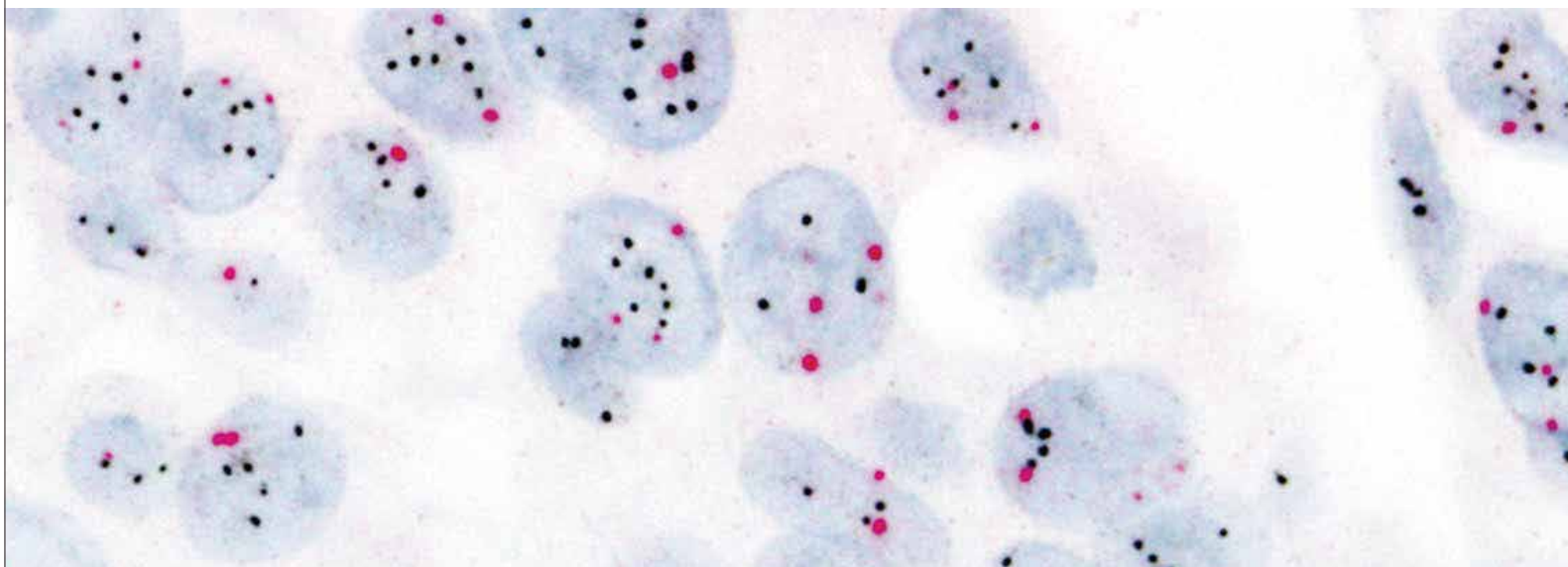




ベンタナ インフォーム Dual ISH HER2 キット 鏡検の手引き



目 次

■ はじめに	3
■ 鏡検に関する注意	4
■ 判定困難な染色結果の分類	9
■ プロトコールの設定について	18
■ 参考資料	25

はじめに

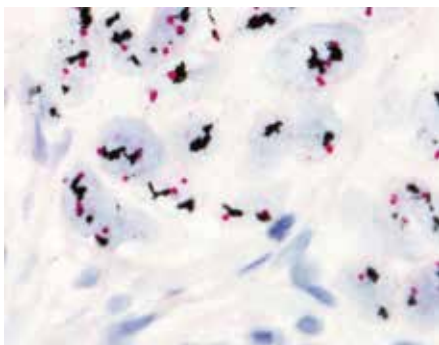
ベンタナ インフォーム Dual ISH HER2 キットは、Silver ISH DNP検出系とRed ISH DIG検出系を利用して、HER2遺伝子と17番染色体セントロメア(CEN17)を黒と赤のシグナルとして可視化し、光学顕微鏡下で観察する検査キットです。

本書は、鏡検の際に注意すべき点に加え、判定困難な結果がえられた際の対処法をケース別に紹介しています。

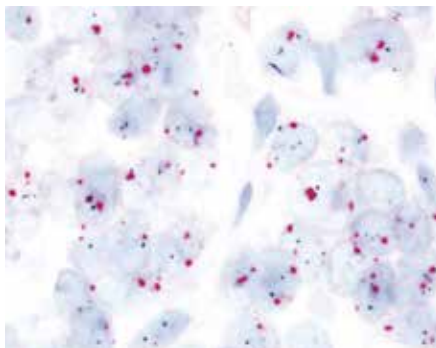
日常の染色で判定に迷う結果に遭遇されましたら、ぜひ本書「HER2検査ガイド」、および「HER2 DISHトラブルシュートフロー」に従って対応し、正しく判定していただきますようお願いいたします。

鏡 検 に 関 す る 注 意

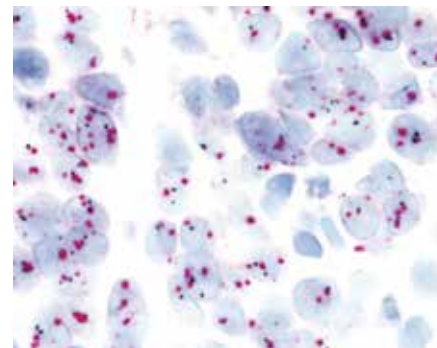
■ 3-in-1コントロールの染色例



Calu-3
(HER2遺伝子の増幅が見られる)



