

添付文書

この電子化された添付文書をよく読んでから使用してください

承認番号 22000AMX00077000

**令和 5 年 7 月改訂(第 7 版)
*令和 2 年 11 月改訂(第 6 版)

体外診断用医薬品

組織検査用腫瘍マーカーキット

ヒストラ HER2 FISH キット

【全般的な注意】

- ア.本製品は、体外診断用であり、それ以外の目的で使用しないで下さい。
イ.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して下さい。
ウ.添付文書以外の使用方法については保証を致しません。
エ.使用する機器の添付文書及び取扱説明書をよく読んでから使用して下さい。

*【形状・構造等(キットの構成)】

構成試薬	成分	20テスト用	5テスト用	保存温度
20×前処理液	緩衝剤	80mL	20mL	2-8°C
プロテアーゼ	プロテアーゼ粉末	30mg ×20	30mg ×5	2-8°C
プロテアーゼ緩衝液	緩衝剤 pH 2.0	1L	250mL	2-8°C
プローブ溶液	HER-2/neu ローダミン DNA プローブ ローカス 17q11.2-q12 サイズ 450 kb Ch-17 fluorescein DNA プローブ 17 番染色体セントロメア領域にある アルファサテライト領域に特異的な DNA 配列	200 µL	50 µL	-20°C
NP40	NP40	2mL ×4	2mL ×1	2-8°C
20×SSC	塩化ナトリウム クエン酸三ナトリウム	500mL	120mL	2-8°C
DAPI 対比染色液	4',6-diamidino-2-phenylindole	200 µL	50 µL	2-8°C

**【使用目的】

- ・乳癌又は胃癌の組織又は細胞中の HER-2/neu 遺伝子の増幅度 (HER2/Ch17 シグナル比)の測定 (悪性腫瘍の診断補助に用いる)
- ・がん組織又は細胞中の HER-2/neu 遺伝子増幅度 (HER2/Ch17 シグナル比)の測定 (トラスツマブ(遺伝子組換え)及びベルツマブ(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】

本キットは FISH 法による HER-2/neu 遺伝子の増幅を測定するためのものである。HER-2/neu DNA プローブは HER-2/neu 遺伝子(17q11.2-q12)に特異的な DNA プローブである。プローブサイズは 450kb で、ローダミン(赤色)で直接標識されている。Ch17 DNA プローブ(chromosome17 Centromeric Probe; Ch-17)は、17 番染色体のセントロメア領域にあるアルファサテライト DNA 配列に特異的な DNA プローブであり、fluorescein(緑色)で直接標識されている。両プローブはあらかじめハイブリダイゼーション緩衝液中に未変性の状態で混合されている(プローブ溶液)。ホルマリン固定パラフィン包埋組織から切片を作製し、前処理(熱処理、タンパク分解酵素処理)を行う。前処理後の組織切片とプローブ溶液をホットプレート上で同時に熱変性してハイブリダイゼーションさせる。各々、HER-2/neu 遺伝子と 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。ハイブリダイゼーション後、過剰の標識プローブを洗浄し、DNA 特異的な色素 DAPI(青色)で染色体と核を対比染色する。適切な励起及び蛍光フィルターを備えた、蛍光顕微鏡で観察する。HER-2/neu 遺伝子の増幅はこれら2色の蛍光シグナル数の比から算出するので、17 番染色体のポリソミーと HER-2/neu 遺伝子の増幅は明確に識別される。各々の核における HER-2/neu 遺伝子数と Ch-17 シグナル数を数える。HER-2/neu シグナルの総計と Ch-17 シグナルの総計を計算して、HER2/Ch-17 のシグナル比を計算する。計算したシグナル比から HER-2/neu 遺伝子の増幅度を算出する。

【操作上の注意】

＜検体の採取と処理＞

組織を採取後、適当な大きさに切り出し(出来るだけ病理組織は 2×2.5×0.5cm 程度以内の大きさ)、直ちに組織切片の 5~50 倍量の 10%中性ホルマリン緩衝液に浸し固定する。固定時間は、24~48 時間とする。

