

HER2/neu檢驗的 檢體處理、判讀與評分標準

廖儷容¹、許志怡^{1,2}

¹台北榮民總醫院病理檢驗部，台北，台灣

²陽明大學醫學院病理學科，台北，台灣

摘要

HER2/neu的狀態為乳癌病患選擇治療的重要依據，HER2/neu的檢驗標準化是近十年來常常被討論且努力的目標。HER2/neu的蛋白質表現使用半定量的免疫化學染色法來評估，染色的結果就不單純的是沒顏色為陰性，有顏色稱為陽性。乳癌HER2/neu免疫染色需要30%以上腫瘤細胞的細胞膜上有整圈完整的「強」染色（strong complete membrane staining），而胃癌於切除的胃腫瘤中有10%以上腫瘤細胞或內視鏡胃切片中有一群（5個腫瘤細胞以上）有整圈完整（complete）、基底部及側邊（basolateral）或是側邊（lateral）的「強」染色，就為陽性3+。當染色的強度，成為區別HER2/neu免疫染色為陽性3+或模稜兩可（equivocal 2+）的主要依據時，HER2/neu免疫染色強度的校正與一致性，就更顯得重要。為了要控制影響免疫染色強度的各種因素，使染色強度能正確的反應腫瘤細胞膜上HER2/neu蛋白質的表現，應遵循HER2/neu檢驗指引，改善分析前（pre-analytic）檢體收集、固定、處理，控制分析中（analytic）染色試劑及步驟，並精進分析後（post-analytic）判讀方法及報告內容。也需建立品管與品保措施，參加外部能力試驗（proficiency test; PT），以期能提供正確的HER2/neu檢驗結果，使病患能因此而得到適當的治療。（生醫2011;4(3):140-147）

關鍵字：HER2/neu、乳癌、胃癌、標準化

前言

上個世紀末發現乳癌的第二型人類表皮生長因子受體（human epidermal growth factor receptor 2; HER2，ErbB2，*HER2/neu*）的改變，而其標靶治療

藥物trastuzumab（Herceptin®，賀癌平）成功的應用於乳癌的治療，在近年成為標靶治療的典範之一。這使原本預後較差的HER2/neu陽性乳癌病患，在接受標靶治療後，預後大幅改善，已經跟HER2/

通訊作者：許志怡 醫師

電話：886-2-2875-7449

傳真：886-2-2875-7056

地址：112 台北市石牌路2段201號

電子郵件：cyhsu@vghtpe.gov.tw

neu陰性、賀爾蒙受體陽性乳癌病患差不多。而要選擇病患接受HER2/neu標靶治療，HER2/neu的檢驗就非常重要，因為只有腫瘤有HER2/neu蛋白質過度表現（overexpression）或HER2/neu基因放大（amplification）者才適合接受治療。若檢驗有誤，使原本為陰性者誤認為陽性（偽陽性），病患不僅接受了不必要的標靶治療，浪費了昂貴的醫療資源，也使病患身體無辜地承受了其副作用。若將原本為陽性者誤認為陰性（偽陰性），對病患的影響更是重大，將使病患會錯失了一個有效的標靶治療，且可能影響其預後。

台北榮總HER2/neu檢驗的源起

台北榮總病理部於1998年開始用免疫染色法來偵測乳癌的HER2/neu蛋白質過度表現，起初並無半定量免疫染色判讀的經驗，也沒有HER2/neu蛋白質的標準細胞來提供參考。以一般免疫染色方法的經驗來判讀，腫瘤細胞細胞膜上有呈現染色即認為是陽性，統計下來其陽性率竟然高達70%。這樣的結果與文獻的30%至35%結果大有不同。而在1999年引進美國食品藥物管理局（US Food and Drug Administration; FDA）核准的HercepTest™檢驗套組，使用其管制玻片、標準的試劑、染色方法及判讀標準，陽性率馬上降為25%至30%。當時也引進了FDA所認可螢光原位雜交法（fluorescent *in situ* hybridization; FISH）來偵測HER2/neu致癌基因放大。FISH來偵測時，DNA較蛋白質穩定，較不易受到延遲固定或固定時間的影響，且使用染色體17著絲粒（CEP17）做為內部對照品（internal control），所以結果更為穩定。一般相信乳癌HER2/neu蛋白質過度表現與HER2/neu致癌基因放大有90%以上的一致性，也就是說絕大多數乳癌HER2/neu蛋白質過度表現是來自於其基因放大。用

