

承認番号23100EZ00001000
TA9217

この添付文書をよく読んでから使用すること。

HER-2遺伝子キット

パスビジョン BOND HER2 FISH

●一般的な注意

1. 本品は体外診断用医薬品である。それ以外の目的には使用しないこと。
2. 診断・治療効果の判定は、本法を含めて関連する他の検査や臨床症状に基づき医師が総合的に判断すること。
3. 添付文書の使用方法を遵守すること。
4. 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すること。

●形状・構造等（キットの構成）

- 1) LSI HER2/CEP17 DNAプローブ
 - 2) ポストハイブリダイゼーション洗浄液
 - 3) 酵素濃縮液2
 - 4) 酵素希釈液
- * 酵素濃縮液2を酵素希釈液で300倍に希釈するためのオーブンコンテナが付いている。

●使用目的

乳がん又は胃がん組織・細胞のHER2/neu遺伝子増幅度の測定（HER2/neu）/（CEP17）比）（悪性腫瘍の診断補助等）

●測定原理¹⁾²⁾³⁾⁴⁾

Fluorescence in situ hybridization（FISH）法

●操作上の注意

1. 使用者は自動 in situ Fluorescence技術について適切にトレーニングを受けていること。
2. スライドの保管
染色したスライドは-20℃で遮光保管すること。観察に先立ち、-20℃から室温にスライドを戻すこと。

●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
 - ・ LSI HER2/CEP17 DNAプローブ
そのまま用いる。
 - ・ ポストハイブリダイゼーション洗浄液
そのまま用いる。
 - ・ 酵素濃縮液2
2) 試液の調製方法に従い酵素希釈液で用時希釈して用いる。
 - ・ 酵素希釈液
そのまま用いる。
- 2) 試液の調製方法
染色前に、酵素濃縮液2を、酵素希釈液で1：300に希釈する（希釈して得られた酵素液を酵素5という。）。例えば、10枚のスライドを染色するために、10 μLの酵素濃縮液2を2990 μLの酵素希釈液で希釈した3 mLの作業用酵素液（酵素5）を調製する。酵素5は各染色工程前に新しく調製し、工程毎に少なくとも900 μLを使用することを推奨する。
2. 必要な器具・器材・試料等
1) コントロールスライド及び試薬
 - ・ ライカ HER2 FISH コントロールスライド
（製品番号：TA9123）
 - ・ ライカ BOND 脱パラフィン液
（製品番号：AR9222）
 - ・ ライカ BOND エピトープ リトリバル液1
（製品番号：AR9961）

- ・ ライカ BOND 洗浄液10倍濃度
（製品番号：AR9590）
- ・ FISH法に基づくアッセイに使用される標準的な溶媒
（例：無水かつ等級品のエタノール）
- ・ 蒸留水又は脱イオン水
- ・ DAPI対比染色液
- ・ ライカ BOND 吸引プローブ洗浄システム
（製品番号：CS9100）

2) 器具・装置

- ・ ピペット
（1-20 μL及び100-1000 μLの体積を計量可能なもの）
 - ・ 有料スライド（ライカ BOND プラス スライド）
（製品番号：S21.2113）
 - ・ ライカ ボンドマックス（製品番号：21.0051）
（医療機器製造販売届出番号：13B2X10268BM0001, 13B3X00324BM0001）
- 又は
- ・ ライカ ボンドⅢ（製品番号：21.2201）
（医療機器製造販売届出番号：13B2X10268B30001, 13B3X00324B30001）
 - ・ ライカ BOND ユニバーサル カバータイル
（製品番号：S21.0051）
 - ・ ライカ BOND ミキシング ステーション
（製品番号：S21.1971）
 - ・ ライカ BOND スライドラベル&プリントリボン
（製品番号：S21.4564）
 - ・ カバースリップ
 - ・ 乾燥オーブン（60℃を維持できるもの）
 - ・ 適切な光源を有する蛍光顕微鏡（60-100倍、対物）
バルブが使用された時間数を記録し、定格時間を超える前に交換すること。ランプが適切に配置されていることを確認すること。
 - ・ 適切な蛍光フィルターセット
（スペクトラムオレンジ：励起ピーク559 nm、
発光ピーク588 nm）
（スペクトラムグリーン：励起ピーク497 nm、
発光ピーク524 nm）
（DAPI：励起ピーク367 nm、
発光ピーク452 nm）
 - ・ 本品と使用するために最適化された多バンドパス蛍光顕微鏡フィルターセット
ほとんどの顕微鏡で30テスト使用可能である。本品に推奨されるフィルターセットは
DAPI/9-オレンジ デュアル バンドパス、
DAPI/グリーン デュアル バンドパス、グリーン/
オレンジ（V.2）デュアル バンドパス 及び、
DAPI/グリーン/オレンジ（V.2）トリプル バンドパスである。

