

学位論文（博士）

Effects of Extended Fixation on Advanced  
Gastric Cancer HER2 Status Assessment  
Using IHC and FISH

（進行胃癌組織におけるホルマリン過固定が IHC と  
FISH を用いた HER2 判定に及ぼす影響について）

氏名 近藤 潤也

所属 山口大学大学院医学系研究科

医学専攻 消化器・腫瘍外科学講座

令和6年1月

## 目次

1. 要旨	3
2. 背景	3
3. 方法	4
4. 結果	5
5. 考察	6
6. 謝辞	8
7. 参考文献	8
8. 図表	12

## 1. 要旨

背景／目的：進行胃癌において、ヒト上皮細胞増殖因子受容体 2 (HER2) の発現状態を正確に判定することは、化学療法を含む治療方針の決定に極めて重要である。しかしながら、HER2 判定で推奨されるホルマリン固定時間は乳癌組織でのデータをもとに作成されており、胃癌検体における HER2 判定の最適なホルマリン固定時間はいまだ確立されていない。本研究では、胃癌患者での HER2 判定の実臨床の現状と、胃癌組織におけるホルマリン固定時間と HER2 判定への影響を調査した。

対象／方法：関連多施設で胃癌と診断された 1945 例の中で HER2 検査を施行され、切除不能もしくは再発で化学療法を行った 228 例の胃癌検体の HER2 判定状況を多角的に解析した。その後、進行胃癌の切除標本 52 例を 3 群に分け、免疫組織化学 (IHC) と蛍光 in situ ハイブリダイゼーション (FISH) を用いて、短期 (6~72 時間) と長期 (1 週間と 2 週間) の固定が HER2 状態判定に及ぼす影響を検討した。

結果：解析対象とした切除不能・再発胃癌症例の 21.5% (49/228) は HER2 陽性であったが、78.5% (179/228) は陰性であった。HER2 陰性検体のうち、生検組織で過剰固定されたものはなかったが、外科的切除標本の 12.5% (9/72) は過固定となっていた。切除標本を用いた研究結果では、6-72 時間群の HER2 判定と比較して、IHC による判定では 1 週間群と 2 週間群でそれぞれ 82.7%と 76.9%、FISH による判定では 73.1%と 36.5%の一致率であった。FISH による HER2 判定は、1 週間群と 2 週間群でそれぞれ 26.9%と 63.5%の検体で判定不能となっていた。

結論：胃癌の HER2 検査において、組織のホルマリン過固定は正確な判定の妨げとなる可能性がある。

## 2. 背景

胃がんは、2020 年には 100 万人を超える新規患者と 769,000 人と推定される死亡者を擁し、依然として世界的に罹患率で 5 位、死亡率で 4 位にランクされている(1)。ヒト上皮成長因子受容体 2 (HER2) は、特定のヒト固形癌の増殖に関与する重要な遺伝子としてよく知られている。胃癌では、HER2 陽性率は 15%から 25%と様々であり(2-4)、HER2 陽性は腫瘍の進行、予後と関連している(2-5)。フルオロピリミジンとプラチナ製剤を併用する化学療法は、現在、世界中で進行胃癌に対して最も広く受け入れられているレジメンである。トラスツズマブとフルオロピリミジン/プラチナ製剤との併用療法がさらに有効であることは、HER2 陽性進行胃癌患者を対象とした大規模無作為化試験である Trastuzumab for Gastric Cancer (ToGA) 試験で検討された(6)。その結果、トラスツズマブと化学療法の併用が HER2 陽性胃癌に対する新しい標準治療となった(7,8)。さらに、標準治療と比較して、トラスツズマブとデルクステカンによる治療は、HER2 陽性胃癌患者の奏効率と全生存率を改善する(9)。

HER2 の状態に関する主な検査法には、タンパク質発現を評価する免疫組織化学 (IHC) 法

と遺伝子増幅を評価する蛍光 in situ ハイブリダイゼーション (FISH) 法がある。HER2 の状態を正確かつ確実に評価することは、患者が HER2 陽性の乳がんまたは胃がんであるかどうかを判定するために極めて重要である。しかし、HER2 検査のための固定手順を含むサンプル調製条件は、施設間でかなり異なることがあり、HER2 検査の結果に影響を与える (10, 11)。2018 年に更新された米国臨床腫瘍学会/米国病理学会 (ASCO/CAP) のガイドラインでは、HER2 検査検体を 10%中性緩衝ホルマリン (NBF) で 6~72 時間固定することが推奨されている (12, 13)。HER2 検査結果と検体の固定時間との関係は、乳がんに関するいくつかの研究によって報告されている (14-16)。これらの知見は胃癌にも適用できるかもしれないが、HER2 過剰発現の特徴 (陽性度や不均一性など) が乳癌と胃癌で異なるため、胃癌に特異的なデータが必要である (17-20)。さらに、切除胃癌のホルマリン固定組織に実施される HER2 検査に関する十分な根拠がないため、胃癌の HER2 検査に対する固定時間の影響に関する直接的なデータを得ることは重要である。

本研究では、まず、山口県内の複数の施設から収集した検体を用いて、胃癌の HER2 検査においてホルマリン過固定が実臨床の現場で実際に生じているのかどうかを検討した。ついで、外科的に切除された胃癌組織の IHC および FISH を用いた HER2 検査の結果に対するホルマリン過固定の影響を検討した。

### 3. 方法

【症例と組織検体】 山口大学医学部附属病院、下関医療センター、関門医療センターにおいて、後ろ向き多施設共同観察研究を実施した。2011 年から 2020 年までの 10 年間に胃がんと診断された患者は合計 1,945 人であった。このうち、HER2 検査を受けた患者 354 人が登録された。このうち、化学療法を受けた切除不能または再発の患者 228 人が全解析集団に含まれた (図 1)。患者背景、腫瘍の特徴、HER2 検査のための検体固定期間、トラスツズマブ併用・非併用治療中の HER2 検査、生存率を調査した。

