

유방암종의 *HER-2/neu* 검색을 위한 형광제자리부합화와 면역조직화학 염색법의 비교

박경미 · 김정연 · 임성직

인제대학교 상계 백병원 병리과

접 수 : 2002년 5월 8일
게재승인 : 2002년 7월 20일

책임저자 : 박 경 미
우 139-707 서울시 노원구 상계 7동 761-1
인제대학교 상계 백병원 병리과
전화: 02-950-1263
Fax: 02-950-1266
E-mail: ysdol@unitel.co.kr

*이 논문은 2001년도 인제대학교 학술연구 조성비 보조에 의한 것임.

Comparing Fluorescence *In Situ* Hybridization and Immunohistochemistry to Determine the *HER-2/neu* Status in Breast Carcinoma

Kyeongmee Park, Jungyoen Kim and Sungjig Lim

Department of Pathology, Inje University Sanggye Paik Hospital, Seoul, Korea

Background : Identification of *HER-2/neu* status is important in predicting the response to specific chemotherapy in breast carcinoma patients and *HER-2/neu* status is associated with poor clinical outcome even with systemic chemotherapy. Introduction of fluorescence *in situ* hybridization (FISH) allows an accurate assessment of the level of gene amplification with information about distribution of gene copies in histologic sections. **Methods :** *HER-2/neu* status was performed on paraffin sections of 176 primary breast carcinomas by FISH, using PathVysion and by immunohistochemistry (IHC), using HercepTest. The results of *HER-2/neu* amplification was compared with clinical and pathological prognostic factors. **Results :** *HER-2/neu* amplification and overexpression were detected in 51 tumors (29.0%) by FISH and 32 tumors (18.2%) by IHC. The results of each method agreed with each other in 157 tumors (concordance: 89.2%, kappa=0.783). *HER-2/neu* amplification was associated with poor nuclear grade, marked nuclear pleomorphism, and presence of the combined ductal carcinoma *in situ* in the invasive ductal carcinomas as well as Van Nuys grade of the ductal carcinoma *in situ* component ($p < 0.05$). **Conclusions :** The comparison of FISH and IHC demonstrated an excellent correlation of *HER-2/neu* overexpression 2+ and 3+ with gene amplification. However, FISH may be a more accurate and reliable method for negative and 1+ cases. *HER-2/neu* amplification proves to be of prognostic relevance.

Key Words : Mammary Neoplasms-In Situ Hybridization, Fluorescence-Genes, erbB-2, Immunohistochemistry

HER-2/neu (*c-erbB-2*) 암유전자는 185 kDa의 transmembrane growth factor receptor로서 티로신 키나아제 작용을 가지고 있으며 세포의 성장을 자극한다. 유방암종에서 *HER-2/neu* 발현율은 20-30%로 예후 예측, 항암 치료 및 호르몬 치료에 있어 그 중요성이 증명되고 있다.¹⁻³ *HER-2/neu* 증폭이나 과발현을 나타내는 환자의 경우 doxorubicin 치료에 효과가 있다는 보고와⁴⁻⁶ 항암 치료제의 양을 증가시키면 효과가 강화된다는 보고들⁵⁻⁷은 항암제 선택에 있어서 *HER-2/neu*의 중요성을 시사하였다. 최근 trastuzumab (HERCEPTIN®; Genentech, Inc., South San Francisco, CA, U.S.A.)이라는 *HER-2/neu*에 대한 단클론항체 치료제의 개발과 전이 유방암종에 대한 높은 치료 효과는 *HER-2/neu*의 검색이 유방암종 환자 치료에 필수적