FISH來檢查有穩定性高的好處，但最大的缺點為試劑耗材很貴，在沒有健保給付此項檢查時，一年之中自費檢驗的人次也是屈指可數。

HER2/neu檢驗指引

在2007年美國臨床腫瘤學會（American Society of Clinical Oncology; ASCO）與美國病理學會（College of American Pathologists; CAP）發表了HER2/neu檢驗的指引¹，規範了HER2/neu檢驗除了要使用標準化的作業程序，其中對於檢體的處理（儘快使用10%福馬林固定6-48小時）、判讀的標準（免疫染色陽性需30%以上侵犯性腫瘤細胞的細胞膜上有整圈完整的「強」染色，FISH陽性需HER2與CEP17的螢光訊號比大於2.2）、報告的方式也做了規範。而對於一個合格的檢驗，在提供臨床服務前需使用25至100個檢體做初始驗證（initial validation），其陽性與陰性結果，需與另一個已經驗證過的檢驗方法所得到的結果，達到95%的一致性。並且之後每半年需做一次（25至100個檢體）持續驗證（ongoing validation），而持續驗證這部分在參加CAP評鑑的實驗室是可以用每半年一次的能力試驗（proficiency test; PT）來進行。不管實驗室是使用美國食品藥物管理局所認可的檢驗套組或是由實驗室所自行研發或部分修改的檢驗方法，都要做初始驗證。通過驗證後才能提供臨床服務。且之後有任何試劑或程序方法的改變，都要重新做驗證。而國內早期要找到一個HER2/neu檢驗經過驗證的實驗室來幫忙做驗證並不容易，尤其是經過大型臨床試驗結果驗證過的實驗室，也僅有國外少數的中央實驗室，要與其進行平行檢驗來做驗證有相當大的難度。唯一較可行的方法就是參加能力試驗，由能力試驗來做驗證，累積25個以上檢體，達到95%的一致性後再提供臨床服務。

HER2/neu檢驗目前的狀況

在2007年ASCO/CAP HER2/neu檢驗指引發表時，文章內宣稱在臨床試驗中央實驗室重測原本實驗室送來的檢體，有接近20%原本的HER2/neu檢驗是不正確的。但經過這幾年的努力，在2009年發表的文章中免疫染色的結果與FISH的結果可高達98%的一致性²，也超過當初指引訂定95%一致性的標準。因此在引用2007年以前的文獻，宣稱有接近20%的HER2/neu檢驗是不正確，應注意時效性。國內已有多家醫院的病理部門已通過CAP認證，HER2/neu免疫染色也為外科病理查核表（check list）的必需項目，因此國內這些醫院的HER2/neu免疫染色應已達ASCO/CAP HER2/neu檢驗指引所訂定95%一致性的標準。而未經認證或平行驗證者，其HER2/neu免疫染色就無法確認是否已達標準。自去年（2010）起台灣病理學會開始辦理HER2/neu檢驗的能力試驗，由各醫院的病理單位報名參加，提供各醫院病理部門實驗室一個平行驗證的機會。

或特徵多半不會與中央實驗室完全一樣，這更突顯做校正與驗證（validation）的重要性。即使我們選用一樣的染色法、標本收集、固定、處理也難確保與中央實驗室完全相同。雖然這些部份若遵循ASCO/CAP HER2/neu檢驗指引可達到一個可接受的水準，但標本取下至放入10%福馬林中間的冷缺血時間（cold ischemic time），對於蛋白質的保存影響甚劇且不可逆。ASCO/CAP HER2/neu檢驗指引要求要儘快（as soon as possible），最好能控制於30分鐘以內。病理部門對冷缺血時間這部份最難控制也最難處理，需要送檢的臨床單位盡力配合。對於全切除的檢體，若不儘快送到病理部門切開固定，即使放福馬林中，以福馬林一小時一公釐的滲透速率，位於中央部位的腫瘤等到福馬林滲透到內部，其冷缺血時間早已超過30分鐘，這樣的檢體細胞膜上的HER2/neu蛋白質品質不佳，免疫染色的結果就很難預期。

