生物醫學 2011年第4卷第3期：154-160

HER2免疫染色檢驗的品質管理

曾嶔元[1,2]

[1]國泰綜合醫院病理暨檢驗醫學部，台北，台灣

[2]輔仁大學醫學系，台北，台灣

摘要

由於乳癌和胃癌病人是否可接受標靶藥物Herceptin®（賀癌平®）治療，完全根據癌細胞是否過度表現第二型人類表皮生長因子受體（human epidermal growth factor receptor 2; HER2）而定，因此這類病人的治療關鍵點之一，就是確保獲得可信賴的HER2檢驗結果以及正確的判讀。而這就端視HER2免疫染色檢驗的品質管理，包括驗證（validation）、品質管制（quality control）、品質評量（quality assessment）和品質保證（quality assurance）。HER2免疫組織化學染色法（immunohistochemistry; IHC）規程（protocol）的驗證包括組織固定、操作及其條件、試劑及抗體濃度、還有人員的能力。整個檢驗過程都必須根據嚴格的規範（如國家級或國際的指引）。此外還需持續地監控及維護此檢驗系統。這整個過程都涉及品管及品保的了解及遵守。（生醫2011;4(3):154-160）

關鍵字：免疫組織化學染色法（immunohistochemistry; IHC）、規程（protocol）、驗證（validation）、品質管制（quality control）、品質評量（quality assessment）、品質保證（quality assurance）

前言

對於乳癌或胃癌有第二型人類表皮生長因子受體（human epidermal growth factor receptor 2; HER2）過度表現的病人，以Herceptin®（賀癌平®）作標靶治療可得到明顯的療效。因此，HER2檢驗在乳癌及胃癌的治療上扮演重要的角色。由於檢驗的結果決定了後續的治療方向，因此不容發生錯誤。從這個角度來看，本篇要討論的就是HER2檢驗的品質管理。

驗證

雖然大多數的病理實驗室都有操作免疫組織化學染色法（immunohistochemistry; IHC）的經驗，可是絕大多數這些IHC使用的都是第一等級的體外診斷醫療器材（in vitro diagnostic device; IVD）。然而，HER2免疫組織化學染色所使用的是對病人的治療有決定性影響之第三等級的IVD。因此任何實驗室在開發HER2檢驗時，都必須先經過驗證（validation）才

通訊作者：曾嶔元 醫師
電話：886-2-2690-7965 ext 2519
傳真：886-2-2691-9800
地址：106 台北市仁愛路四段280號 病理暨檢驗醫學部
電子郵件：jeffbucknell@gmail.com

2011年8月10日來稿；2011年8月13日修改；2011年8月17日同意刊登

生物醫學 BIOMEDICINE JOURNAL

可使用於病人。在驗證過程中，每一步驟都要記錄並簽名。

參考標準品（reference standard）是建立及驗證IHC方法必需使用到的品項。標準品最好是用臨床檢體製作，然而不管組織有多大，能製成的數量總是有限。因此，用癌細胞株來備製標準品不失為解決的辦法，而且實際上也確實如此[1]。此標準品最好由中央實驗室提供，或購自於廠商。在這種情況下，實驗室必須向提供者索取組織製作的資訊，例如檢體固定條件和IHC流程。如果資料顯示標準品的製作過程與實驗室處理臨床檢體的方式非常不同，那麼這個標準品就不適用於這個實驗室。當然參考標準品也可由實驗室自行備製。若是如此，那麼無論是用細胞株或組織備製的標準品，都需先以原位雜交法（*in situ* hybridization; ISH）判定所製作的標準品是0、1+、2+還是3+。判讀ISH時要先回顧H&E或IHC玻片，以確定侵襲癌的位置，不要評估原位癌。計算時要在兩個區域，至少算20個細胞。雙重訊號（duplex signals）應視為一個。如果ISH的片子出現太強的自體螢光（autofluorescence）、細胞核解析度不良或對照之玻片不如預期，那麼ISH就無法用來提供答案了。在這種情況下，只好諮詢外部專家或由外部實驗室提供參考標準品了。

