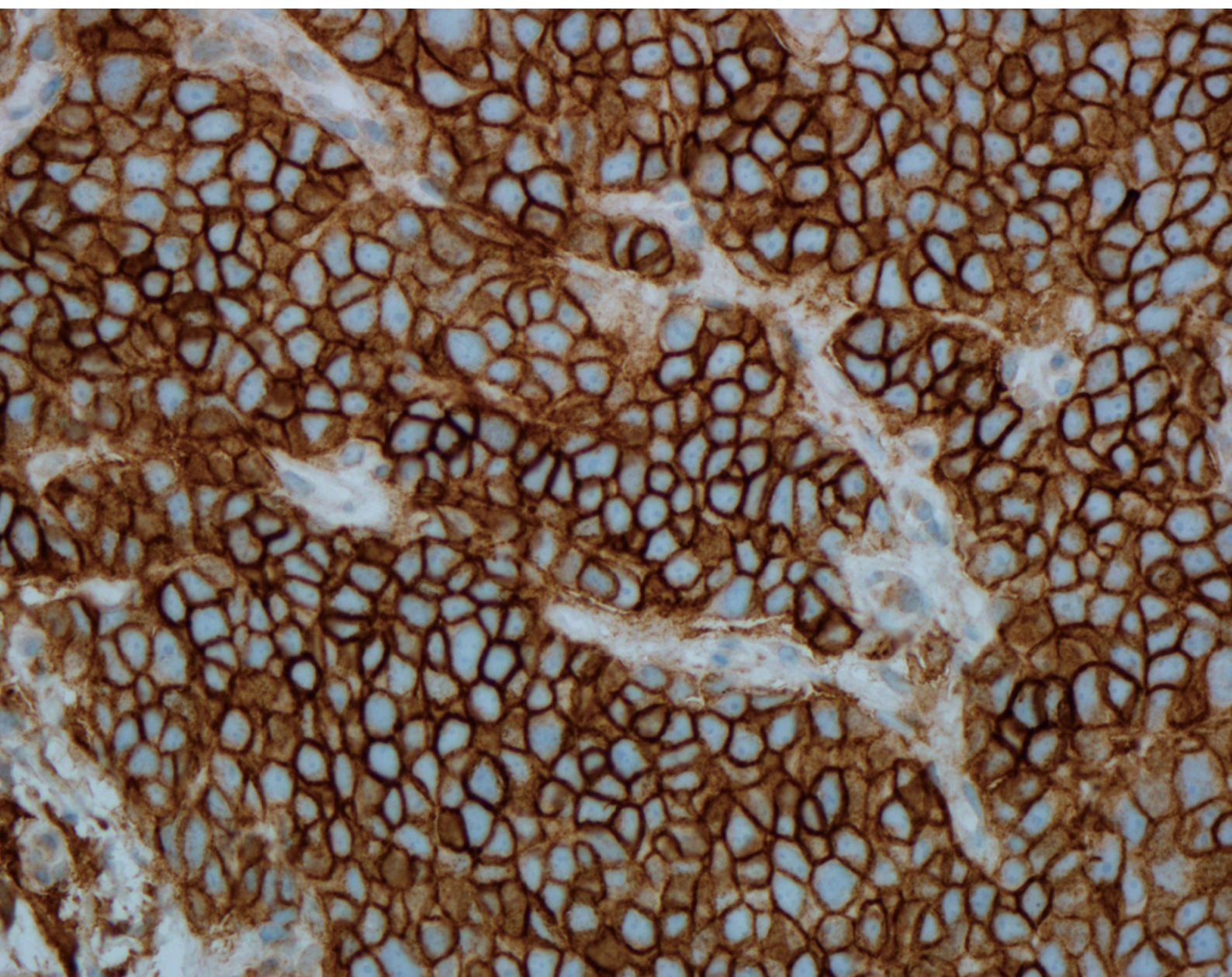


体外診断用医薬品

ベンタナ OptiView PD-L1 (SP263) 検査ガイド ～ 肺癌編 ～



目次

はじめに	2
I. 製品概要	3
II. 試薬の準備(試薬の登録・バッファの充填)	5
III. 機器の定期メンテナンス	5
IV. 検体処理(検体採取～包埋)	5
検体処理の条件と染色に与える影響	6
V. 検体スライドの作製(薄切～染色前処理)	7
VI. 精度管理	8
VII. 測定(操作)方法	9
VIII. 推奨プロトコール	10
スコアリングガイド	11
免疫細胞における染色態度(*判定対象とはならない)	13
陽性率の算出イメージ	16
実際の染色例	17
判定に注意が必要なケース	27
参考文献	37

はじめに

PD-L1(プログラム細胞死リガンド-1)は、別名B7-H1およびCD274としても知られている、45-55kDaのI型膜貫通タンパクです。PD-L1は、過剰な免疫反応や正常細胞への攻撃を防ぐための、免疫抑制機構である免疫チェックポイント分子の一つです。

PD-L1は活性化T細胞に発現しているPD-1(プログラム細胞死-1)やB7.1といった受容体と結合することにより、活性化T細胞を不活性化し、免疫応答を抑制に導きます¹。PD-L1は抗原提示細胞(APC)などの免疫細胞のみならず、腫瘍細胞にも発現し^{2,3}、腫瘍が免疫機構から逃れるための役割を果たしています^{1,4}。

そのため、PD-L1/PD-1が結合することを阻害することにより、腫瘍の微小環境においてPD-L1の発現によって免疫反応が抑制された腫瘍特異的なT細胞を再活性化することができ、抗腫瘍効果を発揮すると考えられます。

■PD-L1 IHC検査

ベンタナ OptiView PD-L1 (SP263) は、抗PD-L1(クローンSP263) ウサギモノクローナル抗体およびベンタナ OptiView DAB ユニバーサルキットを用いて、組織・細胞中のプログラム細胞死リガンド-1 (PD-L1) タンパクを免疫組織化学的に検出します。

ロシュ・ダイアグノスティックス(株)では、自動染色装置であるベンチマークシリーズで使用可能な全自動免疫組織化学染色(IHC)として、ベンタナ PD-L1 (SP263) RxDx(一次抗体)、ベンタナ OptiView DAB ユニバーサルキットから成る“ベンタナ OptiView PD-L1 (SP263)”が体外診断用医薬品として承認されています。本品は、ホルマリン固定パラフィン包埋切片(FFPE)において組織・細胞中のPD-L1タンパクを検出することを目的としています。本品の使用目的および対象となる免疫チェックポイント阻害剤については、ベンタナ OptiView PD-L1 (SP263) の添付文書を参照ください。

本誌は、ロシュ・ダイアグノスティックス(株)が提供するPD-L1 IHC検査を適正に実施していただくことを目的とし、検体の取り扱い、染色操作、判定方法などの推奨法を示した検査ガイドです。

ベンタナ OptiView PD-L1 (SP263) はロシュ・ダイアグノスティックス(株)製の自動染色装置であるベンチマークシリーズ用に開発され、がん組織又は細胞中に発現するPD-L1タンパクの検出を目的とした検査キットです。
 詳細な使用目的については添付文書を参照してください。

1. 製品概要

ベンタナ OptiView PD-L1 (SP263)

体外診断用医薬品製造販売承認番号:23100EZ00006000

■**キット構成** ※一次抗体と検出キットの組み合わせ(別売り)で体外診断用医薬品として承認されています。

●**一次抗体**

ベンタナ PD-L1 (SP263) RxDx 商品コード:518-114497

構成試薬	成分	包装単位
一次抗体	抗PD-L1 ウサギモノクローナル抗体 (SP263)	5 mL (50テスト)

