

ALK-IHC 精度管理プログラム

External Quality Assessment (EQA) Program for Lung Cancer, part 2. ALK-IHC

Phase II（地域がん診療連携拠点病院）報告書

2017 年 5 月 17 日

ALK-IHC 精度管理プログラムの目的

肺癌診療において、進行期非小細胞肺癌の患者が確実に EGFR と ALK の分子診断を受けられるよう求められている。ALK 融合遺伝子は IHC 法、FISH 法、RT-PCR 法の少なくとも 2 つ以上の方法で確認することが勧められており、FISH 法は Abbott Vysis® ALK Break Apart FISH プローブキットがクリゾチニブのコンパニオン診断薬として承認され（6,520 点）、多くが検査センター行われている。一方、IHC 検査はスクリーニングとして位置づけられ、高感度法を用いて院内で行う施設が増加しつつある。とくに、2014 年 9 月 1 日にアレクチニブ（中外、アレセンサ®）のコンパニオン診断薬としてニチレイ ヒストファイン ALK iAEP®キットが保険適用（2,700 点）となり、院内実施が進むものと思われる。しかしながら、同じ ALK 阻害剤であっても、コンパニオン診断の選択に差異があることや、検査の手技や実施のタイミングなど、病理診断の現場では少なからず混乱がある。ALK 融合遺伝子肺癌は非小細胞癌の 2－5%と高頻度ではないものの、いずれの分子標的薬も高い治療効果をあげており、病理医は治療対象患者を確実に拾い上げる責任を担っていると考えられる。このような背景から、ALK-IHC 検査精度を担保する早急な施策の必要性は、肺癌診療に関係する病理医および臨床医の共通認識である。そこで、日本肺癌学会および日本病理学会は共同してワーキンググループを組織し、がん診療拠点病院など検査件数の多い施設を対象とした精度管理プログラム（ALK-IHC 精度管理プログラム）を立ち上げた。この外部評価は、それぞれの施設における ALK-IHC の妥当性を確認することで、陽性症例で引き続いて行われる FISH 法による再検を通じて、適切な ALK 陽性患者の治療選択に結びつけることを目的としている。

これまで、この精度管理プログラムを立ち上げるに当たって委員内の施設での検討を行うとともに採点基準を作成し、都道府県がん拠点病院を対象とした精度管理プログラムを施行した（Phase I, 都道府県がん拠点病院）。これら結果をもとに対象を全国の地域がん拠点病院 345 施設に phase II として拡大した。それぞれの phase ごとの結果を以下に示す。

実施方法

概要: 50 腫瘍（予備 3 腫瘍）を含む 3 枚（ALK-1、ALK-2、ALK-3）の未染スパイラルアレイ標本を配布し、それぞれの施設で ALK タンパクを染色その陽性反応を評価、エクセルシート（評価結果記入シート）

に記入し返却した。ALK-1 のスライドには 18 腫瘍、ALK-2 には 17 腫瘍、ALK-3 には 15 腫瘍および予備 3 腫瘍が含まれていた。HE との対比にあたっては、それぞれの virtual slides が用意されており、日本病理学会病理情報ネットワークセンターで参照可能とした。

評価の基準： ALK IHC の一義的な役割は *FISH* を行うかどうかのスクリーニングあり、下表に従い、”対象腫瘍/症例を *FISH* 検査に回すかどうか” で評価した。スコアリング方式ではそのための基準を確立するための根拠に乏しいことやスコア標準例を設けることが難しいからである。

判定区分	判定の定義
<i>FISH</i> 検査を行う	<i>FISH</i> 陽性となる可能性が極めて高い、もしくは <i>FISH</i> による確認が必要。
<i>FISH</i> 検査を行わない	<i>FISH</i> 検査が陽性となる可能性はない、もしくは無視できる程度に低い。

染色方法： ALK-IHC については、アレクチニブに対してのニチレイ ALK iAEP キットがコンパニオン診断薬となっているが、クリゾチニブについては Abbott/Vysis ALK break apart *FISH* のみがコンパニオン診断薬であり、日本肺癌学会から声明

