

## 添付文書

この添付文書をよく読んでから使用してください

承認番号 22300AMX01163000

\*\*平成 25 年 11 月改訂(第 3 版)

\*平成 24 年 1 月初版(第 2 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 CISH 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                                                             | 10 回測定<br>キット    | 保存温度 |
|-----------|----------------------------------------------------------------|------------------|------|
| プローブ溶液    | HER-2/neu ジゴキシゲニン<br>DNA プローブ<br>ローカス 17q11.2-q12<br>サイズ 450kb | 100 $\mu$ L      | -20℃ |
| 20 × 前処理液 | 緩衝剤                                                            | 40mL             | 2～8℃ |
| プロテアーゼ    | プロテアーゼ粉末                                                       | 30mg<br>× 10 本   | 2～8℃ |
| プロテアーゼ緩衝液 | 緩衝液 pH2.0                                                      | 500mL            | 2～8℃ |
| 20 × SSC  | 塩化ナトリウム<br>クエン酸三ナトリウム                                          | 50mL             | 2～8℃ |
| 3%過酸化水素水  | 過酸化水素水                                                         | 3mL              | 2～8℃ |
| ブロッキング試薬  | ブロッキング剤                                                        | 3mL              | 2～8℃ |
| 一次抗体      | 抗ジゴキシゲニン モノクローナル<br>抗体(動物種:マウス)                                | 3mL              | 2～8℃ |
| 二次抗体      | ペルオキシダーゼ標識ポリマー結合<br>抗マウス IgG ポリクローナル抗体<br>(動物種:ヤギ)             | 3mL              | 2～8℃ |
| 対比染色液     | ヘマトキシリン                                                        | 5mL              | 2～8℃ |
| 発色基質      | 3,3'-ジアミノベンジン・4HCL<br>(剤型:固形)                                  | 1 チューブ<br>× 10 本 | 2～8℃ |
| 基質緩衝液     | トリス塩酸緩衝液                                                       | 3mL              | 2～8℃ |
| 発色試薬      | 過酸化水素水                                                         | 3mL              | 2～8℃ |
| 5 × 洗浄液   | リン酸緩衝液<br>Tween20                                              | 1L               | 2～8℃ |

### 【使用目的】

\*ヒト乳がん、胃がん組織・細胞における HER-2/neu 遺伝子の増幅度の測定  
(主に悪性腫瘍の診断補助に使用される)

### 【測定原理】

本キットは CISH 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、ジゴキシゲニンで直接標識されている。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溶解されている(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、タンパク質分解酵素処理)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スさせる。HER-2/neu 遺伝子にハ

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、ジゴキシゲニン に対する一次抗体を反応させ、次にペルオキシダーゼ標識二次抗体を反応させる。発色基質に基質緩衝液と発色試薬を加えて混合する。ペルオキシダーゼ反応を利用して基質を発色させ、各々の核における HER-2/neu 遺伝子数を光学顕微鏡で観察する。HER-2/neu 遺伝子の増幅はシグナル数から判定する。

### 【操作上の注意】

#### 【検体の準備】

- ・パラフィン包埋前に組織を 10%中性ホルマリン緩衝液で 6～48 時間の固定を行なう。
- ・病理組織は、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。
- ・大きな切片の場合、10  $\mu$  L 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  $\mu$  m 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℃)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 40 ± 3℃の恒温槽内で十分に乾燥させる。

### 【測定に必要な器具・装置・試薬】

キットに含まれる試薬

- (1) プローブ溶液
- (2) 20 × 前処理液
- (3) プロテアーゼ
- (4) プロテアーゼ緩衝液
- (5) 20 × SSC
- (6) 3%過酸化水素水
- (7) ブロッキング試薬
- (8) 一次抗体
- (9) 二次抗体
- (10) 対比染色液
- (11) 発色基質
- (12) 基質緩衝液
- (13) 発色試薬
- (14) 5 × 洗浄液

### 【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

封入剤(非水溶性の永久標本用封入剤、例:マリノール)

コントロールスライド

1) コントロールスライド

#### ■ 陰性コントロールスライド

ホルマリン固定パラフィン包埋された次のセルラインを貼り付けたスライド。  
MDA-MB-231(HER-2/neu 遺伝子正常)

核あたり HER-2/neu 遺伝子の ≤ 5 ドットを示す。

コントロールスライドは患者検体の検査毎に行い、組織切片と同様な方法で行なう。

#### ■ 陽性コントロールスライド

ホルマリン固定パラフィン包埋された次のセルラインを貼り付けたスライド。  
SK-OV-3(HER-2/neu 遺伝子増幅)

核あたり HER-2/neu 遺伝子の小クラスターから大クラスターを示す。  
コントロールスライドは患者検体の検査毎に行い、組織切片と同様な方法で行なう。

## 2) 検体組織コントロールスライド

### ■陰性組織コントロールスライド

検体組織スライドと同様な方法で作製され、あらかじめ HER-2/neu 遺伝子増幅がないことを CISH または FISH で確認している組織切片スライドを準備する。