●**検出キット**

ベンタナ OptiView DAB ユニバーサルキット 商品コード:518-111427

構成試薬	成分	包装単位
インヒビター	過酸化水素	25 mL (250テスト)
リンカー-HQ	ヒドロキシキノキサリン標識 抗ウサギIgG ヤギポリクローナル抗体	25 mL (250テスト)
マルチマー-HRP	ペルオキシダーゼ標識 抗ヒドロキシキノキサリン マウスモノクローナル抗体	25 mL (250テスト)
DAB試薬	3,3'-ジアミノベンジジン	25 mL (250テスト)
H2O2試薬	過酸化水素	25 mL (250テスト)
COPPER試薬	硫酸銅	25 mL (250テスト)

■**適応機種**

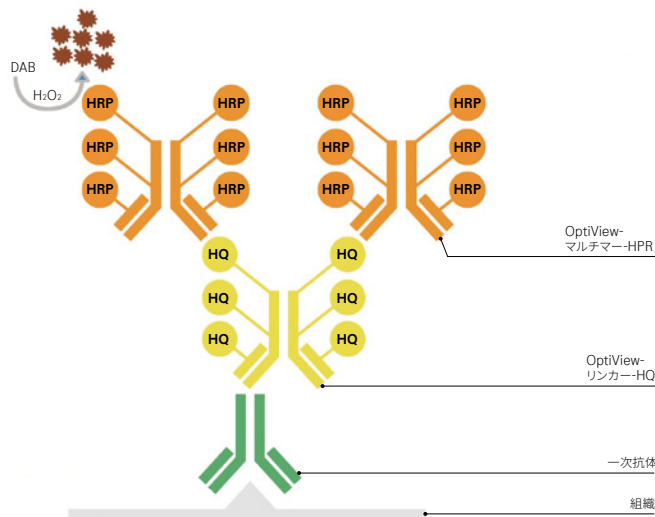
- ベンタナ ベンチマークGX (医療機器:13B1X00201000053)
- ベンタナXTシステム ベンチマークXT (医療機器:13B1X00201000043)
- ベンタナ ベンチマークULTRA (医療機器:13B1X00201000050)
- ベンチマーク ULTRA PLUS (医療機器:13B1X00201000088)

■反応原理

本品は、リンカー-HQ（ブリッジ試薬）を使用した免疫組織化学染色法により、がん組織又は細胞中のPD-L1タンパクを検出します。

- ①スライド標本上の抗原に一次抗体を反応させると、組織切片上に存在する対象抗原と結合します。
- ②次にペンタナ OptiView DAB ユニバーサルキットの、ヒドロキシキノキサリンで標識したリンカー抗体（リンカー-HQ）及びペルオキシダーゼで標識したマルチマー（マルチマー-HRP）を反応させると、スライドガラス上に対象抗原／一次抗体／リンカー-HQ／マルチマー-HRP 結合物が形成されます。
- ③この結合物に対して、DAB試薬、H₂O₂試薬及びCOPPER試薬を添加すると、酵素反応により、組織中に存在する対象抗原が茶褐色に染色されます。

茶褐色に可視化された抗原部位を光学顕微鏡で観察し、PD-L1発現率を測定します。



■別途必要な器具および試薬等

●バッファー類、補助試薬、バーコードラベル

商品コード	製品名	包装単位
518-102982	EZバッファー 10X (ベンチマーク用)	2L
518-100599 または 518-108922 ※	液体カバースリップHI 又は 液体カバースリップ ULTRA※	2L
518-103033	リアクションバッファー 10X	2L
518-103002 または 518-108939 ※	CC1バッファー 又は CC1バッファー ULTRA※	2L
518-102319	ヘマトキシリン核染色試薬 II	250テスト
518-100889	炭酸リチウム試薬	250テスト
518-111182	陰性コントロール ウサギモノク ローナル抗体用	250テスト
518-103095	E-barラベル II	1個 (540枚)

※ベンチマークULTRA, ULTRA PLUSの場合

●その他

器具／試薬	掲載ページ
コーティング スライドガラス	p.7 スライドガラスの準備
キシレン、アルコール (透徹用)	
カバーガラス、封入剤	
精製水又は脱イオン水	
光学顕微鏡	
精度管理用コントロールスライド	p.8 自家製精度管理用 コントロールスライド

II. 試薬の準備 (試薬の登録・バッファの充填)

1. 初回使用時に試薬本体の外箱、またはラベルに付いている登録ボタンを、装置の登録ワンドで読み取り、登録します。
2. 各キットはベンチマーク専用の試薬です。ディスペンサー試薬は開封時に SHIPPING キーを外し、希釈せずにそのまま使用します。使用しない時はキャップをして冷蔵庫に保管してください。
3. EZ バッファおよびリアクションバッファは精製水または脱イオン水で10倍希釈し、自動染色装置へ充填します。
4. 液体カバースリップ、CC1 バッファは希釈せず、そのまま自動染色装置へ充填します。

III. 機器の定期メンテナンス

安定した染色性を維持するために、定期的の下記のメンテナンスを推奨しています。
詳しくは自動染色装置の取扱説明書を参照してください。

- 毎日 : 機器の清掃
- 毎週 : データメンテナンスの実行
- 毎月 : 各バッファタンク、スライドヒーター、廃液タブの洗浄
- 3ヵ月毎 : デコンタミネーション、スライドヒーターの温度チェック、スキャンデスク・デフラグメントの実行
- 1年毎 : アーカイブシステムデータの実行

IV. 検体処理 (検体採取～包埋)

検体採取から包埋までの工程が染色不良の原因となることがあります。
病理標本作製過程における操作にじゅうぶんに注意してください。

- 採取後固定液に入れるまでの時間が染色不良の原因となりうることから、検体は採取後速やかに固定してください。
- 固定は10%中性緩衝ホルマリンを用いて、6時間以上72時間以内の処理が推奨されます⁵⁻⁸。
- 固定液は組織に対してじゅうぶんな液量をご用意ください。組織の15~20倍以上の量が推奨されます。
- ティッシュプロセッサの薬液は適度に交換してください。

検体処理の条件と染色に与える影響

固定条件

- 10%中性緩衝ホルマリンにより、6～72時間固定することが推奨されます。
- 亜鉛ホルマリンは10% 中性緩衝ホルマリンと同等の染色を示すと報告されています。
- 6時間未満の固定は推奨されません。
- AFAをはじめとするアルコール系の固定液は推奨されません。

表1 ベンタナ OptiView PD-L1 (SP263) による胎盤組織の染色 (固定液および固定時間別)

時間 (Hrs)	固定液				
	10% 中性緩衝ホルマリン	亜鉛ホルマリン	AFA*	アルコールホルマリン*	95%エタノール*
1*					
6					
12					
24					
48					
72					

推奨

*推奨されない

V. 検体スライドの作製 (薄切～染色前処理)

■スライドガラスの準備

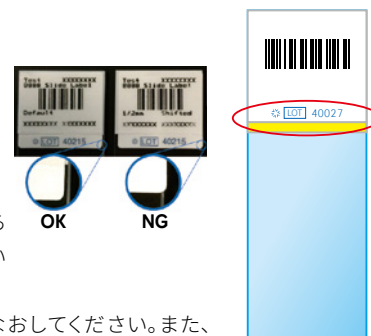
- シランなどがコーティングされたスライドガラスをご使用ください。高温多湿での保管を避けて、有効期限内のスライドガラスをご使用ください。