がん組織標本は、2015 年から 2019 年の間に山口大学大学院医学系研究科消化器・乳腺・内分泌外科および下関医療センター外科で進行胃がんの根治切除を受けた患者 52 人の連続切片から入手した。各患者の外科的に切除された腫瘍標本は、直ちに 10%NBF (武藤純薬、福岡、日本) に入れられ、ホルマリン固定時間別に 3 群に分類した: 1 つは 6~72 時間、2 つ目は 1 週間、3 つ目は 2 週間固定された (図 2)。本研究は、山口大学医学部附属病院倫理委員会 (H29-046 および H29-047) および下関医療センター倫理委員会の承認を得た。すべての検体は、患者の書面によるインフォームド・コンセントのもとに入手した。

【HER2 検査のための IHC および FISH】 HER2 検査のための IHC および FISH は、それぞれ iView 検出キット (Ventana, Tucson, AZ, USA) および Path Vysion HER2 DNA プローブキット (Abbott Molecular Inc. IHC 染色 (スコア: 0, 1+, 2+, 3+) および FISH の評価は、ASCO/CAP ガイドライン (12, 13) に基づいて行われた。

FISH 分析では、腫瘍細胞の少なくとも 20 個の非重複核について、HER2 シグナルと染色体列挙プローブ (CEP) 17 シグナルを評価した。この比が 1.8 から 2.2 の間にある場合、さらに 20 個の核を数え、40 個の核について HER2/CEP17 比を推定した。HER2/CEP17 比が 2.0 以上を陽性、2.0 未満を陰性とした。

盲検化された 2 人の病理医が IHC と FISH のスコアを評価した。最後に、IHC と FISH における HER2 ステータスの 3 群間の相関を分析した。

【統計解析】HER2 発現と臨床病理学的因子との関係は、カテゴリ変数についてはカイ二乗検定、連続変数についてはマン・ホイットニーの U 検定を用いて解析した。各治療群の全生存期間および生存期間中央値は Kaplan-Meier 法を用いて推定した。p<0.05 の結果を統計的に有意とみなした。IHC の結果については、スピアマンの相関係数を算出した。6-72 時間群と 1 週間群の染色スコアの一致率、および 6-72 時間群と 2 週間群の染色スコアの一致率は、Clopper-Pearson exact 法を用いて 95%信頼区間 (CI) とともに推定した。FISH の結果については  $\chi^2$  検定を用いた。統計解析はすべて R 言語 (R Core Team, Vienna, Austria) を用いて行った。

#### 4. 結果

【実臨床調査から得られた HER2 発現と過剰固定の状態】化学療法を受けた切除不能または再発胃がんの HER2 検査患者 228 人を全解析集団とした。228 例の患者背景、腫瘍特性、HER2 検査のための検体固定期間、HER2 検査結果、およびトラスツズマブ治療の有無を表 1 にまとめた。腫瘍の局在、種類、腫瘍の大きさ、臨床病期と HER2 状態との間に相関は認められなかった。HER2 陽性はびまん型腺癌患者よりも腸管型腺癌患者でより多く認められた (p < 0.02)。生検標本 141 例中にホルマリン過固定の症例は観察されなかったが、外科的切除標本 87 例中 9 例に過固定が認められ、HER2 陰性症例の 12.5% (9/72 例) を占めた。トラスツズマブは HER2 陽性患者の 83.7% に投与されたが、HER2 陰性患者には投与されなかった。全体として、臨床現場では患者検体の 3.9% (9/228) がホルマリン過固定であった。HER2 陽性患者と陰性患者の生存率に差は認められなかった (図 3)。

【切除標本の臨床病理学的特徴】胃癌患者 52 人 (男性 36 人、女性 16 人) の臨床病理学的特徴を表 2 にまとめた。全患者の年齢中央値は 77 歳 (範囲、48-92 歳) であった。このうち 47 例は臨床的に Type2 または Type3 と診断された。病理学的検査に基づく、TNM (腫瘍リンパ節転移) 分類によると、6 例が T1、7 例が T2、13 例が T3、26 例が T4 と診断された。Lauren の分類(21)に基づき合計 24 検体は腸管型に分類され、28 検体はびまん型に分類された。平均腫瘍径は 58.8mm であった。

【ホルマリン固定期間が IHC による HER2 判定に及ぼす影響】ホルマリン固定期間が HER2

の IHC 染色に及ぼす影響を検討した。IHC 染色後、6-72 時間群では 52 検体中 16 検体 (30.8%) がスコア 0、17 検体 (32.7%) がスコア 1+、15 検体 (28.8%) がスコア 2+、4 検体 (7.7%) がスコア 3+であった。一方、1 週間群では、18 検体 (34.6%) がスコア 0、18 検体 (34.6%) がスコア 1+、12 検体 (23.1%) がスコア 2+、4 検体 (7.7%) がスコア 3+であった。最後に、2 週間群では 15 例 (28.8%) がスコア 0、23 例 (44.2%) がスコア 1+、10 例 (19.2%) がスコア 2+、4 例 (7.7%) がスコア 3+であった (表 3)。さらに、52 検体中 43 検体 (82.7%、95%信頼区間=69.7%-91.8%) および 40 検体 (76.9%、95%信頼区間=63.2%-87.5%) が、それぞれ 6-72 時間群と 1 週間群、6-72 時間群と 2 週間群で同一の染色スコアを示した (図 4a-d)。このように、IHC の結果では、6-72 時間群と 1 週間群の間、および 6-72 時間群と 2 週間群の間には染色スコアに正の相関が存在した ( $p < 0.01$ ,  $p < 0.01$ ) (表 4)。しかしながら、5 検体 (9.6%) において、HER2 発現の染色スコアは長期固定後に減少した (図 4e)。したがって、6-72 時間固定では IHC スコア 2+で FISH 法による再評価をされるべき症例が、ホルマリン過固定により誤った判定をされる可能性が示唆された。