3. 測定操作法

- 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自動染色装置（「ライカ ボンドマックス又はライカ ボンドⅢ」）により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) 自動染色装置により検体組織切片スライドを97℃で25分間熱処理した後、酵素液で37℃で25分間処理し、LSI HER2/CEP17 DNAプローブ150 μLを添加し、変性（95℃で10分間）及びハイブリダイゼーション（37℃で12時間）を行う。
- 4) 反応後、スライドグラスを48℃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4分間洗浄処理する。
- 5) スライドを乾燥させ、20 μLのDAPI対比染色液を滴下し、蛍光顕微鏡で20個の細胞核についてそれぞれのHER2/neuのオレンジ色のシグナル（蛍光）数とCEP17のグリーン色のシグナル（蛍光）数を数える。
- 6) （HER2/neuシグナル数）/（CEP17シグナル数）比を計算する。

●測定結果の判定法

*シグナル評価及び計数

シグナルの質を評価し、HER2及びCEP17のシグナルを計測するために以下のプロセスに従うこと。

①スライドの質の評価

以下の基準によりスライドの質を評価する：

- ・プローブシグナル強度：シグナルは明るく評価が容易であること。シグナルは明るく小さな楕円形であるか、又は、繊維状で拡散した楕円形であること。
- ・バックグラウンド：バックグラウンドは相対的に蛍光粒子がなく、暗く又は黒く見えること。
もし上記の性質が不十分な場合はトラブルシューティングガイドを参照し、必要ならばアッセイを繰り返すこと。

②ターゲットシグナルの認識

指定されたフィルターを分析に使用する：

- ・組織の概観：浸潤性腫瘍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こと。腫瘍細胞は一般的に正常細胞とは大きさにより識別される：一般的に腫瘍細胞は正常細胞、リンパ球、及び上皮細胞よりも大きい。FISHアッセイが行われた後、H&E染色により目標領域を同定し選択しカバースリップでこれらの領域を表示する。
- ・焦点深度：焦点面深度を決定するため焦点深度を調整し、ターゲットシグナルとノイズ（破砕物）の形状と大きさを理解する。

③核の適合性

20倍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する：

- ・核の選択：ターゲットエリアを決める（H&E染色で同定された腫瘍細胞）。核境界があいまいなエリアや細胞が壊れている部分を選ける。
- ・さらに、弱い強度及び非特異的な、バックグラウンドにノイズがある、又は、核の境界を決定するための対比染色が不十分なシグナルは無視すること。個々に分離したシグナルのみを計測すること。

④シグナルの計測

- ・腫瘍の観察：40倍の対物レンズを用いて、腫瘍細胞のいくつかのエリアをスキャンし、細胞の形状が不均一なものを腫瘍細胞とみなす。シグナルが弱いエリアを避けて核が適当に分布しているエリアを選ぶ。
- ・計測：選択したエリアの左上四分円から分析を開始し、左から右にスキャンし、100倍の対物レンズを用い、下記及び図1のガイドラインに従って、核境界内のシグナルの数を数える。
- ・上下（Z軸）に焦点を合わせて核内に存在する全てのシグナルを特定する。
- ・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又はそれよりも小さい距離しか離れていないものは、1個のシグナルと数える。
- ・シグナルが無い又は1色のみのシグナルの核は記録しない。各色の1個以上のFISHシグナルを持つ核のみを記録する。
- ・個々の核について、HER2シグナルの数とCEP17シグナルの数を数える。2個のシグナルを見るために、必要に応じて、オレンジ色（HER2）、グリーン色（CEP17）、グリーン色/オレンジ色及びDAPI/グリーン色/オレンジ色のフィルターセットを交互に使用する。