ZR-75-1
(HER2遺伝子のシグナルが平均3コピー)



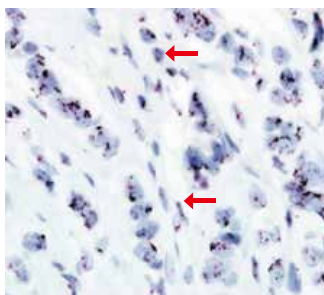
MCF 7
(HER2遺伝子が平均1-2コピー)

3-in-1コントロールは、Xenograft (ヒト腫瘍細胞を移植したマウスの組織) を使用している。

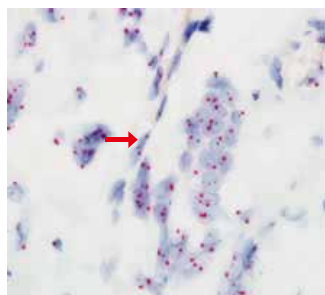
HER2遺伝子及びCEN17のシグナルは、ヒト腫瘍細胞にのみ認められ、間質細胞などのマウスの細胞中には存在しない。

染色工程が正常に実施されたことを確認するために、自家製精度管理用コントロールスライド、もしくは3-in-1コントロールスライドを毎回染色する。また、機器点検やメンテナンス実施後は、必ず3-in-1コントロールを染色し、その染色性を確認する。

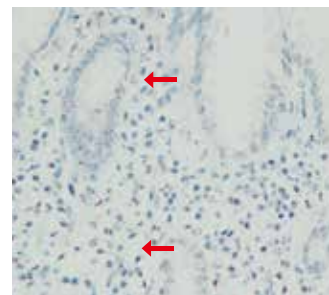
■ スコアリングが可能であることの判断基準



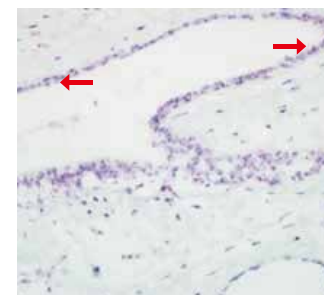
間質線維芽細胞



内皮細胞



リンパ球、非腫瘍部の胃粘膜上皮細胞



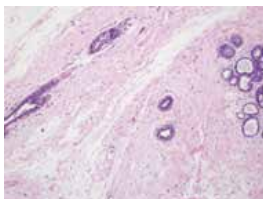
非腫瘍部の乳腺上皮細胞

染色が適切に行われたことを確認するために、検体中に含まれる正常細胞のHER2遺伝子の黒いシグナルとCEN17の赤いシグナルの存在を確認する。検体中に含まれる正常細胞の染色性は、細胞の種類により異なっている。

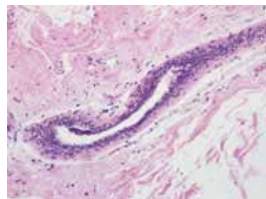
- 線維芽細胞：一部の線維芽細胞の核にシグナルがみられる
- 内皮細胞：多くの内皮細胞の核にシグナルがみられる
- リンパ球：ほぼ全てのリンパ球の核にシグナルがみられる

■ 乳癌における染色例

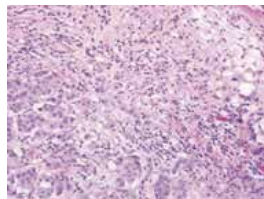
一般染色 (H&E) 染色例



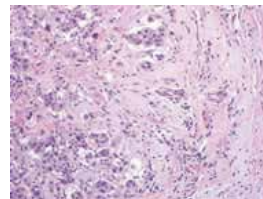
非腫瘍部



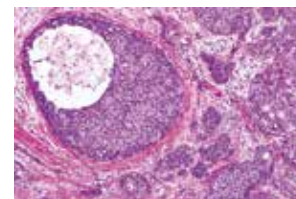
非腫瘍部



浸潤部

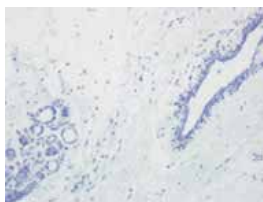


浸潤部

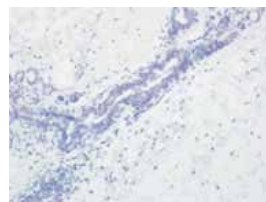


DCIS (非浸潤性乳管癌) [カウント対象外]

