシグナル比の規格：

正常および増幅コントロールスライドの（LSI HER-2/*neu*）/（CEP 17）比の規格は各々、HER-2/*neu*：CEP 17 比が 0.75 ～ 1.25、1.6 ～ 2.0 である。

- コントロールスライドが、染色状態の判定基準に合致していなければ、測定がうまくいかなかったか、またはキットのコンポーネントが適切に機能しなかった可能性がある。新しいコントロールスライドおよび患者の検体スライドを使った再検査が必要である。
- コントロールスライドが染色状態の判定基準を満たしているのに、計測値が規格の範囲外にある時は、計数が正しく実施されていない可能性がある。この場合、同じスライドを使って再度の計数が必要である。
- 検体またはコントロールスライドにおいて、ハイブリダイゼーションがうまくいかなかった場合は、**トラブルシューティングガイド**を参照すること。

- プローブチェックコントロールスライドの個々の値については、製品に添付されているデータシートを参照する。
- 臨床検体において、ハイブリダイゼーションシグナルの判定が困難であり、検体量が不十分なために再検査を実施できない場合には、その測定結果は有意義ではない。同様に細胞数が計測に不十分な場合も、測定結果は有意義ではない。
- 患者検体は各施設要件が定めた要件に従って管理を行う。ハイブリダイゼーションの質および計測結果は、適切な書式で文書化すること。測定結果の判定を行う際は、ハイブリダイゼーションの質および効率が適切か確認すること。

【測定結果の判定法】

（1）結果の判定方法

＊　核あたりの LSI HER-2/*neu* と CEP 17 のシグナルの数を双方向の表に記録する。ハイブリダイゼーションエリアにおいて、20 個の間期核の乳がん、胃がんまたは大腸がん細胞における HER-2/*neu* と CEP 17 の平均コピー数の比を算出する。臨床試験の結果、増幅した検体では LSI HER-2/*neu* と CEP 17 の比が 2.0 以上であり、正常な検体では 2.0 未満の比であった。

カットオフ値（2.0）あるいはその付近の値（1.8 ～ 2.2）になったときは、解釈に注意が必要である。境界線上の結果（1.8 ～ 2.2）のとき、特に核間でカウント数にばらつきが見られるときは、さらに別の核を 20 個追加して数えるべきである。検体スライドは結果を確認するために、別の観察者が再度カウントする。まだ疑わしい場合、新しい検体スライドで測定操作を繰り返す。

（2）再検査が必要な場合

以下の場合、新しい検体スライドおよびコントロールスライド（正常および増幅）を使って再検査を実施する。**トラブルシューティングガイド**を参照する。可能性のある原因とそれに対する対処が示されている。

1）もし、正常および増幅コントロールスライドのいずれかが染色状態の判定基準を満たしていなければ、結果は信頼出来ない。再度の測定が必要である。
2）もし、評価可能な核の数が 20 個より少ない場合には、その測定結果は有意義ではない。再検査をすべきである。
3）シグナルの計測の項で述べたスライドの染色状態の確認において、シグナルの強度、バックグランド、またはクロスハイブリダイゼーションなどの状態が満足のいくものでなければ、再検査が必要である。

（3）カットオフ値の確認

乳がん患者 524 名のヒト乳房組織検体を用いて、カットオフ値の確認および LSI HER-2/*neu* と CEP 17 の参考基準比を評価するために FISH 法による間期核分析を実施した。各検体につき 60 個の核を計測した。

カットオフ値を 2.0 として、乳房組織検体の HER-2/*neu* 遺伝子増幅の評価を行った。（カットオフ値の決定についての詳細は **（4）カットオフ値の設定**を参照のこと）。433 例の検体は HER-2/*neu* 遺伝子増幅陰性、91 例は HER-2/*neu* 遺伝子増幅陽性であった。増幅が認められなかった検体 433 例の HER-2/*neu* と CEP 17 のシグナル比の分布を表 1 に示す。

表 1
増幅が認められなかった乳房組織検体の LSI HER-2/*neu* と CEP 17 のシグナル比の分布

	シグナル比		
結　果	0.1 - 1.0	1.1 - 1.5	1.6 - 1.99
平均値	0.86	1.15	1.72
S.D.	0.14	0.13	0.11
n	185	226	22

増幅が認められた検体 91 例の HER-2/*neu* と CEP 17 のシグナル比の分布を表 2 に示す。

表 2
増幅が認められた乳房組織検体の LSI HER-2/*neu* と CEP 17 のシグナル比の分布

	シグナル比		
結　果	2.0 - 5.0	5.1 - 10.0	＞ 10.0
平均値	3.35	7.39	12.77
S.D.	0.95	1.41	1.80
n	33	42	16

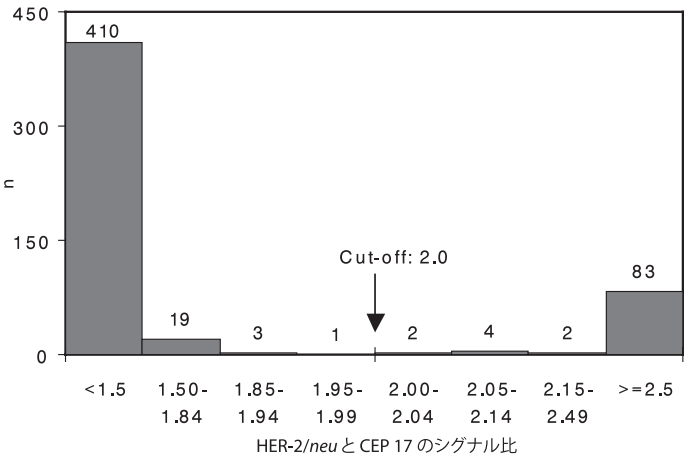
（4）カットオフ値の設定

乳がんの CALGB8869 臨床研究において、HER-2/*neu* 遺伝子増幅のカットオフ値は 2.0 と定められた。CAF 療法 [1]（シクロホスファミド、ドキソルビシン、5-フルオロウラシルの 3 剤併用療法）の臨床結果との良好な一致率がみられることに基づいている。

増幅が認められなかった検体 433 例において、最大の LSI HER-2/*neu* と CEP 17 のシグナル比は 1.95 であった。増幅が認められた検体 91 例において、最小の LSI HER-2/*neu* と CEP 17 のシグナル比は 2.0 であった。この差異（正常検体の最大値と、増幅が認められた検体の最小値）から、カットオフ値を 2.0 とすると、誤判定の可能性が低くなると考えられる。

この臨床検討における上記 524 例の検体の LSI HER-2/*neu* と CEP 17 のシグナル比の分布を図 2 に示す。

図 2　シグナルの分布



判定上の注意

＊
- 本キットは、ホルマリン固定パラフィン包埋ヒト乳房組織検体の間期核の染色体 17 と HER-2/*neu* 遺伝子を識別し、定量化するために最適化されており、胃がんおよび大腸がん組織検体でもその妥当性は確認されている。他のタイプの検体や固定法の異なるものに対しては使用すべきではない。
- 本キットおよびコントロールスライドの性能は、本書で提供する手順に従った場合のみ有効である。この手順を変更すると、測定の性能が変わる可能性がある。
- 本キットの性能は、米国において CAF 療法を受ける腋窩リンパ節転移患者、または Herceptin 療法が考慮されている転移性乳がん患者においてのみ確立されている。他の処置・投薬計画においては確立されていない。
- 測定結果の臨床的な解釈は、患者の医学的な履歴および他の診断試験の結果を考慮に入れてなされるべきである。
- もし検体の品質や検体スライドの調製が不十分ならば、FISH の測定結果は有意義ではない。
- FISH のシグナルの計測を行う技術者は、オレンジ色とグリーン色のシグナルを視覚的に識別することが出来なければならない。
- コントロールスライドは、本キット以外の DNA プローブのコントロールとして使用できることを確認していない。測定者の主観的なシグナルの判定、ハイブリダイゼーションの質により、測定結果に影響を与える可能性がある。
- もし、測定結果が臨床所見や病理所見と一致しない場合は、病理医と担当する臨床医が協議の上、対処することを勧める。

【臨床的意義】

臨床性能試験（乳がん）[2]

