

肺癌における ALK 免疫染色 プラクティカルガイド

第 1.2 版（2016 年 12 月 2 日改訂）

日本肺癌学会・日本病理学会合同 ALK-IHC 精度管理ワーキンググループ

序文

昨今、腫瘍形成に関わる遺伝子変異、すなわち Driver 遺伝子が報告され、それら遺伝子変異に対する阻害剤が開発、そして実臨床で使用されるようになってきました。肺癌では、2002 年にゲフィチニブ（イレッサ）の発売後、EGFR 遺伝子変異の有無により効果に差があることが Lynch ら、Paez ら、Pao らによって 2004 年に同時に報告され、EML4-ALK 融合遺伝子が Soda, Mano らによって 2007 年に報告されています。ALK 融合遺伝子は、EGFR 遺伝子変異とは相互排他的な Driver 遺伝子であり、肺原発の腺癌に約 3~5% に認められ、若年者、非喫煙者や組織学的に印環細胞癌や篩状構造を呈する腺癌などに多いという報告がなされています。

ALK 融合遺伝子陽性肺癌に対する治療薬としては米国では 2011 年に、日本では 2012 年に第一世代の ALK 阻害剤であるクリゾチニブ（ザーコリ）が承認されています。その後、第 2 世代 ALK 阻害剤として 2014 年にセリチニブ（ジカディア）が米国で、アレクチニブ（アレセンサ）が日本で承認されました。2016 年 3 月には日本でも遅ればせながらセリチニブ（ジカディア）が承認されました。これらの ALK 融合遺伝子陽性肺癌に対する治療薬は融合遺伝子の有無によって、治療効果に差が見られることが知られていて、適正に取り扱うためには免疫染色、FISH、RT-PCR 法などでの遺伝子変異検査などを行うことがほぼ必須条件となっています。特に ALK 融合遺伝子の証明には各阻害剤に応じて免疫染色の抗体や検出法、FISH 法などコンパニオン診断として細かく決められ、保険適用されているもの、されていないものと分れています。そのため、現場では分かりにくくなっていることがあり、診断、治療の妨げにもなってしまいます。このプラクティカルガイドは、日本肺癌学会および日本病理学会が合同で、日常臨床に役立つ知識や最新の情報などを盛り込み、病理医が適正な遺伝子診断を行う為の一助になるように作成しました。日々の診療に役立てていただけることを祈念します。

2016 年 8 月

日本肺癌学会・日本病理学会合同ALK-IHC精度管理ワーキンググループ

目次

序文	2
目次	3
略語表	4
Q1: ALK-IHC を行うのはどのような組織型の肺癌が対象となりますか？	5
Q2: EGFR 遺伝子変異のある症例について ALK-IHC を行うべきですか？	7
Q3: ALK-IHC を行わなくてもいい場合がありますか？	8
Q4: ALK-IHC を行うのに適切な検体採取材料は何ですか？	9
Q5 : 腫瘍のどの部分に ALK-IHC を行えば良いですか？	11
Q6 : 過去に ALK の検索が行われている症例で再発が認められた場合にもう一度 ALK-IHC を行う必要がありますか？	13
Q8: 検査の時期はいつがよいのでしょうか？	17
Q10: ALK-IHC はどのように行えばいいですか？	20
Q11: ALK-IHC の評価方法を教えてください。	24
Q12: ALK-IHC の精度管理はどのようにしたらいいのでしょうか？	27
Q13: ALK-IHC の保険点数はどのように考えればいいのか教えて下さい。	30
担当者一覧	36
謝辞	37

略語表

【検体採取】

EBUS: Endobronchial ultrasound : 超音波気管支鏡

TBB : Transbronchial biopsy : 経気管支生検

TBLB : Transbronchial lung biopsy : 経気管支肺生検

TBNA : Transbronchial needle aspiration : 経気管支針生検

EUS : Endoscopic ultrasonography : 超音波内視鏡

FNA : Fine needle aspiration : 穿刺吸引細胞診

【技術/検査】

IHC : Immunohistochemistry : 免疫組織化学

ICC: Immunocytochemistry : 免疫細胞化学

FISH : Fluorescence in situ hybridization : 蛍光 in situ ハイブリダイゼーション

FFPE : Formalin-fixed paraffin- embedded : ホルマリン固定パラフィン包埋

【薬事】

CoDx : Companion diagnostics : コンパニオン診断法

IVD : in vitro diagnostics : 体外診断用医薬品

LDT : Laboratory developed test : 薬事未承認（自家開発）検査法

【治療】

PD : Progressive disease : 進行

SD : Stable disease : 不変

Q1: ALK-IHC を行うのはどのような組織型の肺癌が対象となりますか？

回答:

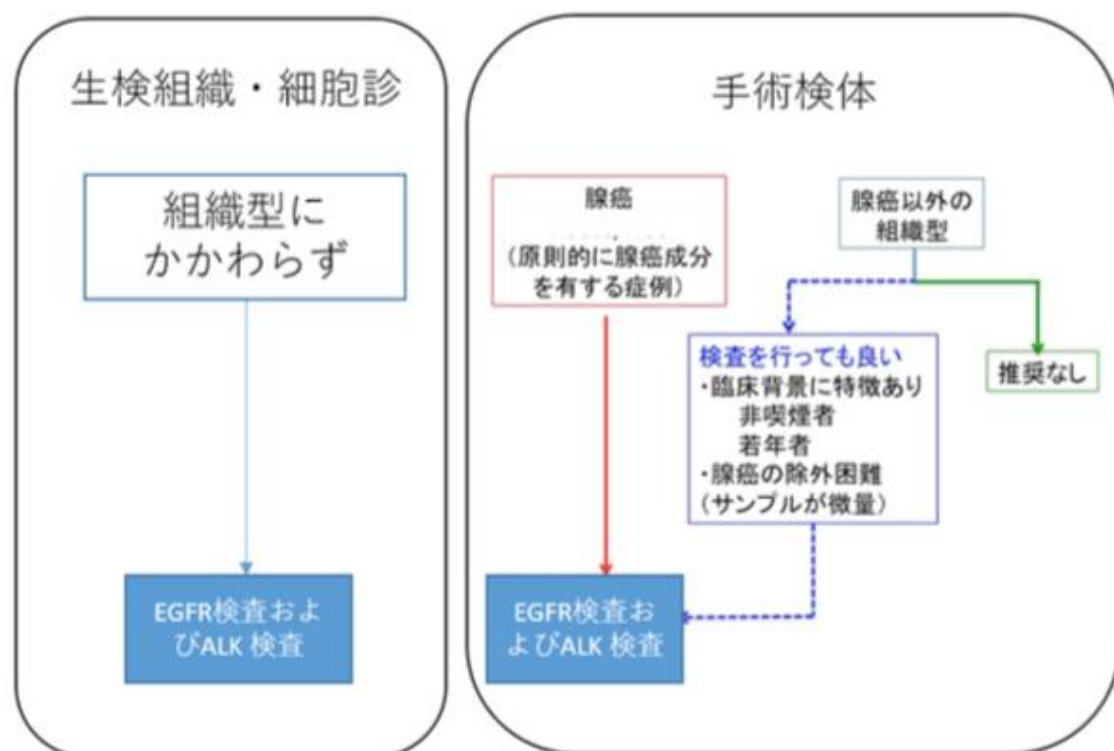
腺癌および腺癌成分を含む症例が ALK 融合遺伝子の検索対象となります。扁平上皮癌、小細胞癌および腺癌としての形質を示さない大細胞癌は除外対象と考えられますが、生検検体のみの場合には診断精度の問題があるため、腺癌以外でも検索を考慮すべきです。

解説

ALK 融合遺伝子陽性肺癌は腺癌以外の組織型における頻度は極めて低いと考えられ^{1,2)}、腺癌および微量でも腺癌成分を含む症例での検索が推奨されます。しかしながらこれは十分な組織を確保できるような検体、例えば手術検体などで腫瘍全体がほぼ組織学的検索がなされた場合に限定されます。生検検体のみで腺癌成分の有無に関して確定することは不可能であるため、腺癌と診断されなくても ALK 検査を考慮してもよいと考えます。その理由として肺癌における組織亜型の決定が特に低分化癌である場合に難しいことや採取された検体の質に大きく影響を受けることが挙げられます。ALK 融合遺伝子陽性肺癌は特徴的な臨床背景（若年、軽度・非喫煙者）³⁾を有する群で高頻度にみられ、これらの条件に合致する場合には積極的な検索が勧められますが、臨床的な特徴をもって検査を行うのではなく、腺癌の可能性が否定出来ないすべての症例について行うべきであるとされています。実際、70 才以上、喫煙者であっても陽性となることがありますので留意すべきです。また、扁平上皮癌での ALK 融合遺伝子陽性症例^{4,5)}および治療有効例が報告されていますが⁶⁾、生検材料での診断に基づく報告が主で、腺扁平上皮癌の部分像を見ている可能性が考慮されます。そのため、生検や細胞診標本では、組織型に関係なく免疫染色を施行すべきとされています

一方で、扁平上皮癌の手術例を用いて IHC に確定された群での解析では 2.5%（40 例中 1 例）に ALK FISH 陽性例が認められたという報告もあり、手術標本であっても比較的若い、非喫煙者などでは検査を施行することが勧められています。^{7,8,9)}(図 1)

図 1



Q2: EGFR 遺伝子変異のある症例について ALK-IHC を行うべきですか？

回答:

基本的には行う必要はありません。同一腫瘍内で EGFR 遺伝子変異陽性、ALK 融合遺伝子陽性肺癌が共存することはまれとされています。

ただし、多発病変の場合は、EGFR 遺伝子変異陽性肺癌と ALK 融合遺伝子陽性肺癌が共存することがあるので、注意が必要です。

解説

現在のところ、EGFR 遺伝子変異 と ALK 融合遺伝子は相互排他的と言われており¹⁰⁻¹³⁾、費用対効果を考えても、EGFR 遺伝子変異が認められる症例に対して ALK-IHC を行う必要は無いと考えられています。(表 1)。ただし、近年、EGFR 遺伝子変異を持つ症例に ALK 融合遺伝子を有する症例が 1.7%~13.6%ほど認められると報告されています。^{13,14)}しかし、これらの症例では衝突癌やアッセイの誤差との意見もあり、いずれの変異も同一腫瘍で生じるかについては多くの研究者は疑問視しています。実際にあったとしてもきわめて例外的と考えられています。また、実臨床において、ALK 融合遺伝子の有無で EGFR-TKI の治療効果に差は無いという報告もあり¹⁵⁾、そのような意味でも EGFR 遺伝子変異症例に ALK の IHC を行う必要性は低いと考えられます。

しかしながら、両方の変異を有する症例で、EGFR-TKI の治療後に ALK 阻害剤が著効した例も報告されていますので¹⁶⁾、EGFR 遺伝子変異を有していても EGFR-TKI で SD や PD の場合などは ALK-IHC 検査を行う意味があると考えられます。

表 1 愛知県がんセンターで EGFR,ALK を検索した結果のまとめ

	ALK 再構成あり	ALK 再構成なし
EGFR 変異あり	2 *	8 9 0
EGFR 変異なし	1 1 1	1 7 5 2

* 1 例は ALK 融合遺伝子陽性肺癌に対して治療後に EGFR Ex19 欠失が観察された。もう 1 例は ALK 融合遺伝子陽性肺癌であるが、EGFR 遺伝子変異は非典型的な G724D で EGFR-TKI の治療効果については予測不能であった。