### ■陽性組織コントロールスライド

検体組織スライドと同様な方法で作製され、あらかじめ HER-2/neu 遺伝子増幅があることを CISH または FISH で確認している組織切片スライドを準備する。

## (2) 器具、装置

ペーパーボンド

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

マイクローム

温浴槽 (37℃、75℃、95～99℃に加温できるもの)

恒温槽 (37℃)

湿潤箱

ホットプレート

ピンセット

コプリンジャー

染色ドーゼ

光学顕微鏡

\*自動染色装置 (必要に応じ用意する)

## [試薬の調製法、安定性]

### (1) 前処理液

20×前処理液を精製水で 20 倍希釈して調製する。  
(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℃ になるまで温める。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) SSC

20×SSC を精製水で 20 倍希釈して調製する。  
(5mL 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 SSC を入れ、使用する。)

### (4) 洗浄液

5×洗浄液を精製水で 5 倍希釈して調製する。

### (5) 基質溶液

基質溶液は使用直前に調製する。  
発色基質が入っている 1 チューブに精製水 1mL を加え、ピペッティングによってペレットを溶解し、よく混合する。基質緩衝液 2 滴と発色試薬 1 滴を加え、再びよく混合し、基質溶液とする。調製後の基質溶液は 30 分以内に使用する。

### (6) その他の試薬

その他の試薬はそのまま用いる。

## [測定操作法]

### <脱バラフィン>

検体組織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。

### <熱処理>

(1) 50mL の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℃に加温した前処理液に 15 分間浸漬する。常温の精製水で各 2 分間、3 回洗浄する。

## \*\*<酵素処理>

ほとんどの乳腺組織において、37℃、5 分間の酵素処理で最適な CISH の結果を得ることが出来るが、組織の厚さや固定方法に依存して酵素処理時間を 2～10 分間の範囲で調節する。酵素処理時間は 5 分間の酵素処理を行ったときの最初の結果に基づいて決定する。

- (1) 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 5 分間浸漬する。常温の精製水で各 2 分間、3 回洗浄する。
- (2) 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。

## <プローブ溶液のハイブリダイゼーション>

- (1) 10  $\mu$  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 94～95℃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 14～18 時間反応させる。

## <プローブ溶液の洗浄>

- (1) SSC をコプリンジャーにいれ、温浴槽にてあらかじめ 75℃になるまで温める。(スライドを 2 枚以上コプリンジャーに入れる場合は、スライド 1 枚につき、1℃温度を上げる。温度を上げる際には 80℃を超えないように注意する。)
- (2) SSC 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 1 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 SSC 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ずす。
- (5) すべての検体スライドのカバーガラスがはずれたら、75℃に加温した SSC に 5 分間浸漬する。
- (6) SSC から検体スライドを取り出し、精製水で各 2 分間、3 回洗浄した後、過剰水分を払い落とし、洗浄液中に 5 分間浸漬する。

## ■用法

### <内因性ペルオキシダーゼの除去>

- (1) 切片上の余分な水分を払い落とす。
- (2) 切片が完全に覆われるように 3%過酸化水素水を 2 滴(100  $\mu$  L)滴下し、常温で 10 分間反応させる。
- (3) 検体スライドを精製水で各 2 分間、3 回洗浄した後、過剰水分を払い落とし、洗浄液中に 5 分間浸漬する。

## <ブロッキング反応>

- (1) 切片上の余分な水分を払い落とす。
- (2) 切片が完全に覆われるようにブロッキング試薬を 2 滴(100  $\mu$  L)滴下し、常温で 10 分間反応させる。
- (3) ブロッキング試薬を払い落とす。洗浄は行なわない。

## <一次抗体反応>

- (1) 切片上の余分な水分を払い落とす。
- (2) 切片が完全に覆われるように一次抗体を 2 滴(100  $\mu$  L)滴下し、常温で 30 分間反応させる。
- (3) 検体スライドを洗浄ビンに入れた洗浄液で静かにすすいで、洗浄液中に 5 分間浸漬する。この洗浄液を新しいものに交換し、更に 5 分間浸漬する。

## <二次抗体反応>

- (1) 切片上の余分な水分を払い落とす。
- (2) 切片が完全に覆われるように二次抗体を 2 滴(100  $\mu$  L)滴下し、常温で 30 分間反応させる。
- (3) 検体スライドを洗浄ビンに入れた洗浄液で静かにすすいで、洗浄液

中に 5 分間浸漬する。この洗浄液を新しいものに交換し、更に 5 分間浸漬する。

#### <基質溶液の添加・反応>

- (1) 切片上の余分な水分を払い落とす。
- (2) 切片が完全に覆われるように前もって調製した基質溶液を 2 滴(100  $\mu$  L)滴下し、常温で 10 分間反応させる。
- (3) 検体スライドを洗浄ビンに入れた精製水または洗浄液で静かにすすぎ、洗浄液中に 5 分間浸漬する。

