この添付文書をよく読んでから使用してください。
また、必要時に読めるように保管しておいてください。

体外診断用医薬品　　** 2022 年 9 月改訂（第 3 版）
＊2021 年 11 月作成（第 2 版）

製造販売承認番号：30300EZX00043000

HER-2 遺伝子キット

ベンタナ DISH HER2 キット

【全般的な注意】

1. 本品は体外診断用であり、それ以外の目的には使用しないでください。
2. 本品を唾液腺癌患者へのトラスツズマブ（遺伝子組み換え）の適応を判定するための補助として用いる場合には、当該薬剤の本邦における最新の添付文書を参照のうえ使用してください。
3. 染色結果に基づく臨床診断は、臨床症状やほかの検査結果などと併せて、担当医師が総合的に判断してください。
4. 添付文書に記載された使用目的及び用法・用量に従って使用してください。記載された使用目的及び用法・用量以外での使用については、測定結果の信頼性を保証しかねます。
5. 使用する機器の添付文書及び取扱説明書をよく読み、記載に従って使用してください。
6. ご使用の際にはプロトコールを最適化する必要があります。ご施設にてバリデーションを実施してからご使用ください。

【形状・構造等（キットの構成）】

構成試薬	成分	分量
ベンタナ HER2 DNA カクテルプローブ※		30 テスト
HER2 DNA カクテルプローブ	1) ジニトロフェノール標識 HER2 DNA プローブ （HER2 プローブ） 2) ジゴキシゲニン標識 Chr17 DNA プローブ （Chr17 プローブ）	6 mL
ベンタナ Silver ISH DNP キット※		60 テスト
HQ 標識 抗 DNP 抗体	ヒドロキシキノキサリン標識抗ジニトロフェノールマウスモノクローナル抗体	6 mL
HRP 標識 抗 HQ 抗体	ペルオキシダーゼ標識抗ヒドロキシキノキサリンマウスモノクローナル抗体	6 mL
発色試薬 A	酢酸銀	12 mL
発色試薬 B	ハイドロキノン	6 mL
発色試薬 C	過酸化水素	6 mL
ベンタナ Red ISH DIG キット※		60 テスト
NP 標識 抗 DIG 抗体	ニトロピラゾール標識抗ジゴキシゲニンマウスモノクローナル抗体	6 mL
AP 標識 抗 NP 抗体	アルカリフォスファターゼ標識抗ニトロピラゾールマウスモノクローナル抗体	6 mL
pHエンハンサー 試薬	塩化マグネシウム	12 mL
Naphthol 試薬	ナフトール AS-TR	6 mL
Fast Red 試薬	ファストレッド KL 塩	12 mL

※ベンタナ HER2 DNA カクテルプローブ（商品コード：114800）、ベンタナ Silver ISH DNP キット（商品コード：114817）及びベンタナ Red ISH DIG キット（商品コード：114824）はそれぞれ個別包装ですので、組み合わせてご使用ください。

【使用目的】

1. 乳癌又は胃癌の組織又は細胞中の HER2 遺伝子増幅度の測定（悪性腫瘍の診断補助等）
2. がん組織又は細胞中の HER2 遺伝子増幅度の測定（トラスツズマブ（遺伝子組換え）の唾液腺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】

本品は、CISH（Chromogenic *in situ* hybridization）法とSISH（Silver *in situ* hybridization）法を組み合わせたDISH（Dual Color *in situ* hybridization）法により、ヒト乳癌又は胃癌の組織又は細胞中のHER2遺伝子増幅を測定します。検体スライド上のHER2遺伝子（HER2）及び第17番染色体のセントロメア（Chr17）に、ジニトロフェノール標識HER2 DNAプローブ（HER2プローブ）とジゴキシゲニン標識Chr17 DNAプローブ（Chr17プローブ）を同時にハイブリダイゼーションさせます。

次に、ヒドロキシキノキサリン標識抗ジニトロフェノールマウスモノクローナル抗体（HQ標識抗DNP抗体）とペルオキシダーゼ標識抗ヒドロキシキノキサリンマウスモノクローナル抗体（HRP標識抗HQ抗体）を反応させると、検体スライド上にHER2プローブ－HQ標識抗DNP抗体－HRP標識抗HQ抗体の結合物が形成されます。この結合物に酢酸銀、ハイドロキノン及び過酸化水素を添加すると、酵素反応により黒色のシグナル（HER2シグナル）が生じます。

続いてニトロピラゾール標識抗ジゴキシゲニンマウスモノクローナル抗体（NP標識抗DIG抗体）とアルカリフォスファターゼ標識抗ニトロピラゾールマウスモノクローナル抗体（AP標識抗NP抗体）を反応させると、Chr17プローブ－NP標識抗DIG抗体－AP標識抗NP抗体の結合物が形成されます。この結合物に塩化マグネシウム、ナフトールAS-TR 及びファストレッドKL塩を添加すると、酵素反応により赤色のシグナル（Chr17シグナル）を生じます。