Q3: ALK-IHC を行わなくてもいい場合がありますか？

回答:

手術検体で腺癌の成分を完全に除外できる場合や ALK の治療を行わない/行えない場合、EGFR 遺伝子変異が陽性である時は ALK-IHC などの検査を行わない場合があります。

解説

ALK 融合遺伝子陽性肺癌は若年発生傾向があり^{17, 18)}、非喫煙¹⁹⁾、女性に多いとの報告がありますが、喫煙男性にも一定頻度で融合遺伝子が認められることから臨床像での絞り込みは行うべきではないとされています。また、組織像に関しては ALK 陽性肺癌のほとんど全てが腺癌であり、EGFR 遺伝子変異とは排他的であるので、EGFR 遺伝子変異陰性の腺癌は必ず ALK-IHC が行われるべきです。頻度の高い EGFR 遺伝子変異も検査すべきで、初診例では EGFR 遺伝子変異検査と同時に行っても構いません。(症例の選択について、Q1 参照)

ALK-IHC は、ALK 融合遺伝子を有する症例はびまん性に陽性となることが知られています。^{20, 21)} また、ALK 融合遺伝子陽性の腺扁平上皮癌の扁平上皮癌成分でも、ALK-IHC は陽性を示すので、原則的に初回生検で検体量が十分であれば、生検陰性症例を手術検体で再評価することは推奨されません。²²⁾ (Q5 参照)

1) 手術予定がある場合に生検検体で ALK-IHC を行う必要性は？

手術が行われる場合は手術検体で施行する方が確実な結果が得られるとする報告もありますが、²⁰⁾ 手術材料に脱灰操作が加わっている場合などは、生検 組織で行う必要があります。複数の腫瘍組織がある場合には、カンサーボードなどの多職種メンバーでどの組織を使うべきか討議することが勧められています。

2) ALK 検査で IHC ではなく、FISH や RT-PCR が先行された場合の IHC の必要性は？

ALK FISH 陽性例、特に陽性細胞数カウントが 15-20%の症例では真の ALK 融合遺伝子が認められない症例(それらは免疫染色が陰性)の報告があり、²³⁾ また、陽性シグナル数が多くても 5'欠損例では次世代シーケンサーの結果 ALK 融合遺伝子が証明されなかった症例の報告がありますので注意が必要です。²⁴⁾

RT-PCR で陽性であれば科学的な面からは FISH や IHC を施行する必要性は存在しないと考えられますが、保険請求との関連からは FISH または IHC を施行する必要性があります。RT-PCR 法では、抽出した核酸を用いる検査であるため、確実に検体中に腫瘍細胞が入っているか確認する必要があります。また、肺腫瘍においてもまれながらも新規転座パートナーが同定されてきていますので、^{24,25)} RT-PCR が陰性の場合では ALK 融合遺伝子が陰性である根拠とはなりませんので未知の転座パートナー遺伝子でも陽性となる FISH または IHC を施行すべきです。

Q4: ALK-IHC を行うのに適切な検体採取材料は何ですか？

回答

検体の種類は組織検体、液状検体、穿刺吸引細胞診検体のいずれでも可能とされています。重要な点は材料が適切に処理されて取り扱われるべきこと、および検体が十分な腫瘍細胞を有することです。

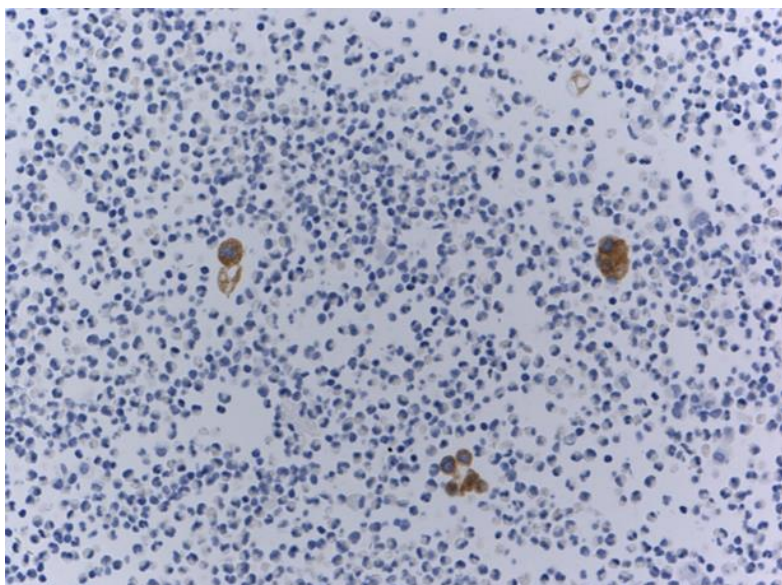
解説

ALK-IHC は FFPE 組織ブロック、ALK ICC は液状検体及び穿刺吸引細胞診検体のセルブロックあるいは塗抹標本(スメア)のような種々の異なる腫瘍検体で技術的には検査可能とされています（保険適用に関しては Q13 参照）。ただし、検査可能とは言っても viable な腫瘍細胞集塊が作製された標本内にごく少数でも存在している必要があります。判定に必要な腫瘍細胞の数があれば、生検検体でも検査は可能です。しかしながら現時点では IHC における必要組織量、厳密に言うと必要腫瘍細胞数は、FISH(最低 50 個)と異なり、決まっていません。アーチファクトを除外し、粘液産生等腺癌細胞であることや、逆に偽陽性が生じうる神経内分泌形態でないことを認識するためには(Q5 参照)、細胞形態のみならず組織構築をある程度判定できる腫瘍細胞数を確保することが望ましいと考えられますが、逆に IHC の利点として腫瘍細胞数のごく少数であっても適切に作製された標本であれば正しく判定できる可能性があります。

細胞診検体は材料の種別関係なくセルブロックが作製されていれば免疫染色が可能です（図 2）。セルブロックは組織標本と同様に扱えることができ、バイオマーカー解析と同じプロトコルを適用できるため、セルブロック作製が推奨されます。ただし、液状化細胞診では使用するシステムによって固定液や固定方法が異なるため、ガラス塗抹標本、セルブロック、何れの場合にも推奨されるプロトコルはなく、報告に散見される程度です。施行に当たっては各検査室で抗原賦活化などの染色条件を十分に検討しておく必要があります（図 3）。同じ細胞診検体でも、喀痰や洗浄液などのある一定の変性が加わる材料には同様に注意が必要です。全ての診断作業が完了するまで胸水などの保存可能な検体は保存しておくことが望まれます。

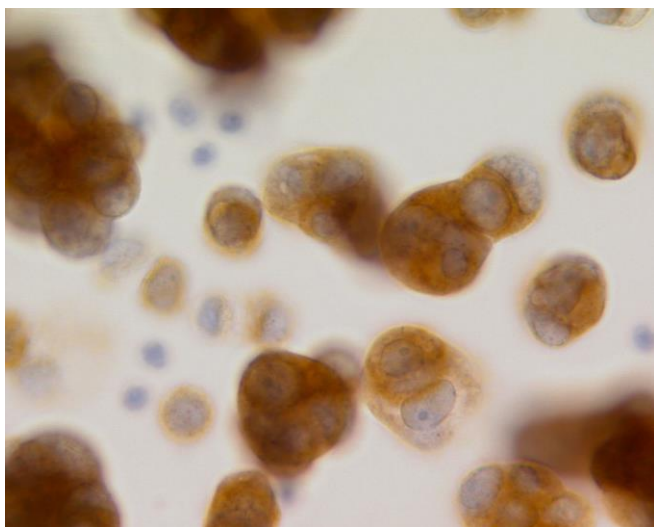
参考文献 8,26,27

図 2



少数の腫瘍細胞と思われる細胞に ALK 陽性を示し、ALK 融合遺伝子の存在が強く示唆される。少数の細胞であっても陽性所見が得られる点は IHC 法の利点であるが、神経内分泌腫瘍などでも偽陽性を示すことを考えると FISH での確認が必要となる。本例では FISH においても陽性であった。

図 3



液状細胞診検体を用いた ALK immunocytochemistry. 背景の炎症細胞は染色されないが、腫瘍細胞の胞体に強く染色される。本例では FISH においても陽性であった。施行に当たっては、推奨されるプロトコールがないことから十分な事前検討が望まれる。

Q5：腫瘍のどの部分に ALK-IHC を行えば良いですか？

回答：

壊死部分や固定不良領域以外の腫瘍部分を用いてください。複数の病変が存在し、それぞれが独立した腫瘍であると考えられる場合は、それぞれについて ALK-IHC を行うことが望ましいと考えられます。

しかし、類似した組織像をとる場合は、同一のがん細胞に由来している可能性が高いので、より保存状態が良い方で行ってください。

解説：

理論的には、適切な方法を用いれば、ALK 融合遺伝子がある場合は、蛋白はほとんどの腫瘍細胞の細胞質に発現します。しかし、壊死部分や固定不良領域では、偽陽性、偽陰性となる場合があるので、手術材料などの複数ブロックが存在する場合には、形態学的に最も状態のよいブロックを選んで染色することが勧められます。

複数病変があり、肺内転移の可能性が高い場合は、より保存状態のよいほう、採取時期の新しいほうで実施することが推奨されます。別々の腫瘍である可能性が想定される場合は、それぞれの腫瘍に実施したほうがよいと考えられます。また、ALK 阻害剤耐性となった場合には再構成以外の遺伝子変異が加わっている可能性があります（図 4）。