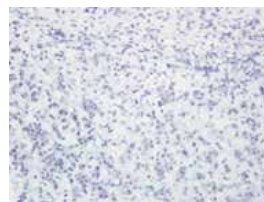
HER2 Dual ISH染色例



非腫瘍部



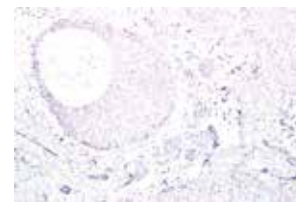
非腫瘍部



浸潤部



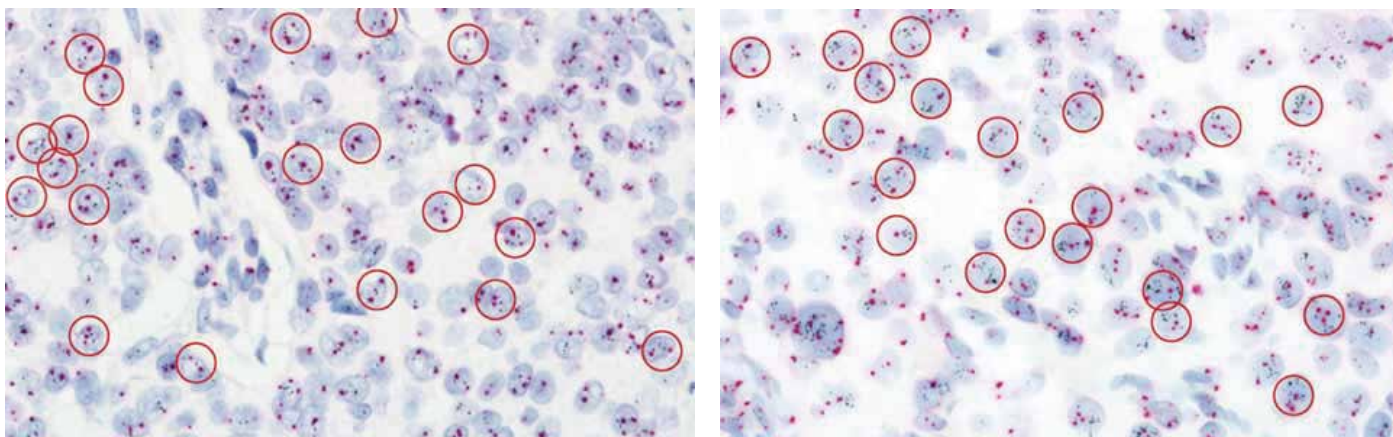
浸潤部



DCIS (非浸潤性乳管癌) [カウント対象外]

- 浸潤部にある腫瘍細胞で、カウントすべき20個の細胞を選択する。
- DCISは判定対象から除外する。

■ カウントすべきターゲットエリアと細胞の選択



選択基準

- 浸潤部の腫瘍細胞で、平均的なサイズ(最も代表的なサイズ)の核を選んでシグナルをカウントする。
- 同じエリアの他の腫瘍細胞と比べて著しく核のサイズが大きいものや、著しく核のサイズが小さいものはカウントに含めない。
- Heterogeneityが存在する場合、なるべくシグナル数の多い腫瘍細胞の核を選んでシグナルをカウントする。
- Heterogeneityが存在する場合、報告書に記録する。

■ シグナルの出現パターン別計測方法

	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対象から外す。

	黒色 (HER2) のシグナルを1個に赤色 (CEN17) 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 (CEN17) 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 (CEN17) 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、また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 (CEN17) 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、単独のシグナルを4個、あわせて16個、赤色 (CEN17) 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 (CEN17) 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 (CEN17) のシグナルを2個に数える。

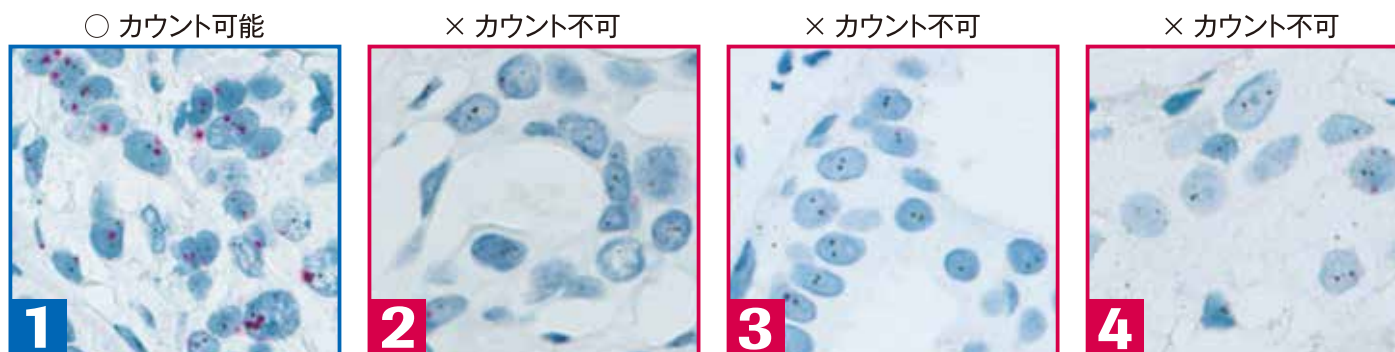
	黒色 (HER2) のシグナルのクラスターに重なって、不鮮明な赤色 (CEN17) のシグナルを認める場合、対物60Xのレンズで赤色 (CEN17) のシグナルを確認する。
	核内に黒色のダスト状のバックグラウンドを認めた場合、明らかにシグナルと確認できるもののみを数える。
	シグナル様の不鮮明な赤色のドットを認めた場合、シグナルとの鑑別に注意が必要であり、染色強度の違いで鑑別する。この細胞については、黒色 (HER2) のシグナルを2個と赤色 (CEN17) のシグナルを2個とする。

