

## 乳癌 HER2 病理診断ガイドライン（仮）

### はじめに

近年、がん遺伝子産物を主なターゲットとする分子標的薬剤が次々と登場し、現在世界では 60 を超える薬剤が承認されている。乳癌治療における抗 HER2 療法は分子標的薬剤のなかでも先駆的なものの一つであり、2001 年に国内で治療薬として承認されてから既に 10 年以上を経ている。

抗 HER2 療法の適応決定のために適切な HER2 検査が不可欠であるのは周知のとおりである。わが国では 2001 年に乳がん HER2 検査病理部会において HER2 検査ガイドが作成された。2007 年、ASCO/CAP から HER2 検査のガイドラインが作成され、これらによって IHC 法、FISH 法による適正な HER2 検査に対する指針が示された。その後、2013 年に ASCO/CAP ガイドラインの改訂が行われ、それを受けて乳がん HER2 検査病理部会 HER2 検査ガイドも改訂が行われている。また日本乳癌学会作成の乳癌診療ガイドラインの中でも HER2 治療に関する項目が取り上げられている。

日本病理学会では、平成 23 年 11 月に“乳癌における HER2 病理組織標本作製および病理診断のガイドライン”を作成している。今回の乳癌 HER2 病理診断ガイドラインは、“乳癌における HER2 病理組織標本作製および病理診断のガイドライン”の骨子を継承しつつ、日常業務として HER2 検査における標本作製、評価判定を行っている検査技師および病理医を対象としたさらに実践的なガイドラインとなるよう心がけた。但し、HER2 検査についてのガイドラインという性格上、ASCO/CAP ガイドライン、乳がん HER2 検査病理部会 HER2 検査ガイド、日本乳癌学会乳癌診療ガイドラインと重複する点のあることを了解いただきたい。また、ガイドラインでは推奨グレードが付記されることが多く、本委員会でも推奨グレードを付けることを検討したが、病理学的手技、診断基準に関する項目には、各施設固有の事情も存在するため推奨度は付け難いと判断し、推奨グレードの付記は行わないことを委員会内で合意した。

本ガイドラインが、日常業務の一助となることを期待する。

乳癌 HER2 ガイドライン委員

## 1. Pre-analytical

- CQ1-1: HER2 検査の対象となる検体はなにか？ (p3)
- CQ1-2: 多発浸潤癌の場合、各々に HER2 検査を行うべきか？ (p5)
- CQ1-3: 10%中性緩衝ホルマリン以外の固定液を用いて、IHC 法および FISH 法を行うことか可能か？ (p8)
- CQ1-4: 検体が採取されてからホルマリン固定が行われるまでに許容される時間はどの程度か？ (p10)
- CQ1-5: 10%中性緩衝ホルマリンを用いて固定を行う際に、推奨される固定時間はどの程度か？ (p12)
- CQ1-6: 細胞診検体での HER2 検査は可能か？ (p14)
- CQ1-7: セルブロック検体での HER2 検査は可能か？ (p16)

## 2. Analytical

- CQ2-1: HER2 検査法にはどのようなものがあるか？ (p18)
- CQ2-2: HER2 IHC 法に適した組織切片はどのように作製するか？ (p21)
- CQ2-3: HER2 IHC 検査に推奨される抗体はあるか？ (p23)
- CQ2-4: 推奨される HER2 検査判定方法アルゴリズムは？ (p25)

## 3. Post-analytical

- CQ3-1: 報告書に記載すべき内容にはどのようなものがあるか？ (p29)
- CQ3-2: 組織型から予測される HER2 検査結果と実際の結果との間に乖離が生じた場合、再検を行う必要があるか？ (p31)
- CQ3-3: IHC と FISH の結果に不一致が生じた場合、どのように解釈するのが適切か？ (p33)
- CQ3-4: 不一致,あるいは IHC2+を想定し, IHC と FISH の両者を同時に行っても良いか？ (p35)
- CQ3-5: 内部精度管理を行うことは必要か？ (p37)
- CQ3-6: 外部精度評価を受けることは必要か？ (p39)

## 1. Pre-analytical

CQ1-1: HER2 検査の対象となる検体はなにか？

A. すべての浸潤性乳癌原発巣の手術標本、あるいは術前加療対象者の場合は術前確定診断検体(針生検標本)が対象となる。また、原発巣と再発巣、転移巣では時に検査結果に不一致例が存在することが知られており、乳癌に関する原発巣だけでなく再発巣、転移巣すべての手術、生検検体が対象となり得る。

### 【解説】

ホルモン受容体（エストロゲン受容体;ER、プロゲステロン受容体;PgR）と HER2 は予後因子であると同時に薬物療法の効果予測因子である。乳癌の全身療法の治療方針を決定するうえで不可欠な因子であり、すべての浸潤性乳癌で検索する必要がある。さらに、再発・転移乳癌には薬物療法が原則として必要である。治療を開始する前には、治療効果予測因子であるホルモン受容体 (ER、PgR)、HER2 の評価を行う必要があるが、その際に再発・転移病巣組織を対象とした再評価が必要か否かを検討した。

HER2 検査の対象として、腫瘍全体の性状を確認できるという意味において、針生検検体よりも癌巣を広く観察できる手術標本代表切片での検索が望ましい。HER2 の IHC 法での一致率は高いものの<sup>1,2)</sup>、同一乳癌症例の針生検標本と手術標本ではホルモン受容体や HER2 の判定結果が異なることは起こりうる。判定結果の不一致は、針生検標本と手術標本における検体の取り扱いの相違、腫瘍内の不均質性などによることが想定される。術前薬物療法症例における手術標本と針生検標本の不一致は、前述の理由に加え薬物による癌の生物学的な性質の変化などが原因として挙げられる<sup>3)</sup>。しかしながら、多くの乳癌症例では術前の針生検標本でホルモン受容体や HER2 を検索することで、癌の生物学的特徴が予測可能になる。術前薬物療法症例では適切な投与薬剤の選択のために、針生検でホルモン受容体と HER2 の発現状況を確認することは必須である。

HER2 検査の結果に関し、原発巣と再発・転移巣で異なる症例が存在する。原発巣と再発・転移巣における HER2 検査結果の乖離の検討は、これまでに多数報告されている。原発巣と再発・転移巣の HER2 の不一致に関する 2,520 例のメタアナリシスでは、不一致率は 5.2%であった<sup>4)</sup>。原発巣と再発・転移巣の結果が異なる原因として、腫瘍側と測定側の 2 つの因子が想定されている。腫瘍側の因

子として、癌の生物学的特性が転移巣で変化している場合、癌の不均質性、治療による修飾など、測定側の因子としては **sampling error**、解析前段階 (**pre-analytical**) 因子、免疫組織化学的方法の不安定性、病理医の判定の差などが挙げられている<sup>4, 5)</sup>。HER2 検査が十分に精度管理されている場合、適切な治療によって検査結果不一致症例の予後が改善するのかは現在のところ不明である。しかしながら、今後の更なる検証が必要ではあるものの、予後因子および治療選択の観点からは再発時点で再発・転移巣検体での検査、あるいは原発巣の再評価が推奨される。

#### 【検索式・参考にした二次資料】

PubMed で、breast, primary, recurrence, metastasis, therapy, biopsy, receptor のキーワードを用いて検索した。また ASCO/CAP ガイドライン 2013 年版を参考とした。ハンドサーチで検索した重要文献も追加した。

#### 【参考文献】

1. Lee AH, Key HP, Bell JA, et al. Concordance of HER2 status assessed on needle core biopsy and surgical specimens of invasive carcinoma of the breast. *Histopathology* 2012;60:880-84.
2. Tsuda H, Kurosumi M, Umemura S, et al. HER2 testing on core needle biopsy specimens from primary breast cancers: interobserver reproducibility and concordance with surgically resected specimens. *BMC Cancer* 2010;10:534.
3. van de Ven S, Smit VT, Dekker TJ, et al. Discordances in ER, PR and HER2 receptors after neoadjuvant chemotherapy in breast cancer. *Cancer Treat Rev* 2011;37:422-30.
4. Houssami N, Macaskill P, Balleine RL, et al. HER2 discordance between primary breast cancer and its paired metastasis : tumor biology or test artifact? Insights through meta-analysis. *Breast Cancer Res Treat.* 2011;129:659-74.
5. Niikura N, Liu J, Hayashi N, et al: Loss of human epidermal growth factor receptor 2 (HER2) expression in metastatic sites of HER2-overexpressing primary breast tumors. *J Clin Oncol* 2012;30:593-9.

