

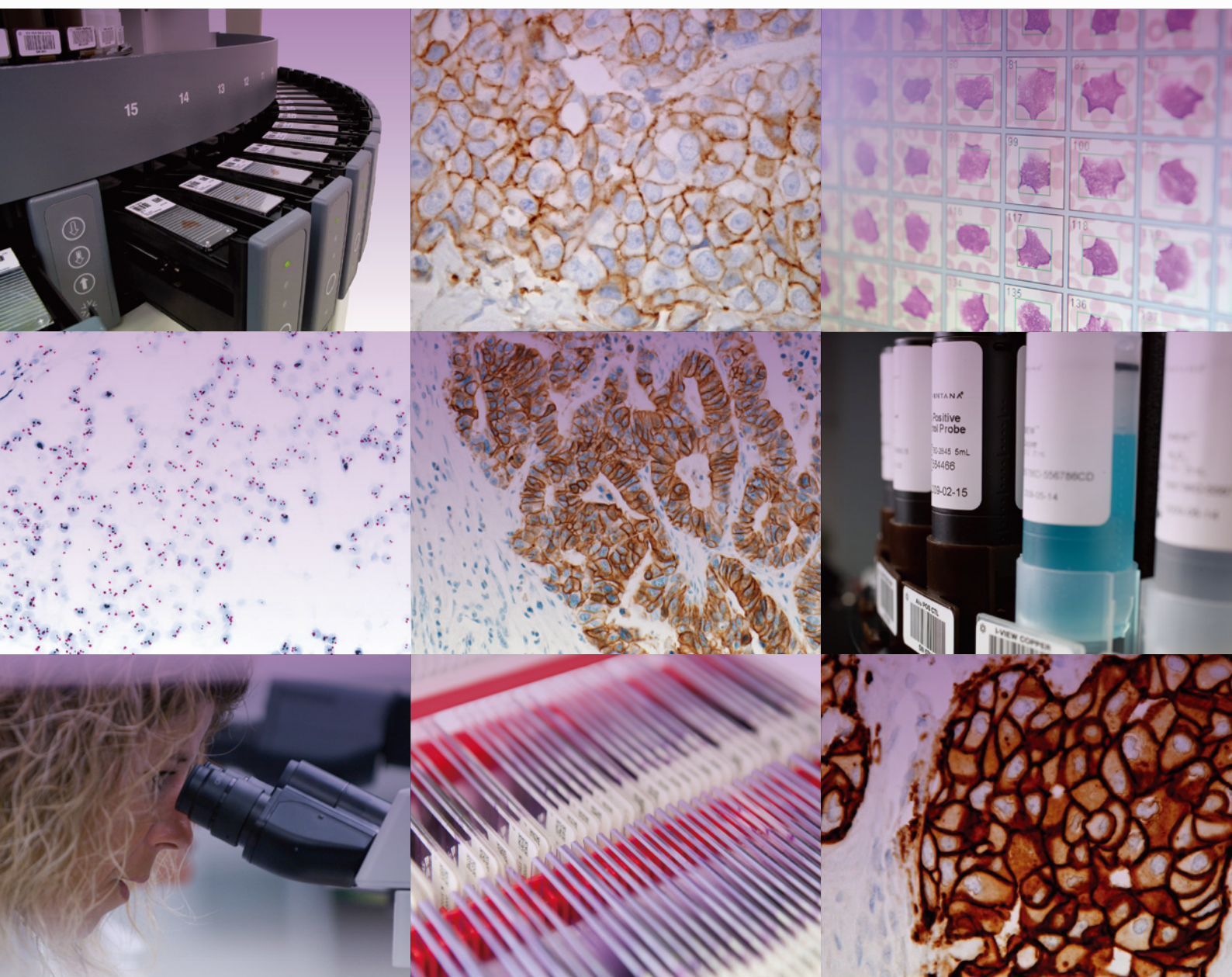
ロシュ・ダイアグノスティックス株式会社

HER2検査ガイド

ベンタナ ultraView パスウェー HER2(4B5)
ベンタナ DISH HER2 キット

体外診断用医薬品製造販売承認番号:22300AMX01167000

体外診断用医薬品製造販売承認番号:30300EZ00043000



はじめに

乳癌においてHER2(ヒト上皮成長因子受容体2型)は予後予測因子であり、乳癌の15～25%にHER2遺伝子増幅およびタンパク過剰発現が認められ、HER2陽性乳癌は予後不良であることがわかっています。

また、HER2は抗HER2治療薬の効果予測因子でもあり、2001年に日本で最初のヒト化モノクローナル抗体乳癌治療薬として承認されたトラスツズマブをはじめ、ペルツズマブやT-DM1などの種々の抗HER2治療薬の投与に先立って、HER2のタンパク過剰発現および遺伝子増幅の検査が、投与対象の患者選別や治療効果予測に欠かせない検査となっています。

また、胃癌についても国際第Ⅲ相試験であるToGA試験において、標準的化学療法にトラスツズマブを併用することで、生存期間の有意な延長をもたらすことが示され、日本では2011年3月にトラスツズマブがHER2陽性進行・再発胃癌に適応拡大されています。ToGA試験においては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。¹⁾乳癌同様に胃癌においても、抗HER2治療薬の投与の適応を判断する上で、HER2遺伝子増幅およびタンパク過剰発現の検査が有用です。

近年、HER2タンパクを特異的ターゲットとする分子標的薬の開発が相次ぎ、治療による生存率の向上がもたらされる中で、一人でも多くの対象患者を適正に選別するための精度向上がHER2検査に求められています。

本誌は、ロシュ・ダイアグノスティックス(株)が提供するHER2検査を適正に実施していただくことを目的とし、検体の取扱い、染色操作、判定方法などの推奨法を示した検査ガイドです。

■HER2検査

ロシュ・ダイアグノスティックス(株)では、HER2のタンパク過剰発現の検査薬であるベンタナ ultraView パスウェー HER2(4B5)と、遺伝子増幅の検査薬であるベンタナ DISH HER2 キットが体外診断用医薬品として承認されています。

INDEX

免疫組織化学染色 (IHC法) 3

ベンタナ ultraView パスウェー HER2 (4B5)

I. 製品概要	3
II. 試薬の準備 (試薬の登録・バッファーの充填)	5
III. 機器の定期メンテナンス	5
IV. 検体処理 (検体採取～包埋)	5
V. 検体スライドの作製 (薄切～染色前処理)	6
VI. 精度管理	7
VII. 測定 (操作) 方法	7
VIII. 推奨プロトコール	8
IX. 染色結果の判定	9
X. トラブルシュート	12

Dual Color *in situ* Hybridization法 (DISH法) 13

ベンタナ DISH HER2 キット

I. 製品概要	13
II. 試薬の準備 (試薬の登録・バッファーの充填)	15
III. 導入時の機器整備	16
IV. 機器の定期メンテナンス	16
V. 検体処理 (検体採取～包埋)	16
VI. 検体スライドの作製 (薄切～染色前処理)	17
VII. 測定 (操作) 方法	18
VIII. 染色プロトコールの設定	20
IX. 精度管理	22
X. 染色結果の判定	23
XI. トラブルシュート	27

参考 31

乳癌におけるHER2検査フローチャート	31
胃癌におけるHER2検査フローチャート	32

製品一覧 33

ベンタナ ultraView パスウェー HER2 (4B5)	33
ベンタナ DISH HER2 キット	34

参考文献

免疫組織化学染色 (IHC法)

ベンタナ ultraView パスウェー HER2 (4B5) は、Roche社製の自動染色装置であるベンチマーク用に開発され、HER2タンパクの過剰発現を免疫組織化学染色 (IHC法) により検出する検査キットです。

1. 製品概要

■キット構成 *一次抗体と各検出キットの組み合わせ (別売り) で体外診断用医薬品として承認されています。

ベンタナ ultraView パスウェー HER2 (4B5) 体外診断用医薬品製造販売承認番号: 22300AMX01167000

●一次抗体

ベンタナ パスウェー HER2 (4B5) 商品コード: 518-107918

構成試薬	成分	包装単位
一次抗体	抗HER2ウサギモノクローナル抗体 (4B5)	5mL (50テスト)

●検出キット

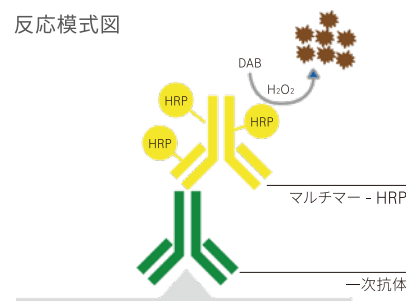
ベンタナ ultraView DAB ユニバーサルキット 商品コード: 518-109431

構成試薬	成分	包装単位
インヒビター	過酸化水素	25mL (250テスト)
マルチマー-HRP	ペルオキシダーゼ標識抗ウサギIgGヤギポリクローナル抗体 ペルオキシダーゼ標識抗マウスIgG/IgMヤギポリクローナル抗体	25mL (250テスト)
DAB試薬	3,3'-ジアミノベンジジン	25mL (250テスト)
H ₂ O ₂ 試薬	過酸化水素	25mL (250テスト)
COPPER試薬	硫酸銅	25mL (250テスト)

●反応原理

本キットは、マルチマーを使用した免疫組織化学染色により、生体由来の組織又は細胞中のHER2タンパクを検出します。検体スライド上のHER2タンパクに一次抗体を反応させます。次にペルオキシダーゼを標識したマルチマーを反応させると検体スライド上に、HER2-抗HER2ウサギモノクローナル抗体 (4B5) -ペルオキシダーゼ標識抗ウサギIgGヤギポリクローナル抗体結合物が形成されます。この結合物にDAB試薬、H₂O₂試薬およびCOPPER試薬を添加すると、酵素反応により、検体スライド上のHER2タンパクが茶褐色に染色されます。

反応模式図



■適応機種

- ベンタナ ベンチマークGX (医療機器:13B1X00201000053)
- ベンタナXTシステム ベンチマークXT (医療機器:13B1X00201000043)
- ベンタナ ベンチマークULTRA (医療機器:13B1X00201000050)

■別途必要な器具および試薬等

●バッファー類、補助試薬、バーコードラベル

商品コード	製品名	包装単位
518-102982	EZバッファー 10X (ベンチマーク用)	2L
518-100599 または 518-108922*	液体カバースリップHI または 液体カバースリップULTRA ※	2L
518-103033	リアクションバッファー 10X	2L
518-103002 または 518-108939*	CC1バッファー または CC1バッファー ULTRA ※	2L
518-102319	ヘマトキシリン核染色試薬 II	250テスト
518-100889	炭酸リチウム試薬	250テスト
518-111182	陰性コントロール ウサギモノクローナル抗体用	250テスト
518-107895	HER2 4 in 1 コントロールスライド	10枚
518-103095	E-bar ラベル II	1個 (540枚)

※ベンチマークULTRAの場合

●その他

器具 / 試薬	掲載ページ
コーティング スライドガラス	p.6 スライドガラスの 準備
イムノブロック (DSファーマバイオメディカル社) またはスキムミルク	p.6 撥水防止処理
脱水・透徹用のアルコール、キシレン	
封入用のカバーガラス、封入剤	
精製水または脱イオン水	
光学顕微鏡	
精度管理用コントロールスライド	p.7 自家製精度管理用 コントロールスライド

免疫組織化学染色 (IHC法)

II. 試薬の準備 (試薬の登録・バッファーの充填)

1. 初回使用時に試薬本体の外箱、またはラベルに付いている登録ボタンを、装置の登録ワンドで読み取り登録します。
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 SHIPPING キーを外し、希釈せずにそのまま使用します。使用しない時はキャップをして冷蔵庫に保管してください。
3. EZ バッファーおよびリアクションバッファーは精製水または脱イオン水で10倍希釈し、自動染色装置へ充填します。
4. 液体カバースリップ、CC1 バッファーは希釈せず、そのまま自動染色装置へ充填します。

III. 機器の定期メンテナンス

安定した染色性を維持するために、定期的の下記のメンテナンスを推奨しています。
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。

- 毎日 : 機器の清掃
- 毎週 : データメンテナンスの実行
- 毎月 : 各バッファータンク、スライドヒーター、廃液タブの洗浄
- 3か月毎 : デコンタミネーション、スライドヒーターの温度チェック、スキャンデスク・デフラグメントの実行
- 1年毎 : アーカイブシステムデータの実行

IV. 検体処理 (検体採取～包埋)

検体採取から包埋までの工程が染色不良の原因となることがあります。
病理標本作製過程における操作にじゅうぶんに注意してください。

- 検体採取後は速やかに固定液に入れてください。1時間以内が推奨されます。2) 3)
- 固定は10%中性緩衝ホルマリンを用いて、6時間以上72時間以内の処理が推奨されます。4) 5) 6)
- 固定液は組織に対してじゅうぶんな液量をご用意ください。組織の10倍以上の量が推奨されます。3)
- 固定する組織が大きい場合は、適切な幅で割を入れてください。5-10mmが推奨されます。3)
- 脱脂をじゅうぶんに行ってください。
- ティッシュプロセッサの薬液は適度に交換してください。