鏡検に関する注意

判定困難な染色結果の分類

- シグナル強度について
- バックグラウンドについて
- その他

■ 赤いシグナルが無い・または弱い



判定困難な染色結果の分類

所 見

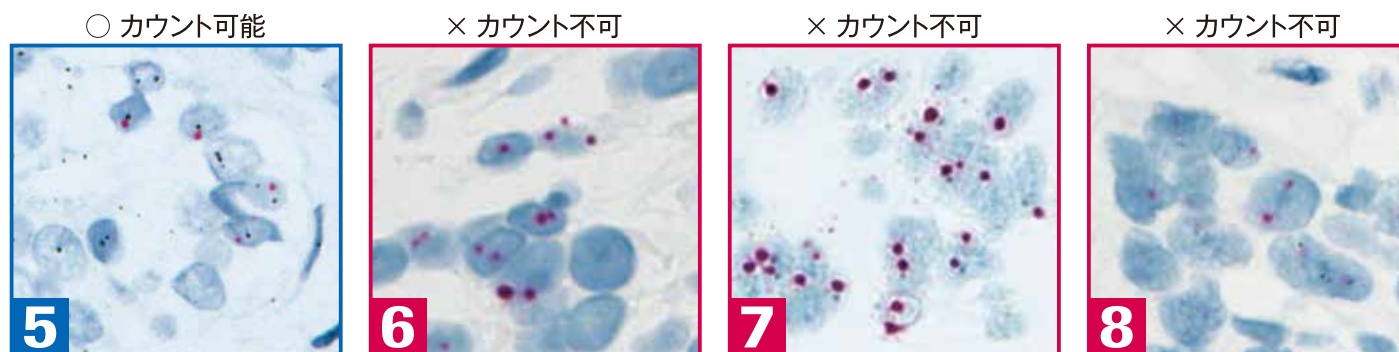
- 同一組織内の正常細胞に染色されるはずの1-2個の赤シグナルが、多くの細胞で染まっていないケース。ターゲットエリア近くの数個の正常細胞にシグナルが確認できればカウント可能であるが、確認できないときは再染色をする。
- 赤シグナルが一部の腫瘍細胞に染まっていないが、正常細胞には確認できるので、赤と黒の両方が染まっている腫瘍細胞を選択してカウント可能。(画像1)
- 消化不足の場合、核染色が濃く染まり、形態が良く保持されている。(画像2, 3)
- 過消化の場合、核染色の染まりが悪く、細胞が溶けたような形態である。(画像3, 4)
- 黒シグナルも弱い、または染まっていないことがある。

カウント可能なエリアがない場合の再染色用プロトコール

消化不足 → 前処理増強 Protocol#

過消化 → 前処理緩和 Protocol#

■ 黒いシグナルが無い・または弱い



判定困難な染色結果の分類

所 見

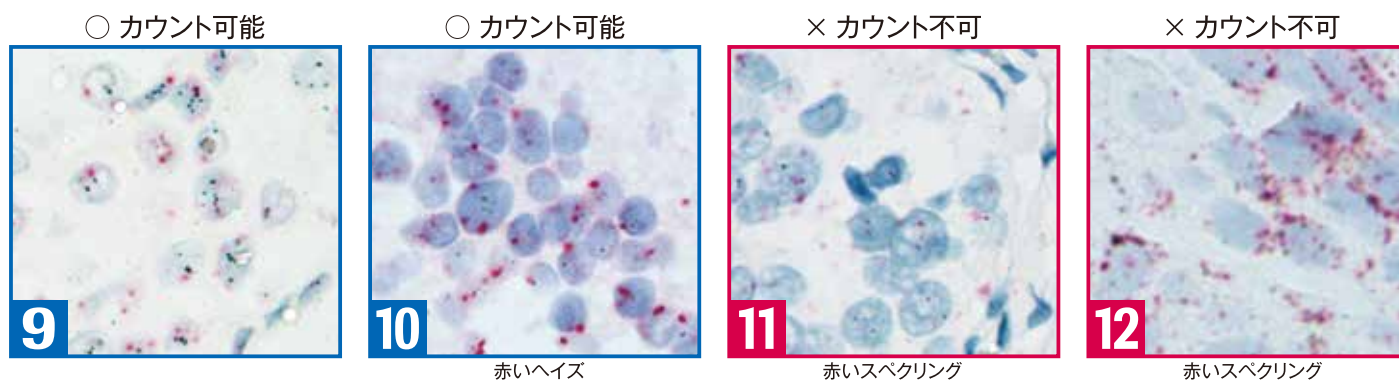
- 同一組織内の正常細胞に染色されるはずの1-2個の黒シグナルが、多くの細胞で染まっていないケース。ターゲットエリア近くの数個の正常細胞にシグナルが確認できればカウント可能であるが、確認できないときは再染色をする。
- 黒シグナルが一部の腫瘍細胞に染まっていないが、正常細胞には確認できるので、赤と黒の両方が染まっている腫瘍細胞を選択してカウント可能。(画像5)
- 消化不足の場合、核染色が濃く染まり、形態が良く保持されている。(画像6)
- 過消化の場合、核染色の染まりが悪く、細胞が溶けたような形態である。(画像7)
- 赤シグナルも弱い、または染まっていないことがある。(画像8)