驗證時要評估的性能參數（performance parameter）包括靈敏度（sensitivity）、特異性（specificity）、精確度（precision）、準確度（precision）、再現性（analytic specificity）。IHC的靈敏度是指偵測出微量抗原的能力，因此所使用的陽性對照組需含有弱染色樣本；所以理想的陽性標準品應呈現不均勻的染色，其中有多處為弱陽性染色。特異性是指對特定的組織或細胞而言，出現預期的陰性染色。準確度是指評估非特異之背景的染色。精確度是指出現預期的陽性與陰性染色結果，這是對整個流程的評估。再現性則是指每次染色都不會出現不同的結果。

雖然驗證涉及檢驗的每一個步驟，但是重點要放在抗體的稀釋倍數、反應的時間、補強技術（如加熱）以及判讀。若流程中使用到自動化儀器，還需加上操作設定的驗證。驗證時每一次測試都必須使用「多組織的對照蠟塊（multitissue control blocks）」，裡面包含陽性及陰性的組織。對於乳癌的樣本，病理醫師要評估侵襲癌的部份而非原位癌的地方。陽性染色是指完全的胞膜染色（complete membrane staining），亦即均勻且深的染色出現在整個細胞膜上。胃癌的HER2 IHC則可以是完全的、底部及側邊的（basolateral）、或側邊的胞膜染色。必須要有陽性及陰性對照組作比對才能下判斷。評分時只針對癌細胞計分，要評估染色的強度及陽性的百分比。判讀標準及計分系統必須標準化，這可根據全國的或國際的指引來建立（如表一、二、三）。所有HER2評分為2+的乳癌或胃癌都需要作ISH。

如果實驗室沒有太多IHC的經驗，則應至少測試100個樣本。為解決此大量的檢體數目，實驗室可採用組織微陣列（tissue microarray）。不管是陽性或是

表一、乳癌的HER2免疫組織化學染色之計分與判讀

陽性癌細胞	IHC	判讀
<10%	0	陰性
>10%，但染色強度為弱	1+	陰性
>10%，但染色強度為弱到中等程度	2+	未定
>10%，且染色強度為強	3+	陽性

生物醫學 BIOMEDICINE JOURNAL

陰性樣本，檢驗正確率要達到95%才可驗收。為了達到合理的驗證，最好使用陽性和陰性樣本各半。

品質管制

專家們一致認為，當實驗室使用標準化及有驗證的操作規程時，HER2的檢驗具有高度的特異性及再現性。然而，經驗告訴我們，不論是什麼樣的檢驗，在分析前（pre-analytic）、分析中（analytic）及分析後（post-analytic）各個階段，都可能出現變數而使得檢驗結果不正確[2,3]。HER2檢驗當然也不例外，因此實驗室必須要從每一個階段作好檢驗的品質管理。為了追溯錯誤的來源以提出矯正措施，實驗室應有足夠的文件管制，包括紀錄所有異常事件及困難評估的切片。如此方可確保HER2陽性的病人能被正確地辨識出來。

表二、胃癌大件標本的HER2免疫組織化學染色之計分與判讀

陽性癌細胞	IHC	判讀
<10%	0	陰性
≥10%，但染色強度為弱	1+	陰性
≥10%，但染色強度為弱到中等程度	2+	未定
≥10%，且染色強度為強	3+	陽性

表三、胃癌切片標本的HER2免疫組織化學染色之計分與判讀

陽性癌細胞	IHC	判讀
全無	0	陰性
聚集成簇，但染色強度為弱	1+	陰性
聚集成簇，但染色強度為弱到中等程度	2+	未定
聚集成簇，且染色強度為強	3+	陽性

「品質管制（quality control）」，簡稱品管（QC），是品質管理中最基本的部份。根據美國病理學會（the College of American Pathologists; CAP）的定義，QC是指「結合流程及技術以用來偵測、減少、及矯正分析過程中的缺陷」[4]。由此可見，QC強調及定義檢驗的過程面。每一步驟都必須分別描述、建立、監督，才足以讓每次的操作達到一致，因而結果有再現性。就實務面而言，QC著重IHC檢驗中的每一步驟。每天都必須記錄QC的結果。若結果無法接受，則要執行矯正措施並紀錄之。以下我們就從組織的取得、固定（fixation）、處理、切片、染色、判讀到報告的發行來討論HER2檢驗的QC。