*LSI HER2とCEP17のシグナル比

LSI HER2とCEP17のシグナル比を決定するために、下記の方法を用いること。

- ①20個の核についてLSI HER2及びCEP17のシグナル数を記録する。
- ②LSI HER2シグナルの全てを合計する。これはLSI HER2シグナルの合計、例えば143となる。
- ③CEP17シグナルの全てを合計する。これはCEP17シグナルの合計、例えば48となる。
- ④最終結果を算出するため、下記の計算を行う：
LSI HER2シグナル合計をCEP17シグナル合計で割る。例えば、143/48は2.98の比となり、これはHER2増幅陽性である。

重要：LSI HER2とCEP17のシグナル比があいまいな（1.81以上-2.20未満）場合は、新たに20個の核をカウントし、再算定し

た結果に基づき判定を行う。

結果は以下のように報告する：

1. 比が2未満の場合、HER2遺伝子増幅 陰性
2. 比が2以上の場合、HER2遺伝子増幅 陽性

重要：LSI HER2とCEP17のシグナル比がカットオフ値付近（1.81以上-2.20未満）の場合は、上述のように注意して解釈すること。

●臨床的意義

HER2遺伝子（別名neuまたはc-erbB2）は17番染色体の長腕、17q11-12に位置している（1）。HER2遺伝子とこれがコードする185 kDのタンパク質はともに、乳癌の悪性形質転換と腫瘍の進行において重大な役割を果たすことが示されている（2）。

HER2は予後マーカーの機能を持ち、遺伝子増幅とタンパク質の過剰発現は疾患再発率の上昇と高い死亡率とに関連がある。HER2は全身の選択的化学療法と標的化治療の予測マーカーとしての役割も持つ（3）。具体的には、HER2遺伝子の増幅は、リンパ節転移のある乳癌における不良な予後の指標となることが示されている（4-8）。さらに、1研究は、化学療法により治療される患者において、HER2の予後因子としての価値が高いことを示している（7）。しかし、個々の患者における無病生存率および全生存率を予測する際は、腫瘍の大きさ、転移リンパ節の数、およびステロイドレセプターの状態などのその他確立された予後因子も考慮しなければならない。

乳癌細胞に認められる遺伝子増幅の結果としてのHER2癌タンパクの過剰発現は、HER2が抗体療法の標的となることを示唆する（3）。Herceptin（トラスツズマブ）はヒト化モノクローナル抗体であり（9）、HER2癌タンパクに高い親和性で結合し、in vitroおよびin vivo両方において、HER2癌タンパクを過剰発現するヒト腫瘍細胞の増殖を阻害することが示されている（10-12）。Herceptinの開発以来、HER2遺伝子およびタンパク質両方の検出は乳癌腫瘍の評価において不可欠なツールとなり、治療法の選択とその後の患者の管理の方向性を決定するものとなっている（13,14）。

ヒト乳癌細胞株由来の間期および中期にある細胞の両方において、HER2遺伝子増幅を示すためにFISHが用いられている（15-18）。HER2遺伝子増幅の定量化のため、FISHは腫瘍細胞内のHER2遺伝子増幅レベルを直接的に評価する。個々の培養されていない原発乳癌における組織の特徴的な形態と癌遺伝子コピーの空間的分布は保持される。17番染色体コピー数の異常（異数性）も乳癌腫瘍で多く認められる。これらは染色体の欠失または増加（ポリソミー）として現れる場合がある。

●性能

1. 品質管理試験（性能試験）

以下の管理用検体を用い、本申請書の使用方法の使用法により染色した染色標本の間期核及び分裂中期核（メタフェーズ）を3種類のフィルター（DAPI/オレンジ、DAPI/グリーン及びDAPI/グリーン/オレンジ）条件で蛍光顕微鏡にて観察する。