光学顕微鏡により鏡検を行い、所定数の細胞核における黒色のシグナル（HER2シグナル）と赤色のシグナル（Chr17シグナル）を計測します。計測したChr17シグナル総数に対するHER2シグナル総数の比（以下、HER2／Chr17比）を算出し、HER2遺伝子の増幅を判定します。

【操作上の注意】

1. 検体にはホルマリン固定パラフィン包埋ブロックを使用してください。
2. 検体は採取後速やかに固定してください [1,2]。固定液は 10％中性緩衝ホルマリンの使用を推奨します。検体の 15～20 倍量の固定液 [3]を用いて、15～25℃にて少なくとも 6 時間固定してください [2～6]。
3. 採取後固定液に入れるまでの時間が 1 時間以上、固定液に浸漬している時間が 72 時間以上経過した場合や、固定不良等の病理標本作成過程における不適切な操作が染色不良の原因となりうることから、じゅうぶんに注意してください。
4. 検体となる切片は 4μm に薄切し、シラン等がコートされたスライドガラスに貼り付け、薄切後は速やかに染色を実施してください。また、使用するスライドガラスは、製造後なるべく新しいものを使用してください。
5. 本品は、既に適切な濃度に希釈されているので、希釈せずにそのまま使用してください。希釈して使用するとじゅうぶんな染色結果が得られないことがあります。
6. 染色を行う場合には、同時に精度管理用コントロールスライドの染色を行い、染色操作が適切に行われていることを確認することが推奨されます。
7. 使用する封入剤によって、シグナルの退色などが生じる場合があります。詳細は弊社作成の『HER2 検査ガイド』を参照してください。

【用法・用量（操作方法）】

1. **別途必要な器具・器材・試薬・自動分析装置など**
   - ベンタナ XT システム　ベンチマークモジュール XT
   - ベンタナ　ベンチマーク ULTRA
   - ベンタナ　ベンチマーク GX
   - **・ベンチマーク ULTRA PLUS
   - スライドバーコードラベル
   - ハイブレディ
   - ISH プロテアーゼ 3

・ *ultra*View Silver Wash II バッファー
・ 液体カバースリップ HI 又は液体カバースリップ ULTRA
・ EZ バッファー
・ リアクションバッファー
・ SSC バッファー
・ CC1 バッファー又は CC1 バッファー ULTRA
・ CC2 バッファー又は CC2 バッファー ULTRA
・ ヘマトキシリン核染色試薬 II
・ 炭酸リチウム試薬
・ 精製水又は脱イオン水
・ 染色用バット、染色かご
・ 中性洗剤(液体カバースリップ洗浄用)
・ キシレン
・ カバーガラス、封入剤
・ 光学顕微鏡
・ 精度管理用コントロールスライド
(商品コード:109530 HER2 Dual ISH 3 in 1 コントロールスライド又は自家製精度管理用コントロールスライド)

2. 試薬の調製方法

(1) 初回使用時の試薬本品の外箱、又はラベルに付いている登録ボタン又は二次元バーコードを機器付属の専用ツールで読み取り、装置に登録します。

(2) 各キットはベンチマーク専用の試薬です。ディスペンサー試薬は開封時にシッピングキーを外し、希釈せずにそのまま使用します。

(3) 精製水又は脱イオン水で EZ バッファー及びリアクションバッファーは 10 倍、SCC バッファーは 5 倍に希釈し、自動染色装置へ充填します。

(4) 液体カバースリップ、CC1 バッファー、CC2 バッファー、*ultra*View Silver Wash II バッファーは希釈せず、そのまま自動染色装置へ充填します。

(5) 測定に使用する試薬を希釈する際は、臨床検査標準協会が定めた、臨床検査室試薬用水(CLRW)の規格(生菌数:10cfu/mL 以下、比抵抗値:10MΩ/cm 以上、粒子状物質:0.22μm 濾過、TOC:500ppb)に準じた水をご使用ください。また、微生物のコンタミネーションを避けるために、下記の点にご留意ください。
・ 汲み置きの水は避ける、または UV 滅菌装置付きのタンクを使用する。
・ UV による滅菌が組み込まれている純水製造装置を使用する。
・ 微粒子を取り除くフィルターが組み込まれている純水製造装置を使用する。

3. スライド標本の準備

(1) 薄切する切片の厚さは 4μm を推奨します。
切片が 4μm よりも厚い場合、プロテアーゼ処理が十分でないことによるシグナル不良や脱パラフィン不十分による核内への空胞が認められることがあります。

(2) 適切な方法により固定、包埋した検体を薄切し、シラン等がコートされたスライドガラスに貼り付けます。

(3) 薄切後、スライド標本は約 40℃で一晩乾燥させることを推奨します。高温での乾燥は、60℃で 30 分間以内の処理を推奨します。長時間、高温に置くことは避けてください。