病理組織ブロックは、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。
注)・病理組織の選択は病理医が行なう。

【用法・用量(操作方法)】

＜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作製＞

- 注)
- ・ハイブリダイゼーションエリアを識別するために、同じ組織ブロックから作製し、連続切片の 10 枚に 1 枚を HE 染色する。
 - ・1 回の測定には 22mm×22mm のエリアを使用する(切り出した組織の大きさが 2×2.5×0.5cm 程度以内であれば、検索エリアをカバーできる)。
 - ・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。
- (1) ミクロトームで 4~5 µm 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°C)に浮かべる。
 - (3) 組織切片をシランコートしたスライドガラスの処理側にのせる。
 - (4) スライドを風乾する。
 - (5) スライドを 50~55°Cで一晩放置する。

＜測定に必要な器具・装置・試薬＞

- キットに含まれる試薬
- (1) 20×前処理液
 - (2) プロテアーゼ
 - (3) プロテアーゼ緩衝液
 - (4) プローブ溶液
 - (5) NP40
 - (6) 20×SSC
 - (7) DAPI 対比染色液

＜そのほか用意する試薬・器具・装置＞

- (1) 試薬
10%中性緩衝ホルマリン溶液
ヘマトキシリン・エオジン溶液(HE)
エタノール
精製水
キシレン
- (2) 器具・装置
ペーパーバンド(コクヨ(株))
シランコートスライドガラス
カバーガラス
微量ピペット及び滅菌済みピペットチップ
タイマー
ミクロトーム
温浴槽(37°C、72°C、95°C~99°C)
恒温槽(インキュベーター、37°C)
湿潤箱
ホットプレート(85°C)
ピンセット
コプリンジャー
蛍光顕微鏡
光源:100W 水銀ランプ
対物レンズ:油浸用 60×対物レンズ
油浸オイル:無蛍光オイル
フィルター:蛍光色素に対応するフィルター

蛍光色素	励起波長	蛍光波長
fluorescein	495nm	520nm
ローダミン	550nm	575nm
DAPI	360nm	460nm

＜試薬の調製法、安定性＞

- (1) 1×前処理液
2.5mL の 20×前処理液に精製水を加えて全量 50mL とする。十分に攪拌する。
- (2) プロテアーゼ溶液
コプリンジャーに 50mL のプロテアーゼ緩衝液を入れ、温浴槽で 37°C にするまで温める。使用する直前に 30mg 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。
- (3) プローブ溶液
そのまま使用する。
- (4) NP40
そのまま使用する。

- (5) 2 × SSC
10mL の 20 × SSC に精製水を加えて全量 100mL とする。十分に攪拌し、コプリンジャーに 50mL の 2 × SSC を入れ、使用する。
- (6) 洗浄用緩衝液(2 × SSC/0.3% NP40)
10mL の 20 × SSC、300 μ L の NP40 に精製水を加えて全量 100mL とする。十分に攪拌し、2 個のコプリンジャーに各 50mL の洗浄用緩衝液を入れ、使用する。
- (7) DAPI 対比染色液
そのまま使用する。

<測定操作法>

1. 脱パラフィン

検体スライドをキシレンに各 5 分間、3 回浸漬する。その後、100%エタノール、100%エタノール、90%エタノール、70%エタノールの順で各 2 分間浸漬し、精製水で各 2 分間、3 回洗浄する。

2. 前処理

- (1) 50mL の 1 × 前処理液をコプリンジャーに入れ、温浴槽で 95～99℃になるまで温める。
- (2) 検体スライドを温浴槽で 95～99℃に加温した 1 × 前処理液に 20 分間浸漬する。コプリンジャーを温浴槽から取り出し、検体スライドを浸漬したまま、常温で 20 分間放冷する。常温の精製水で各 2 分間、3 回洗浄する。(別表 トラブルシューティング 1a. 参照)
- (3) 余分な水分を払い落とし、検体スライドを温浴槽で 37℃に加温したプロテアーゼ溶液に 10 分間浸漬する。常温の精製水で各 2 分間、3 回洗浄する。(別表 トラブルシューティング 1a. 参照)
- (4) エタノールの上昇系列、70%エタノール、85%エタノール、100%エタノールに各 1 分間浸漬して脱水し、検体スライドをドライヤーで乾燥する。