カウント可能なエリアがない場合の再染色用プロトコール

消化不足 → 前処理増強 Protocol#

過消化 → 前処理緩和 Protocol#

■ 赤いバックグラウンドがある



判定困難な染色結果の分類

所 見

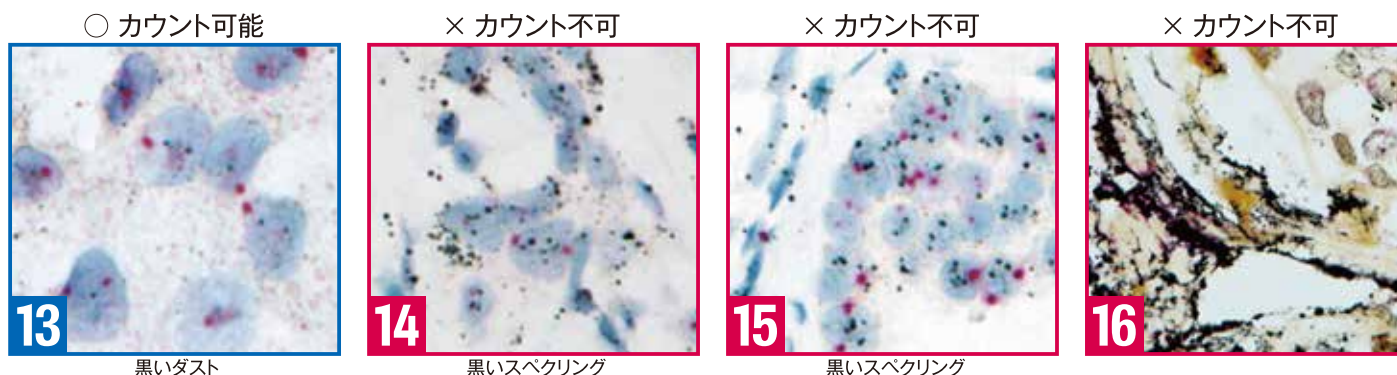
- シグナルが滲んだり、細胞質が赤く着色しているが、赤いシグナルが識別できる場合にはカウント可能。バックグラウンドがシグナルに似た形状で、識別できない場合にはカウント不可。
- 赤シグナルがぼやけて滲んで見えるが、正常細胞のシグナルも同等に染まっているので、しっかり染まっている細胞を選択してカウント可能。(画像9)
- 組織全体/細胞全体が、うっすら赤く染まっているが、シグナルが識別できるのでカウント可能。(画像10)
- 核染色の色合いが薄く、細胞が溶けたような形態の場合、全体的に赤く染まることもある。
- 核以外の細胞質や間質に、顆粒状の赤い発色がある。(画像11, 12)

カウント可能なエリアがない場合の再染色用プロトコル

背景抑制 Protocol#

※精度管理用コントロール検体にも同様のバックグラウンドが出ている場合には、デコンタミネーションを実施する

■ 黒い顆粒状のバックグラウンドがある



判定困難な染色結果の分類

所 見

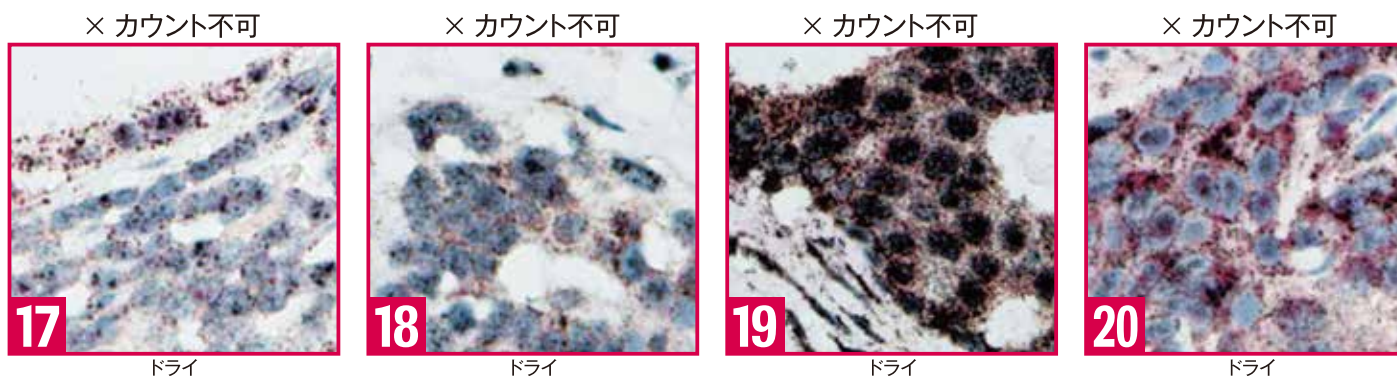
- 細かい顆粒状の黒いバックグラウンドがあるが、シグナルが識別できる場合にはカウント可能。バックグラウンドがシグナルに似た形状で、識別できない場合にはカウント不可。この場合、同一組織内の正常細胞に1-2個よりも多くの黒いシグナルがあるように見える。
- 黒く細かい顆粒はあるが、シグナルとの識別ができる。(画像13)
- 黒い顆粒がシグナルと識別できない。(画像14, 15)
- 黒い顆粒は、細胞核や間質、時に組織全体に認められる。
- 組織上ではない、スライドガラス上に認められるときもある。
- 組織以外の混入物に反応している。(マーキングの色素への着色, 画像16)

カウント可能なエリアがない場合の再染色用プロトコール

背景抑制 **Protocol#**

※精度管理用コントロール検体にも同様のバックグラウンドが出ている場合には、デコンタミネーションを実施する

■ 一面に赤や黒、茶の着色がある



判定困難な染色結果の分類

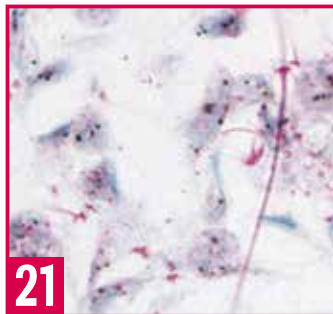
所 見

- 組織全体への赤や黒、茶色の着色は処理工程中の乾燥が原因と推測される。(ドライ)
- 同一組織内の正常細胞や腫瘍細胞にシグナルとの識別ができない数多くの黒い顆粒がある。(画像17, 18)
- 細胞質や細胞核、時には組織全体へ赤や黒の着色がある。(画像19)
- 色は、黒色や赤色の他に、両方が混ざった茶色のときもある。(画像20)
- 腫瘍細胞の中にクラスターが形成されているように見えることもあるが、正常細胞にある赤や黒のシグナルが2個よりも多い時は、カウント不可とする。