임을 말해 준다.⁸ 유방암종 환자에게서 *HER-2/neu*의 발현이 있는 경우 cyclophosphamide, methotrexate, 5-fluorouracil (CMF) 치료에 내성을 보이는 경우가 많고 tamoxifen을 포함한 호르몬 치료에 내성을 보인다는 보고도 계속되고 있다.⁹⁻¹¹ 결국 항암제 치료를 받는 모든 환자에게 *HER-2/neu*의 검색은 효과적인 치료를 위하여 필수적인 과정이 되었다. *HER-2/neu*의 과발현을 보기 위한 단백 검색 방법으로는 면역조직화학 염색이 가장 많이 이용되지만, 이용되는 항체의 특이도와 판정 기준에 따라 결과가 다르다.¹² *HER-2/neu* 유전자의 경우 단백질 과발현보다는 유전자의 증폭이 항암제에 대한 효과를 더 정확히 예측할 수 있는 지표이므로 형광제자리부합화(fluorescence *in situ* hybridization: FISH) 검색이 필수적이다.^{13,14} 형광제자리

부합화는 조직학적으로 동정된 암 세포의 핵 내에서 유전자의 증폭 여부를 정확히 구별할 수 있는 장점을 가지고 있으며, 또한 소량의 조직에서도 검색이 가능하므로 조기 진단으로 얻을 수 있는 암 조직의 양이 점점 작아지는 현실적인 면에서도 유리하다. 유방암 환자에게서 *HER-2/neu* 유전자의 증폭 분석이 면역조직화학 염색보다 예후를 더 정확히 예측할 수 있다는 연구 결과도 형광제자리부합화의 장점을 보여 주는 것이다.¹ 그러나 여러 장점을 가지고 있음에도 불구하고 실제적으로 형광제자리부합화를 이용한 *HER-2/neu* 유전자 증폭 분석은 보편화되지 못하고 있다. 형광제자리부합화를 시행하기 위해서는 형광 물질을 분석할 수 있는 특수 현미경 및 필터가 필요하며 검사에 사용되는 시약 가격의 저렴화도 요구된다.

본 연구는 유방암 조직에서 형광제자리부합화와 면역조직화학 염색을 이용하여 *HER-2/neu* 유전자 증폭과 단백질 과발현의 결과를 비교 분석하고자 시행되었다.

재료와 방법

1989년 9월부터 2000년 8월까지 인제대학교 상계 백병원에서 유방암 절제술을 받은 환자 중 임상 정보를 갖춘 침윤관암종 176예를 대상으로 하였다. 침윤관암종은 Nottingham 분류법¹⁵에 의한 조직학적 등급을 사용하였고 동반된 관내암종은 Van Nuys 분류법¹⁶에 의하여 등급을 나누었다.

형광제자리부합화

두께 3.5 μm 의 슬라이드를 56°C로 24시간 두었다가 탈파라핀한 후 100% 알코올로 탈수시켜 45-50°C 상태를 유지하였다. 0.2 N HCl에 20분 담근 후 증류수에 3분간 넣고 세척완충액(Vysis Inc., Downers Grove, IL, U.S.A.)에 3분간 두었다. 80°C의 전처리 용액(Vysis)에 30분간 처리하고 증류수에 1분간 담근 후 세척완충액에 5분 동안 2회 세척하였다. 37°C의 단백질 분해효소용액(Vysis)에 10분 동안 처리한 후 세척완충액에 5분씩 2회 세척하고 45-50°C 상태를 유지하면서 탈수하였다. 포르말린에 10분간 고정시킨 후 세척완충액으로 5분씩 2회 세척하고 45-50°C 상태를 유지하면서 탈수하였다. 72°C의 변성용액(Vysis)에 5분간 적용한 후 70%, 85%, 100% 알코올에 순서대로 1분씩 담그고 45-50°C 상태로 탈수하였다. 10 μL 의 LSI *HER-2/CEP* probe (Vysis)를 적용한 후 커버 슬립으로 덮고 37°C로 14-18시간 동안 유지하였다. 실온 온도의 후부합화세척완충액(Vysis)에 넣어 커버 슬립을 제거한 후 72°C의 후부합화세척완충액에 2분간 적용한 다음 슬라이드를 어두운 곳에 세운 상태로 탈수하였다. 10 μL 의 4,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI, Vysis)로 염색하여 관찰하였다.