CQ1-2: 多発浸潤癌の場合、各々に HER2 検査を行うべきか？

- A. 原則として最大浸潤径を示す浸潤癌が多く含まれるスライドを対象とする。乳癌には多様性、不均一性を示す癌の存在が知られている。検査の対象スライドとは別のスライドに、組織型や組織学的悪性度の異なる病巣が存在する場合は、追加検索を行ってもよい。

#### 【解説】

乳癌には、画像所見に基づく病理学的検索方法（標本作製数など）にもよるが、同一乳房内に同時に複数の浸潤癌巣がある場合がある。それらは **multicentric development**、**multifocal invasion**、単一浸潤癌の乳房内転移、の3通りに分類できる<sup>1-3)</sup>。これらの同一乳房内に同時に見られる複数の浸潤癌巣の間で、**ER**、**PgR**、**HER2**の発現状況が互いに異なる症例の存在が報告されている<sup>4-8)</sup>。**HER2**に関しては、個々の浸潤癌の比較で**6.0-9.7%**の相違が報告されており<sup>5-8)</sup>、同一組織型、悪性度であっても**HER2**発現状況が異なる症例が少数存在する。また同一浸潤癌巣内にも異なる組織型（混合癌）や組織学的悪性度成分、ホルモン・**HER2**発現状況に不均一性(**heterogeneity**)が存在することが知られている<sup>9-11)</sup>。

**HER2**検査施行標本の選択はその後の治療選択に影響を与えうるが、これまでに行われた**HER2**陽性乳癌の臨床治験のほとんどは、**multifocal**の乳癌は対象外となっている。全浸潤癌標本に対して**HER2**発現の検討を行うことは、現時点でエビデンスがなく、その検討結果に伴う治療成績、また労力・医療経済的観点をふまえた今後の検証が必要である。なお、**College of American Pathologists (CAP) Guidelines**では、**HER2**を含む乳癌生物学的因子は考慮せず、乳癌の病理学的検討は最大浸潤径の癌に基づいて行うとし、他の**multifocal**な浸潤癌成分に関しては組織型や組織学的悪性度が最大浸潤癌と異なる場合に検討・付記報告するとしている<sup>12,13)</sup>。

#### 【検索式・参考にした二次資料】

PubMed で、**breast**、**multifocal**、**multicentric**、**heterogeneity** のキーワードを用いて検索した。また **ASCO/CAP** ガイドライン 2013 年版を参考とした。ハンドサーチで検索した重要文献も追加した。

### 【参考文献】

1. Lynch SP, Lei X, Chavez-MacGregor M, et al. Multifocality and multicentricity in breast cancer and survival outcomes. *Ann Oncol* 2012;23:3063-9.
2. WoltersR, WöckelA, JanniW, et al. Comparing the outcome between multicentric and multifocal breast cancer: what's the impact on survival, and is there a role for guideline-adherent therapy? A retrospective cohort study of 8935 patients. *Breast Cancer Res Treat* 2013;142:579-90.
3. Boros M, Marian C, Moldovan C, et al. Morphological heterogeneity of the simultaneous ipsilateral invasive tumor foci in breast carcinoma: a retrospective study of 418 cases of carcinomas. *Pathol Res Pract.* 2012; 208:604-609.
4. Potts SJ, Krueger JS, Landis ND, et al. Evaluating tumor heterogeneity in immunohistochemistry-stained breast cancer tissue. *Lab Invest.* 2012; 92:1342-57.
5. Bartlett AI, Starczynski J, Robson T, et al. Heterogeneous HER2 gene amplification: impact on patient outcome and a clinically relevant definition. *Am J Clin Pathol* 2011; 136:266-74.
6. Seol H, Lee HJ, Choi Y, et al. Intratumoral heterogeneity of HER2 gene amplification in breast cancer: its clinicopathological significance. *Mod Pathol* 2012; 25:938-48.
7. Garimella V, Long ED, O'Kane SL, et al. Oestrogen and progesterone status of individual foci in multifocal invasive ductal cancer. *Acta Oncol.* 2007;46:204-207.
8. Buggi F, Folli S, Curcio A, et al. Multicentric/multifocal breast cancer with a single histotype: is the biological characterization of all individual foci justified? *Ann Oncol.* 2012;23:2042-6.
9. Choi Y, Kim EJ, Seol H, et al. The hormone receptor, human epidermal growth factor receptor 2, and molecular subtype status of individual tumor foci in multifocal/multicentric invasive ductal carcinoma of breast. *Hum Pathol.* 2012; 43:48-55.
10. Pekar G, Gere M, Tarjan M, et al. Molecular phenotype of the foci in multifocal invasive breast carcinomas: intertumoral heterogeneity is related to shorter survival and may influence the choice of therapy. *Cancer.* 2014;120:26-34
11. Bethune GC, Brendan Mullen J, Chang MC. HER2 testing of multifocal invasive breast cancer. How many blocks are enough? *Am J Clin Pathol* 2013;140:588-92.

12. Lester SC, Bose S, Chen YY, et al; Members of the Cancer Committee, College of American Pathologists. Protocol for the examination of specimens from patients with invasive carcinoma of the breast. Arch Pathol Lab Med. 2009;133:1515-38.

13. Protocol for the examination of specimens from patients with invasive carcinoma of the breast. ([www.cap.org/cancerprotocols](http://www.cap.org/cancerprotocols).)

CQ1-3: 10%中性緩衝ホルマリン以外の固定液を用いて、IHC 法および FISH 法を行うことか可能か？

A. HER2 検査の標準化および抗原性保持の点からも 10%中性緩衝ホルマリンを用いた固定が望ましい。それ以外のホルマリン固定液を用いる場合は、内部精度管理を厳密に行って、正しい検査結果が得られるように努めるべきである。

#### 【解説】

米国 ASCO/CAP ガイドラインおよび乳がん HER2 検査病理部会検査ガイドにおいて、固定液に関して 10%中性緩衝ホルマリンが推奨されている<sup>1,2)</sup>。しかしながら、わが国で 10%中性緩衝ホルマリンを使用している施設は、およそ半数程度である。それ以外の施設では 10%非緩衝ホルマリン、15%、20%の中性緩衝ホルマリンあるいは非緩衝ホルマリンなどが使用されている<sup>3)</sup>。10%、15%中性緩衝ホルマリンおよび 20%非緩衝ホルマリンを用いた施設での検討では各々の HER2 陽性率は適切な範囲内に収まっていると報告されている<sup>4)</sup>。10%中性緩衝ホルマリン以外の固定液使用については、ASCO/CAP ガイドライン内に注釈があり、施設内での検討が必要である旨の記載がなされている<sup>5,6)</sup>。具体的には、陽性・陰性コントロールを用いて適切に検査が行われるかを検討し、検査施行後には陽性率が 15~25%程度の適切な陽性率内にあることを確認するなどの内部精度管理を行うことが大切である。

なお、アルコール、アセトンなどのホルマリン以外での固定液の使用は不可とされている。ホルマリン濃度の低い zinc(Zn) formalin やホルマリンフリーの固定液でも 10%中性緩衝ホルマリンと同等の結果が FISH 法でも得られるという研究報告もあるが<sup>7)</sup>、現時点における実務状況を考慮すると 10%中性緩衝ホルマリンを第一選択とするべきであろう。正確な検査のためには、適切な条件下での検体標本作製が重要である。

#### 【検索式・参考にした二次資料】

PubMed にて、breast, human epidermal growth factor receptor type2, HER2, fixation, fixative, formalin のキーワードを用いて検索した。また ASCO/CAP ガイドライン 2013 年版を参考とした。ハンドサーチで検索された重要文献も追加した。

【参考文献】

1. Wolff AC, Hammond ME, Schwartz JN, et al. American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer. *J Clin Oncol.* 2007;25:118-45.
2. 乳がんHER2検査病理部会作成. HER2検査ガイド-抗HER2薬の適正な症例選択のための. 乳癌編第四版, 2014年4月改訂.  
(<http://pathology.or.jp/news/pdf/HER2-150213.pdf>)
3. 乳癌診断の精度管理 日本病理学会 精度管理委員会  
(<http://www.med.hirosaki-u.ac.jp/~patho2/SeidoKanri/index.html>)
4. Hashizume K, Hatanaka Y, Kamihara Y, et al. Interlaboratory comparison in HercepTest assessment of HER2 protein status in invasive breast carcinoma fixed with various formalin-based fixatives. *Appl Immunohistochem Mol Morphol.* 2003;11:339-44.
5. Gown AM. Current issues in ER and HER2 testing by IHC in breast cancer. *Mod Pathol.* 2008;21 Suppl 2:S8-S15. Review.
6. Wolff AC, Hammond ME, Hicks DG, 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;31:3997-4013.
7. Babic A, Loftin IR, Stanislaw S, 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;52:287-300.