(4) 自家製精度管理用コントロールスライドを用いる場合には、スライド標本と同様の手順で作成します。

(5) バーコードラベルプリンターより、染色プロトコール認識用バーコードラベルを印刷し、スライドガラスのフロスト部分に貼付します。

(6) 透明なフラップがしわにならないように注意して貼付してください。

(7) バーコードラベルは、スライドガラスのフロスト部分の上端に合せて、左右からはみ出さないように貼ります。このとき、ラベルのロット部分が浮き上がらないように、しっかり押さえてください。

(8) 一度はがしたラベルは粘着力が弱まるため、ラベルを貼りなおす場合は、別途作成しなおしてください。また、ラベルの重ね貼りは避けてください。

**4. 染色プロトコールの設定

本品は自動免疫染色装置「ベンタナ XT システム ベンチマークモジュール XT」、「ベンタナ ベンチマーク ULTRA」、「ベンチマーク ULTRA PLUS」又は「ベンタナ ベンチマーク GX」を用いて操作をします。それぞれ以下のプロシージャ及び推奨染色条件を参考にしてください。

**表 1. 各機種におけるプロシージャ名

機種名	プロシージャ名
ベンタナ ベンチマーク GX	GX VENTANA HER2 DISH DNA PRB CKT
ベンタナ XT システム ベンチマークモジュール XT	XT VENTANA HER2 DISH DNA PRB CKT
ベンタナ ベンチマーク ULTRA ベンチマーク ULTRA PLUS	U VENTANA HER2 DISH DNA PRB CKT

**表 2.推奨染色条件

染色条件	乳癌/唾液腺癌	胃癌
Baking (ベーキング)	Not selected	Not selected
Cell Conditioning 1 (熱処理 1)	16 min	16 min
Cell Conditioning 2 (熱処理 2)	24 min	16 min
ISH Protease 3 (酵素処理)	20 min	16 min
Stringency Wash Temperature	76℃※1	76℃※1
	74℃※2	74℃※2

※1 ベンタナ ベンチマーク GX/ベンタナ XT システム ベンチマークモジュール XT

**※2 ベンタナ ベンチマーク ULTRA/ベンチマーク ULTRA PLUS

固定条件や検体処理方法などによって、最適な染色条件は異なるため、熱処理の処理時間や酵素処理の反応時間を検体の状況によって調整することが推奨されます。

5. 測定(操作)方法

本品は自動免疫染色装置を用いて操作を行います。
代表的な自動免疫装置である「ベンタナ ベンチマーク ULTRA」を使用した場合の全自動の操作方法は、以下のとおりです。(詳しくは自動免疫染色装置の取扱説明書を参照してください。)

(1) 染色モジュール、PC、E-bar システムの順に電源を入れます。

(2) Windows 画面から VSS ソフトウエアを立ち上げます。

(3) Instrument View を表示し、画面右下の Ready モードボタンをクリックします。

(4) 装置の取扱説明書に従ってプロトコールを作成し、ソフトウエアに保存します。

(5) 廃液タンクの液量を確認し、必要に応じて適切な方法で廃棄します(施設の廃棄基準を順守してください)。

(6) バーコードラベルを印字し、検体スライドに貼り付けます。

(7) 必要な試薬を染色モジュールにセットします。このとき、試薬の液量や試薬ディスペンサーキャップがすべて外されていることを確認します。また、ノズルの流路を塞ぐ大きな気泡や析出物等がないことを確認し、析出物があれば金属以外の細いピンで除去してください。大きな気泡が確認された場合には、弊社カスタマーソリューションセンターへご連絡ください。

(8) 検体スライドを染色モジュールにセットし、スライドドローワーと試薬フードを閉めます。

(9) 染色モジュールにあらかじめセットされているバッファー類の量がじゅうぶんにあること(容器の半分以上)を確認し、Prime を 2 回実施します。
Prime 操作:Instrument View の画面左下のメンテナンスボタンをクリックします。Function Tests → Test → Prime ULTRA の順に選択し、Run をクリックすると Prime が開始されます。

(10) Prime が終了したら Running モードボタンをクリックし、染色開始確認のポップアップ画面の Yes をクリックします。試薬

と検体スライドのバーコードを読み取り後、染色処理が開始されます。

脱パラフィン操作及び前処理

① 検体スライドを加熱してパラフィンを溶解し、その後 EZ バッファーで洗浄することにより脱パラフィンが行われます。
② 検体スライドは CC1 バッファーULTRA および CC2 バッファー ULTRA により設定された条件で熱処理が行われます。
③ 洗浄が行われます。
④ 検体スライド上に ISH プロテアーゼ 3 を 1 滴加え設定された条件で酵素処理が行われます。