현미경의 1,000배 시야에서 암 세포가 한층으로 배열된 부위

를 선택하여 CEP 녹색 신호와 *HER-2/neu* 오렌지 신호의 수를 관찰하여 비율을 구하였다. *HER-2/neu* 오렌지 신호가 CEP 녹색 신호의 2배 이상인 경우를 유전자 증폭으로 간주하였다(Fig. 1).

면역조직화학 염색

두께 3.5 μm 의 슬라이드를 탈파라핀하여 95-99°C의 전처리 용액(HerceptTest kit; DAKO, Carpinteria, CA, U.S.A.)에 40분 처리한 후 실온에서 20분간 식혔다. 세척완충액으로 세척한 후 과산화효소차단제(HerceptTest kit; DAKO)를 5분간 적용하였다. 200 μL 의 일차 항체를 조직 위에 30분간 적용한 후 세척하였다. 200 μL 의 Visualization Reagent (HerceptTest kit; DAKO)를 30분간 적용한 후 세척하였다. 200 μL 의 diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB)를 10분간 적용한 후 세척하고 Mayer's hematoxylin으로 대조염색을 시행하였다. 암 세포의 세포막에 갈색으로 염색이 되는 정도에 따라 다음과 같이 점수를 주었다. 음성 반응을 나타내거나 10% 미만의 암 세포에서 약하게 염색되는 경우를 0, 암 세포의 10% 이상에서 염색은 되었으나 세포막의 일부가 약하게 염색된 경우를 1+, 암 세포의 10% 이상에서 세포막의 전체가 중등도로 염색된 경우를 2+, 암 세포의 10% 이상에서 세포막의 전체가 강하게 염색된 경우를 3+로 판독하였으며, 그 중 염색 점수가 2+와 3+인 경우를 *HER-2/neu* 단백질의 과발현으로 간주하였다(Fig. 2).

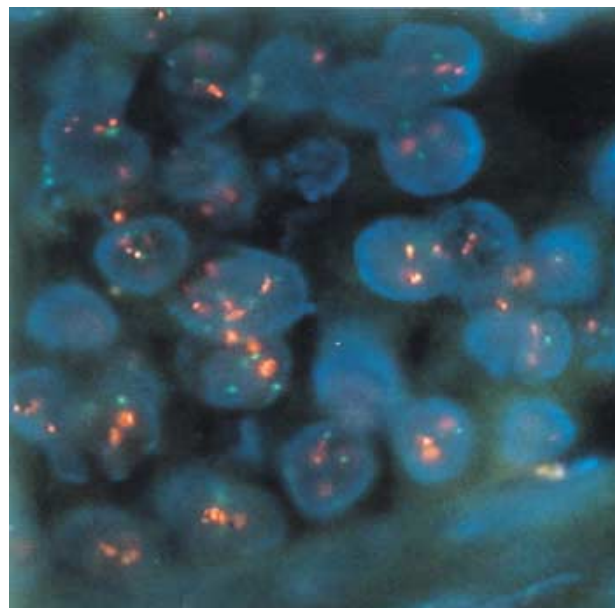


Fig. 1. Fluorescence in situ hybridization shows increased *HER-2/neu* gene copy number in breast cancer tissue (*HER-2/neu* gene probe, orange signals; chromosome 17 centromere control, green signals).