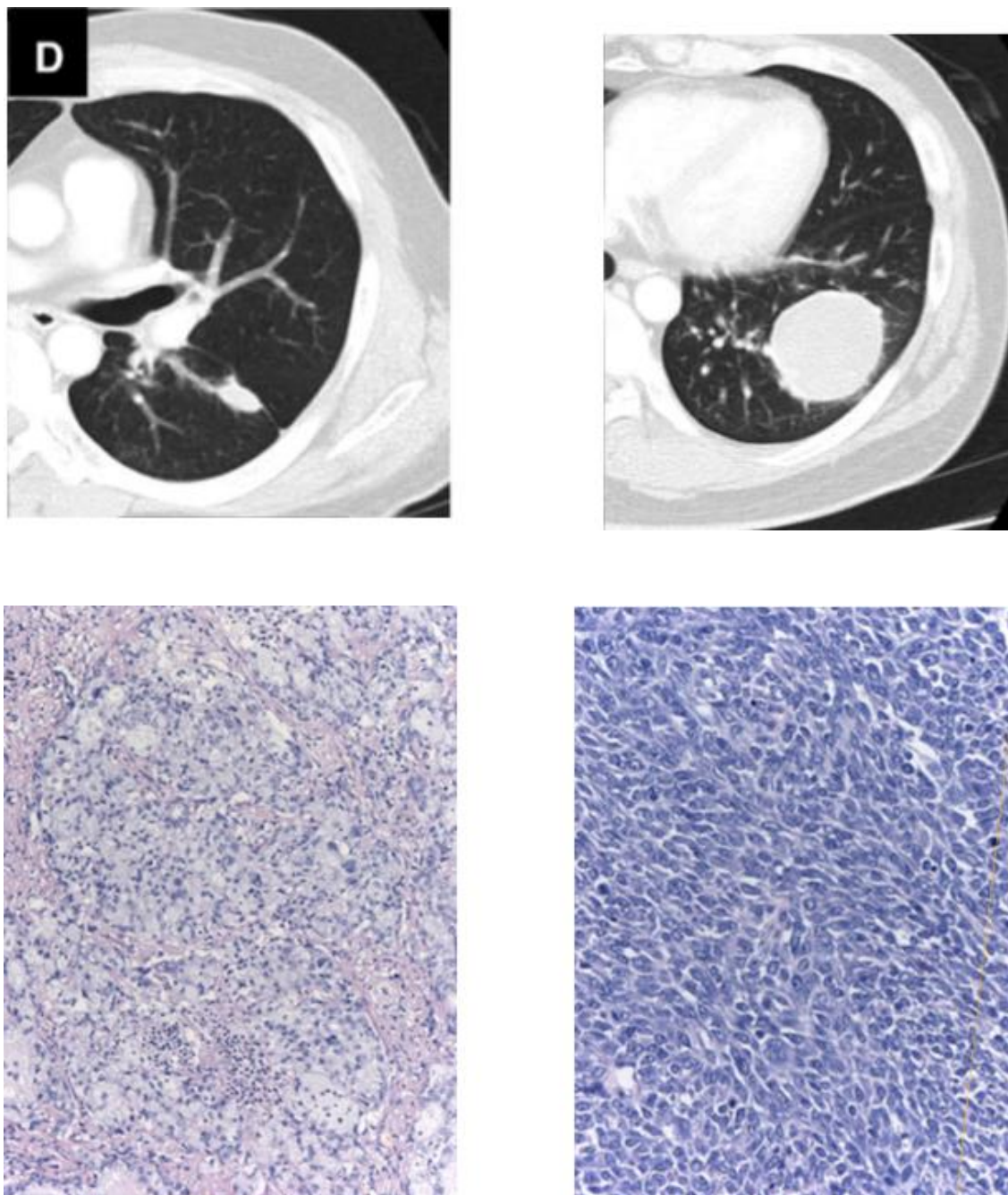
手術の際に郭清されたリンパ節に転移があれば ALK-IHC に用いることも可能です。原発巣と転移巣で遺伝子変異に差が見られることも大腸癌の KRAS や乳がんの HER2 で報告されていますが、固定などの理由と考えられています。原発巣での固定状態に問題があれば転移巣で検索した方がよい場合もあります。

（ノート 1）神経内分泌分化示す場合は、融合遺伝子が無くても、全長型の ALK を発現することがあります。この場合には、陽性細胞は >80% ですが、checker board pattern（陰性・陽性細胞が頻繁に隣り合う）を示すと報告されています。

（ノート 2）印環細胞などのように高度粘液産生細胞は、染色されるべき細胞質の領域が少なく、融合遺伝子があっても染色陽性となりにくいため、偽陰性になる可能性があり、陰性と見えても判定には注意が必要です。ニチレイの ALK ATLAS では、明瞭な陽性細胞が確認される場合には印環細胞を評価対象に含めない、という記載もあります。

参考文献 28-33

図 4 クリゾチニブ治療後の S6 と S9 の腫瘍に対してのサルベージ手術



異なる組織型を示し、重複癌との鑑別を要したが、ALK-IHC 陽性、ALK FISH で融合遺伝子の他、遺伝子増幅も観察され、クリゾチニブ（ザーコリ）耐性による肉腫様変化と考えられます。

**Q6：過去に ALK の検索が行われている症例で再発が認められた場合にもう一度 ALK-IHC を行う必要
がありますか？**

回答：

手術後、放射線後、殺細胞性の抗がん剤の治療を行った後の再発では ALK-IHC の再検査は必要ありません。ただし、重複癌が疑われる場合は ALK-IHC を行う必要があります。

解説

再発後の再生検に関しては議論のあるところで、EGFR 遺伝子変異については色々と調べられており、一致率も様々です。しかしながら、再発巣が特に骨や脳であった場合など、再生検そのもので遺伝子変異を検索するのに十分な量の検体を採取することは時としてリスクを伴います。また、肺非小細胞癌における原発巣と転移巣との遺伝子変異を比較することを目的とした研究では、同じ変異が出現していた割合(一致率)は 94%と報告されており³⁴⁾、大腸癌における同様の研究でも 90%の一致率とされています³⁵⁾。さらに現在まで ALK 融合遺伝子陰性症例からの陽転化の報告もないことから、再発時の再生検及び ALK-IHC の 検索は必要ないものと考えられます。ただし、重複癌が疑われる場合は ALK-IHC を行う必要があります(複数病変の取り扱い方については、Q5 を参照)

ALK 耐性についての ALK-IHC の臨床的意義は疑問視されています。現在までに ALK 阻害剤を使用した場合、当初は感受性であっても EGFR-TKI と同様に耐性が獲得されることが知られています。耐性の獲得機構としては、ALK 優位な変異以外にも EGFR や KRAS など ALK とは別の伝達経路活性化によるものがあり、ALK キナーゼ領域に変異が見られた症例が 36%、ALK 遺伝子の増幅によるものが 18%、EGFR 変異が 9%、KRAS 変異が 18%との報告があります。³⁷⁾ ALK 阻害剤耐性変異としては、ゲートキーパー変異といわれる ALK キナーゼ領域の変異や ALK 遺伝子の増幅などが知られており、特にクリゾチニブ（ザーコリ）耐性機構として、L1196M のゲートキーパー変異が最も頻度が高いといわれています。これらのクリゾチニブ（ザーコリ）耐性変異型 ALK にも有効な第 2 世代 ALK 阻害剤(アレクチニブ（アレセンサ）やセリチニブ（ジカディア）など)が開発されており、耐性の機序別に二次治療の戦略がとられるようになる可能性もあります。しかしながら、ALK-IHC は ALK 耐性遺伝子や遺伝子増幅、別の伝達経路活性化があっても、染色態度には特に変化がないため、耐性の診断には使用できません。

Q7: 標本作製で技術的に注意する点を教えてください。

回答：

10%中性緩衝ホルマリンを用い、6-48 時間固定します。固定後の標本作製は通常の工程で問題ありませんが、薄切した標本は速やかに ALK 検査（IHC, FISH など）を行うことが勧められます。生検検体では微小な材料から多数の切片を作る必要があり、薄切後での腫瘍細胞量の変化に注意が必要です。

解説：

固定液は 10%中性緩衝ホルマリンが推奨されています。ホルマリン濃度の違いが検査実施上問題となることは多くはありませんが、標準化という観点からは、10%中性緩衝ホルマリンの使用が勧められます。非緩衝ホルマリンや酸性固定液は DNA の断片化、タンパクの抗原性の劣化をもたらす可能性があり、避けるべきです。またグリオキサールなどの代替ホルマリンについても、核酸やエピトープへの影響について検証が必要です。

骨生検などで脱灰が必要な場合は、酸性脱灰液（ギ酸、塩酸、プランクリュクロ等）あるいは重金属塩類を基盤とした脱灰液は避け、中性付近で脱灰できる EDTA を使用することが推奨されています。ただし、その場合、脱灰に時間がかかる点も考慮に入れなければなりません。

固定液もさることながら、材料採取後の速やかな固定が極めて重要です。この過程は臨床医に委ねられている場合も多く、実際に固定までにどの程度の時間がかかっているか不明なことも多いと思われます。信頼のおける検査結果を出すために、病理検査室としても十分な関与が必要です。転移巣などの手術材料ですぐに固定できない場合は、乾燥を防ぐため、生理的食塩水で湿らせたガーゼなどに包み冷蔵庫で保管すべきです。固定までの時間が各種バイオマーカーの検出に及ぼす影響に関して乳癌で多数の報告がありますが、肺癌 ALK 検査における検討はほとんどありません。しかしながら、その固定までの時間は 1 時間以内が理想的とされています。検体採取から固定までに時間がかかる場合は、乾燥を防ぐため、生理的食塩水で湿らせたガーゼなどに包み冷蔵庫で保管しないといけませんが、少なくとも金曜日採取の検体を月曜日まで冷蔵庫に保管するのは避けるべきです。

固定時間は、乳癌の HER2 検査のガイドラインと同様に、6 時間以上、48 時間以内とされています。しかしながら、小さな生検材料では 6-12 時間、大きな手術材料は 8-18 時間が最もよいとされており、固定時間による ALK 検査への影響を各施設で評価することも推奨されています。

標本作製の際、固定後の標本作製は、水洗い、エタノールでの脱水、キシレンでの脱アルコール・透徹、パラフィン浸透後のパラフィン包埋ブロックの作製、といった通常の工程で問題ありません。しかしながら、薄切後の切片は、タンパクの変性、DNA の断片化の観点から、少なくとも、6 週以内に検査を行うことが推奨されています。それでも、余剰となった薄切切片は、パラフィンなどで被覆して酸化を防ぎ、涼しく、乾燥した暗所での保存がよいでしょう。後日、新たな遺伝子検査が求められた場合、材料（腫瘍量）が十分であれば、新たな薄切切片から遺伝子検査を行った方が良好な結果が得られる可能性が高まります。

ALK 検査は進行肺癌患者から採取される材料で行うことが多く、材料は微小な生検材料や細胞診材料のみ

であることがほとんどです。従って、その微小な切片中に検査に十分な腫瘍成分が含まれているかが ALK 検査を行う上で重要な鍵となります。採取材料中の腫瘍細胞の数に関しては、IHC を行う上での規定はありませんが、FISH では最低 50 個の腫瘍細胞が必要です。十分量の腫瘍細胞が含まれない場合は、積極的に材料の再提出（再検）を促すか、ALK 検査を進めても偽陰性になる可能性を臨床医に伝えることが必要です。

切片としては、診断のための H&E 染色に加え、原発か否か、あるいは腺癌であるか否かを判断するために IHC を行うことが推奨されています。生検検体に関して、IHC 用の切片をそのたびに薄切していくと貴重な材料（腫瘍細胞）が失われてしまう可能性があり、最初から腺癌判定用の IHC 用切片（最低 4 枚）に加え、EGFR 検査用の切片、ALK 検査用の切片を作製しておくことで、再薄切の際の無駄が省略できます。また、症状の進行が早い肺癌に関しては一刻も早く治療に入ることが求められ、同時に検査を行う場合も多いと思われます。少なくとも ALK-IHC には 1 枚の切片、ALK FISH には 1 枚の切片が必要ですが、作業工程での検査の失敗（再検査）を含め ALK 検査用だけで複数枚の準備が必要です。

細胞診検体でセルブロックを作製し、ALK ICC を行う場合があります。細胞診材料から作製されるセルブロックは、遠心分離により収集した細胞成分を凝固・固化させ、組織片と同様にパラフィンブロックとする方法です。生検材料と同様に IHC や遺伝子検査を行うことが可能で、非常に有用な材料です。しかも、材料採取法の技術革新（EBUS, EUS など）により、より侵襲の少ない FNA での材料提出が多くなり、その有用性が増えています。