プローブのハイブリダイゼーション及び検出

① 検体スライド上にハイブレディ(別売)を 3 滴加え、50℃で 4 分間反応します。
② 検体スライド上に HER2 DNA カクテルプローブを 2 滴加え、50℃で 8 分間反応します。そのまま 80℃で 8 分間 DNA を変性させ、44℃で 60 分間反応します。
③ 検体スライドは SSC バッファーにより設定温度で 24 分間洗浄します。
④ 検体スライドを洗浄後、HQ 標識抗 DNP 抗体を 1 滴加え、36℃で 16 分間反応します。
⑤ 検体スライドを洗浄後、HRP 標識抗 HQ 抗体を 1 滴加え、36℃で 24 分間反応します。
⑥ 検体スライドを洗浄後、発色試薬 A を 1 滴加え 36℃で 4 分間、再度発色試薬 A を 1 滴加え 36℃で 4 分間、発色試薬 B を 1 滴加え 36℃で 4 分間、発色試薬 C を 1 滴加え 36℃で 8 分間反応します。
⑦ 検体スライドを洗浄します。
⑧ 検体スライドを洗浄後、NP 標識抗 DIG 抗体を 1 滴加え、36℃で 16 分間反応します。
⑨検体スライドを洗浄後、AP 標識抗 NP 抗体を 1 滴加え、36℃で 20 分間反応します。
⑩ 検体スライドを洗浄後、pH エンハンサー試薬を 1 滴加え 36℃で 8 分間、Naphthol 試薬を 1 滴加え 36℃で 4 分間、Fast Red 試薬を 1 滴加え 36℃で 4 分間、再度 Fast Red 試薬を 1 滴加え 36℃で 4 分間反応します。
⑪ 検体スライド上を洗浄します。

対比染色

① 検体スライド上にヘマトキシリン核染色試薬Ⅱを 1 滴加え、36℃で 8 分間反応します。
② 検体スライドを洗浄後、色だし試薬を 1 滴加え、36℃で 8 分間反応します。その後、洗浄します。

(11) 染色が終了したら、自動免疫染色装置から検体スライドを取り出し、EZ バッファーもしくは中性洗剤入りの水溶液でじゅうぶんに洗浄します(推奨 2 回)。その後、精製水又は脱イオン水で水洗します(推奨 3 回)。40～60℃で 1 時間以内もしくは室温放置し、完全に乾燥させます。乾燥後、1 枚毎に新鮮なキシレンに素早く(1dip～30 秒以内)浸漬し、適切な封入剤を用いて封入します。

検体スライドの取り出しから封入までの注意事項

・検体上に液体カバースリップ(LCS)が残っていると標本観察の妨げとなることがあるので、EZ バッファーもしくは中性洗剤入りの水溶液でじゅうぶんに洗浄し、除去してください。水洗終了後に、LCS が水面に浮かばないことを確認してください。
・水洗時においても水道水の使用は、シグナルや核染色の退色の原因となるため、使用しないでください。
・アルコールは赤シグナルの退色原因となるため、使用しないでください。
・検体上に水分が残っていると赤シグナルのにじみや、針状結晶の原因となるため、完全に乾燥させてください。また、封入直前に浸漬するキシレンは新しいキシレンをご使用ください。
・使用する封入剤によって、シグナルの退色を生じる場合があります。適切な封入剤をご使用ください。

【測定結果の判定法】

光学顕微鏡により鏡検を行います。HER2 は黒色のシグナルとして、Chr17 は赤色のシグナルとして染色されます。シグナルの観察には、対物レンズ 20 倍、40 倍又は 60 倍を使用してください(100 倍は推奨されません)。

シグナルの計測方法の詳細を表 3 に示します。合わせて、弊社作成の『HER2 検査ガイド』を参照してください。

はじめに、検体スライドのインターナルコントロールの染色性を確認し、適切に染色されたことを確認してください。同時に精度管理用コントロールスライドを測定している場合は、その染色性も確認してください。不適切な染色結果が認められた検体スライドについては、再度染色を実施してください。

1. 計測方法

20 個の腫瘍細胞について各々の核における HER2 シグナルと Chr17 シグナルの数を計測します。

(1) スライドの妥当性

本品で染色されたスライドを評価するためには、次の 3 つの基準を満たしている必要があります。患者検体スライドがこれらの基準を 1 つでも満たさない場合、評価しないでください。不適切な染色結果が認められた検体スライドについては、再度、染色を実施します。

インターナルコントロール

検体スライド内の正常細胞(間質線維芽細胞、血管内皮細胞、リンパ球、非腫瘍上皮細胞を含むさまざまな非腫瘍細胞)が、適切に染色されているかどうかを確認します。正しく染色されている場合、各細胞での 1～2 コピーの HER2 及び Chr17 のシグナルが認められます。