#### <対比染色>

\*1~3 分間の対比染色時間が適切である。対比染色時間は使用される組織に依存する。暗い対比染色はシグナルを不明瞭にさせる。

- (1) 切片上の余分な水分を払い落とす。
- (2) 切片が完全に覆われるように対比染色液を 2 滴(100  $\mu$  L)滴下し、常温で 1~3 分間反応させる。
- (3) 流水で 15 分間洗浄する。

#### \*■自動染色装置による操作法

- 1) 検体スライド、3%過酸化水素水、ブロッキング試薬、一次抗体、二次抗体、基質溶液、対比染色液、洗浄液、精製水を機器の所定位置に設置する。
- 2) それぞれの反応時間を下記のように設定する。( ) は検体スライドあたりの試薬の滴下量を表す。
  - ① 3%過酸化水素水 : 10 分(100~200  $\mu$  L)
  - ② 精製水または洗浄液 : 3 分
  - ③ 洗浄液 : 5 分
  - ④ ブロッキング試薬 : 10 分(100~200  $\mu$  L)
  - ⑤ ブロッキング試薬を払い落とす。洗浄は行わない。
  - ⑥ 一次抗体 : 30 分(100~200  $\mu$  L)
  - ⑦ 洗浄液 : 5 分 2 回
  - ⑧ 二次抗体 : 30 分(100~200  $\mu$  L)
  - ⑨ 洗浄液 : 5 分 2 回
  - ⑩ 基質溶液 : 10 分(100~200  $\mu$  L)
  - ⑪ 精製水または洗浄液 : 5 分
  - ⑫ 洗浄液 : 5 分
  - ⑬ 対比染色液 : 1~3 分(100~200  $\mu$  L)
  - ⑭ 流水で 3 分間洗浄する。
- 3) 自動染色装置の操作法に従って操作する。

#### <封入>

- (1) 検体スライドを以下のように順に各液に浸漬する。  
精製水 1 分→70%エタノール 3 分→80%エタノール 3 分→95%エタノール 3 分→100%エタノール 3 分→100%エタノール 3 分→100%エタノール 3 分→キシレン 3 分→キシレン 3 分→キシレン 3 分
- (2) 封入剤で封入し、カバーガラスをかける。

#### 【測定結果の判定方法】

##### CISH の結果の解釈

(別紙 1、図 A-H を参照)

##### 1. CISH シグナル

###### 1-1. 標本の評価

HER-2/neu CISH ドット(シグナル)は小さいが 20×-40× 対物レンズで明確に確認できる。ドットは対比染色に対して茶色を表す。

###### 1-2. CISH シグナルの種類

- (1) シングルドット(図 A, 別紙 1)。正常細胞やがん細胞で、滑らかで丸いシグナルとして観察できる。シングルドット(1 個のシグナル)は HER-2/neu 遺伝子 1 コピーを表す。
- (2) ダブルドット。ドットはペアとして見られるが、小クラスターではない。2 個のシグナルが 1 個のシグナルの直径より短い距離しか離れていないものはシングルドットとして数える(図 C, 別紙 1)。
- (3) 小クラスター(図 G, 別紙 1)。形状は不均一で、シングルドットの直径の 3 から 5 倍の大きさ。同じスライドからのがん細胞や正常上皮細胞からのシングルドットは対照として使用される。
- (4) 大クラスター(図 D, 別紙 1)。形状は不均一で、シングルドットの直径

の 5 倍より大きい。同じスライドからのがん細胞や正常上皮細胞からのシングルドットは対照として使用される。

表 1: シグナル観察

| 倍率(対物)       | CISH シグナル                   |
|--------------|-----------------------------|
| 10×          | シングル ドットはわずかに見える。標本全体を見渡せる。 |
| 20×          | シングル ドットは小さいが明確に認識できる。      |
| 40×          | シングル ドットは容易に確認できる。          |
| 60× または 100× | 必要ない。                       |

#### 1-3. HER-2/neu CISH シグナルの測定領域

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。10×-20× 対物レンズを使用して、HER-2/neu CISH シグナルの腫瘍内多様性を観察する。がん細胞の CISH シグナルのみを測定する。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を持つ核は測定しない。核が適当に分布している領域を選ぶ。がん細胞が同質の場合、シグナルが強い領域を選び、腫瘍内多様性がある場合、典型的なシグナル形態を示している領域を選ぶ。