CQ1-4: 検体が採取されてからホルマリン固定が行われるまでに許容される時間はどの程度か？

A. 検体採取後は速やかにホルマリン固定を行うことが望ましい。生検検体については、乾燥を防ぐ観点からも速やかに、手術検体についても 1 時間以内、長くとも 2 時間以内に固定を行うことが推奨される。

#### 【解説】

固定するまでにかかる時間が長い **delayed fixation** は、IHC 法および FISH 法のいずれにも影響を与える。蛋白質や DNA が蛋白質分解酵素や DNase の働きで分解されることで、抗原決定基の構造や DNA 断片の構造に影響を与え、IHC 法、ISH 法で検出できなくなることや反応性が低下することがある。

2 時間以上の **delayed fixation** は HER2 FISH 法の結果に有意に影響があるとする論文があり<sup>1)</sup>、同論文では 1 時間以上の **delayed fixation** はホルモン受容体に対する IHC 法の結果に影響を与えているとしている。これを受けてホルモン受容体に関する ASCO/CAP ガイドラインでは 1 時間以内の固定を推奨している<sup>2)</sup>。

HER2 IHC 法でスコア 3+となる場合には、固定までの時間が長くても染色への影響は少ないとする報告はある<sup>1,3)</sup>。しかしながら、HER2 IHC スコア 2+以下の症例や、ER, PgR などのホルモン受容体の IHC 検査に対する影響も考慮する必要があり、その観点からも 2 時間程度を目安として固定を行ったほうがよいであろう。

わが国では約半数の施設で 1 時間以内に手術検体の固定を行っているが、1/4 程度の施設では固定までに 2 時間以上かかっている。

検体採取から固定までに時間がかかる場合は、組織融解を防ぐために冷蔵庫に一時保存することで対応する必要があるが、4 時間程度に留めておいたほうがよい<sup>4,5)</sup>。

組織に対するホルマリン浸透は 1 時間あたり 1mm 程度なので、大きな切除検体では腫瘍部にホルマリンが到達するまでに時間を要する場合がある。そのため、腫瘍部分の検体を別取りして固定を行うか、腫瘍部に対して割を入れることで、速やかに腫瘍部の固定が行われる必要がある<sup>6)</sup>。

今後、各施設ごとの事情に対応しつつ、検体の適切な固定が速やかに行なわれるシステムの構築が必要である。

#### 【検索式・参考にした二次資料】

PubMedにて、breast, human epidermal growth factor receptor type2, HER2, fixation, fixative, ischemic のキーワードを用いて検索した。ハンドサーチで検索された重要文献も追加した。

#### 【参考文献】

1. Khoury T, Sait S, Hwang H, et al. Delay to formalin fixation effect on breast biomarkers. *Mod Pathol.* 2009;22:1457-67.
2. Hammond ME, Hayes DF, Dowsett M, et al. American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for immunohistochemical testing of estrogen and progesterone receptors in breast cancer. *Arch Pathol Lab Med.* 2010;134:907-22.
3. Moatamed NA, Nanjangud G, Pucci R, et al. Effect of ischemic time, fixation time, and fixative type on HER2/neu immunohistochemical and fluorescence in situ hybridization results in breast cancer. *Am J Clin Pathol.* 2011;136:754-61.
4. Portier BP, Wang Z, Downs-Kelly E, et al. Delay to formalin fixation 'cold ischemia time': effect on ERBB2 detection by in-situ hybridization and immunohistochemistry. *Mod Pathol.* 2013;26:1-9.
5. Yildiz-Aktas IZ, Dabbs DJ, Bhargava R. The effect of cold ischemic time on the immunohistochemical evaluation of estrogen receptor, progesterone receptor, and HER2 expression in invasive breast carcinoma. *Mod Pathol.* 2012;25:1098-105.
6. Lee AH, Key HP, Bell JA, et al. The effect of delay in fixation on HER2 expression in invasive carcinoma of the breast assessed with immunohistochemistry and in situ hybridisation. *J Clin Pathol.* 2014;67:573-5.

CQ1-5: 10%中性緩衝ホルマリンを用いて固定を行う際に、推奨される固定時間はどの程度か？

A. 推奨される固定時間は切除検体および生検検体ともに 6～72 時間である。これは HER2 検査だけではなく、同じ検体を用いて行われるホルモン受容体の IHC 法に対しての至適固定時間も考慮した固定時間となっている。

#### 【解説】

2013 年の米国 ASCO/CAP ガイドラインで、推奨される組織固定時間が従来の 6～48 時間から 6～72 時間に変更された。これによって金曜日に切除、固定された検体を週明けの月曜日まで固定することが可能となった。わが国では 75%以上の施設で、切除検体の固定時間は 48 時間以内となっている。IHC 法ではスコア 3+症例であれば、固定時間が 5～7 日であっても有意な染色性低下はないという報告が複数ある<sup>1,2)</sup>が、スコア 1+やスコア 2+症例では染色性が低下するという報告もある<sup>3)</sup>。FISH 法に関しても、7 日までの固定時間ではシグナル減弱はないとする報告はあるが、過固定により FISH 法に影響を与えるとする報告もある。

乳癌治療においては同じ検体を用いてホルモン受容体の検索を IHC 法で行うことが一般的である。72 時間以上の固定では、ホルモン受容体の染色性が低下することがあり、過固定を避けることが必要である<sup>3,4)</sup>。

一方、どの程度まで固定時間を短縮できるかということについては、HER2 検査に関しては、2-3 時間の固定を行えばスコア 3+症例では影響はないとする報告が多い。FISH 法に関しては、2 時間固定でシグナルは確認できるとの報告もある<sup>5)</sup>が、6 時間以下であれば影響を受けるという報告もある。ホルモン受容体について 6 時間未満の固定では染色性の低下を生じることが報告されており、CAP では用いるべきではないとされている。以上のことから、固定時間は 6～72 時間が推奨される。

注意点としては、固定液の長期使用によってホルマリン濃度は低下するため、適宜交換するなどして適正なホルマリン濃度に保つことも必要である。また、生検検体では、採取時刻によって固定時間が短くなる可能性もあり、状況によっては採取翌日まで固定を行うことも考慮する必要がある。

#### 【検索式・参考にした二次資料】

PubMedにて、breast, human epidermal growth factor receptor type2, HER2, fixation time, fixative, delay, short のキーワードを用いて検索した。また ASCO/CAP ガイドライン 2013 年版を参考とした。ハンドサーチで検索された重要文献も追加した。

#### 【参考文献】

1. Ibarra JA, Rogers LW. Fixation time does not affect expression of HER2/neu: a pilot study. *Am J Clin Pathol.* 2010;134:594-6.
2. Moatamed NA, Nanjangud G, Pucci R, et al. Effect of ischemic time, fixation time, and fixative type on HER2/neu immunohistochemical and fluorescence in situ hybridization results in breast cancer. *Am J Clin Pathol.* 2011;136:754-61.
3. Tong LC, Nelson N, Tsourigiannis J, et al. The effect of prolonged fixation on the immunohistochemical evaluation of estrogen receptor, progesterone receptor, and HER2 expression in invasive breast cancer: a prospective study. *Am J Surg Pathol.* 2011;35:545-52.
4. Wolff AC, Hammond ME, Hicks DG, 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;31:3997-4013.
5. Selvarajan S, Bay BH, Choo A, et al. Effect of fixation period on HER2/neu gene amplification detected by fluorescence in situ hybridization in invasive breast carcinoma. *J Histochem Cytochem.* 2002;50:1693-6.

CQ1-6: 細胞診検体での HER2 検査は可能か？

A. 乳腺穿刺吸引細胞診標本による HER2 IHC 法および HER2 FISH 法は、浸潤部を特定した判定が困難なため、原則として勧められない。ただし細胞診検体のみが採取可能な部位からの穿刺吸引細胞診あるいは体腔液からの検体では、セルブロック法による検討を考慮する。

#### 【解説】

乳癌の原発巣に対する穿刺吸引細胞診は、その低侵襲性や簡便さから、長らく重用されてきた。しかし現在の乳癌診療では、良悪性、組織型、悪性度などの組織学的所見に加えて、ホルモン受容体や HER2、Ki-67 など様々なバイオマーカーの検索が必要となった。

乳腺穿刺吸引細胞診標本を用いた HER2 蛋白および HER2 遺伝子増幅に関する検討は、1990 年代より継続的に行われてきた<sup>1-4)</sup>。IHC 法、FISH 法のいずれを実施しても、細胞診標本での結果は、対照となる生検ないし手術検体と比較し高い一致率を示したとする報告が多い<sup>2,4)</sup>。しかし HER2 の判定にあたっては、ASCO/CAP ガイドライン 2013 年版においても従来通り、浸潤巣での発現を評価することが明記されている<sup>1)</sup>。また細胞診検体の固定方法、染色性や遺伝子増幅の判定方法は標準化されていない。

以上より、乳腺穿刺吸引細胞診標本による HER2 検査は、浸潤部を特定した判定が困難なこと、評価方法が確立していないことより、原則として勧められない。ただし、針生検による検体採取が困難な部位から得られた細胞診検体を用いて HER2 検索を行う場合は、後述 (CQ1-7) のセルブロックによる評価を考慮する。なおアルコール固定された細胞診検体は HER2 検索に用いない。

#### 【検索式・参考にした二次資料】

Pubmed にて human epidermal growth factor receptor type 2, breast cancer, immunocytochemistry のキーワードを用いて検索した。また ASCO/CAP ガイドライン 2013 年版を参考とした。ハンドサーチで検索した重要文献も参考とした。

#### 【参考文献】

1. Corkill ME, Katz R. Immunocytochemical staining of c-erb B-2 oncogene in fine-needle aspirates of breast carcinoma: a comparison with tissue sections and other breast cancer prognostic factors. *Diagn Cytopathol.* 1994;11:250-4.