HER2檢驗最佳的樣本是外科切除的檢體，因為手術切下的檢體除了可提供足夠的形態學以及腫瘤異質性（heterogeneity）的檢查外，也可在同一切片上提供陰性對照。至於小的檢體如乳房的粗針切片（core needle biopsy）也可以作HER2檢驗。但胃的切片樣本，最好要有6-8個來自腫瘤不同部位的切片才足夠。雖然細胞蠟塊（cell block）可用於ISH檢驗，但並不能用於IHC，因為細胞學樣本的處理過程會破壞細胞結構的完整性。

固定是分析前階段中一個重要的步驟，然而卻常因流程不正確而導致錯誤的檢驗結果。固定的過程能阻止細胞的自溶現象（autolysis），尤其是手術切除的大標本。固定除了能防止組織崩解而讓標本保有細胞的形態及組織的結構之外，還能強化檢體組織以承受病理處理（包括染色）過程中的破壞，更重要的是保護抗原點不受蛋白酶分解。因此良好的固定過程是正確的IHC染色不可或缺的步驟。檢體在手術切下後半小時內要放入固定液，並且在固定前要有適當的處

生物醫學 BIOMEDICINE JOURNAL

理，像是胃切除之類的大標本應先剪開，清除內容物後再浸入固定液。固定液的使用量約為檢體體積之10倍左右才足夠。固定液宜用10%中性福馬林緩衝液（neutral buffer formalin; NBF），此固定液在乳房組織的穿透力為每小時1-2 mm，在胃組織為每小時2-3 mm。乳房標本固定時間為6-48小時，胃切除標本的固定時間為8-48小時。如果是粗針切片的檢體則時間可縮短，但起碼也要固定1小時（時間更長些如2-4小時則更好）。固定時間不夠會使ISH標本出現片狀（patchy）染色，時間太長則使其出現自體螢光。

IHC使用的組織厚度為3-5 μm（微米），玻片要使用塗藥玻片（coated slide）。雖然檢體製作成蠟塊後，即可在室溫（20-25℃）中幾乎無限期地儲存，但玻片應等到操作IHC前才製作。如果要事先切好空白片，最好也不要存留超過2個星期以上。事先切好的空白片不要保留太久是所有IHC的原則，因為染色強度會減低[5,6]。雖然保存過久的空白片常可用抗原修復（antigen retrieval）挽救，但由於任何變更過的規程都應重新驗證，這比重新切空白片麻煩多了。

由於病理組織在製作過程中經過10%NBF和酒精的固定，所以抗原位點可能會被扭曲。尤其是10%NBF，因為可產生交叉聯結（cross-linking），所以更有可能遮蔽了抗體辨識位置。抗原修復即是以加熱的方法打開被遮蔽的抗原位點。HER2免疫組織化學檢驗所需的抗原修復需因地制宜，因為各地方之溫度和濕度都不一樣。抗原修復是蠻詭異的技術，過度地操作此技術可得到偽陽性結果。從品管的角度來看，能不必做抗原修復就最好不要做。但是不做抗原修復會出現偽陰性結果時，還是非做不可。由於適當的抗原修復是蠻費精神的，所以操作者要有耐心。

使用正確濃度的抗體是避免IHC錯誤的重要步驟。每一批新購的試劑（酵素、抗體、偵測系統）都必須品質一致。為了確保新的批號的試劑不會影響到染色的型態，新試劑都必須以對照標準品來驗證後才可使用。因此，實驗室必須製作足夠數量的對照品，以應付驗證所需。使用後的對照品要保存其紀錄，可用保存實體玻片或其照片的方式進行。為了後續的改善，在使用抗體的過程中要紀錄其濃度及使用日期，如此則可追查錯誤是否發生於此步驟。

例行QC所使用的對照品（蠟塊包埋的組織），必須由實驗室以例行檢體製作的過程製作。購買的標準品或組織微陣列不太可能用來當作QC的對照品，因為它們無法反映該實驗室所使用之組織固定方法與其他的處理過程。雖然組織微陣列是很好的IHC研發材料，但並非QC必需用的對照品。