HER2/neu免疫染色強度的重要性

HER2/neu免疫染色的標準化

實務上HER2/neu免疫染色為半定量的免疫化學染色法，要用抗體來標示細胞膜上的HER2/neu蛋白質，以染色的分佈與強弱來反應細胞膜上蛋白質的量，是需要從標本收集、固定、處理、染色、判讀、報告，一連串的標準作業才能達成。事實上目前世界上並沒有一種HER2/neu免疫染色的標準方法（reference method），雖然有幾種FDA所認可染色套組可使用，但每一種套組所染出來的強弱也不一樣。我們看到一樣的檢體使用Ventana 4b5抗體所染的強度就比Dako HercepTest™強。通用的判讀方法是由大型臨床試驗的中央實驗室所發展，我們的染色方法與染色的強度

2010年發表第三期全球臨床研究（ToGA study）的結果，證實使用trastuzumab來治療HER2/neu免疫染色3+或免疫染色2+且FISH為陽性（HER2/neu與CEP17比值大於2）的晚期胃癌病患，有存活上的好處，其存活中位數比沒使用者長2.7個月³。胃癌與乳癌的HER2/neu情況是有其不同之處，胃癌不管是蛋白質的過度表現或是基因的放大，較常有局部分布的現象，乳癌腫瘤內HER2/neu分布不一或局部陽性的情況較少見。而胃癌HER2/neu免疫染色判讀的方法與乳癌也稍有不同（表一）^{3,4}，胃癌免疫染色陽性3+的細胞並不一定像乳癌HER2/neu蛋白質過度表現的細胞一樣，需要30%腫瘤細胞的細胞膜上有整圈完整的「強」染色，胃癌可以是整圈完整（complete）、基