V. 検体スライドの作製(薄切～染色前処理)

■スライドガラスの準備

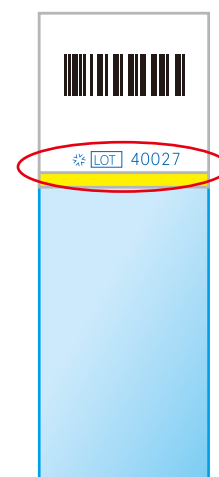
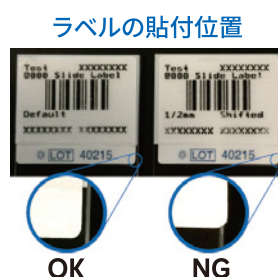
- シランなどがコーティングされたスライドガラスをご使用ください。高温多湿での保管を避けて、有効期限内のスライドガラスをご使用ください。
- 下記のスライドガラスが推奨されます。
松浪硝子：プラチナプロ 武藤化学：New Silane III

■薄切

- 薄切する切片の厚さは4 μ mに設定してください。
- スライドガラス上の試薬が広がる範囲に切片を貼り付けます。ガラスの側面から1mm、ラベル・フロストから5mm離してください。切片を貼り付ける部分は素手で触れないように注意してください。
- 薄切後の乾燥は、約40 $^{\circ}$ Cで一晩の処理を推奨します。切片の剥離防止のためベーキングを行う場合は、60 $^{\circ}$ Cで30分以内の処理にとどめ、長時間、高温に置くことは避けてください。
- 乾燥後の標本は保管せず、速やかに染色してください。

■ラベルの貼付

- 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字します。
- 透明なフラップをしわにならないように注意して貼ります。
- 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わせて、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LOT部分(右図○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。
- 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。



■撥水防止処理

撥水とは、スライドガラス表面の変質などにより、バッファーなどの溶液をはじいてしまう現象で、染色不良(染まらない、染色ムラなど)の原因となります。スライドガラス表面の変質の要因として、製造後から長期間経過した場合や高温多湿で保管された場合、薄切後の乾燥で60 $^{\circ}$ C以上の高温に1時間以上置いた場合等があげられます。

●マニュアルで行う場合：5%SMEZ前処理法

1. 希釈済EZバッファーに5%の濃度になるようにスキムミルクを溶解します。
50mL調製する場合：希釈済EZバッファー50mL+スキムミルク2.5g
150mL調製する場合：希釈済EZバッファー150mL+スキムミルク7.5g
2. ドーゼに移し、バーコードを貼付した脱パラフィン前のスライドを10分間浸漬します。
3. スライド裏面をしっかりと拭い、染色モジュールにセットします。このとき、スライド表面の5%SMEZは拭き取らず、そのまま残してください。

●自動で行う場合：IMBR自動撥水防止処理法

1. イムノブロック (DSファーマバイオメディカル社) の原液とリアクションバッファーの原液を4:1の割合で調製します。
25mL調製する場合：イムノブロック(原液) 20mL+リアクションバッファー(原液) 5mL
2. 前処理用ディスペンサーに充填し、染色モジュールにセットします。
3. プロトコールのPretreatmentを選択し、処理時間は24minを選択してください。
4. 調製後は4 $^{\circ}$ Cで保管します。6週間までの安定性が確認されています。

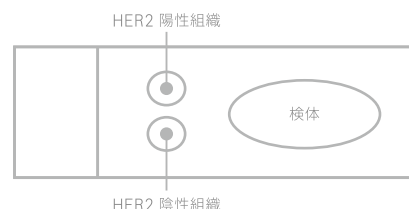
免疫組織化学染色 (IHC法)

VI. 精度管理

染色を行う場合には、必ず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してください。

■自家製精度管理用コントロールスライド

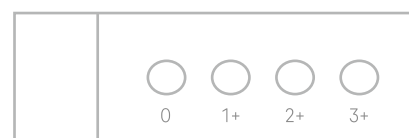
- 結果が既知である組織（陽性および陰性）を、検体と同じスライドガラス上に載せて染色する方法を推奨します。
- コントロール組織と検体は、同時に薄切してスライドに貼り付けることを推奨します。
- 同じスライドガラスに載せられない場合は、結果が既知である組織（陽性および陰性）を別のスライドガラスに載せたコントロールスライドを用意し、同一ランで染色します。この場合、長期保存したコントロールスライドは使用しないでください。また、HER2 4 in 1 コントロールスライド（商品コード：518-107895）でも代用可能です。



■動作確認用コントロールスライド:HER2 4 in 1 コントロールスライド（商品コード:518-107895）

染色パターンが異なる4種類のセルブロックを1枚のスライドガラス上に載せています。機器のメンテナンスや点検、修理後の確認染色の際に使用します。

Cell Line	HER2 IHC スコア	陽性率と細胞膜染色パターン
MDA-MB-231	0	<10% 陰性～部分的に陽性
T47D	1+	>10% かすかに陽性～部分的に陽性
MDA-MB-453	2+	>10% 弱陽性～全周性に陽性
BT-474	3+	>10% 全周性に陽性～強陽性



■陰性コントロール一次抗体:陰性コントロール ウサギモノクローナル抗体用（商品コード:518-111182）

一次抗体の代わりに陰性コントロールを使用して染色することにより、一次抗体を除く構成試薬の非特異的反応を確認します。

VII. 測定 (操作) 方法

本キットは弊社の自動染色装置を用いて行います。代表的な自動染色装置として「ベンタナ ベンチマークULTRA」を使用した場合の操作方法を記載します。詳しくは、自動染色装置の取扱説明書ならびに試薬の添付文書を参照してください。

■操作手順

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ソフトウェアを立ち上げます。
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、ソフトウェアに保存します。
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）
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。（p.6 ラベルの貼付 参照）
7. マニュアルで撥水防止処理を行う場合は、5%SMEZに浸漬します。（p.6 撥水防止処理 参照）
8. 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全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、弊社カスタマーサポートセンターへご連絡ください。
9. 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。

10. 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、**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。

脱パラフィンおよび前処理

- (1) 検体スライドを加熱してパラフィンを溶融し、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。

一次抗体の反応および検出

ベンタナ ultraView DABユニバーサルキットの場合は製品の添付文書を参照してください。

- (1) 検体スライド上にインヒビターを1滴加え、4分間反応させます。
- (2) 検体スライドを洗浄後、一次抗体を1滴加え、12分間反応させます。
- (3) 検体スライドを洗浄後、マルチマーHRPを1滴加え、8分間反応させます。
- (4) 検体スライドを洗浄後、DAB試薬とH₂O₂試薬を1滴ずつ加え、8分間反応させます。
- (5) 検体スライドを洗浄後、COPPER試薬を1滴加え、4分間反応させます。その後、洗浄を行います。

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、設定時間反応させます。
- (2) 検体スライドを洗浄後、炭酸リチウム試薬を1滴加え、設定時間反応させます。その後、洗浄を行います。

11. 染色が終了したら、自動染色装置から検体スライドを取り出し、水洗、脱水、透徹後、封入し、光学顕微鏡により鏡検を行います。

VIII. 推奨プロトコール

Procedure: U ultraView DAB (ULTRA) : XT ultraView DAB v3 (XT) : BMK ultraView DAB Par (GX)

染色工程	ultraView DAB	
	ベンチマーク ULTRA	ベンチマーク XT/GX
Baking (ベーキング)	None	None
Deparaffinization (脱パラフィン)	Selected	Selected
Cell Conditioning (熱処理)	CC1 mild	CC1 mild
Enzyme (酵素処理)	None required	None required
Antibody (一次抗体)	36°C, 12min	37°C, 16min
ultraWash (追加洗浄)	Selected	Selected
Counterstain (核染色)	Hematoxylin II, 4min	Hematoxylin II, 4min
Post Counterstain (色出し)	Bluing, 4min	Bluing, 4min

免疫組織化学染色 (IHC法)

IX. 染色結果の判定

HER2タンパクが存在する場合、茶褐色に染色されます。HER2タンパク過剰発現の判定は、腫瘍細胞の細胞膜における染色性およびその染色強度を対象とし、細胞質における反応は判定対象外とします。判定基準については、学会またはHER2検査病理部会等の推奨する判定基準に従ってください。参考として、乳癌・胃癌HER2病理診断ガイドライン 第2版に掲載されている判定基準を記載します。5) 7)

■標本の観察手順

1. 精度管理用コントロールスライドおよび陰性コントロール試薬にて染色した検体スライドの染色結果を確認し、正常に染色工程が行われたことを確認します。
2. 検体スライドの腫瘍細胞における染色像を確認します。
3. 光学顕微鏡の2～4倍対物レンズを使用して、腫瘍全体を観察し、細胞膜における染色性と陽性率を確認します。次に10～20倍対物レンズで細胞膜への染色強度と陽性率を評価します。必要に応じて、40倍対物レンズで確認してください。

■乳癌におけるスコアリングの判定基準

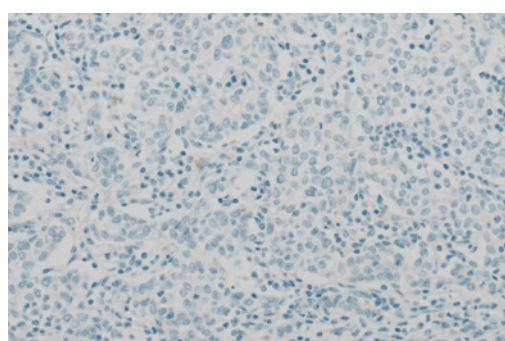
乳癌は、浸潤部分における腫瘍細胞の陽性所見のみを検索対象とし、非浸潤部分の腫瘍細胞は検索対象から除外します。陽性所見が細胞膜に局在していることを確認し、細胞質のみ染色されている場合は陰性と判定します。検体組織内の腫瘍細胞における染色像、強度、陽性率の結果より、スコア0～3+にスコアリングします。

染色パターン	スコア	判定
>10%の腫瘍細胞*に強い完全な全周性の膜染色が認められる	3+	陽性
>10%の腫瘍細胞に弱/中等度の全周性の膜染色が認められる	2+	未確定 (equivocal)
>10%の腫瘍細胞にかすかな/かろうじて認識できる不完全な膜染色が認められる	1+	陰性
染色像が認められない、 または ≤10%の腫瘍細胞にかすかな/かろうじて認識できる不完全な膜染色が認められる	0	

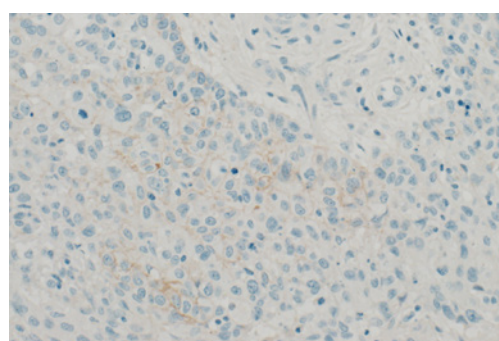
*低倍率の対物レンズで容易に評価でき、均一および近接する浸潤細胞集団

乳癌・胃癌HER2病理診断ガイドライン 第2版より抜粋

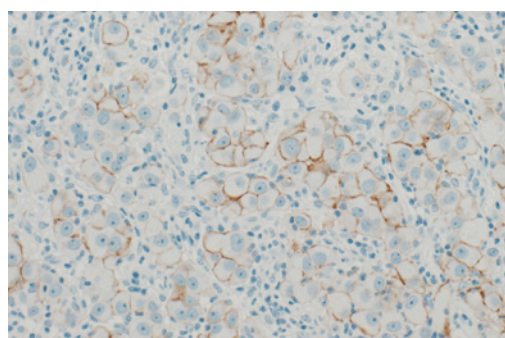
■乳癌におけるHER2タンパクの代表的な染色例



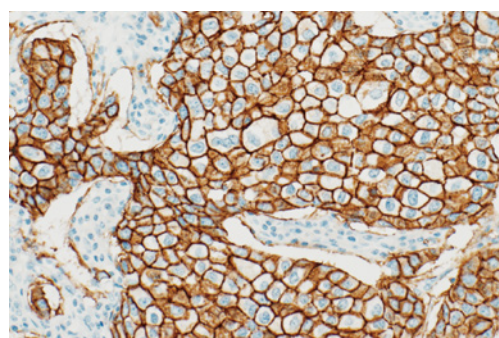
Score 0



Score 1+



Score 2+



Score 3+

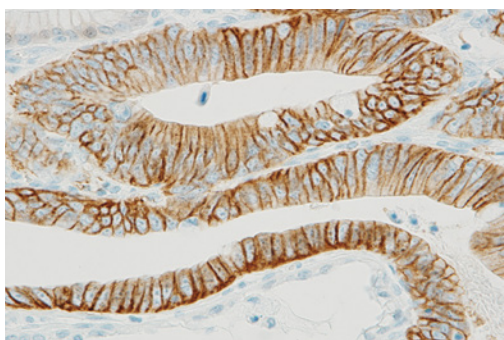
■胃癌におけるスコアリングの判定基準

胃癌では、腫瘍内の不均一性 (Heterogeneity) がしばしば認められるため、はじめに腫瘍全体を観察してください。陽性所見が細胞膜に局在していることを確認し、細胞質のみ染色されている場合は陰性と判定します。全周性ではなく基底膜および側方側の細胞膜のみに陽性反応が認められる場合もあります。検体組織内の腫瘍細胞における染色像、強度、陽性率の結果より、スコア0～3+にスコアリングします。

