

*《自動染色装置による操作法》

- (1) 検体組織スライド、ブロッキング試薬、一次抗体、一次抗体陰性コントロール、ポリマー試薬、基質溶液、精製水、洗浄液を機器の所定位置に設置する。
- ** (2) 全ての染色工程と反応時間は、以下のとおり Dako Link ソフトウェアに予め設定されている。本品のプログラムがインストールされていない場合は、問い合わせ先に連絡すること。各試薬は、200μL/滴下ゾーンで設定される。

- ①ブロッキング試薬：5分
- ②洗浄液：5分
- ③一次抗体：30分
- ④一次抗体陰性コントロール：30分
- ⑤洗浄液：5分2回
- ⑥ポリマー試薬：30分
- ⑥洗浄液：5分2回
- ⑦基質溶液：10分
- ⑧精製水または洗浄液：5分2回
- ⑨対比染色液：1～5分
- ⑩流水にて3分間静かに洗浄する。

- (3) 自動染色装置の操作法に従って操作する。

《脱水・透徹・封入》

- (1) 使用する封入剤の種類により、必要に応じて検体組織スライドを以下のように順に各液に浸漬する。
- 流水水洗1分→精製水1分→エタノール(50vol%) 3分→エタノール(70vol%) 3分→エタノール(80vol%) 3分→エタノール(95vol%) 3分→エタノール(100vol%) 3分→エタノール(100vol%) 3分→エタノール(100vol%) 3分→キシレン(100vol%) 3分→キシレン(100vol%) 3分→キシレン(100vol%) 3分
- (2) 封入剤で封入し、カバーガラスをかける。

検出結果の判定法及び判定に係る注意事項

①検出結果の判定法

検体組織中に HER2 タンパクが検出される場合、陽性シグナルは一次抗体が反応した標的細胞（乳癌及び胃癌細胞）の膜及び細胞質に認められ、茶褐色を呈する。検体組織中の HER2 タンパクの発現量の判定は、以下の基準に従って実施する。

■判定対象検体組織スライドの染色性

- 腫瘍細胞が HER2 タンパクを発現していれば、腫瘍細胞の膜に一致して褐色の反応性が認められる。この染色強度を下記判定基準により、以下の手順で判定すること。
1. 陽性および陰性対照のコントロールスライドの特異染色性及び染色強度を観察し、染色手順及び構成試薬の性能を確認する。
 2. 陽性所見を示す検体組織スライドを選択し、HER2 タンパク染色像を確認する。
 3. 乳癌検体の場合、浸潤性乳癌細胞の陽性所見のみを検索対象とする。
 4. 胃癌検体の場合、胃および胃食道接合部の腺癌を検索対象とする。
 5. 胃癌検体において、高度な不均一性が認められる時は、2 以上の病理組織ブロックを用いて検査を行うことが推奨されている。
 6. まず、光学顕微鏡の4倍対物レンズを使用して、検体組織内の癌細胞の HER2 タンパク陽性染色像、陽性染色の強度、陽性細胞率を観察する。
 7. 次に対物レンズを10倍に切り替え、陽性所見が細胞膜か細胞質に局在するかを検索する。細胞質のみに陽性所見が見られるものは陰性と判定する。
 8. ほとんどの検体組織において、対物レンズ10倍で細胞膜に局在する陽性像が確認できるが、陽性像が確認出来ない場合は、さらに対物レンズ20倍で検索する。（別冊「Dako HercepTest II 結果判定マニュアル・胃癌」参照）

*＜判定基準＞

HER2 タンパク過剰発現の有無については、学会等から出される最新の HER2 検査ガイドラインなどに従って判定を行うこと。

各染色を実施した際、下記に示す順序で染色結果の妥当性を決定すること。

■本品中のコントロールスライドの染色性

各施設で HER2 タンパク発現量の絶対基準が確定するまでは、キットの構成試薬のコントロールスライドを校正用標準スライドとし、必ず同時に染色して判定の参考にすること。

SK-BR-3細胞では細胞膜全周に強い褐色の染色性(3+)が、MDA-175細胞においては細胞膜の一部に弱い反応性(1+)が認められ、MDA-231細胞ではなんら免疫反応性が認められないこと。

MDA-231細胞において、褐色の反応性が認められる場合、この染色は非特異反応であり、これらの染色標本は診断に適さない。

■陽性対照のコントロールスライドの染色性

腫瘍細胞の膜に褐色の免疫反応が認められること。

■陰性対照のコントロールスライドの染色性

本品の構成試薬の成分が交差反応により起こしうる反応性を除外するために、HER2 タンパクが発現していないと確認されている病理組織標本で陰性であることを確認する。この切片で褐色の反応性が認められる場合、この染色は非特異反応であり、これらの染色組織標本は診断に適さない。