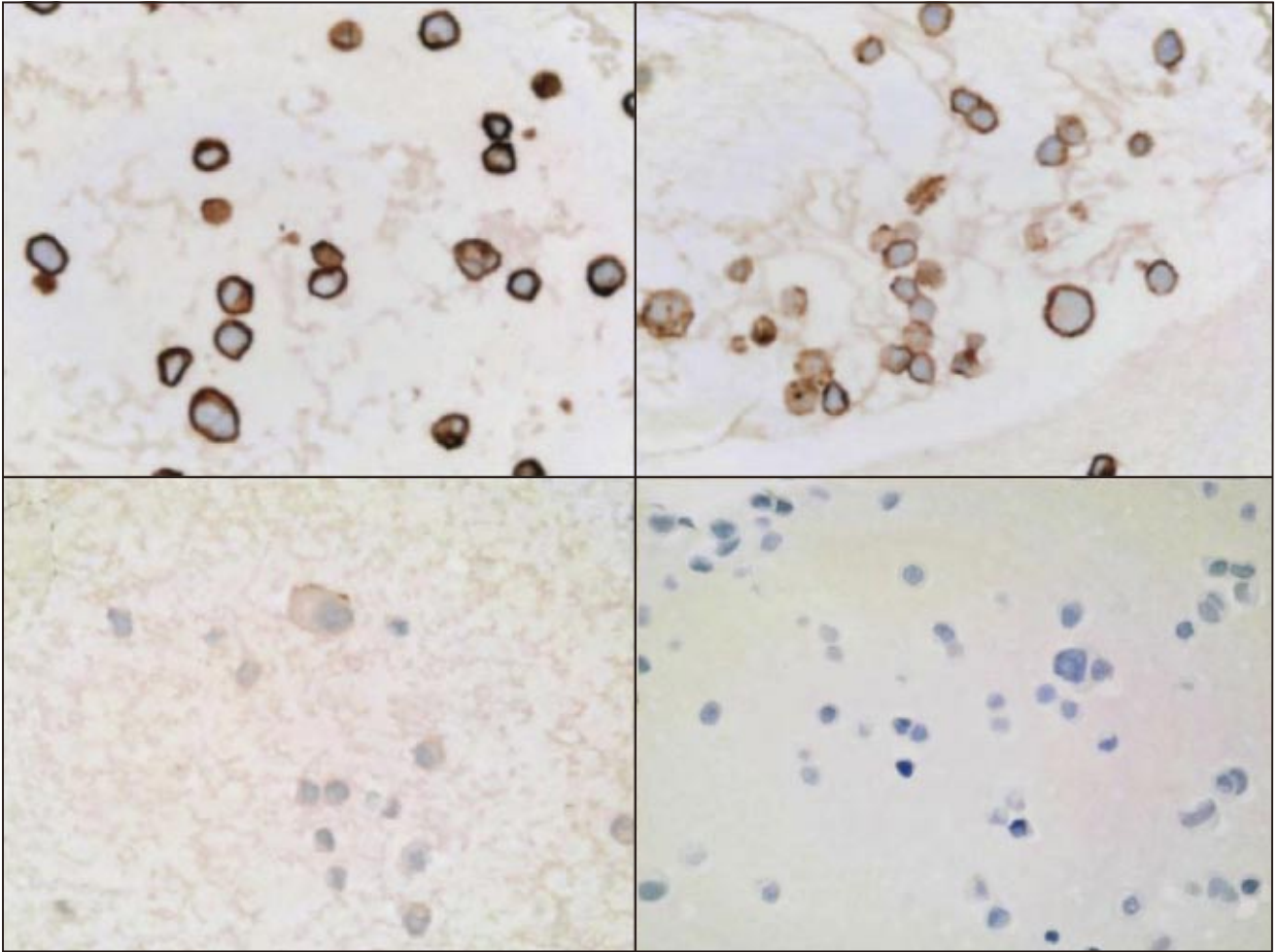
表一、乳癌與胃癌HER2/neu免疫染色判讀評分方法

評分	乳癌	胃癌（切除之大標本）	胃癌（內視鏡切片之小標本）
0（陰性）	沒有染色或<10%的侵犯性腫瘤細胞有細胞膜染色。	沒有染色或<10%的侵犯性腫瘤細胞有細胞膜染色。	腫瘤細胞完全沒有染色或完全沒有細胞膜染色。
1+（陰性）	>10%的侵犯性腫瘤細胞有很淺且不完全的細胞膜染色。	≥10%腫瘤細胞有很淺且部份的細胞膜染色。	腫瘤細胞群（5個細胞）有很淺的細胞膜染色。
2+（未定，equivocal）	>10%的侵犯性腫瘤細胞有弱到中等強度完整的細胞膜染色。	≥10%腫瘤細胞有弱到中等強度完整、底部及側邊或是側邊的細胞膜染色。	腫瘤細胞群（5個細胞）有弱到中等強度完整、底部及側邊或是側邊的細胞膜染色。
3+（陽性）	>10% ⁵ / 30% ¹ 的侵犯性腫瘤細胞有強且完整的細胞膜染色。	≥10%腫瘤細胞有強且完整、底部及側邊或是側邊的細胞膜染色。	腫瘤細胞群（5個細胞）有強且完整、底部及側邊或是側邊的細胞膜染色。

底部及側邊（basolateral）或是側邊（lateral）的染色分布，只要細胞與細胞間有染色就可以。且於切除的胃腫瘤中有10%腫瘤細胞或內視鏡胃切片中有一群（5個腫瘤細胞）有上述情況的「強」染色，就為陽性3+。若胃癌中上述情況的較弱染色出現於10%腫瘤細胞或內視鏡胃切片中的一群腫瘤細胞中，需要10倍或20倍物鏡才能看清楚，不像3+那麼「強」，使用4倍或5倍物鏡就能清楚看見細胞膜染色，其結果就是模稜兩可（equivocal 2+），需要進一步做原位雜交（*in situ hybridization*），來確認基因有無放大的情形。而染色結果為1+者其染色強度就更弱，需要高倍物鏡（40倍）才能清楚看見細胞膜染色。沒有細胞膜染色者其染色結果為0。染色結果為1+或0者，都是陰性。這種染色判讀的方法更加顯現染色強度的重要性，因此把染色強度由無到淺到深，分成0、1+、2+、3+，染色強度需要經過校正，判讀的結果才會正確。