HER2免疫染色的判讀

當染色不均勻時，要評估最有代表性的區域。亦即當癌細胞出現不同程度或型態的染色時，只評估最高分的部份。如果細胞形態不清楚或染色欠佳，例如細胞質的染色太強而使細胞膜的染色無法評估，就不要勉強判讀。只有當正常組織（例如正常的上皮細胞）為陰性，而陽性染色出現在癌細胞之細胞膜上的時候才評估IHC。如果切片上出現嚴重的假象（artefact）（例如標本的邊緣或標本被壓扁），則不要評估此處，這地方很容易被誤認為陽性。總之，如果對照品未達允收條件，則不要對個案之IHC做判讀，應要求重新做檢驗。出現模稜兩可（equivocal）的結果時也應重做檢驗。若仍有問題，則可用ISH來釐清。完成判讀後宜儘量使用格式化的報告，以避免重要的資訊被忽略掉。

生物醫學 BIOMEDICINE JOURNAL

品質評量與品質保證

即便實驗室認真地執行QC，我們要如何得知檢驗的正確性不會被分析前、分析中或分析後各個階段的因素所影響呢？實驗室要證明已達到並可維持所期待的品質水準，就需要仰賴「品質評量（quality assessment）」了。「外部品質評量（external quality assessment）」就是外部監控，亦即和其他實驗室作比對。這可用來確定實驗室內部的程序與外面其他實驗室的標準程序一致[7]。品質評量是長期的工作，可用來判斷實驗室的整體表現，例如陽性率、陰性率、再檢率，這些數據和別的實驗室比起來是否過高。在評估病理醫師間的差異性時（亦即同儕比較），可用事先經IHC染色好的組織微陣列寄給參加受評的醫師。每位醫師將其評定之結果（染色強度及區域之計分）寄回評鑑單位作比較。經驗告訴我們，只要遵守指引，即便在不同的病理醫師之間，都可得到一致的結果。由於胃癌HER2檢驗的困難度稍高些，所以負責的病理醫師需要有特別的訓練[8]。

對於乳癌HER2檢驗的能力測試，CAP要求每次的測試都必須答對90%才及格。澳洲皇家病理學院（the Royal college of Pathology of Australasia；RCPA）也提供組織微陣列（含50例），每年舉辦兩次，包括乳癌及胃癌的HER2檢驗。英國國家外部品質評量（United Kingdom National External Quality Assessment Service; UK NEQAS）每季以細胞株製作的切片寄送到參加的實驗室。寄回的切片由4位專家評分，以中位數作為及格分數。此系統可辨識、矯正及提供建議給未達理想的操作者，NEQAS也提供這方面的訓練。丹麥的Nordic免疫組織化學品管（Nordic immunohistochemical Quality Control; NordiQC）提供經ISH證實的細胞株切片給參加的實驗室。參與外部品質評量的好處包括：

- 可藉此驗證實驗室的檢驗方法。
- 實驗室可證明其HER2檢驗的正確性。
- 若在技術上或判讀上碰到的困難，可獲得改善意見以建立矯正措施。

避免或減少錯誤最好的方法就是，從一開始每個步驟都是由優秀的工作人員根據已通過驗證的方法，在最佳的情況下，使用最好的技術做檢驗。毫無疑問地，檢驗品質在這種情況下可獲得充分的保證。詳細地說，品質保證（quality assurance）的工作包括：

（1）在人員方面：在職教育必須是持續性的，以確保技術及知識都能保持在最先進的狀態。

- 技術人員的持續訓練：實驗室的工作人員由於背景與經驗不盡相同，因此教育訓練極為重要。對於乳癌之HER2檢驗，RCPA認為實驗室每年至少要有150例的經驗。弔詭的是，實驗室的工作經常論資歷之深淺安排，例如許多實驗室常常把試劑的備製交付給資淺的醫檢師。如果資淺的醫檢師沒有足夠的訓練及指導，那麼後果就不難想像了。