■薄切

- 薄切する切片の厚さは4 μ mが推奨されます。
- スライドガラス上の試薬が広がる範囲に切片を貼り付けます。ガラスの側面から1mm、ラベル・フロストから5mm離してください。切片を貼り付ける部分は素手で触れないように注意してください。
- 薄切後の乾燥は、約40 $^{\circ}$ Cで一晩の処理を推奨します。切片の剥離防止のためベーキングを行う場合は、60 $^{\circ}$ Cで30分以内の処理にとどめ、長時間、高温に置くことは避けてください。60 $^{\circ}$ C以上の高温で長時間置いた場合、スライドガラス表面の変質により、撥水現象が起こる場合があります。
- 乾燥後の標本は保管せず、速やかに染色してください。

■ラベルの貼付

- バーコードラベルプリンターより、染色プロトコール認識用バーコードラベルを印字します。
- 透明なフラップをしわにならないように注意して貼ります。
- バーコードラベルは、スライドガラスのフロスト部分の上端に合わせて、左右からはみ出さないように貼ります。このとき、ラベルのLOT部分 (右図○部分) が浮き上がらないように、しっかり押さえてください。
- 一度はがしたラベルは粘着力が弱まるため、ラベルを貼りなおす場合は、別途作成しなおしてください。また、ラベルの重ね貼りは避けてください。



薄切後の安定性

肺癌および胎盤の未染スライドは、薄切後、2-8 $^{\circ}$ Cおよび15-30 $^{\circ}$ C保管で最大9～12ヶ月までの安定性データがありますが、保管状態などによっては期間内でも著しく染色性が低下する可能性がありますので、薄切後はできるだけ速やかに染色してください。

VI. 精度管理

染色を行う場合には、必ず同時に精度管理用コントロールスライドの染色を行い、染色操作が適切に行われていることを確認してください。

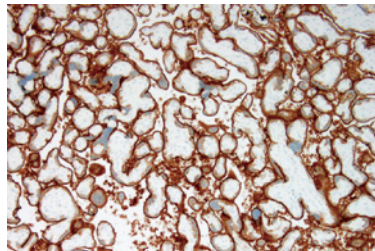
■自家製精度管理用コントロールスライド

胎盤組織は陽性組織と陰性組織の両方を含んでいるため、ベンタナ OptiView PD-L1 (SP263) の特異的反応と非特異的反応を確認するためのコントロール組織として適しています。

- ートロホプラストの細胞膜および細胞質に中程度～強度の陽性反応が認められます。
- ー絨毛内の間質細胞と血管では陰性となります。

PD-L1発現率が既知の肺癌症例を用いることも可能です。

軽微な異常を検出するためには、強陽性の検体よりも、中等度の染色性を示す検体を陽性コントロールとして用いる方が適しています。



胎盤におけるベンタナ OptiView PD-L1(SP263)染色

■陰性コントロール試薬:陰性コントロール ウサギモノクローナル抗体用(商品コード:518-111182)

一次抗体の代わりに陰性コントロール試薬を使用して染色することにより、一次抗体を除く構成試薬の非特異反応を確認します。

VII. 測定(操作)方法

本キットの染色は弊社の自動染色装置を用いて行います。代表的な自動染色装置として「ベンタナ ベンチマークULTRA」を使用した場合の操作方法を記載します。詳しくは、自動染色装置の取扱説明書ならびに試薬の添付文書を参照してください。

■操作手順

1. 染色モジュール、PC、E-barシステムの順に電源を入れます。
2. Windows画面からVSSソフトウェアを立ち上げます。
3. Instrument Viewを表示し、画面右下の「Ready」モードボタンをクリックします。
4. 装置の取扱説明書に従ってプロトコールを作成し、ソフトウェアに保存します。
5. 廃液タンクの液量を確認し、必要に応じて適切な方法で廃棄します。(施設の廃棄基準を順守)
6. バーコードラベルを印字し、検体スライドに貼り付けます。(p.7 ラベルの貼付 参照)
7. 必要な試薬を染色モジュールにセットします。このとき、試薬の液量や試薬ディスペンサーキャップが全て外されていることを確認します。また、ノズルの流路を塞ぐ大きな気泡や析出物等がないことを確認し、析出物があれば金属以外の細いピンで除去してください。大きな気泡が確認された場合には、弊社カスタマーソリューションセンターへご連絡ください。
8. 検体スライドを染色モジュールにセットし、スライドドローワーと試薬フードを閉めます。
9. 染色モジュールにあらかじめセットされているバッファー類の量がじゅうぶんにあること(容器の半分以上)を確認し、「Running」モードボタンをクリックし、染色開始確認のポップアップ画面の「Yes」をクリックします。試薬と検体スライドのバーコードを読み取り後、染色処理が開始されます。

脱パラフィンおよび前処理

- (1) 検体スライドを加熱してパラフィンを溶融し、その後EZバッファーで洗浄することにより脱パラフィンが行われます。
- (2) 検体スライドは、CC1バッファーにより設定された条件で熱処理が行われます。
- (3) 洗浄が行われます。

一次抗体の反応および検出

- (1) スライド上の検体にインヒビターを1滴加え、4分間反応させます。
- (2) スライド上のインヒビターを洗浄後、一次抗体を1滴加え、16分間反応させます。
- (3) スライド上の一次抗体を洗浄後、リンカー-HQを1滴加え、8分間反応させます。
- (4) スライド上のリンカー-HQを洗浄後、マルチマー-HRPを1滴加え、8分間反応させます。
- (5) スライド上のマルチマー-HRPを洗浄後、DAB試薬とH₂O₂試薬を1滴ずつ加え、4分間反応させます。
- (6) スライド上のDAB試薬とH₂O₂試薬を洗浄後、COPPER試薬を1滴加え、4分間反応させます。
- (7) スライド上のCOPPER試薬を洗浄させます。

対比染色

- (1) 検体スライド上にヘマトキシリン核染色試薬IIを1滴加え、設定時間反応させます。
- (2) 検体スライドを洗浄後、炭酸リチウム試薬を1滴加え、設定時間反応させます。その後、洗浄を行います。

10. 染色が終了したら、自動染色装置から検体スライドを取り出し、水洗、脱水、透徹後、封入し、光学顕微鏡により鏡検を行います。

VIII. 推奨プロトコール

■プロシージャとプロトコール

PD-L1 (SP263) 専用プロシージャによる染色が必要となります。

【プロシージャ名】

ベンチマークULTRA, ULTRA PLUS: U VENTANA PD-L1 (SP263) IVD W

ベンチマークXT: XT VENTANA PD-L1 (SP263) IVD W

ベンチマークGX: GX VENTANA PD-L1 (SP263) IVD W

プロトコール ステップ	設定内容
Baking	必要に応じて選択
Antibody (Primary)	VENTANA PD-L1 (SP263) IVD W Ab もしくは Negative Control
Counterstain	Hematoxylin II, 4 min
Post Counterstain	Bluing, 4 min

染色には、各検体から薄切した3枚の連続切片が必要となります。1枚目の切片はH&E用、2枚目は陰性対照として陰性コントロールウサギモノクローナル抗体を用いて染色、3枚目はベンタナ OptiView PD-L1 (SP263) による染色を行います。