2. Sauter G, Feichter G, Torhorst J, et al. Fluorescence in situ hybridization for detecting erbB-2 amplification in breast tumor fine needle aspiration biopsies. *Acta Cytol.* 1996;40:164-73.
3. Bozzetti C, Nizzoli R, Guazzi A, et al. HER-2/neu amplification detected by fluorescence in situ hybridization in fine needle aspirates from primary breast cancer. *Ann Oncol.* 2002;13:1398-403.
4. Bofin AM, Ytterhus B, Martin C, et al. Detection and quantitation of HER-2 gene amplification and protein expression in breast carcinoma. *Am J Clin Pathol.* 2004;122:110-9.
5. Wolff AC, Hammond ME, Hicks DG, 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;31:3997-4013.

CQ1-7: セルブロック検体での HER2 検査は可能か？

A. ホルマリン固定でセルブロック化した検体から HER2 IHC 法および HER2 FISH 法のいずれも実施可能である。生検不可能な転移・再発病変あるいは体腔液由来の検体が対象となる。

**【解説】**

セルブロック法は、細胞診用の検体から組織ブロック標本を作成する方法である。具体的には、通常の細胞診標本作製後に残存する細胞沈渣や組織片を対象として、それらを種々の基材によって凝固・固化、あるいは遠心分離することによって集塊状とし、ホルマリン固定、パラフィン化を行い、組織検体のようにパラフィンブロックを作製する。体腔液や、生検不可能な組織からの穿刺吸引細胞診検体が対象となる。

セルブロック標本の利点は、組織診と同様に切片を作製し、複数の未染標本から免疫染色を行うことが可能な点にある。ホルマリン固定されたサンプルであれば、通常の組織標本と同じプロトコルを用いて免疫染色を実施可能である。乳癌を対象としたセルブロックの検討は多数報告されており<sup>1-4)</sup>、ホルマリン固定を行い作製されたセルブロック標本では、対照となる組織標本と同等の結果が得られるとする報告が多い<sup>1,4)</sup>。

ASCO/CAP ガイドライン 2013 年版では、原発巣と同様、再発巣に関しても HER2 の評価を行うことを強く推奨している<sup>5)</sup>。セルブロック法により、生検不可能な再発病変あるいは胸水・腹水などの体腔液由来の検体での HER2 検索が可能となる。

**【検索式・参考にした二次資料】**

Pubmed にて human epidermal growth factor receptor type 2, breast cancer, immunocytochemistry, cell block のキーワードを用いて検索した。また ASCO/CAP ガイドライン 2013 年版を参考とした。ハンドサーチで検索した重要文献も参考とした。

**【参考文献】**

1) Shabaik A, Lin G, Peterson M, et al. Reliability of Her2/neu, estrogen receptor, and progesterone receptor testing by immunohistochemistry on cell block of FNA and serous effusions from patients with primary and metastatic breast carcinoma. Diagn

Cytopathol. 2011;39:328-32.

2) Williams SL, Birdsong GG, Cohen C, et al. Immunohistochemical detection of estrogen and progesterone receptor and HER2 expression in breast carcinomas: comparison of cell block and tissue block preparations. *Int J Clin Exp Pathol* 2009;2:476-80.

3) Hanley KZ, Birdsong GG, Cohen C, et al. Immunohistochemical detection of estrogen receptor, progesterone receptor, and human epidermal growth factor receptor 2 expression in breast carcinomas: comparison on cell block, needle-core, and tissue block preparations. *Cancer*. 2009;117:279-88.

4) Kinsella MD, Birdsong GG, Siddiqui MT, et al. Immunohistochemical detection of estrogen receptor, progesterone receptor and human epidermal growth factor receptor 2 in formalin-fixed breast carcinoma cell block preparations: correlation of results to corresponding tissue block (needle core and excision) samples. *Diagn Cytopathol*. 2013;41:192-8.

5) Wolff AC, Hammond ME, Hicks DG, 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;31:3997-4013.

## 2. Analytical

CQ2-1: HER2 検査法にはどのようなものがあるか？

A1. DNA レベルの増幅をみる方法として ISH 法(FISH, DISH, CISH)、タンパクレベルで過剰発現をみる方法として IHC 法があり、抗 HER2 薬投与適応の決定に用いられる。

A2. 定量 RT-PCR 法などの分子生物学的方法によっても HER2 発現レベルを調べることも可能であるが、現段階において、IHC 法、ISH 法の代替法としての使用は推奨されない。

### 【解説】

HER2 検査は IHC 法や ISH 法によって行われる。ISH 法には、FISH 法、DISH(Dual color in situ hybridization)法、CISH(Chromogenic in situ hybridization)法があり。これらは体外診断用医薬品が保険収載されている<sup>1,2)</sup>。

DISH 法、CISH 法はいずれも FISH 法と同様に DNA における *HER2* 遺伝子増幅を検出する<sup>3-5)</sup>。DISH 法は、*HER2* 遺伝子と第 17 染色体のセントロメアを検出し、FISH 法と同様にシグナル総数の比を算出して、遺伝子増幅を判定する。銀粒子を用いて *HER2* 遺伝子は黒色、第 17 染色体のセントロメアはジゴキシゲニン(DIG)標識によって赤色のシグナルとして光学顕微鏡下で観察可能である。DISH 法も従来法である FISH 法と良好な相関性が得られている。FISH 法では、蛍光シグナルを用いて *HER2* 遺伝子増幅を検出するのに対し、CISH 法では色素(chromogen)を用いて検出する。蛍光色素を用いないため光学顕微鏡下で観察できる点が長所である。CISH 法は *HER2* 遺伝子シグナルのみで増幅を判定する方法であるが、CISH と FISH 間で高い一致率が示されている。この他、抗 HER2 薬適応検査ではないが、血清を対象とする CLIA(Chemiluminescent Immunoassay) 法も保険収載されており、転移性乳癌患者の再発モニタリングや治療効果評価目的で用いられることがある。

他にも HER2 の検査法としては、Northern blot 法や定量 RT-PCR 法、DNA microarray による遺伝子発現解析など分子生物学的手法によって RNA 発現レベルを調べることも可能である。但し、現時点では体外診断用医薬品としての保険収載はなされていない。

定量 RT-PCR 法は、ホルマリン固定パラフィン包埋標本から RNA を抽出して

行うことが可能である。定量 RT-PCR 法と、IHC 法あるいは FISH 法を用いた通常の HER2 検査との検討では、高い一致率を示すと報告されているものは多いが、腫瘍の不均一性(heterogeneity)などに起因すると考えられる不一致例が生じている<sup>7,8)</sup>。臨床使用が可能な *Oncotype DX* は定量 RT-PCR 法を用いて乳癌予後予測のための遺伝子解析ツールであり、解析される 21 遺伝子の中には HER2 も含まれている。*Oncotype DX* と IHC/FISH 法の比較検討もなされているが、高い割合で偽陰性が生じるとする報告もあり<sup>9,10)</sup>、現段階においては IHC/FISH 法の代替法としての使用は推奨されない。

DNA microarray を用いた遺伝子解析ツールとして *TargetPrint* があり、これは HER2, ER, PgR の mRNA 発現を定量的に評価する。これも同様に IHC/FISH 法との比較検討がなされているが、HER2 陽性症例での一致率は 75-90%程度とする報告もあり<sup>11)</sup>、薬剤適応を決める HER2 検査法としての使用は推奨されない。

#### 【検索式・参考にした二次資料】

PubMed にて、breast, human epidermal growth factor receptor type2, HER2, testing, technology, RT-PCR, microarray, molecular analysis のキーワードを用いて検索した。ハンドサーチで検索された重要文献も追加した。

#### 【参考文献】

1. 乳がん HER2 検査病理部会作成. HER2 検査ガイド-抗 HER2 薬の適正な症例選択のための. 乳癌編第四版, 2014 年 4 月改訂.
2. Moelans CB, de Weger RA, Van der Wall E, et al. Current technologies for HER2 testing in breast cancer. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2011;80:380-92. Review.
3. Brüggemann A, Lelkaitis G, Nielsen S, et al. Testing HER2 in breast cancer: a comparative study on BRISH, FISH, and IHC. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 2011;19:203-11.
4. Wixom CR, Albers EA, Weidner N. Her2 amplification: correlation of chromogenic in situ hybridization with immunohistochemistry and fluorescence in situ hybridization. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 2004;12:248-51.
5. Horii R, Matsuura M, Iwase T, et al. Comparison of dual-color in-situ hybridization and fluorescence in-situ hybridization in HER2 gene amplification in breast cancer. *Breast Cancer*. 2014 ;21:598-604.

6. Hayashi N, Nakamura S, Tokuda Y, et al. Serum HER2 levels determined by two methods in patients with metastatic breast cancer. *Int J Clin Oncol*. 2012;17:55-62.
7. Baehner FL, Achacoso N, Maddala T, et al. Human epidermal growth factor receptor 2 assessment in a case-control study: comparison of fluorescence in situ hybridization and quantitative reverse transcription polymerase chain reaction performed by central laboratories. *J Clin Oncol*. 2010;28:4300-6.
8. Lehmann-Che J, Amira-Bouhidel F, Turpin E, et al. Immunohistochemical and molecular analyses of HER2 status in breast cancers are highly concordant and complementary approaches. *Br J Cancer*. 2011;104:1739-46.
9. Dabbs DJ, Klein ME, Mohsin SK, et al. High false-negative rate of HER2 quantitative reverse transcription polymerase chain reaction of the Oncotype DX test: an independent quality assurance study. *J Clin Oncol*. 2011;29:4279-85.
10. Park MM, Ebel JJ, Zhao W, et al. ER and PR immunohistochemistry and HER2 FISH versus oncotype DX: implications for breast cancer treatment. *Zynger DL. Breast J*. 2014;20:37-45.
11. Viale G, Slaets L, Bogaerts J, et al. High concordance of protein (by IHC), gene (by FISH; HER2 only), and microarray readout (by TargetPrint) of ER, PgR, and HER2: results from the EORTC 10041/BIG 03-04 MINDACT trial. *Ann Oncol*. 2014;25:816-23.