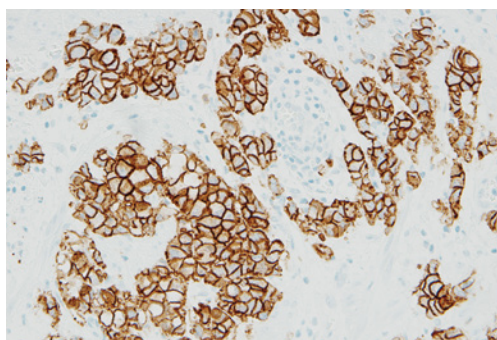
手術検体	生検検体	スコア	判定
10%以上の腫瘍細胞に強い完全な側方あるいは側方・基底膜側の膜染色が認められる	強い完全な側方あるいは側方・基底膜側の膜染色を示す5個以上の腫瘍細胞クラスターが認められる (腫瘍細胞における染色性を示す細胞の比率は問わない)	3+	陽性
10%以上の腫瘍細胞に軽～中等度の完全な側方あるいは側方・基底膜側の膜染色が認められる	軽～中等度の完全な側方あるいは側方・基底膜側の膜染色を示す5個以上の腫瘍細胞クラスターが認められる (腫瘍細胞における染色性を示す細胞の比率は問わない)	2+	Equivocal
10%以上の腫瘍細胞にかすかな/かろうじて膜染色が認められる； 染色性は腫瘍細胞膜の一部にのみ認められる	かすかな/かろうじて膜染色を示す5個以上の腫瘍細胞クラスターが認められる	1+	陰性
染色性が認められない、 もしくは膜染色が認められる腫瘍細胞が10%未満	腫瘍細胞に染色性が認められない	0	

乳癌・胃癌HER2病理診断ガイドライン 第2版より抜粋

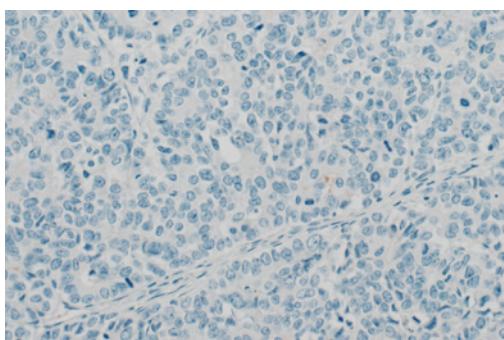
■胃癌におけるHER2タンパクの代表的な染色例



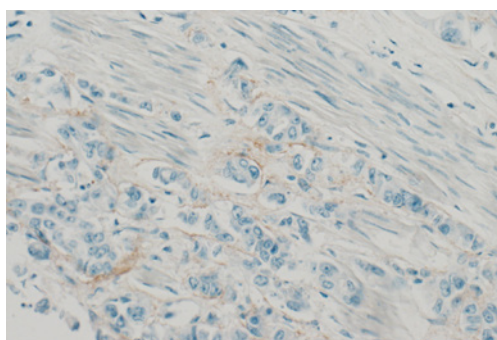
側方または側方・基底膜側の細胞膜への染色



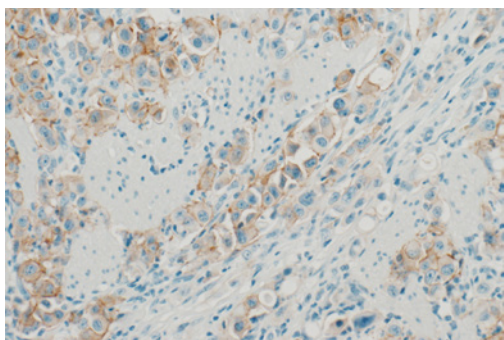
全周性の染色



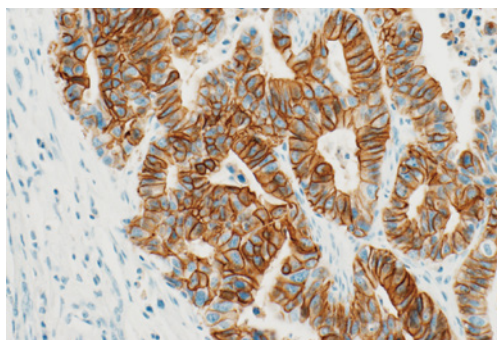
Score 0



Score 1+



Score 2+



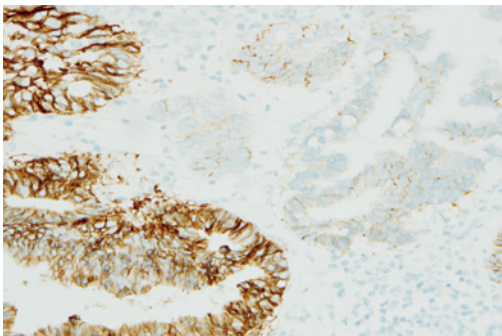
Score 3+

免疫組織化学染色 (IHC法)

■判定上の注意

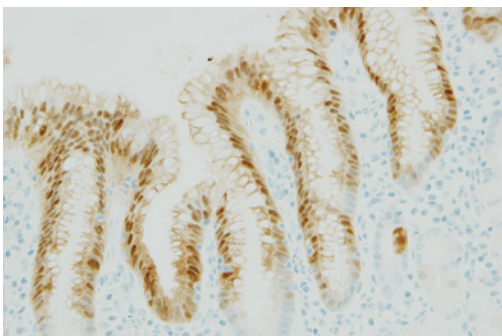
●腫瘍内の不均一性 (Heterogeneity)

同一腫瘍の中でHER2過剰発現を示す部分と示さない部分の両方を認めることがあります。腫瘍全体を観察して、判定エリアを特定してください。

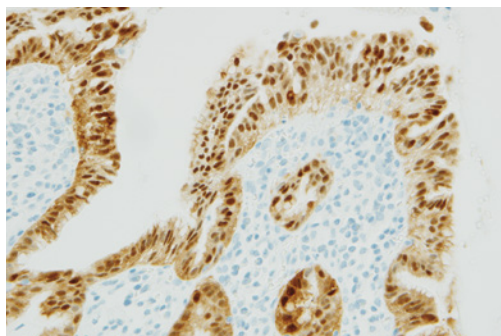


●HER2 (4B5) の交差性について

正常および腫瘍組織の一部の核や細胞質に交差反応を認める場合があります。HER2の判定は腫瘍細胞の細胞膜における反応が判定対象となりますので、これらの染色像は判定対象外となります。



正常上皮細胞の細胞質および核における反応



腫瘍細胞の細胞質および核における反応

X. トラブルシュート

下記の表を参照して、トラブルシュートを行ってください。

組織の種類：精度管理用コントロール組織=コ、検体組織=検 染色結果：症状が無く良好=○、症状が有り観察に不適=×

症状	コ	検	原因	対策
シグナルが無い、 または弱い	×	×	試薬ディスペンサーの滴下不良があった	SHIPPINGキーが外れていることを確認する 試薬ディスペンサーの液量やノズルの詰まり、気泡の有無を確認する ⇒p.7
	×	×	プロトコールが適切でなかった	ラベルに印字されているプロトコール番号の設定値が正しいことを確認する
	×	×	薄切後の長期保管により抗原性が低下していた	薄切後は速やかに染色する ⇒p.6
	○	×	固定条件が適切でなかった	適切な条件で固定する ⇒p.5
	×	×	切片の厚さが適切でなかった	4μmに薄切する ⇒p.6
	×	×	スライドガラスの撥水により 試薬が広がらなかった	適切な撥水防止処理を実施する ⇒p.6
	×	×	機器動作に不具合があった	機器動作を確認する (洗浄ノズル、ヒートブロック、ディスペンスハンマー等) ⇒弊社カスタマーソリューションセンターまでご連絡ください
バックグラウンドが高い	×	×	プロトコールが適切でなかった	ラベルに印字されているプロトコール番号の設定値が正しいことを確認する
	○	×	固定条件が適切でなかった	適切な条件で固定する ⇒p.5
	×	×	切片の厚さが適切でなかった	4μmに薄切する ⇒p.6
	○	×	切片のしわにより試薬が攪拌されず 一部に停滞してしまった	しわに注意し再薄切を行う
	×	×	機器動作に不具合があった	機器動作を確認する (洗浄ノズル、ヒートブロック、ディスペンスハンマー等) ⇒弊社カスタマーソリューションセンターまでご連絡ください
不純物の混在	×	×	切片やスライドガラスが汚れていた	薄切時の水槽の水は、蒸留装置から直接採水したきれいな精製水、または脱イオン水を使用する
	○	×	組織ブロックにコンタミがあった	ブロック作製までの工程を確認する ⇒p.5
	×	×	機器やバッファーにコンタミがあった	デコンタミネーションを実施する ⇒機器取扱説明書参照

Dual Color *in situ* Hybridization法 (DISH法)

ベンタナ DISH HER2 キットは、独自の技術であるSilver *in situ* Hybridization法 (SISH法) をベースとしたDual Color *in situ* Hybridization法 (DISH法) により、組織または細胞中のHER2遺伝子およびHER2遺伝子が局在する17番染色体のセントロメア (Chr17) を、それぞれ黒色と赤色のシグナルとして検出します。検出されたシグナルは光学顕微鏡下で、腫瘍組織の形態学的特徴との同時観察が可能です。

1. 製品概要

■キット構成

カクテルプローブと2種類の検出キット (別売り) との組み合わせにより体外診断用医薬品として承認されています。

ベンタナ DISH HER2 キット 体外診断用医薬品製造販売承認番号:30300EZX00043000

●カクテルプローブ

ベンタナ HER2 DNA カクテルプローブ 商品コード:518-114800

構成試薬	成分	包装単位
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)	6mL (30テスト)

●検出キット

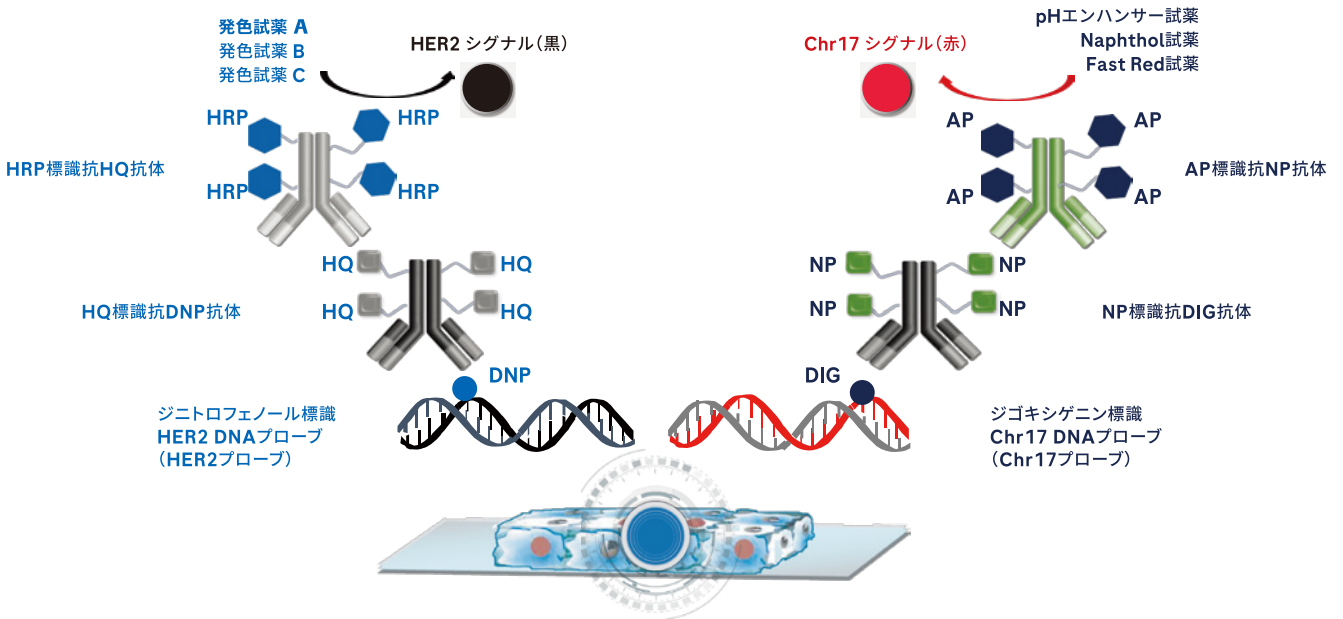
ベンタナ Silver ISH DNP キット 商品コード:518-114817

構成試薬	成分	包装単位
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	6mL (60テスト)
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	6mL (60テスト)
発色試薬A	酢酸銀	12mL (60テスト)
発色試薬B	ハイドロキノン	6mL (60テスト)
発色試薬C	過酸化水素	6mL (60テスト)

ベンタナ Red ISH DIG キット 商品コード:518-114824

構成試薬	成分	包装単位
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	6mL (60テスト)
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	6mL (60テスト)
pH エンハンサー試薬	塩化マグネシウム	12mL (60テスト)
Naphthol 試薬	ナフトールAS-TR	6mL (60テスト)
Fast Red 試薬	ファストレッドKL塩	12mL (60テスト)

● 反応原理図



検体上のHER2遺伝子および17番染色体のセントロメアにジニトロフェノール(DNP)標識HER2 DNAプローブとジゴキシゲニン(DIG)標識Chromosome 17 DNAプローブとのカクテル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、HQ標識抗DNP抗体とHRP標識抗HQ抗体を反応させると、検体上に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(発色試薬A)、ヒドロキノン(発色試薬B)を過酸化水素(発色試薬C)とともに添加すると、酵素反応によりHER2が黒色に染色されます。続いて、NP標識抗DIG抗体と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、Chr17が赤色に染色されます。

■ 弊社既承認品(ベンタナ インフォーム Dual ISH HER2キット)および既承認品(FISH法)との比較

● 乳癌における相関性試験成績

119例の乳癌組織における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。乖離した1例は、増幅/非増幅の境界付近の検体でした。