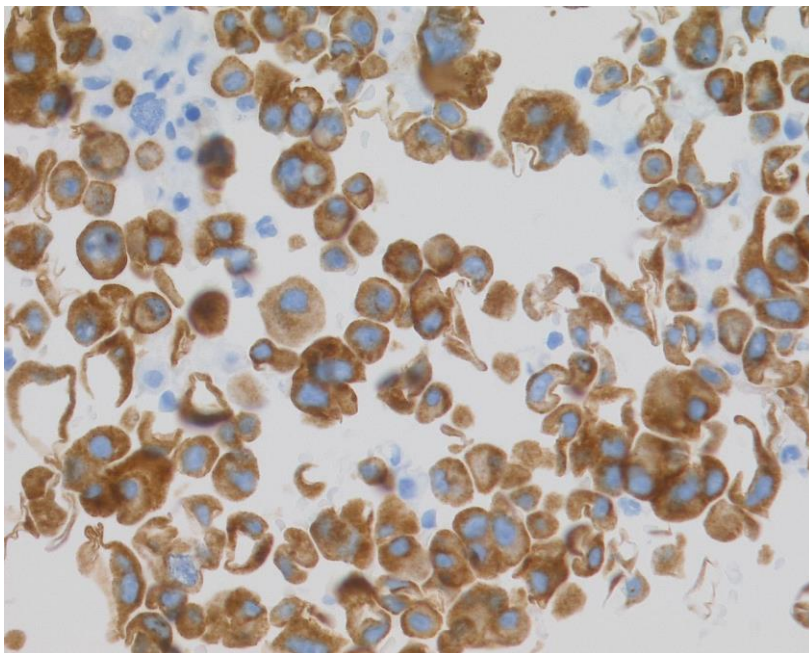
セルブロックの標本作製には、遠心分離細胞収集法後の、細胞凝固・固化法に関していくつかの方法（コロジオンバック法、グルコマンナン法、アルギン酸ナトリウム法、クライオバイアル法、アガロース法など、表 2、図 5）があります。ただし上記のように複数の方法がありますが、IHC や遺伝子検査にとってどの方法が最も有用であるかの標準化は進んでいません。特に凝固剤を添加した場合の遺伝子検査への影響などはさらに検証が必要と思われ、自施設にて行う場合は、相応の精度管理が必要です。

参考文献 26, 38-40

表 2 セルブロック作成方法

方法	コロジオンバッグ法	クライオバイアル法	アガロース法	アルギン酸ナトリウム法	グルコマンナン法
	遠心分離細胞収集法			細胞凝固・固化法	
試薬など	10%コロジオン液：コロジオン＋エーテル：アルコール（1:1）	クライオバイアル容器	アガロース	アルギン酸ナトリウム＋塩化カルシウム	アルコール脱水、グルコマンナン添加、メタノール深沈

図 5 セルブロック（アルギン酸ナトリウム法をしよう）での ALK 免疫染色



腫瘍細胞胞体に ALK が強く染色される。印環細胞癌も細い範囲で染色が確認される。本例では FISH においても陽性であった。

Q8: 検査の時期はいつがよいのでしょうか？

回答：

ALK 検査は、ALK 阻害剤を用いる標的治療実施前に行うべきです。

解説：

ALK 検査は研究的に全例実施する施設以外での実施時期は、①診断時、②(一次)治療後再発時、が想定されます。いずれも功利があり、実施施設の状況によるため推奨される時期はないのが現状です。実際には、ALK 融合遺伝子陽性と診断された後の治療方針に応じて各施設・各症例で至適な時期を選定するべきと考えられます。また、複数の施設を経由する症例(診断と治療が異なる施設で行われる場合)には、限られた検体(特に微小検体)で正確な診断を行うための有効利用と医療経済の両面から、検索方法・時期・検索結果の共有方法を慎重かつ適切に判断する必要があり、病理相互および病理と臨床の緊密な連携が求められます。また、カンサーボードなどでの症例ごとの検討が推奨されています。

EGFR, ALK, KRAS の変異は相互排他的で、ALK 融合遺伝子陽性の頻度は低いため、EGFR の結果がでてから ALK 検査を行うほうが効率的です。しかし、EGFR 遺伝子検査が偽陽性であることもあるので、注意が必要です。

ALK 検査を臨床病理像が特徴的な症例(非喫煙、若年者、粘液産生篩状・腺房状腺癌)に絞って検索すると費用対効果比が高くなりますが、特徴的所見のない ALK 融合遺伝子陽性肺癌も存在するので、臨床病理像で検査の施行そのものを決定すべきではないとされています。症例・検体の選定および検査品質管理については、別項目(Q1-5,12)を参照してください。

1)診断時に実施する場合

利点：転院などで試料が消失するなどの危険性なく ALK 融合遺伝子の有無を知ることができるため、個別化医療を最適条件で実施することができます。また、再発時に治療方針判断が迅速に行えます。

欠点：全例実施する場合に、ALK 融合遺伝子陽性肺癌陽性例の頻度が低いため非効率的です。ALK 検査費用の負担が大きくなります。

附記：症例・検体の選定については、別項目(Q1-5)を参照してください。

2)一次治療後、再発時

利点：費用対効果比が高くなります。

欠点：検査にやや時間がかかるため、緊急で治療選択を決めねばならない場合は、ALK-IHC のみで治療が開始されることもありえます。

附記：初発腫瘍と再発腫瘍のどちらで検索するべきか、については別項目(Q5,6)を参照してください。

Q9: ALK-IHC および FISH を実施するうえで注意する点を教えてください。

回答:

ALK-IHC では高感度の免疫染色法が必要とされ、偽陰性例や偽陽性例を防ぐための精度管理が重要です。FISH は時間と労力もかかり、スクリーニング検査には向いていないとされています。

解説:

ALK-IHC、FISH の施行に当たっては以下のように考えられます。

IHC では長所: ①安価である、②比較的簡便な手技であり、一般病理診断施設で実施可能、③確実に腫瘍細胞についての評価が可能、④少量の生検組織でも基本的には可能、などが挙げられます。従って、スクリーニング検査に適しています。

短所: 肺癌における ALK 融合遺伝子タンパクの発現は微量であり、通常の染色法/発色法では検出が困難です。そのため、高感度の免疫染色法が必要とされ、偽陰性例や偽陽性例を防ぐための精度管理が重要です (Q12 参照)。

FISH は時間と労力が必要でスクリーニング検査としては不適とされています。まずは高感度 IHC によりスクリーニングを行い、その後 FISH により確認を行うことが推奨されます。

一般的には、FISH と高感度 ALK-IHC の結果は高い相関率を示します (95%以上)。従って、十分な精度管理の下で施行された免疫染色で確実な陰性例では FISH は不要であろうとする意見もあり、米国における ALK-IHC の認可に伴い ALK-IHC のみでの患者選択について議論されています。しかしながら、両者は完全に一致するわけではなく、まれに免疫染色陰性、FISH 陽性の症例も存在することから、陽性・陰性の微妙な症例では FISH による追加検討が推奨されています。また、臨床病理学的に ALK 融合遺伝子陽性肺癌が疑われる症例 (具体例としては、40 歳以下の症例、および病理学的に (粘液産生を伴う篩状構造を呈する腺癌、印環細胞癌、TTF-1 陽性の粘液産生腺癌など) ALK 融合遺伝子の存在が疑われる場合は、FISH による追加検討が望ましいとされています。

現時点で本邦において、クリゾチニブ (ザーコリ) を使用する場合には、ALK 免疫染色陽性の場合に FISH による確認が、アレクチニブ (アレセンサ) を使用する場合には、免疫染色 (ニチレイ ヒストファイン ALK iAEP キット) 及び FISH (Vysis ALK Break Apart FISH プローブキット) を使用することが原則とされています。しかしながら、ALK 融合遺伝子陽性肺癌患者の中には、進行が速く早急な治療が必要と判断される患者も含まれています。このような患者に対しては、ALK-IHC 偽陽性の可能性を患者・家族に十分説明の上、FISH の検査結果を待たずに ALK 阻害剤を投与することも一つの選択肢となりえます。その際、十分な精度管理がなされた免疫染色法であることを確認し、FISH 検査のオーダーと後日の結果確認が必要です。

なお、米国 FDA では FISH 法である Vysis ALK Break Apart FISH プローブキットによる CoDx に加えて、最近ロシュ社 VENTANA ALK (D5F3) CDx Assay で ALK 遺伝子転座陽性の診断に基づきクリゾチニ

ブ(ザーコリ)を適用することが認可されました。ヨーロッパではクリゾチニブ適用における ALK 陽性の判定法は IHC、FISH いずれとも特定されていません。

表 3 地域による ALK 融合遺伝子検出のコンパニオン診断の違い

	Crizotinib	Alectinib	Ceritinib
US	Vysis ALK FISH Ventana ALK-IHC	Vysis ALK FISH Ventana ALK-IHC	Vysis ALK FISH [*]
Japan	Vysis ALK FISH	Vysis ALK FISH Nichirei iAEP IHC	Vysis ALK FISH [*]
Europe	ALK 陽性患者とのみで、特定の診断テストを要求していない。		
China	Vysis ALK FISH Surexam ALK FISH Ventana ALK-IHC Amoy ALK RT-RCR	未承認	未承認
Korea	Vysis ALK FISH	未承認	Vysis ALK FISH (no description related with diagnosis method in label)

* 承認が crizotinib 治療に不応の患者に適応となっているため、crizotinib と同一となる

参考文献 1,8,21

Q10: ALK-IHC はどのように行えばいいですか？

回答

ALK-IHC は ALK 阻害剤に対応するコンパニオン診断を行うことが原則となります。アレクチニブ(アレセンサ)に対応した IHC には、薬事承認された検出キットの使用が求められています。一方クリゾチニブ(ザーコリ)に対応した IHC 検査では、薬事未承認の検出方法を使用することになり、特に院内実施にあたっては注意が必要になります。検体数の少ない場合には、外注検査も選択肢にあがります。

解説

未分化大細胞型リンパ腫（ALCL）の診断において、長く ALK-IHC 検査が行われてきましたが、ALCL とは異なり、肺癌における ALK 融合タンパクの発現レベルは低く、そのため使用可能な一次抗体（クローン）や検出システムは、高感度検出に適したものを使用しなければなりません。また ALCL とは異なり、肺癌の ALK-IHC は、コンパニオン診断（CoDx：特定の医薬品の治療効果等を予測するために行なわれるバイオマーカー検査）として実施されるものですので、投与対象患者層別を要する治療薬と対応関係にある体外診断用医薬品（IVD）承認を得た検出キット（CoDx 薬）の使用が原則となります。

●ALK-IHC で推奨される検出方法

1) 標準化/最適化されている方法

このような原則は、日常病理診断業務を複雑化させていますが、現時点ではこれに則った運用が推奨されます。

⁴¹⁾ アレクチニブ(アレセンサ)に対応した IHC には、IVD 承認されたニチレイ ヒストファイン ALK iAEP キットの使用が求められ、また所定点数（2700 点）に準じて保険算定する場合には、IVD 承認を得た検出キット（CoDx 薬）の使用が必須となります。一方、クリゾチニブ（ザーコリ）に対応した IHC 検査では、IVD 承認された CoDx 薬はありませんので、未承認の検出方法を使用することになります（Q9,13 参照、表 4）。国内外における CoDx 薬の臨床開発状況^{42,43)}、ALK-IHC ワーキンググループで行った調査研究の結果⁴⁴⁾を踏まえ、下表の標準化/最適化された検出方法の使用が現時点では推奨されます。ALK-IHC で使用される高感度の検出法は、リンカー法とタイラミド法の 2 つに大別されます。両者の判定結果は高い一致性を示しますが⁴⁴⁾、これらを用いた ALK-IHC の染色性には、やや差異が認められ、リンカー法に比べ、タイラミド法では、染色強度はやや強く、染色態度はより顆粒状を呈します（図 6。詳細は Q11）。