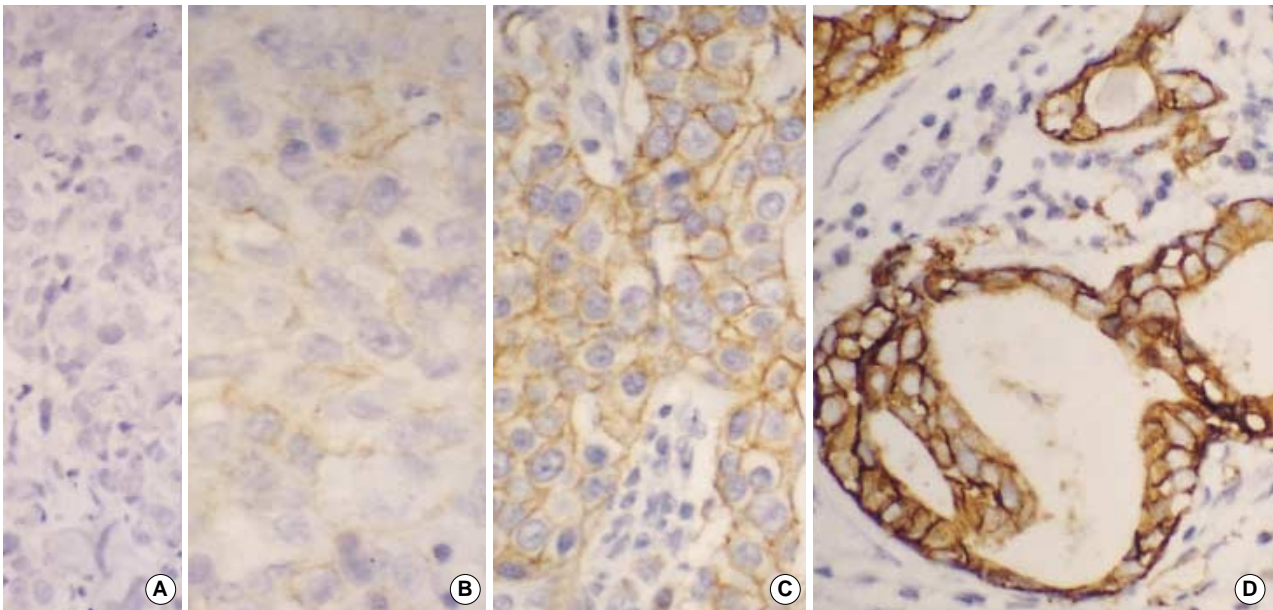


Fig. 2. Scores for HER-2/neu overexpression range from 0 to 3+ (A) 0: Negative; No staining, (B) 1+: Negative; A faint membrane staining is detected in >10% of tumor cells. The cells are only stained in part of their membrane. (C) 2+: Weak positive; A weak to moderate complete membrane staining is observed in >10% of tumor cells. (D) 3+: Strong positive; A strong complete membrane staining is observed in >10% of tumor cells.

통계학적 분석

통계분석은 Statistical Package for the Social Science (SPSS) 8.0 (Systat, Chicago, U.S.A.) 통계 프로그램을 이용하였고 p 값이 0.05 미만인 것을 의미 있는 것으로 하였다. 측정 인자들간의 상관성 검증에는 *Chi-square* 법을 사용하였으며 Spearman's correlation coefficient (kappa)에 의하여 형광제 자리부합화와 면역조직화학 염색 결과의 일치성에 대한 상관관계를 구하였다. kappa 계수가 1에 근접할수록 완전한 일치에 가깝고 0.4 이하는 불량한 일치로 보았다.

결 과

침윤관암종 176예 중 Nottingham 분류에 의한 조직학적 등급은 I이 22예(12.5%), II가 83예(47.2%), III이 71예(40.3%)였고, Black의 분류에 의한 핵 등급은 I이 75예(42.6%), II가 84예(47.7%), III이 17예(9.7%)였다. 침윤관암종의 130예(73.9%)가 관내암종을 동반하였고, 그 중 광범위 관내암종인 경우는 41예(31.5%)였다. 동반된 관내암종의 Van Nuys에 의한 등급은 I이 11예(8.5%), II가 47예(36.2%), III이 72예(55.4%)였다.

총 176예에 대하여 HER-2/neu 검색을 위한 형광제자리부합화와 면역조직화학 염색을 시행한 결과, 형광제자리부합화와 면역조직화학 검사에서 HER-2/neu 유전자 증폭과 단백질 과발

Table 1. Correlation between results of FISH and immunohistochemistry for the detection of HER-2/neu amplification and overexpression in 176 breast carcinomas

FISH	IHC				Total
	0	1+	2+	3+	
No amplification	120	5	0	0	125
Amplification	11	8	11	21	51
Total	131	13	11	21	176

Concordance: 89.2%.

FISH: fluorescence in situ hybridization, IHC: immunohistochemistry.