（1）試験方法

臨床性能試験は 2 施設で、それぞれの倫理規定に準拠して行った。検体は乳房切除または部分摘除した 215 名の日本人女性の原発性浸潤性乳管がん・小葉がん・粘液がんおよび扁平上皮がん組織の連続切片を用いた。

本キットを使って 215 検体の外科的に切除した乳がん組織における HER-2 遺伝子の増幅を調べ、IHC（A 法）の結果と比較した。また、内 101 検体については IHC（B 法）の結果とも比較した。IHC は A 社と B 社の 2 種の方法を用いた。ここでは便宜上、A 法(A 社)、B 法（B 社）と呼ぶこととする。

なお、判定は A 法および B 法ともに、以下の基準で統一して実施した。

0 ：細胞膜が染色されていないか、乳がん全体の 10％未満の細胞の表面膜が染色されているにすぎない（IHC 陰性）
1+: 乳がん全体の 10％以上の細胞の表面膜が染色されているが、がん細胞の表面膜が弱く不完全に染色され、縁取られている（IHC 陰性）
2+: 乳がん全体の 10％以上の細胞の表面膜が染色されていて、がん細胞の表面膜が中程度の強度で完全に染色され、縁取られている（IHC 弱陽性）
3+: 乳がん全体の 10％以上の細胞の表面膜が染色されており、がん細胞の表面膜が強く完全に染色され、縁取られている（IHC 強陽性）

（2）結果と考察

次表 A

FISH と IHC（A 法）の比較において、215 検体中、40 検体（6+34）のがん標本（19％）が FISH 陽性（HER-2/*neu* 遺伝子が増幅している；HER-2/CEP 17 比≧ 2）と判定された。IHC（A 法）による HER-2 蛋白の過剰発現（2+ および 3+）は 50 検体（24％）のがん患者の組織で認められ、低レベル（2+）が 19 検体で、高レベル（3+）が 31 検体であった。FISH で強陽性（HER-2/CEP 17 比≧ 3）と判断された 34 検体は、IHC でも 3+（29 検体）または 2+（5 検体）の過剰発現を示した。FISH と IHC の一致率は 91％［195/215 =（71+89+0+1+5+29）/（175+6+34）］で、感度は 70％［35/50 =（0+5+1+29）/（19+31）］、特異度は 97％［160/165 =（71+89）/（73+92）］であった。

高レベルの遺伝子増幅（≧ 3.0）は、31 例の IHC 3+ の内 29 例に見られたが、IHC 2+ では 19 例中 5 例であり、IHC 陰性群（IHC 1+，0）165 例では 0 例であった。

IHC 3+ の検体は 96％（30/31）が FISH 陽性であるが、IHC 2+ では 26％（5/19）が陽性であった。さらに IHC 陰性の検体（0 および 1+）でも 3.0％（5/165）が FISH 陽性であった。これらの結果は米国における臨床試験のデータ[3]とよく一致しており、IHC と FISH の相関性は人種間で違いのないことを示唆している。

次表 B

IHC（B 法）との比較においても、HER-2 蛋白の過剰発現（2+ および 3+）は 24 検体（24％）のがん患者の組織で認められ、低レベル（2+）が 6 検体で、高レベル（3+）が 18 検体であった。特に FISH 強陽性（HER-2/*neu*：CEP 17 比≧ 3.0）の 15 例はすべて IHC でも 3+ の強陽性であり、FISH は B 法による IHC ともよく相関していることがわかった。

次表 C

FISH と IHC（A 法）、および IHC（B 法）との不一致例をリストアップし、その推測される原因を示した。

表 A　FISH と IHC（A 法）の比較（215 例の比較）

	パスビジョンキットで測定した HER-2/CEP 17 比			
	＜ 2.0	≧ 2.0 ～＜ 3.0	≧ 3.0	計
IHC（A 法）でスコアリングした HER-2 蛋白の発現				
0	71	2	0	73
1+	89	3	0	92
2+	14	0	5	19
3+	1	1	29	31
計	175	6	34	215

表 B　FISH と IHC（B 法）の比較（101 例の比較）

	パスビジョンキットで測定した HER-2/CEP 17 比			
	＜ 2.0	≧ 2.0 ～＜ 3.0	≧ 3.0	計
IHC（B 法）でスコアリングした HER-2 蛋白の発現				
0	41	1	0	42
1+	34	1	0	35
2+	6	0	0	6
3+	3	0	15	18
計	84	2	15	101

表 C　不一致例と推測される原因

比較対象	不一致例の分類と推測される原因
FISH と IHC（A 法）（20 例）	FISH 陰性で IHC 陽性例：15 例
	IHC 2+（14 例）→ 遺伝子増幅以外の機構による過剰発現ないし中等度の発現上昇（ポリソミーによる dose effect や DNA 脱メチル化等）
	IHC 3+（1 例）→ 遺伝子増幅以外の機構による過剰発現（ポリソミーによる dose effect や DNA 脱メチル化等）
	FISH 陽性で IHC 陰性例：5 例
	HER-2/CEP 17 比 平均 2.2 未満（3 例）→ カットオフ値付近
	HER-2/CEP 17 比 平均 2.2 - 3.0 の間（2 例）→ IHC 偽陰性
FISH と IHC（B 法）（11 例）	FISH 陰性で IHC 陽性例：9 例
	IHC 2+（6 例）→ 遺伝子増幅以外の機構による過剰発現ないし中等度の発現上昇（ポリソミーによる dose effect や DNA 脱メチル化等）
	IHC 3+（3 例）→ 遺伝子増幅以外の機構による過剰発現（ポリソミーによる dose effect や DNA 脱メチル化等）
	FISH 陽性で IHC 陰性例：2 例 → カットオフ値付近

※ dose effect：用量効果

臨床性能試験（胃がん）

（1）試験方法

臨床性能試験は 2 施設で、それぞれの倫理規定に準拠して行った。検体は外科的に切除した 200 名の日本人の原発性胃がん組織の連続切片を用いた。

本キットを使って 200 検体の外科的に切除した胃がん組織における HER-2 遺伝子の増幅を調べ、IHC（C 法）の結果と比較した。ここでは便宜上、C 法（C 社）と呼ぶこととする。なお、C 法の判定は、HER-2 陽性の進行・再発胃がん患者を対象として実施された国際共同第Ⅲ相臨床試験（ToGA 試験）で用いられた判定基準に準じた[7]。結果判定は 0 、1+、2+、3+ の 4 段階で分類し、3+ のみを陽性とした。

（2）結果と考察

次表 D

FISH と IHC（C 法）の比較において、200 検体中、61 検体（10+14+37）のがん標本（31％）が FISH 陽性（HER-2/*neu* 遺伝子が増幅している；HER-2/CEP 17 比≧ 2）と判定された。

HER-2 蛋白質発現との対比では、蛋白質発現陰性とされる IHC 0，1+ の例では FISH 陽性率は 8.6％（10/116）、IHC 3+ の例では FISH 陽性率は 88％（37/42）であり、良好な相関関係がみられた。IHC 法 2+ は蛋白質の発現境界域とされるが、IHC 2+ での FISH 陽性率は 33％（14/42）であった。乳がんにおける FISH と IHC（A 法）の比較においても、FISH 陽性率は IHC 0，1+ で 3.0％（5/165）、IHC 2+ で 26％（5/19）、IHC 3+ で 97％（30/31）であったが[2]、胃がん切除標本における本品と IHC 法との対比の結果は、これらの乳がんにおける結果と近い結果であった。

このように、胃がんにおいても IHC 法による HER-2 蛋白質発現の有無と FISH 法による HER-2 遺伝子増幅の有無とはよく相関した。一方、蛋白質発現が境界域（スコア 2+）の例では、遺伝子増幅陽性例が 3 分の 1、陰性例が 2/3 を占め、IHC2+ の不確実性、FISH 法での再検査の必要性が確認された。

FISH と IHC の一致率は、(102+4+28+37) ÷ 200 = 86％と良好な相関性を示し、本品が胃がん検体においても、乳がん検体と同じ操作で問題なく HER-2 遺伝子の検出が可能なことが示され、報告のある施設間での日本人検体での HER-2 増幅の頻度とも一致しており、乳がんで報告されている高い再現性と高い精度、および種々の条件下で変性を受けにくい DNA を検出する本品の特性を鑑みたときに、胃がん組織でも乳がん組織と同様に、本品による HER-2 遺伝子増幅の測定が可能と判断された。