(<https://www.haigan.gr.jp/modules/bulletin/index.php?page=article&storyid=83>) が発表されているように ALK-IHC の方法については保険当局に柔軟な対応が呼びかけられている。また、ALK-IHC の目的は *FISH* による確認が必要な症例の抽出であり、方法を比較/検討することはこのプログラムの趣旨とは異なる。そのため本プログラムにおいては ALK-IHC の方法についての規定を設けなかった。その免疫染色により ALK-*FISH* に回す症例の抽出が妥当であるかどうかの精度をみるものである。

期間：一般に未染標本を作成してから免疫染色を完了する期間として推奨されているのは 3 週間とされている。そこで、準備・輸送に一週間かかることから 2 週間以内に染色を施行し、3 週間以内に結果を事務局まで返送することとした。

評価方法

それぞれの腫瘍は、ワーキンググループ委員内で事前に染色を各施設で施行・評価し、コンセンサスを得た判定結果（標準）あらかじめ設けてある。また、陽性腫瘍については *FISH* 法やその他の方法で出来る限り遺伝子変異についても検証した。その標準をもとに陽性強度や標本の状態により基準点が設けてあり、一定の基準内にあればその染色・評価は妥当であると評価した。基準外であれば改善に向けての方策やコメントを添付した。

参加施設

Phase I

各ワーキンググループ委員より分担によりメールによって 45 施設にプログラムへの参加を打診した。その結果は以下のとおりである。

参加 29 施設 (64%)

(1 施設で 2 種類の染色方法を実施されており 2 施設として数えた)

不参加 16 施設 (36%)

不参加 16 施設のうち、

ALK 染色院内実施検討中 4 施設

ALK 染色は外注 8 施設

回答なし 4 施設

Phase II

345 施設 (地域がん診療連携拠点病院 344 施設+自主参加 1 施設) に郵送による書面にてプログラムへの参加を打診した。その結果は以下のとおりである。

参加 82 施設 (24%)

不参加 263 施設 (76%) そのうち、

回答あり 84 施設 (全体の 24%, 不参加の 32%)

(ALK 染色は外注による不参加 36 施設 : 全体の 10%, 不参加の 14%)

回答なし 179 施設 (全体の 52%, 不参加の 68%)

なお、3 施設においては、未染標本を送付したが、3/15/2017 現在においても染色、およびその評価の返答がなかったため、この解析からは除外した。

結果

染色手段

自動免疫染色装置 86 施設 (77%)

用手法 21 施設 (19%)

記載なし 4 施設 (4%)