【ホルマリン固定期間が FISH による HER2 判定に及ぼす影響】 つづいて、ホルマリン過固定が FISH による判定結果に影響を及ぼすかどうかも検討した。6-72 時間群の全検体で HER2/CEP17 コピー数比の測定に成功し、52 検体中 7 検体 (13.5%) が遺伝子増幅 (コピー数比 $\geq 2.0$ ) を示した。しかし、HER2/CEP17 のコピー数比を検出できなかったのは、1 週間群 14 検体 (26.9%)、2 週間群 33 検体 (63.5%) であった。さらに、判定不能であった (ND) 頻度は、6-72 時間群よりも 1-2 週間群で有意に高かった (それぞれ  $p < 0.0001$  および  $p < 0.0001$ ; 表 5)。52 検体中 38 検体 (73.1%) と 19 検体 (36.5%) が、6-72 時間群と 1 週間群、6-72 時間群と 2 週間群で、それぞれ同程度の HER2/CEP17 コピー数比を示した (表 6)。

固定時間が長くなるにつれて、シグナルが弱くなったり (図 5a)、背景ノイズが増えたり (図 5b) して、評価が困難になる検体の数が増えることを観察した。最終的には、FISH 検査の対象となった IHC スコア 2+の 15 検体中 5 検体 (33.3%) が、ホルマリン過固定のために誤った判定結果となった。これは実臨床において重要な所見である。

## 5. 考察

本研究は胃癌患者の HER2 判定に使用される臨床検体のホルマリン過固定の頻度に関する初めての研究であり、外科的に切除された胃癌検体のホルマリン固定期間が HER2 検査の IHC 法および FISH 法に及ぼす影響を検討した。本研究では、HER2 判定に使用される検体は、実臨床において時に過固定されていることが確認された。HER2 が臨床的に評価された胃癌検体全体の 3.9%、HER2 陰性検体 72 例中 9 例 (12.5%) でホルマリン過固定が検出された (外科的切除検体に限る)。検体の取り扱いが厳密に管理されるべきであるが、実

臨床の現場では、推奨されるよりも長く固定された検体を用いて HER2 を判定することがある。さらに本研究では、52 例の進行胃癌切除標本の IHC 染色結果では、全症例の 82.7%と 76.9%が、それぞれ 6-72 時間群と 1 週間群、6-72 時間群と 2 週間群で同一の染色スコアを示した。しかし、FISH では、6-72 時間群と 1 週間群、6-72 時間群と 2 週間群でそれぞれ 73.1%、36.5%しか同一の遺伝子増幅を示さなかった。

我々の知る限り、ヒト胃癌組織の固定期間が IHC および FISH の結果に及ぼす影響を報告した研究は他にない。本研究ではさらに、切除胃癌のパラフィン包埋標本を用いて、固定期間が HER2 検査における IHC 法と FISH 法の結果に及ぼす影響を検討した。

不均一性とは、遺伝子型や遺伝子発現の腫瘍内変異を指す。胃癌では、IHC 染色や FISH で部分的に陽性が検出された場合にこの用語が用いられる。理想的には、組織型や悪性度に関係なく、HER2 陽性腫瘍組織の同じブロックを IHC 染色と FISH 解析に用いて、HER2 強度が最大となる領域を決定すべきである。潰瘍部位に隣接する腸管形質転換部位や高悪性度異形成部位では偽陽性反応が観察されることがあり、このような病変は避けるべきである。破碎アーチファクトや壊死組織も避けるべきである(6)。そこで本研究では、各患者の切除腫瘍標本を 3 等分し、ホルマリンで異なる期間固定し、固定期間が IHC と FISH の HER2 判定に及ぼす影響を分析した。IHC 法においては、HER2 発現は、より長い固定期間(1 週間および 2 週間)であっても、3 群間でほぼ同一の判定結果であった。IHC 法による判定では、ホルマリンで 6-72 時間固定後に HER2 過剰発現(スコア 3+)を示す標本は、1 週間または 2 週間の過固定後でも HER2 高発現状態(スコア 3+)を保持していた。National Comprehensive Cancer Network のガイドライン(22)では、“IHC で HER2 の発現が 2+の検体は、FISH で追加評価すべきである”と推奨している。したがって、HER2 発現の正確な診断のためには、適切な検体を用いた IHC と FISH の結果を正確に評価することが必要である。HER2 スコアが 2+であった 6-72 時間群の 15 例のうち、5 例は 1 週間または 2 週間の固定後に HER2 スコアが 1+であった。これらの患者は、FISH の結果次第では HER2 標的治療の対象とされたかもしれない。IHC で HER2 陰性と判定された症例の中には、本来 HER2 陽性であった可能性のある偽陰性症例が含まれている可能性が示唆された。

さらに本研究では、ホルマリン固定時間が FISH 結果に有意に影響することを示唆した。1 週間固定した検体の 26.9%、2 週間固定した検体の 63.5%では、HER 発現の判定は不可能であった。判定不能となった理由として、FISH は、特定の DNA 配列を標的ゲノムにハイブリダイズさせる強力な分子細胞遺伝学的方法である。ホルマリン固定は、細胞構造の複雑さとクロマチン凝縮を増加させ、DNA の断片化と化学修飾による架橋を引き起こす。これらの化学修飾が、増幅の弱さと細胞構造の破壊の主な原因であると考えられる(23, 24)。