次表 E

FISH と IHC（C 法）との不一致例をリストアップし、その推測される原因を示した。

表 D　FISH と IHC（C 法）の比較（200 例の比較）

	パスビジョンキットで測定した HER-2/CEP 17 比		
	＜ 2.0	≧ 2.0	計
IHC（C 法）でスコアリングした HER-2 蛋白の発現			
0	102	10	112
1+	4	0	4
2+	28	14	42
3+	5	37	42
計	139	61	200

表 E　不一致例と推測される原因

比較対象		不一致例の分類と推測される原因	
FISH と IHC（C 法）	FISH 陰性で IHC 陽性例：5 例		
	IHC 3+	（4 例）→ 蛋白質発現の不均一性	
		（1 例）→ 遺伝子増幅以外の機構による過剰発現	
（15 例）	FISH 陽性で IHC 陰性例：10 例		
	HER-2/CEP 17 比	低増幅例　（7 例）→ 低レベルの遺伝子増幅	
		（3 倍未満）（1 例）→ 蛋白質発現の不均一性	
		高増幅例　（1 例）→ 蛋白質発現の不均一性	
		（3 倍以上）（1 例）→ 不明	

＊臨床性能試験（HER-2 過剰発現が確認された治癒切除不能な進行・再発の結腸・直腸がん）

国内第 II 相試験（TRIUMPH 試験）

抗 EGFR 抗体を含む標準化学療法に不応・不耐な HER-2 陽性の治癒切除不能な進行・再発の結腸・直腸がん患者 30 例を対象に、トラスツズマブ + ペルツズマブを併用で投与した。トラスツズマブは初回 8 mg/kg（体重）、2 回目以降 6 mg/kg、ペルツズマブは初回 840 mg、2 回目以降 420 mg を 3 週間間隔で投与した。主要評価項目である客観的奏効割合は腫瘍組織で HER-2 陽性の患者群では 8/27 例（29.6％）であった。

【性　能】

(1) 性能試験

ヒト末梢血リンパ球またはプローブチェックコントロールスライド（HER-2/*neu* 正常または増幅コントロールスライド）を検体として用い、用法および用量欄の操作方法により染色した染色標本の間期核および分裂中期核（メタフェーズ）を、3 種類のフィルター（DAPI/ オレンジ、DAPI/ グリーンおよび DAPI/ グリーン / オレンジ）条件で蛍光顕微鏡にて観察する。

このとき、1）シグナルの強度　2）バックグランド　3）交差反応（クロスハイブリダイゼーション）　4）特異性　5）総合評価の 5 つの項目について、それぞれ 5 段階評価（性能評価判定表）で判定し、点数をつける。5 つの評価項目すべての評価点数が 3 以上であることを性能適とする。

性能評価判定表

以下の表では間期核および分裂中期核（メタフェーズ）を総称して " 核 " と略記する。必要に応じ、随時、意図的に " 間期核と分裂中期核 " という用語を使い分ける場合もある。

評価項目	点数	評価基準
1）シグナルの強度		染色標本のハイブリダイゼーションエリア内における HER-2/*neu* および CEP 17 のシグナルは、明るく、明確に区別できることが理想的である。
	5	極めて明るく、明確に区別できるシグナルが、ハイブリダイゼーションエリア内の少なくとも 90％以上の核に存在する。
	4	ハイブリダイゼーションエリア内の 80％以上の核に、明るく、明確に区別できるシグナルが存在する。
	3	読み取り可能な（評価可能な）シグナルがハイブリダイゼーションエリア内の 80％以上の核に存在する。
	2	ハイブリダイゼーションエリア内の 25％以上の核にシグナルが見られない。または、シグナルの強度が弱すぎて、ハイブリダイゼーションエリア内の 80％以上の核でシグナルを評価できない。
	1	ハイブリダイゼーションの失敗により、染色標本のハイブリダイゼーションエリア内の核にシグナルが全く見られない。

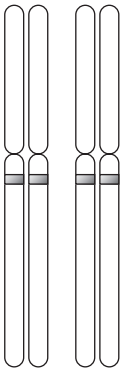
評価項目	点数	評価基準
2）バックグランド		ハイブリダイゼーションエリア内にいかなる蛍光粒子もなく、かすみもかかっておらず、暗いかまたは黒に見える状態が理想的なスライドのバックグランドである。
	5	可視性の粒子やかすみが全くない。ハイブリダイゼーションエリアのバックグランドは黒である。
	4	・蛍光粒子がハイブリダイゼーションエリア内に時折見られる程度であるか、または限られた領域に低密度で存在する。粒子はあってもプローブシグナルの判読を妨害するものではない。 ・かすみや蛍光性の光がハイブリダイゼーションエリア内に無いか、あっても非常に弱いため、可視性を減弱させたり、評価の妨げになることはない。
	3	・バックグランドに蛍光粒子が存在するものの、特異的プローブシグナルより小さく、蛍光強度が弱い。ハイブリダイゼーションエリア内で蛍光粒子は非常に弱い蛍光強度で存在するか、または散発に分布する程度である。このレベルのバックグランドが存在しても、判読を妨げず、問題にならない。 ・かすみがかかったり蛍光性の光が存在していても、プローブシグナルの判読に影響を与えない程度である。
	2	・多数のバックグランド蛍光粒子があるが、ハイブリダイゼーションエリアのすべてを覆うまでには至っていない（バックグランド蛍光粒子のないハイブリダイゼーションエリア部分もある）。これらのバックグランド蛍光粒子の存在により、プローブシグナルの正確な判読が妨げられている。 ・かすみや蛍光性の光が、ハイブリダイゼーションエリアの 50％以上に存在するため、プローブシグナルの判読や視覚化が困難である。
	1	・蛍光粒子または破砕物が多く、全ハイブリダイゼーションエリアを覆っているため HER-2/*neu* および CEP 17 のシグナルの正確な判読が妨げられている。 ・ハイブリダイゼーションエリア全体がかすみや蛍光性の光で覆われており、プローブの判読が不可能である。

評価項目	点数	評価基準
3）交差反応（クロスハイブリダイゼーション）		HER-2/*neu* および CEP 17 のプローブは 17 番染色体対の特定の染色体領域に結合し、蛍光を発する。従って、交差反応は分裂中期核（メタフェーズ）でのみ評価できる。もし、本来プローブが結合する染色体領域以外の領域に結合して、HER-2/*neu* および CEP 17 のプローブと同じ大きさの蛍光を発すれば（正常ヒトの分裂中期核標本では、染色分体あたり 1 つのシグナルだけが見られる）、これは交差反応によるものである。
	5	交差反応が全く観察されない。
	4	非常に弱い交差反応がハイブリダイゼーションエリア内の 1 個の細胞だけに見られる。このレベルの交差反応は、判読上の妨げとはならない。
	3	弱い交差反応が、ハイブリダイゼーションエリア内の分裂中期核の 10％未満の染色分体または染色体対に見られる。交差反応のシグナルの強度は非常に弱く、プローブシグナルの判読を妨げない。
	2	ハイブリダイゼーションエリア内の分裂中期核の 25％以上に交差反応が見られ、プローブシグナルの正確な判読が妨げられている。
	1	ハイブリダイゼーションエリア内の分裂中期核の 80％以上に、非常に明るく明確なシグナルの交差反応が観察される。このレベルの交差反応は、ハイブリダイゼーションの失敗である。

評価項目	点数	評価基準
4）特異性		・プローブシグナルは、標的染色体領域のみを光らせ、他の染色体や核・細胞の膜成分にはハイブリダイゼーションしない。正常分裂中期核（メタフェーズ）においては、4 つの染色分体に存在する 4 つの独立したシグナルがみられる（注：下図参照）。 ・非特異的なシグナルは、間期核と分裂中期核の両方に観察され得るが、もしあったとしても、プローブの増幅と混同されないことが必須である。
	5	間期核や分裂中期核に、非特異的な蛍光粒子が存在しない。
	4	ハイブリダイゼーションエリア内の核の 5％未満に、プローブシグナルのサイズより小さい非特異的な蛍光粒子が存在する。このレベルの非特異的な粒子の存在は、シグナルの正確な計測やシグナルの可視化または判読を妨げない。