CQ2-2: HER2 IHC 法に適した組織切片はどのように作製するか？

A. 浸潤癌巢が含まれた 4  $\mu\text{m}$  の薄切標本を IHC 法に用いる。薄切後は可能な限り速やかに染色を行うことが望ましいが、最長でも室温で 6 週間以内の保存に留める。

#### 【解説】

HER2 検査は、浸潤癌巢を対象として判定を実施する<sup>1,2)</sup>。具体的には、対象症例の組織像を代表する浸潤部を含むパラフィンブロックを選定し、免疫染色 (IHC) 法に用いる。HER2 IHC 法に用いる抗体は、対象とする切片の厚さを 4  $\mu\text{m}$  と規定している。切片の厚さは、染色強度の判定に影響を及ぼし得るので、可能な限り推奨された厚さでの薄切を心掛ける<sup>1)</sup>。

パラフィンブロックを薄切して得られた未染色標本を室温で保管すると、経時的に免疫染色の染色性が低下することが知られている<sup>3,4)</sup>。ASCO/CAP ガイドライン 2013 年版<sup>1)</sup>および乳がん HER2 検査病理部会作成の HER2 検査ガイド<sup>2)</sup>では、薄切から 6 週間以内の使用を推奨している。薄切後の未染標本を用いた HER2 IHC 法の経時的変化を詳細に検討した報告はないが、薄切 6 ヶ月後の乳癌組織アレイを用いた検討では、HER2 陽性頻度が 64.4% から 45.5% に低下したと報告されている<sup>5)</sup>。HER2 IHC 法は薄切後、可及的速やかに行うことが望ましい。

既に pre-analytical の項で述べたように、IHC 法に適さないものとしては、上述の条件を満たさないものに加え、長時間固定された標本 (72 時間以上)、固定までの時間が遅延して組織融解を生じた標本、などが挙げられる<sup>1)</sup>。

#### 【検索式・参考にした二次資料】

Pubmed にて human epidermal growth factor receptor type 2, breast cancer, immunohistochemistry, storage, loss のキーワードを用いて検索した。また ASCO/CAP ガイドライン 2013 年版を参考とした。ハンドサーチで検索した重要文献も参考とした。

#### 【参考文献】

1. Wolff AC, Hammond ME, Hicks DG, 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;31:3997-4013.

2. 乳がん HER2 検査病理部会作成. HER2 検査ガイドー抗 HER2 薬の適正な症例選択のための. 乳癌編第四版, 2014 年 4 月改訂.
3. Jacobs TW, Prioleau JE, Stillman IE, et al. Loss of tumor marker-immunostaining intensity on stored paraffin slides of breast cancer. *J Natl Cancer Inst.* 1996;88:1054-9.
4. Wester K, Wahlund E, Sundström C, et al. Paraffin section storage and immunohistochemistry. Effects of time, temperature, fixation, and retrieval protocol with emphasis on p53 protein and MIB1 antigen. *Appl Immunohistochem Mol Morphol.* 2000;8:61-70.
5. Fergenbaum JH, Garcia-Closas M, Hewitt SM, et al. Loss of antigenicity in stored sections of breast cancer tissue microarrays. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2004;13:667-72.

### CQ2-3: HER2 IHC 検査に推奨される抗体はあるか？

A. 体外診断用医薬品として認可された抗体を用い、推奨されたプロトコールに則り免疫染色を行う。

#### 【解説】

HER2 免疫染色 (IHC) は抗 HER2 抗体薬治療の対象症例を適切に選定するうえで、極めて重要であり、また高い精度で実施することを求められている<sup>1,2)</sup>。

HER2 IHC 用抗体は、本邦では体外診断用試薬として 4 メーカー 6 種類が認可されている (表 1)。各々の抗体の染色プロトコールに従い、IHC を行う必要がある。これらの抗体は、スクリーニング用検査試薬としての感度、特異度、正確度を有することが実験データで示されている。ただし、個々の抗体間では、IHC のスコアの分布に異なる特徴がみられるとの報告もあり<sup>3)</sup>、自施設で使用する抗体の特徴に留意する必要がある。

表 1 体外診断用医薬品として承認されている免疫染色用キット

製品名	販売元	抗体種	クローン	認識部位
ダコ Hercep Test II	ダコ・ジャパン	P		ICD
ヒストファイン HER2 キット(POLY)	ニチレイバイオサイエンス	P		ICD
ヒストファイン HER2 キット (MONO)	ニチレイバイオサイエンス	MM	SV2-61Y	ECD
Bond ポリマーシステム HER2 テスト	ライカマイクロシステムズ	MM	CB11	ICD
ベンタナ I-VIEW パスウェーHER2(4B5)	ロシュ・ダイアグノスティックス	MR	4B5	ICD
ベンタナ ultra View パスウェーHER2(4B5)	ロシュ・ダイアグノスティックス	MR	4B5	ICD

P、polyclonal ; MM、monoclonal, mouse; MR、monoclonal, rabbit; ICD、intracytoplasmic domain; ECD、extracytoplasmic domain

#### 【検索式・参考にした二次資料】

Pubmed にて human epidermal growth factor receptor type 2, breast cancer, immunohistochemistry, antibody のキーワードを用いて検索した。また ASCO/CAP ガイドライン 2013 年版を参考とした。ハンドサーチで検索した重要文献も参考とした。

#### 【参考文献】

1. Wolff AC, Hammond ME, Hicks DG, 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;31:3997-4013.
2. 乳がん HER2 検査病理部会作成. HER2 検査ガイドー抗 HER2 薬の適正な症例選択のための. 乳癌編第四版, 2014 年 4 月改訂.
3. 淵之上史, 増田しのぶ. 乳癌におけるコンパニオン診断. 病理と臨床 2012, 30:1321-7.