3. プローブ溶液のハイブリダイゼーション

- (1) 10 μ L のプローブ溶液を切片上に滴下する。
- (2) 22mm × 22mm のカバーガラスで標本を覆い、カバーガラスの周りをペーパーボンドでシールする。
- (3) 検体スライドを 85℃のホットプレートに載せて 5 分間熱変性する。
- (4) 熱変性の終わった検体スライドを湿潤箱に入れ、あらかじめ 37℃に温めておいた恒温槽にて一晩(14～18 時間)反応させる。

4. プローブ溶液の洗浄

- (1) 洗浄用緩衝液をコプリンジャーにいれ、温浴槽にてあらかじめ 72 ± 1℃になるまで温める。
- (2) 洗浄用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できない。
- (3) 恒温槽から検体スライドを取り出し、組織を傷つけないように注意しながら、ペーパーボンドをゆっくりとはがす。
- (4) 常温の洗浄用緩衝液に、カバーガラスをつけたまま、検体スライドを浸漬する。ピンセットを使用してゆっくりとカバーガラスをはがす。
- (5) すべての検体スライドのカバーガラスがはずれたら、72 ± 1℃に加温した洗浄用緩衝液に 2 分間浸漬する。
- (6) 洗浄用緩衝液から検体スライドを取り出し、常温の 50mL、2 × SSC で各 3 分間、2 回洗浄する。
- (7) エタノールの上昇系列、70%エタノール、85%エタノール、100%エタノールに各 1 分間浸漬して脱水し、検体スライドをドライヤーで乾燥する。

5. 後染色 封入

- (1) DAPI 対比染色液を 10 μ L 切片上に滴下し、封入する。
- (2) 少なくとも 15 分間放置した後、1 週間以内に蛍光顕微鏡にて観察する。

<測定結果の判定法>

<シグナルの計測と判定>

- 浸潤癌をもつ患者の検体のみを検査する。同じ患者で非浸潤癌と浸潤癌がある場合は浸潤癌のみを検査する。HE (hematoxylin and eosin) 染色でがん細胞を特定し、観察する部分を定める。FISH 染色スライドで同じ場所を計測する。がん細胞の FISH シグナルのみを計測する。ネクローシス部分や核の境界があいまいな部分、弱いシグナル強度、非特異的なシグナル、高いバックグラウンドのシグナルを持つ核は判定しない。核が適当に分布している領域を選ぶ。核が選ばれた領域の左上 4 分円から右に観察していく。
- 核内のすべてのシグナルを見つめるためにフォーカスを上下させる。
 - 同じ大きさの 2 個のシグナルで、シグナルの直径と同じ距離又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。
 - 1 色だけのシグナルしかない核やシグナルの無い核は計測しない。各々の色について 1 個以上の FISH シグナルがある核のみを計測する。
 - 1 検体につき 20 個の核について計測する。
 - HER-2/neu シグナルの総計と Ch-17 シグナルの総計を計算して、HER2/Ch-17 の比を計算する。
 - HER2/Ch-17 比が 2 以上を HER2 遺伝子増幅と判定する(8)。

<性能>

HER-2/neu 正常、増幅コントロールスライド、分裂中期核標本を用い、用法および用量欄の操作方法により染色した染色標本を、3 種類のフィルター(DAPI/赤、DAPI/緑及び DAPI/緑/赤)条件で観察する。