3	・ハイブリダイゼーションエリア内の核の 75％以上で特異的なプローブシグナルより小さい非特異的な蛍光粒子が存在するが、シグナルの正確な計数や判読を妨げない程度である。 ・たとえ核の形態が見えるほどの非特異的なシグナルが存在していても、このシグナルは拡散しているため、シグナル識別の妨げとはならない。
2	ハイブリダイゼーションエリア内の全ての核またはメタフェーズに様々な大きさの非特異的な蛍光粒子が存在する。非特異的なシグナルは 75％以上の核で観察され、シグナルの正確な計数や判読を妨げている。
1	ハイブリダイゼーションエリア内の全ての核に様々な大きさの非特異的な蛍光粒子が観察される。これらの粒子の存在によりシグナルの計数や判読は不可能である。

注）分裂中期核における 4 つの染色分体に存在する 4 つの独立したシグナルの模式図



評価項目	点数	評価基準
5）総合評価		総合評価点数はハイブリダイゼーションの一般的印象を表す。他の項目の判定結果も考慮に入れ、プローブの性能を総合的に評価する。
	5	優秀な読み易さを示す。他の 4 つの評価点は最低でも 4 以上で、大多数は 5 の評価点数である。
	4	シグナルが容易に読み取り可能である状態。他の 4 つの評価項目は 4 以上の評価点数である。
	3	判読において困難なくシグナルを読み取ることが可能である。他の 4 つの評価項目は 3 以上の評価点数である。
	2	シグナルが読みづらい状態。他の 4 つの評価項目のうちの 1 つ以上は、評価点数 2 である。
	1	シグナルを読みとることが出来ない。他の 4 つの評価項目のうちの 1 つ以上は、評価点数 1 である。

(2) 分析感度、特異性

1. ハイブリダイゼーション効率

プローブチェック HER-2/*neu* 正常コントロールスライドおよび増幅コントロールスライドにおいて、ハイブリダイゼーションシグナルの無い細胞は、平均で 0.0 ～ 2.0% であった。これらのスライドはホルマリン固定パラフィン包埋培養ヒト乳がん細胞株であり、ハイブリダイゼーションに最適な条件となっている。この条件では、細胞の 2% 未満はどちらのプローブのシグナルも示さず、98% のハイブリダイゼーション効率が期待される。

2. 分析感度

本キットのプローブの分析感度を検討するため、次に述べる再現性試験を実施した。この試験において HER-2/*neu* と CEP 17 の比が 1.0 ～ 1.2 の検体の平均値は 1.05（± 0.03）、HER-2/*neu* と CEP 17 の比が 1.6 ～ 2.0 の検体の平均値は 1.81（± 0.08）と算出された。95％信頼区間の上限は、シグナル比 1.0 ～ 1.2 の検体において 1.11 であった。95％信頼区間の下限は、シグナル比 1.6 ～ 2.0 の検体において 1.65 であった。これにより本キットの間期核細胞における検出限界の比は 1.5 であった。

3. 分析特異性

位置特異性試験は、社内プロトコルに従い、正常リンパ球の分裂中期核（メタフェーズ）を用いて検討した。254 例の分裂中期核について、17 番染色体および HER-2/*neu* 遺伝子の位置を特定するために G バンド法により連続して試験を行い、続いて FISH 測定を行った。254 個の核において他の染色体部位へのクロスハイブリダイゼーションは確認されなかった。ハイブリダイゼーションは 2 つのプローブのターゲット領域に限定されていた。

厳密さ試験として、社内プロトコルに従い、ホルマリン固定パラフィン包埋組織検体を用いて、最適な変性時間と温度、ハイブリダイゼーションの時間と温度、ハイブリダイゼーション後の洗浄時間と温度、ポストハイブリダイゼーション洗浄緩衝液の組成物の検討を行った。変性のステップでは、3 種類の温度（65℃、73℃、80℃）について、各 2 分、5 分、8 分で試験を実施した。すべての変性温度、時間に関する総合評価に統計的な差異は認められず、すべての組み合わせが品質評価に適合した。ハイブリダイゼーションステップの厳密さは、次の 2 つのパートで試験を行った。1 つ目は 5 種類の温度（27℃、32℃、37℃、42℃、47℃）で 18 時間、2 つ目は 5 種類の時間（10 時間、14 時間、18 時間、22 時間、26 時間）で推奨温度（37℃）で試験を行った。ハイブリダイゼーションは温度と時間の両方により大きな影響を受け、37℃で 18 時間の条件が全体的に最も高い総合品質評価を示したが、14 時間と 18 時間の間にはハイブリダイゼーションの品質に関し統計的に有意な差はなかった。このため推奨されるインキュベーション時間は 14 ～ 18 時間である。ポストハイブリダイゼーション洗浄緩衝液のステップは同様の方法で、1 つ目は 5 種類の温度（69℃、71℃、73℃、76℃、80℃）で、2 つ目は 2 ～ 8 分間の各分で、73℃において測定を行った。洗浄温度は重要因子であり、73℃が最適であった。洗浄時間が 2 ～ 5 分の場合、測定結果は良好であったが、8 分に延ばした場合は、全体的な性能が有意に低下したサンプルがあった。このためポストハイブリダイゼーション洗浄で推奨される条件は 72 ± 1℃で 2 分間である。洗浄緩衝液の組成はシグナル強度およびプローブの特異性を決定するために、検討された。塩濃度を 0.4 × SSC から 2 × SSC まで高めると、シグナル強度は増加するが、プローブの特異性には影響がなかった。このためポストハイブリダイゼーション洗浄緩衝液は、2 × SSC/0.3% NP-40 を推奨する。

(3) 前臨床試験における再現性

HER-2/*neu* に対する FISH 測定の再現性を、正常な乳房組織および増幅が認められた乳房組織について、それぞれ同じ組織から異なる厚さで連続切片を作製し、本キットを用いて検討した。正常な乳房組織の連続切片 10 枚における LSI HER-2/*neu* と CEP 17 の比の平均値は 1.19（S.D. = 0.05）であった。結果を表 3 に示す。

表 3
正常な乳房組織の連続切片における
シグナルおよび LSI HER-2/*neu* と CEP 17 の比の平均値

	連続切片									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
LSI HER-2 シグナル数	3.8	3.2	3.6	3.5	3.6	3.5	3.4	3.5	3.3	3.1
CEP 17 シグナル数	3.1	3.1	3.0	2.7	3.0	3.0	2.8	2.1	3.0	2.7
シグナル比	1.2	1.2	1.2	1.3	1.2	1.2	1.2	1.6	1.1	1.1

増幅が認められた乳房組織の連続切片 10 枚における、HER-2/*neu* と CEP 17 の比の平均値は 3.61（S.D. = 0.50）であった。結果を表 4 に示す。

表 4
増幅が認められた乳房組織の連続切片における
シグナルおよび LSI HER-2/*neu* と CEP 17 の比の平均値

	連続切片									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
LSI HER-2 シグナル数	4.7	4.9	5.9	4.5	3.6	4.6	4.6	4.8	4.5	4.2
CEP 17 シグナル数	1.2	1.3	1.3	1.3	1.3	1.3	1.4	1.3	1.4	1.3
シグナル比	3.9	3.7	4.7	3.6	2.8	3.7	3.3	3.8	3.3	3.3

同様に、正常な乳房組織の異なる厚さ（2 ～ 8 μm）の連続切片 8 枚では、HER-2/*neu* と CEP 17 の比の平均値は 1.15（S.D. = 0.16）であった。結果を表 5 に示す。これらの結果は厚さが 4 ～ 8 μm の組織切片における HER-2/*neu* FISH 測定の再現性は、良好であることを示す。

表 5
異なる厚さの連続切片組織における
シグナルおよび LSI HER-2/*neu* と CEP 17 の比の平均値

	組織の厚さ（μm）							
	2	2	4	4	6	6	8	8
LSI HER-2 シグナル数	2.3	2.4	2.4	2.7	2.7	2.8	2.6	3.3
CEP 17 シグナル数	1.7	1.8	2.3	2.5	2.7	2.7	2.5	3.2
シグナル比	1.4	1.4	1.1	1.1	1.0	1.1	1.1	1.0