- ・ 4×-20× 対物レンズを使用して、最も典型的な浸潤癌の領域を同定するために CISH 染色された患者検体を観察する。ネクローシス部分や重なっている核による重なっているシグナルや弱いシグナル強度を持つ核は計測しない。浸潤癌の中の非浸潤性乳管がん成分は計測しない。CISH 測定の前に HER-2/neu 遺伝子状態の腫瘍内多様性を評価する。
- ・ サンプルが同型であるなら、シグナル計測において、強い CISH シグナルを持つ組織の領域を選択する。シグナル計測に進む。
- ・ サンプルが浸潤癌構成要素の中で HER-2/neu 遺伝子状態の腫瘍内多様性を持つならば、シグナル計測においてそれぞれの HER-2/neu 遺伝子状態を表している領域を選択する。HER-2/neu 遺伝子状態(増幅や非増幅)が原発乳癌の同じ切片の異なった領域で異なっているなら、組織サンプルは多様性がある。多様性のあるそれぞれの領域内の細胞は、どの HER-2/neu 状態(増幅や非増幅)が腫瘍切片の 50%より多いなかで優位を占めるのかを決めるために評価される必要がある。HER-2/neu 状態がこの腫瘍の中で優位である領域の計測に進む。

#### 1-4. シグナルの測定

- ・ 40× 対物レンズを使用する。より高倍率の対物レンズで見えることは可能だが、油浸オイルは必要ない。
- ・ 別紙 1. 判定ガイドを参照する。
- ・ 個々の HER-2/neu 遺伝子は小さい丸いシングルドットとして確認できる(図 A, 別紙 1)。
- ・ 重なっている核や核が見えない全ての領域を数えてはいけない。核内にある CISH シグナルのみを数える。がん細胞の反転によって、核の外にこぼれた HER-2/neu DNA の残物による、偶然のまばらなシグナルは除外する。

#### 増幅なし

- ・ 選択した組織領域内の大部分(>50%)のがん細胞において核あたり HER-2/neu 遺伝子の 1-5 シングルドットとして定義される。
- ・ 30 個の細胞のドットをカウントする必要はない。任意の選択として別紙 2 の判定表を使用する。30 個の細胞をカウントして平均値を記録する。増幅なし(1-5 ドット)の明確な診断が得られる。

#### 増幅

##### 定義:

選択した組織領域内の大部分(>50%)のがん細胞において核あたり HER-2/neu 遺伝子の >5 ドット、または大クラスター、または複数ドットと大クラスターの混合、または

複数ドットと小クラスターの混合、または小クラスター

上記のケースでは 30 個の細胞のドットをカウントする必要はない。任意の選択として別紙 2 の判定表を使用する。30 個の細胞をカウントして平均値を記録する。増幅あり(>5 ドット)の明確な診断が得られる。カウントするために小クラスターを 5 ドットとしてカウントし、大クラスターを 10 ドットとしてカウントする。

- ・ 解釈: 小クラスターや大クラスターに対する特定のドット数の割り当ては定量化目的においては任意である。正常細胞は 2 個の HER-2/neu 遺伝子コピーをもつ。DNA を複製しているが、まだ分裂していない細胞は 4 個の HER-2/neu 遺伝子コピーを持つ。よって、小クラスターは増幅を示し、5 遺伝子コピーの最小数を持つ。大クラスターは少なくとも小クラスターの 2 倍の大きさであり、10 遺伝子コピーの最小数を持つ。

増幅または増幅なしの明確でないケース。

増幅か非増幅に属するか明確でない患者検体は注意して解釈する必要がある。これらの患者検体は測定のために選んだ領域内の大部分(>50%)のがん細胞において核あたり 4-6 ドットを示す。30 個の細胞をカウントしたあと、ドットの平均数が 4 と 6 の間であるとき、追加の 30 個の細胞をトータル 60 個の細胞になるようにカウントする。60 個の細胞のドットの平均数が 1-5 ドットであるとき、非増幅として記録する。60 個の細胞のドットの平均数が >5 ドットであるとき、増幅として記録する。まだ疑わしいなら、新しい検体スライドで測定操作を繰り返す。別紙 2 の判定表を使って結果を報告する。

1. 選択された組織領域の 30 個のがん細胞のドットをカウントする。小クラスターが明確であるなら、下記の 4. を参照する。
2. 30 個の細胞のドットの合計数と平均数を計算する。
3. 60 個の細胞の平均に基づいた結果を記録する。
4. シングルドットと小クラスター(いくつかのシングルドットが部分的に重なり合っているクラスター)の混合、または小クラスターのみが観察されるなら、
  - ・ 1 個の小クラスターを 5 ドットとしてカウントする。
  - ・ 同じスライドからの癌や正常上皮細胞からのシングルドットは、何が小クラスターであるかを決める対照として使用される。
5. ヒストラ HER2 CISH キット ガイドラインの下で増幅か非増幅かの診断を得るために、合計 60 個の細胞のカウントの平均として結果を報告する。

#### ・ 結果の報告

特に増幅か非増幅かが明確でない場合、結果は別紙 2 の判定表を使って報告する。HER-2/neu 遺伝子状態はヒストラ HER2 CISH キットのガイドラインに従って報告する。