SKBr-3
MDA-MB-453
MDA-MB-175
MDA-MB-231

このとき、

- 1) シグナルの強度
- 2) バックグラウンド
- 3) 特異性

の3項目について以下のとおり検討する。

1) シグナルの強度

スコア1：

目標エリア内の核（又は分裂中期）に検出可能なシグナルが全く無い。

スコア2：

目標エリア内の25%以上の細胞でシグナルが無い、又は、目標エリア内の少なくとも80%の細胞でシグナル強度が弱くて評価できない。

スコア3:

目標エリア内の少なくとも80%の核又は分裂中期核で判読可能な(はっきりした)シグナルが存在する。

スコア4:

目標エリア内の少なくとも80%の細胞で明いはっきりしたシグナルが存在する。

スコア5:

目標エリア内の少なくとも90%の核及び分裂中期核できわめて明いはっきりしたシグナルが存在する。

スコア2以下の評価を受けた場合は不合格、スコア3以上の評価を受けた場合は合格とする。

2) バックグラウンド

スコア1:

バックグラウンドの蛍光粒子部分が大きくて目標エリア全体を覆っている。このレベルの背景はLSI HER2/CEP17シグナルの正確な解釈を妨げる。かすみや蛍光の輝きが存在する場合がある。かすみ又は輝きが目標エリア全体を覆うとプローブの解釈が不可能である。

スコア2:

バックグラウンドの蛍光粒子のサイズは大きい目標エリア全体を覆うほどではない。すなわち、バックグラウンドが無い目標エリアがある。蛍光粒子が存在するエリアではLSI HER2/CEP17シグナルの正確な解釈を妨げる。かすみ又は輝きが目標エリアの50%超を覆うとプローブのシグナルの解釈又は可視化に問題を生じる。

スコア3:

バックグラウンドの蛍光粒子が存在するが蛍光強度において特異的なプローブのシグナルよりも小さくて弱い。蛍光粒子は存在するが、目標エリア全体又は目標エリアに散発的に分布している。このレベルのバックグラウンドの存在は解釈を妨げないので目標エリアの誤った解釈を引き起こすことはない。かすみ又は輝きが存在するにせよ、このレベルのかすみ又は輝きはプローブのシグナルの解釈の容易さを妨げることはない。

スコア4:

目標エリア全体にときどき蛍光の細粒又は粒子が観察されるか、又は目標エリアの特定のエリアでとても低い密度の蛍光が存在するにすぎない。蛍光粒子の存在はプローブシグナルの解釈を妨げない。かすみや輝きが目標エリア全体に存在しないかとても低いレベルであり、可視性が減弱することなく、又は目標組織の評価を妨げることもない。

スコア5:

目標エリア内に蛍光粒子も、かすみも存在しない。目標の背景は黒い。

スコア2以下の評価を受けた場合は不合格、スコア3以上の評価を受けた場合は合格とする。

3) 特異性

スコア1:

目標エリア内で解析された全ての細胞において、あらゆるサイズの非特異的な蛍光粒子又は一様な蛍光染色が観察される。これらの蛍光粒子のサイズと存在、又は、一様な蛍光の強度はLSI HER2/CEP17 シグナルの正確な解釈や計数を困難にする。このレベルの非特異性は目標の誤りを生じる。

スコア2:

目標エリア内で解析された全ての細胞において、あらゆるサイズの非特異的な蛍光粒子の存在又は一様な蛍光染色が観察される。蛍光粒子の頻度、強度及びサイズ、又は、一様な蛍光の強度はLSI HER2/CEP17 シグナルの可視化を妨げたり、観察される50%以上の細胞における正確な解釈や計数を困難にしたりする。このレベルの非特異性は目標の誤りを生じる。

スコア3:

目標エリア内で解析された75%以下の細胞において、あらゆる

サイズの非特異的な蛍光粒子の存在(シグナルは特異的なプローブシグナルよりも小さく、本質的に弱い)が観察される。蛍光粒子の頻度、強度及びサイズ、又は、一様な蛍光の強度はLSI HER2/CEP17 シグナルの可視化を妨げない。核の形態は非特異性ゆえに可視的であり、核の一樣又は粒状の染色を生じるが、非特異性は十分に弱いのでシグナルの解釈を妨げない。このレベルの非特異性は目標の誤りを生じない。