われわれの研究にはいくつかの限界がある。サンプル数が限られていることに加え、集積した切除胃癌組織は 2 つの施設からしか登録されていない。したがって、胃癌における HER2 ステータスの判定に最適な検体固定期間を検討するためには、より多くのサンプルによるさらなる研究が望まれる。さらに、検体は腫瘍の同じ部分から得られたが、腫瘍の不

均一性は完全には排除できず、HER2 判定に影響を与えた可能性がある。

われわれの研究は、ホルマリン固定の期間が胃癌における HER2 判定の IHC 法と FISH 法の結果に影響することを示し、乳癌組織における報告と同様であった。したがって、乳癌の ASCO/CAP ガイドラインに示されているように、胃癌においても判定に用いる検体のホルマリン固定時間は 6~72 時間以内とすることを推奨する。患者の治療選択肢を減らす可能性のある偽陰性のリスクを最小化するためには、胃癌切除標本を取り扱う際に、胃癌に関する CAP/ASCP/ASCO のガイドライン勧告を厳密に遵守することが不可欠である。

## 6. 謝辞

本研究にあたり、ご指導頂いた永野浩昭教授に深甚なる謝意を表します。また、直接ご指導を賜りました吉野茂文先生、飯田通久先生、星井嘉信先生に心より拝謝申し上げます。また技術的支援をしていただいた池本健三さんに深謝いたします。

## 7. 参考文献

1. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, Bray F: Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin* 71(3): 209-249, 2021. DOI: 10.3322/caac.21660
2. Park DI, Yun JW, Park JH, Oh SJ, Kim HJ, Cho YK, Sohn CI, Jeon WK, Kim BI, Yoo CH, Son BH, Cho EY, Chae SW, Kim EJ, Sohn JH, Ryu SH, Sepulveda AR: HER-2/neu amplification is an independent prognostic factor in gastric cancer. *Dig Dis Sci* 51(8): 1371-1379, 2006. DOI: 10.1007/s10620-005-9057-1
3. Yano T, Doi T, Ohtsu A, Boku N, Hashizume K, Nakanishi M, Ochiai A: Comparison of HER2 gene amplification assessed by fluorescence in situ hybridization and HER2 protein expression assessed by immunohistochemistry in gastric cancer. *Oncol Rep* 15(1): 65-71, 2006.
4. Zhang XL, Yang YS, Xu DP, Qu JH, Guo MZ, Gong Y, Huang J: Comparative study on overexpression of HER2/neu and HER3 in gastric cancer. *World J Surg* 33(10): 2112-2118, 2009. DOI: 10.1007/s00268-009-0142-z
5. Tanner M, Hollmén M, Junttila TT, Kapanen AI, Tommola S, Soini Y, Helin H, Salo J, Joensuu H, Sihvo E, Elenius K, Isola J: Amplification of HER-2 in gastric carcinoma: association with topoisomerase IIalpha gene amplification, intestinal type, poor prognosis and sensitivity to trastuzumab. *Ann Oncol* 16(2): 273-228, 2005. DOI: 10.1093/annonc/mdi064



6. Bang YJ, Van Cutsem E, Feyereislova A, Chung HC, Shen L, Sawaki A, Lordick F, Ohtsu A, Omuro Y, Satoh T, Aprile G, Kulikov E, Hill J, Lehle M, Rüschoff J, Kang YK: 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* 376(9742): 687–697, 2010. DOI: 10.1016/S0140-6736(10)61121-X
7. Komatsu S, Otsuji E: Essential updates 2017/2018: recent topics in the treatment and research of gastric cancer in Japan. *Ann Gastroenterol Surg* 3(5): 581–591, 2019. DOI: 10.21037/jgo-22-527
8. Sasako M: Progress in the treatment of gastric cancer in Japan over the last 50 years. *Ann Gastroenterol Surg* 4(1): 21–29, 2020. DOI: 10.1002/ags3.12306
9. Shitara K, Bang YJ, Iwasa S, Sugimoto N, Ryu MH, Sakai D, Chung HC, Kawakami H, Yabusaki H, Lee J, Saito K, Kawaguchi Y, Kamio T, Kojima A, Sugihara M, Yamaguchi K; DESTINY-Gastric01 Investigators: Trastuzumab deruxtecan in previously treated HER2-positive gastric cancer. *N Engl J Med* 382(5): 2419–2430, 2020. DOI: 10.1056/NEJMoa2004413
10. Sauter G, Lee J, Bartlett JM, Slamon DJ, Press MF: Guidelines for human epidermal growth factor receptor 2 testing: biologic and methodologic considerations. *J Clin Oncol* 27(8): 1323–1333, 2009. DOI: 10.1200/JCO.2007.14.8197
11. Rüschoff J, Hanna W, Bilous M, Hofmann M, Osamura RY, Penault-Llorca F, van de Vijver M, Viale G: HER2 testing in gastric cancer: a practical approach. *Mod Pathol* 25(5): 637–650, 2012. DOI: 10.1038/modpathol.2011.198
12. Wolff AC, Hammond MEH, Allison KH, Harvey BE, Mangu PB, Bartlett JMS, Bilous M, Ellis IO, Fitzgibbons P, Hanna W, Jenkins RB, Press MF, Spears PA, Vance GH, Viale G, McShane LM, Dowsett M: Human epidermal growth factor Receptor 2 testing in breast cancer: American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists clinical practice guideline focused update. *J Clin Oncol* 36(20): 2105–2122, 2018. DOI: 10.1200/JCO.2018.77.8738
13. Bartley AN, Washington MK, Colasacco C, Ventura CB, Ismaila N, Benson AB, 3rd, Carrato A, Gulley ML, Jain D, Kakar S, Mackay HJ, Streutker C, Tang L, Troxell M, Ajani JA: HER2 testing and clinical decision making in gastroesophageal adenocarcinoma: guideline from the College of American Pathologists, American Society for Clinical Pathology, and the American Society of Clinical Oncology. *J Clin Oncol* 35(4): 446–464, 2017. DOI: 10.1200/JCO.2016.69.4836