表 4 クリゾチニブの使用が考慮される場合に推奨される ALK-IHC の検出方法

製造販売元 (メーカー)	ニチレイ バイオサイエンス社	ロシュ/ベンタナ社	ライカ バイオシステムズ社
ALK-IHC キット名	ヒストファイン ALK iAEP キット*	ALK (D5F3) OptiView DAB ユニバーサルキット	—
製造販売元での 標準化/最適化	◎	◎	○
一次抗体	5A4 Prediluted	D5F3 Prediluted	5A4 1:50 倍 ^{*3}
高感度 検出法	iAEP (リンカー法)	OptiView (タイラミド法) ^{*2}	BOND Polymer Refine (リンカー法) ^{*2}
プラットフォーム	ヒストステイナー ^{*1}	Benchmark	BOND III, BOND MAX
抗原賦活処理機器 および処理液	Heat Pro III 使用が推奨 (処理液はキット試薬)	プラットフォーム一体型 (処 理液は CC1)	プラットフォーム一体型 (処 理液は ER2)
CoDx 薬としての IVD 承認状況	本邦ではアレクチニブのみ。 海外では未承認。	本邦では未承認。 海外ではクリゾチニブのみ ^{*4}	国内外で未承認。

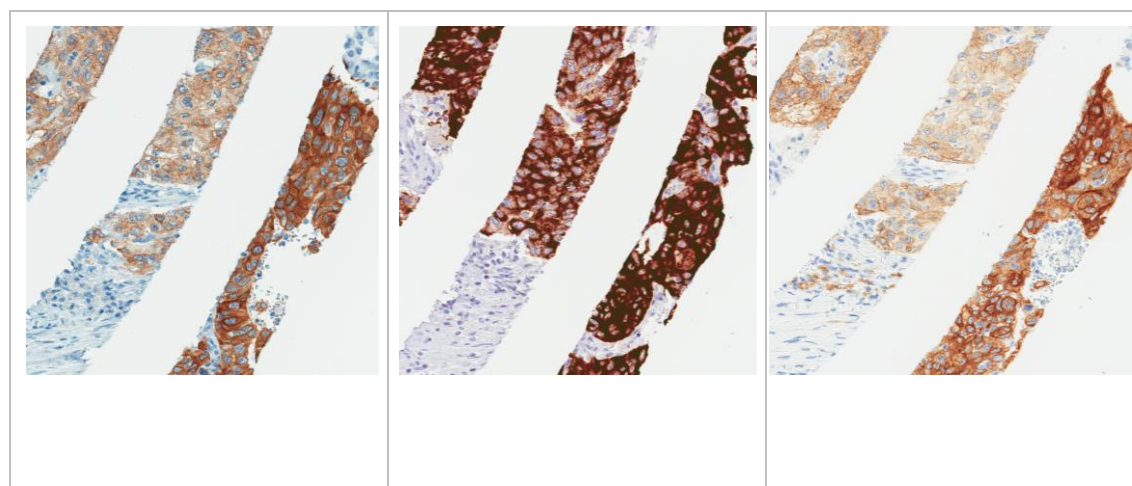
^{*1} 自動染色用以外にも用手法用キットも IVD 承認されている。

^{*2} 本検出法は ALK 以外の項目で IVD 承認されている。

^{*3} 製造販売元が提示している希釈倍率条件。一次抗体は医療機関側で希釈して使用するため、注意が必要となる。

^{*4} 厳密には、国内で使用可能なキットは海外 IVD 承認品とはことなる。

図 6 上記 3 法を用いた染色性の比較



写真左：ニチレイバイオサイエンス社（リンカー法），中央：ロシュ/ベンタナ社（タイラミド法），右：ライカバイオシステムズ社（リンカー法）。ALK-IHC 精度管理プログラム（検討フェーズ I）で用いられたスパイラル組織マイクロアレイ標本における ALK-IHC 染色の結果。

2) Home-brew 法の使用と注意点

クリゾチニブ（ザーコリ）に対応した IHC 検査の場合、表 4 の検出方法はいずれも単一メーカーの試薬・機器で構成された検出方法ですが、これら以外を使用する場合は、複数のメーカーの試薬を組み合わせる使用することになります（いわゆる home-brew 法）。そのため医療機関の責任のもと、CoDx としての使用に耐えうる十分な染色条件の検討が行われる必要があります。染色条件の検討では、ALK 陽性および陰性細胞株から作製された市販の FFPE コントロールスライド（Q12 参照）および ALK 陽性および陰性が確認された FFPE 検体を用いて、表 4 に挙げた推奨検出方法との結果の一致性（同等性）を確認する必要があります（ちなみに IVD の薬事申請では、通常陽性および陰性検体、それぞれ 50 例以上での比較検討が求められます）。また検討データについては保管が望まれます。

Home-brew 法での実施を検討する場合、市販の一次抗体（抗体クローン）は数多くありますが、国内外で IVD として使用実績のある 5A4 や D5F3 といった抗体クローンの選択・使用が望ましいと考えられます^{8,26)}。これら研究用試薬は、IVD 承認試薬のような特定の基準に適合した製造・品質管理は行われていない場合が多く、ロット間差等に問題がより生じやすい可能性がありますので注意が必要です。ロットが変わる場合は、必ず新旧ロット間での比較検討を、上記の市販 FFPE コントロールスライドや FFPE 検体を用いて行う必要があり、乖離がある場合は、希釈倍率の再設定や販売元への確認が必要となります。また、リンパ腫で広く用いられている抗体クローン ALK1 は、肺癌では感度が低く、使用はできません。逆に、肺癌用のクローンは未分化大細胞リンパ腫の検出に用いることができます。

一方、高感度の検出方法については、上表の検出試薬以外に、病理診断現場で広く普及しているダコ社 EnVision FLEX+（リンカー法）が挙げられます。抗原賦活処理法については、いずれの抗体クローンおよび高感度検出法を用いる場合においても、Tris-EDTA を主体とする高 pH（pH9 付近）の抗原賦活処理液が使用されていますので、染色条件検討時の第一選択となります。

3) 検査センターへの外注

クリゾチニブ（ザーコリ）に対応した IHC 検査を上記 home-brew 法で院内実施する場合、条件検討や検査精度維持に割く医療機関側の人的負担は少なくありません。こうした負担の受容が困難な医療機関では、検査センター（正式には登録衛生検査所）の利用が薦められます。現在、検査センターでは、アレクシニブ（アレセンサ）の IHC CoDx 薬（ニチレイ ヒストファイン ALK iAEP キット）を用いた検査以外にも、検査センターが独自に開発した薬事未承認検査法（米国 CLIA 認定施設で行われている laboratory developed test [LDT] 法に相当する方法）による検査も一部実施されています。薬事未承認検査法で採用されている検出方法は非公開ですが、大手検査センターで実施された LDT IHC と FISH の結果の一致率は 98% だったことが、ファイザー社によるクリゾチニブ（ザーコリ）保険償還前無償提供プログラムの当時（2012 年 4 月～5 月）の提供データで示されています。⁴⁹⁾

表 5 Home-brew 法のうち使用に耐えうると判断される検出方法

一次抗体 ^{*1}	アブカム社 5A4 (1:40 倍*) ^(43,45) , ライカバイオシステムズ社 5A4 (1:30 倍希釈*) ^(46,47) CST 社 D5F3 (1:200 倍希釈*) ^(46,48)
高感度検出法	ダコ社 EnVision FLEX+ (リンカー法) ^{*2}
プラットフォーム	ダコ社 Autostainer Link48, Autostainer/Autostainer Plus
抗原賦活処理機器 および処理液	ダコ社 PTLINK 使用が推奨 (処理液は TRS High pH 試薬)

^{*1} 記載は目安となる希釈倍率であり，医療機関において十分な検討が行われる必要がある。一次抗体反応では特殊な反応条件（4℃・一晩など）の使用は適さない。

^{*2} 本検出法（但し LINKER 試薬は除く）は ALK 以外の項目で IVD 承認されている。

染色プログラム例（ワーキンググループ委員の施設より）

A 施設

1. 脱パラ
2. 抗原賦活化 (PT-Link High-Buffer x20min)
3. 一次抗体(5A4、Santa Cruz Biotech, sc-57624, 50 倍希釈 x30 min)
4. DAKO Flex+ Mouse Linker (K8021) x 15min
5. DAKO Envision Flex (Polymer, K8000) x 15min
6. 内因性パーオキシダーゼブロック x5 min
7. DAB 発色 10min

B 施設

1. 脱パラ
2. 抗原賦活化 (High-Buffer 98℃ 40min)
3. 一次抗体(5A4、Thermo, MA5-11460, 20 倍希釈 x60 min)
4. DAKO Flex+ Mouse Linker (K8021) x 15min
5. DAKO Envision Flex (Polymer, K8000) x 30min
6. 内因性パーオキシダーゼブロック x5 min
7. DAB 発色 10min

Q11: ALK-IHC の評価方法を教えてください。

回答：

ALK-IHC は細胞質内に染色性が認められるため、検体組織の腫瘍細胞における細胞質の陽性所見を検索します。染色対照として、あらかじめ ALK 融合タンパク発現の有無が確認された組織・細胞標本（コントロール標本、対照標本）を検体組織と同時に染色し、これらの染色対照における反応性が妥当であることを確認した上で検体組織の染色評価を行うことが重要です。

解説：

ALK-IHC の陽性反応は細胞質内に染色されるため、検体組織の腫瘍細胞における細胞質の陽性所見を検索します。正常肺組織における ALK タンパクの発現はないため、検体組織中で内部コントロールを得ることができません。したがって、ALK-IHC の実施においては、染色対照として、あらかじめ ALK タンパク発現の有無が確認された組織・細胞標本を検体組織と同時に染色し、これらの染色対照における反応性が妥当であることを確認した上で検体組織の染色評価を行うことが重要です。さらに、検体標本で一次抗体の代わりに陰性コントロール試薬（使用する一次抗体と同種のイムノグロブリン等）を反応させた陰性対照スライドにて、検体標本におけるアーチファクト（非特異反応）の有無を確認するのが望ましいとされます。