腫瘍細胞

腫瘍細胞に計測可能な HER2 及び Chr17 シグナルが存在することを確認します。シグナルの観察には、対物レンズ 20 倍、40 倍又は 60 倍を使用してください。(100 倍は推奨されません。)

バックグラウンド

バックグラウンド染色が HER2 又は Chr17 シグナルの計測に影響しないことを確認します。黒いバックグラウンド染色は、特異的な HER2 シグナルと区別できる程度の細かい「ダスト」として認められることがあります。赤いバックグラウンド染色は、赤いかすみ状として表示されるか、まれに特異的なシグナルと比較して弱い非特異的なシグナル様の染色が認められることがあります。

(2) 計測領域

浸潤性乳癌及び胃癌のシグナル計測には、HER2 及び Chr17 シグナルの両方が認められるエリアを選択してください。シグナルの計測は弱いシグナルの細胞、圧縮された核又は重なり合った核、壊死を含む領域では行わないでください。任意のエリアが計測に不適切な場合でも、同じスライド上で計測に適したエリアが他にもある場合もあります。そのエリアで計測を行って良いがどうかは、腫瘍細胞内又は腫瘍に隣接する正常細胞に HER2 及び Chr17 シグナルが正しく認められることを確認してください。

(3) 計測に適した細胞

腫瘍細胞について、極端に大きい又は小さい核については計測対象としないでください。重なり合っている核、赤もしくは黒のどちらか一方のみしか存在しない核、非特異的な染色がシグナル計測に影響を与えている核は評価対象としないでください。赤シグナルと黒シグナルが重なっていて高倍率で観察しても両者が鑑別できない場合には、計測しないでください。核内に著しい空胞が認められ、シグナルの観察に影響を与えている核は計測対象としないでください。

(4) シグナルの見え方

単一のシグナル

個々に識別可能な黒い点は一つずつ HER2 シグナルとして数えます。その際、正常細胞におけるシグナルを参照してシグナルの一つ分の大きさを確認してください。赤い点も同様に、一つずつ Chr17 シグナルとして数えます。赤シグナルは発色色素の影響により、黒シグナルよりも大きい場合があります。赤いかすみのような薄い染色が認められる場合がありますが、非常に弱いシグナルは計測しないようにして

ください。

クラスター

個々に識別できない多数の点が重複したシグナルは、一つの塊として“クラスター”と定義されます。便宜的に、小さなクラスターを単一シグナル 6 個分、大きなクラスターをシグナル 12 個分として数えます。その際、正常細胞における単一シグナルの大きさを参考にしてください。

2. 計測上の注意

シグナルに加えて、以下の内容は報告書に記載することが推奨されます。

(1) 不均一性(ヘテロジェナイティ)

同一切片上で、HRE2 遺伝子コピー数が大きく異なる領域が混在(増幅を認めるエリアと非増幅のエリアなど)する場合があります。この場合、なるべく HER2 コピー数の多い領域を選んで評価し、シグナル比に加えて、不均一性(ヘテロジェナイティ)が認められたことを報告することが推奨されます。

(2) 異数性(ポリソミー又はモノソミー)

17 番染色体は通常 1 対であるため、Chr17 シグナルは 2 コピー(薄切の影響で 0-1 コピーに見えることもある)ですが、ポリソミーの場合には一つの細胞中に 3 つ以上のシグナルが認められます [6]。また、モノソミーの場合にはすべての細胞で Chr17 シグナルが 1 つ以下となります。Chr17 のシグナル数の増減はシグナル比に影響を与えるため、シグナル比に加えてポリソミーもしくはモノソミーであることを報告することが推奨されます。特に、HER2 シグナルのクラスターに加えて Chr17 シグナルもクラスターを形成している場合、本来は「HER2 増幅あり」と判定されるべきですが、シグナル比だけで見ると 1.0 以下になることがあります。このような症例では、タンパク過剰現象が認められることが多いため、Chr17 シグナルのクラスターが認められた場合には、免疫組織化学染色の結果もあわせて参照することが推奨されます。

(3) モノアレル

HER2 遺伝子がすべての細胞において 1 つ以下の場合、モノアレルであることが疑われます。この場合、シグナル比は 1.0 以下になります。

3. シグナル比の算出及び判定法

計測した HER2 シグナル総数及び Chr17 シグナル総数から HER2／Chr17 比を算出し、以下のとおり判定します。

- HER2/Chr17 比≧2.0 ： 増幅あり
- HER2/Chr17 比＜2.0 ： 増幅なし

20 個の腫瘍細胞で計測した HER2/Chr17 比が 1.8～2.2 になった場合には、さらに別の 20 細胞で各シグナルを計測し、40 細胞での HER2/Chr17 比を算出し、判定に用いることが望ましいです。なお、シグナル比の判定については、病理学会が定める検査ガイド等 [7]もございますので、各施設にて専門医とご相談の上、ご判断ください。