染色方法

体外診断用医薬品（ALK iAEP キット）	36 施設（32%）
それ以外	49 施設（59%）
記載なし	4 施設（4%）

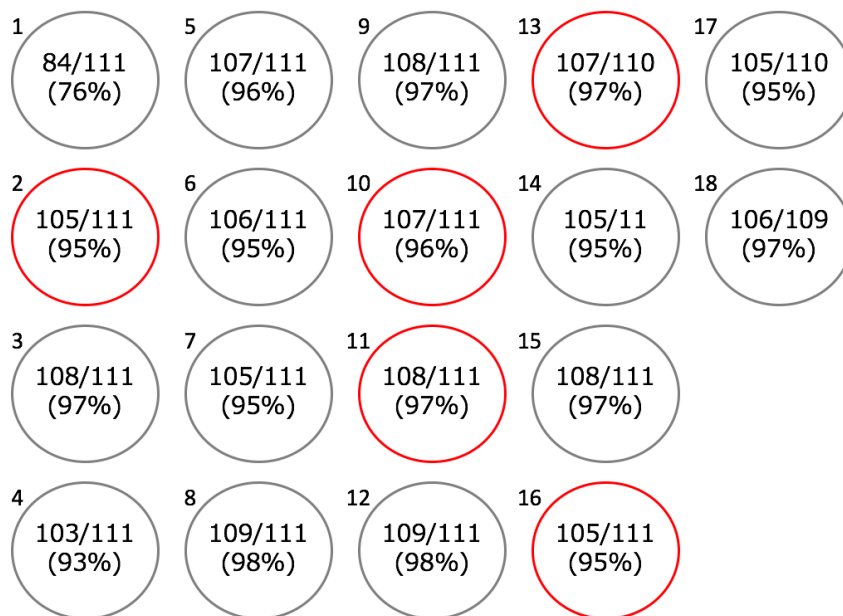
一次抗体としての ALK のクローン

5A4	85 施設（77%）
D5F3	19 施設（17%）
ALK-1	2 施設（2%）
その他	1 施設（4%）
記載なし	4 施設（4%）

その組織コアごとの結果を以下に示す。

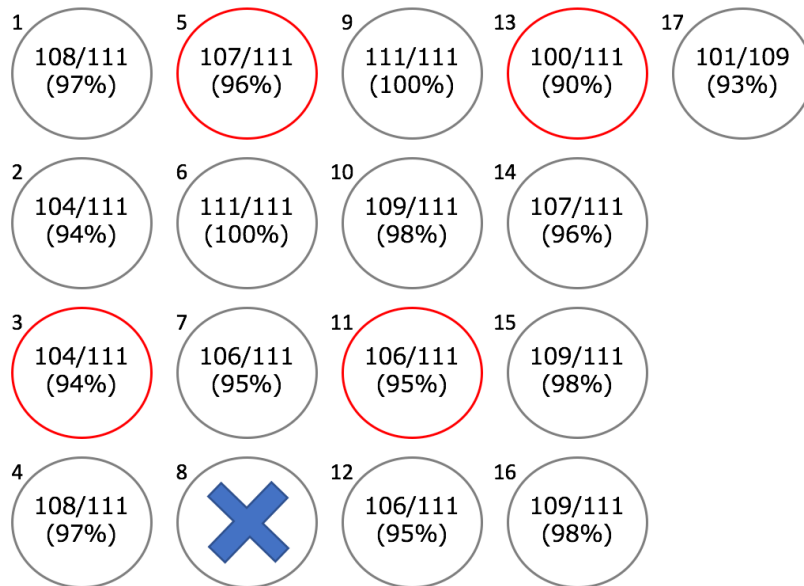
ALK-1 Slide

○ はALK肺癌



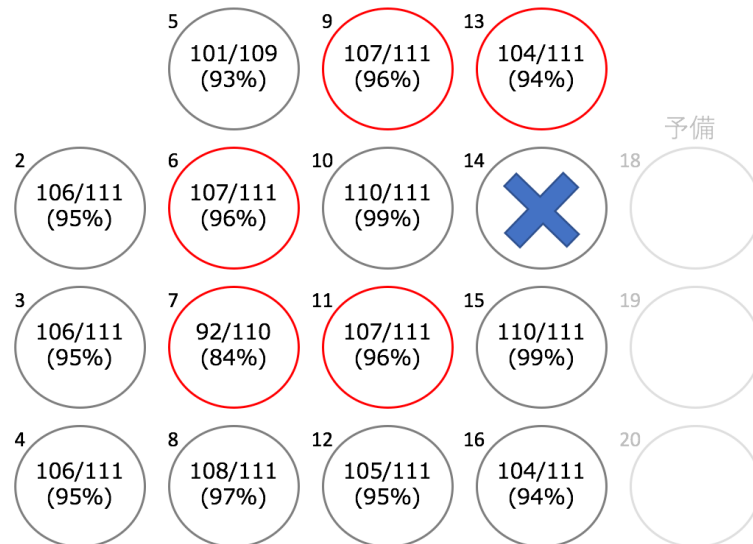
ALK-2 Slide

○はALK肺癌 ×は評価対象外



ALK-3 Slide

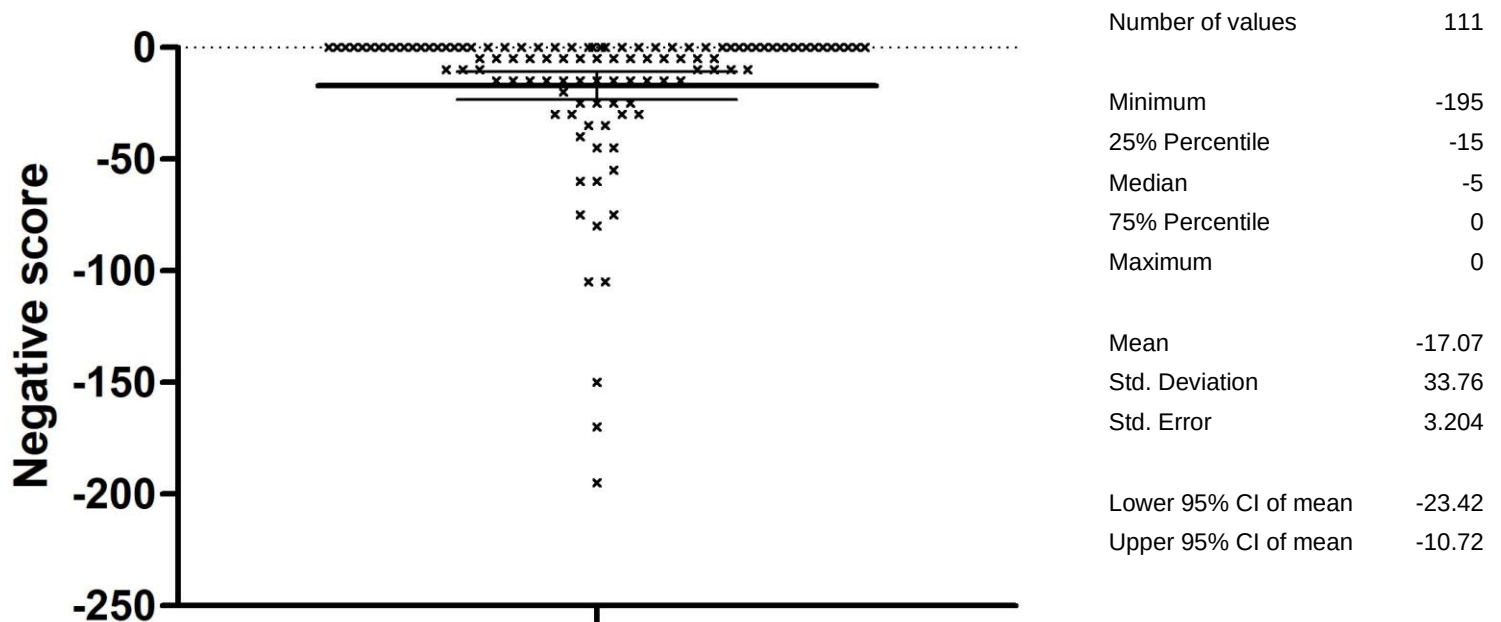
○はALK肺癌 ×は評価対象外



最終評価

評価基準内であった施設（評価点数 -10 点以上）：	74 施設（67%）
評価基準以下であった施設（評価点数 -15 点以下）：	37 施設（33%）
若干の改善を要するとした施設（評価点 -15 点）：	12 施設（11%）
早急な改善を要するとした施設（評価点 -20 点以下）：	24 施設（22%）

全体の分布としては以下のとおりであった。



評価基準内であった施設には評価標準との結果とともに、特異度・感度ともに十分であったことが記載された評価書を送付した。Phase II においては評価基準以下であった施設には、改善点を記載した評価書を送付するとともに、とくに大きく評価基準を下回った 10 施設に関しては、要望に応じて染色標本を送付いただいてどのような点が問題となったのかについて個別に評価し、考えられる改善点を挙げ、返答した。その一例を以下に示す。