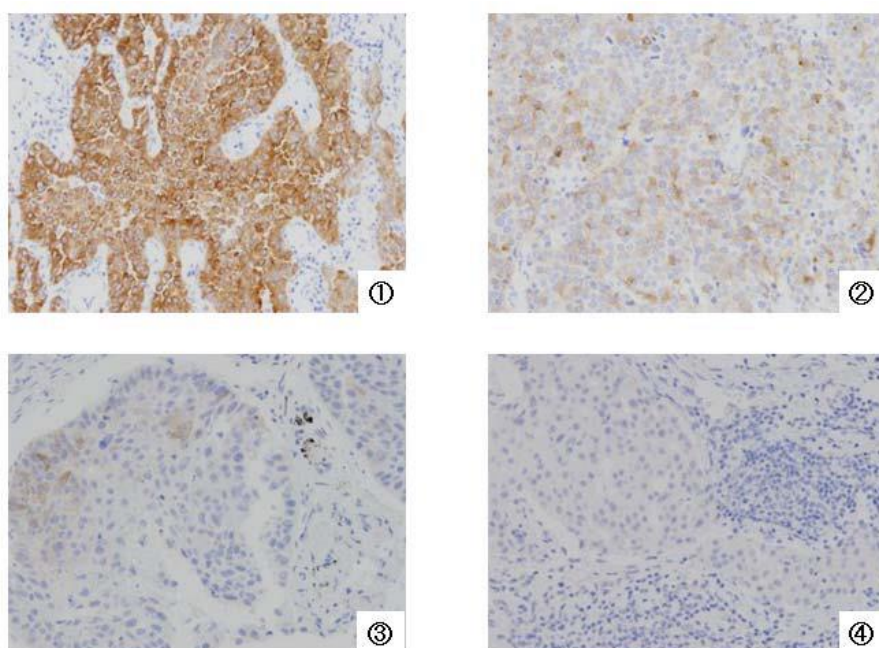
日本肺癌学会がまとめた「肺癌患者における ALK 融合遺伝子検査の手引き（第 2.1 版）」では、ALK 融合遺伝子検査として、まず IHC でのスクリーニングを行い、ALK-IHC 陽性となった症例について FISH を実施し ALK 阻害剤適用可否を判断するアルゴリズムが示されています。

クリゾチニブ（ザーコリ）適応患者識別のための ALK-IHC として、ロシュ社 VENTANA ALK (D5F3) CDx Assay が全自動免疫染色組織化学法コンパニオン診断薬としての米国 FDA 承認、中国 CFDA および欧州 CE-IVD を取得していますが、本邦における体外診断薬は未だないため、当該目的の検査には研究用試薬の ALK 抗体と高感度検出法を組み合わせた IHC が用いられているのが現状です。使用する一次抗体や染色法により得られる染色性は異なるため、ALK-IHC 導入時の事前検討において自施設の染色性を十分に把握した上で、ALK 融合遺伝子検査のスクリーニングという目的において一律の判定基準を設定し、それに基づいた ALK-IHC 陽性、陰性の判定を行うことが望まれます。判断基準を至適化さえしておけば、ほとんどの症例で明瞭に陽性と陰性を区別することができる。また、ALK-IHC 精度管理プログラム(Q12 参照)に参加し、その妥当性を確認するのもよい方法でしょう。

一方、アレクチニブ（アレセンサ）適応患者識別のための ALK-IHC としては、ニチレイ ヒストファイン ALK iAEP キットがコンパニオン診断薬の承認を得ており、染色結果の判定においては iScore [50]に基づいた判定基準が用いられています（表 5 および図 7）。判定における注意点やスコアごとの適応判定については添付文書を参照してください。

表 6 ニチレイ ヒストファイン ALK iAEP キットにおける ALK 融合タンパクのスコアリングおよび判定方法（添付文書より転載）

スコア	適合条件	判定
3	陽性腫瘍細胞率＞80%	陽性
2	80%≥陽性腫瘍細胞率＞50%	境界域
1	50%≥陽性腫瘍細胞率＞0%	境界域
0	陽性腫瘍細胞なし	陰性



本キットを用いた染色の写真(×200)

- ①: スコア3 ②: スコア2
③: スコア1 ④: スコア0

図 7 ニチレイ ヒストファイン ALK iAEP キット染色例（添付文書より転載）

*: ニチレイ ヒストファイン ALK iAEP キットはアレクチニブ塩酸塩適応患者識別のためのコンパニオン診断薬であり、当該目的以外に使用する場合は保険償還されません。

検体の種類による留意点

特に生検組織や細胞診検体から作製されたセルブロックを用いた検査の場合は、検体標本中に評価すべき腫瘍細胞が含まれているか否かを確認した上で評価を行います。また、通常の免疫染色と同様に固定条件による染色の不均一性や微量検体処理に起因するアーチファクトにも留意してください。

染色性評価における留意点

通常の免疫染色より高感度な検出系が用いられることもあり、組織中の粘液や肺泡マクロファージの細胞質等への着色（バックグラウンド染色）が認められる場合があります。また、使用する一次抗体や染色キット特有の非特異反応の有無についても、添付文書等の記載を確認した上で評価を行ってください。

さらに、高感度な ALK-IHC では全長 ALK タンパクも検出されることを知っておく必要があります。正常の神経系細胞は全長 ALK タンパクを発現しているため ALK-IHC にて陽性となります。また、肺癌で神経内分泌系への分化を示す腫瘍などにおいて、全長 ALK タンパクの生理的発現により陽性反応が認められる場合があります。その多くは不均一な陽性所見を呈するとされ、このような症例は FISH 等で ALK 融合遺伝子の有無を確認することが望めます。⁵¹⁾また、印環細胞など粘液を多く含有する細胞では、粘液空胞により細胞質の陽性所見が確認しづらい場合があるため、染色性評価には留意が必要です（図 8）。⁵²⁻⁵⁴⁾

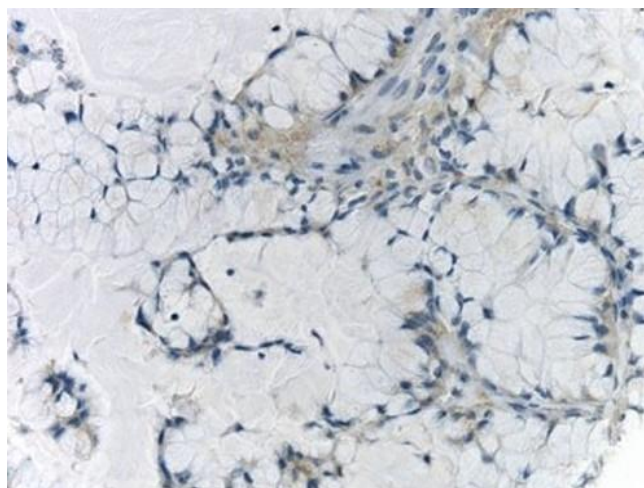


図 8 粘液産生細胞における ALK 染色例（陰性的に見える）

細胞質が粘液成分で圧排され、ALK 陽性所見がほとんど確認できない。この症例は FISH で ALK 再構成が確認された。

Q12: ALK-IHC の精度管理はどのようにしたらいいのでしょうか？

回答：

Q7, Q11 で回答された ALK 染色の推奨方法に従うことと共に，IHC の基本とも言えるコントロールを立てることが望ましい。

解説：

ALK-IHC は神経細胞を除く殆どの正常組織には陰性ですので，生検材料や手術材料に含まれる正常肺組織は必然的に陰性コントロールとなります。

陽性コントロールに関しては，ALK 肺癌の組織片が入手可能であればそれを用いれば良いのですが，出来れば偽陰性の可能性がある印環細胞が主成分でない症例をいれることで，弱い染色態度についても確認ができます。入手困難の場合は，正常組織での発現をみることで代用が可能です。ALK を正常で発現する正常組織は主として神経組織で，中枢神経組織や腸管神経節などを用いることができます。ただし，中枢神経組織は ALK1 抗体を用いた一般的な免疫組織化学染色法で陽性（図 9）となるので，肺癌用の ALK 染色方法(リンカー法)を用いると過度な陽性像を示す場合があります(図 10)。腸管神経節細胞ではそのような過度な陽性像はない代わりに，小さな組織片では神経節が含まれない可能性があります(図 11)。また，ニチレイ社のヒストファイン ALK コントロールスライド（図 12）の他，CST 社などからコントロールスライドが発売されています。

また，ALKIHC ワーキンググループでは，外部精度管理を行っており，そのプログラムに積極的に参加することで，染色技術、評価の客観的評価が得られるようになり，より良い ALK 染色の実施に有用です。興味があれば，以下に連絡してみてください。

ALK-IHC 精度管理ワーキンググループ

東日本事務局

坂下信悟（さかしんご）

筑波大学医学医療系診断病理学

〒305-8575 茨城県つくば市天王台 1-1-1

TEL 029-853-3865(病理部)

sakashingo@hotmail.com

西日本事務局

酒井 康裕（さかやすひろ）

神戸大学医学部附属病院病理診断科

〒650-0017 兵庫県神戸市中央区楠町 7-5-2

TEL 078-382-6473(直通)