#### 2. HER-2/neu CISH の結果の評価

表 2: CISH による HER-2/neu 遺伝子状態の評価(別紙 1 に対応)。

CISH による HER-2/neu 遺伝子コピー数は 40× 対物レンズで容易に区別できる。個々の HER-2/neu 遺伝子は滑らかな丸いシングル ドットとして観察できる(図 A, 別紙 1)。増幅していない HER-2/neu 遺伝子を持つがん細胞は典型的に核あたり 1 から 2 ドット(2 倍体, 図 A, 別紙 1)、またはポリソミーの場合で 3 から 5 ドット(図 B, 別紙 1)を表す。増幅している HER-2/neu 遺伝子を持つがん細胞は典型的に大クラスター(図 D, 別紙 1)、複数ドット(図 E, H 別紙 1)、大クラスターと複数ドットの混合(図 F, 別紙 1)、または小クラスターの混合(図 G, 別紙 1)として観察できる。

表 2: HER-2/neu CISH の結果

|      |                                                                                     |
|------|-------------------------------------------------------------------------------------|
| 増幅なし | 測定のために選んだ組織領域内の大部分(>50%)のがん細胞において核あたり HER-2/neu 遺伝子の 1-5 ドット。<br>参照: 図 A, 図 B, 別紙 1 |
|------|-------------------------------------------------------------------------------------|

|    |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |
|----|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 増幅 | <p>高増幅: 測定のために選んだ組織領域内の大部分(&gt;50%)のがん細胞において核あたり HER-2/neu 遺伝子の &gt;10 ドットまたは大クラスターまたは複数ドットと大クラスターの混合。<br/>参照: 図 D, 図 E, 図 F 別紙 1</p> <p>大クラスターは不規則な形状のシグナルで、シングルドットの直径の 5 倍より大きい。同じスライドからのがん細胞や正常上皮細胞からのシングルドットは対照に使用される。<br/>参照: 図 D, 別紙 1</p> <p>低増幅: 測定のために選んだ組織領域内の大部分(&gt;50%)のがん細胞において核あたり HER-2/neu 遺伝子の &gt;5~10 ドット<br/>または小クラスターまたは複数ドットと小クラスターの混合。<br/>参照: 図 G, 図 H, 別紙 1</p> <p>小クラスターは不規則な形状のシグナルで、シングルドットの直径の 3 倍から 5 倍の大きさ。同じスライドからのがん細胞や正常上皮細胞からのシングルドットは対照に使用される。<br/>参照: 図 G, 別紙 1</p> |
|----|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|

#### コントロールスライド

##### ■コントロールスライドの染色性

- ・ CISH シグナルは茶色で明確で容易に評価できる。
- ・ コントロールスライドはスライドガラスにホルマリン固定パラフィン包埋した 2 種類のセルラインが貼り付けてある。コントロールスライドは操作を確かめるためのコントロールとして使用する。セルライン A(MDA-MB-231)は増幅なしで、核あたり HER-2/neu 遺伝子の ≤5 ドットを示す。セルライン B(SK-OV-3)は増幅で、核あたり HER-2/neu 遺伝子の小クラスターから大クラスターを示す。
- ・ コントロールスライドは患者検体の検査毎に行い、組織切片と同様な方法で行なう。
- ・ コントロールスライドで A や B のセルラインが染色されなければ CISH 操作で起こった実験エラーである。
- ・ HER-2/neu 増幅を知られている陽性コントロールセルライン B は全ての試薬が機能していることを示すためにはじめに調べられるべきである。細胞の核内で HER-2/neu 遺伝子のクラスターや >5 ドットの存在は期待された陽性反応を示している。陽性コントロールで、がん細胞の大部分(>50%)の核につきクラスターや >5 ドットの存在を示さなかったならば、患者検体に対して得られている結果は無効であると考えられるべきである。
- ・ HER-2/neu 増幅なしと知られている陰性または正常コントロールセルライン A はそれぞれの細胞の核内で ≤5 ドットを示すべきである。
- ・ 非特異的染色が正常コントロール A の核内で起こるならば患者検体に対して得られている結果は無効であると考えられるべきである。
- ・ 非特異的な染色が起こるならばそれは大抵、拡散した染色を示す。時折、過度にホルマリン固定された組織で、核外のまばらな茶色い染色が見られることがある。これらのケースの結果には注意が必要である。非特異的な染色は陽性 CISH シグナルと混同されるべきではない。

##### ■検体組織コントロールスライドの染色性

- ・ HER-2/neu 増幅ありと知られている乳癌組織より成る陽性組織コントロールは、使用する場合は、がん細胞の大部分(>50%)の核あたり HER-2/neu 遺伝子のクラスターまたは >5 ドットが、観察されるべきである。陽性組織コントロールががん細胞の大部分(>50%)の核あたり HER-2/neu 遺伝子のクラスターまたは >5 ドットが観察されないなら、患者検体に対して得られている結果は無効であると考えられるべきである。
- ・ HER-2/neu 増幅なしと知られている乳癌組織より成る陰性組織コントロールは、使用する場合は、がん細胞の大部分(>50%)の核につき <5 ドットを含むべきである。