4. 判定上の注意

(1) 不適切な染色結果のトラブルシューティングの詳細は弊社作成の『HER2 検査ガイド』を参照してください。

(2) 染色結果の判定にあたって、不均一性(ヘテロジェナイティ)や異数性(ポリソミー又はモノソミー)などを認めた場合は注意が必要です。詳細は弊社作成の『HER2 検査ガイド』を参照してください。

【臨床的意義】

HER2(別名 HER2/neu 又は c-erbB-2)遺伝子は、チロシンキナーゼ活性を持つ受容体型の膜貫通型タンパクをコードしており、細胞増殖、分化などに関与しています [8～10]。HER2 遺伝子増幅及びタンパク過剰発現は乳癌の 15～20%に認められており、予後不良であることがわかっています [10,11]。また、胃癌については ToGA 試験において 21.3%に HER2 遺伝子増幅およびタンパク過剰発現が認められたと報告されています [12]。本品による HER2 遺伝子増幅の測定はトラスツズマブ(遺伝子組換え)をはじめとする抗 HER2 薬の適応を判断するための指標として使用可能です。

また、本品による HER2 遺伝子増幅の測定は唾液腺癌患者へのトラスツズマブ(遺伝子組換え)の適応を判定することを目的として用います。唾液腺癌に対するトラスツズマブ(遺伝子組換え)の有効性及び安全性を評価した国内第Ⅱ相試験(HUON-003-01 試験)において、DISH 法陽性とされた被験者 11 例のうち、奏効例は 6 例(54.5%)でした。当該 DISH 法と本品は唾液腺癌患者の検体を用いた同等性試験に基づき同等の性能を有することが確認されています。

【性能】

1. 性能

【用法・用量(操作方法)】の記載に従い試験を行った場合、下記の規格値に適合します。

出荷試験用陽性及び陰性コントロールスライドにおいて、それぞれ以下の結果が得られます。

出荷試験用陽性コントロールスライド

1) 測定する領域周辺の正常細胞が適切に染色されている。
2) HER2 シグナル及び Chr17 シグナルの強度が適切である。
3) 1 細胞あたりの HER2 シグナル数の平均が 7～100 の範囲内であり、かつ Chr17 シグナル数の平均が 1～3 の範囲内である。
4) バックグラウンドが適切に染色されている。

出荷試験用陰性コントロールスライド

1) 測定する領域周辺の正常細胞が適切に染色されている。
2) HER2 シグナル及び Chr17 シグナルの強度が適切である。
3) 1 細胞あたりの HER2 シグナル数の平均が 1～3 の範囲内であり、かつ Chr17 シグナル数の平均が 1～3 の範囲内である。
4) バックグラウンドが適切に染色されている。

2. 乳癌における相関性試験成績

(1) 本品と弊社既承認品との相関性を検討した結果、全体一致率は 99.2%でした。

		弊社既承認品		計
		増幅あり	増幅なし	
本品	増幅あり	56 例	0 例	56 例
	増幅なし	1 例	62 例	63 例
計		57 例	62 例	119 例

全体一致率 ： 99.2% (95% CI:95.4 - 99.9%)
陽性一致率 ： 98.2% (95% CI:90.7 - 99.7%)
陰性一致率 ： 100% (95% CI:94.2 - 100%)

乖離した 1 例は、増幅/非増幅の境界付近の検体でした。

(2) 本品と既承認品(A 社 FISH 法)との相関性を検討した結果、全体一致率は 92.7%でした。

		既承認品		計
		増幅あり	増幅なし	
本品	増幅あり	270 例	12 例	282 例
	増幅なし	32 例	291 例	323 例
計		302 例	303 例	605 例

全体一致率: 92.7 % (95% CI:90.4 - 94.5 %)
陽性一致率: 89.4 % (95% CI:85.4 - 92.4 %)
陰性一致率: 96.0 % (95% CI:93.2 - 97.7 %)

乖離した 44 例の主な乖離原因として、増幅/非増幅の境界付近の検体であったこと、検体の不均一性が考えられました。

3. 胃癌における相関性試験成績

(1) 本品と弊社既承認品との相関性を検討した結果、全体一致率は 96.6%でした。

		弊社既承認品		計
		増幅あり	増幅なし	
本品	増幅あり	43 例	1 例	44 例
	増幅なし	3 例	72 例	75 例
計		46 例	73 例	119 例

全体一致率 ： 96.6% (95% CI:91.7 - 98.7%)
陽性一致率 ： 93.5% (95% CI:82.5 - 97.8%)
陰性一致率 ： 98.6% (95% CI:92.6 - 99.8%)