14. Moatamed NA, Nanjangud G, Pucci R, Lowe A, Shintaku IP, Shapourifar-Tehrani S, Rao N, Lu DY, Apple SK: 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* 136(5): 754-761, 2011. DOI: 10.1309/AJCP99WZGBPKCXOQ
15. Ibarra JA, Rogers LW: Fixation time does not affect expression of HER2/neu: a pilot study. *Am J Clin Pathol* 134(4): 594-596, 2010. DOI: 0.1309/AJCPAIJPSN4A9MJI
16. Tong LC, Nelson N, Tsourigiannis J, Mulligan AM: 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* 35(4): 545-552, 2011. DOI: 10.1097/PAS.0b013e31820e6237
17. Grillo F, Fassan M, Sarocchi F, Fiocca R, Mastracci L: HER2 heterogeneity in gastric/gastroesophageal cancers: from benchside to practice. *World J Gastroenterol* 22(26): 5879-5887, 2016. DOI: 10.3748/wjg.v22.i26.5879
18. Fusco N, Bosari S: HER2 aberrations and heterogeneity in cancers of the digestive system: implications for pathologists and gastroenterologists. *World J Gastroenterol* 22(35): 7926-7937, 2016. DOI: 10.3748/wjg.v22.i35.7926
19. Wada R, Hirabayashi K, Ohike N, Morii E: New guidelines for HER2 pathological diagnostics in gastric cancer. *Pathol Int* 66(2): 57-62, 2016. DOI: 10.1111/pin.12390
20. Nishida Y, Kuwata T, Nitta H, Dennis E, Aizawa M, Kinoshita T, Ohtsu A, Ochiai A: A novel gene-protein assay for evaluating HER2 status in gastric cancer: simultaneous analyses of HER2 protein overexpression and gene amplification reveal intratumoral heterogeneity. *Gastric Cancer* 18(3): 458-466, 2015. DOI: 10.1007/s10120-014-0394-7
21. Chen YC, Fang WL, Wang RF, Liu CA, Yang MH, Lo SS, Wu CW, Li AF, Shyr YM, Huang KH: Clinicopathological variation of Lauren classification in gastric cancer. *Pathol Oncol Res* 22(1): 197-202, 2016. DOI: 10.1007/s12253-015-9996-6
22. Ajani JA, D'Amico TA, Almhanna K, Bentrem DJ, Chao J, Das P, Denlinger CS, Fanta P, Farjah F, Fuchs CS, Gerdes H, Gibson M, Glasgow RE, Hayman JA, Hochwald S, Hofstetter WL, Ilson DH, Jaroszewski D, Johung KL, Keswani RN, Kleinberg LR, Korn WM, Leong S, Linn C, Lockhart AC, Ly QP, Mulcahy MF, Orringer MB, Perry KA, Poultsides GA, Scott WJ, Strong VE, Washington MK, Weksler B, Willett CG, Wright CD, Zelman D, McMillian N, Sundar H: *Gastric Cancer*, version 3. 2016, NCCN

Clinical Practice Guidelines in Oncology. *J Natl Compr Canc Netw* 14(10): 1286-1312, 2016. DOI: 10.6004/jnccn.2016.0137

23. Thompson CT, LeBoit PE, Nederlof PM, Gray JW: Thick-section fluorescence in situ hybridization on formalin-fixed, paraffin-embedded archival tissue provides a histogenetic profile. *Am J Pathol* 144 (2): 237-243, 1994.

24. Do H, Dobrovic A: Sequence artifacts in DNA from formalin-fixed tissues: causes and strategies for minimization. *Clin Chem* 61(1): 64-71, 2015. DOI: 10.1373/clinchem.2014.223040