sakai@med.kobe-u.ac.jp

図 9 ALK1 抗体を用いた中枢神経組織染色像

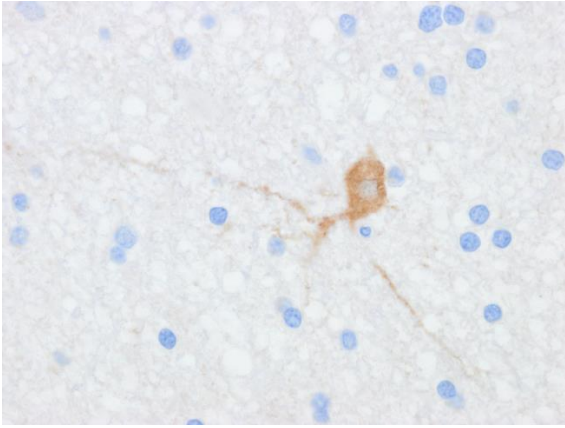


図 11 小腸粘膜における神経節 ALK 染像

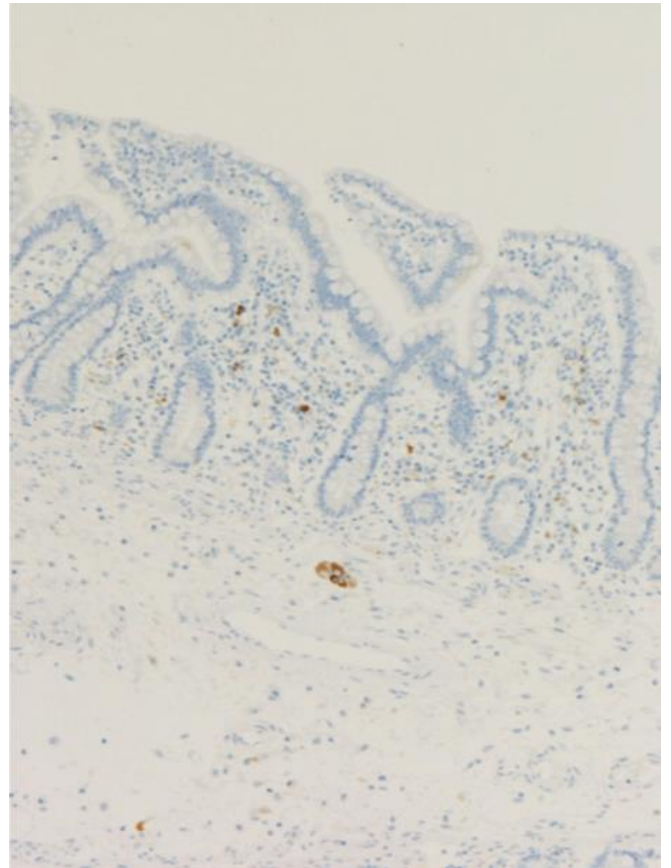


図 10 肺癌用の ALK 染色法を用いた中枢神経系組織での染色像。時として過度な染色像を示すこともある。

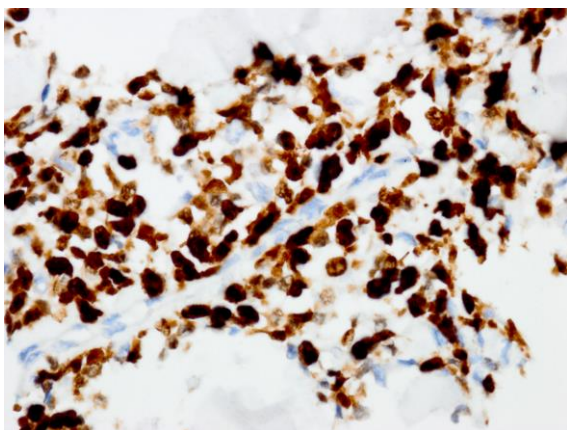
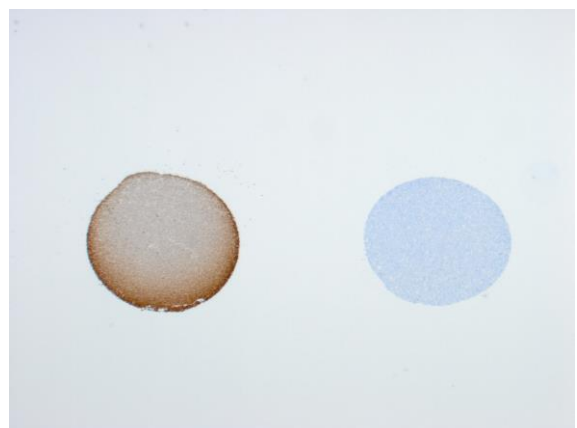


図 12 ニチレイ社のヒストファイン ALK コントロールスライド。左が陽性コントロール、右が陰性コントロール



Q13: ALK-IHC の保険点数はどのように考えればいいのか教えて下さい。

回答:

ALK 融合遺伝子陽性の切除不能な進行・再発非小細胞肺癌に保険適用されます。

ニチレイ ヒストファイン ALK iAEP キットを用いた場合は、アレクチニブ（アレセンサ）の非小細胞肺癌患への適応を判定するための補助に用いた場合に限り、診療報酬 2,700 点が請求できます。よって、現時点ではアレクチニブ（アレセンサ）以外の ALK 阻害剤（クリゾチニブ（ザーコリ）など）に投与するため上記キットを用いた場合は、通常の免疫染色病理組織標本作製として取り扱われるため、診療報酬 400 点しか請求できません。また、それ以外の場合は全て通常の免疫染色病理組織標本作製として取り扱われるため、診療報酬 400 点しか請求できません。

解説：

非小細胞肺癌に対して、アレクチニブ（アレセンサ）の投与の適応を判断することを目的として、リンカー試薬を用いた IHC 法（ニチレイ ヒストファイン ALK iAEP キット）により病理標本作製を行った場合に、当該薬剤の投与方針の決定までの間に、1 回を限度として、保険適用に算定（2,700 点）されます。また、それ以外の方法で IHC を行った場合は、一臓器に 1 回のみ算定（N002 免疫染色病理標本作製、400 点）することができます。また、肺悪性腫瘍に対しては、4 種類以上の抗体を用いて腺癌、扁平上皮癌の鑑別に用いることで 1600 点の加算が認められています（N002 注 2）。鑑別のための染色に加えて ALK—IHC を加えることも可能ですが、この加算は EGFR 遺伝子検査や ALK FISH 検査を算定している場合には算定できないことになっています。

IHC で保険適用されるのは原則として病理組織標本です。セルブロックに関しては細胞診の項目に記載されています。この場合悪性中皮腫を疑う患者に対して、穿刺吸引などにより採取した検体を用いてセルブロック法により標本作製した場合に 860 点が算定されます。セルブロックが細胞診とみなされた場合は通常、IHC での保険は適応されません。しかし、現在の IHC は加算ではなく個別請求が可能になっています。セルブロック法で 860 点、IHC400 点、免疫染色の判定による組織診断料 450 点が算定可能な場合もあります。このようにセルブロックの IHC が保険適応されるか否かは、各都道府県で異なる場合もあるため、各都道府県の厚生局医療課や監査課あるいは事務所などに確認して下さい。

特異的阻害剤であるアレクチニブ（アレセンサ）を使用する場合は、ニチレイ ヒストファイン ALK iAEP キットを用いた IHC 法が、原則的にはコンパニオン診断薬と位置づけられています。一方、クリゾチニブ（ザーコリ）の場合は、コンパニオン診断薬は、アボット社の Vysis ALK Break Apart FISH プローブキットを用いた FISH 法のみであったため、推奨される IHC は特になのが現状です。しかし、2015 年 6 月に米国では、ロシュ社 VENTANA ALK (D5F3) CDx Assay が FDA より承認されました。日本での保険収載に関して現時点

（2016 年 3 月）では明らかになっていませんが、日本肺癌学会は厚生労働大臣に対し早期の製造販売承認の要望書を提出しています。

肺癌を ALK の免疫染色でスクリーニングし陽性であった場合は、FISH あるいは RT-PCR 検査を施行し（通常は FISH を施行）、2 つ以上の検査が陽性であることの確認が望ましいとされています。ただし、アボット社の Vysis ALK Break Apart FISH プローブキットを用いた FISH 法は保険適用（6,520 点）されていますが、RT-PCR については保険適応されていません。

最後に実例をあげます。

1. 初回治療を決定する際に気管支鏡検査などで採取される微小な生検組織で腺癌と診断できた場合、EGFR 遺伝子検査と ALK-IHC でのスクリーニングが推奨されているので、施行すれば両者の保険点数が算定可能です（EGFR 遺伝子検査の保険点数は用いる方法により異なり、2100 点もしくは 2500 点）。ニチレイ iAEP キットでは ALK 融合タンパク 2,700 点、それ以外の ALK-IHC では免疫染色加算 400 点となります。いずれも IHC 陽性であれば FISH（6,520 点）で確認する必要があります。
2. 同様の症例で腺癌と扁平上皮癌の鑑別が困難な場合には、IHC による鑑別が推奨されているので、2 種類の抗体（例：TTF-1, p40）を用いた場合免疫染色加算（400 点）が算定できます。その後、腺癌とわかった際には、上記と同様に EGFR 検査と ALK-IHC でのスクリーニングが推奨されていますので、施行した場合は上記 #1 と同様の算定方法となります。ただし、ニチレイ iAEP キット以外の ALK-IHC を施行した場合はすでに免疫染色加算を算定していますので、重複して請求することはできません。
3. 同様に腺癌と扁平上皮癌の鑑別が困難な場合に 4 種類の抗体（例：TTF-1, Napsin A, p40, CK5/6）を使用した場合は、400 点+加算 1,600 点（計 2,000 点）の算定が可能です（N002 注 2）。この加算は EGFR 遺伝子検査や ALK FISH を算定している場合には算定できませんので注意が必要です。その後の EGFR 遺伝子検査および ALK-IHC については上記 #2 と同様です。
4. 再発腫瘍の場合、すでに腺癌と扁平上皮癌の鑑別は済んでいますし、多くの場合 EGFR 検査も施行されています。その場合に施行されていない ALK 検査では以下の選択が可能性です。
 - a. アレクチニブ（アレセンサ）の使用を前提にした場合には、IHC と FISH での陽性所見が投与には必要となりますので、ニチレイ ヒストファイン ALK iAEP キットを用いるとともに FISH を施行します。両者を行えば 2,700+6,520 点の加算請求が可能です。IHC を先行し、陽性であった症例のみに FISH を施行するアルゴリズムを肺癌学会は提唱しています。
 - b. アレクチニブ（アレセンサ）以外の使用を前提にした場合には、ニチレイ ヒストファイン ALK iAEP キットでの請求はできないので、通常の免疫染色としての ALK-IHC（400 点）を施行し、陽性であれば FISH を施行することになります。免疫染色を施行せず、FISH のみを施行することも可能ですが、ガイドンスでは IHC スクリーニングを推奨し、陽性であった場合に FISH の施行を勧めています。

参考文献 60

参考文献

1. Inamura K, et al. EML4-ALK fusion is linked to histological characteristics in a subset of lung cancers. *J Thorac Oncol*. 2008; 3: 13-17.
2. Boland JM, et al. Anaplastic lymphoma kinase immunoreactivity correlates with ALK gene rearrangement and transcriptional up-regulation in non-small cell lung carcinomas. *Hum Pathol*. 2009; 40: 1152-1158.
3. Kwak EL, et al. Anaplastic lymphoma kinase inhibition in non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med*. 2010; 363 :1693-1703.
4. Wang J, et al. Detection of ALK protein expression in lung squamous cell carcinomas by immunohistochemistry. *J. Exp. Clin. Cancer Res*. 2014; 33: 109.
5. Calio A, et al. ALK/EML4 fusion gene may be found in pure squamous carcinoma of the lung. *J. Thorac. Oncol*. 2014; 9: 729-732.
6. Vergne F, et al. ALK-rearranged squamous cell lung carcinoma responding to crizotinib: A missing link in the field of non-small cell lung cancer? *Lung Cancer*. 2016; 91: 67-69.
7. 日本肺癌学会 肺癌患者における EGFR 遺伝子変異検査の手引き 第 2.1 版
<https://www.haigan.gr.jp/uploads/photos/810.pdf>
8. 日本肺癌学会、肺癌患者における ALK 融合遺伝子検査の手引き 第 2.1 版 2014
<https://www.haigan.gr.jp/uploads/photos/810.pdf>
9. NCCN ガイドライン 日本語版 非小細胞肺癌 <http://www.tri-kobe.org/nccn/guideline/lung/index.html>
10. Soda M, et al. Identification of the transforming EML4-ALK fusion gene in nonsmall cell lung cancer. *Nature* 2007; 448: 561-566.
11. Shaw AT, et al. Clinical features and outcome of patients with non—small cell lung cancer who harbor EML4-ALK. *J Clin Oncol* 2009; 27: 4247-4253.
12. Horn L, et al. EML4-ALK: honing in on a new target in non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 2009;27:4232-4235
13. Gainor JF, et al. ALK rearrangements are mutually exclusive with mutations in EGFR or KRAS:an Analysis of 1683 patients with non-small cell-lung cancer. *Clin Cancer Res* 2013;19:4273-4281.
14. Ulivi P, et al, Nonsquamous, Non-Small-Cell Lung Cancer Patients Who Carry a Double Mutation of EGFR, EML4-ALK or KRAS: Frequency, Clinical-Pathological Characteristics, and Response to Therapy. *Clin Lung Cancer*. 2015 Dec 1. [Epub ahead of print]
15. Yang JJ, et al. Lung cancers with concomitant EGFR mutations and ALK rearrangements: diverse responses to EGFR-TKI and crizotinib in relation to diverse receptors phosphorylation. *Clin Cancer Res*. 2014; 20:1383-1392.
16. Chen X, et al. A case of lung adenocarcinoma harboring exon 19 EGFR deletion and EML4-ALK fusion gene, *Lung Cancer*, 2013; 81: 308-310
17. Pan Y, et al. ALK, ROS1 and RET fusions in 1139 lung adenocarcinomas: a comprehensive study of common and fusion pattern-specific clinicopathologic, histologic and cytologic features. *Lung Cancer* 2014;84:121-126.
18. Wang WY, et al. Immunohistochemical screening and fluorescence in situ hybridization confirmation of ALK translocation in lung adenocarcinoma and its clinicopathological significance: a single-center large-scale investigation of Chinese patients. *Hum Pathol* 2014;45: 1414-1422.
19. Calio A, et al. ALK/EML4 fusion gene may be found in pure squamous carcinoma of the lung. *J Thorac Oncol* 2014;9:729-732.
20. Abe H, et al. Heterogeneity of anaplastic lymphoma kinase gene rearrangement in non-small-cell lung