현을 나타낸 예는 각각 51예(29.0%)와 32예(18.2%)였다. 형광제자리부합화와 면역조직화학 결과에서 일치를 보인 경우는 157예(89.2%)였으며 kappa 계수는 0.783였다. 검사 결과의 불일치를 보인 19예 모두 형광제자리부합화에서는 HER-2/neu 유전자 증폭이 관찰되었으나 면역조직화학 염색에서는 HER-2/neu 단백질의 과발현이 관찰되지 않았다. 그 중에서 단백질 발현의 점수가 0과 1+인 경우가 각각 11예, 8예였다(Table 1). 병리학적 소견과 비교해 보았을 때 침윤관암종의 핵 등급이 나뉠수록 HER-2/neu 유전자 증폭이 증가하였고 동반된 관내암종의 Van Nuys 등급이 높을수록 HER-2/neu 유전자의 증폭이 증가되었다(p<0.05). HER-2/neu 유전자 증폭은 관내암종이 동반된 침윤관암종에서 동반되지 않은 경우보다 자주 관찰되었다(p<0.05). 그러나 조직학적 등급이나 동반된 광범위 관내암종의 유무 및 Ki-67 표지 지수와는 상관성이 없었다. 침윤관암종의 조직학적 등급을 위하여 사용하는 Nottingham분류법의 3가지

Table 2. Relationship between HER-2/neu amplification and pathological parameters

	HER-2/neu (%)		p-value
	No Amplification	Amplification	
Histologic grade			0.152
I	20 (90.9)	2 (9.1)	
II	63 (75.9)	20 (24.1)	
III	53 (74.6)	18 (25.4)	
Tubule formation			0.644
1	9 (81.8)	2 (18.2)	
2	25 (78.1)	7 (21.9)	
3	102 (76.7)	31 (23.3)	
Nuclear pleomorphism			0.021
1	5 (100.0)	0 (0.0)	
2	31 (88.6)	4 (11.4)	
3	100 (73.5)	36 (26.5)	
Mitotic index			0.118
1	72 (81.8)	16 (18.2)	
2	28 (75.7)	9 (24.3)	
3	36 (70.6)	15 (29.4)	
Nuclear grade			0.043
I	54 (72.0)	21 (28.0)	
II	66 (78.6)	18 (21.4)	
III	16 (94.1)	1 (5.9)	
DCIS			0.025
Absent	42 (91.3)	4 (8.7)	
Present	94 (72.3)	36 (27.7)	
EIC			1.000
Absent	105 (77.8)	30 (22.2)	
Present	31 (76.2)	10 (23.8)	
Van Nuys grade of associated DCIS			0.000
1	15 (10.0)	0 (0.0)	
2	36 (80.0)	9 (20.0)	
3	43 (61.4)	27 (38.6)	
Ki-67 labeling index (%)			0.735
<10	71 (78.0)	20 (22.0)	
≥10	65 (75.6)	20 (23.5)	

DCIS: ductal carcinoma in situ, EIC: extensive intraductal carcinoma.

요소를 HER-2/neu 유전자 증폭과 비교해 보았을 때 핵의 다형성이 심할수록 HER-2/neu 유전자 증폭이 증가하였지만 ($p<0.05$), 관 구조 형성의 정도나 유사분열의 정도와는 상관성을 나타내지 않았다(Table 2). 침윤관암중에서 HER-2/neu 유전자 증폭과 환자의 연령, 종양의 크기, 림프절 전이, 호르몬 수용체, 병기, 재발 및 생존율 등과 유의한 상관성은 없었다(Table 3).