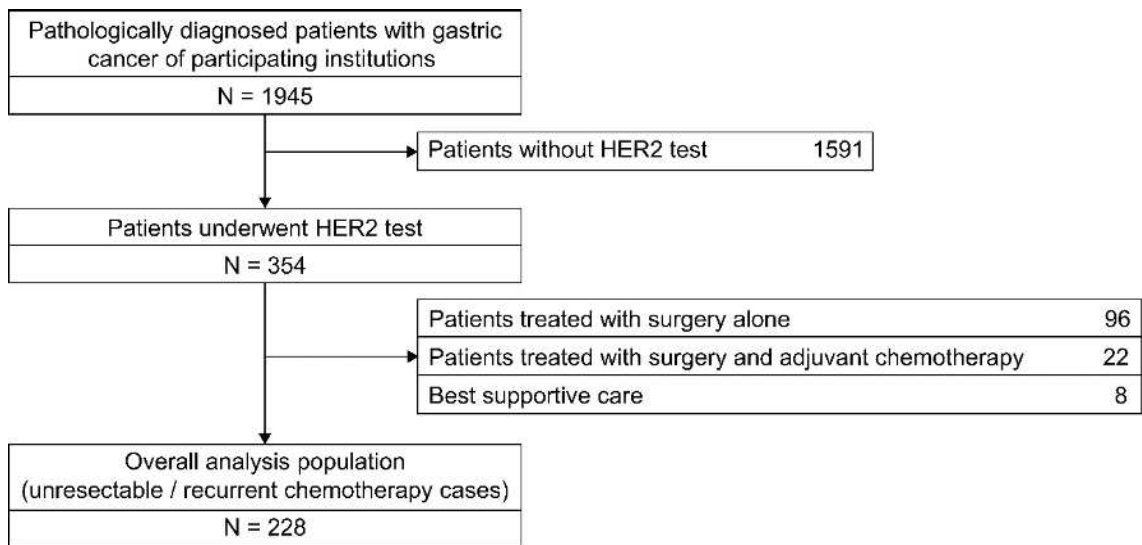


図 1. 症例選択。 HER2 : ヒト上皮成長因子受容体 2 型。

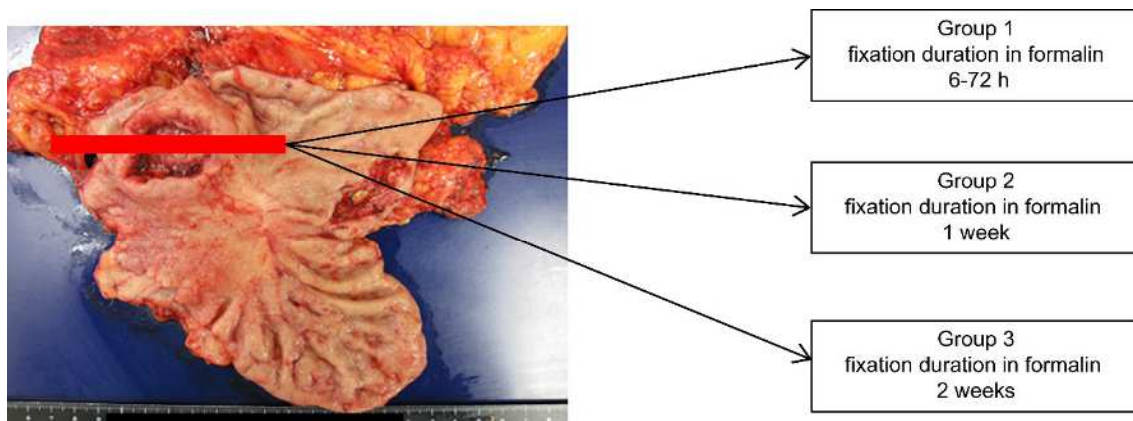


図 2. 全患者の同一部位から切除した胃癌標本切片を 3 つに分け、それぞれホルマリン溶液で 6-72 時間 (第 1 群)、1 週間 (第 2 群)、2 週間 (第 3 群) 固定した。

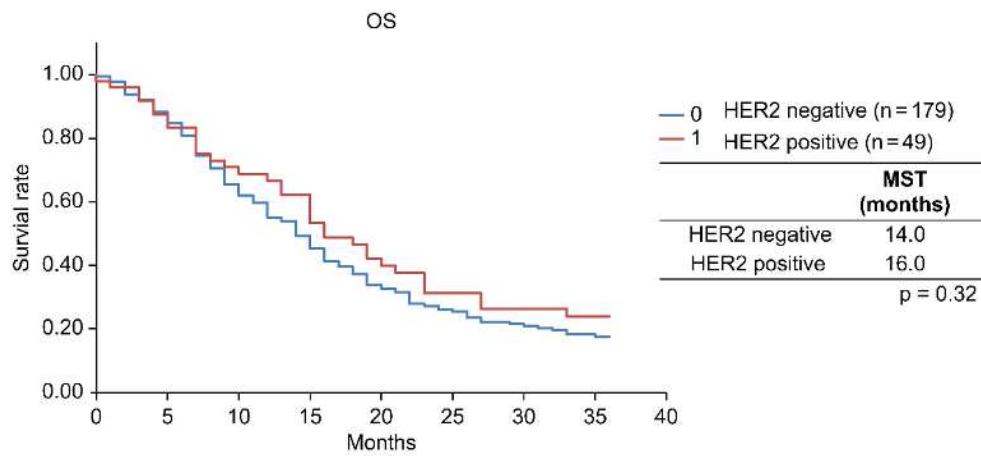


図 3. ヒト上皮成長因子受容体 2 型 (HER2) 検査を受けた胃癌患者 (切除不能/再発化学療法) における全生存期間のカプラン・マイヤー解析 (n=228)。HER2 陽性患者と陰性患者の生存率に差はなかった。

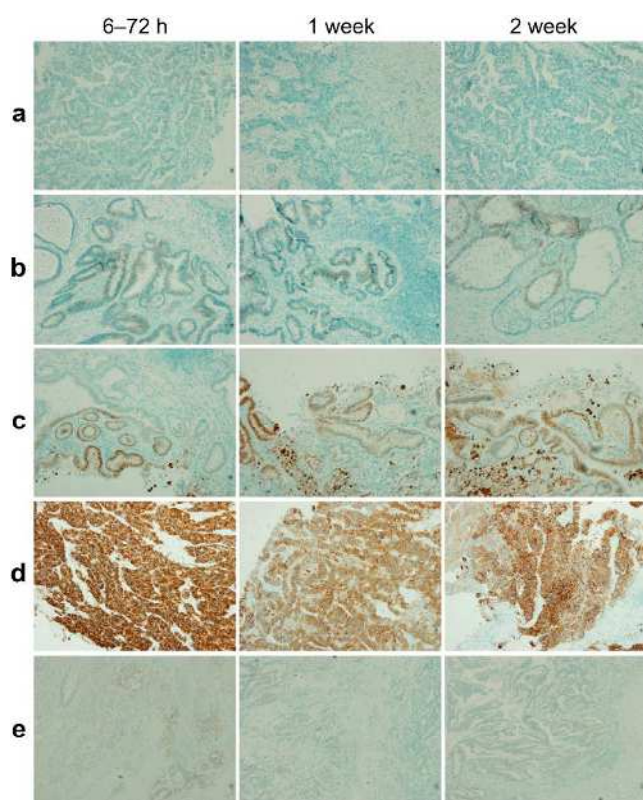


図4. 免疫組織化学（IHC）に対する固定時間の影響。6-72時間、1週間、2週間固定した標本におけるヒト上皮成長因子受容体2型（HER2）検出の代表的なIHC染色；同じスコア（A-D）、または固定期間が長くなるとスコアが低下する（E）。（A）各固定時間におけるHER2 IHCスコアは0。（B）各固定期間のHER2 IHCスコア1+。（C）各固定期間のHER2 IHCスコアが2+。（D）各固定期間のHER2 IHCスコアが3+。（E）HER2 IHCスコアは6-72時間固定で2+、1-および2週間固定で1+。

