

ALK IHC の標準化、精度管理に向けての調査研究

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

愛知県がんセンター中央病院

遺伝子病理診断部 レジデント 近藤 千晶

レジデント 三窪 将史

臨床研修医 森 俊輔

ALK-IHC 精度管理の目的

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 ヒストファイブ 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。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) を立ち上げたが、その経済的な裏付けは得られず、個人的な外部資金調達が求められた。そのため、委員長による癌研究助成を申請し、外部評価プログラムの資金の一部に当てた。以下に都道府県がん拠点病院を対象に行った ALK IHC 精度管理の結果を示す。

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、特定のサイトで参照可能であった。

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、陽性書憂いについては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

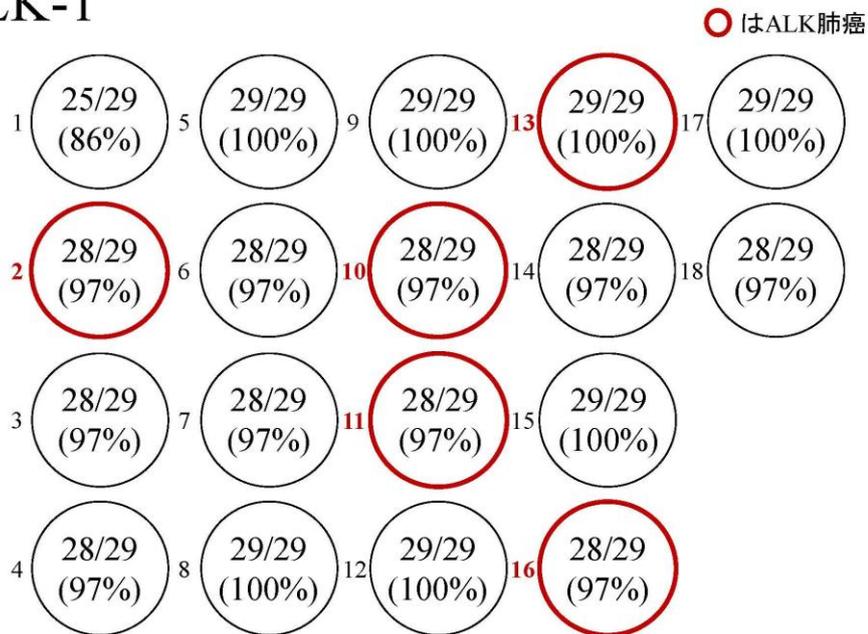
各ワーキンググループ委員より分担によりメールによって 45 施設にプログラムへの参加を打診した。その結果は以下のとおりである。

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

結果

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。その組織コアごとの結果を以下に示す。

ALK-1



ALK-2



ALK-3

○はALK肺癌 ✕は評価対象外へ



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、47 施設に状況を評価することができた。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、ロシユ 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. ライカ製染色機器を用いた場合、検出増幅が不十分で過小評価される施設もあった。
 - d. 独自の染色方法ではうまく行っていない施設の方が多かった。
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。

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、免疫染色の方法および評価のピットフォールについてのプラクティカルガイドを作成し、評価に役立ててもらうことにした。

また、これまでの経験をもとにして、地方がん拠点病院（352 施設）などに広めていく必要性があると感じた。