HER2検査ガイドトラブルシューティングを参照する

■ 赤い結晶や混入物がある

× カウント不可

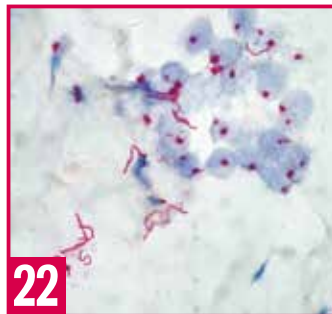


21

針状結晶

*シグナルと識別できる箇所が存在すれば、
カウント可能

× カウント不可

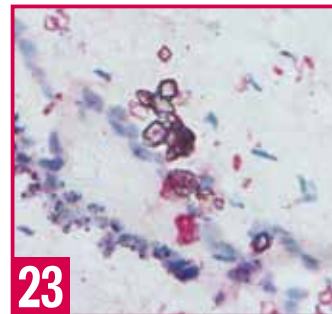


22

糸くず状の混入物

*シグナルと識別できる箇所が存在すれば、
カウント可能

× カウント不可



23

立方体の結晶

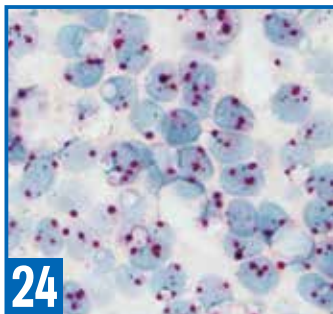
所 見

- シグナルとは全く異なった形状の、針状、糸くず状、立方体の結晶の様な混入物が見えるケース。同一組織上の正常細胞や腫瘍細胞の核に、赤と黒のシグナルが識別できる場合にはカウント可能。
- 長い線状の結晶は針状結晶と呼ばれ、封入操作時の脱水不十分が疑われる。(画像21)
- 糸くず状の混入物は、雑菌などのコンタミネーションが疑われる。(画像22)
- 立方体の結晶は、赤の発色試薬の結晶と推測されるため、試薬の管理方法を確認する。(画像23)

HER2検査ガイドトラブルシューティングを参照する

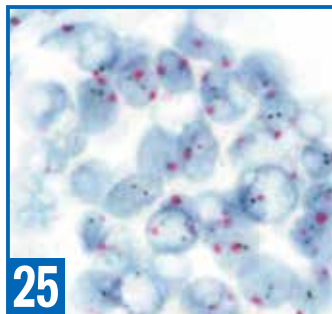
■ 組織上に空胞がある

○ カウント可能



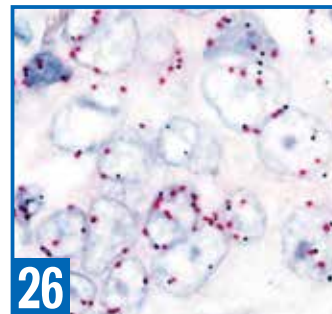
24

○ カウント可能



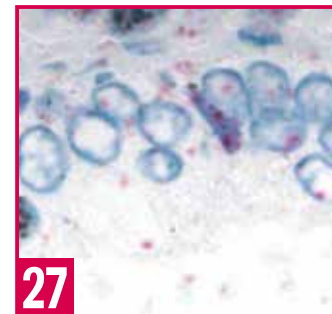
25

○ カウント可能



26

× カウント不可



27

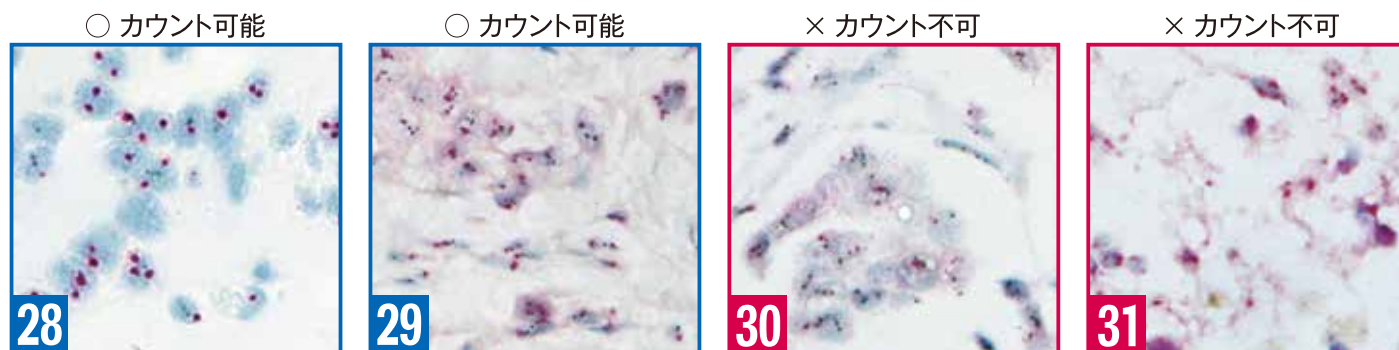
判定困難な染色結果の分類

所 見

- 組織上に、気泡、又は油滴の様な混入物が認められ、その部分の組織は焦点が合わない。(画像24, 25)
- 核の中に空胞が認められ、核染色のヘマトキシリンが一部で染まっていないように見える。(画像26, 27)
- 同一組織上の正常細胞と空胞のある腫瘍細胞で、赤と黒のシグナルが識別できる場合にはカウントが可能。(画像24 - 26)