A 病院の場合

評価シートで再評価し、問題点を抽出したのち、メールにてそれらをまとめて報告した。

ALK_1			コメント評価	
-	FISH検査を行わない	-5	1 FISH検査を行わない	
+	FISH検査を行う	-15	2 FISH検査を行う	標準例と比較して染色強度が弱く、陽性反応にややムラがあります。技術的な改善が望まれます。
-	FISH検査を行わない	-5	3 FISH検査を行わない	
-	FISH検査を行わない	-5	4 FISH検査を行う	腫瘍細胞は陰性と思われます。
-	FISH検査を行わない	-5	5 FISH検査を行わない	
-	FISH検査を行わない	-5	6 FISH検査を行わない	
-	FISH検査を行わない	-5	7 FISH検査を行う	腫瘍細胞は陰性と思われます。
-	FISH検査を行わない	-5	8 FISH検査を行う	マクロファージに陽性像を見ますが、腫瘍細胞は陰性と思われます。
-	FISH検査を行わない	-5	9 FISH検査を行う	腫瘍細胞は陰性と思われます。
+	FISH検査を行う	-15	10 FISH検査を行う	十分な染色強度です。
+	FISH検査を行う	-15	11 FISH検査を行う	標準例と比較して染色強度が弱く、陽性反応にややムラがあります。技術的な改善が望まれます。
-	FISH検査を行わない	-5	12 FISH検査を行わない	
+	FISH検査を行う	-15	13 FISH検査を行う	標準例と比較して染色強度が弱く、陽性反応にややムラがあります。技術的な改善が望まれます。
-	FISH検査を行わない	-5	14 FISH検査を行わない	
-	FISH検査を行わない	-5	15 FISH検査を行う	腫瘍細胞は陰性と思われます。
+	FISH検査を行う	-15	16 FISH検査を行わない	標準例と比較して染色強度が弱く、陽性反応にややムラがあります。技術的な改善が望まれます。
-	FISH検査を行わない	-5	17 FISH検査を行う	腫瘍細胞は陰性と思われます。
-	FISH検査を行わない	-5	18 FISH検査を行わない	

ALK-IHC精度管理では大変お世話になっております。
ご送付いただきました染色標本を拝見しました。

全体としてバックグラウンドが強く、弱い染色強度が判断しにくいように思います。1つの原因としては検出系が問題と
思われます。これまでライカ自動染色装置をそのまま使うと感度不足に陥ることが知られています。この染色装置を用
いる際には、Dako mouse linker ([Code K8022](#))を加えて感度をあげてください。代表的なプロトコールは以下のとおり
で、ステップ番号15にこの試薬を加えてください。また、標準染色スライドのバーチャルスライドをお送りしますの
で、比較検討ください。

A病院

標準染色例

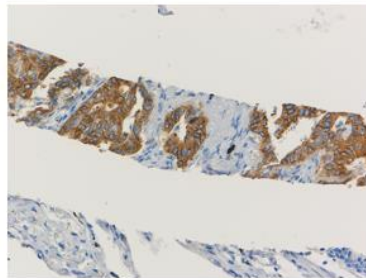
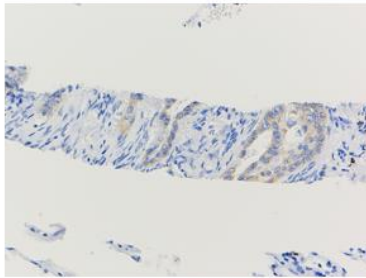
ALK1-#2