このとき、1)シグナルの強度 2)バックグラウンド 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。

<性能評価試験>

性能評価判定表

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 及び Ch17 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)バックグラウンド		ハイブリダイゼーションエリア内にかかる蛍光粒子もなく、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ウンドである。
	5	可視性の粒子やかすみがない。ハイブリダイゼーションエリアのバックグラウンドは黒である。
	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場合、可視性を減弱させたり、評価の妨げになることはない。
	3	・ バックグラウンドに蛍光粒子が存在するものの、特異的な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ウンドが存在しても、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断に影響を与えない程度である。
2	・ 多数のバックグラウ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(バックグラウ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ウ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 及び Ch17 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及びCh17のプロープは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、本来プロープが結合する染色体領域以外の領域に結合して、HER-2/neu及びCh17のプロープ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、プロープ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の分裂中期核の25%以上に交差反応が見られ、プロープ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		<ul style="list-style-type: none"> プロープシグナルは、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見られる。 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、プロープのシグナル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、プロープ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	<ul style="list-style-type: none"> 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プ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、シグナルの識別の妨げとならない。
	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。	

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、プロープ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1つ以上は、評価点数2である。
1	シグナルを読み取ることが出来ない。他の4つの評価項目のうち1つ以上は、評価点数1である。	

<同時再現性試験>

3回同時に標準操作を行なったとき、すべての結果が既知のパターンに一致する。

<較正用の基準物質>

HER-2/neu 正常、増幅コントロールスライド、分裂中期核標本

<測定範囲>

- HER-2/neu 正常コントロールスライド、HER2/Ch17 シグナル比は 0.75 から 1.25 の測定範囲にあてはまる。
- HER-2/neu 増幅コントロールスライド、HER2/Ch17 シグナル比は 2.0 から 8.0 の測定範囲にあてはまる。

<相関性>

本品と既承認品との相関性試験を行ない相関性基準に適合していることを確認した。

<データ>

測定方法: FISH(Fluorescence *in situ* hybridization)法

HER-2/neu と 17 番染色体セントロメア領域(Ch17 とする)のシグナルの数を記録して、HER2/Ch17 の比を求める。

本品と既承認品の比較を 280 検体の乳癌症例を使用して行なった結果を下記に示す。

HER2/Ch17 増幅比の相関性

既承認品

	2 以上(≥2)	2 未満(<2)	合計
本品	50	1	51
既承認品	0	229	229
合計	50	230	280

HER2/Ch17 増幅比が 2 以上(≥2)の一致率=100%(50 検体/ 50 検体)

HER2/Ch17 増幅比が 2 未満(<2)の一致率=99.6%(229 検体/ 230 検体)

全体一致率=99.6%(279 検体/280 検体)

※不一致の 1 例はカットオフ値(2.0)近傍の値であった。

<データ>

測定方法: FISH(Fluorescence *in situ* hybridization)法

HER-2/neu と 17 番染色体セントロメア領域(Ch17 とする)のシグナルの数を記録して、HER2/Ch17 の比を求める。

本品と既承認品の比較を 211 検体の胃癌症例を使用して行なった結果を下記に示す。

HER2/Ch17 増幅比の相関性

既承認品

	2 以上(≥2)	2 未満(<2)	合計
本品	52	1	53
既承認品	0	158	158
合計	52	159	211

HER2/Ch17 増幅比が 2 以上(≥2)の一致率=100%(52 検体/ 52 検体)

HER2/Ch17 増幅比が 2 未満(<2)の一致率=99.4%(158 検体/ 159 検体)

全体一致率=99.5%(210 検体/211 検体)

※不一致の 1 例はカットオフ値(2.0)近傍の値であった。

***<データ>

測定方法: FISH(Fluorescence *in situ* hybridization)法

HER-2/neu と 17 番染色体セントロメア領域(Ch17 とする)のシグナルの数を記録して、HER2/Ch17 の比を求める。

本品と既承認品の比較を 134 検体の大腸癌(結腸・直腸癌)症例を使用して行なった結果を下記に示す。

HER2/Ch17 増幅比の相関性

既承認品

	2 以上(≥2)	2 未満(<2)	合計
本品	31	0	31
既承認品	0	103	103
合計	31	103	134

HER2/Ch17 増幅比が 2 以上(≥2)の一致率=100%(31 検体/ 31 検体)