HER2検査ガイドトラブルシューティングを参照する

■ 核の形態が保持されない



判定困難な染色結果の分類

所 見

- 消化が強く、細胞核へのヘマトキシリンの染色強度が弱いケース。辛うじて1つの細胞核が識別でき、シグナルがはっきり確認できる場合にはカウント可能。個々の細胞核が識別できない場合にはカウント不可。
- 細胞核の輪郭が不明瞭でカウントが難しい場合はカウント不可とする。(画像30, 31)
- シグナルは強く染色されて、1つの細胞核が特定できる場合はカウント可能。(画像28, 29)

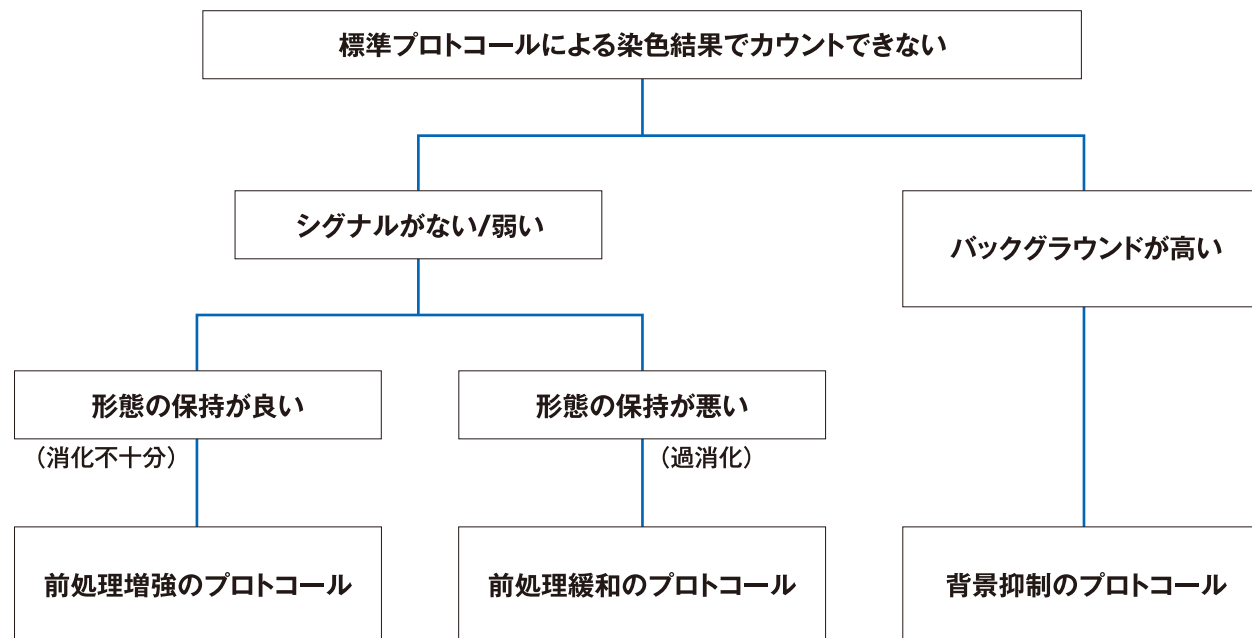
カウント可能なエリアがない場合の再染色用プロトコール

過消化 → 前処理緩和 Protocol#

プロトコールの設定について

■ 再染色用プロトコルの選定

各施設で最適化した標準プロトコルでも、条件が適さず判定できない染色結果が得られる場合があります。3パターン別の再染色用プロトコルを事前に設定しておき、判定不可の場合には下記のフローに従い、再染色用プロトコルを特定してください。標準プロトコルでの最初の成功率は93%、再染色用プロトコルの使用による成功率は97%であったとの報告があります。



■ プロトコルの条件変更と期待される効果

Protocol の変更項目	影響する項目	低い/短い ← → 高い/長い
Cell Conditioning (CC2) 処理時間	シグナル	弱い ← → 強い
	バックグラウンド	低い ← → 高い
	核染色	濃い ← → 薄い
	細胞形態	ダメージ弱い ← → ダメージ強い
ISH-Protease 3 処理時間	シグナル	弱い ← → 強い
	バックグラウンド	低い ← → 高い
	核染色	濃い ← → 薄い
	細胞形態	ダメージ弱い ← → ダメージ強い
Stringency Wash 温度	バックグラウンド	高い ← → 低い
SISH Multimer 処理時間 SISH Chromogen 処理時間	シグナル	弱い ← → 強い
	バックグラウンド	低い ← → 高い
Red Multimer 処理時間 Red Chromogen 処理時間	シグナル	弱い ← → 強い
	バックグラウンド	低い ← → 高い

■ 標準プロトコールと再染色用プロトコール

ー乳癌（手術材料）ー

最適化した標準プロトコールと再染色用のプロトコールについて、番号と条件を記入してください。

Procedure: GX → Dual ISH CKT XT/LT → XT Dual ISH CKT ULTRA → U Dual ISH CKT	推奨	標準	前処理増強	前処理緩和	背景抑制
Protocol No.					
Deparaffinization	Selected	Selected	Selected	Selected	Selected
Extended Deparaffinization	Selected				
Cell Conditioning #	Mild	12 min	min	min	min
	Standard	12 min	min	min	min
	Extended	12 min	min	min	min
ISH Protease-3	16 min	min	min	min	min
Denaturation	20 min	min	min	min	min
Hybridization	6 hours	hours	hours	hours	hours
Stringency wash	72°C	°C	°C	°C	°C
SISH Multimer	24 min	min	min	min	min
SISH Chromogen	8 min	min	min	min	min
Red Multimer	32 min	min	min	min	min
Red Chromogen	12 min	min	min	min	min
Counterstain/Hematoxylin II	8 min	min	min	min	min
Post Counterstain/Bluing Reagent	4 min	min	min	min	min