- 一般的に陽性組織コントロールの対照物である正常組織（腫瘍中の正常上皮細胞や間質細胞）の核内での2シグナルやドットの存在はプローブや免疫検出試薬が細胞や組織成分と交差反応していないことを示している。
- 非特異的染色が陽性組織コントロールの対照物である正常組織の核内で起こるならば、患者検体に対して得られている結果は無効であると考えべきである。
- 使用者の施設によって組織処理工程や技術的な進行手順が異なるので、結果に変動性が生じる可能性があるとして確認されなければならない。施設内のコントロールの定期的な実行が必要になる。

#### 【臨床的意義】

##### HER-2/neu

HER-2/neu 遺伝子はがん遺伝子のひとつであり、1986年にその配列が決定された<sup>1)</sup>。この遺伝子のコードする産物(HER-2/neu タンパク)はチロシンキナーゼ活性をもつ分子量 185kDa の細胞膜を貫通する受容体型タンパクである。そして、乳癌や胃癌など主に腺癌で高頻度に増幅または過剰発現していることが報告されている<sup>2)</sup>。特に乳がんにおいては、全患者の15～25%において HER-2/neu 遺伝子の増幅と HER-2/neu タンパクの過剰発現が見られ、こういった乳癌患者では予後が不良であると報告されている<sup>3-5)</sup>。このため、HER-2/neu 遺伝子又はそのタンパクを検出することは、臨床経過を予測する上で重要であると考えられる。近年、日本において、この HER-2/neu タンパクに対する抗体治療薬が発売された。この治療薬の適正な治療対象となる患者の選択方法としては、現在、遺伝子の増幅の検出方法として蛍光 in situ ハイブリダイゼーション法(FISH 法)、タンパクの過剰発現の検出方法として免疫組織化学染色法(IHC 法)がある。

本品は HER-2/neu 遺伝子の増幅の検出方法として色素産性 in situ ハイブリダイゼーション法(CISH 法)を用いた CISH 法キットである。この方法はホルマリン固定パラフィン包埋組織切片上(4-5 μm)で、通常のペルオキシダーゼ反応を使用して、光学顕微鏡下で遺伝子増幅、遺伝子転座、染色体数を検出できる。標識 DNA プローブは相補的な核酸に特異的にハイブリダイゼーションすることで可視化される。プローブのハイブリダイゼーションの結果は組織形態と関連して観察できるため、病理医は同時に組織形態と遺伝子異常型を観察できる。CISH 染色の結果は標準的な光学顕微鏡で40×対物レンズを使用して観察できる。DAB シグナルは永久的で長い期間保存できる。

#### 【性能】

校正用の基準物質として設定した 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、光学顕微鏡で観察する。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 シグナルは、明確に区別できることが理想的である。                                |
|           | 5  | 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いかなる色素粒子もなく、かすみがかかっておらず、透明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透明である。                                                                                                                                                                                                                      |
|            | 4  | <ul style="list-style-type: none"> <li>色素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。</li> <li>かすみや色素性の粒子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、プローブシグナルを減弱させたり、評価の妨げになることはない。</li> </ul>                                         |
|            | 3  | <ul style="list-style-type: none"> <li>バックグラウンドに色素粒子が存在するものの、特異的のプローブシグナルより小さく、色素強度が弱い。ハイブリダイゼーションエリア内で色素粒子は非常に弱い色素強度で存在するか、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。</li> <li>かすみがかかったり色素性の粒子が存在していても、プローブシグナルの判断に影響を与えない程度である。</li> </ul>            |
|            | 2  | <ul style="list-style-type: none"> <li>多数のバックグラウンド色素粒子があるが、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(バックグラウンド色素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色素粒子の存在により、プローブシグナルの正確な判読が妨げられている。</li> <li>かすみや色素性の粒子が、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。</li> </ul> |
|            | 1  | <ul style="list-style-type: none"> <li>色素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 シグナルの正確な判読が妨げられている。</li> <li>ハイブリダイゼーションエリア全体がかすみや色素性の粒子で覆われており、プローブの判読が不可能である。</li> </ul>                                                                                 |

| 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 プローブは 17 番染色体対の特定の染色体領域に結合し、免疫検出法によって発色する。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 プローブと同じ大きさの色素を発すれば(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の分裂中期核の80%以上に、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"> <li>・ プローブシグナルは、標的染色体領域のみを発色させ、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。</li> <li>・ 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、プローブのシグナルと混同されないことが必須である。</li> </ul> |
|       | 5  | 間期核や分裂中期核に、非特異的な色素粒子が存在しない。                                                                                                                                                                                                                   |
|       | 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色素粒子が存在する。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判読を妨げない。                                                                                                                                                 |
|       | 3  | <ul style="list-style-type: none"> <li>・ 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色素粒子が存在するが、シグナルの正確な計測や判読を妨げない程度である。</li> <li>・ 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。</li> </ul>                             |
|       | 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色素粒子が存在する。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測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色素粒子が観察される。これらの粒子の存在によりシグナルの計測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の印象を表す。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、すべての結果が下記の測定範囲にあてはまる。