乖離した 4 例は、いずれも増幅/非増幅の境界付近の検体でした。

(2) 本品と既承認品(A 社 FISH 法)との相関性を検討したところ、全体一致率は 90.8%でした。

		既承認品		計
		増幅あり	増幅なし	
本品	増幅あり	37 例	7 例	44 例
	増幅なし	4 例	71 例	75 例
計		41 例	78 例	119 例

全体一致率 :90.8% (95% CI:84.2 – 94.8%)
陽性一致率 :90.2% (95% CI:77.5 – 96.1%)
陰性一致率 :91.0% (95% CI:82.6 – 95.6%)

乖離した 11 例の主な乖離原因として、増幅/非増幅の境界付近の検体であったこと、シグナルの計測方法に起因すること、対照法の偽陽性が考えられました。

【使用上又は取扱い上の注意】

1. **取扱い上(危険防止)の注意**
   (1) 検体スライドや試薬を取り扱っている間は、使い捨ての手袋を着用することを推奨します。
   (2) 検体スライドや試薬を取り扱っている場所での喫煙・飲食は避けてください。
   (3) 検体スライドは、感染性のあるものとして取り扱い、適切な予防措置をとってください。
   (4) 試薬、検体スライドが皮膚や粘膜に直接接触しないようにしてください。
   (5) 試薬がこぼれたり、漏れたりした場合は、消毒剤及び洗浄剤できれいに拭き取ってください。
   (6) 試薬が誤って目や口に入ったり、皮膚に付着した場合、水でじゅうぶんに洗い流すなどの応急措置を行い、必要があれば医師の手当てなどを受けてください。
   (7) 冷凍保存した本品は使用しないでください。冷凍保存した本品を使用するとじゅうぶんな染色結果が得られない場合があります。
2. **使用上の注意**
   (1) 本品は、既に適切な濃度に希釈されているので、希釈せずにそのまま使用してください。希釈して使用するとじゅうぶんな染色結果が得られない場合があります。
   (2) 染色を行う場合には、同時に精度管理用コントロールスライドの染色を行い、染色操作が適切に行われていることを確認することが推奨されます。
   (3) 試薬は必ず貯蔵方法に従って保存し、凍結など指定の条件以外で保存したものや使用期限を過ぎたものは使用しないでください。
   (4) 試薬を装置にセットする場合は、必ずキャップとストッパーを外してからセットしてください。
   (5) 使用後の試薬は、できるだけ速やかにキャップをはめて冷蔵庫に保管してください。
   (6) 試薬の注ぎ足しは行わないでください。
   (7) 安定した染色性を維持するために、定期的なメンテナンスを推奨します。詳しくは自動染色装置の取扱説明書を参照してください。
   (8) 使用する精製水の水質により染色不良が生じる場合がありますのでご注意ください。
3. **廃棄上の注意**
   廃棄にあたっては、各施設の内部規則及び各地域により規定されている水質汚濁防止法などの規則に留意して処理してください。

【貯蔵方法・有効期間】

1. **貯蔵方法**
   2～8℃で保存してください。
2. **有効期間**
   24 ヵ月
   ベンタナ HER2 DNA カクテルプローブ :24 ヵ月
   ベンタナ Silver ISH DNP キット :24 ヵ月
   ベンタナ Red ISH DIG キット :24 ヵ月

【包装単位】

ベンタナ Dual ISH HER2 キット

1. ベンタナ HER2 DNA カクテルプローブ 30 テスト
   (商品コード 114800)
   HER2 DNA カクテルプローブ 6 mL×1 ディスペンサー
2. ベンタナ Silver ISH DNP キット 60 テスト
   (商品コード 114817)
   HQ 標識抗 DNP 抗体 6 mL×1 ディスペンサー
   HRP 標識抗 HQ 抗体 6 mL×1 ディスペンサー
   発色試薬 A 12 mL×1 ディスペンサー
   発色試薬 B 6 mL×1 ディスペンサー
   発色試薬 C 6 mL×1 ディスペンサー
3. ベンタナ Red ISH DIG キット 60 テスト
   (商品コード 114824)
   NP 標識抗 DIG 抗体 6 mL×1 ディスペンサー
   AP 標識抗 NP 抗体 6 mL×1 ディスペンサー
   pH エンハンサー試薬 12 mL×1 ディスペンサー
   Naphthol 試薬 6 mL×1 ディスペンサー
   Fast Red 試薬 12 mL×1 ディスペンサー