고찰

유방암중 환자에게서 HER-2/neu 유전자 검색의 주목적은 가장 효과적인 치료약제의 선택에 있다. 특히 전이성 유방암중 치료제인 trastuzumab (Herceptin®)이 미국 Food and Drug Administration (FDA)에서 승인되면서 HER-2/neu의 중요성

Table 3. Relationship between HER-2/neu amplification and clinical parameters

	HER-2/neu (%)		p-value
	No Amplification	Amplification	
Age (yr)			0.720
<50	90 (77.6)	26 (22.4)	
≥50	46 (76.7)	14 (23.3)	
Size (cm)			0.717
<2	36 (75.0)	12 (25.0)	
2-5	88 (80.0)	22 (20.0)	
>5	12 (66.7)	6 (33.3)	
Node metastasis			0.064
0	65 (73.0)	24 (27.0)	
1-3	35 (81.4)	8 (18.6)	
≥4	36 (81.8)	8 (18.2)	
ER			0.865
Negative	72 (76.6)	22 (23.4)	
Positive	49 (78.0)	18 (22.0)	
PR			1.000
Negative	55 (77.5)	16 (22.5)	
Positive	81 (77.1)	24 (22.9)	
Stage			0.296
1	29 (76.3)	9 (23.7)	
2	67 (76.1)	21 (23.9)	
3	34 (81.0)	8 (19.0)	
4	6 (75.0)	2 (25.0)	

ER: estrogen receptor, PR: progesterone receptor.

이 더욱 강조되고 있다. 이와 함께 HER-2/neu 검사의 면역조직화학 염색인 HercepTest 역시 FDA의 승인을 받게 되었다. 현재까지 HER-2/neu 유전자 검색으로는 면역조직화학 염색이 보편적으로 사용되어 왔으나, 최근 형광제자리부합화와 면역조직화학 검사간의 불일치가 계속 보고되고 있으므로 HER-2/neu 유전자 단백질의 과발현보다는 유전자의 증폭을 증명할 수 있는 형광제자리부합화 검사가 요구되고 있다.^{12,17-19} 본 연구에서는 총 176예의 침윤관암중을 대상으로 형광제자리부합화와 HercepTest 면역조직화학 염색 결과를 비교하여 일치율 89.2%와 kappa 값 0.783의 결과를 얻었는데, 이는 다른 보고에서와 마찬가지로 좋은 성적이었다.²⁰⁻²² 특히 면역조직화학 결과가 2+, 3+인 경우 형광제자리부합화에서도 HER-2/neu 유전자 증폭을 확인할 수 있었다. 그러나 면역조직화학 염색 점수가 0이거나 1+인 경우의 소수에서 HER-2/neu 유전자 증폭을 나타냈다. 이러한 결과는 다른 연구자들이 보고하였듯이 저등도의 유전자 증폭을 나타냈거나 면역조직화학 염색의 기술적인 문제로 생각된다.^{21,22} 그러므로 면역조직화학 검사의 위음성을 극복하려면 형광제자리부합화가 시행되어야 함을 시사한다. 많은 연구자들이 보고하였듯이^{21,22} HER-2/neu 유전자 증폭은 겨드랑 림프절 전이,^{14,23} 호르몬 수용체의 결핍,^{14,24-26} 종양의 크기^{14,23} 등과 같은 불량한 예후와 상관성이 있는 것으로 알려져 있다. 본 연구에서는 이러한 임상적 예후 인자들과 의미 있는 상관성을 나타내지 않았지만 향후 항암 치료제에 따른 환자의 재분류를 시

도하여 HER-2/neu 유전자 증폭과 치료 방법에 따른 예후와의 상관성을 확인할 필요성이 있을 것이다. 본 연구 결과처럼 HER-2/neu 유전자와 호르몬 수용체 발현간의 의미 있는 상관성을 발견하지 못한 보고도 있다.²⁷ 조직학적 등급과 Ki-67 표지 지수도 HER-2/neu 유전자와 상관성을 나타내지 않았고 다른 문헌에서도 그 결과가 다양하다.^{24,27} 광범위 관내암종은 유방암종의 재발과 관련이 있다고 알려져 있지만^{28,29} HER-2/neu의 증폭과 유의한 상관성은 없었다. 이는 광범위 관내암종이 유방암종의 분포 범위와 상관성은 있으나 암 세포의 생물학적 특성과는 직접적 관련이 없기 때문이라고 생각한다. 그러나 침윤관암종의 핵 등급과 동반된 관내암종의 Van Nuys 등급은 HER-2/neu의 증폭과 의미 있는 상관 관계를 나타냈다.^{16,24} 이러한 결과는 HER-2/neu 유전자의 증폭이 불량한 예후와 연관이 있음을 시사한다. Nottingham 분류에 의한 조직학적 등급에 사용하는 3가지 인자 중 핵의 다형성만 HER-2/neu 유전자의 증폭과 상관성을 나타냈다는 것은 유방암종의 조직학적 분화보다는 핵의 분화가 절대적으로 예후와 상관성이 크다는 것을 암시하는데, 다른 문헌에서도 HER-2/neu 유전자의 증폭이 핵의 등급과 밀접한 관계가 있다고 보고하였다.³⁰ 침윤관암종이 관내암종을 동반하는 경우에 HER-2/neu 유전자의 증폭이 의미 있게 관찰되었다.