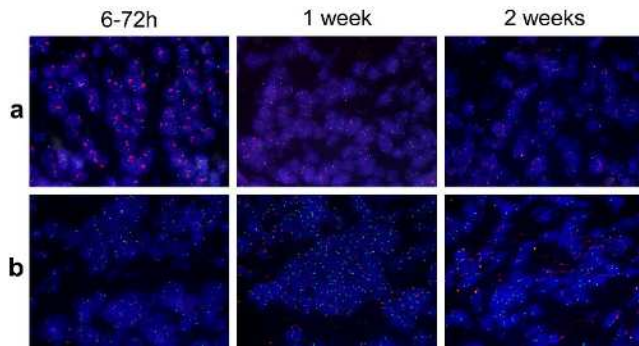


図5. 蛍光 in situ ハイブリダイゼーションの結果に対する固定期間の影響。

(A) 6-72時間固定（比率5以上）および1週間固定（比率2.62）の検体では、高度に増幅されたシグナル（赤斑）が観察された。しかし、2週間固定すると増幅が弱まり、シグナルは検出されなかった。(B) 6-72時間（比1.05）または1週間（比0.95）固定した検体では、低増幅シグナル（赤斑）が観察された。細胞構造が破壊されたため、2週間固定するとシグナルは検出されなくなった。



Table 1. Characteristics of HER2-tested patients with unresectable/recurrent gastric cancer receiving chemotherapy (n=228).

Variable	HER2 positive, N=49 (%)	HER2 negative, N=179 (%)
Age (mean±SD)	71±10	68±10
Sex - Male:Female	37 (75.5):12 (24.5)	124 (69.3):98 (30.7)
Location - U:M:L	14 (30.4):16 (34.8):6 (34.8)	52 (29.2):65 (36.5):61 (34.3)
Type - 0:1:2:3:4:5	0 (0):1 (2.0):10 (20.8):28 (58.3):9 (18.8):0 (0)	3 (1.7):6 (3.4):2 (12.4):98 (55.4):43 (24.3):5 (2.8)
Tumor size (mm, mean±SD)	70.0±29.0	70.0±31.5
Tumor subtype		
Intestinal:Diffuse	27 (61.4):17 (38.6)	71 (41.0):102 (59.0)
T-Stage		
T1:T2:T3:T4	3 (6.3):3 (6.3):11 (22.9):31 (64.6)	3 (1.7):8 (4.5):28 (15.7):139 (78.1)
N-Stage		
N0:N1:N2:N3	4 (8.3):9 (18.8):15 (31.2):20 (41.7)	27 (15.3):18 (10.1):56 (31.6):76 (42.9)
Specimen		
Surgical:Biopsy	15 (30.6):34 (69.4)	72 (40.2):107 (59.8)
Fixation duration of surgical specimen in formalin 6-72 h:over 72 h	15 (100.0):0 (0.0)	63 (87.5):9 (12.5)
HER-2 test		
IHC3+:IHC2+ & FISH(+):IHC2+ &FISH(-):IHC1+:IHC0	31 (63.3):18 (36.7):0 (0.0):0 (0.0):0 (0.0)	0 (0.0):0(0.0):27 (15.1):44 (24.6):108 (60.3)
Trastuzumab +/-	41 (83.7):8 (16.3)	0 (0.0):179 (100.0)

HER2: Human epidermal growth factor receptor type 2; IHC: immunohistochemistry; FISH: fluorescence *in situ* hybridization.

表 1. 化学療法を受けている切除不能/再発胃癌の HER2 検査患者の特徴 (n = 228)。

**Table II. Clinicopathological characteristics of all resected specimens (n=52).**

Variable	Number of patients (%)
Age (mean±SD)	75±10
Sex	
Male:Female	36 (69.2):16 (30.8)
Procedure	
OTG:ODG:OPG:LTG:LDG	19 (36.5):17 (32.7): 2 (3.8):1 (1.9):13 (25.0)
Specimen location	
U:M:L	13 (25.0):15 (28.8):24 (46.2)
Type	
1:2:3:4	3 (5.8):18 (34.6): 29 (55.8):2 (3.8)
Neoadjuvant chemotherapy	
Yes:No	4 (7.7):48 (92.3)
pT-Stage	
T1:T2:T3:T4	6 (11.5):7 (13.5): 13 (25.0):26 (50.0)
pN-Stage	
N0:N1 N2:N3	17 (32.7):17 (32.7): 7 (13.5):11 (21.2)
Metastatic sites	
Yes:No	6 (11.5):46 (88.5)
Tumor subtype	
Intestinal:Diffuse	24 (46.2):28 (53.8)
Tumor size (mm, mean±SD)	60.3±30.3

OTG: Open total gastrectomy; ODG: open distal gastrectomy; OPG: open proximal gastrectomy; LTG: laparoscopic total gastrectomy; LDG: laparoscopic distal gastrectomy.