H&E染色で組織形態を評価し、その結果、検体の状態が不適切であると判定された場合は新たな検体（別ブロックなど）を用意し、ベンタナ OptiView PD-L1 (SP263) および陰性対照の染色を行う必要があります。

ベンタナ OptiView PD-L1 (SP263) で染色した精度管理用コントロールスライド（ヒト胎盤組織もしくはPD-L1発現が既知の肺癌症例）の染色性の確認および、陰性対照試薬を用いて染色した検体スライドの結果においてバックグラウンド染色に問題がないことを確認したうえで、ベンタナ OptiView PD-L1 (SP263) で染色した検体スライドの評価を行ってください。精度管理用コントロールスライドや陰性対照試薬で染色したスライドの結果が不適切である場合には、再染色を実施してください。

ベンタナ OptiView PD-L1 (SP263) を用いて染色した患者検体の評価は病理医により行ってください。

スコアリングガイド

ペンタナ OptiView PD-L1 (SP263) で染色された非小細胞肺癌検体は、腫瘍細胞全体に対して、強度にかかわらず（但し、試薬対照スライドの背景染色よりも強い染色強度）細胞膜への茶褐色の陽性反応が認められる腫瘍細胞の割合を算出し、腫瘍細胞におけるPD-L1発現率 (TC) とします。細胞膜の染色は、基底側方への染まりなど、全周性以外のパターンも対象となります。

免疫細胞や腫瘍細胞の細胞質等に陽性反応が認められる場合がありますが、細胞質のみの染まりは評価対象から除外します。

非小細胞肺癌におけるPD-L1発現は腫瘍内で不均一性を示すこともあるため、注意が必要です。

表2 アテゾリズマブ投与基準	
対象患者	投与基準
非小細胞肺癌	腫瘍細胞全体に対して、染色強度に関係なく、細胞膜にPD-L1による陽性反応が認められる腫瘍細胞の割合 (TC) が1%以上を占める

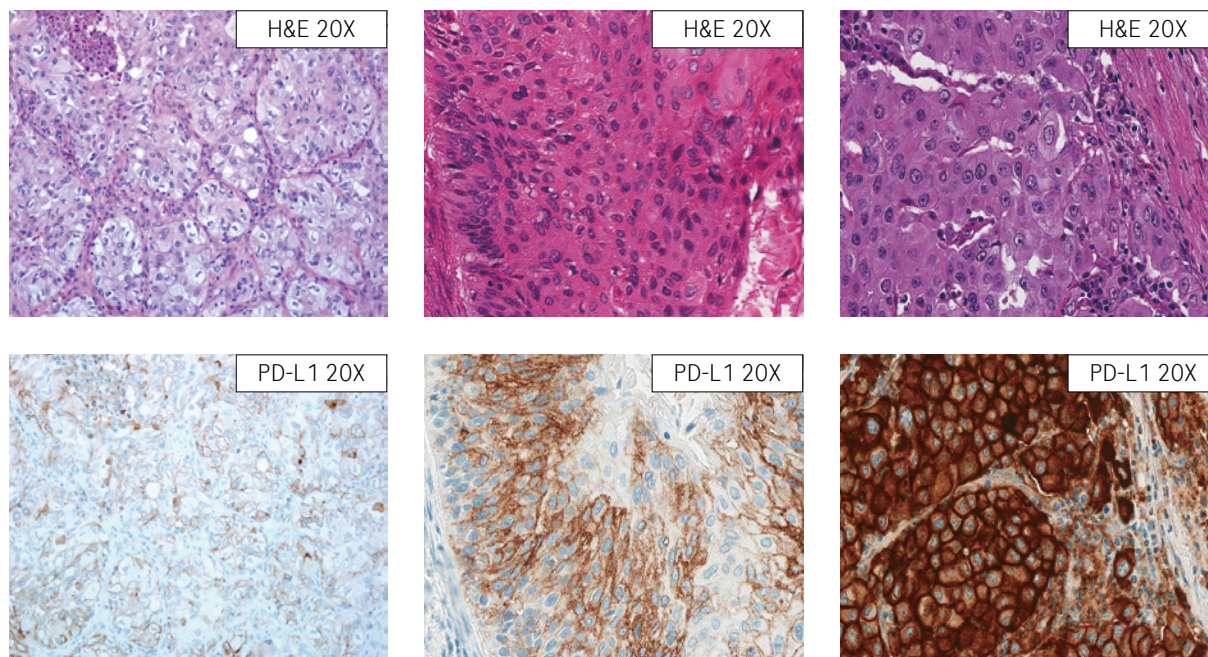
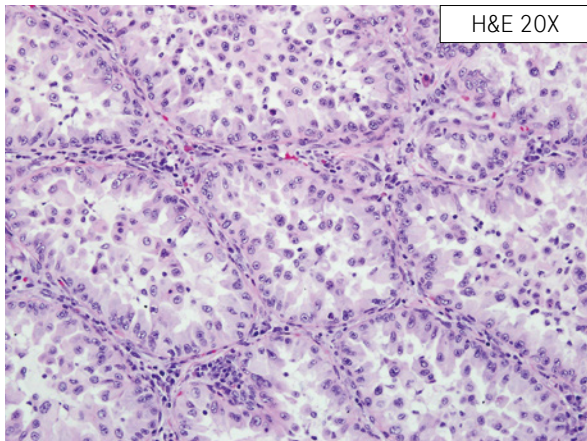
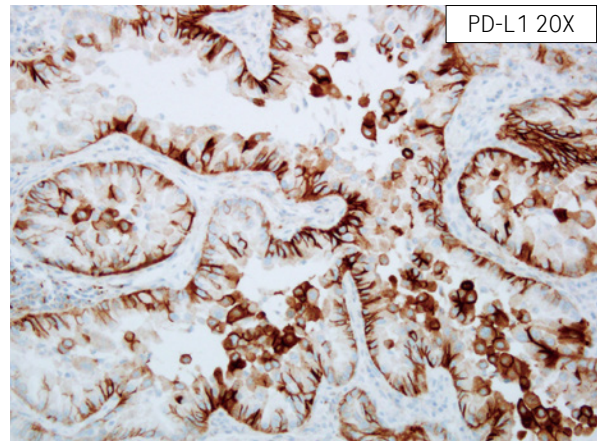


図1 非小細胞肺癌におけるH&E染色とPD-L1 (SP263) 染色
(左:弱い染まり、中央:中等度、右:強い染まり。いずれも陽性として判定する)