HER2/Ch17 増幅比が 2 未満(<2)の一致率=100%(103 検体/ 103 検体)

全体一致率=100%(134 検体/134 検体)

[使用上又は取り扱い上の注意]

<取り扱い上、廃棄上の注意>

- 固定前、固定後の検体やそれらにさらされたすべての物質は感染の可能性のあるものとして扱い、特段の注意で処理、管理すること。
- 試薬を口で吸引してはいけない。
- 試薬や検体で皮膚や粘膜との接触をさける。試薬が敏感な部分に接触したら充分な量の水であらう。

- (4) 検体組織に接触した器具・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°C20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。廃棄に際しては廃棄物の処理及び清掃に関する法律に従って適切に処理すること。
- (5) 検体やそれらに接触した試薬が飛散した場合、1vol%次亜塩素酸などの消毒液で処理すること。

<使用上の注意>

- (1) 最適な再現性のある結果のために、組織スライドは完全に脱パラフィンされなければならない。パラフィンの除去は染色過程の初めで完成される必要がある。
- (2) 中性緩衝ホルマリン以外の固定液で固定された検体、ホルマリン固定を長期間された検体はヒストラ HER2 FISH キットの使用に適していない。
- (3) 最適な再現性のある結果は温度制御された温浴槽、恒温槽、インキュベータのみを使う。熱処理の他の方法はテストされていて、再現性のある結果は得られていない。
- (4) 他のロットや他の資源からの試薬によってこのキットからの試薬を置き換えてはいけぬ。
- (5) 指定している温度や状態以外で試薬を使用、保存はしてはいけぬ。
- (6) 使用した試薬を開封したまま保存すると性能が劣化する。使用後は密封して保存する。
- (7) 有効期限を過ぎた試薬は使用してはいけぬ。
- (8) プローブ溶液は50%ホルムアミドが入ったハイブリダイゼーションバッファーで提供されている。ホルムアミドは呼吸システムや皮膚に刺激性があると知られている。完全な保護のために手袋を着用し、フード内でプローブを扱う。
- (9) 誤った結果を避けるために試薬の微生物のコンタミを避ける。
- (10) 指定されたインキュベーション時間、温度、方法以外は誤った結果を与える。
- (11) 指定された以外の組織固定方法や検体の厚さは組織形態やシグナル強度に影響する。
- (12) 試薬は適切に希釈されている。更なる希釈は結果に影響する。
- (13) 目や皮膚に接触を避けるために適切な保護具をつける。
- (14) DAPI は変異原性、皮膚、呼吸器刺激性がある可能性がある。吸入、皮膚接触は避ける。
- (15) キットの構成試薬は個別に補充する場合がある。
- (16) 測定試料は冷暗所で保管する。
- (17) 判定値がカットオフ値近傍の値(1.8-2.2)になったときは、解釈に注意が必要である。カットオフ値近傍の値(1.8-2.2)のとき、さらに別の核を20個追加して数えるべきである。結果を確認するために別の観察者が再度カウントを行う。まだ疑わしい場合、再検査を行う。

[貯蔵方法・有効期間]

プローブ溶液 -20°Cで12ヶ月保存
 その他の試薬 2~8°Cで12ヶ月保存

*[包装単位]

20テスト用、5テスト用

[主要文献]