スコア4:

目標エリア内で解析された25%未満の細胞において、非特異的な蛍光粒子の存在はLSI HER2/CEP17 シグナルのサイズよりも小さい。このレベルの非特異的な蛍光粒子の存在、又は一様な染色の強度は、正確な可視化又はLSI HER2/CEP17 シグナルの解釈を妨げない。このレベルの非特異性は目標の誤りを生じない。

スコア5:

解析された細胞において、あらゆるサイズの非特異的な蛍光粒子が存在しない。

スコア2以下の評価を受けた場合は不合格、スコア3以上の評価を受けた場合は合格とする。

上記の結果に基づき各スライドについて以下のとおり総合評価する。

シグナルの強度、バックグラウンド、又は特異性のいずれかでスコア2以下の評価を受けた場合は不合格とする。

シグナルの強度、バックグラウンド、及び特異性の全てでスコア3以上の評価を受けた場合は合格とする。

2. 品質管理試験(同時再現性試験)

同一検体を同時に3回測定する際のセルライン毎の増幅・非増幅の判定が全て以下のパターンとなること。

セルライン	増幅・非増幅
MDA-MB-231	非増幅
MDA-MB-175	非増幅
MDA-MB-453	増幅又は非増幅
SKBr-3	増幅

3. 相関性試験

1) 相関性試験(乳がん)

①試験方法

試験1: 乳がん検体における本品(自動化法)と既承認品(A)(用手法) 2×2 相関性試験
結果を下表に示す。

表 乳がん検体における本品(自動化法)と既承認品(A)(用手法) 2×2 相関性試験

		既承認品(A)		
		陰性(<2.0)	陽性(≥2.0)	計
本品	陰性(<2.0)	52	1	53
	陽性(≥2.0)	1	53	54
	計	53	54	107

検体例数 n=107

陰性一致率 98.1%(52/53例)

陽性一致率 98.2%(53/54例)

全体一致率 98.1%(105/107例)

本品と既承認品(A)は乳がん検体において高い一致率を示すことが確認された。

試験2: 乳がん検体における本品(自動化法)と既承認品(B)(用手法) 2×2 相関性試験
結果を下表に示す。

表 乳がん検体における本品（自動化法）と既承認品(B)（用手法） 2×2 相関性試験

		既承認品(B)		
		陰性 (< 2.0)	陽性 (≥ 2.0)	計
本品	陰性 (< 2.0)	51	2	53
	陽性 (≥ 2.0)	0	54	54
	計	51	56	107

検体例数 n=107

陰性一致率 100% (51/51例)

陽性一致率 96.4% (54/56例)

全体一致率 98.1% (105/107例)

本品と既承認品(B)は乳がん検体において高い一致率を示すことが確認された。

試験3：胃がん検体における本品（自動化法）と既承認品(A)（用手法） 2×2 相関性試験
結果を下表に示す。

表 胃がん検体における本品（自動化法）と既承認品(A)（用手法） 2×2 相関性試験

		既承認品(A)		
		陰性 (< 2.0)	陽性 (≥ 2.0)	計
本品	陰性 (< 2.0)	59	3	62
	陽性 (≥ 2.0)	1	46	47
	計	60	49	109

検体例数 n=109

陰性一致率 98.3% (59/60例)

陽性一致率 93.9% (46/49例)

全体一致率 96.3% (105/109例)

本品と既承認品(A)は胃がん検体において高い一致率を示すことが確認された。

試験4：胃がん検体における本品（自動化法）と既承認品(B)（用手法） 2×2 相関性試験
結果を下表に示す。

表 胃がん検体における本品（自動化法）と既承認品(B)（用手法） 2×2 相関性試験

		既承認品(B)		
		陰性 (< 2.0)	陽性 (≥ 2.0)	計
本品	陰性 (< 2.0)	62	7	69
	陽性 (≥ 2.0)	2	46	48
	計	64	53	117