(4) コントロールスライドにおける再現性

LSI HER-2/*neu* および CEP 17 測定の再現性の評価として、HER-2/*neu* 遺伝子増幅が異なる値のコントロールスライドを用いて、LSI HER-2/*neu* と CEP 17 の比の施設間差、ロット間差、日差、測定者間差について検討した。カットオフ値未満（1.0 ～ 1.2）および増幅が認められた（1.6 ～ 2.0、3 ～ 5、7 ～ 11）4 例のヒト腫瘍細胞株のホルマリン固定パラフィン包埋組織を用いて、LSI HER-2/*neu* と CEP 17 の比を、本書の **4) シグナルの計測**の項に従って評価した。初回の測定では、全体的なハイブリダイゼーション率は 98.3%（118/120）であった。再実施した 2 枚のスライドでのハイブリダイゼーションは成功した。

分散分析を行ったところ、1 回の計測および判定において、統計的に有意な変動が確認されたのは測定者間であった。他の変動要因では、統計的に有意な変動は確認されなかった。LSI HER-2/*neu* と CEP 17 の比の、平均値、標準偏差、CV（%）を表 6 ～ 9 に示す。

表 6
施設間再現性

LSI HER-2/*neu* と CEP 17 の比	結　果	施設 1	施設 2	施設 3
1.0 - 1.2	平均値	1.08	1.01	1.07
	S.D.	0.03	0.04	0.07
	CV（%）	2.66	3.58	6.77
	n	8	8	8
1.6 - 2.0	平均値	1.81	1.71	1.78
	S.D.	0.05	0.05	0.19
	CV（%）	2.88	2.78	10.50
	n	8	8	8
3.0 - 5.0	平均値	4.39	3.65	4.49
	S.D.	0.22	0.18	0.79
	CV（%）	4.99	4.93	17.64
	n	8	8	8
7.0 - 11	平均値	7.21	8.26	8.23
	S.D.	0.15	0.83	0.87
	CV（%）	2.07	10.10	10.55
	n	8	8	8

S.D.（標準偏差）、CV（%）（変動係数）

表 7
ロット間再現性

LSI HER-2/*neu* と CEP 17 の比	結　果	ロット 1	ロット 2	ロット 3	ロット 4
1.0 - 1.2	平均値	1.05	1.07	1.02	1.04
	S.D.	0.07	0.06	0.03	0.05
	CV（%）	6.48	6.06	3.21	4.87
	n	6	6	6	6
1.6 - 2.0	平均値	1.78	1.77	1.77	1.75
	S.D.	0.10	0.13	0.15	0.09
	CV（%）	5.65	7.49	8.54	5.07
	n	6	6	6	6
3.0 - 5.0	平均値	4.08	3.92	4.57	4.14
	S.D.	0.44	0.34	0.96	0.40
	CV（%）	10.78	8.74	20.92	9.56
	n	6	6	6	6
7.0 - 11	平均値	7.67	7.72	7.89	8.33
	S.D.	0.69	0.72	0.88	1.06
	CV（%）	8.97	9.36	11.16	12.68
	n	6	6	6	6

S.D.（標準偏差）、CV（%）（変動係数）

表 8
日差再現性

LSI HER-2/*neu* と CEP 17 の比	結　果	測定日 1	測定日 2	測定日 3	測定日 4
1.0 - 1.2	平均値	1.06	1.07	1.02	1.04
	S.D.	0.06	0.07	0.05	0.04
	CV（%）	5.65	6.61	4.58	4.03
	n	6	6	6	6
1.6 - 2.0	平均値	1.76	1.77	1.77	1.77
	S.D.	0.17	0.14	0.08	0.10
	CV（%）	9.62	7.99	4.31	5.65
	n	6	6	6	6
3.0 - 5.0	平均値	4.24	4.48	4.10	3.89
	S.D.	0.48	0.97	0.36	0.38
	CV（%）	11.25	21.56	8.89	9.71
	n	6	6	6	6
7.0 - 11	平均値	7.91	8.01	7.72	7.97
	S.D.	1.11	0.90	0.57	0.89
	CV（%）	13.99	11.22	7.39	11.20
	n	6	6	6	6

S.D.（標準偏差）、CV（%）（変動係数）

表 9
測定者間再現性

LSI HER-2/*neu* と CEP 17 の比	結　果	測定者 1	測定者 2
1.0 - 1.2	平均値	1.06	1.04
	S.D.	0.07	0.03
	CV（%）	7.00	2.85
	n	12	12
1.6 - 2.0	平均値	1.71	1.82
	S.D.	0.10	0.11
	CV（%）	6.01	6.20
	n	12	12
3.0 - 5.0	平均値	4.05	4.31
	S.D.	0.44	0.73
	CV（%）	10.80	16.84
	n	12	12
7.0 - 11	平均値	7.52	8.28
	S.D.	0.49	0.95
	CV（%）	6.55	11.44
	n	12	12

S.D.（標準偏差）、CV（%）（変動係数）

（5）ポータビリティーアッセイ（施設間再現性）

5 つの施設で、ホルマリン固定パラフィン包埋**ヒト乳がん検体**を用いて、測定の施設間再現性の検討を行った [4]。検体は、HER-2/*neu* 遺伝子増幅の値が様々な、ホルマリン固定パラフィン包埋ヒト乳がん組織を使用した。この内 1 例が正常検体（増幅なし）、2 例が低値の増幅あり、1 例が中程度の値の HER-2/*neu* 遺伝子増幅ありであることが FISH 法により確認されている。

日差再現性

3 日間にわたる LSI HER-2/*neu* と CEP 17 の比の平均値を表 10 に示した。P 値が示す通り、3 日間にわたる比の値に統計的に有意な差はなかった（全ての p 値＞ 0.05）。この検討の結果から、本キットの良好な日差再現性が示された。

表 10
LSI HER-2/*neu* と CEP 17 の比の日差再現性

増幅比	結　果	測定日 1	測定日 2	測定日 3	p 値
1.0 - 1.2	平均値	1.01	1.06	1.05	0.6826
	S.D.	0.10	0.12	0.08	
	CV（%）	9.90	11.32	7.62	
	n	15	15	15	
2.1 - 2.8	平均値	2.54	2.43	2.32	0.5535
	S.D.	0.19	0.32	0.22	
	CV（%）	7.48	13.17	9.52	
	n	15	15	15	
2.5 - 3.5	平均値	3.18	2.98	3.03	0.2083
	S.D.	0.30	0.31	0.32	
	CV（%）	9.43	10.40	10.56	
	n	15	15	15	
5.0 - 7.0	平均値	5.69	5.63	5.69	0.9620
	S.D.	0.53	0.49	0.86	
	CV（%）	9.31	8.70	15.11	
	n	15	15	15	

施設間再現性

5 施設における LSI HER-2/*neu* と CEP 17 の比の平均値を表 11 に示した。5 施設間の HER-2/CEP 17 比は有意な差を示した（カットオフ値未満および 2.5 ～ 3.5 で p 値 = ＜ 0.05）。しかし、この差は臨床的に重要ではなく、99% の検体では HER-2/*neu* 遺伝子増幅が、陽性または陰性に正しく分類される。

表 11
施設間再現性

増幅比	結　果	施設 1	施設 2	施設 3	施設 4	施設 5	p 値
1.0 - 1.2	平均値	1.00	1.16	1.01	1.04	0.97	0.0001
	S.D.	0.09	0.09	0.07	0.09	0.04	
	CV（%）	9.00	7.76	6.93	8.65	4.12	
	n	9	9	9	9	9	
2.1 - 2.8	平均値	2.40	2.46	2.57	2.26	2.65	0.0965
	S.D.	0.19	0.26	0.52	0.22	0.24	
	CV（%）	7.92	10.60	20.20	9.73	9.06	
	n	9	9	9	9	9	
2.5 - 3.5	平均値	3.01	3.09	3.41	2.74	3.08	＜ 0.0001
	S.D.	0.21	0.35	0.20	0.23	0.16	
	CV（%）	6.98	11.30	5.87	8.39	5.19	
	n	9	9	9	9	9	
5.0 - 7.0	平均値	5.48	5.22	5.94	5.82	5.91	0.0568
	S.D.	0.66	0.43	0.56	0.89	0.18	
	CV（%）	12.0	8.24	9.43	15.30	3.05	
	n	9	9	9	9	9	