1. Yamamoto T, Ikawa S, Akiyama T, Semba K, Nomura N, et al. Similarity of protein encoded by the human c-erbB-2 gene to epidermal growth factor receptor. Nature. 1986 Jan 16-22;319(6050):230-4.
2. Slamon DJ, Clark GM, Wong SG, Levin WJ, Ullrich A, et al. Human breast cancer correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. Science. 1987 Jan 9;235(4785):177-82.
3. Borg A, Tandon AK, Sigurdsson H, Clark GM, et al. HER-2/neu amplification predicts poor survival in node-positive breast cancer. Cancer Res. 1990 Jul 15;50(14):4332-7.
4. Gullick WJ, Love SB, Wright C, Barnes DM, et al. c-erbB-2 protein overexpression in breast cancer is a risk factor in patients with involved and uninvolved lymph nodes. Br J Cancer. 1991 Mar;63(3):434-8.
5. Kallioniemi OP, Kallioniemi A, Kurisu W, Thor A, et al. ERBB2 amplification in breast cancer analyzed by fluorescence in situ hybridization. Proc Natl Acad Sci U S A. 1992 Jun 15;89(12):5321-5.
6. Persons DL, Bui MM, Lowery MC, Mark HF, et al. Fluorescence in situ hybridization (FISH) for detection of HER-2/neu amplification in breast cancer: a multicenter portability study. Ann Clin Lab Sci. 2000 Jan;30(1):41-8.
7. Slamon DJ, Leyland-Jones B, Shak S, Fuchs H, et al. Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2. N Engl J Med. 2001 Mar 15;344(11):783-92.

8. Tsuda H, Akiyama F, Terasaki H, Hasegawa T, et al. Detection of HER-2/neu (c-erb B-2) DNA amplification in primary breast carcinoma. Interobserver reproducibility and correlation with immunohistochemical HER-2 overexpression. Cancer. 2001 Dec 15;92(12):2965-74.
9. Bilous M, Dowsett M, Hanna W, Isola J, Lebeau A, et al. Current perspectives on HER2 testing: a review of national testing guidelines. Mod Pathol. 2003 Feb;16(2):173-82. Review.

別表 トラブルシューティング

問題点	考えられる原因	その対策
1. シグナルが見られないまたは弱い。	1a. 前処理(熱処理、酵素処理)条件が適切でない。	1a. 前処理液が95~99°Cであることを確認して処理する。 プロテアーゼ溶液が37±1°Cであることを確認して処理する。 組織の厚さや固定方法によって、以下の範囲で調節する。 熱処理時間を15~20分間で調節する。 酵素処理時間を2~10分間で調節する。
	1b. 熱変性が適切でない。	1b. ホットプレートの温度を85±5°Cであることを確認して処理する。
	1c. ハイブリダイゼーションが適切でない。	1c. 恒温槽の温度が37±1°Cであることを確認して処理する。
	1d. プローブ溶液の洗浄温度が適切でない。	1d. 洗浄用緩衝液の温度が72±1°Cであることを確認して処理する。
	1e. 蛍光顕微鏡フィルターが適切でない。	1e. 蛍光色素に対応したフィルターを使用する(器具、装置、フィルターの種類を参照)。
	顕微鏡の操作が適切でない。	顕微鏡メーカーの技術の担当者と呼ぶ。
	不適切なランプ。	100W 水銀ランプを使用する。
	水銀ランプが古い。	新しい水銀ランプに交換する。
	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。	集光レンズを磨く、交換する。
2. シグナルが見られない領域がある。	2a. カバーガ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。	2a. カバーガラスをかぶせるときはまず、プローブ溶液に触れるように置く。
	2b. プローブ溶液の量が少ない。	2b. カバーガラスの範囲に十分なプローブ溶液を滴下する。
3. バックグラウンドのノイズが高い。	3a. プローブ溶液の洗浄温度が適切でない。	3a. 洗浄用緩衝液の温度が72±1°Cであることを確認して処理する。
	3b. エタノールの上昇系列が汚れている。	3b. 汚れていないエタノールの上昇系列(70%~100%)で切片を脱水、乾燥してから、DAPI 対比染色液を滴下する。
4. 組織が欠落している、または形態が損傷している。	4a. 組織の固定が不十分。	4a. 固定方法や固定時間を確認する。
	4b. 不適切なスライドの使用。	4b. シランコートスライドを使用する。
	4c. 前処理(熱処理、酵素処理)条件が適切でない。	4c. 1a.を参照する。

[問い合わせ先]

株式会社 常光 菊川工場 薬事品質保証課
 TEL 0537-36-1644 FAX 0537-36-2185
 静岡県菊川市西方154

[製造販売元]



株式会社

常光

静岡県菊川市西方154
 電話 0537-36-1644