결론적으로 HER-2/neu 암유전자 검색 방법에 있어 면역조직화학 염색에서 2+, 3+를 나타낸 경우에는 형광제자리부합화와 높은 일치율을 나타냈으나 0 또는 1+ 경우에는 제한점이 있으므로 형광제자리부합화가 면역조직화학 염색의 단점을 보완할 수 있는 좋은 방법이 될 것으로 생각한다.

참고문헌

- Slamon DJ, Clark GM, Wong SG, Levin WJ, Ullrich A, McGuire WL. Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science* 1987; 235: 177-82.
- Paik S, Hazan R, Fisher ER, et al. Pathologic finding from the national surgical adjuvant breast and bowel project: prognostic significance of erbB-2 protein overexpression in primary breast cancer. *J Clin Oncol* 1990; 8: 103-12.
- Toikkanen S, Helin H, Isola J, Joensuu H. Prognostic significance of HER-2 oncoprotein expression in breast cancer: a 30-yr follow-up. *J Clin Oncol* 1992; 10: 1044-8.
- Muss HB, Thor AD, Berry DA, et al. c-erbB-2 expression and response to adjuvant therapy in women with node-positive early breast cancer. *N Engl J Med* 1994; 330: 1260-6.
- Paik S, Bryant J, Park C, et al. erbB-2 and response to doxorubicin in patients with axillary lymph node-positive, hormone receptor-negative breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 1998; 90: 1361-70.
- Thor AD, Berry DA, Budman DR, et al. erbB-2, p53, and efficacy of adjuvant therapy in lymph node-positive breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 1998; 90: 1346-60.
- Clark GM. Should selection of adjuvant chemotherapy for patients with breast cancer be based on erbB-2 status? *J Natl Cancer Inst* 1998; 90: 1320-1.
- Pegram M, Hsu S, Lewis G, et al. Inhibitory effects of combinations of HER-2/neu antibody and chemotherapeutic agents used for treatment of human breast cancers. *Oncogene* 1999; 18: 2241-51.
- Allred DC, Clark GM, Tandon AK, et al. HER-2/neu in node-negative breast cancer: prognostic significance of overexpression influenced by the presence of *in situ* carcinoma. *J Clin Oncol* 1992; 10: 599-605.
- Tetu B, Brisson J, Plante V, Bernard P. p53 and erbB-2 as markers of resistance to adjuvant chemotherapy in breast cancer. *Mod Pathol* 1998; 11: 823-30.
- Bitran JD, Samuels B, Trujillo Y, Klein L, Schroeder L, Martinec J. Her2/neu overexpression is associated with treatment failure in women with high-risk stage II and stage IIIA breast cancer (>10 involved lymph nodes) treated with high-dose chemotherapy and autologous hematopoietic progenitor cell support following standard-dose adjuvant chemotherapy. *Clin Cancer Res* 1996; 2: 1509-13.
- Press MF, Hung G, Godolphin W, Slamon DJ. Sensitivity of HER-2/neu antibodies in archival tissue samples: potential source of error in immunohistochemical studies of oncogenic expression. *Cancer Res* 1994; 54: 2771-7.
- Kallioniemi OP, Kallioniemi A, Kurisu W, et al. ERBB2 amplification in breast cancer analyzed by fluorescence *in situ* hybridization. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89: 5321-5.
- Andrulis IL, Bull SB, Blackstein ME, et al. neu/erbB-2 amplification identifies a poor prognosis group of women with node-negative breast cancer. Toronto breast cancer study group. *J Clin Oncol* 1998; 16: 1340-9.
- Elston CW, Ellis IO. Pathological prognostic factors in breast cancer: I. The value of histologic grade in breast cancer-experience from a large study with long-term follow-up. *Histopathology* 1991; 19: 403-10.
- Silverstein MJ, Poller DN, Waisman JR, et al. Prognostic classification of breast ductal carcinoma-*in-situ*. *Lancet* 1995; 345: 1154-7.
- Jacobs TW, Gown AM, Yaziji H, Barnes MJ, Schnitt SJ. Specificity of HerceptTest in determining Her-2/neu status of breast cancer using the United States Food and Drug Administration-approved scoring system. *J Clin Oncol* 1999; 17: 1983-7.
- Roche PC, Ingle JN. Increased Her-2 with US Food and Drug Administration approved antibody. *J Clin Oncol* 1999; 17: 434-5.
- Tubbs RR, Pettay JD, Roche PC, Stoler MH, Jenkins RB, Grogan