5 施設の施設間差の概要を表 12 に示す。LSI HER-2/*neu* と CEP 17 の比の標準偏差（S.D.）および変動係数（C.V.）は全体に渡って比較的小さく、安定している。

表 12
施設間再現性の概要

LSI HER-2/*neu* と CEP 17 の比	平均値	S.D.	CV%	n
1.0 - 1.2	1.04	0.10	9.60	45
2.1 - 2.8	2.47	0.32	12.96	45
2.5 - 3.5	3.07	0.31	10.10	45
5.0 - 7.0	5.67	0.63	11.11	45

この検討において、ハイブリダイゼーションの成功率は 100% であり、本キットの取り扱いが容易であることが示された。

（6）相関性試験成績

臨床試験法との一致率

ヒト乳がんにおける HER-2 タンパクの過剰発現の主要なメカニズムは、遺伝子増幅を介することが明らかとなっている。HER-2/*neu* 遺伝子を検出する蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーション（FISH）は、HER-2 過剰発現を定義するための診断方法である [3,5,8]。

Genentech 社が行ったハーセプチンの試験（HO648g, H0649g, H0650g）に登録した乳がん患者の検体を用いて、本キットと免疫組織化学的分析（CTA）の比較を行った [3]。

FISH と CTA の一致率を立証するために、ハーセプチンの試験に登録の目的でスクリーニングした検体から 1 対 1 比となるようにランダムに選択した 623 検体のサブセット（CTA 陽性 317 例、CTA 陰性 306 例）を用いた。すべての検体について FISH 測定を行い、529 検体について有効な結果を得た。529 例の測定結果を次表に示す。

CTA vs FISH

	CTA スコア				
FISH	0	1+	2+	3+	合計
陰性	207	28	67	21	323
陽性	7（3.2%）	2（6.7%）	21（23.9%）	176（89.3%）	206
合計	214	30	88	197	529

一致率の結果は 82%（95% 信頼区間：79 ～ 85%）であった。一致率は CTA では 0 または 1+ の結果で、かつ FISH で増幅が確認されなかった検体、および CTA では 2+ または 3+ の結果で、FISH 測定では増幅が確認された検体を結果が一致したと定義した。これらの結果から、タンパク質過剰発現（IHC 法で測定）と遺伝子増幅（FISH（本キット）で測定）との高い相関が示された。

【使用上又は取扱い上の注意】

（1）取扱い上（危険防止）の注意

- 本キットの測定では、ヒト検体を取り扱う。検体は、HIV、HBV、HCV 等の感染の恐れがあるものとして取り扱うこと。検査にあたっては、感染の危険を避けるため、専用の着衣、眼鏡、マスクおよび使い捨て手袋を着用し、また口によるピペッティングは行わないこと。
- **注意**：本測定で使用する試薬類には、ヒト由来および / または潜在的に感染性のある物質が含まれている。詳細は、**【形状・構造等（キットの構成）】**または**【用法・用量（操作方法）】**を参照のこと。ヒト由来物質または不活化微生物が完全に感染伝播しないことを保証する試験は知られていない。感染性物質を含む、またはその疑いがある物質については、Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories[9]、OSHA Standard on Bloodborne Pathogens[10]、CLSI 文書 M29-A3[11]、または他の適切なバイオセイフティ基準 [12] に従って取り扱うこと。すべてのヒト由来物質は潜在的に感染性があると考えること。
- 検体や試薬を取り扱う場所では、飲食、喫煙、化粧、コンタクトレンズの取り扱いをしないこと。
- 試薬が誤って目や口、皮膚等に触れた場合には水で十分に洗い流す等の応急措置を行い、必要があれば医師の手当て等を受けること。
- すべての生体検体は病原性の感染媒体として取り扱う。このキットで用いるプローブチェックコントロールスライドは 10%ホルマリンで固定したヒト細胞株から製造されている。何が感染性であるかを知ることは不可能なので、すべての生体検体およびコントロールスライドは一般的な注意事項に従って取り扱うこと。検体取り扱いのガイドラインは U.S. Centers for Disease Control[6] により参照可能である。
- 次の試薬類に関する危険有害性情報、注意事項を示す。
  - LSI HER-2/*neu* スペクトラムオレンジ / CEP 17スペクトラムグリーン DNA プローブ



危険：	ホルムアミドを含む
H360D	胎児への悪影響のおそれ
P201	使用前に取扱説明書を入手すること。
P281	指定された個人用保護具を使用すること。
P303+P361 +P353	**皮膚**（又は髪）**に付着した場合**：直ちに汚染された衣類を全て脱ぐこと。皮膚を流水／シャワーで洗うこと。
P308+P313	ばく露又はばく露の懸念がある場合：医師の診断／手当てを受けること。
P403+P235	換気の良い場所で保管すること。涼しいところに置くこと。
P501	内容物／容器を適切な方法で廃棄すること。

- 次の試薬類に関する危険有害性情報、注意事項を示す。
  - NP-40



危険：	Triton X-100 を含む
H302	飲み込むと有害
H318	重篤な眼の損傷
H412	長期継続的影響によって水生生物に有害
P280	保護手袋 / 保護衣 / 保護眼鏡を着用すること。
P264	取扱い後は手をよく洗うこと。
P273	環境への放出を避けること。
P305+P351 +P338	**眼に入った場合**：水で数分間注意深く洗うこと。次にコンタクトレンズを着用していて容易に外せる場合は外すこと。その後も洗浄を続けること。
P301+P312	**飲み込んだ場合**：気分が悪いときは医師に連絡すること。
P501	内容物／容器を適切な方法で廃棄すること。

- **安全データシート（SDS）**：製品の安全な取り扱い、輸送および廃棄に関する重要な情報が記載されている。
- **注：安全データシートについては、カストマーサポートセンターにお問い合わせください。**
- LSI HER-2/*neu* DNA プローブと CEP 17 DNA プローブの混合物は催奇性物質であるホルムアミドを含んでいる。皮膚、粘膜への接触を避けること。
- コントロールスライドは、皮膚、粘膜への接触を避けること。
- パラフィンプレトリートメントキットの前処理溶液（Vysis Pretreatment Solution）は、チオシアン酸ナトリウム（NaSCN）を含む。チオシアン酸ナトリウムは、飲み込んだ場合有害で、死に至る可能性がある。目や皮膚、着衣に触れないようにすること。触れた場合は触れたすべての部分を、大量の水で洗い流すこと。

（2）使用上の注意

- 使用期限を過ぎた試薬類を使用しないこと。
- キット内または異なるキットの試薬を混ぜて使用しないこと。
- 同一のロット番号の試薬であっても試薬を注ぎ足すことはしないこと。
- 試薬は、微生物に汚染されないよう注意すること。
- 未開封のパスビジョンキットは、–20℃で保存し、光、湿度の影響を避ける。20X SSC 塩と NP-40 は、別けて常温でも保存できる。未開封の構成試薬の使用期限は、おのおのの試薬のラベルに表示している。開封・未開封の両方の試薬ともラベルに記載の保存条件で保存する。
- 試薬を、光、熱、湿気に曝すことは、キットの構成試薬のうちのいくつかの使用期限に影響する可能性があるので避ける。
- 試薬は、ラベルに記載された条件で貯蔵すること。適切貯蔵されていない試薬はアッセイ結果に悪影響を与える可能性がある。
- 20X　SSC 液を低温で保存すると、結晶化することがある。室温に戻しても結晶が再溶解しないときは廃棄する。
- 調製した試薬に沈殿が生じたり、濁ってきたら、廃棄して新しい試薬を調製する。
- 蛍光物質は光により退色するため、蛍光物質を含む溶液は遮光下で取り扱う。蛍光標識 DNA プローブを取り扱うすべての工程と蛍光染色後のスライドを取り扱うすべてのステップにおいて、操作に光を必要としないすべての工程は遮光下で行う（インキュベーション、洗浄等）。
- ＊ 本キットはホルマリン固定パラフィン包埋乳がん、胃がんまたは大腸がん組織および細胞のみに用いる。新鮮組織、乳がん、胃がんまたは大腸がん以外の組織に使用することを目的とはしていない。
- DNA が損傷を受け FISH 法がうまくいかないことがあるため、検体を酸、強い塩基、極端な熱に暴露させないこと。
- すべての操作（スライド標本の変性、ハイブリダイゼーションおよび測定）は、本書の記載に従うこと。従わない場合、解釈不能なまたは誤った結果を与える可能性がある。
- ハイブリダイゼーションエリアを同定するには、同じ組織片から得られる連続組織切片スライドを 10 枚に 1 枚、HE 染色を行う必要がある。
- 弊社以外から提供されている試薬類を使用した場合、良好なハイブリダイゼーション結果が得られない場合がある。
- 溶液、温浴槽、インキュベーターの温度の測定には較正した温度計を用いる。
- 前処理溶液、変性溶液、洗浄用緩衝液は、毎回使用前に温度の確認をする（較正した温度計を使ってコプリンジャー中の溶液の温度を測定する）。
- 使用前のコントロールスライドは、15 ～ 30℃で保存すること。30℃を超える温度に長時間さらさないこと。
- コントロールスライドは、湿気を避けるために乾燥剤とともに密閉容器中に 15 ～ 30℃で保存した場合、おのおのの使用期限まで安定である。