CQ2-4: 推奨される HER2 検査判定アルゴリズムは？

A. ASCO/CAP 2013 ガイドラインに準拠して判定する（以下に『HER2 検査ガイド（第4版）』【HER2 検査フローチャート】を転載）。

表 1. HER2 IHC 法の判定フローチャート

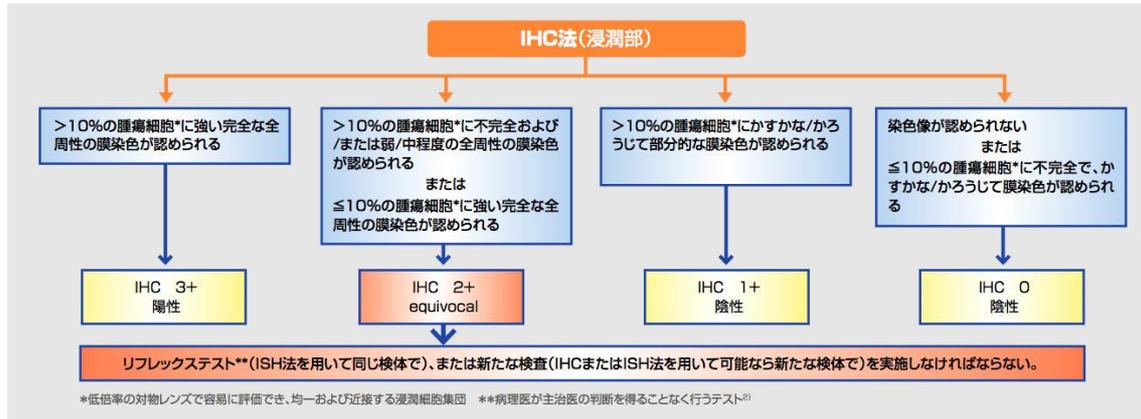


表 2. HER2 Dual probe ISH 法 (FISH 法、DISH 法) の判定フローチャート

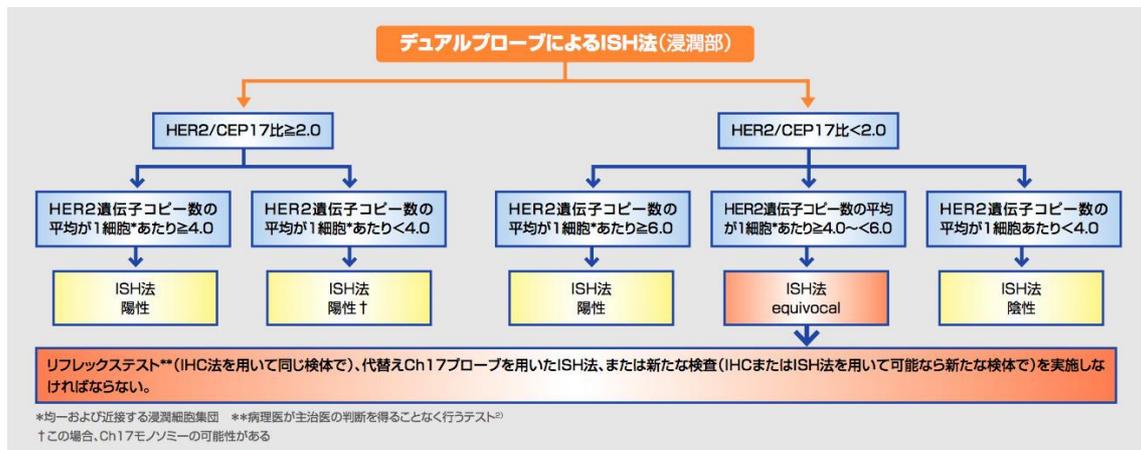
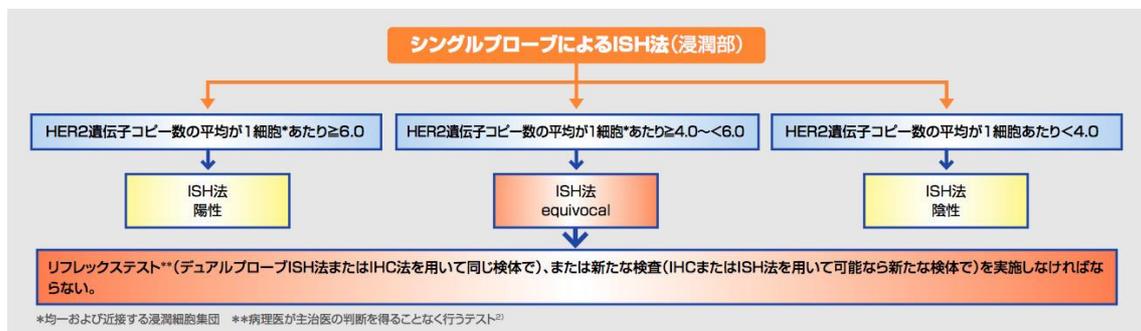


表 3. HER2 Single probe ISH 法 (CISH 法) の判定フローチャート



(表 1-3; 『HER2 検査ガイド (第 4 版)』 から転載)

### 【解説】

ASCO/CAP HER2ガイドラインの判定方法には変遷がみられるため、注意が必要である。IHC法でのスコア3+の判定基準に関して、FDA承認時の基準では浸潤部の癌細胞の10%以上が強陽性であることとされていたが、2007年版のASCO/CAPでは30%を越える浸潤部の腫瘍細胞が強陽性の場合に3+とするとしていた<sup>1)</sup>。また、FISH法の場合のFDA承認時の基準は、浸潤癌細胞における平均17番染色体セントロメアコピー数に対する平均HER2遺伝子コピー数の比 (HER2/CEP17比、もしくはHER2/CEN17比) が2.0以上を増幅ありとしていたが、2007年版ASCO/CAPガイドラインでは $>2.2$ を増幅ありとした。ただし、IHC法での3+の判定基準の10%以上を $>30\%$ への変更、FISH比のカットオフ値2.0を2.2に変更に関する客観的根拠は示されていなかった。2007年ASCO/CAPガイドラインではIHC法、FISH法の判定各々にequivocalという概念を取り入れ、HER2陽性の判定により慎重な姿勢が示されていた。IHC法では癌細胞の $>10\%$ 以上に全周性の弱～中等度の膜染色性もしくは $>10\%$ かつ $30\%$ 以下の全周性の強い膜染色性の場合にはスコア2+ (equivocal) と判定され、FISH法で確認することが奨められた。またFISH法でHER2/CEP17比が1.8～2.2の間の場合もequivocalと判定され、計測細胞数を増やしての測定やFISH法での再検、これらでもなおequivocalのときはIHC法を行うことが奨められていた。結果として、偽陽性・偽陰性症例の頻度が減少を示した報告が複数なされ<sup>2,3)</sup>、ASCO/CAP 2013ガイドラインの改訂に至っている<sup>4)</sup>。この6年でHER2検査精度管理への周知が浸透したことを受け、今回の改訂では、患者受益の点を考慮し、偽陰性症例のすくい上げに主眼が置かれている

2013年 ASCO/CAPのIHCに関するガイドラインの主要な変更点として(1) IHCスコア3+の判定基準が、強い完全な全周性の細胞膜陽性を示す癌細胞の比率「 $>30\%$ 」から、「 $>10\%$ 」に引き下げられた。(2) 従来はスコア0 (陰性) と判定されていた、「完全な全周性の細胞膜陽性癌細胞が $10\%$ 以下」の症例はIHCスコア2+と定義された。従来はIHCスコア1+と判定されていた不完全な全周性の膜染色性が $>10\%$ の癌細胞に認められた症例の判定がスコア2+にupgradeされた。(4)技術的問題で検査が実施できない、あるいは陽性、equivocal、陰性が判定出来ない場合には判定不能と報告する、である。ISH法に関する主な変更点は、(1)HER2 ISH

陽性基準は、HER2/CEP17比（或いはHER2/CEN17比）が、従来の「2.2を超える」から「2.0以上」に変更され、またこれらの比が、2.0未満でも、癌細胞あたり平均HER2遺伝子コピー数が6.0以上のものが新たにISH陽性と定義された。(2) (2)HER2/CEP17比（或いはHER2/CEN17比）が2.0未満でも、癌細胞あたり平均HER2遺伝子コピー数が4.0以上、6.0未満の場合はequivocalと定義された、である。HER2蛋白過剰発現は、癌細胞あたりの平均HER2/CEP17比（或いはHER2/CEN17比）2.0以上、平均HER2遺伝子コピー数(6.0以上)、のどちらの基準とも相関することが示されている。一方、乳癌には癌細胞あたりの平均17番染色体CEP17（或いはCEN17）コピー数が3.0以上のpolysomy 17の例が10～49%に見られることが知られている<sup>5)</sup>。Polysomy 17の例の場合、平均HER2遺伝子コピー数6.0以上の乳癌であってもHER2/CEP17比は2.0未満となり得る。このような乳癌を持つ患者では、有効であるはずの抗HER2療法を受ける機会が失われることが危惧されており、一部の研究者からは、平均HER2遺伝子コピー数を報告すべき、あるいはHER2/CEP17比と併記すべき、との主張もなされていた<sup>5-7)</sup>。2013年版ASCO/CAPガイドラインではHER2/CEP17比とともに平均HER2遺伝子コピー数も加味された判定となっている。

IHC法、ISH法の判定がequivocalとなった場合は、IHCとISHを交代させたりフレックステスト、ISH法では代替17番染色体プローブを用いたISH法の実施、などが勧められている。ASCO/CAP 2013年版では、再検査を行っても再度判定がequivocalとなる症例もありえ、その場合は総合的に判断し、陽性か否かを判定することになる。しかしながら、その明確な判断根拠は示されていない。ガイドラインのカットオフ値に関するさまざまな基準は、改訂毎の主な変更点の対象となっており、注意が必要である。

#### 【検索式・参考にした二次資料】

PubMedで、breast cancer, human epidermal growth factor receptor type 2, HER2, immunohistochemistry, In Situ Hybridization, FISHのキーワードを用いて検索した。またASCO/CAPガイドライン2013年版を参考とした。ハンドサーチで検索した重要文献も追加した。

#### 【参考文献】

- 1) Wolff AC, Hammond ME, Schwartz JN, et al. American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for human

- epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer. *J Clin Oncol* 2007;25:118-45.
- 2) Middleton LP, Price KM, Puig P, et al. Implementation of American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists HER2 Guideline Recommendations in a tertiary care facility increases HER2 immunohistochemistry and fluorescence in situ hybridization concordance and decreases the number of inconclusive cases. *Arch Pathol Lab Med.* 2009;133:775-80.
  - 3) Vergara-Lluri ME, Moatamed NA, Hong E, et al. High concordance between HercepTest immunohistochemistry and ERBB2 fluorescence in situ hybridization before and after implementation of American Society of Clinical Oncology/College of American Pathology 2007 guidelines.) *Mod Pathol.* 2012;25:1326-32.
  - 4) Wolf AC, Hammond EH, Hicks DG, 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;31:3997-4014.
  - 5) Moelans CB, Reis-Filho JS, van Diest PJ. Implications of rarity of chromosome 17 polysomy in breast cancer. *Lancet Oncol.* 2011;12:1087-9.
  - 6) Vranic S, Teruya B, Repertinger S, et al. Assessment of HER2 gene status in breast carcinomas with polysomy of chromosome 17. *Cancer.* 2011;117:48-53.
  - 7) Tse CH, Hwang HC, Goldstein LC, et al. Determining true HER2 gene status in breast cancers with polysomy by using alternative chromosome 17 reference genes : implications for anti—HER2 targeted therapy. *J Clin Oncol.* 2011;29:4168-74.