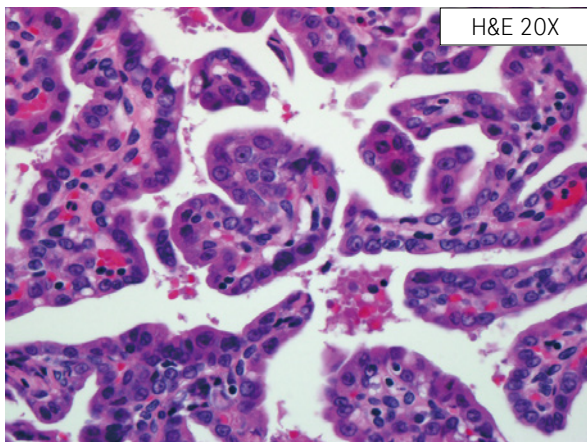


H&E 20X

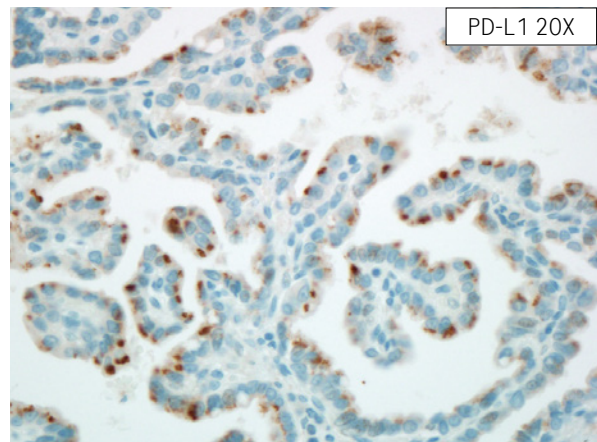


PD-L1 20X

図2 腫瘍細胞の細胞膜(基底・側方)に中等度から強い染色が認められる。

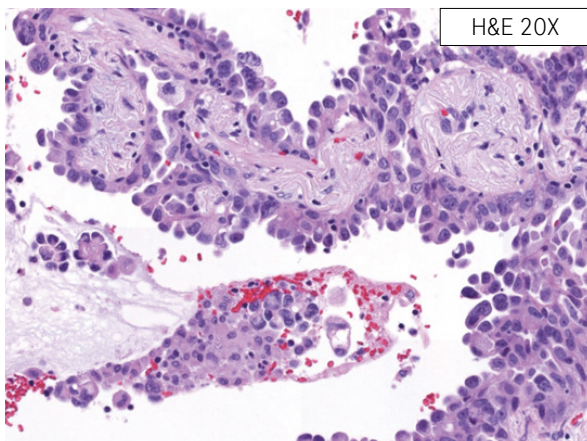


H&E 20X

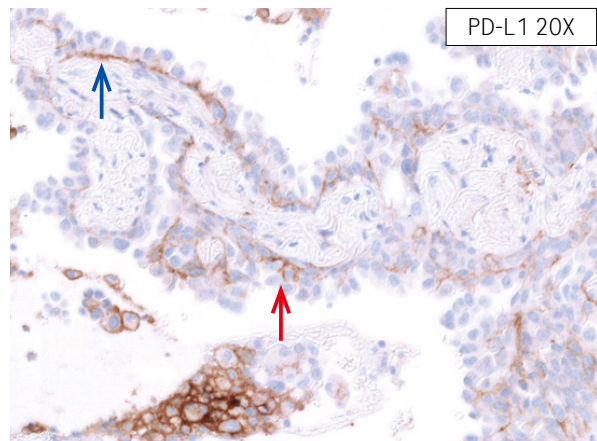


PD-L1 20X

図3 稀に腫瘍細胞内の核縁にドット状の染色が認められることがある。陽性染色には含めない。



H&E 20X



PD-L1 20X

図4 腫瘍細胞膜への染色性
細胞膜の全周に染まっている場合、もしくは、腫瘍細胞の基底側方に染まっているもの(赤矢印)のみを、PD-L1発現率の計測に陽性細胞として含める。腫瘍細胞に染まっていると断定できない場合(腫瘍周辺の免疫細胞や間質に由来する可能性がある場合)には、陽性細胞として含めるべきではない。(側方の染まりが認められず、腫瘍細胞の基底部分にのみ染まっている青矢印部分は、陽性としてカウントすべきではない。)

免疫細胞における染色態度(*判定対象とはならない)

免疫細胞は、陰性、弱～強いびまん性の細胞質／細胞膜染色といった様々な染色強度・染色パターンを示します。免疫細胞におけるPD-L1発現は、リンパ球、マクロファージ、組織球、形質細胞、好中球などで認められ、リンパ球では点状の染色パターンであることがほとんどです。マクロファージは膜状に染まり、腫瘍細胞への染色との鑑別が難しい場合があります。そのような場合にはH&E染色で確認してください。

クローンSP263を用いた非小細胞肺癌におけるPD-L1発現率の評価には免疫細胞は含まれないため、腫瘍細胞との鑑別が重要となります。以下にベンタナ OptiView PD-L1 (SP263) で染色した免疫細胞の染色例を示します。

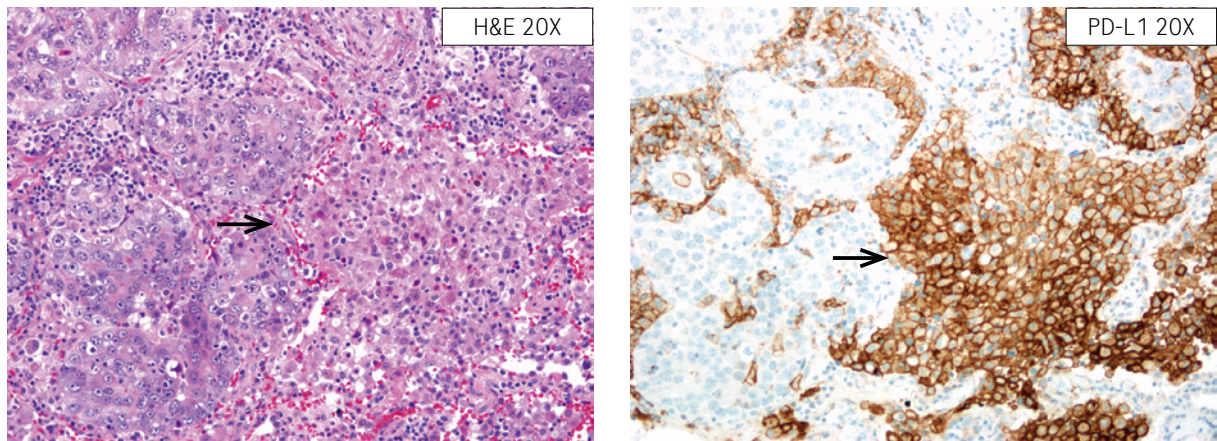


図5 肺胞マクロファージ(黒矢印)に強いPD-L1染色が認められる。(隣接する腫瘍細胞は陰性。)

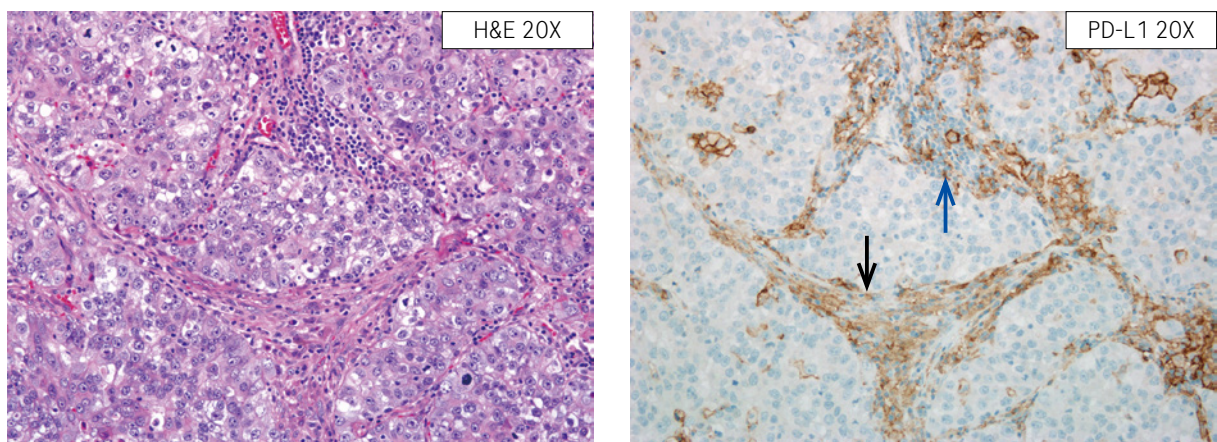


図6 顆粒状(青矢印)および、びまん性(黒矢印)の免疫細胞への染色が認められる。(隣接する腫瘍細胞は陰性。)