#### 【校正用の基準物質】

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:

がん細胞の大部分(>50%)の核あたり HER-2/neu 遺伝子の1-5ドット。

HER-2/neu 増幅コントロールスライド:

がん細胞の大部分(>50%)の核あたりHER-2/neu 遺伝子のクラスターまたは>5ドット。

#### 【相関性】

本品と既承認品との相関性試験を行い相関性基準に適合していることを確認した。

#### \*[データ]

FISH(Fluorescence *in situ* hybridization)法: **既承認品**

HER-2/neu と 17 番染色体セントロメア領域(CEP17)のシグナルの数を記録して、HER2/CEP17 の比を求める。HER2/CEP17 比が 2 以上(2≤)を FISH 陽性(HER-2/neu 遺伝子増幅)、HER2/CEP17 比が 2 未満(<2)を FISH 陰性(HER-2/neu 遺伝子増幅なし)。

CISH(Chromogenic *in situ* hybridization)法: **本品**

HER-2/neu CISH シグナル数をシグナルの計測と判定方法に従い記録する。CISH 陽性(HER-2/neu 遺伝子増幅)、CISH 陰性(HER-2/neu 遺伝子増幅なし)。

IHC(Immunohistochemistry)法

HER-2/neu タンパク

高レベル過剰発現あり(3+)、低レベル過剰発現あり(2+)、過剰発現なし(0/1+)

(表1) IHC による HER-2/neu タンパク過剰発現と FISH,CISH による HER-2/neu 遺伝子増幅の比較(乳癌)

|         | FISH      |           | CISH      |           |     |
|---------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----|
| IHC スコア | 陰性(%)     | 陽性(%)     | 陰性(%)     | 陽性(%)     | 合計  |
| 0       | 55 (100)  | 0 (0)     | 55 (100)  | 0 (0)     | 55  |
| 1+      | 14 (87.5) | 2 (12.5)  | 14 (87.5) | 2 (12.5)  | 16  |
| 2+      | 4 (23.5)  | 13 (76.5) | 4 (23.5)  | 13 (76.5) | 17  |
| 3+      | 1 (2.7)   | 36 (97.3) | 1 (2.7)   | 36 (97.3) | 37  |
| 合計      | 74        | 51        | 74        | 51        | 125 |

(表2) CISHとFISHによるHER-2/neu 遺伝子増幅の比較(乳癌)

|         | FISH 陽性 | FISH 陰性 | 合計  |
|---------|---------|---------|-----|
| CISH 陽性 | 50      | 1       | 51  |
| CISH 陰性 | 1       | 73      | 74  |
| 合計      | 51      | 74      | 125 |

陽性の一致率 = 98.0% (50 検体 / 51 検体)

陰性の一致率 = 98.6% (73 検体 / 74 検体)

全体一致率 = 98.4% (123 検体 / 125 検体)

(表3) CISHとFISHによるHER-2/neu 遺伝子増幅の不一致例(乳癌)

| 症例 | HER2 IHC score | HER2 遺伝子コピー数の平均 (FISH) | HER2: CEP17 比 (FISH) | HER2 遺伝子コピー数の平均 (CISH) | 不一致の説明                |
|----|----------------|------------------------|----------------------|------------------------|-----------------------|
| 1  | 2+             | 6.42                   | 1.12                 | 8.4                    | ポリソミーの存在に起因する不一致      |
| 2  | 2+             | 5.45                   | 2.02                 | 4.5                    | HER2 遺伝子増幅境界域に起因する不一致 |

(表4) ポリソミーケースに関する CISHとFISH による HER-2/neu 遺伝子増幅の比較(乳癌)、ポリソミーケースはがん細胞の少なくとも 10%で≥3 の CEP17 シグナルと定義した。

|         | FISH 陽性 | FISH 陰性 | 合計 |
|---------|---------|---------|----|
| CISH 陽性 | 25      | 1       | 26 |
| CISH 陰性 | 0       | 24      | 24 |
| 合計      | 25      | 25      | 50 |

陽性の一致率 = 100% (25 検体 / 25 検体)

陰性の一致率 = 96% (24 検体 / 25 検体)

全体一致率 = 98% (49 検体 / 50 検体)

(表5) IHC による HER-2/neu タンパク過剰発現と FISH,CISH による HER-2/neu 遺伝子増幅の比較(胃癌)

| IHC スコア | FISH       |           | CISH      |           | 合計  |
|---------|------------|-----------|-----------|-----------|-----|
|         | 陰性(%)      | 陽性(%)     | 陰性(%)     | 陽性(%)     |     |
| 0       | 139 (99.3) | 1 (0.7)   | 139(99.3) | 1 (0.7)   | 140 |
| 1+      | 7 (87.5)   | 1 (12.5)  | 6 (75)    | 2 (25)    | 8   |
| 2+      | 2 (15.4)   | 11 (84.6) | 1 (7.7)   | 12 (92.3) | 13  |
| 3+      | 0 (0)      | 37 (100)  | 0 (0)     | 37 (100)  | 37  |
| 合計      | 148        | 50        | 146       | 52        | 198 |

