

ALK IHC の標準化、精度管理に向けての調査研究： がん拠点病院への拡大調査

愛知県がんセンター中央病院
遺伝子病理診断部 部長
谷田部 恭

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で行われている。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肺癌の 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。しかしながら、このワーキンググループには経済的な裏付けがなく、昨年度の第 4 1 回がんその他の悪性新生物研究助成金において、都道府県がん拠点病院における精度管理プログラムを施行した。45 都道府県がん拠点病院のうち、院内検査として ALK IHC を施行している 26 施設について、その精度管理用の標本を配布しそれぞれの病院において染色、評価した。その結果の詳細は報告書にまとめたが、少なからずの病院が基準範囲外の ALK-IHC 結果を示し、それぞれの施設に対して改善案を提供することができた。今年度はこのプログラムを拡大し、285 のがん拠点病院を対象として精度管理を行った。

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
FISH 検査を行う	FISH 陽性となる可能性が極めて高い、もしくは FISH による確認が必要。
FISH 検査を行わない	FISH 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実際に施行・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

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 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	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 3/15/2017 現在においても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	63 施設（77%）
用手法	16 施設（20%）
記載なし	3 施設（3%）

染色方法

体外診断用医薬品（ALK iAEP キット）	30 施設（37%）
仕様通り ALK iAEP キットでヒストステイナー使用なし用手法	
はい	30 施設
いいえ	0 施設
それ以外	49 施設（60%）
記載なし	3 施設（3%）

一次抗体としての ALK のクローン

5A4	64 施設 (78%)
D5F3	13 施設 (16%)
ALK-1	2 施設 (2%)
記載なし	3 施設 (4%)

増感法

iAEP 法	30 施設 (37%)
それ以外	44 施設 (54%)
増感せず	1 施設 (1%)
記載なし	7 施設 (8%)

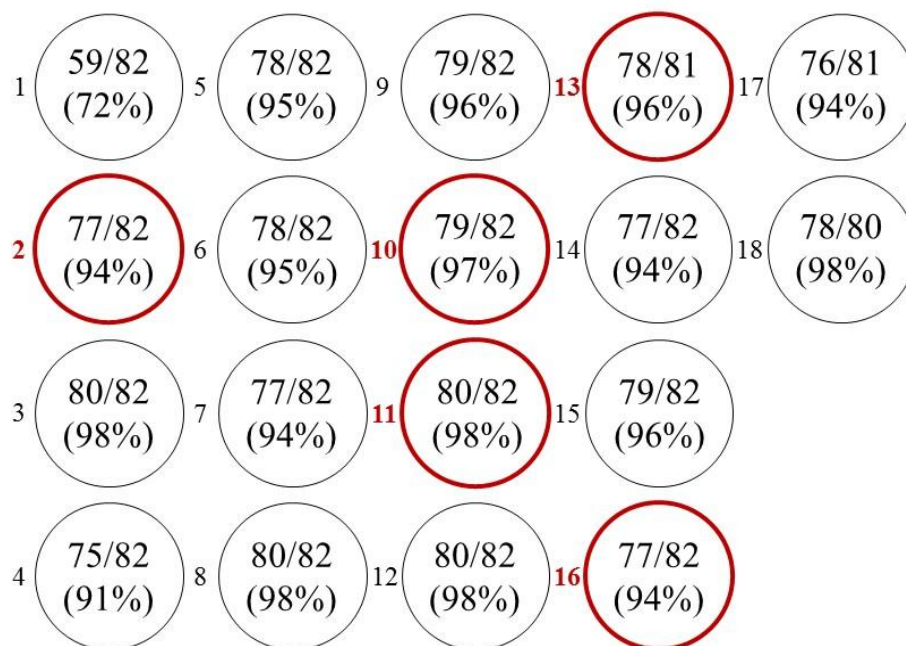
標本については、コア欠損、腫瘍消失もあって評価対象コアは基本 48 組織コアであった。

48 組織コアで回答	78 施設
47 組織コアで回答	3 施設
44 組織コアで回答	1 施設

その組織コアごとの結果を以下に示す。

ALK-1

○ はALK肺癌



ALK-2

○ はALK肺癌 × は評価対象外へ



ALK-3

○ はALK肺癌 × は評価対象外へ



最終評価

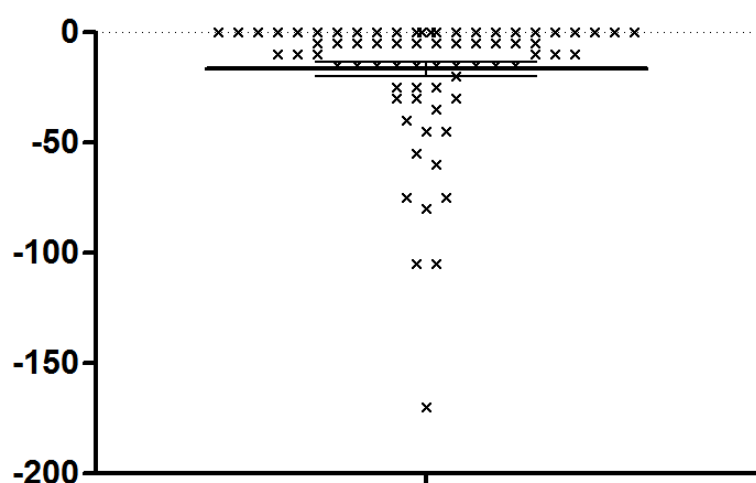
評価基準内であった施設（評価点数 -10 点以上）： 52 施設 （64%）

評価基準以下であった施設（評価点数 -15 点以下）： 29 施設 （36%）

若干の改善を要するとした施設（評価点 -15 点）： 10 施設

早急な改善を要するとした施設（評価点 -20 点以下）： 19 施設（23%）

全体の分布としては以下のとおりであった。



Number of values	81
Minimum	-170
25% Percentile	-15
Median	-5
75% Percentile	0
Maximum	0
Mean	-16.6
Std. Deviation	29.13
Std. Error	3.237
Lower 95% CI of mean	-23.05
Upper 95% CI of mean	-10.16