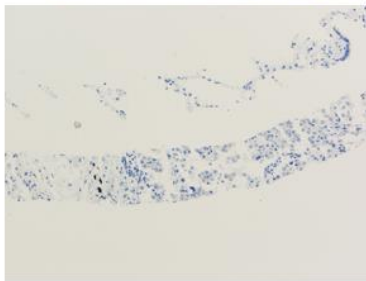
ALK1-#11



ALK1-#11
HPF



ALK3-#7

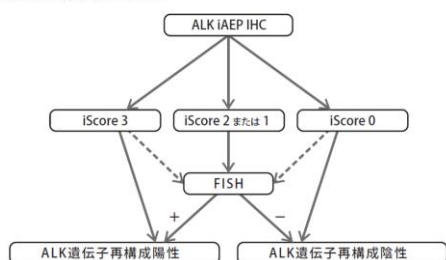


まとめ

1. これまで、精度管理が必要と考えられてきたが、実施母体がなく問題であった。しかしながら、経済的な裏付けのない有志グループでの試みではあったが、82 施設に状況を評価することができた。染色がうまく行っている施設ではその方法の妥当性が確認され、評価基準以下の施設では問題を指摘することができた。
2. 作成したスパイラルアレイでは腫瘍細胞の消失は最小限にとどまり、切片（ALK1～ALK3）、組織コア（1～16）による特定の傾向は見出されなかった。
3. 染色方法によって一定の傾向が見受けられた。
 - a. ニチレイ ヒストファイン ALK iAEP キットを用いている施設は評価が良好であった。
 - b. D5F3、ロシュ BenchMark XT は過染傾向があり、過大評価される組織コアもあった。
 - c. 5A4 でライカ製染色機器を用いて通常プロトコル（Bond ポリマーシステム）で染色すると、検出増幅が不十分で過小評価される施設が多かった。少なくともライカには検出増感系が不十分であることを認知する必要がある。
 - d. ALK-1 の使用施設は染色がうまく行っていなかった。
4. ALK-IHC による陽性反応は一般に明瞭であるが、まれにあるごく弱い反応の場合、見過ごされる場合があった。
5. ALK 染色自体の問題ではなく、ALK iAEP 染色キットの添付文書に基づいて ALK 染色陽性例を ALK break apart FISH 不要と判断された施設が一部にあり、一般的に受け入れられている ALK 検査アルゴリズムの違いを生じることがわかった（下記参照）。

ニチレイ iAEP kit Atlas

□ iScore に基づいたALK検査アルゴリズム



ニチレイ ALK iAEP kit Atlasより

日本肺癌学会 ALK検査の手引

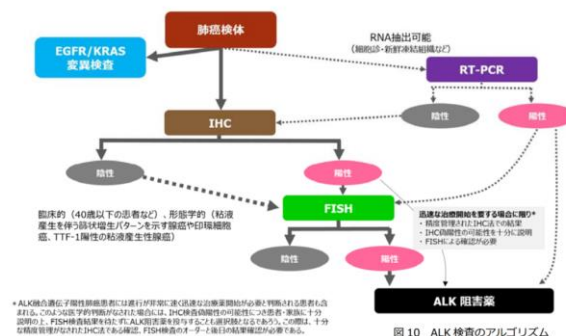


図 10 ALK 検査のアルゴリズム

6. Ventana Benchmark での染色ではスライドガラスによっては、辺縁部のコアに十分に試薬が届かないことがあり、他院未染標本を用いて BenchMark で染色する際には注意する必要があることがわかった。

7. 今回は染色強度の基準を作ることが難しいため、FISH を施行するか否かという視点で評価していただいたが、IHC 陰性でも組織像によって FISH を施行すると考えた施設もあり、より明確な基準が必要であった。

展望

これらのことから、至適化条件決定のためのコントロールスライド（ALK 陽性肺癌細胞株 H2228, ALK 陰性肺癌細胞株 A549）を希望者に配布することにした。また、日本肺癌学会、日本病理学会のホームページで公表されている「肺癌における ALK 免疫染色プラクティカルガイド」を染色、評価に役立ててもらうことにした。特に、5A4 でライカ染色機を通常プロトコルで用いている場合は、広く感度が足りないことを通知する必要があると感じた。

今後、どの施設でも肺癌に対する ALK 染色に対する精度管理を続けていけるような、支援事業体系の構築の必要性があり、日本精度管理機構への円滑な移行が期待される。

ALK-IHC 精度管理ワーキンググループメンバー

日本肺癌学会・日本病理学会合同 ALK-IHC 精度管理ワーキンググループ委員

羽場 礼次（香川大学医学部附属病院病理部）

畑中 豊（北海道大学病院コンパニオン診断研究部門）

福岡 順也（長崎大学大学院医歯薬学総合研究科医療科学専攻病態病理学分野）

石川 雄一（公益財団法人がん研究会がん研究所病理部）

南 優子（国立病院機構茨城東病院胸部疾患・療育医療センター病理診断科）

野口 雅之（筑波大学診断病理学）

大林 千穂（奈良県立医科大学病理診断学講座）

酒井 康裕（神戸大学医学部附属病院病理診断科）

武島 幸男（広島大学大学院医歯薬保健学研究院病理学研究室）

薦 幸治（国立がん研究センター中央病院臨床検査部）

谷田部 恭（愛知県がんセンター中央病院遺伝子病理診断部）

坂下信悟（筑波大学診断病理学）