(表6) CISHとFISH による HER-2/neu 遺伝子増幅の比較(胃癌)

|         | FISH 陽性 | FISH 陰性 | 合計  |
|---------|---------|---------|-----|
| CISH 陽性 | 50      | 2       | 52  |
| CISH 陰性 | 0       | 146     | 146 |
| 合計      | 50      | 148     | 198 |

陽性の一致率 = 100% (50 検体 / 50 検体)

陰性の一致率 = 98.6% (146 検体 / 148 検体)

全体一致率 = 99% (196 検体 / 198 検体)

(表7) CISHとFISHによるHER-2/neu 遺伝子増幅の不一致例(胃癌)

| 症例 | HER2 IHC score | HER2 遺伝子コピー数の平均 (FISH) | HER2: CEP17 比 (FISH) | HER2 遺伝子コピー数の平均 (CISH) | 不一致の説明                |
|----|----------------|------------------------|----------------------|------------------------|-----------------------|
| 1  | 2+             | 5.65                   | 1.55                 | 5.2                    | ポリソミーの存在に起因する不一致      |
| 2  | 1+             | 3.75                   | 1.97                 | 5.1                    | HER2 遺伝子増幅境界域に起因する不一致 |

(表8) ポリソミーケースに関する CISHとFISH による HER-2/neu 遺伝子増幅の比較(胃癌)、ポリソミーケースはがん細胞の少なくとも 10%で≥3 の CEP17 シグナルと定義した。

|         | FISH 陽性 | FISH 陰性 | 合計 |
|---------|---------|---------|----|
| CISH 陽性 | 32      | 1       | 33 |
| CISH 陰性 | 0       | 21      | 21 |
| 合計      | 32      | 22      | 54 |

陽性の一致率 = 100% (32 検体 / 32 検体)

陰性の一致率 = 95.5% (21 検体 / 22 検体)

全体一致率 = 98.1% (53 検体 / 54 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】**

- (1) 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があるものとして扱い、特段の注意で処理、管理すること。
- (2) 試薬を口で吸引してはいけません。
- (3) 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℃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。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 CISH 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、インキュベーターのみを使う。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) プローブ溶液以外の試薬は使用前に常温に戻して使用すること。プローブ溶液は常温に戻さないで、冷えた状態でも使用可能。
- (5) 染色中は、検体組織が乾かないよう注意し、必要に応じて湿潤箱を用いること。
- (6) 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ません。
- (7) 指定している温度や状態以外で試薬を使用、保存はしてはいけません。
- (8) 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。
- (9) 有効期限を過ぎた試薬は使用してはいけません。
- (10) 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。
- (11) 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。
- (12) 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。
- (13) 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。
- (14) 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。
- (15) 目や皮膚に接触を避けるために適切な保護具をつける。
- (16) 3,3'-ジアミノベンジジン・4HCL は変異原性、皮膚、呼吸器刺激性があるので吸入、皮膚接触は避ける。
- (17) ヘマトキシリン溶液には抱水クロラルが含まれている。抱水クロラルは眼、鼻、喉、皮膚刺激性があるので、ヘマトキシリン溶液の吸引、皮膚接触は避ける。
- (18) キットの構成試薬は個別に補充する場合がある。

**【貯蔵方法・有効期限】**

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

**【包装単位】**

10 回用

**【主要文献】**

- 1) Yamamoto, T., Ikawa, S., Akiyama, T. et al. : Similarity of protein encoded by the human c-erb-B-2 gene to epidermal growth factor receptor. Nature. 1986 ; 319 : 230-234.
- 2) Yokota, J., Yamamoto, T., Toyoshima, K. et al. : Amplification of c-erbB-2 oncogene in human adenocarcinomas in vivo. Lancet. 1986 ; 1 : 765-767.
- 3) Slamon, D.J., Clark, G.M., Wong, S.G. et al. : Human breast cancer : correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. Science. 1987 ; 235 : 177-182.
- 4) Seshadri, R., Fargnoli, F.A., Horsfall, D.J. et al. : Clinical significance of HER-2/neu oncogene amplification in primary breast cancer. J Clin Oncol. 1993 ; 11 : 1936-1942.
- 5) Ross, J.S., Fletcher, J.A. : The HER-2/neu oncogene in breast cancer: prognostic factor, predictive factor, and target for therapy. Stem Cells. 1998 ; 16 : 413-428.

**【問い合わせ先】**

株式会社 常光 菊川工場 薬事品質保証課  
TEL0537-36-1644 FAX0537-36-2185  
〒439-0037 静岡県菊川市西方 154

**【製造販売元】**

株式会社 常光  
TEL0537-36-1644 FAX0537-36-2185  
〒439-0037 静岡県菊川市西方 154