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。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。

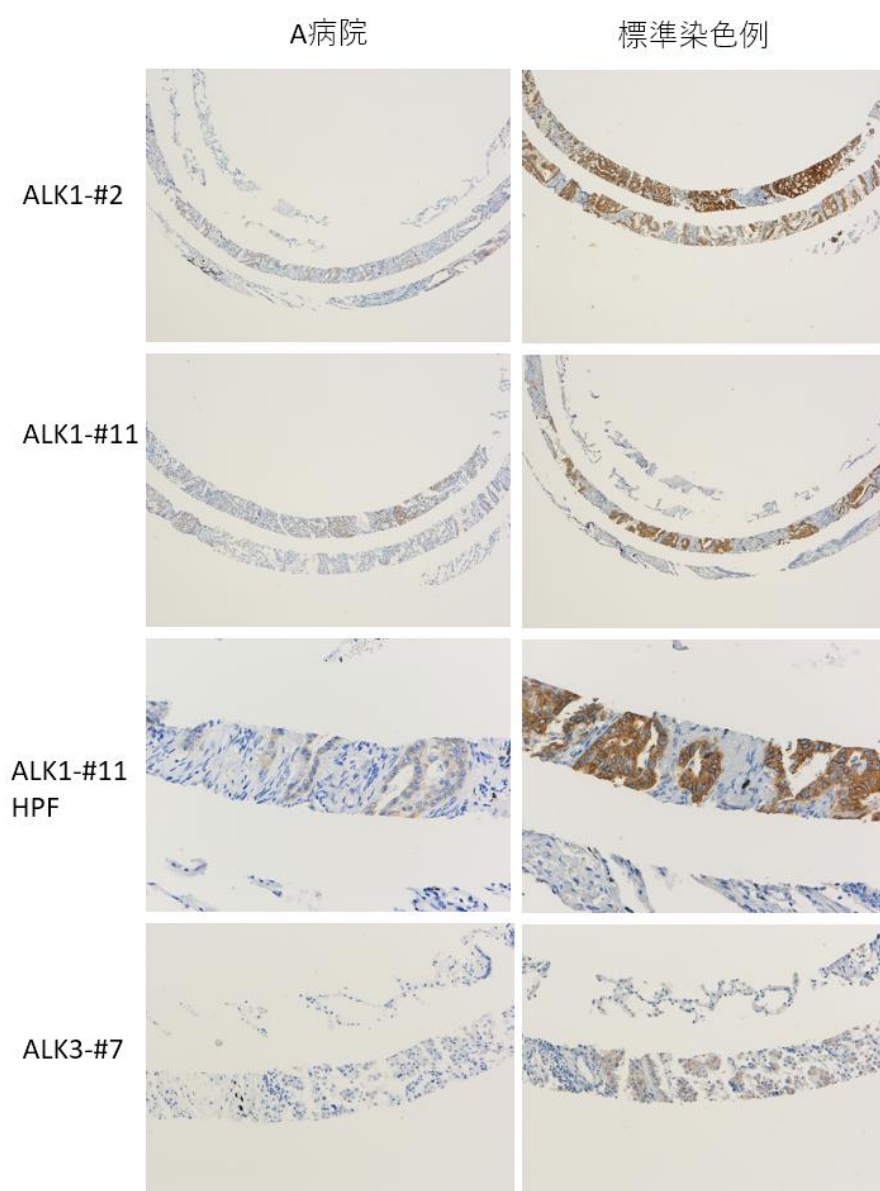
ALK_1			コメント評価	
-	FISH検査を行わない	-5	1 FISH検査を行わない	
+	FISH検査を行う	-15	2 FISH検査を行う	標準例と比較して染色強度が弱く、陽性反応にややムラがあります。技術的な改善が望まれます。
-	FISH検査を行わない	-5	3 FISH検査を行わない	
-	FISH検査を行わない	-5	4 FISH検査を行う	腫瘍細胞は陰性と思われます。
-	FISH検査を行わない	-5	5 FISH検査を行わない	
-	FISH検査を行わない	-5	6 FISH検査を行わない	
-	FISH検査を行わない	-5	7 FISH検査を行う	腫瘍細胞は陰性と思われます。
-	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。





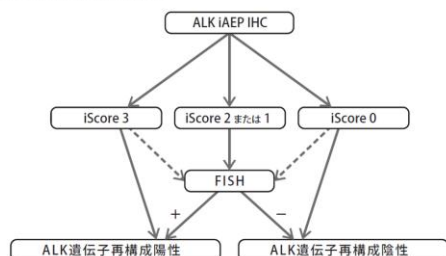
まとめ

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

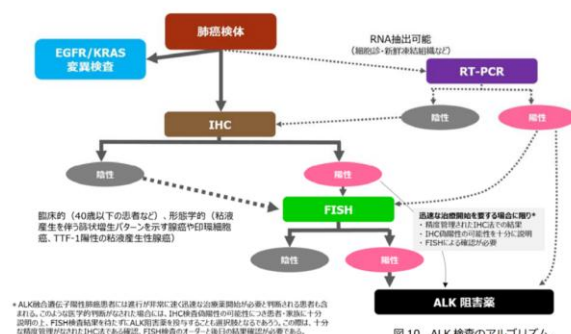


□ iScore に基づいたALK検査アルゴリズム



ニチレイ ALK iAEP kit Atlasより

日本肺癌学会 ALK検査の手引



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。