■一次抗体陰性コントロール試薬で染色した検体組織スライドの染色性

免疫反応性がないことを確認する。結合組織・壊死組織・白血球や赤血球に褐色の反応性が認められる場合、検体組織スライドの不良が考えられるため留意すること。

②判定上の注意

- (1) ほとんどの腫瘍細胞の細胞膜に陽性染色像が確認される場合は、2+或いは 3+と判定する。
- (2) 特に3+に判定されるものは、80%以上の浸潤性乳癌細胞の細胞膜に強い陽性像を認める。
- (3) 対物レンズ10倍、20倍で観察して、1+か2+かの判定が困難な場合は、概ね1+と判定する。
- (4) 必ず各コントロールスライドの染色結果と比較して、染色結果を判定すること。
- (5) 一般的にタンパクや基質反応生成物の非免疫的結合により、偽陽性結果が観察される場合がある。偽陽性結果は赤血球による偽パーオキシダーゼ反応やサイトクロームCによる内因性パーオキシダーゼ反応によっても起きることがある。
- (6) 使用する核染色液の性能や反応時間の長さによって、核染色の度合いが薄かったり、逆に暗青色に染まることもある。過剰、或いは不完全な核染色は、染色結果の適切な判定を損なう怖れがあるので注意すること。
- (7) コントロールスライド上の MDA-175 セルラインはある時期を越えると劣化する。コントロールスライドの結果は、コントロールスライドの有効期限を考慮して評価すること。MDA-175セルラインが陰性染色結果を示した場合、コントロールスライドが劣化している可能性がある。
- (8) 細胞質に陽性染色が観察されることがある。判定は腫瘍細胞膜の陽性染色態度より判定すること。⁽⁹⁾
- (9) 検体組織の壊死部分は、抗体が非特異的に結合しやすく非特異的染色の原因となり易いので、陰性コントロールスライドと比較し、十分注意して判定すること。
- (10) 間質系のコラーゲンは、固定後疎水性となって抗体と結合し易くなること、陰性に帯電しているため陽性に帯電している抗体と結合し易いことなどにより、非特異的染色の原因となり易いので、陰性コントロールスライドと比較し、十分注意して判定すること。
- (11) 顆粒球の一部、及びマクロファージなどは細胞膜表面にFcレセプターを有するため、抗体のFc部分と結合し、抗体本来の特異的反応部位以外に染色が現れることがあるので、陰性コントロールスライドと比較し、十分注意して判定すること。
- (12) 胃の生検標本を用いて検査を行う際に検体が小さい場合は、腫瘍の形態学的損傷がないことや免疫組織化学的染色に十分な腫瘍細胞の存在を確認すること。
- (13) 胃癌の検査を行う際は、腺癌患者からの検体のみ評価対象とする。同一組織内に腸上皮化生組織と胃腺癌組織が存在する場合は、腺癌組織のみを計測する。生検標本の場合、5個以上の癌細胞の集塊からなるクラスターの染色を評価すること。

性能

「用法・用量（操作方法）」欄の操作方法により、感度、正確性及び同時再現性の各試験を行い、「検出結果の判定法及び判定に係る注意事項」の判定基準に従って、HER2 タンパク過剰発現を判定した場合、下記の規格に適合する。

①感度試験

キット中のコントロールスライドを染色する時、それぞれのセルラインに対応した所定のスコアが得られる。

②正確性試験

キット中のコントロールスライドを染色する時、それぞれのセルラインに対応した所定のスコアが得られる。

また、一次抗体の代わりに一次抗体陰性コントロールを使用し、同様に試験を行った場合、すべてのセルラインにおいてスコア(0)が得られる。

③同時再現性試験

キット中のコントロールスライド3枚を同時に染色する時、いずれの検体スライドにおいても、それぞれのセルラインに対応した所定のスコアが得られる。

④相関性試験

本品と同一の原理を用いた既承認品と比較した場合、50例の検体の検出結果において、一致率は次の通りであり、良好な相関性を示した。

			比較対照品				
			過剰発現なし 過剰発現あり			合計	
本品	過剰発現なし	0	10	1	0	0	11
		1+	0	7	0	0	7
	過剰発現あり	2+	0	0	8	0	8
		3+	0	0	0	24	24
	合計		10	8	8	24	50

スコアごとの一致率 0：100% 判定結果の一致率 「過剰発現あり」一致率100%
1+：88% 「過剰発現なし」一致率100%
2+：100% 全体一致率：100%
3+：100%
全体の一致率：98%

使用上又は取扱い上の注意

①取扱い上の注意

- (1) 検体組織には、HBV、HIV など、感染のおそれのあるものもあるので、取扱いには十分注意すること。
- (2) 検査にあたっては感染の危険を避けるため、使い捨て手袋を着用すること。
- (3) 試薬を口で吸い上げないこと。
- (4) 試薬が皮膚や粘膜に直接接することを避けること。万一触れた場合は、多量の水で洗い流すこと。
- (5) 製品中の容器・付属品等は他の目的に転用しないこと。