検体例数 n=117

陰性一致率 96.9% (62/64例)

陽性一致率 86.8% (46/53例)

全体一致率 92.3% (108/117例)

本品と既承認品(B)は胃がん検体において高い一致率を示すことが確認された。

●使用上又は取扱い上の注意

1. 取扱い上の注意

- 1) 試料はHIV、HBV、HCV等の感染のおそれがあるものとして取り扱うこと。
- 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) 感染を避けるために口によるピペティングを行わないこと。
- 4) 次の試薬類に関する注意事項を示す。
 - ①ポストハイブリダイゼーション洗浄液

危険：ホルムアミドを含む。
胎児への悪影響のおそれ。

適切な保護衣と手袋を着用すること。
不十分な換気の場合は、適切な呼吸具を装着すること。
気分が悪いときは医師の診察を受けること。
曝露を避けること。

②ブローブ

危険：ホルムアミドを含む。
胎児への悪影響のおそれ。
適切な保護衣と手袋を着用すること。
不十分な換気の場合は、適切な呼吸具を装着すること。
気分が悪いときは医師の診察を受けること。
曝露を避けること。

③酵素濃縮液2

危険：グリセロールを含む。
発ガン作用の報告がある。
吸入により感作を起こす場合がある。
蒸気を吸わないこと。
適切な保護衣と手袋を着用すること。
気分が悪いときは医師の診察を受けること。
吸入した場合は新鮮な空気を吸って休息すること。

2. 使用上の注意

- 1) 本品は保管方法に従って保存し、有効期間を過ぎた試薬は使用しないこと。
- 2) 本品は、測定後、速やかに冷蔵庫に保存すること。
- 3) キットの構成試薬について、異なったロットの試薬と組み合わせ使用しないこと。
- 4) カバータイルは、新品を使用すること。
- 5) 試薬の継ぎ足しは行わないこと。
- 6) 試薬が飛散した場合は直ちにふき取り、消毒等を行うこと。

3. 廃棄上の注意

- 1) 検体、検査に使用した器具類及び廃液は、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）、グルタルアルデヒド溶液（2%、1時間以上浸漬）等での消毒又はオートクレーブ処理（121℃、20分以上）を行うこと。
- 2) 試薬、検査に使用した器具類及び廃液を廃棄する場合は、廃棄物の処理及び清掃に関する法律、水質汚濁防止法等に従って、廃棄すること。

●保管方法、有効期間

1. 保管方法：2～8℃で遮光保存する。
2. 有効期間：18ヶ月

●包装

製品番号	包装内容	包装単位
TA9217	LSI HER2/CEP17 DNAブローブ ポストハイブリダイゼーション洗浄液 酵素濃縮液2 酵素希釈液 * 酵素濃縮液2を酵素希釈液で300倍に希釈するためのオープンコンテナが付いている。	6.6 mL×1 9 mL×1 1 mL×1 65 mL×1

●主要文献

1. Press MF, Zhou JY, Ma Y, et al. Evaluation of HER-2/neu gene amplification by fluorescence in situ hybridization in invasive breast carcinoma. In: FISH: Clinical Applications in Cancer and Genetics February 8-11, 1994; Lake Tahoe, CA.
2. Pauletti G, Singh R, Press MF, et al. HER-2/neu gene amplification detected by fluorescence in situ hybridization: A comparative study with other techniques. Abstract 3247, Proceedings of the American Association for Cancer Research 1994 35:545.
3. Szöllösi J, Balázs M, Feuerstein BG, et al. Phenotype genotype relationship in erbB-2 amplification. International Society for Analytical Cytology 1994 Abstracts. 92. Abstract 536D.
4. Kallioniemi O, Kallioniemi A, Kurisu W, et al. ERBB2 amplification in breast cancer analyzed by fluorescence in situ hybridization. Proceedings of the National Academy of Sciences 1992;89:5321-5325.