HER2/neu免疫染色強度的影響因素與評估方法

HER2/neu免疫染色的染色強度受到很多因素的影響，因此染色強度的校正需要很多條件的配合，其中最基本的就是在染色前檢體的處理應遵照ASCO / CAP HER2/neu檢驗指引：控制冷缺血時間（cold ischemic time）至30分鐘以內，使用檢體體積10倍以上的10%福馬林固定6-48小時，以確保檢體上HER2/neu蛋白質的品質。另外，切片的厚度也會影響免疫染色的染色強度，厚的片子所呈現的顏色會較深。目前世界上HER2/neu免疫染色普遍使用的參考物質是使用腫瘤細胞株（tumor cell line），利用腫瘤細胞株可培養且性質的一致性之特質，經過一般檢體的固定與組織處理，做成細胞蠟塊（cell block），來當做主要的校正標準物質。不僅FDA所認可的HER2/neu檢驗套組，如Dako HercepTest™、Vysis PathVysion™等，所使用的管制玻片（control slide）是由腫瘤細胞株

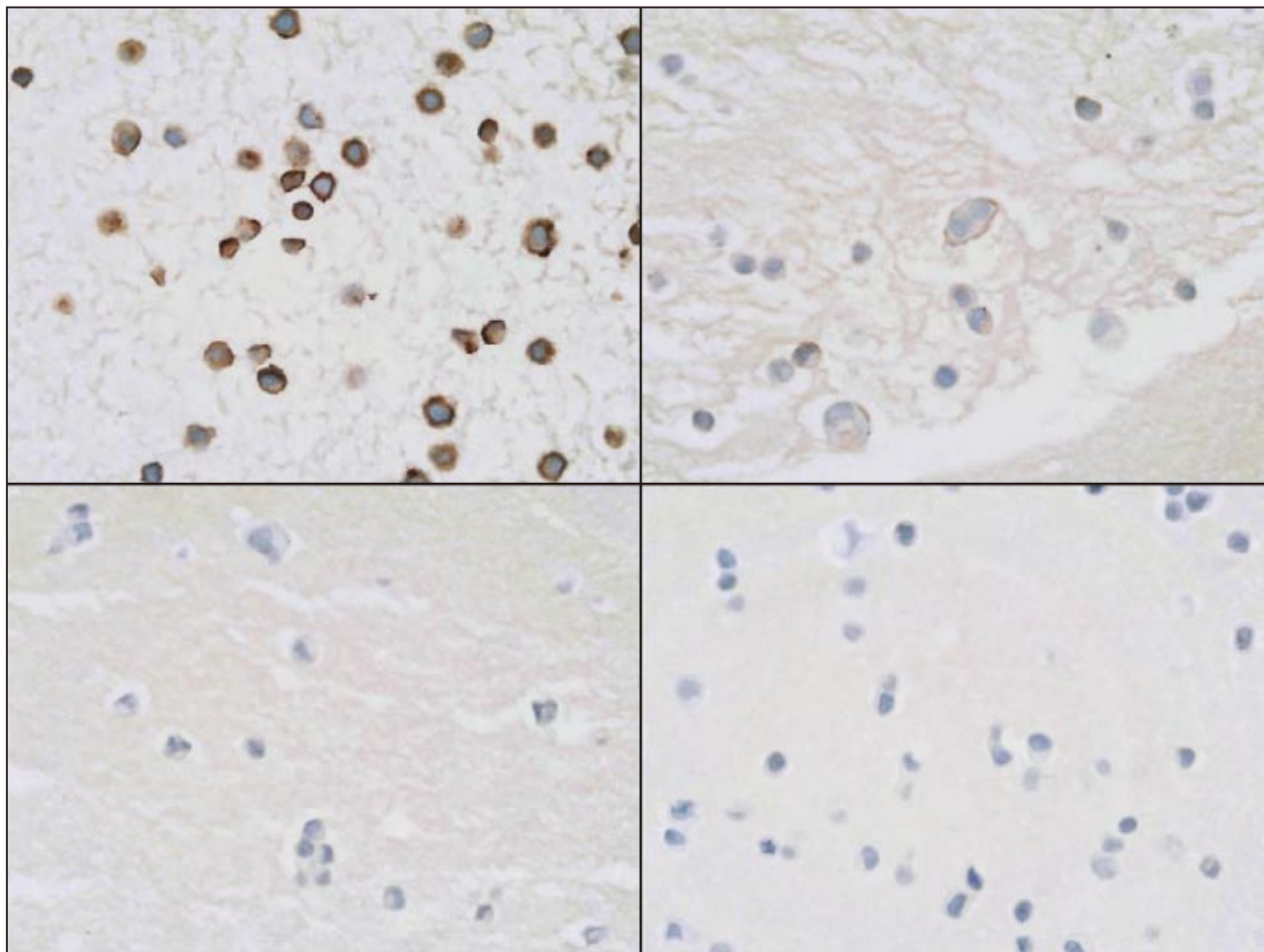


圖一、Ventana PATHWAY HER2 4 in 1 Control Slide™ 正常的染色情況（左上3+、右上2+、左下1+、右下0）。
（彩圖詳見本刊網頁）

來製作，英國國家外部品質評量（United Kingdom National External Quality Assessment Service; UK NEQAS）所做的HER2/neu檢驗的品質評估，也長期使用腫瘤細胞株來製作細胞蠟塊切片，來評估HER2/neu的免疫染色與FISH的品質。