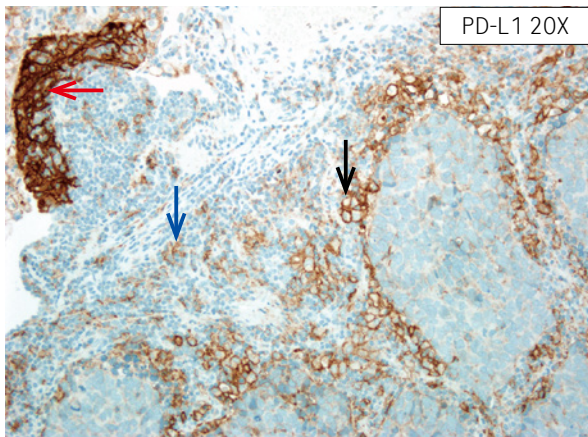
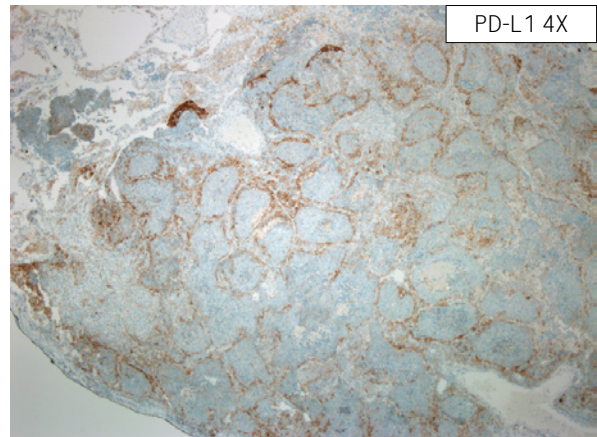
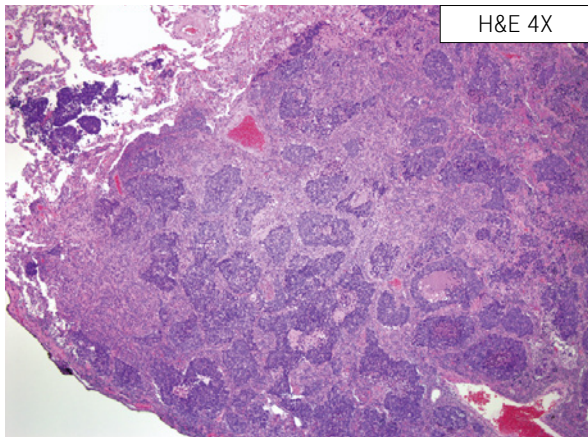
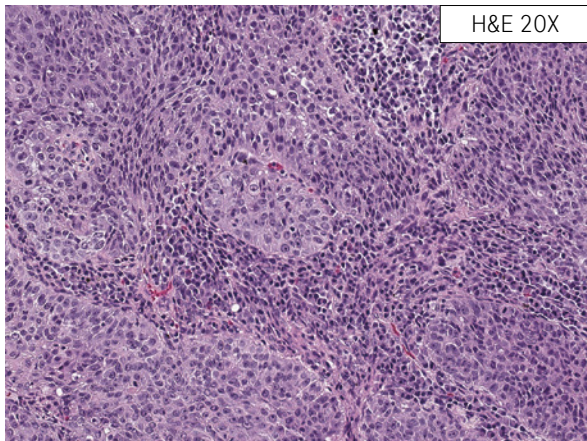
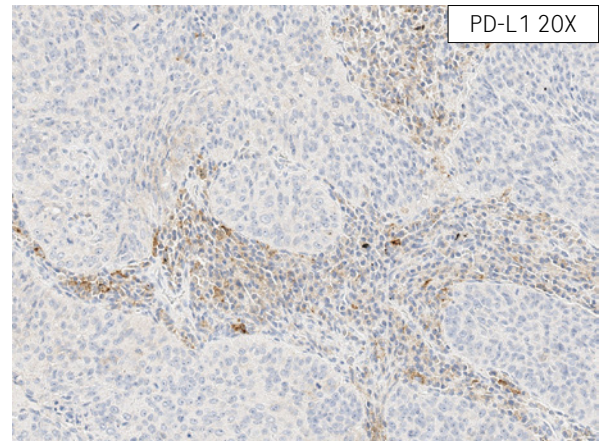


図7 上段の低倍率(対物レンズ4倍)の画像では、一見、腫瘍細胞に染まっているように見えるが、下段の高倍率(対物レンズ20倍)画像で詳細に観察すると、膜状(黒矢印)および顆粒状(青矢印)の染色が認められるのは免疫細胞であり、腫瘍細胞では陰性であることがわかる。樹状細胞への強い染まりも認められる(赤矢印)。

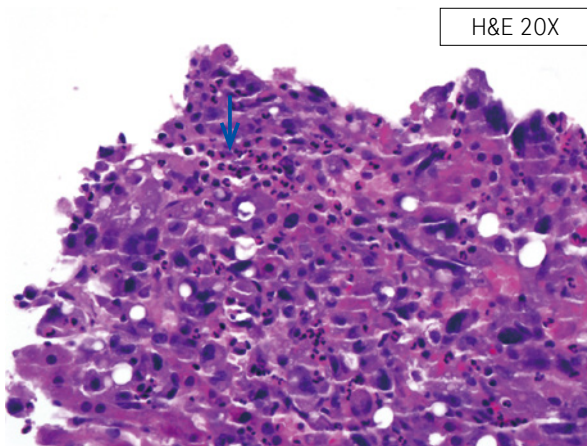


H&E 20X

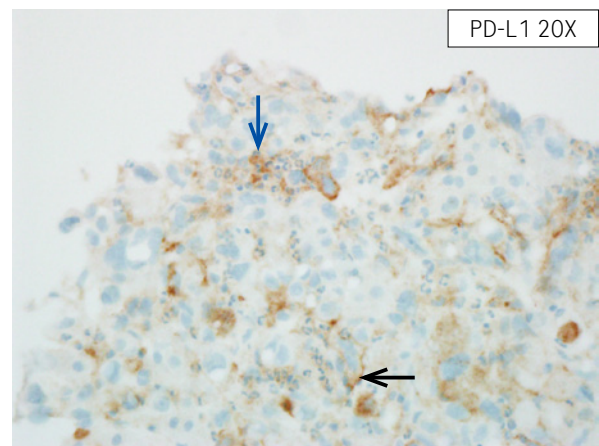


PD-L1 20X

図8 弱から中程度のびまん性染色が形質細胞の細胞質に認められる。(周囲の腫瘍細胞は陰性。)