### 3. Post-analytical

CQ3-1: 報告書に記載すべき内容にはどのようなものがあるか？

A. HER2 IHC 法では染色スコア (0, 1+, 2+, 3+)、*HER2* FISH 法 (Dual probe 法) ないし DISH 法では *HER2*/CEP17 比 (或いは *HER2*/CEN17 比) の記載が必須である。*HER2*/CEP17 比 2.0 未満の場合は癌細胞あたりの平均 *HER2* 遺伝子コピー数の記載を加える。

#### 【解説】

HER2 検査では免疫染色によって HER2 蛋白の過剰発現の有無を、ISH 法などによって *HER2* 遺伝子の増幅の有無を評価する<sup>1)</sup>。HER2 IHC では、乳癌細胞の細胞膜における染色強度、細胞膜の全周に占める割合、陽性細胞の割合を総合的に評価し、0、1+、2+、3+のいずれかのスコアを記載する (CQ2-4: 表 1 参照)。*HER2* ISH では、計測可能な 20 細胞における *HER2* シグナル数、CEP17 シグナル数を計測する。*HER2*/CEP17 比 (或いは *HER2*/CEN17 比) および癌細胞あたりの平均 *HER2* 遺伝子コピー数を算定し、報告書に記載する (CQ2-4: 表 2,3 参照)。ASCO/CAP ガイドライン 2013 年版では *HER2*/CEP17 比 (或いは *HER2*/CEN17 比) が 2 以上で ISH 陽性とするが、2 未満でも、癌細胞あたりの平均 *HER2* 遺伝子コピー数が 6 以上の場合は *HER2* ISH 陽性とすることが明記されている。

HER2 検査の判定基準は時代によって変遷してきており、最近も ASCO/CAP ガイドラインが 2007 年版から 2013 年版に改訂され<sup>1,2)</sup>、本邦でもそれらに準じた *HER2* 検査ガイドが公開されている<sup>3,4)</sup>。ASCO/CAP ガイドライン 2013 年版では、*HER2* 検査に用いた抗体や ISH プローブ、判定基準などの項目について詳細に記載することを推奨しているが<sup>1)</sup>、不可能な場合は検査室内で追跡可能な形で情報を記録しておくことが望まれる。

#### 【検索式・参考にした二次資料】

Pubmed にて human epidermal growth factor receptor type 2, breast cancer, immunohistochemistry, fluorescence in situ hybridization, report のキーワードを用い

で検索した。また ASCO/CAP ガイドライン 2013 年版を参考とした。ハンドサーチで検索した重要文献も参考とした。

【参考文献】

1. Wolff AC, Hammond ME, Hicks DG, 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;31:3997-4013.
2. Wolff AC, Hammond ME, Schwartz JN, et al. American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer. J Clin Oncol. 2007;25:118-45.
3. トラスツズマブ病理部会作成. HER2 検査ガイドーハーセプチンの適正な症例選択のための. 第三版, 2009 年 9 月改訂.
4. 乳がん HER2 検査病理部会作成. HER2 検査ガイドー抗 HER2 薬の適正な症例選択のための. 乳癌編第四版, 2014 年 4 月改訂.

CQ3-2: 組織型から予測される HER2 検査結果と実際の結果との間に乖離が生じた場合、再検を行う必要があるか？

A. ASCO/CAP HER2 ガイドライン 2013 年版では、組織型によって予想される HER2 検査結果と実際の結果が異なる場合、HER2 の再検索を考慮するよう推奨している。病理医あるいは臨床医が、組織型と HER2 判定結果との間に乖離があると判断した場合は、HER2 の再検索を考慮してもよい。

#### 【解説】

ASCO/CAP 検査ガイドライン 2013 年版では、組織型によって予想される HER2 検査結果と実際の結果が異なる場合、HER2 の再検索を考慮するよう推奨している<sup>1)</sup>。HER2 の陽性頻度は、組織型やグレードによって異なり<sup>2)</sup>、特に組織学的グレード 3 の浸潤性乳管癌で陽性頻度が高いことが知られている<sup>3)</sup>。

再検を考慮する実例として、組織学的グレードが 1 のホルモン受容体陽性浸潤性乳管癌、ホルモン受容体陽性浸潤性小葉癌、管状癌、粘液癌、浸潤性篩状癌、腺様嚢胞癌などが HER2 陽性だった場合を挙げている<sup>1)</sup>。これらの組織型では通常、HER2 陰性であるためである<sup>2)</sup>。

現状では、病理医あるいは臨床医が、組織型と HER2 判定結果との間に明らかな乖離があると判断した場合にのみ、HER2 の再検索を考慮しても良い。

#### 【検索式・参考にした二次資料】

Pubmedにて human epidermal growth factor receptor type 2, breast cancer, histological classification, discordance のキーワードを用いて検索した。また ASCO/CAP ガイドライン 2013 年版を参考とした。ハンドサーチで検索した重要文献も参考とした。

#### 【参考文献】

1. Wolff AC, Hammond ME, Hicks DG, 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;31:3997-4013.
2. Weigelt B, Reis-Filho JS. Histological and molecular types of breast cancer: is there a unifying taxonomy? Nat Rev Clin Oncol. 2009;6:718-30.

3. Tsuda H. Prognostic and predictive value of c-erbB-2 (HER-2/neu) gene amplification in human breast cancer. *Breast Cancer*. 2001;8:38-44.

CQ3-3: IHC と FISH の結果に不一致が生じた場合、どのように解釈するのが適切か？

A. 通常、IHC 法の検査結果よりも ISH 法の検査の方が正確で、再現性も高いことが示されている。標本作製過程や検査過程が正しく行われていなかった場合、免疫染色や ISH の結果が偽陰性になる可能性がある。標本作製、検査自体、判定自体が正しく行われていた場合、IHC と ISH の検査結果不一致は腫瘍内不均一性、低レベルの ISH 陽性例、IHC スコア 3+ の ISH 陰性例などに由来し得る。

#### 【解説】

IHC法とISH法の検査精度については、NSABP-B31試験、N-9831試験において、IHC法でHER2陽性とされてトラスツズマブ治療に登録された乳癌患者の18～26%が中央検査施設における再検査により、蛋白質過剰発現も遺伝子増幅も認められなかった、というデータがある。<sup>1-2)</sup> これに対しFISH法の観察者間再現性は極めて高いと報告されている<sup>3)</sup>、最近では、精度管理の概念が普及するにつれて偽陰性、偽陽性症例の頻度は減少傾向にある<sup>4,5)</sup>。また、IHCとFISHの結果は、用いる組織が新鮮凍結材料であれば、非常によく一致することが知られているが、ホルマリン固定パラフィン包埋することでこの両者の結果に食い違いが起り得るとされ、FISH法の結果を重視するという意見もある<sup>6)</sup>。また同一浸潤癌巣内にも異なる組織型(混合癌)や組織学的悪性度成分がみられ、HER2発現状況に不均一性(heterogeneity)が存在することも、不一致の一因と推定されている<sup>7-9)</sup>。低レベルのISH陽性例(例えば、*HER2/CEP17*比=2.0だが17番染色体セントロメア領域のみの欠失により、癌細胞あたりの平均*HER2*遺伝子コピー数は2.0しかなく、HER2 IHCでは発現陰性の例)、一方で、IHCスコア3+だがISH陰性(*HER2/CEP17*比2.0未満かつ癌細胞あたりの*HER2*遺伝子コピー数6.0未満の例など)もごく稀に存在する。

#### 【検索式・参考にした二次資料】

PubMedで、breast cancer, human epidermal growth factor receptor type 2, HER2, immunohistochemistry, In Situ Hybridization, FISHのキーワードを用いて検索した。またASCO/CAPガイドライン2013年版を参考とした。ハンドサーチで検索した重要文献も追加した。

【参考文献】

1. Paik S, Bryant J, Tan-Chiu E, et al. Real-world performance of HER2 testing-National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project experience. *J Natl Cancer Inst.* 2002;94:852-4.
2. Roche PC, Suman VJ, Jenkins RB, et al. Concordance between local and central laboratory HER2 testing in the breast intergroup trial N9831. *J Natl Cancer Inst.* 2002; 94: 855-7.
3. Tsuda H, Akiyama F, Terasaki H, et al. Detection of HER-2/neu (c-erbB-2) DNA amplification in primary breast carcinoma. Interobserver reproducibility and correlation with immunohistochemical HER2 overexpression. *Cancer.* 2001;92:2965-74.
4. Middleton LP, Price KM, Puig P, et al. Implementation of American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists HER2 Guideline Recommendations in a tertiary care facility increases HER2 immunohistochemistry and fluorescence in situ hybridization concordance and decreases the number of inconclusive cases. *Arch Pathol Lab Med.* 2009;133:775-80.
5. Vergara-Lluri ME, Moatamed NA, Hong E, et al. High concordance between HercepTest immunohistochemistry and ERBB2 fluorescence in situ hybridization before and after implementation of American Society of Clinical Oncology/College of American Pathology 2007 guidelines.) *Mod Pathol.* 2012;25:1326-32.
6. Sauter G, Lee J, Bartlett JM, et al. Guidelines for human epidermal growth factor receptor 2 testing : biologic and methodologic considerations. *J Clin Oncol.* 2009;27:1323-33.
7. Potts SJ, Krueger JS, Landis ND, et al. Evaluating tumor heterogeneity in immunohistochemistry-stained breast cancer tissue. *Lab Invest.* 2012;92:1342-57.
8. Bartlett AI, Starczynski J, Robson T, et al. Heterogeneous HER2 gene amplification: impact on patient outcome and a clinically relevant definition. *Am J Clin Pathol* 2011;136:266-74.
9. Seol H, Lee HJ, Choi Y, et al. Intratumoral heterogeneity of HER2 gene amplification in breast cancer: its clinicopathological significance. *Mod Pathol* 2012;25:938-48.