因此使用包含不同HER2/neu蛋白質表現的細胞株切片，其HER2/neu免疫染色可表現0、1+、2+、3+不同染色特徵，就可以很快且明確的了解目前實驗室內的染色方法，與我們所知道理想狀況下所訂定的染色評估標準，兩者中間的差異。以下就以Ventana PATHWAY HER2 4 in 1 Control Slide™為例，做HER2/neu免疫染色之染色強度的校正。

HER2/neu免疫染色強度的校正

Ventana PATHWAY HER2 4 in 1 Control Slide™ 包含4個細胞株：MCF-7（HER2/neu免疫染色表現為0）、T-47D 1+、MDA-MB-453 2+ 及 BT-474 3+。理想狀況下，0的細胞株不應有細胞膜染色（membrane staining），也就是完全沒有顏色。1+的細胞株應有局部非整圈（non-complete）淡淡的（weak）細胞膜染色。2+及3+的細胞株應有整圈（complete）中等度（moderate）以上的細胞膜染色，且3+的染色強度要比2+的染色強度看起來要深。這些染色的特徵就如同我們所熟知的HER2/neu免疫染色判讀標準，一個正確



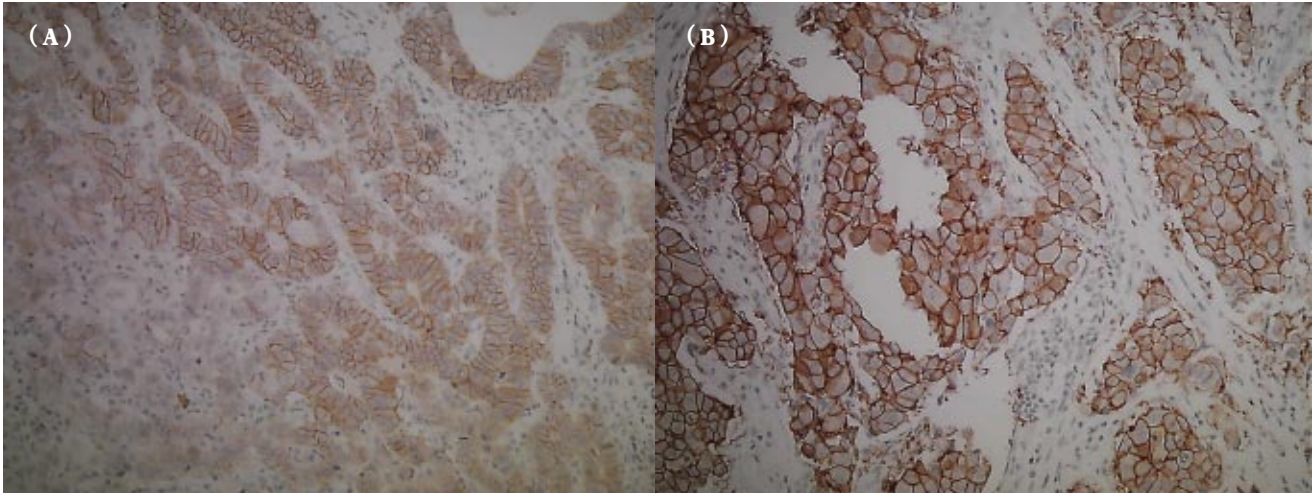
圖二、Ventana PATHWAY HER2 4 in 1 Control Slide™ 偏弱的染色情況（左上3+、右上2+、左下1+、右下0）。（彩圖詳見本刊網頁）