表 2. 全切除標本 (n = 52) の臨床病理学的特徴。

Table III. Complete immunohistochemistry data according to fixation duration.

Case No.	Tumor subtype	HER2 IHC score			Case No.	Tumor subtype	HER2 IHC score		
		6-72 h	1 week	2 weeks			6-72 h	1 week	2 weeks
1	Intestinal	0	0	0	27	Diffuse	1+	1+	1+
2	Intestinal	0	0	0	28	Diffuse	1+	1+	1+
3	Intestinal	0	0	0	29	Intestinal	1+	1+	1+
4	Diffuse	0	0	0	30	Intestinal	1+	1+	1+
5	Intestinal	1+	0	0	31	Intestinal	3+	3+	3+
6	Diffuse	2+	2+	2+	32	Intestinal	2+	2+	1+
7	Diffuse	0	0	0	33	Diffuse	0	0	0
8	Diffuse	0	0	0	34	Diffuse	1+	1+	1+
9	Intestinal	1+	1+	1+	35	Diffuse	0	0	0
10	Intestinal	0	0	1+	36	Diffuse	1+	1+	1+
11	Intestinal	2+	1+	1+	37	Intestinal	1+	1+	1+
12	Intestinal	1+	0	0	38	Diffuse	1+	1+	1+
13	Diffuse	0	0	0	39	Diffuse	2+	2+	2+
14	Intestinal	1+	0	1+	40	Diffuse	1+	1+	1+
15	Diffuse	1+	1+	1+	41	Intestinal	2+	2+	1+
16	Diffuse	2+	2+	2+	42	Intestinal	2+	2+	2+
17	Diffuse	2+	2+	2+	43	Diffuse	2+	1+	1+
18	Diffuse	2+	2+	2+	44	Diffuse	2+	2+	2+
19	Diffuse	0	0	0	45	Diffuse	0	0	1+
20	Intestinal	3+	3+	3+	46	Diffuse	1+	1+	1+
21	Diffuse	0	1+	1+	47	Diffuse	2+	2+	2+
22	Intestinal	3+	3+	3+	48	Intestinal	2+	2+	2+
23	Diffuse	0	0	0	49	Intestinal	2+	2+	2+
24	Diffuse	0	0	0	50	Intestinal	3+	3+	3+
25	Intestinal	1+	0	0	51	Diffuse	1+	1+	1+
26	Intestinal	0	1+	1+	52	Intestinal	2+	1+	1+

HER2: Human epidermal growth factor receptor type 2; IHC: immunohistochemistry.

表 3. IHC 法による HER2 判定のホルマリン固定時間別の全データ

Table IV. Assessment results match the rate of immunohistochemistry data.

	6-72 h=1 week (%)	6-72 h=2 weeks (%)
Score 0	14/16 (87.5)	12/16 (75.0)
Score 1+	13/17 (76.4)	14/17 (82.4)
Score 2+	12/15 (80.0)	10/15 (66.6)
Score 3+	4/4 (100.0)	4/4 (100.0)
All	43/52 (82.7)	40/52 (76.9)

表 4. ホルマリン固定時間別の IHC による HER2 判定の一致率

Table V. Complete fluorescence in situ hybridization data according to fixation duration.

Case No.	HER2/CEP17 ratio			Case No.	HER2/CEP17 ratio		
	6-72 h	1 week	2 weeks		6-72 h	1 week	2 weeks
1	1.1	ND	ND	27	1.4	1.3	ND
2	1.0	0.8	ND	28	1.0	1.0	ND
3	1.1	ND	ND	29	0.8	0.7	ND
4	1.2	ND	ND	30	0.9	0.9	1.1
5	0.9	0.7	ND	31	>100	>100	>100
6	>5	2.6	ND	32	1.1	1.0	0.9
7	1.0	ND	ND	33	1.1	1.1	ND
8	0.9	1.0	ND	34	1.1	1.1	ND
9	1.2	ND	ND	35	1.3	1.4	ND
10	1.1	ND	ND	36	1.0	1.1	1.2
11	1.1	1.0	ND	37	1.3	ND	ND
12	1.1	0.9	ND	38	1.5	1.4	1.4
13	1.1	1.0	ND	39	1.1	1.1	1.1
14	1.0	ND	ND	40	1.3	1.2	1.1
15	1.0	1.0	ND	41	1.0	1.2	1.2
16	1.0	1.0	ND	42	1.1	1.1	1.1
17	1.2	1.2	ND	43	1.0	1.1	0.9
18	1.7	1.6	1.3	44	1.1	0.9	1.0
19	0.9	1.0	ND	45	1.0	0.9	1.0
20	>100	>100	ND	46	1.1	1.0	1.0
21	0.9	ND	ND	47	1.1	0.8	1
22	6.7	8.4	ND	48	>10	>10	>10
23	1.0	0.9	1.0	49	>5	>5	>5
24	1.0	ND	ND	50	>20	ND	>20
25	1.0	0.9	ND	51	1.1	ND	ND
26	1.1	ND	ND	52	2.6	ND	ND

HER2: Human epidermal growth factor receptor type 2; CEP17: chromosome enumeration probe 17; ND: not detected.

表 5. FISH 法による HER2 判定のホルマリン固定時間別の全データ。

**Table VI. Assessment results match the rate of fluorescence in situ hybridization data.**

	<b>6-72 h= 1 week (%)</b>	<b>6-72 h= 2 weeks (%)</b>
<b>HER2 over-expression assessment</b>	<b>38/52 (73.1)</b>	<b>19/52 (36.5)</b>

**HER2: Human epidermal growth factor receptor type 2.**

表 6. ホルマリン固定時間別の FISH 法による HER2 判定の一致率。