- (6) 発色基質である3,3'-ジアミノベンジジンテトラヒドロクロライド(DAB)は、変異毒性が認められているので、取扱いに際しては非金属製のピンセット等の保護具を使用し、目や皮膚への接触を避けること。万一、皮膚に触れたり、目に入った場合は、流水で15分以上洗い流し、直ちに医師の診察を受けること。
- (7) キットの試薬中、ブロッキング試薬、一次抗体、一次抗体陰性コントロールはアジ化ナトリウムを含んでいる。アジ化ナトリウムは鉛や銅と反応して起爆性の高い金属化合物を生成するため、容器の落下・衝撃による破損がないように丁寧に取り扱うこと。

②使用上の注意

- (1) 本品は凍結を避け、貯法に従い保存して下さい。凍結させた試薬は、品質が変化して正しい結果が得られないことがあるので使用しないこと。
- (2) 試薬はなるべく早く使用し、使用期限を過ぎた試薬、コントロールスライドは使用しないこと。
- (3) 試薬は直接日光に当てないこと。特に発色基質や基質溶液は、強い光にさらさないこと。
- (4) 試薬は微生物に汚染されないよう注意すること。
- (5) 異なるロットの試薬や他社品の試薬を混ぜて使用しないこと。
- (6) 同一ロットの試薬であっても試薬を注ぎ足さないこと。
- (7) 使用後は、キャップを強く締めておくこと。
- ** (8) 発色基質はロット或いはボトルによって、溶液の色の濃さ及び色調に違いが見られるが、発色の性能に影響はない。

③廃棄上の注意

- (1) 組織検体に接触した器具・試薬及び試薬容器等は感染の危険性があるものとし、オートクレーブで121℃20分間滅菌処理するか、または1vol%次亜塩素酸などの消毒液に浸して一晩処理すること。また、これらを廃棄する場合には、廃棄物処理及び清掃に関する法律等の規定に従って処理すること。
- (2) キットの試薬中、ブロッキング試薬、一次抗体、一次抗体陰性コントロールはアジ化ナトリウムを含んでいる。アジ化ナトリウムは鉛や銅と反応して起爆性の高い金属化合物を生成するため、廃棄の際は多量の水で希釈して廃棄すること。

貯蔵方法、有効期間

貯蔵方法：2～8℃で保存

有効期間：1年

**包装

	Code No.	包装単位
ダコ HercepTest II	K5204	(販売終了)
ダコ HercepTest II (自動染色装置用)	K5207	(販売終了)
ダコ HercepTest II (自動染色装置用)	SK001	50 テスト
Dako Wash Buffer 10x (別売)	S3006	1L×1

主要文献

- (1) Yamamoto, T., Ikawa, S., Akiyama, T., Semba, K., Nomura, N., Miyajima, N., Saito, T., Toyoshima, K. Similarity of protein encoded by the human c-erb-B-2 gene to epidermal growth factor receptor. Nature 1986;319:230-234.
- (2) Press, M. F., Hung, G., Godolphin, W., Slamon, D. J. Sensitivity of Her2/neu antibodies in archival tissue samples: Potential source of error in immunohistochemical studies of oncogene expression. Can Res 1994;54:2771-2777
- (3) Fahimi, H. D., Gray, B. A., Herzog, V. K. Cytochemical localization of catalase and peoxidase in sinusoidal cells of rat liver. Lab Invest 1976;34:192-201.
- (4) Li, C-Y et. al. Use of azide and hydrogen peroxide as an inhibitor for endogenous peroxidase in the immunoperoxidase method. J Histochem Cytochem 1987;35:1457-1460.
- (5) Press MF, Cordon-Cardo C, Slamon DJ. Expression of the HER-2/neu proto-oncogene in normal human adult and fetal tissues. Oncogene 1990;5:953-62
- (6) Asioli S, Maletta F, Verdun di Cantogno L, Satolli MA, Schena M, Pecchioni C, et al. Approaching heterogeneity of human epidermal growth factor receptor 2 in surgical specimens of gastric cancer. Human Pathol 2012; 43;11: 2070-2079.
- (7) HER2 検査ガイド 胃癌編 胃癌 トラスツズマブ病理部会

- ** (8) Bang YJ, Van Cutcem E, Feyereislova A, Chung HC, Shen L, Sawaki A et al. Trastuzumab in combination with chemotherapy versus chemotherapy alone for treatment of HER2-positive advanced gastric or gastro esophageal junction cancer (ToGA): a phase 3, open-label, randomized controlled trial. Lancet 2010.

問い合わせ先

アジレント・テクノロジー株式会社 カスタマーサポート
〒108-0023 東京都港区芝浦四丁目16番36号住友芝浦ビル
TEL：03-5232-9968

製造販売業者の名称及び住所

アジレント・テクノロジー株式会社
〒108-0023 東京都港区芝浦四丁目16番36号住友芝浦ビル
TEL：03-5232-9970 FAX：03-5232-9969