【主要文献】

1) Lee AH, et al. The effect of delay in fixation on HER2 expression in invasive carcinoma of the breast assessed with immunohistochemistry and *in situ* hybridization. J Clin Pathol 2014;67:573-5.
2) Carson F, Hladik C. Histotechnology: A Self Instructional Text, 3rd edition. Hong Kong: American Society for Clinical Pathology Press; 2009.
3) Rakha EA, et al. Updated UK Recommendations for HER2 assessment in breast cancer. J Clin Pathol 2015,68, p.93-99.
4) Babic A. et al. The impact of pre-analytical processing on staining quality for H&E, dual hapten, dual color *in situ* hybridization and fluorescent *in situ* hybridization assays. Methods. 2010,Dec;52(4), p.287-300.
5) Wolff AC, et al. Recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer: American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists clinical practice guideline update. J Clin Oncol 2013,Nov1;31(31), p.3997-4013.
6) Reinholz MM, et al. Breast cancer and aneusomy 17: Implications for carcinogenesis and therapeutic response. Lancet Oncol. 2009 Mar;10:267-277.
7) 乳癌・胃癌 HER2病理診断 ガイドライン 第2版. 一般社団法人 日本病理学会編. 2021 年 4 月.
8) Gschwind, A. et al. The discovery of receptor tyrosine kinases, target for cancer therapy. Nat Rev Cancer. 2004, 4, p.361～370.
9) Muleris, M. et al. Assignment of v-erb-b2 avian erythroblastic leukemic viral oncogene homolog 2 (ERBB2) to human chromosome band 17121.1 by *in situ* hybridization. Cytogenet Cell Genet. 1997, 76, p.34～35.
10) Coussens, L. et al. Tyrosine kinase receptor with extensive homology to EGF receptor shares chromosomal location with neu oncogene. Science. 1985, 230, p.1,132～1,139.
11) Slamon, DJ. et al. Studies of the HER-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer. Science. 1989, 244, p.707～712.
12) Bang, YJ. et al. Trastuzumab in combination with chemotherapy versus chemotherapy alone for treatment of HER2-positive advanced gastric or gastro-oesophageal junction cancer (ToGA): a phase 3, open-label, randomised controlled trial. Lancet. 2010, 376, p.687-697.

【問い合わせ先】

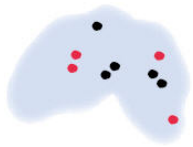
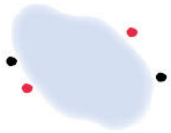
ロシュ・ダイアグノスティックス株式会社
カスタマーソリューションセンター
〒108-0075 東京都港区港南 1-2-70
フリーダイヤル: 0120-600-152

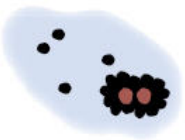
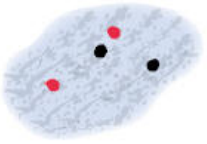
【製造販売業者の氏名又は名称及び住所】

ロシュ・ダイアグノスティックス株式会社
〒108-0075 東京都港区港南 1-2-70
フリーダイヤル: 0120-600-152

Ventana is a trademark of Roche.
Ventana は Roche の商標です。

表 3. シグナルの計測方法

	核が重なっている細胞は計測対象から外す。
	シグナルの認められない細胞は計測対象から外す。
	二色のシグナルが認められない細胞は計測対象から外す。
	シグナルが核の外に認められる細胞は計測対象から外す。
	黒色(HER2)のシグナルを1個に赤色(Chr17)のシグナルを1個に数える。
	黒色(HER2)のシグナルを2個に赤色(Chr17)のシグナルを2個に数える。
	黒色(HER2)のシグナルを1個に赤色(Chr17)のシグナルを2個に数える。 同色の2個のシグナルが、シグナルの直径と同じ距離、又は直径よりも短い距離に位置する場合は、1個のシグナルとして数える。

	複数のシグナルのクラスターは正常細胞のシグナル1個の大きさを基準にシグナル数を決定する。この細胞については、黒色(HER2)のシグナルは小さいクラスター1個でシグナル6個、単独のシグナルが2個、あわせて8個に、赤色(Chr17)のシグナルを2個に数える。 計測結果にクラスターを認めたことを記録する。
	この細胞については、黒色(HER2)のシグナルは大きいクラスターが1個でシグナル12個、単独のシグナルが4個、あわせて16個、赤色(Chr17)のシグナルを2個に数える。 計測結果にクラスターを認めたことを記録する。
	二色のシグナルが接近して認められる場合には、対物60Xのレンズで確認して、黒色(HER2)のシグナルを1個に赤色(Chr17)のシグナルを1個に数える。 この細胞については、黒色(HER2)のシグナルを4個に赤色(Chr17)のシグナルを2個に数える。
	黒色(HER2)のシグナルのクラスターに重なって、不鮮明な赤色(Chr17)のシグナルを認める場合、対物60Xのレンズで赤色(Chr17)のシグナルを確認する。
	核内に黒色のダスト状のバックグランドを認めた場合、明らかにシグナルと確認できるもののみを数える。
	シグナル様の不鮮明な赤色のドットを認めた場合、シグナルとの鑑別に注意が必要であり、染色強度の違いで鑑別する。 この細胞については、黒色(HER2)のシグナルを2個と赤色(Chr17)のシグナルを2個とする。