605例の乳癌組織における本品と既承認品(FISH法)との一致率は92.7%であり、高い相関性が示されました。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。

ベンタナ DISH vs インフォーム DISH (既承認) 全体一致率:99.2%

		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%)

ベンタナ DISH vs FISH (既承認) 全体一致率:92.7%

		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%)

● 胃癌における相関性試験成績

119例の胃癌組織における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。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。

119例の胃癌組織における本品と既承認品(FISH法)との一致率は90.8%であり、高い相関性が示されました。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。

ベンタナ DISH vs インフォーム DISH (既承認) 全体一致率:96.6%

		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%)

ベンタナ DISH vs FISH (既承認) 全体一致率:90.8%

		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%)

Dual Color *in situ* Hybridization法 (DISH法)

■適応機種

- ベンタナ ベンチマークGX (医療機器:13B1X00201000053)
- ベンタナXTシステム ベンチマークXT (医療機器:13B1X00201000043)
- ベンタナ ベンチマークULTRA (医療機器:13B1X00201000050)

■別途必要な器具および試薬等

●バッファー類、補助試薬、バーコードラベル

商品コード	製品名	包装単位
518-102982	EZバッファー 10X (ベンチマーク用)	2L
518-100599または 518-108922	液体カバースリップHI または 液体カバースリップULTRA※	2L
518-103033	リアクションバッファー 10X	2L
518-103002または 518-108939	CC1バッファー または CC1バッファー ULTRA※	2L
518-102999または 518-108946	CC2バッファー または CC2バッファー ULTRA※	1L
518-103026	SSCバッファー 10X	2L
518-108892	ultraView Silver Wash II バッファー	2L
518-109547	ハイブレディ	83テスト
518-102289	ISH プロテアーゼ3 (0.02 units/mL)	200テスト
518-102319	ヘマトキシリン核染色試薬 II	250テスト
518-100889	炭酸リチウム試薬	250テスト
518-109530	HER2 Dual ISH 3-in-1 コントロールスライド	10枚
518-103095	E-bar ラベル II	1個 (540枚)

※ベンチマークULTRAの場合

●その他

器具 / 試薬	掲載ページ
コーティングスライドガラス	p.17 スライドガラスの準備
スキムミルク	p.17 撥水防止処理
透徹用のキシレン	p.18 操作手順
封入用のカバーガラス、封入剤	p.19 封入剤
精製水または脱イオン水	p.15 試薬の準備
光学顕微鏡	
精度管理用コントロールスライド	p.22 自家製精度管理用コントロールスライド

II. 試薬の準備 (試薬の登録・バッファーの充填)

- 1.初回使用時に試薬本体の外箱、またはラベルに付いている登録ボタンを、装置の登録ワンドで読み取り登録します。
- 2.本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 SHIPPING キーを外し、希釈せずにそのまま使用します。使用しない時はキャップをして冷蔵庫に保管してください。
- 3.下記の水質基準を満たす精製水を用いて、リアクションバッファーおよびEZバッファーは10倍希釈、SSCバッファーは5倍希釈し、自動染色装置へ充填します。精製水は、純水装置から直接採取したものを使用し、汲み置きされた水は使用しないでください。
- 4.液体カバースリップ、CC1バッファー、CC2バッファー、ultraView 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。

【注意】

DISH法を実施する際は、臨床・検査標準協会 (Clinical and Laboratory Standards Institute:CLSI) が定めた臨床検査室試薬用水 (Clinical Laboratory Reagent Water:CLRW) の規格※に準じた水をご使用ください。7) 中でも微生物のコンタミネーションによって大きな影響を受けるため、生菌数に関しては特に注意してください。

微生物のコンタミネーションを抑えるために、下記の点にご留意ください。

- 汲み置きの水の使用は避ける、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。

※CLRW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

III. 導入時の機器整備

本キットの導入にあたり、機器の整備および点検を実施してください。

詳細については、弊社カスタマーソリューションセンター（フリーダイヤル：0120-868-555）へお問い合わせください。

■廃液センサーの交換（ベンタナXTシステム ベンチマークXT、ベンタナ ベンチマークGX）

本キット専用の廃液センサーへ交換する必要があります。弊社サービスエンジニアが行います。

■レベル1チェック

本キットを使用する上で必要な機能の動作確認です。弊社サービスエンジニアが行います。

■デコンタミネーション

流路ラインおよび染色モジュールに付属している各種バッファータンク、20Lの希釈バッファータンクの洗浄操作です。3か月毎の実施を推奨します。

■バッファーの充填

調製が必要なバッファークラスは、CLSIが定める水質基準を満たす精製水で希釈し、自動染色装置に充填します。

IV. 機器の定期メンテナンス

安定した染色性を維持するために、定期的の下記のメンテナンスを推奨しています。

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。

- 毎日 : 機器の清掃
- 毎週 : データメンテナンスの実行
- 毎月 : 各バッファータンク、スライドヒーター、廃液タブの洗浄
- 3か月毎: デコンタミネーション、スライドヒーターの温度チェック、スキャンデスク・デフラグメントの実行
- 1年毎 : アーカイブシステムデータの実行

V. 検体処理（検体採取～包埋）

検体採取から包埋までの工程が染色不良の原因となることがあります。

病理標本作製過程における操作にじゅうぶんに注意してください。

- 検体採取後は速やかに固定液に入れてください。1時間以内が推奨されます。2) 3)
- 固定は10%中性緩衝ホルマリンを用いて、6時間以上72時間以内の処理が推奨されます。4) 5) 6)
- 固定液は組織に対してじゅうぶんな液量をご用意ください。組織の10倍以上の量が推奨されます。3)
- 固定する組織が大きい場合は、適切な幅で割を入れてください。5-10mmが推奨されます。3)
- 脱脂をじゅうぶんに行ってください。
- ティッシュプロセッサの薬液は適度に交換してください。

Dual Color *in situ* Hybridization法 (DISH法)

VI. 検体スライドの作製(薄切～染色前処理)

■スライドガラスの準備

シラン等がコーティングされたスライドガラス*をご使用いただくことを推奨します。高温多湿での保管を避けて、有効期限内のスライドガラスをご使用ください。なお、スライドガラスの種類によっては、スライドガラスに着色がみられる場合があります。

*松浪硝子工業社製「CREST(クレスト)」等

■薄切

- 薄切する切片の厚さは4 μ mに設定してください。
- 薄切時の水槽の水は、蒸留装置から直接採水したきれいな精製水または脱イオン水を使用してください。
- スライドガラス上の試薬が広がる範囲に切片を貼り付けます。(ガラスの側面から1mm、ラベル・フロストから5mm離してください。)切片を貼り付ける部分は素手で触れないように注意してください。
- 薄切後の乾燥は、約40 $^{\circ}$ Cで一晩の処理を推奨します。切片の剥離防止のためベーキングを行う場合は、60 $^{\circ}$ Cで30分以内の処理にとどめ、長時間、高温に置くことは避けてください。
- 乾燥後の標本は保管せず、速やかに染色してください。

■ラベルの貼付

- 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字します。
- 透明なフラップをしわにならないように注意して貼ります。
- 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わせて、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LOT部分(右図○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。
- 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。



■撥水防止処理

撥水とは、スライドガラス表面の変質などにより、バッファーなどの溶液をはじいてしまう現象で、染色不良(染まらない、染色ムラなど)の原因となります。スライドガラス表面の変質の要因として、製造後から長期間経過した場合や高温多湿で保管された場合、薄切後の乾燥で60 $^{\circ}$ C以上の高温に1時間以上置いた場合等があげられます。撥水が懸念される場合には、以下の処理を行ってください。

●5%SMEZ前処理法

1. 希釈済EZバッファーに5%の濃度になるようにスキムミルクを溶解します。
50mL調製する場合: 希釈済EZバッファー 50mL+スキムミルク2.5g
150mL調製する場合: 希釈済EZバッファー 150mL+スキムミルク7.5g
2. ドーゼに移し、バーコードを貼付した脱パラフィン前のスライドを10分間浸漬します。
3. スライド裏面をしっかりと拭い、染色モジュールにセットします。このとき、スライド表面の5%SMEZは拭き取らず、そのまま残してください。

VII. 測定(操作)方法

本キットは弊社の自動染色装置を用いて行います。代表的な自動染色装置として「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、以下の通りです。(使用する機種により、操作方法が異なります。詳しくは自動染色装置の取扱説明書ならびに試薬の添付文書を参照してください。)

■操作手順

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ソフトウェアを立ち上げます。
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、ソフトウェアに保存します。(p.21 推奨プロトコール 参照)
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)
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。(p.17 ラベルの貼付 参照)
7. 撥水防止処理を行う場合は5% SMEZに浸漬します。(p.17 撥水防止処理 参照)
8. 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全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か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。
9. 検体スライドを染色モジュールにセットし、スライドドロワーと試薬フードを閉めます。
10. 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の画面左上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。
11. 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。

脱パラフィンおよび前処理

- (1) 検体スライドを加熱してパラフィンを溶融し、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バッファーおよびCC2バッファーにより設定された条件で熱処理が行われます。
- (3) 検体スライドは、ISH プロテアーゼ3により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および検出

- (1) 検体スライドを洗浄後、ハイプレディ3滴が滴下され、プレハイブリダイゼーションの処理が行われます。
- (2) 検体スライド上にHER2 DNA カクテルプローブ2滴が滴下され、設定時間の反応を行います。
- (3) 検体スライドを洗浄後、HQ標識抗DNP抗体1滴が滴下され、設定時間の反応を行います。
- (4) 検体スライドを洗浄後、HRP標識抗HQ抗体1滴が滴下され、設定時間の反応を行います。
- (5) 検体スライドを洗浄後、発色試薬A 2滴に発色試薬Bと発色試薬Cが1滴ずつ滴下され、設定時間の反応を行います。
- (6) 検体スライドを洗浄後、NP標識抗DIG抗体1滴が滴下され、設定時間の反応を行います。
- (7) 検体スライドを洗浄後、AP標識抗NP抗体1滴が滴下され、設定時間の反応を行います。
- (8) 検体スライドを洗浄後、pHエンハンサー試薬2滴にNaphthol試薬1滴とFast Red試薬2滴が滴下され、設定時間の反応を行います。

対比染色

- (1) 検体スライドを洗浄後、ヘマトキシリン核染色試薬II 1滴が滴下され、設定時間の反応を行います。
 - (2) 検体スライドを洗浄後、色出し試薬1滴が滴下され、設定時間の反応を行います。その後、洗浄を行います。
12. 染色が終了したら、自動染色装置から検体スライドを取り出し、検体スライドを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洗浄します(推奨2回)。その後、精製水また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。(p.19 封入剤 参照)

Dual Color *in situ* Hybridization法 (DISH法)

■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。水洗終了時に、LCSが水面に浮かばず、除去されていることを確認してください。
- 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の原因となるため、使用しないでください。
- 検体上に水分が残っていると赤のシグナルがにじんだり、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。

■封入剤

使用する封入剤によって、シグナルの退色など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。

各種封入剤の適合検査結果

封入剤	メーカー	タイプ	適/不適
Entellan	Merck	Xylene	No
Entellan New	Merck	Xylene	No
Eukitt	EMS	Xylene	No
HSR	Systemex	Xylene	No
Malinol	Muto Chemical	Xylene	No
DPX new	Merck	Xylene	Yes
MountQuick	Daido Sangyo Co.	Aqueous	Yes
Permount	Fisher	Xylene	Yes

*製造元にて確認されている製品を記載

VIII. 染色プロトコールの設定

■標準プロトコールの設定

各施設の固定条件などにより、最適な染色条件は異なる場合があります。そのため、導入の際には標準プロトコールを施設ごとに設定する必要があります。以下の推奨プロトコールを参考にして、乳癌および胃癌の標準プロトコールを設定してください。

Procedure: U VENTANA HER2 DISH DNA PRB CKT (ULTRA)
: XT VENTANA HER2 DISH DNA PRB CKT (XT)
: GX VENTANA HER2 DISH DNA PRB CKT (GX)

染色工程

染色工程	ベンチマークULTRA		ベンチマークGX/XT	
	温度	時間	温度	時間
Baking (ベーキング)	63°C	20min	65°C	20min
Deparaffinization (脱パラフィン)	69°C	52min	69°C	52min
Cell Conditioning 1 (熱処理)	84°C	16-40min	84°C	16-40min
Cell Conditioning 2 (熱処理)	82°C	16-40min	82°C	16-40min
ISH Protease (酵素処理)	36°C	8-24min	37°C	8-24min
Denaturation (熱変性)	80°C	8min	80°C	8min
Hybridization (ハイブリダイゼーション)	44°C	1h	44°C	1h
Stringency Wash (プローブの洗浄)	72-78°C	24min	72-78°C	24min
Silver Detection (All)	36°C	56min+44min	37°C	56min+44min
Red Detection (All)	36°C	56min+28min	37°C	56min+28min
Hematoxylin II (核染色)	36°C	8min	37°C	8min
Bluing Reagent (色だし)	36°C	8min	37°C	8min

*太字の箇所は設定が可能です

ベンチマーク各機種および材料における推奨プロトコール

染色工程	ベンチマークULTRA		ベンチマークXT/GX	
	乳癌	胃癌	乳癌	胃癌
Baking	Not selected		Not selected	
Cell Conditioning 1 (CC1)	16 min	16 min	16 min	16 min
Cell Conditioning 2 (CC2)	24 min	16 min	24 min	16 min
ISH-Protease 3	20 min	16 min	20 min	16 min
Stringency Wash Temp	74°C	74°C	76°C	76°C