■ 標準プロトコールと再染色用プロトコール

ー乳癌（生検材料）ー

最適化した標準プロトコールと再染色用のプロトコールについて、番号と条件を記入してください。

Procedure: GX → Dual ISH CKT XT/LT → XT Dual ISH CKT ULTRA → U Dual ISH CKT	推奨	標準	前処理増強	前処理緩和	背景抑制
Protocol No.					
Deparaffinization	Selected	Selected	Selected	Selected	Selected
Extended Deparaffinization	Not Select				
Cell Conditioning # Mild	12 min	min	min	min	min
Standard	12 min	min	min	min	min
Extended	12 min	min	min	min	min
ISH Protease-3	8 min	min	min	min	min
Denaturation	20 min	min	min	min	min
Hybridization	6 hours	hours	hours	hours	hours
Stringency wash	72°C	°C	°C	°C	°C
SISH Multimer	16 min	min	min	min	min
SISH Chromogen	4 min	min	min	min	min
Red Multimer	32 min	min	min	min	min
Red Chromogen	12 min	min	min	min	min
Counterstain/Hematoxylin II	8 min	min	min	min	min
Post Counterstain/Bluing Reagent	4 min	min	min	min	min

■ 標準プロトコールと再染色用プロトコール

－胃癌（手術材料）－

最適化した標準プロトコールと再染色用のプロトコールについて、番号と条件を記入してください。

Procedure: GX → Dual ISH CKT XT/LT → XT Dual ISH CKT ULTRA → U Dual ISH CKT	推奨	標準	前処理増強	前処理緩和	背景抑制
Protocol No.					
Deparaffinization	Selected	Selected	Selected	Selected	Selected
Extended Deparaffinization	Selected				
Cell Conditioning #	Mild	12 min	min	min	min
	Standard	12 min	min	min	min
	Extended	12 min	min	min	min
ISH Protease-3	16 min	min	min	min	min
Denaturation	20 min	min	min	min	min
Hybridization	6 hours	hours	hours	hours	hours
Stringency wash	72°C	°C	°C	°C	°C
SISH Multimer	24 min	min	min	min	min
SISH Chromogen	8 min	min	min	min	min
Red Multimer	32 min	min	min	min	min
Red Chromogen	12 min	min	min	min	min
Counterstain/Hematoxylin II	8 min	min	min	min	min
Post Counterstain/Bluing Reagent	4 min	min	min	min	min

■ 標準プロトコールと再染色用プロトコール — 胃癌（生検材料） —

最適化した標準プロトコールと再染色用のプロトコールについて、番号と条件を記入してください。

Procedure: GX → Dual ISH CKT XT/LT → XT Dual ISH CKT ULTRA → U Dual ISH CKT	推奨	標準	前処理増強	前処理緩和	背景抑制
Protocol No.					
Deparaffinization	Selected	Selected	Selected	Selected	Selected
Extended Deparaffinization	Not Select				
Cell Conditioning # Mild	12 min	min	min	min	min
Standard	12 min	min	min	min	min
Extended	12 min	min	min	min	min
ISH Protease-3	8 min	min	min	min	min
Denaturation	20 min	min	min	min	min
Hybridization	6 hours	hours	hours	hours	hours
Stringency wash	72°C	°C	°C	°C	°C
SISH Multimer	16 min	min	min	min	min
SISH Chromogen	4 min	min	min	min	min
Red Multimer	32 min	min	min	min	min
Red Chromogen	12 min	min	min	min	min
Counterstain/Hematoxylin II	8 min	min	min	min	min
Post Counterstain/Bluing Reagent	4 min	min	min	min	min

参 考 資 料

■ 製品リーフレット、および便利ツール

- 乳癌におけるHER2 DISH法の有用性と判定のコツ 埼玉県立がんセンター 黒住 昌史先生 執筆
- HER2検査ガイド
- 製品添付文書各種
 - ベンタナ I-VIEW パスウェー HER2 (4B5)
 - ベンタナ ultraView パスウェー HER2 (4B5)
 - ベンタナ インフォーム Dual ISH HER2 キット
- HER2 DISHトラブルシュートフロー
- ベンタナ インフォーム Dual ISH HER2 キット 鏡検の手引き
- HER2 DISH カウント表
- HER2 DISH 染色手順チェックリスト

■ HER2 Dual ISH Training Resources (英語)

- INFORM HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail Assay Training and Certification Program
[HER2DualISH.com](https://www.her2dualish.com)
- Ventana YouTube Channel
 - [Lesson 1 - INFORM HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail](#)
 - [Lesson 2 - Preanalytical Considerations](#)
 - [Lesson 3 - Automated Staining Procedure](#)
 - [Lesson 4 - Interpretation and Enumeration](#)
 - [Lesson 5 - Troubleshooting](#)

資料のご請求は、弊社営業担当者またはカスタマーサポートセンターへお問い合わせください。
カスタマーサポートセンター ☎ 0120-868-555