（3）廃棄上の注意

- 検体中には HIV、HBV、HCV 等の感染性のものが存在する恐れがあるので、廃液、使用済み器具などは次亜塩素酸ナトリウム（有効塩素濃度 1,000 ppm、1 時間以上浸漬）またはグルタルアルデヒド（2%、1 時間以上浸漬）による消毒処理、あるいはオートクレーブ（121℃、20 分以上）による滅菌処理を行うこと。
- 試薬および器具等を除染および廃棄する場合には、廃棄物の処理および清掃に関する法律、水質汚濁防止法等の規定に従って処理すること [12]。
- 試薬類や検体が飛散した場合には、飛散した溶液を吸収剤で吸収し、飛散した場所を洗浄液で拭き取った後、さらに 1.0% 次亜塩素酸ナトリウム溶液などの適切な消毒剤で拭き取ること。作業は適切な保護用具（手袋、安全眼鏡、実験衣など）を着用して行うこと [9]。
- 有害物質を廃棄する場合は、有害物質に対応した廃棄を行うこと。

【貯蔵方法、有効期間】

貯蔵方法： 遮光して –20℃で保存する。
有効期間： 15 箇月
使用期限は、外装に表示されている。

【包装単位】

パスビジョン HER-2 DNAプローブキット

○ 20 テスト用　　製品番号：2J01-31（30-161060）

- LSI HER-2/*neu* スペクトラムオレンジ /CEP 17スペクトラムグリーン DNA プローブ　200 μL× 1
- DAPI 対比染色液　300 μL× 1
- NP-40　2 mL× 2
- 20X SSC塩　66 g× 1

【主要文献】

1. *Muss HB, Thor AD, Berry DA, et al. 1994*: c-erbB-2 expression and response to adjuvant therapy in women with node-positive early breast cancer. *N Engl J Med.* 330(18): 1260-1266.
2. *Tsuda H. Akiyama F, Terasaki K. et al. 2001*: Detection of *HER-2/neu* (*c-erbB-2*) DNA Amplification in Primary Breast Carcinoma: Interobserver Reproducibility and Correlation with Immunohistochemical HER-2 Overexpression. *Cancer*. 92(12): 2965-2974.
3. Mass RD, Sanders C, Kasian C, *et al*. The Concordance Between the Clinical Trials Assay (CTA) and Fluorescence *in Situ* Hybridization (FISH) in the Herceptin Pivotal Trials [abstract]. *Am. Soc. Clin. Oncology* 2000; 19:75a.
4. Persons DL, Bui MM, Lowery MC, *et al*. Fluorescence *in situ* hybridization (FISH) for detection of HER-2/*neu* amplification in breast cancer: a multicenter portability study. *Ann. Clin. Lab Science*. 2000;30:41-8.
5. Pauletti G, Godolphin W, Press MF, *et al*. Detection and quantitation of HER-2/*neu* gene amplification in human breast cancer archival material using fluorescence in situ hybridization. *Oncogene*. 1996;13:63-72.
6. U.S. Centers for Disease Control. *Morbidity and Mortality Weekly Review*. 1987;36(suppl. 2S):2S-18S.
7. Hofmann M, *et al*. Assessment of a HER2 scoring system for gastric cancer: results from a validation study. *Histopathology* 52:797-805, 2008.
8. Mass RD, Press MF, Anderson S, *et al*. Evaluation of clinical outcomes according to HER2 detection by fluorescence in situ hybridization in women with metastatic breast cancer treated with trastuzumab [abstract]. *Clin Breast Cancer.* 2005;6(3):240-6.
9. US Department of Health and Human Services. *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories*, Fifth Edition. Washington, DC: US Government Printing Office, December 2009.
10. US Department of Labor, Occupational Safety and Health Administration, 29 CFR Part 1910.1030, Occupational Safety and Health Standards: Bloodborne Pathogens.
11. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). *Clinical Laboratory Waste Management: Approved Guideline—Third Edition*. CLSI Document GP5-A3. Clinical and Laboratory Standards Institute (formerly NCCLS): Wayne, PA; 2011.
12. World Health Organization. *Laboratory Biosafety Manual*, Geneva: World Health Organization, 2004.

【その他】

(1) 特許

PathVysion および他の多重直接標識 DNA FISH プローブは、米国特許＃ 5,663,319 および＃ 5,491,224 によりカバーされている。Vysis LSI, CEP and WCP（whole chromosome painting）直接標識蛍光プローブは、米国特許 RE40,494, 6,596,479, 7,115,709, 5,756,696, 6,475,720, 6,607,877 によりカバーされ、カリフォルニア大学から Abbott Molecular Inc. に独占的にライセンス供与されている。本キットの測定は、米国特許＃ 5,985,553 によりカバーされており、米国保健社会福祉省から Vysis に非独占的にライセンス供与されている。

(2) トラブルシューティング

別表　トラブルシューティングガイド

問題点	予想される原因	解決法
・シグナルが見られない、または、弱い	・スライドを観察するフィルターセットが適切でない	・推薦するフィルターを使用する
	・顕微鏡が適切に機能していない	・顕微鏡メーカーの技術の担当者を呼ぶ
	・不適切なランプ（例：Xenon、Tungsten）	・水銀ランプの使用（100watt を推奨）
	・水銀ランプが古い	・新しいランプに交換する
	・水銀ランプの取り付け違い	・水銀ランプを取り付け直す
	・集光レンズの汚れ・破損	・レンズを磨く、交換する
	・ランプハウスの鏡の汚れ・破損	・鏡を磨く、交換する
	・ハイブリダイゼーションの状態が適切でない	・インキュベーターの温度が 37 ± 1℃であることを確認する ・ハイブリダイゼーション時間を 14 時間以上にする
	・ポストハイブリダイゼーション洗浄温度が適切でない	・溶液の温度が 72 ± 1℃であることを確認する
	・カバーグラスの下に気泡があり、プローブとの反応が阻害されている	・カバーグラスをかぶせる時はまず、ハイブリダイゼーション混合物に触れるように置く
	・切片に対してハイブリダイゼーション溶液の量が少ない	・標本当たり 20 μL のハイブリダイゼーション溶液になるようにする
	・プロテアーゼ消化が不十分	・溶液の温度が 37 ± 1℃であることを確認する ・緩衝液の pH が 2.0 ± 0.2 であることを確認する ・消化時間を 60 分まで延長する
	・切片が過剰に固定されている	・スライドの前処理工程での固定化操作を省く ・組織試料の最適固定時間は 24 ～ 48 時間で、これより時間を長くすると、シグナル強度が減弱することがある
	・DNA の漏出（DAPI 染色が弱い）	・固定化状態を確認する
・組織切片間でシグナルの強度にばらつきがある	・多くの組織切片でそれぞれに異なる	・DAPI 染色を確認する ・DAPI 染色がシグナルの少ない部分でうまく行っていれば、そのスライドをカウントする ・シグナルの少ない部分の DAPI 染色がおかしければ、スライドの前処理行程での固定化時間を延長する
	・カバーグラスの下に気泡があり、スライド上でプローブが偏在している	・次の切断面標本または同じスライドを使ってハイブリダイゼーションを繰り返す ・カバーグラスに気泡が残らないように気をつける
	・切片が大きすぎる	・大きな組織切片ではハイブリダイゼーション溶液を 20 μL まで増量する
・バックグランドのノイズが高い	・洗浄の厳密さ（ストリンジェンシー）が不適切	・ポストハイブリダイゼーション洗浄緩衝液の pH が 7.0 ～ 7.5 であることを確認する ・溶液の温度が 72 ± 1℃であることを確認する ・洗浄時に温和にかき混ぜる ・洗浄時間を 5 分まで延長する
・組織が欠落している、または形態が損傷している	・組織切片の固定が不十分（DAPI 染色の不調）	・スライド前処理行程の固定化の時間と条件を確認する
	・不適切なスライドの使用	・オルガノシランコートスライドを使用する
	・スライドのベーキングが不適切	・オーブンの温度が 56℃であることを確認する
	・前処理のしすぎ	・前処理溶液の温度が 80 ± 1℃であることを確認する ・前処理時間を短くする ・プロテアーゼ消化時間を短くする
	・変性のしすぎ	・変性溶液の温度が 72 ± 1℃であることを確認する ・変性時間を短縮する
	・ハイブリダイゼーション後にカバーグラスを取り除く際に、組織切片が千切れる	・カバーグラスをポストハイブリダイゼーション洗浄緩衝液に浸けてはがす