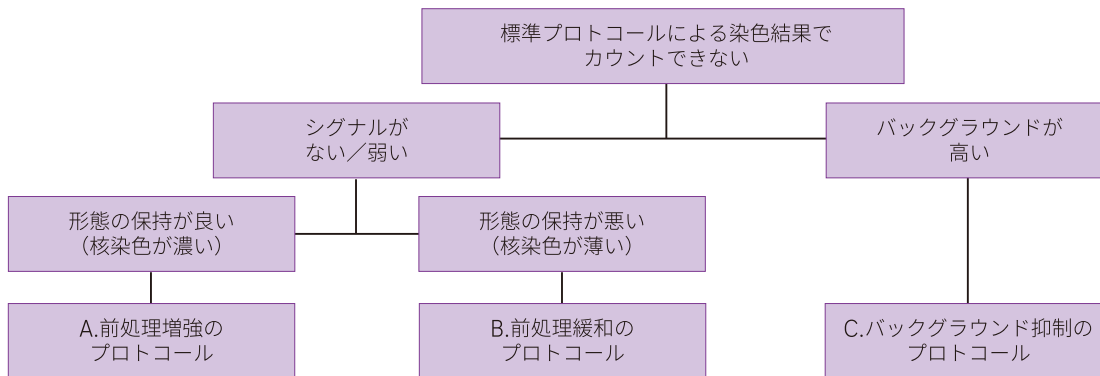
プロトコールの条件変更と期待される効果

変更項目と可変範囲	効果対象	反応時間:短縮 反応温度:低下	←	→	延長 上昇
Cell Conditioning (CC1およびCC2) 処理時間: 16-40 min (CC1) : 16-40 min (CC2)	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: 8-24 min	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: 72-78°C	バックグラウンド	高い	←	→	低い

Dual Color *in situ* Hybridization法 (DISH法)

■再染色用プロトコルの設定

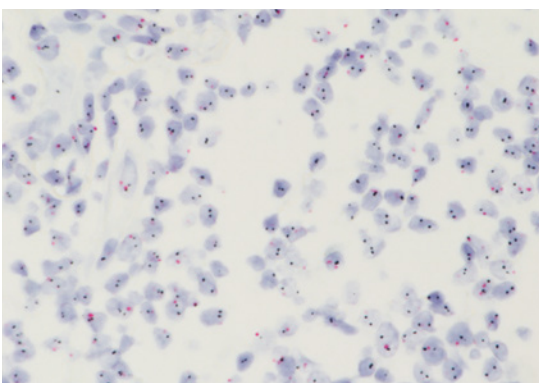
標準プロトコルでの初回成功率は、3-in-1コントロールスライドでは96%、臨床検体 (N=240) では97.1%というデータが得られています (自社データ) が、各施設で最適化した標準プロトコルでも、単一のプロトコルでは個々の検体の固定状況などによっては、じゅうぶんな染色性が得られない場合があります。パターン別にいくつかの再染色用プロトコルを備えて、初回染色で判定不可であった検体では再染色用プロトコルを用いて再度染色を実施してください。初回染色では判定不可であっても、前処理を調整することにより、染色の成功率が向上したという報告もあります。再染色時には、標準プロトコルで得られた染色像より下記のフローに従い、再染色用プロトコルを選択してください。



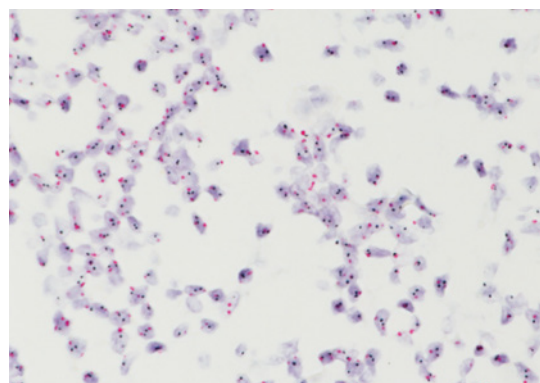
- A. 前処理増強のプロトコル: 1. ISH Protease 3 処理時間を延長する
2. Cell Conditioning (CC1/CC2) 処理時間を延長する
- B. 前処理緩和のプロトコル: 1. ISH Protease 3 処理時間を短縮する
2. Cell Conditioning (CC1/CC2) 処理時間を短縮する
- C. バックグラウンド抑制のプロトコル: Stringency Wash温度を高くする

■プロテアーゼ処理の時間を延長し、再染色を実施した事例 (乳癌)

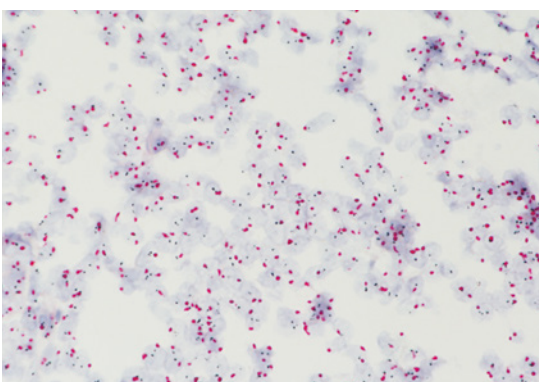
赤のシグナルが弱かったため、プロテアーゼ処理を延長した結果、良好な染色が得られましたが、延長しすぎると、核にダメージを与えてしまいます。



ISH protease 4min



ISH protease 8min



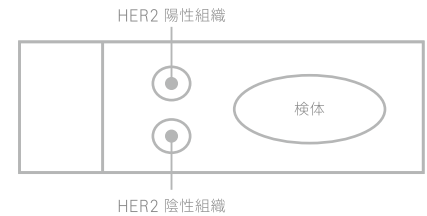
ISH protease 24min

IX. 精度管理

染色を行う場合には、必ず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してください。

■自家製精度管理用コントロールスライド

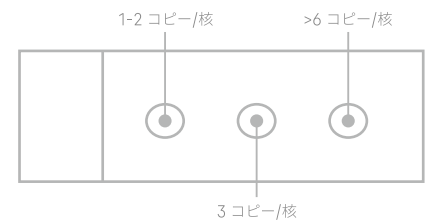
- 結果が既知である組織（陽性および陰性）を、検体と同じスライドガラス上に載せて染色する方法を推奨します。
- 管理用コントロール組織と検体は、同時に薄切してスライドに貼り付けることを推奨します。
- 同じスライドガラスに載せられない場合は、結果が既知である組織（陽性および陰性）を別のスライドガラスに載せたコントロールスライドを用意し、同一ランで染色します。この場合、長期保存したコントロールスライドは使用しないでください。また、HER2 Dual ISH 3-in-1 コントロールスライド（商品コード：518-109530）でも代用可能です。



■動作確認用コントロールスライド：HER2 Dual ISH 3-in-1 コントロールスライド（商品コード：518-109530）

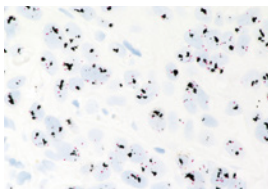
染色パターンが異なる3種類の組織を1枚のスライドガラス上に載せています。機器のメンテナンスや点検、修理後の確認染色の際に使用します。

Cell Line	HER2 IHC スコア	コピー数	シグナル比平均 (FISH)	シグナル比平均 (DISH)
MCF 7	0	1-2 copies/nuclei	1.0	0.85
ZR-75-1	1+	3 copies/nuclei	1.36	1.34
Calu-3	3+	>6 copies/nuclei	5.01	5.53

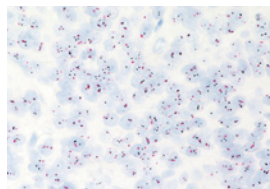


HER2 Dual ISH 3-in-1 コントロールスライド 専用プロトコール

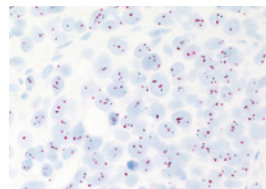
染色工程	ベンチマークULTRA	ベンチマークXT / GX
Cell Conditioning 1 (熱変性)	16min	20min
Cell Conditioning 2 (熱変性)	16min	20min
ISH Protease (酵素処理)	8 min	8 min
Stringency Wash Temp (プローブの洗浄温度)	76°C	78°C



Calu-3:増幅あり(x60)



ZR-75-1:1-3コピー(x60)



MCF 7:-2コピー(x60)

Dual Color *in situ* Hybridization法 (DISH法)

X. 染色結果の判定

HER2は黒色のシグナル、Chr17は赤色のシグナルとして染色されます。各々の核におけるシグナル数を計測し、Chr17のシグナル総数に対するHER2シグナル総数の比率を算出して、HER2遺伝子増幅あり・なしの判定を行います。

■標本の観察手順

はじめに、精度管理用コントロールスライドおよび検体スライドの染色性を確認します。適切に染色されていることを確認後、検体スライドにおける腫瘍細胞のHER2およびChr17のシグナルを計測します。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. 精度管理用コントロールスライドおよび検体スライドの染色性確認:

精度管理用コントロール組織および検体スライドのインターナルコントロール細胞への染色が適切であることを確認してください。検体スライドでは、適切に染色されている場合、インターナルコントロールとして正常細胞(間質線維芽細胞、血管内皮細胞、リンパ球、非腫瘍の乳腺上皮細胞など)に1-2コピーのHER2およびChr17のシグナルが認められます。

2. ターゲットエリアの特定:

HE染色標本やIHC染色標本を参照し、検体スライドにおける遺伝子増幅を判定するための適切なエリアを特定します。判定可能なシグナル強度が得られているエリアを選定し、核が重複しているエリア、壊死や検体採取時のアーチファクトが含まれているエリアは除外する必要があります。ターゲットエリアの特定後、腫瘍全体の平均的な直径を有する腫瘍細胞の核を選択してカウントします。平均サイズよりも極端に大きい、または小さい腫瘍細胞の核はカウント対象から除外することが望ましいです。

HER2コピー数が不均一性(Heterogeneity)を示す場合、腫瘍全体の平均的な細胞径でシグナル数の多い細胞核を選んでカウントします。その場合、不均一性が認められたことを記録してください。

3. シグナルの計測:

黒色シグナルは赤色シグナルより小さく見えるのが通常です。また、検体種や固定の状況によってシグナルの大きさが異なる場合があります。腫瘍細胞の計測時(特に、複数のシグナルがクラスターを形成している場合)には、インターナルコントロールとなる正常細胞のシグナルのサイズを基準としてください。詳細はシグナルの計測方法を参照してください。

4. 結果の報告:

HER2遺伝子増幅の判定は、乳癌および胃癌におけるスコアリングの判定基準(p.25)を参照してください。次の様な染色像が観察された場合には、報告書に記載してください。

HER2遺伝子発現の不均一性(Heterogeneity)

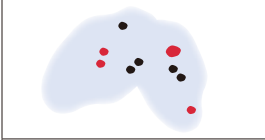
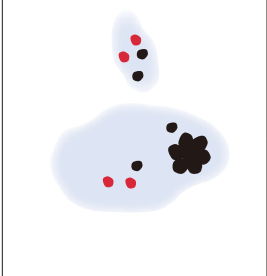

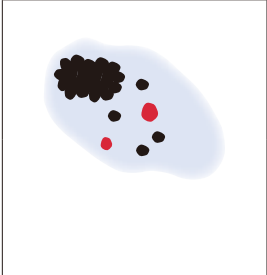
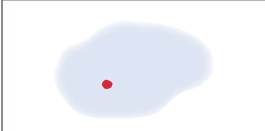
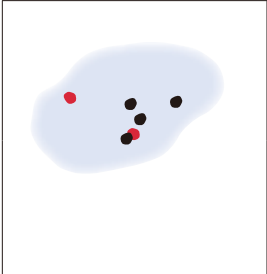
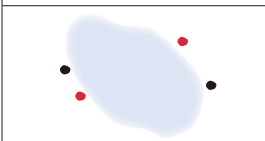
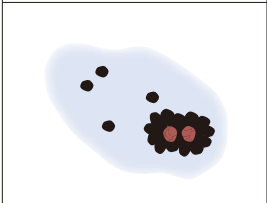
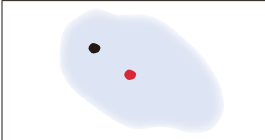
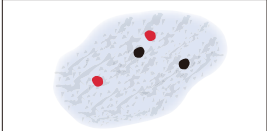

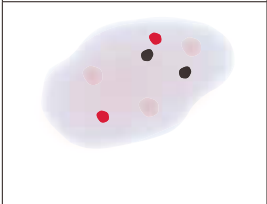
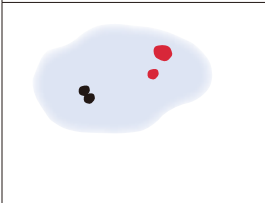
17番染色体セントロメアの増幅(Polysomy)

17番染色体セントロメアの欠失(Monosomy)

■シグナルの計測方法

光学顕微鏡の20~60倍の対物レンズを使用して、個々の腫瘍細胞の核のHER2シグナル数とChr17シグナル数を数えて、記録します。複数のシグナルがクラスターを形成している場合、小さいクラスターはシグナル6個、大きいクラスターはシグナル12個と数えます。シグナルの出現パターンとその計測方法については下記の表を参照してください。

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。		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。
	シグナルの認められない細胞は計測対象から外す。		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 (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。
	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。
	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。		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。
	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。		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。
	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、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。		

Dual Color *in situ* Hybridization法 (DISH法)