- TM. Discrepancies in clinical laboratory testing of eligibility for trastuzumab therapy: apparent immunohistochemical false-positive do not get the message. *J Clin Oncol* 2001; 19: 2714-21.
20. Birner P, Oberhuber G, Stani J, *et al.* Evaluation of the United States Food and Drug Administration-approved scoring and test system of HER-2 protein expression in breast cancer. *Clin Cancer Res* 2001; 7: 1669-75.
21. Couturier J, Vincent-Salomon A, Nicolas A, *et al.* Strong correlation between results of fluorescence *in situ* hybridization and immunohistochemistry for the assessment of the ERBB2 (*HER-2/neu*) gene status in breast carcinoma. *Mod Pathol* 2000; 13: 1238-43.
22. *HER-2/neu* testing in breast carcinoma: a combined immunohistochemical and fluorescence *in situ* hybridization approach. *Mod Pathol* 2000; 13: 866-73.
23. Ferrero-Pous M, Hacene K, Bouchet C, Le Doussal V, Tubiana-Hulin M, Spyrtos F. Relationship between *c-erbB-2* and other tumor characteristics in breast cancer prognosis. *Clin Cancer Res* 2000; 6: 4745-54.
24. Claus ER, Chu P, Howe CL, *et al.* Pathologic features in DCIS of the breast: morphologic features, angiogenesis, *HER-2/neu* and hormone receptors. *Exp Mol Pathol* 2001; 70: 303-16.
25. Clark GM, McGuire WL. Follow-up study of *HER-2/neu* amplification in primary breast cancer. *Cancer Res* 1991; 51: 944-8.
26. Holland R, Connolly JL, Gelman R, *et al.* The presence of an extensive intraductal component following a limited excision correlates with prominent residual disease in the remainder of the breast. *J Clin Oncol* 1990; 8: 113-8.
27. Bartkova J, Barnes DM, Millis RR, Gullick WJ. Immunohistochemical demonstration of *c-erbB-2* protein in mammary ductal carcinoma *in situ*. *Hum Pathol* 1990; 21: 1164-7.
28. Liu E, Thor A, He M, Barcos M, Ljung BM, Benz C. The *HER2* (*c-erbB-2*) oncogene is frequently amplified in *in situ* carcinomas of the breast. *Oncogene* 1992; 7: 1027-32.
29. Glockner S, Lehmann U, Wilke N, Kleeberger W, Langer F, Kreipe H. Amplification of growth regulatory genes in intraductal breast cancer is associated with higher nuclear grade but not with the progression to invasiveness. *Lab Invest* 2001; 81: 565-71.
30. Berger MS, Locher GW, Saurer S, *et al.* Correlation of *c-erbB-2* amplification and protein expression in human breast carcinoma with nodal status and nuclear grading. *Cancer Res* 1988; 48: 1238-43.