的染色就應該與圖譜上所看到的一樣，如圖一。圖二的2+及1+都沒有細胞膜染色，且3+的染色也較淡，應加強抗原修復（antigen retrieval），增加抗體濃度及反應時間，使染色加深。

評估HER2/neu免疫染色強度的注意事項

HER2/neu免疫染色判讀時一定要先檢視同時染的管制物質（control material）是否正確染出，通常一個已知的HER2/neu陽性組織（positive tissue）來當做外部陽性對照組（external positive control）是必

要的。它除了可確認染色是否無誤外，更可提供判斷染色強度的參考。如圖三中之胃癌的HER2/neu免疫染色，在判斷其為2+或3+時，除使用物鏡的倍率來幫忙判斷外，染色強度更要與同時染外部陽性管制（已知為HER2/neu為3+的陽性組織）來比較。當強度比3+的陽性組織明顯來的弱時，應判為2+。若沒有外部陽性對照組（external positive control）來提供強度的參考標準，就假設目前的染色已達理想狀態且恆定不變，用圖譜上強度或自己的想像來判斷，就難免會有出入。而腫瘤旁的良性上皮組織可提供很好的內部陰性對照（internal negative control），正常狀況下良性腺體組織應染為0或淡淡的1+。若如圖四之乳

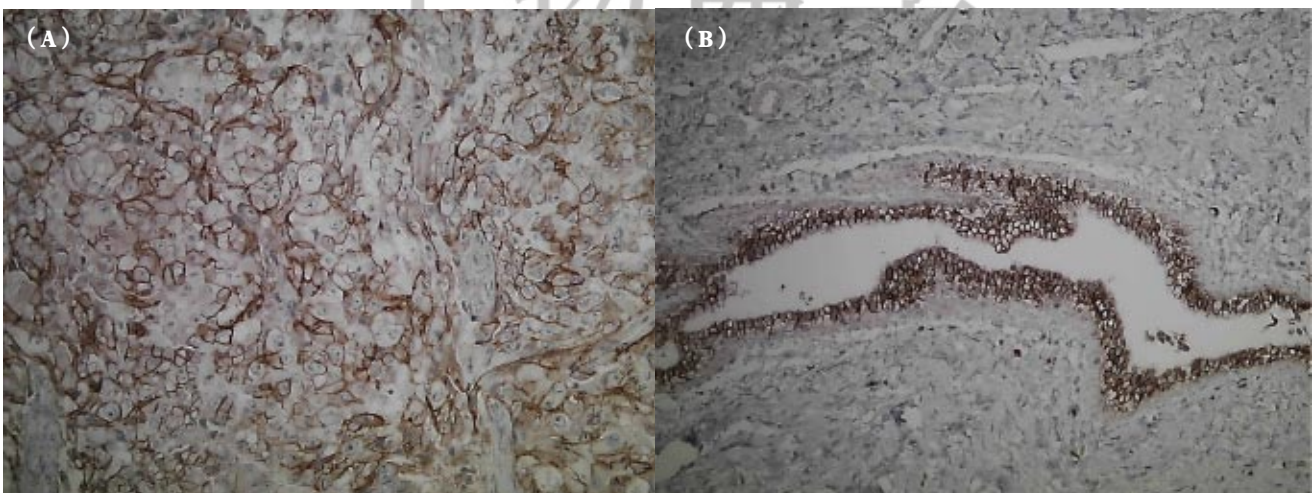


圖三、(A) 胃癌的HER2/neu免疫染色，與(B) 外部陽性管制(已知為HER2/neu為3+的陽性組織)比較。(彩圖詳見本刊網頁)