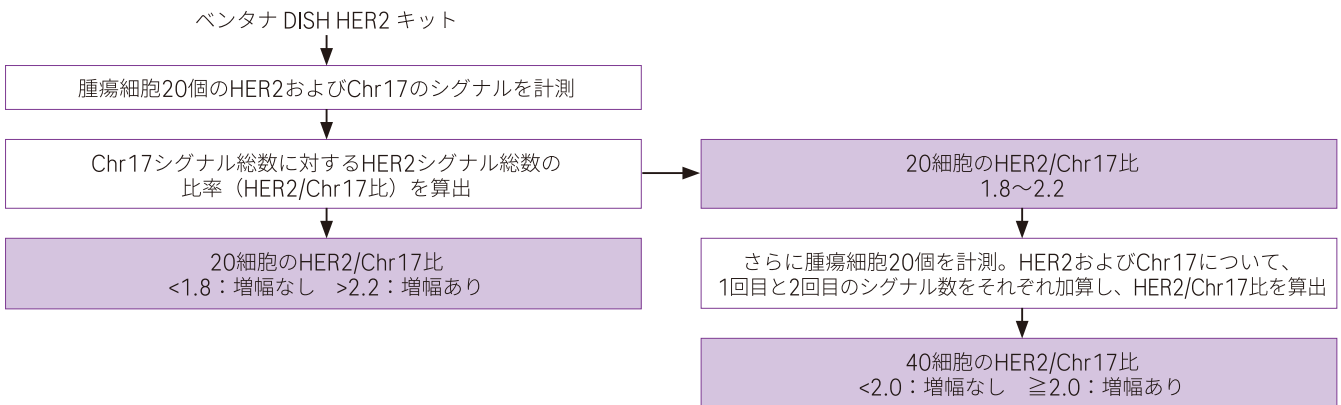
■スコアリングの判定基準

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。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。

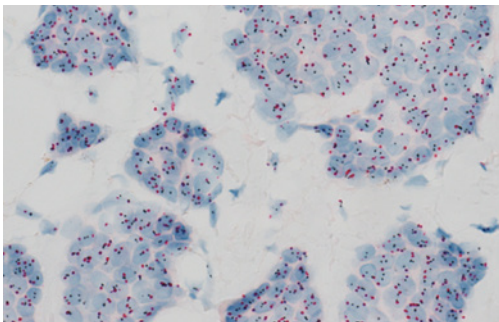
- HER2/Chr17 比 ≥ 2.0 : 増幅あり
- HER2/Chr17 比 < 2.0 : 増幅なし

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。

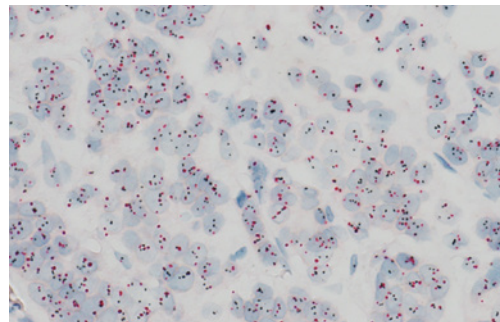
なお、シグナル比の判定については、病理学会が定める診断ガイドライン等⁵⁾もございますので、各施設にて専門医とご相談の上、ご判断ください。



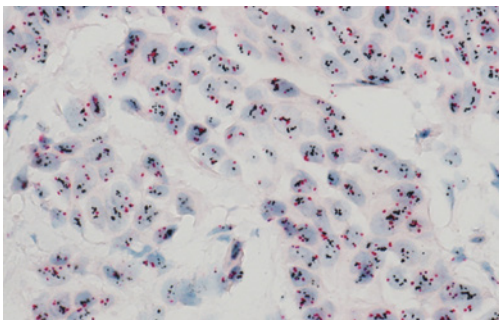
■乳癌における代表的な染色例



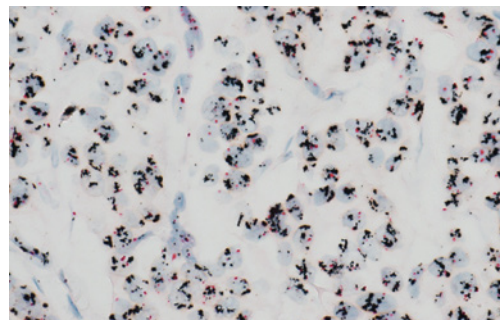
増幅なし シグナル比 1.1



増幅なし シグナル比 1.2

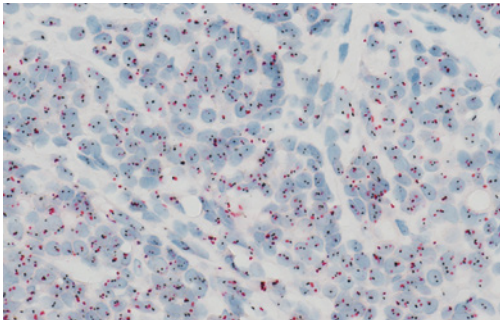


増幅あり(中等度) シグナル比 4.9

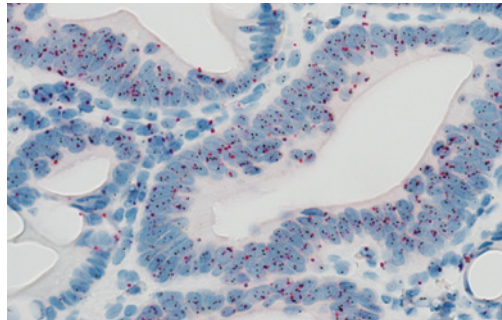


増幅あり(高度) シグナル比 10.9

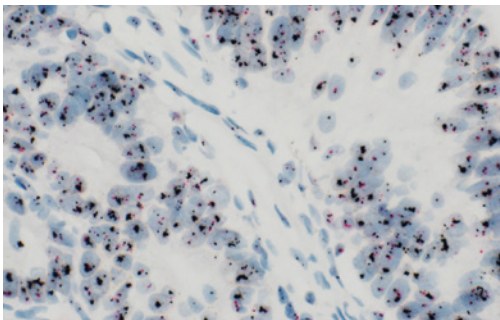
■胃癌における代表的な染色例



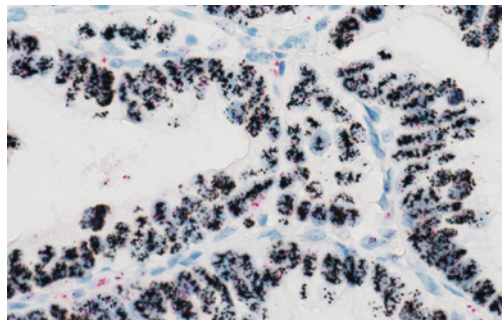
増幅なし シグナル比 1.1



増幅なし シグナル比 1.3



増幅あり(中等度) シグナル比 5.3

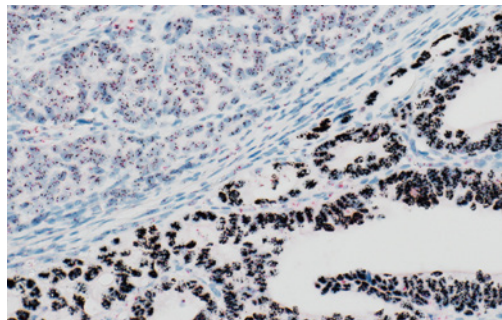


増幅あり(高度) シグナル比 20.6

■判定上の注意

●腫瘍内の不均一性(Heterogeneity)

胃癌ではHER2タンパクと同様に、腫瘍においてHER2遺伝子の不均一性が認められることが多くあります。そのため、染色結果の観察においては、腫瘍全体を観察することが重要となってきます。同一標本上で不均一性が認められた場合には、全体を低倍で観察後、増幅の高い部分を選択してシグナルの計測を行ってください。



Dual Color *in situ* Hybridization法 (DISH法)

XI. トラブルシュート

トラブルシュート実施の際、症状を正確に把握するため、p.29-30の各種染色画像と弊社提供の鏡検の手引き(別冊)等を参考にしてください。その上で、同時に染色した精度管理用コントロール組織と検体のインターナルコントロール細胞の結果を確認し、下記の表を参照して、トラブルシュートを行ってください。

組織/細胞の種類:精度管理用コントロール組織=コ、検体のインターナルコントロール細胞=検 染色結果:症状が無く良好=○、症状が有り観察に不適=×

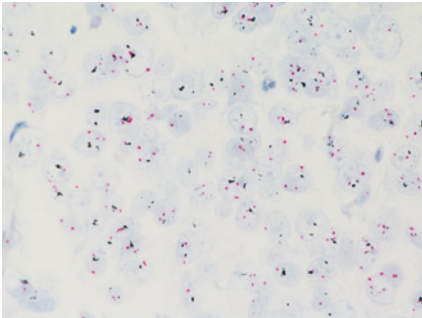
症状	コ	検	原因	対策
赤いシグナルが無い、または弱い	×	×	プロトコールが最適ではなかった	再染色プロトコールの選択フローに従い、再染色を実施する⇒p.21
	○	×	固定条件が適切でなかった	適切な条件で固定する⇒p.16
	×	×	切片の厚さが適切でなかった	4μmに薄切する⇒p.17
	×	×	標本が古かった	薄切後は速やかに染色する⇒p.17
	×	×	試薬ディスペンサーの滴下不良があった	SHIPPINGキーが外れていることを確認する 試薬ディスペンサーの液量やノズルの詰まり、気泡の有無を確認する⇒p.18
	×	×	脱水操作をアルコールで行った	適切な脱水操作を実施する⇒p.18
	×	×	封入操作が適切でなかった	適切な封入剤で封入する ⇒p.19 封入時のキシレンは新鮮なものを使用し長く浸漬しない⇒p.18
	×	×	ガラスの撥水により試薬が広がらなかった	適切な撥水防止処理を実施する⇒p.17
	×	×	試薬が劣化した	保管方法などを確認する ⇒試薬の添付文書 <small>※保管方法に問題がなく、試薬の劣化を疑う場合は、弊社カスタマーソリューションセンターまでご連絡ください</small>
	×	×	機器動作に不具合があった	機器動作を確認する (洗浄ノズル、ヒートブロック、ディスペンサーハンマー等) ⇒弊社カスタマーソリューションセンターまでご連絡ください
黒いシグナルが無い、または弱い	×	×	プロトコールが最適ではなかった	再染色プロトコールの選択フローに従い、再染色を実施する⇒p.21
	○	×	固定条件が適切でなかった	適切な条件で固定する⇒p.16
	×	×	切片の厚さが適切でなかった	4μmに薄切する⇒p.17
	×	×	標本が古かった	薄切後は速やかに染色する⇒p.17
	×	×	試薬ディスペンサーの滴下不良があった	SHIPPINGキーが外れていることを確認する 試薬ディスペンサーの液量やノズルの詰まり、気泡の有無を確認する⇒p.18
	×	×	封入剤が適切でなかった	適切な封入剤で実施する⇒p.19
	×	×	ガラスの撥水により試薬が広がらなかった	適切な撥水防止処理を実施する⇒p.17
	×	×	機器やバッファーにコンタミがあった	デコンタミネーションを実施する ⇒装置の取扱説明書
赤いバックグラウンドがある(ヘイズ)	×	×	プロトコールが最適ではなかった	再染色プロトコールの選択フローに従い、再染色を実施する⇒p.21
	○	×	固定条件が適切でなかった	適切な条件で固定する⇒p.16
	×	×	切片の厚さが適切でなかった	4μmに薄切する⇒p.17
	×	×	機器やバッファーにコンタミがあった	デコンタミネーションを実施する ⇒装置の取扱説明書
	×	×	機器動作に不具合があった	機器動作を確認する (洗浄ノズル、ヒートブロック、ディスペンサーハンマー等) ⇒弊社カスタマーソリューションセンターまでご連絡ください