CQ3-4: 不一致,あるいはIHC2+を想定し,IHCとFISHの両者を同時に行っても良いか?

A. 結果に相違がある場合でも、いずれかの方法でHER2過剰発現が確認された乳癌は抗HER2療法の対象となるため、両者を同時に行えばHER2偽陰性症例の減少に繋がる。ただし、現在推奨されているのはIHC法を先に行い、判定がつかない例にISH法で再検査を行う流れか、もしくはISH法を先に行い、判定がつかない例にIHC法などで再検査を行う流れか、のいずれかである。同時に行うことは推奨されない。

#### 【解説】

現在わが国では、まずIHC法によりHER2蛋白発現の検査を行い、IHC法スコア3+を治療適応あり、IHC法スコア0/1+を原則治療適応なし、IHC法スコア2+の場合はISH法で再検査を行い、HER2遺伝子増幅が確認された症例のみを治療適応ありとする施設が多いが、ISH法を先に行う施設もある。近年欧米では、精度・再現性・治療効果予測性および医療経済的観点から、初めからISH法を用いることも提唱されている<sup>1)</sup>。医療経済学的見地からFISH法のみを用いるか、IHC法2+,3+全例につきFISH法で増幅を確認する方法が、IHC法2+のみに対する再検査よりも対費用効果が高いと結論付けた報告もある<sup>2)</sup>。乳がんHER2検査病理部会(旧トラスツズマブ病理部会)作成の「HER2検査ガイド 乳癌編第4版」では、IHC法とISH法は並列の関係に位置付けられており、両者とも保険収載され、平成24年度の診療報酬改定で併算定も認められるようになった。IHCとFISHの両者を同時に行うことは、一部の患者には利益があると想定される。しかしながら、IHC法とISH法の併用算定は、IHCスコア2+の例の再検査としてISH法を行うか、最初からISH法を行うことを想定して承認された経緯があると考えられる。医療経済学的観点からは、全例に両検査の同時併用を行うことは積極的には推奨されない。

#### 【検索式・参考にした二次資料】

PubMedで、breast cancer, human epidermal growth factor receptor type 2, HER2, immunohistochemistry, In Situ Hybridization, FISHのキーワードを用いて検索した。またASCO/CAPガイドライン2013年版を参考とした。ハンドサーチで検索した重要文献も追加した。

【参考文献】

- 1) Sauter G, Lee J, Bartlett JM, et al. Guidelines for human epidermal growth factor receptor 2 testing : biologic and methodologic considerations. J Clin Oncol. 2009; 27:1323-33.
- 2) Elkin EB, Weinstein MC, Winer EP, et al. HER-2 testing and trastuzumab therapy for metastatic breast cancer: a cost-effectiveness analysis. J Clin Oncol. 2004;22:854-63.

CQ3-5: 内部精度管理を行なうことは必要か？

A. HER2 検査における IHC 法、ISH 法は多くのステップを経て行われ、検査精度の低下をひきおこすような要因が各ステップに内在している。これらの要因を日常業務においても意識しながら正しい検査結果を報告し、患者に受益をもたらすことは検査の根幹であることから、持続的な内部精度管理を行うことは不可欠である。

#### 【解説】

ASCO/CAP ガイドラインでは、HER2 検査の精度維持、持続的な精度管理の重要性が強調されている<sup>1)</sup>。精度管理には、施設ごとの精度管理である内部精度管理と、学会や非営利活動法人などが多施設にわたって精度管理を行う外部精度評価がある。HER2 検査では、pre-analytical から post-analytical までの全ての工程において、標準化が困難な部分もあるため、検査の質の保つために内部および外部精度評価が必要である。

HER2 検査の導入時には相当数の症例を用いて検査結果の妥当性を評価する必要があり、その後も継続的な精度管理や設備管理を行なうべきである。施設内で標準化された作業手順を適用し、手順に変更が生じた際には、再度検査の精度を評価する必要がある。継続的な技師や病理医のトレーニング、能力評価も精度評価に含まれる。実際的には、可能なかぎり ASCO/CAP の推奨条件に近づけて標本作製を行うとともに、プロセスの適正化を行う。HER2 IHC 法の際には、陰性例、陽性例のコントロール組織を同時に染色することが望ましく、陽性例の染色性が弱いあるいは陰性となった場合、陰性例や 1+症例が通常よりも強く染色された場合には再検査をする必要がある<sup>2)</sup>。確立された各施設内での内部精度管理の手順はないが<sup>3)</sup>、ある期間内での検査陽性率が 15～25%程度の適切な陽性率内にあることを確認するも大切である。

内部および外部精度評価を行なった際の記録を保管、レビューすることによって HER2 検査の質が保たれていることを確認する必要がある。

#### 【検索式・参考にした二次資料】

PubMed にて、breast, human epidermal growth factor receptor type2, HER2, internal, quality, control, assurance のキーワードを用いて検索した。ハンドサーチで検索された重要文献も追加した。

【参考文献】

1. Wolff AC, Hammond ME, Hicks DG, 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;31:3997-4013.
2. Moelans CB, de Weger RA, Van der Wall E, et al. Current technologies for HER2 testing in breast cancer. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2011;80:380-92. Review.
3. Martin V, Camponovo A, Ghisletta M, et al. Internal Quality Assurance Program for ERBB2 (HER2) Testing Improves the Selection of Breast Cancer Patients for Treatment with Trastuzumab. *Patholog Res Int*. 2012;2012:261857. doi: 10.1155/2012/261857.

### CQ3-6: 外部精度評価を受けることは必要か？

A. 内部精度管理だけではなく、第三者からみた検査精度の評価を受けることは、検査の質を維持していく上で不可欠である。外部精度評価によって、標本の質、検査の質、病理判定の質についての客観的な評価を受けることができる。日本病理精度保証機構などの外部精度評価を受けることは必要である。

#### 【解説】

英国、北米、欧州においては UK-NEQAS(United Kingdom National External Quality Assessment Service)や CAP(College of American pathologists)などの外部精度評価体制が確立されている。ASCO/CAP ガイドラインでは、少なくとも年2回は外部精度評価に参加することを推奨している。具体例としては、標本が配布され、各施設で HER2 検査を行い、染色結果の判定まで行う。90%以上の症例が正しく判定されることが要求され、90%未満であれば認証プログラムの必要条件に基づいた対応が必要となる<sup>1)</sup>。

HER2 IHC 法においては、外部精度評価における検討で、スコア 0, 3+症例において一致率は高いが、スコア 1+, 2+症例については各施設の結果にばらつきがみられることがあると報告されている<sup>2)</sup>。また、同一標本を用いた場合においても検査者間の判定結果に不一致が生じることもある<sup>3)</sup>。

HER2 FISH 法においては、大きな検査施設では一定の精度が保たれている一方、細胞株を用いた多施設間での検討によって精度が保たれていない施設もあると報告されている<sup>4)</sup>。

以上のことから、IHC 法、FISH 法などいずれの検査法においても、検査精度が保たれていることを定期的に確認する必要がある、評価結果が良くない場合には、標本作製の段階から見直し、検査精度を向上させることが求められる。内部精度管理に加え、第三者の目からみた精度評価である外部精度評価へ参加することも大切である<sup>5)</sup>。

本邦においては、日本病理学会と日本臨床衛生検査技師会によって設立された日本病理精度保証機構(Japan Pathology Quality Assurance System; JPQAS)によって、2014 年より外部精度評価が始動している。

病理診断の質を保証するためには、継続的な内部精度管理を行うとともに、外部評価を受けることが大切である。

#### 【検索式・参考にした二次資料】

PubMed にて、breast, human epidermal growth factor receptor type2, HER2, external, quality, control, assurance のキーワードを用いて検索した。ハンドサーチで検索された重要文献も追加した。

#### 【参考文献】

1. Wolff AC, Hammond ME, Hicks DG, 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;31:3997-4013.
2. Terrenato I, Arena V, Pizzamiglio S, et al. External Quality Assessment (EQA) program for the preanalytical and analytical immunohistochemical determination of HER2 in breast cancer: an experience on a regional scale. *J Exp Clin Cancer Res.* 2013 Aug 21;32:58.
3. Dowsett M, Hanby AM, Laing R, et al. HER2 testing in the UK: consensus from a national consultation. *J Clin Pathol.* 2007;60:685-9.
4. Bartlett JM, Ibrahim M, Jasani B, et al. External quality assurance of HER2 fluorescence in situ hybridisation testing: results of a UK NEQAS pilot scheme. *J Clin Pathol.* 2007;60:816-9.
5. Bartlett JM, Ibrahim M, Jasani B, et al. External quality assurance of HER2 FISH and ISH testing: three years of the UK national external quality assurance scheme. *Am J Clin Pathol.* 2009;131:106-11.