- carcinomas: a comparative study between small biopsy and excision samples. *J Thorac Oncol* 2015;10 :800-805.
21. Yoshida A, et al. Comprehensive histologic analysis of ALK-rearranged lung carcinomas. *Am J Surg Pathol* 2011;35:1226-1234.
 22. Natasha BL et al. Molecular Testing for Selection of Patients With Lung Cancer for Epidermal Growth Factor Receptor and Anaplastic Lymphoma Kinase Tyrosine Kinase Inhibitors: American Society of Clinical Oncology Endorsement of the College of American Pathologists/International Association for the Study of Lung Cancer/Association for Molecular Pathology Guideline *J Clin Oncol* 2014;32:3673-3679.
 23. Ilie MI. et al. Discrepancies between FISH and immunohistochemistry for assessment of the ALK status are associated with ALK 'borderline'-positive rearrangements or a high copy number: a potential major issue for anti-ALK therapeutic strategies. *Ann Oncol* 2015; 26:238-244.
 24. Gao X, Sholl LM, Nishino M, Heng JC, Janne PA, Oxnard GR. Clinical Implications of Variant ALK FISH Rearrangement Patterns. *J Thorac Oncol* 2015; 10: 1648-1652.
 25. Shan L, Jiang P, Xu F, Zhang W, Guo L, Wu J, et al. BIRC6-ALK, a Novel Fusion Gene in ALK Break-Apart FISH-Negative Lung Adenocarcinoma, Responds to Crizotinib. *J Thorac Oncol* 2015; 10: e37-39.
 26. IASLC, IASLC Atlas of ALK testing in lung cancer IASLC Press 2013
 27. Koss LG et al. Koss' Diagnostic Cytology and Its Histopathologic Bases, 5th ed. Lippincott Williams & Wilkins 2005
 28. ALK ATLAS. 第 2 版. Nichirei Biosciences INC. Tokyo, pp. 1-26, 2014.
 29. 竹内賢吾. 腫瘍のコンパニオン診断. ALK. 病理と臨床 臨時増刊号 32: 379-383, 2014
 30. Takamochi K, et al. A rational diagnostic algorithm for the identification of ALK rearrangement in lung cancer: A comprehensive study of surgically treated Japanese patients. *PLOS ONE* 2013; 8:1-9
 31. Tekeuchi K, Interpretation of anti-ALK immunohistochemistry results. *J Thorac Oncol* 2013; 8: e67-e68
 32. Takeuchi K, et al. KIF5B-ALK, a novel fusion oncokine identified by an immunohistochemistry-based diagnostic system for ALK-positive lung cancer. *Clin Cancer Res* 2009; 15: 3143-3149
 33. Zito Marino F, et al. Intratumor Heterogeneity of ALK-Rearrangements and Homogeneity of EGFR-Mutations in Mixed Lung Adenocarcinoma. *PLoS One*. 2015 ;10 :e0139264.
 34. Vignot S, et al. Next-Generation Sequencing Reveals High Concordance of Recurrent Somatic Alterations Between Primary Tumor and Metastasis From Patients With Non-small Cell Lung Cancer. *J. Clin Oncol*. 2013; 31:2167-2172
 35. Vakiani E, et al. Comparative genomic analysis of primary versus metastatic colorectal carcinomas. *J Clin Oncol*. 2012; 30:2956-2962
 36. Kim H, et al. Overview of clinicopathologic features of ALK-rearranged lung adenocarcinoma and current diagnostic testing for ALK rearrangement. *Transl Lung Cancer Res*. 2015; 4:149-155.
 37. Robert C, et al. Mechanisms of Resistance to Crizotinib in Patients with ALK Gene Rearranged Non-Small Cell Lung Cancer. *Clin Cancer Res*. 2012 ; 18: 1472-1482
 38. Travis WD, et al. WHO Classification of Tumours of Lung, Pleura, Thymus & Heart, 4th ed. World Health Organization 2015 WHO classification
 39. Wolff AC, 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. *Arch Pathol Lab Med*. 2014;13: 241-256
 40. Lindeman NI, et al. Molecular testing guideline for selection of lung cancer patients for EGFR and ALK tyrosine kinase inhibitors: guideline from the College of American Pathologists, International Association for the Study of Lung Cancer, and Association for Molecular Pathology. *J Thorac Oncol*.

41. 大林 千穂, 他. 肺癌における遺伝子変異検査のガイドライン. 病理と臨床 2016; 34: 249-255.
42. Takeuchi K, et al. Prospective and clinical validation of ALK immunohistochemistry: results from the phase I/II study of alectinib for ALK-positive lung cancer (AF-001JP study). Ann Oncol. 2016; 27: 185-92.
43. Nitta H, et al. New methods for ALK status diagnosis in non-small-cell lung cancer: an improved ALK immunohistochemical assay and a new, Brightfield, dual ALK-IHC-in situ hybridization assay. J Thorac Oncol. 2013; 8 :1019-31.
44. 日本肺癌学会・日本病理学会合同 ALK-IHC 精度管理ワーキンググループ. EQA プログラム報告書. 準備中
45. Murakami Y, et al. A Screening Method for the ALK Fusion Gene in NSCLC. Front Oncol. 2012; 2: 24.
46. Conklin CM, et al. Immunohistochemistry is a reliable screening tool for identification of ALK rearrangement in non-small-cell lung carcinoma and is antibody dependent. J Thorac Oncol. 2013; 8:45-51.
47. Lung Anaplastic Lymphoma Kinase (lu-ALK) Assessment Run45 2015. Recommended lu-ALK protocols (Dako/mAb 5A4). http://www.nordiqc.org/Run-45-B20-H8/Protocols/ALK_5A4_D_GeneralModulerun45.pdf
48. Lung Anaplastic Lymphoma Kinase (lu-ALK) Assessment Run45 2015. Recommended lu-ALK protocols (Dako/mAb D5F3). http://www.nordiqc.org/Run-45-B20-H8/Protocols/ALK_D5F3_D_GeneralModulerun4
49. 日本肺癌学会バイオマーカー委員会. ALK 遺伝子検査における FISH 法と高感度 IHC 法による検査結果の不一致についてのお知らせと対応. 2012 <http://www.haigan.gr.jp/uploads/photos/519.pdf>
50. 竹内賢吾. ALK. 臨床検査. 57:271-6, 2013
51. Takeuchi K, Interpretation of anti-ALK immunohistochemistry results [letter]. J Thorac Oncol. 2013;8:e67-e68.
52. Rodig S, et al. Unique clinicopathologic features characterize ALK-rearranged lung adenocarcinoma in the western population. Clin Cancer Res. 2009; 15: 5216-5223.
53. Yoshida A, et al. Frequent ALK rearrangement and TTF-1/p63 co-expression in lung adenocarcinoma with signet-ring cell component. Lung Cancer. 2011;72:309-315.
54. Popat S, et al. ALK translocation is associated with ALK immunoreactivity and extensive signet-ring morphology in primary lung adenocarcinoma. Lung Cancer. 2012;75:300-305.
55. 竹内賢吾. ALK. 免疫組織化学 診断と治療選択の指針. 病理と臨床 臨時増刊号 2014;32:379-383.
56. ALK iAEP Kit ATLAS, NICHIREI BIOSCIENCES INC, 2014.
<http://www.nichirei.co.jp/bio/products/pdf2/42707.pdf>
57. Lung Anaplastic Lymphoma Kinase (lu-ALK) Assessment Run39 2013. Nordic immunohistochemical quality control. http://www.nordiqc.org/Run-39-B16-H4/Assessment/Run39_ALK.pdf
58. Ventana <http://www.uclad.com/newsletters/ALK-LUNG-IHC-INTERPRETATION-GUIDE.pdf>
59. VENTANA ALK (D5F3) CDx Assay Quick Reference Guide for Non-Small Cell Lung Carcinoma (NSCLC). http://productlibrary.ventanamed.com/ventana_portal/OpenOverlayServlet?launchIndex=1&objectId=790-4796101291100US
60. 厚生労働省 平成 28 年度診療報酬改定について
<http://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/0000106421.html>

担当者一覧

編集（敬称略）

大林千穂 奈良県立医科大学病理診断学講座
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
南優子 国立病院機構茨城東病院胸部疾患・療育医療センター病理診断科
畑中豊 北海道大学病院コンパニオン診断研究部門
元井紀子 国立がん研究センター中央病院病理・臨床検査科

執筆者(敬称略)（五十音順）

石井源一郎 国立がん研究センター 先端医療開発センター臨床腫瘍病理分野
石川雄一 公益財団法人がん研究会がん研究所病理部
岡本賢三 北海道中央労災病院病理診断科
河原邦光 大阪府立呼吸器・アレルギー医療センター病理診断科
酒井康裕 神戸大学医学部附属病院病理診断科
坂下信悟 筑波大学医学医療系 診断病理学
田口健一 国立病院機構九州がんセンター統括診療部臨床検査科/病理診断科
武島幸男 広島大学大学院医歯薬保健学研究院病理学研究室
薦幸治 関西医科大学病態検査学講座
中谷行雄 千葉大学大学院医学研究院診断病理学
鍋島一樹 福岡大学医学部病理学講座・病理部/病理診断科
仁木利郎 自治医科大学統合病理学
二宮浩範 公益財団法人がん研究会がん研究所病理部
野口雅之 筑波大学医学医療系 診断病理学
畑中豊 北海道大学病院コンパニオン診断研究部門
羽場礼次 香川大学医学部附属病院 病理診断科・病理部
林雄一郎 慶應義塾大学病院病理診断部
廣島健三 東京女子医科大学八千代医療センター病理診断科
福岡順也 長崎大学病院病理診断科・病理部
松野吉宏 北海道大学病院病理診断科
元井紀子 国立がん研究センター中央病院病理・臨床検査科
吉澤明彦 京都大学医学部附属病院 病理診断科・病理部

謝辞

本プラクティカルガイドをまとめるにあたり、佐々木治一郎先生：北里大学医学部臨床腫瘍学、集学的がん診療センター、佐藤之俊先生：北里大学医学部呼吸器外科、東山聖彦先生：地方独立行政法人大阪府立病院機構大阪府立成人病センター呼吸器外科、今岡由紀先生：長崎大学病院病理診断科・病理部に多大なるご指導、ご助言をいただきまして、心より御礼申し上げます。