症状	コ	検	原因	対策
黒い顆粒状のバックグラウンドがある (ダスト、スペーキング)	×	×	プロトコールが最適ではなかった	再染色プロトコールの選択フローに従い、再染色を実施する⇒p.21
	○	×	固定条件が適切でなかった	適切な条件で固定する⇒p.16
	×	×	切片の厚さが適切でなかった	4μmに薄切する⇒p.17
	○	×	組織ブロックがコンタミしていた	ブロック作製までの工程を確認する ※インクなどで組織をマーキングしているところに発色することがあります
	×	×	機器やバッファーにコンタミがあった	デコンタミネーションを実施する ⇒装置の取扱説明書
	×	×	バッファーを希釈した水が適切でなかった	DISHの水質基準を満たす精製水でバッファーを希釈する⇒p.15
	×	×	切片やスライドが汚れていた	薄切時の水槽の水は、蒸留装置から直接採水したきれいな精製水、または脱イオン水を使用する⇒p.17
	×	×	標本が古かった	薄切後は速やかに染色する⇒p.17
	×	×	機器動作に不具合があった	機器動作を確認する (洗浄ノズル、ヒートブロック、ディスペンスハンマー等) ⇒弊社カスタマーソリューションセンターまでご連絡ください
一面に赤や黒、茶の着色がある (ドライ)	×	×	処理中に切片が乾燥してしまった	適切な撥水防止処理を実施する⇒p.17
	×	×	機器やバッファーにコンタミがあった	デコンタミネーションを実施する ⇒装置の取扱説明書
	×	×	機器動作に不具合があった	機器動作を確認する (洗浄ノズル、ヒートブロック、ディスペンスハンマー等) ⇒弊社カスタマーソリューションセンターまでご連絡ください
赤い結晶や混入物がある (針状、糸くず状、立方体)	×	×	封入時の乾燥が足りなかった	乾燥をじゅうぶんに行う⇒p.18
	×	×	封入操作が適切でなかった	適切な封入剤で封入する ⇒p.19 封入時のキシレンは新鮮なものを使用し長く浸漬しない ⇒p.19
	×	×	機器やバッファーにコンタミがあった	デコンタミネーションを実施する ⇒装置の取扱説明書
	×	×	試薬が劣化した	保管方法などを確認する ⇒試薬の添付文書 ※保管方法に問題がなく、試薬の劣化を疑う場合は、弊社カスタマーソリューションセンターまでご連絡ください
組織上に空胞がある	○	×	固定条件が適切でなかった	適切な条件で固定する⇒p.16 ※短すぎる固定時間は核内空胞の原因となります
	×	×	切片の厚さが適切でなかった	4μmに薄切する⇒p.17
	×	×	封入時の洗浄が足りなかった	中性洗剤入り水溶液による洗浄をじゅうぶんに行う ⇒p.18
	×	×	封入時のキシレンや封入剤にコンタミがあった	キシレンや封入剤を新しくする
核の形態が保持されない	○	×	前処理条件が強かった	前処理緩和のプロトコールで再染色をする⇒p.21
	○	×	固定条件が適切でなかった	適切な条件で固定する⇒p.16
沈殿物がある (Precipitation)	○	×	ラベルの貼り方に不備があった	判定の妨げになる場合は、再染色を行う。その際、バーコードスライドラベルが中央に配置され、ラベルのはみ出しがないようにスライドガラスに貼られていることを確認する。ラベルを二重に貼ったり、バーコードラベルを貼り直したりしない

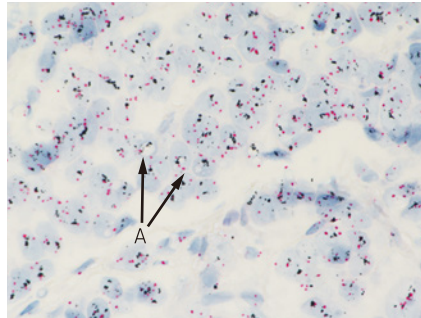
Dual Color *in situ* Hybridization法 (DISH法)

■各種染色画像

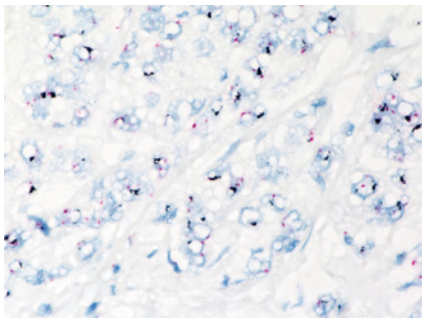
プレアナリティカル(固定・薄切)による影響



乳癌 x60: 薄切4μm(推奨)

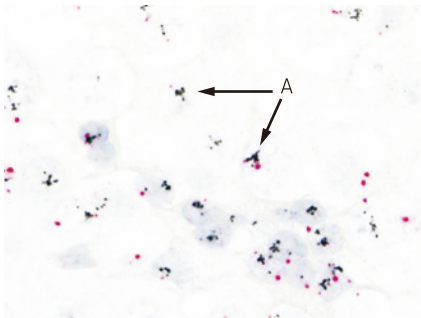


乳癌 x60: 薄切8μm核に空胞を認める(A)。切片が厚い場合には、パラフィンが多いため、核に空胞が増えることがある。



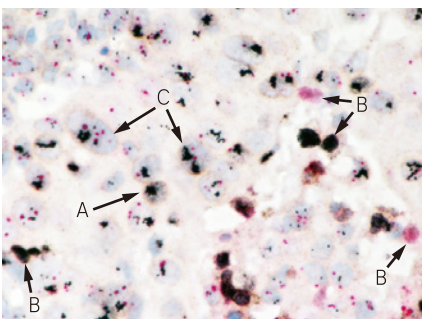
バブリング(空胞)

乳癌 x60: 固定不良による核への空胞。固定時間が3時間程度であれば、熱/酵素処理を調整することで改善される可能性もあるが、基本的には、6時間以上72時間以内の固定時間を厳守する。核のバブリングは、様々なケースで発生することがあるが、一般的にカウントには影響しない。



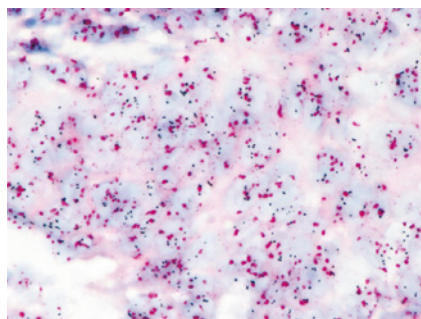
乳癌 x60: 固定不良と過剰なプロテアーゼ処理により核形態へのダメージが大きい(A)。

非特異的なバックグラウンド染色



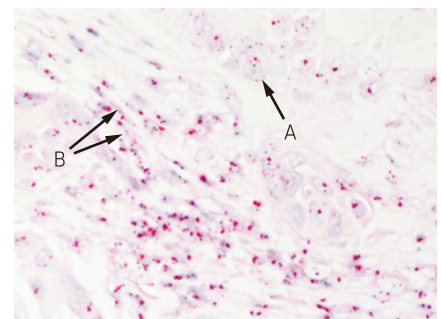
SISHダスト

乳癌 x60: 黒いダストが核を部分的に覆い隠している(A)。ダストが影響しない多くの核があり、容易にカウントできる(C)。壊死細胞に非特異的なSISHやRedの染色を認めるが(B)、これは無視できる。



Redヘイズ

乳癌 x60: 核の中や周囲に、中程度から重度の赤みやヘイズが認められる。また、小さな非特異的なシグナルがあるが、これはカウントに含めるべきではない。Redヘイズは、特に固定不良の組織でよく見られる。

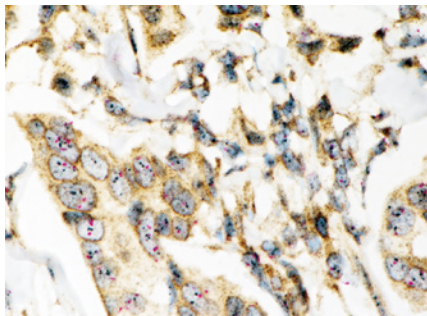


赤いバックグラウンド

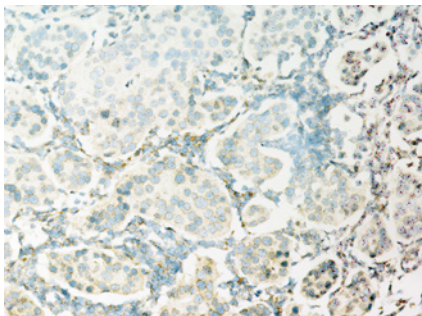
乳癌 x60: 腫瘍細胞と正常細胞の核に非特異的な赤いバックグラウンド染色を認める。このシグナルはChr17の特異的な赤いシグナルよりも薄く見えるが、広範にわたっており、特異的な赤色のシグナルのカウントを妨げる。そのため、別のエリアでカウントすることを推奨する。

沈着物(Precipitation)がある

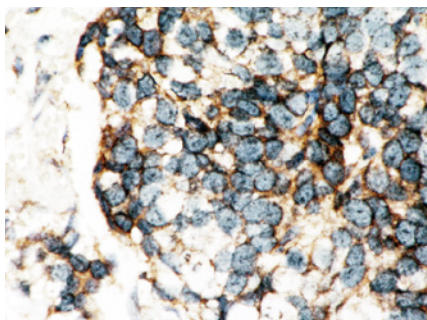
核の上や周辺に茶色や黒の沈殿が見られる場合は、別の場所でカウントするか、再染色することをお勧めします。スライドラベルの貼り方が悪いと、沈着物が発生することがあります。バーコード付きスライドラベルは、スライドガラスの端にはみ出さないように貼る必要があります。スライドラベルの二重貼りや貼り直しは避けてください。また、酢酸銀は時間の経過とともに酸化しますので、ディスペンサーのキャップを付けて保管されていることを確認してください。



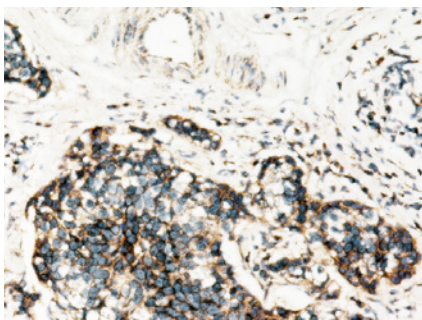
乳癌 x60:核の周りに中等度の沈着物を認める。



乳癌 x20:沈着物を認めるエリアと認めないエリア。

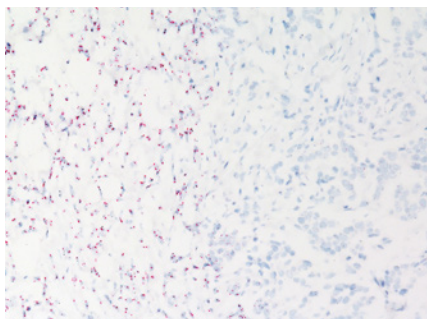


乳癌 x60:核の周りに重度の沈着物を認める。

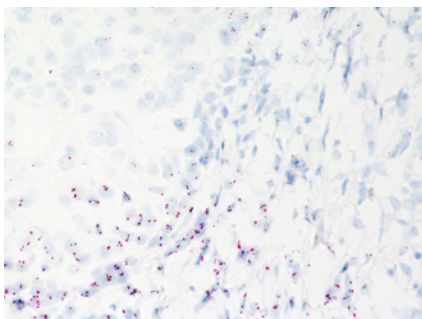


乳癌 x20:スライドの広範囲に渡り沈着物を認める。

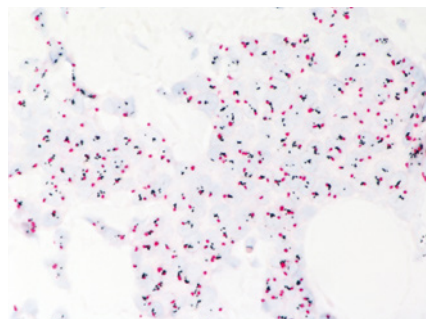
弱い/染色されていないエリアがある



乳癌 x20(左)、乳癌x40(右):スライド上に弱いまたは染色されなかったエリアが生じることがある。染色されていないエリアはごく一部で、他に十分に染色された部分がある場合は、その部分で判定する。



シグナルが重なっている

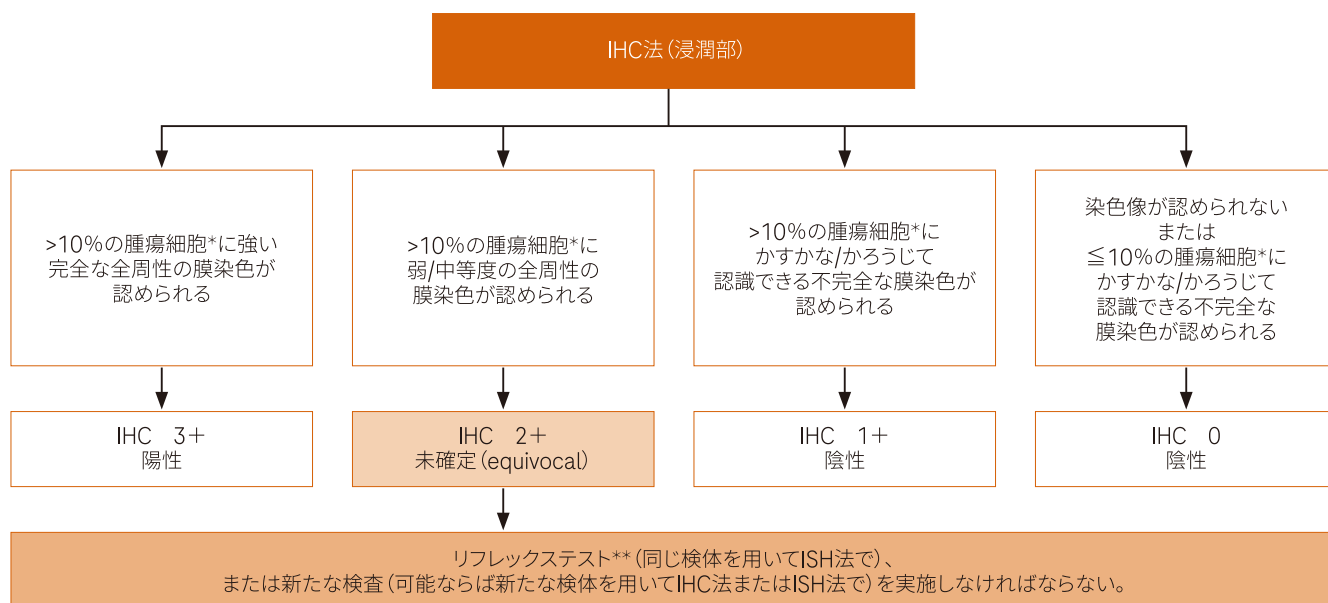


乳癌 x60:シグナルの中には大きく重なるものもある。特に赤色のシグナルは大きく重なり、Chr17シグナルの区別がつかず、カウントが困難になることがある。その際には、Chr17シグナルが分離している核に注目してカウントを行う。