- 技術人員的定期能力評估：人員的能力必須定期重新評估，通常為每年一次。在評估實驗室間的差異時，可用組織微陣列當樣本，要求各實驗室

生物醫學 BIOMEDICINE JOURNAL

以合法上市的檢驗套組作HER2檢驗，再比對各實驗室之計分。

- HER2檢驗結果必須由合格的醫師判讀：病理醫師也需要有持續的教育。對於乳癌之HER2檢驗，RCPA認為判讀的醫師每年要有50例的經驗，此外還需例行從事乳癌的病理診斷。

- 人員的溝通與合作：病理醫師應與外科醫師充分溝通以便乳癌和胃癌的檢體傳送能符合HER2檢驗的規程。病理醫師也應與醫檢師密切合作以確保HER2的檢驗規程能在實驗室中建立、驗證及嚴格地遵守。

（2）在實驗室方面：包括所有的硬體、試劑、流程與環境。

- 持續的儀器校正與維護：需要校對的儀器包括吸注器（pipette）、保溫箱（incubator）、水浴箱（waterbath）、溫度計及計時器。校正的目的是確保儀器的準確度及精確度，因此才不會干擾到檢驗的正確性及其再現性。

- 樣本與試劑的標示必須正確而且清楚。

- 要注意實驗室的環境條件是否良好，因為溫度及溼度的變化都有可能影響檢驗結果。

- 驗證任何修改過的檢驗方法，並依據此新的規程操作。通常在使用新抗體前，必須測試25-100個樣本，通過後才可放行使用。

- 監控陽性及陰性率並與文獻所記載的數據相比。每年應重驗5%的陽性及陰性案例。要持續的定期評估、分析缺點、以及建立矯正措施。

- 報告的充足性及結果的正確送達。RCPA認為檢驗報告必須在7個工作天發行才符合臨床所需。

結語

IHC為病理實驗室的常規操作。絕大多數的IHC是用於協助診斷，其本身並不直接影響病人的治療決策。所以此類之IHC所使用的為第一等級的IVD，品質管理也不受重視。但是，由於HER2檢驗結果對病人的治療有決定性影響，所以必須使用第三等級的IVD。在開始使用HER2免疫組織化學染色方法前，實驗室必須要先驗證自行建立的方法。一旦開始執行HER2檢驗後，就要嚴格遵循此驗證過的規程，若有任何改變都需要重新驗證。此外，實驗室還需接受品質評量以判斷HER2檢驗是否達到預期的目標。只有當檢驗結果是正確時，病人才能獲得最佳的治療。因此，實驗室必須要落實品質保證以確保病人得到良好品質的HER2檢驗。

引用文獻

1. Taylor CR. The total test approach to standardization of immunohistochemistry. Arch Arch Pathol Lab Med 2000;124:945-951.
2. 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.
3. Carlson RW, Moench SJ, Hammond ME, Perez EA, Burstein

生物醫學 BIOMEDICINE JOURNAL

HJ, Allred DC, Vogel CL, Goldstein LJ, Somlo G, Gradishar WJ, Hudis CA, Jahanzeb M, Stark A, Wolff AC, Press MF, Winer EP, Paik S, Ljung BM; NCCN HER2 Testing in Breast Cancer Task Force. HER2 testing in breast cancer: NCCN Task Force report and recommendations. J Natl Compr Canc Netw 2006;4 (Suppl 3):S1-22.

4. College of American Pathologists, Standards for laboratory accreditation, Commission on Laboratory Accreditation. Skokie, Illinois, 1987.
5. Grabau DA, Nielsen O, Hansen S, Nielsen MM, Lænkholm A-V, Knoop A, Pfeiffer P. Influence of storage temperature and high-temperature antigen retrieval buffers on results of immunohistochemical staining in sec-tion stored for long periods. Applied Immunohistochemistry 1998;6:209-213.
6. Jacobs TW, Prioleau JE, Stillman IE, Schnitt SJ. Loss of tumor marker-immunostaining intensity on stored paraffin slides of breast cancer. J Natl Cancer Inst 1996;88:1054-1059.
7. Bilous M, Dowsett M, Hanna W, Isola J, Lebeau A, Moreno A, Penault-Llorca F, Rüschoff J, Tomasic G, van de Vijver M. Current perspectives on HER2 testing: a review of national testing guidelines. Mod Pathol 2003;16:173-182.
8. 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.

BIOMEDICINE
生物醫學
BIOMEDICINE JOURNAL