●問い合わせ先

ライカマイクロシステムズ株式会社
〒169-0075 東京都新宿区高田馬場1-29-9
TEL : 03-6758-5690

●製造販売元



ライカマイクロシステムズ株式会社
〒169-0075 東京都新宿区高田馬場1-29-9
東亜 DKK 株式会社別館オフィスビル

シグナルの判定方法

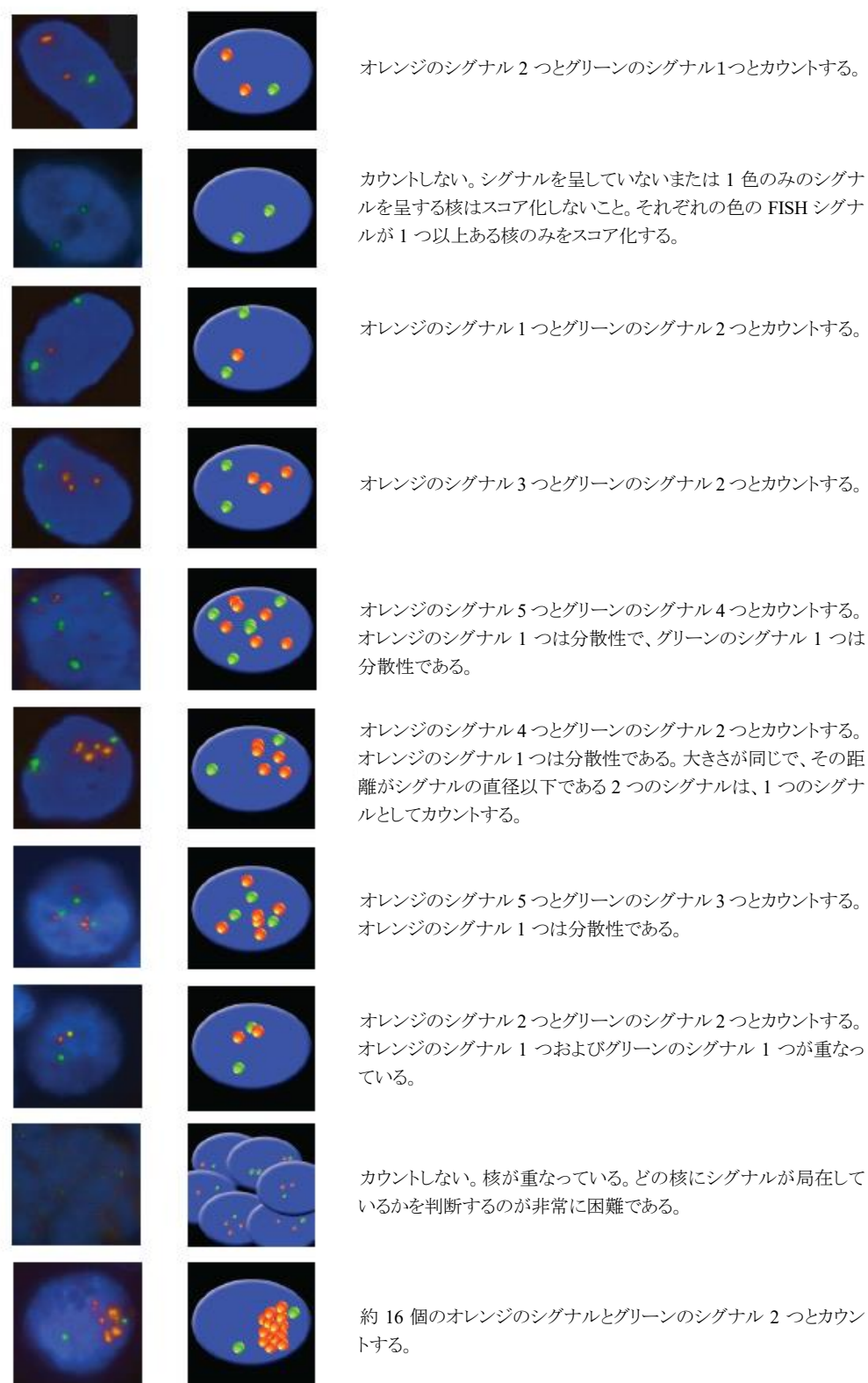


図 1. シグナルの判定方法