■乳癌におけるHER2検査フローチャート

HER2検査は原則として浸潤癌を対象とする。ASCO/CAPガイドライン2018に準拠し、以下のアルゴリズムに基づき抗HER2薬の治療対象症例を選択する。IHC法2+のときは、ISH法(同じ検体)または新たな検査(可能ならば新たな検体を用いてIHC法またはISH法で)を行う。IHC法2+の場合に行われるISH法の結果は通常、グループ1かグループ5であるが、まれなISHの結果(グループ2,3,4)が得られたときには、IHC法検査結果に、より重きを置いて解釈されることが推奨されている。

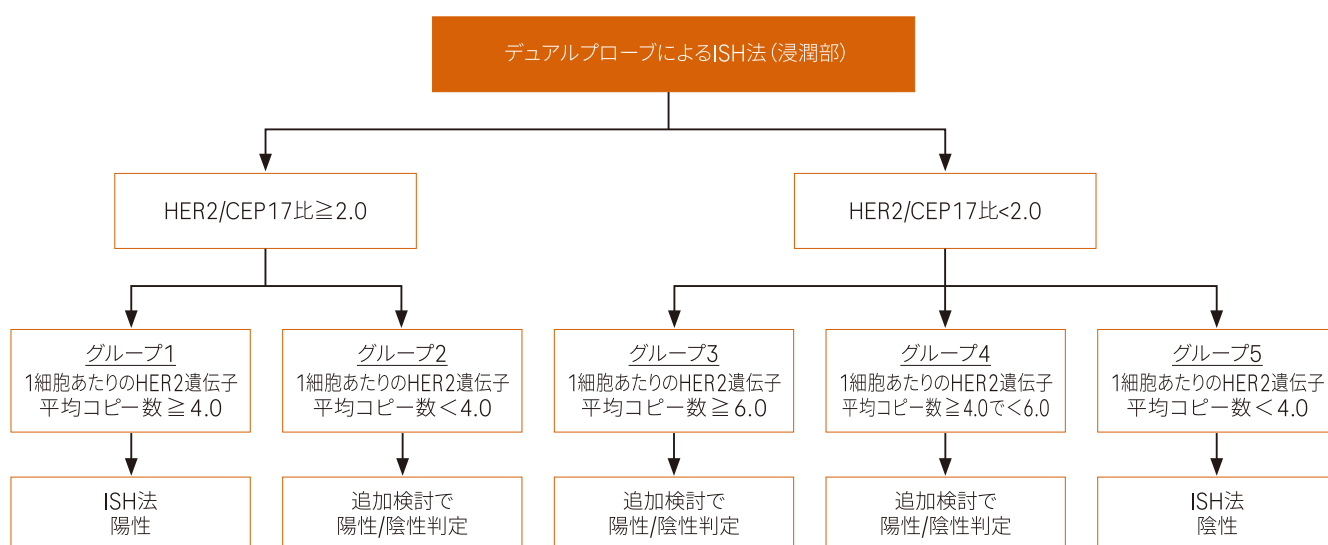
IHC法のアルゴリズム



*低倍率の対物レンズで容易に評価でき、均一および近接する浸潤細胞集団 **病理医が主治医の判断を得ることなく行うテスト

乳癌・胃癌 HER2病理診断ガイドライン 第2版より抜粋

デュアルプローブを用いたISH法のアルゴリズム



注釈: グループ2, 3, 4に関しては、ISH法を行った検査室でIHC法がまだ行われていない場合、IHC法を、ISH法と同じ検体で実施すべきである。そして、ISH法とIHC法、両方のスライドを一緒にレビューし、ISH法で評価する領域を選択すべきである。

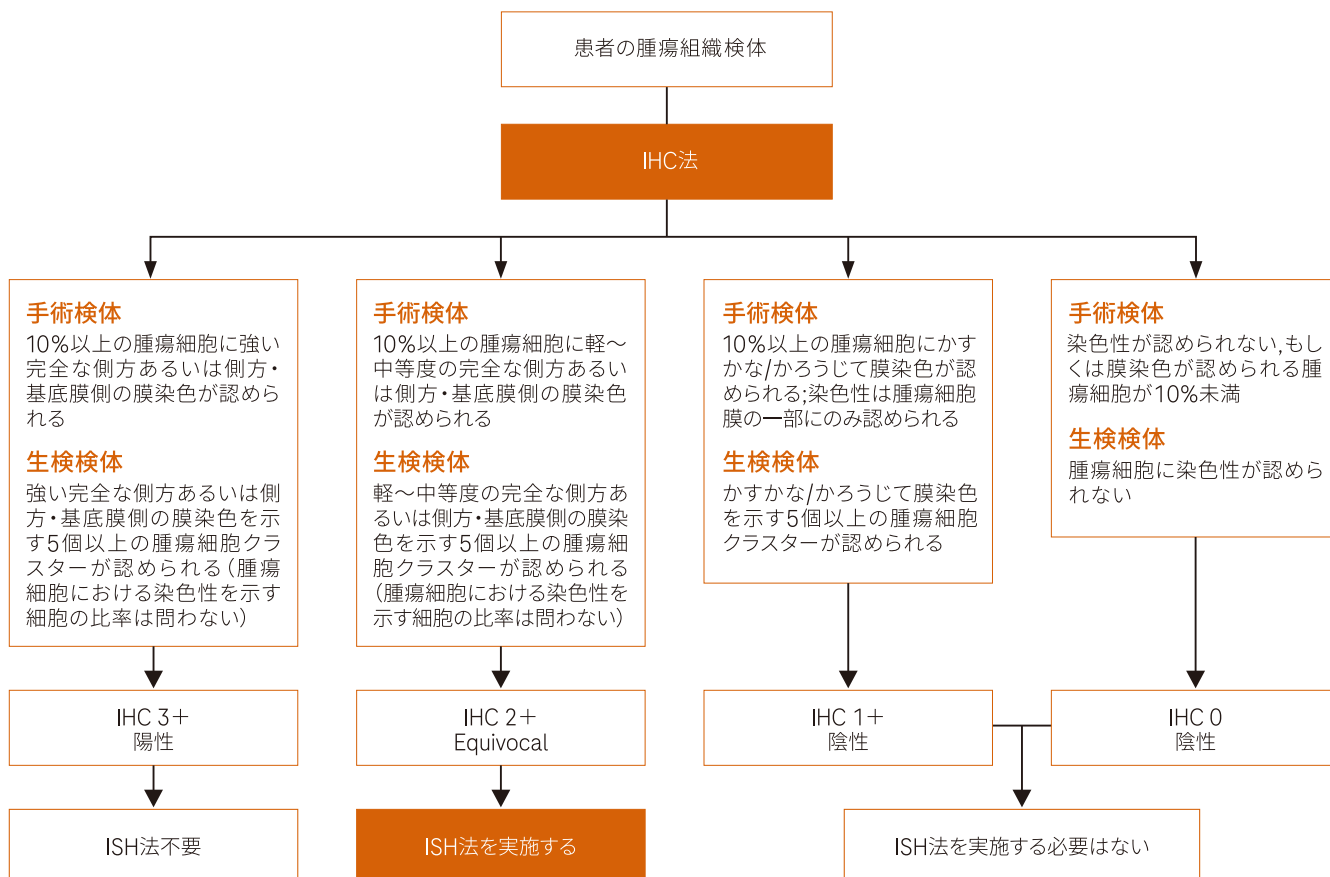
乳癌・胃癌 HER2病理診断ガイドライン 第2版より抜粋

■胃癌におけるHER2検査フローチャート

胃・食道胃接合部腺癌に対するCAP/ASCP/ASCOガイドライン2016では、まずIHC法が実施され、IHC 2+ (equivocal) となった場合にISH法を実施することが推奨される。

IHC 3+ (陽性) もしくは0/1 (陰性) の場合にはISH法の実施は必要とされていない。

胃癌HER2診断アルゴリズム



ISH法の評価方法は、HER2/CEP17比が2.0以上の場合、遺伝子増幅ありと判定し、2.0以下の場合には遺伝子増幅なしと判定する。HER2/CEP17が1.8以上2.2以下のときは、さらに20個の細胞をカウントし、計40個判定することが望ましい。

Polysomy (核1個あたりのCEP17シグナルの数が3個以上認められる)が生じた場合、HER2/CEP17が2.0以下であっても、核1個あたりのHER2シグナル数が6を超える場合は遺伝子増幅ありと判定し、4未満の場合には遺伝子増幅なしと判定する。4以上6以下の場合にはさらに20個の核でカウントを行い判定する。計40個カウントしても判定困難な場合は、腫瘍内のカウントする場所を再検討する、検査対象のブロックを変える、等の対応を考慮する。

Monosomy (核1個あたりにCEP17シグナルが1個しかない)をどう扱うか、定まった結論は出ていない。薄切の影響も鑑み、現状ではHER2/CEP17シグナル比を基準に判定を行う。

ベンタナ ultraView パスウェー HER2(4B5)

体外診断用医薬品製造販売承認番号:22300AMX01167000

■一次抗体

製品番号	商品コード	製品名	包装単位	貯法	価格	備考
790-2991	518-107918	ベンタナ パスウェー HER2(4B5)	50テスト	2~8°C	98,000円	医

■検出キット

製品番号	商品コード	製品名	包装単位	貯法	価格	備考
760-500	518-109431	VENTANA ultraView Universal DAB Detection Kit ベンタナ ultraView DAB ユニバーサルキット 内訳 <ul style="list-style-type: none"> ・ インヒビター ・ マルチマー-HRP ・ DAB試薬 ・ H₂O₂試薬 ・ COPPER試薬 	250テスト	2~8°C	250,000円	医

■精度管理用コントロールスライド

製品番号	商品コード	製品名	包装単位	貯法	価格	備考
781-2991	518-107895	PATHWAY HER-2 4 in 1 Control Slides HER2 4 in 1 コントロールスライド	10枚	2~8°C	88,000円	受

■陰性コントロール一次抗体

製品番号	商品コード	製品名	包装単位	貯法	価格	備考
790-4795	518-111182	Rabbit Monoclonal Negative Control Ig 陰性コントロール ウサギモノクローナル抗体用	250テスト	2~8°C	13,000円	受

ベンタナ DISH HER2 キット

体外診断用医薬品製造販売承認番号:30300EZ00043000

■カクテルプローブ

製品番号	商品コード	製品名	包装単位	貯法	価格	備考
800-6043	518-114800	VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail ベンタナ HER2 DNA カクテルプローブ	30テスト	2~8°C	300,000円	医

■検出キット

製品番号	商品コード	製品名	包装単位	貯法	価格	備考
760-516	518-114817	VENTANA Silver ISH DNP Detection Kit ベンタナ Silver ISH DNP キット 内訳 ・ HQ標識 抗DNP抗体 ・ HRP標識 抗HQ抗体 ・ 発色試薬A ・ 発色試薬B ・ 発色試薬C	60テスト	2~8°C	300,000円	医
760-512	518-114824	VENTANA Red ISH DIG Detection Kit ベンタナ Red ISH DIG キット 内訳 ・ NP標識 抗DIG抗体 ・ AP標識 抗NP抗体 ・ pHエンハンサー試薬 ・ Naphtol試薬 ・ Fast Red試薬	60テスト	2~8°C	300,000円	医

■プローブ希釈液

製品番号	商品コード	製品名	包装単位	貯法	価格	備考
780-4409	518-109547	HybReady Solution ハイブレディ	83テスト	2~8°C	80,000円	※1 消

※1:火気厳禁 ホルムアミド 50% 25mL

■補助試薬

製品番号	商品コード	製品名	包装単位	貯法	価格	備考
780-4149	518-102289	ISH Protease III ISH プロテアーゼ 3 (0.02 units/mL)	200テスト	2~8°C	13,000円	
780-003	518-108892	ultraView Silver Wash II ultraView Silver Wash II バッファー	2L	15~30°C	28,000円	
950-110	518-103026	SSC SSC バッファー 10X	2L	15~30°C	9,000円	※2
950-123	518-102999	CC 2 CC 2 バッファー	1L	15~30°C	25,000円	※3
950-223	518-108946	Benchmark ULTRA CC 2 CC 2 バッファー ULTRA	1L	15~30°C	40,000円	※4
950-124	518-103002	CC 1 CC 1 バッファー	2L	15~30°C	50,000円	※3
950-224	518-108939	Benchmark ULTRA CC 1 CC 1 バッファー ULTRA	2L	15~30°C	80,000円	※4

※2:使用時5倍希釈

※3:対象機種 ベンチマークXT、ベンチマークGX

※4:対象機種 ベンチマークULTRA

■精度管理用コントロールスライド

製品番号	商品コード	製品名	包装単位	貯法	価格	備考
783-4422	518-109530	HER2 Dual ISH 3-in-1 Xenograft Slides HER2 Dual ISH 3-in-1 コントロールスライド	10枚	15~30°C	25,000円	

医: 体外診断用医薬品 消: 消防法に該当する成分を含む 受: 受注発注品はご注文いただいてから商品お届けに約4~5週間かかります。

参考文献

- 1) Bang YJ, Van Cutsem EV, Feyereislova A, et al. ToGA Trial Investigators. 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 (9742):687-97.
- 2) 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.
- 3) Rakha EA, et al. Updated UK Recommendations for HER2 assessment in breast cancer. *J Clin Pathol* 2015;68:93-99.
- 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):287-300.
- 5) 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
- 6) 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 Nov 1;31 (31):3997-4013.
- 7) Laboratory General Checklist, CAP Accreditation Program, 09.25.2012, College of American Pathologists