癌的HER2/neu免疫染色，發現腫瘤旁的良性腺體上皮細胞已呈強陽性，這樣的染色結果是無法判讀的，若判為陽性更是不恰當。如果這種染色結果是免疫染色的問題，改善染色後重染應可解決。如果是染色前的標本處理問題，如冷缺血時間或固定時間的問題，檢體的HER2/neu蛋白質品質不良，重染是無法改善，只能求助於FISH，通常DNA保存的狀況會比較好。如果DNA都已損壞，就連FISH也愛莫能助。

結論

HER2/neu基因改變了乳癌的診斷與治療，HER2/neu免疫染色更是開啟了使用半定量的免疫化學染色法做為選擇標靶治療的依據。HER2/neu檢驗標準化的議題，是近十年來大家常常討論且努力的目標。當HER2/neu在胃癌的治療上也出現其重要性，而評估胃癌HER2/neu免疫染色為陽性3+或模稜兩可2+，主要依據染色的強度時，HER2/neu免疫染色強度的校正與

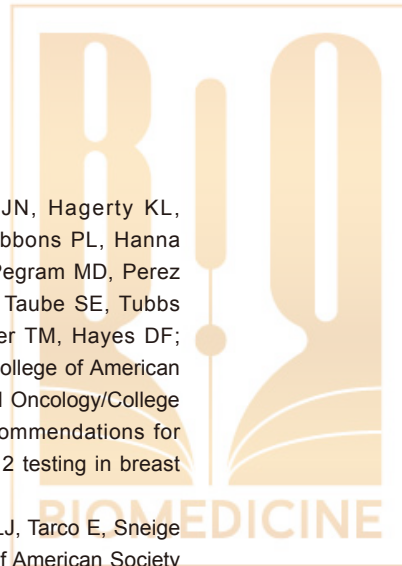


圖四、(A) 乳癌的HER2/neu免疫染色，與(B) 內部陰性管制(良性腺體上皮細胞)比較。(彩圖詳見本刊網頁)

一致性，就更顯得重要。為了要控制影響免疫染色強度的各種因素，使染色強度能正確的反應腫瘤細胞膜上HER2/neu蛋白質的表現，應遵循HER2/neu檢驗指引，改善分析前（pre-analytic）檢體收集、固定、處理，控制分析中（analytic）染色試劑及步驟，並精進分析後（post-analytic）判讀及報告。也需建立品管與品保措施，參加外部能力試驗，以期能提供正確的HER2/neu檢驗結果，使病患能因此而得到適當的治療。

引用文獻

1. Wolff AC, Hammond ME, Schwartz JN, Hagerty KL, Allred DC, Cote RJ, Dowsett M, Fitzgibbons PL, Hanna WM, Langer A, McShane LM, Paik S, Pegram MD, Perez EA, Press MF, Rhodes A, Sturgeon C, Taube SE, Tubbs R, Vance GH, van de Vijver M, Wheeler TM, Hayes DF; American Society of Clinical Oncology; College of American Pathologists. 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;25:118-145.
2. Middleton LP, Price KM, Puig P, Heydon LJ, Tarco E, Sneige N, Barr K, Deavers MT. 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;133:775-780.
3. 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; ToGA Trial Investigators. 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* 2010;376:687-697.
4. Rüschoff J, Dietel M, Baretton G, Arbogast S, Walch A, Monges G, Chenard MP, Penault-Llorca F, Nagelmeier I, Schlake W, Höfler H, Kreipe HH. HER2 diagnostics in gastric cancer-guideline validation and development of standardized immunohistochemical testing. *Virchows Arch* 2010;457:299-307.
5. Dako: HercepTest™ Interpretation Manual - Breast. 2002, p15



醫學
JOURNAL