H&E 20X



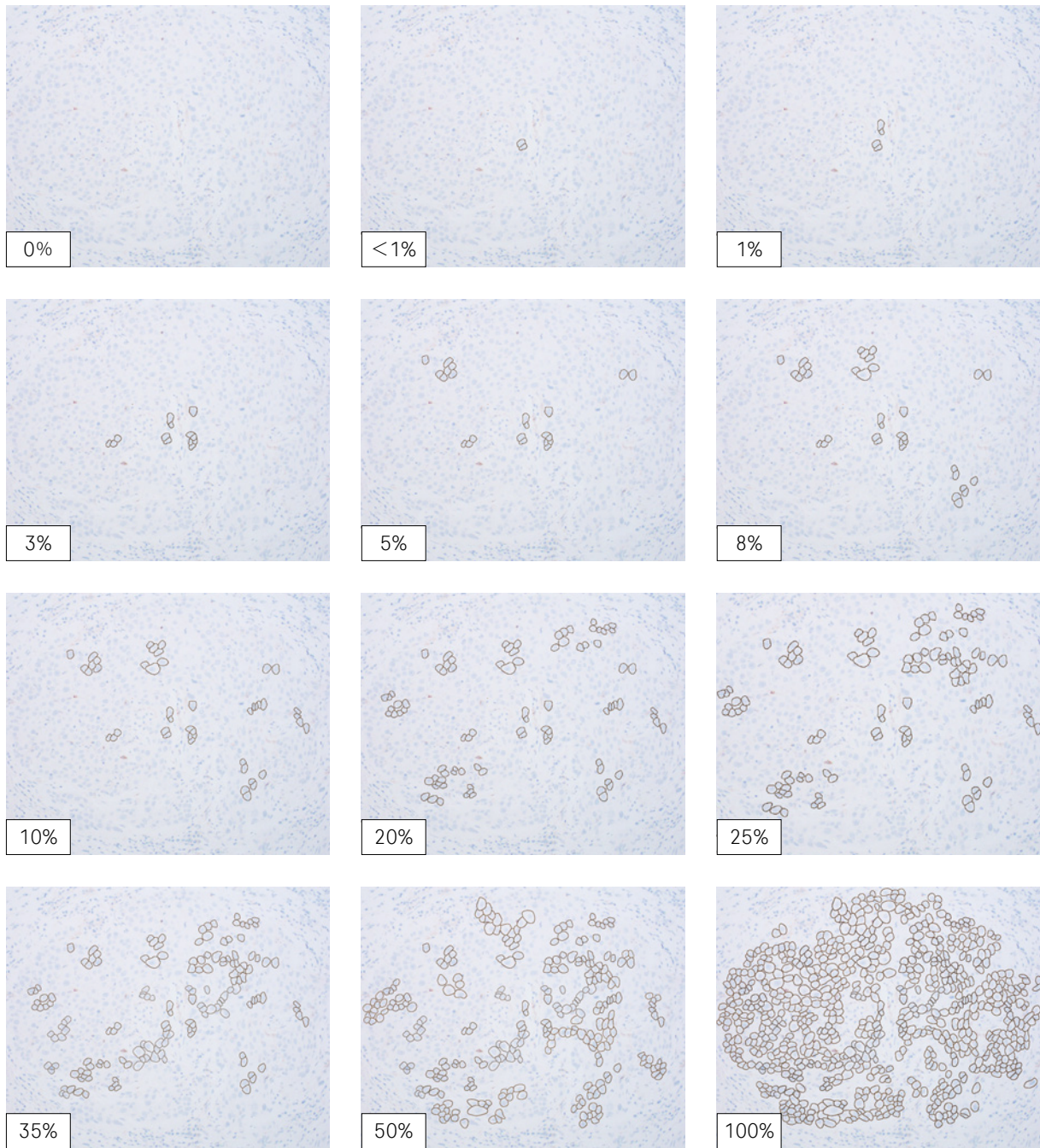
PD-L1 20X

図9 PD-L1発現を示す好中球(青矢印)が認められる。また、本症例では、腫瘍細胞にも中程度の細胞膜染色(黒矢印)が認められる。

陽性率の算出イメージ

約450個の腫瘍細胞を含む非小細胞肺癌症例において、各陽性率でのPD-L1染色細胞の含有割合を模式的に示しています(下図)。実際には、症例ごとに腫瘍細胞の密度などが異なるため、母数となる腫瘍細胞と染色されている腫瘍細胞の両方の把握が重要になります。

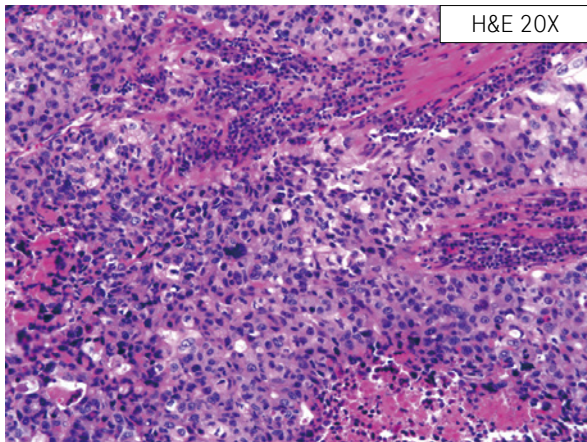
陽性率の判定は、病理医により行ってください。



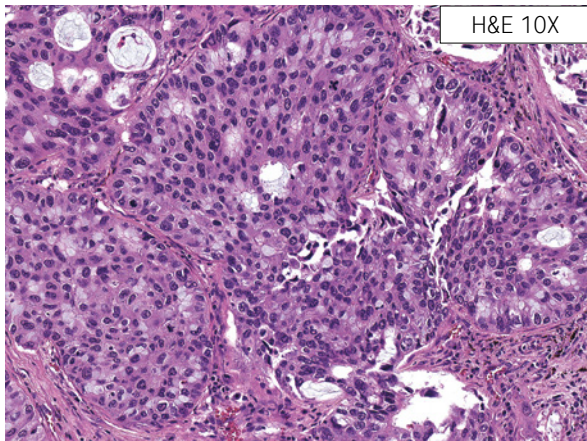
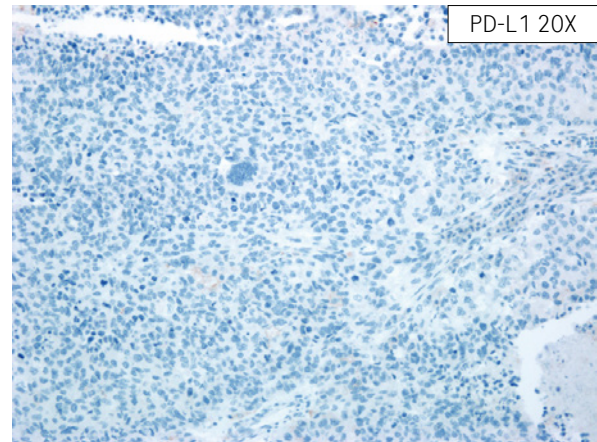
実際の染色例