(3) 操作方法の概略

検体の取扱いとスライドの調製

(1) 検体の処理（組織の選択は病理医）		
	① 組織の採取	
	② 切り出し（2 × 2.5 × 0.5cm 程度）	
	③ 固定：10%中性緩衝ホルマリン液	24 ～ 48 時間
	④ 水洗い	
	⑤ 脱水：70% → 80% → 90% → 100%エタノール	
	⑥ 脱アルコール：中間剤（キシレン）	
	⑦ パラフィン包埋	
(2) 切片スライドの作製		
	① 4 ～ 6 μm のパラフィン切片 （胃がん組織の場合、4 μm とすること）	
	② 加温精製水（40 ± 2℃）に浮かべる	
	③ シランコートスライドグラスにのせる	
	④ 風乾	
	⑤ 56℃で放置	一晩

パラフィンプレトリートメントキット
(a) 前処理溶液
(b) プロテアーゼ（ペプシン）
(c) プロテアーゼ緩衝液
(d) 洗浄緩衝液

プローブチェック HER-2/*neu* 正常コントロール
プローブチェック HER-2/*neu* 増幅コントロール

スライドの前処理

(1) 脱パラフィン		
	① Hemo-De（常温）に浸漬	10 分間
	② 新しい Hemo-De（常温）に浸漬	10 分間× 2 回
	③ 脱水：100%エタノール（常温）に浸漬	5 分間× 2 回
	④ 乾燥：風乾または 45 ～ 50℃スライドウオーマー	
(2) 検体スライドの前処理		
	① 0.2 mol/L 塩酸に浸漬	20 分間
	② 精製水に浸漬	3 分間
	③ 洗浄緩衝液に浸漬	3 分間
	④ 前処理溶液（80 ± 1℃）に浸漬	30 分間
	⑤ 精製水に浸漬	1 分間
	⑥ 洗浄緩衝液に浸漬	5 分間× 2 回
(3) 酵素処理		
	① プロテアーゼ溶液（37 ± 1℃）に浸漬	10 ～ 60 分間 （胃がん組織の場合、 60 分間浸漬すること）
	② 洗浄緩衝液に浸漬	5 分間× 2 回
	③ 乾燥：風乾または 45 ～ 50℃スライドウオーマー	2 ～ 5 分間 （スライドウオーマー の場合）
(4) 検体の固定		
	① 10%中性緩衝ホルマリン（常温）に浸漬	10 分間
	② 洗浄緩衝液に浸漬	5 分間× 2 回
	③ 乾燥：風乾または 45 ～ 50℃スライドウオーマー	2 ～ 5 分間 （スライドウオーマー の場合）

FISH 染色操作

(1) 検体 DNA の変性		
	① 湿潤箱を 37 ± 1℃に予備加温	
	② 変性溶液を 72 ± 1℃に温浴槽で加温	30 分間
	③ 使用前に溶液温度を確認	
	④ ハイブリダイゼーション領域をマーク	
	⑤ 変性溶液（72 ± 1℃）に浸漬	5 分間
	⑥ 70%エタノール（常温）、振盪、浸漬	1 分間
	⑦ 85%エタノール（常温）、振盪、浸漬	1 分間
	⑧ 100%エタノール（常温）、振盪、浸漬	1 分間
	⑨ 乾燥：風乾または 45 ～ 50℃スライドウオーマー	2 ～ 5 分間 （スライドウオーマー の場合）
(2) ハイブリダイゼーション		
	① DNA プローブを 10 μL 添加	
	② カバーグラスを被せプローブを広げる	
	③ カバーグラスの周囲をシール	
	④ 37 ± 1℃に予備加温した湿潤箱に入れる	
	⑤ ハイブリダイゼーション：37 ± 1℃でインキュベーション	14 ～ 18 時間
(3) スライドグラスの洗浄		
	① PHWB ※を予備加温（72 ± 1℃）	30 分間
	② スライドグラス周囲のシールを取り除く	
	③ 検体スライドを常温の PHWB ※に入れる	
	④ カバーグラスをはずして取り出す	
	⑤ PHWB ※（72 ± 1℃）に浸漬	2 分間
	⑥ 検体スライドを遮光下で風乾	
	⑦ DAPI 対比染色液を 10 μL 添加	
	⑧ カバーグラスを被せる	

※ PHWB = ポストハイブリダイゼーション洗浄緩衝液

パスビジョン HER-2 DNA プローブキット
(a) 蛍光標識 DNA プローブ
(b) DAPI 対比染色液
(c) NP-40
(d) 20X SSC 塩

自動前処理装置 VP2000

(1) 脱パラフィン		
	① Hemo-De（常温）に浸漬	5 分間
	② 新しい Hemo-De（常温）に浸漬	5 分間× 2 回
	③ 脱水：95%エタノール（常温）に浸漬	1 分間× 2 回
(2) 検体スライドの前処理		
	① 0.2 mol/L 塩酸に浸漬	20 分間
	② 精製水に浸漬（流水下）	3 分間
	③ 前処理溶液（80℃）に浸漬	30 分間
	④ 精製水に浸漬（流水下）	3 分間
(3) 酵素処理		
	① プロテアーゼ溶液（37℃）に浸漬	10 ～ 60 分間 （胃がん組織の場合、 60 分間浸漬すること）
	② 精製水に浸漬（流水下）	3 分間
(4) 検体の固定		
	① 10%中性緩衝ホルマリン（常温）に浸漬	10 分間
	② 精製水に浸漬（流水下）	3 分間
	③ 脱水：70%エタノール（常温）に浸漬	1 分間
	④ 脱水：85%エタノール（常温）に浸漬	1 分間
	⑤ 脱水：100%エタノール（常温）に浸漬	1 分間
	⑥ 乾燥：air drying station 中（28℃）	3 分間

ThermoBrite もしくは HYBrite を用いた FISH 染色操作
（検体の DNA 変性 / ハイブリダイゼーションの同時処理）

(1) 検体 DNA の変性とハイブリダイゼーション		
	① DNA プローブを 10 μL 添加	
	② カバーグラスを被せ均一にプローブを広げる	
	③ カバーグラスの周囲をシール	
	④ スライドの下底を確認（清浄）	
	⑤ 湿らせたペーパータオルをヒーティング面に沿った溝に置く	
	⑥ ThermoBrite もしくは HYBrite をオン	
	⑦ プログラムをセット	
	⑧ スライドを装置のヒーティング面に置く	
	⑨ ThermoBrite もしくは HYBrite のカバーを閉じる	
	⑩ プログラムを動作	14 ～ 18 時間

【問い合わせ先】
アボットジャパン合同会社
カストマーサポートセンター
〒 270-2214　千葉県松戸市松飛台 278
TEL 0120-031441

【製造販売業者の名称及び住所】
アボットジャパン合同会社
〒 270-2214　千葉県松戸市松飛台 278
TEL 047（385）2211（代表）

すべての商標の所有権は、各商標の所有権者に帰属します。

©ABBOTT JAPAN LLC 2024

Abbott