判定に迷う症例などを含めた、非小細胞肺癌におけるペンタナ OptiView PD-L1 (SP263) の染色例をご紹介します。

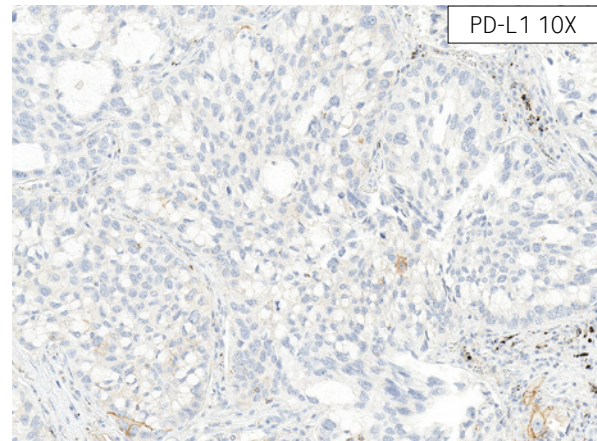
非小細胞肺癌の腫瘍細胞における細胞膜への染色は様々な染色強度で認められます。弱陽性の染色は低倍率での特定が難しい場合があるため、倍率をあげて詳細に観察することが重要です。また、低倍率での観察だけでは、免疫細胞への染色が腫瘍細胞への染まりのように見えることもあるため、注意が必要です。

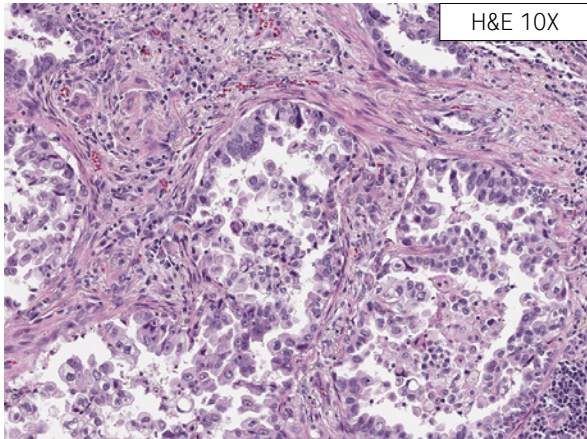


症例1 腫瘍細胞および免疫細胞ともに陰性

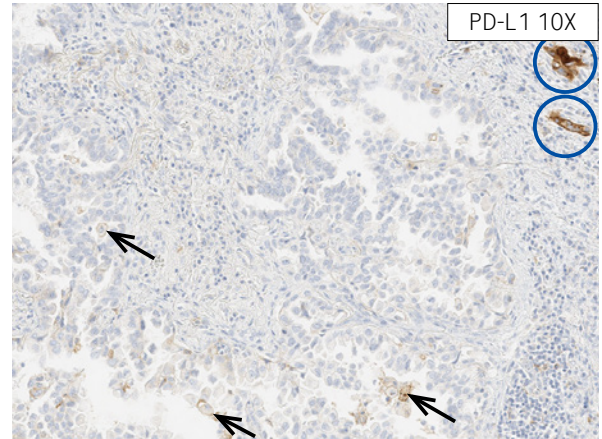


症例2 細胞膜に陽性反応が認められる腫瘍細胞が1%未満





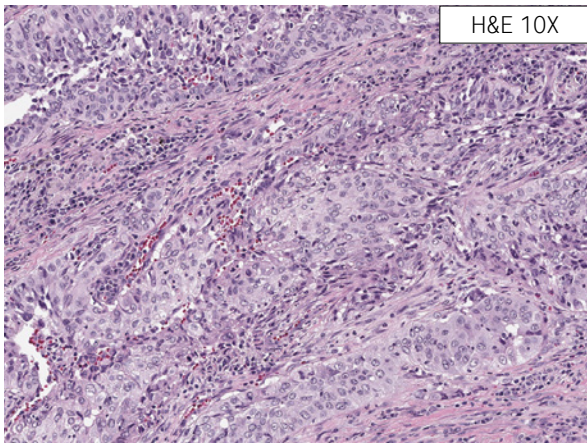
H&E 10X



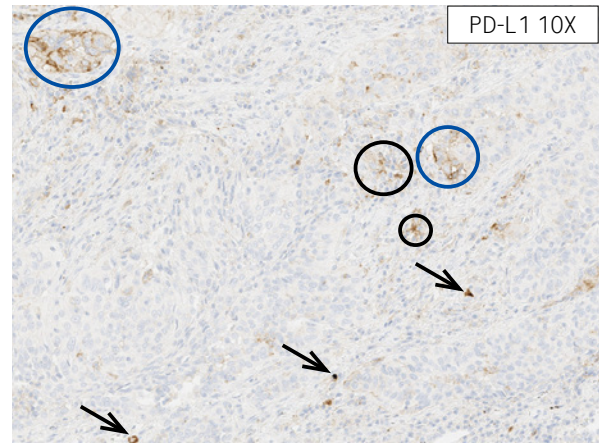
PD-L1 10X

症例3 腫瘍細胞の1%に膜染色が認められ(青い円)、散在性の肺胞マクロファージに弱い細胞膜染色を示す(黒矢印)。

肺胞マクロファージへの染まりは、腫瘍細胞と似ていることがあるため、迷う場合にはH&E染色での確認が有用です。

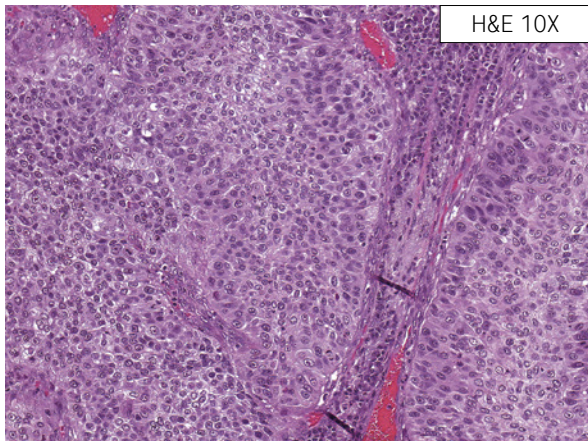


H&E 10X

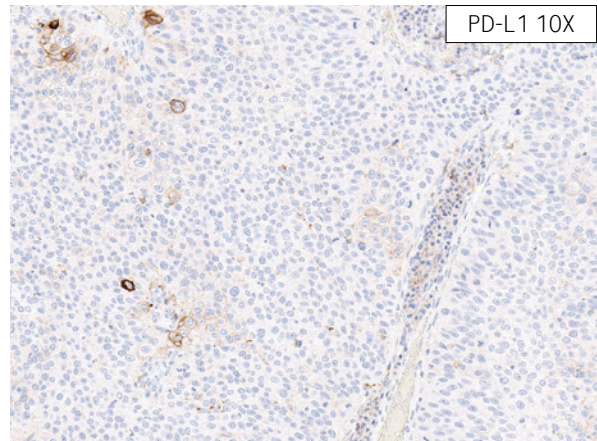


PD-L1 10X

症例4 腫瘍細胞の3%に膜染色が認められ(青い円)、散在性の免疫細胞に顆粒状の染色を示す(黒矢印と円)。

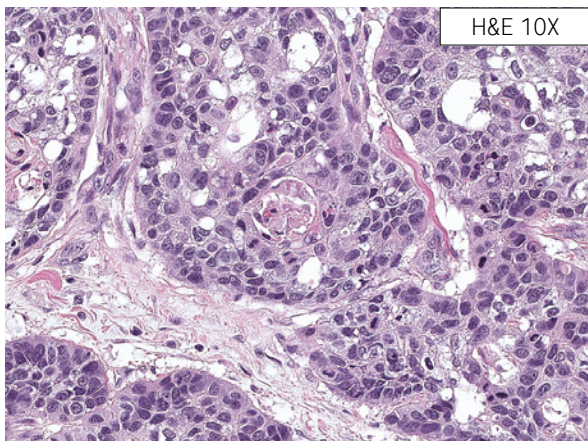


H&E 10X

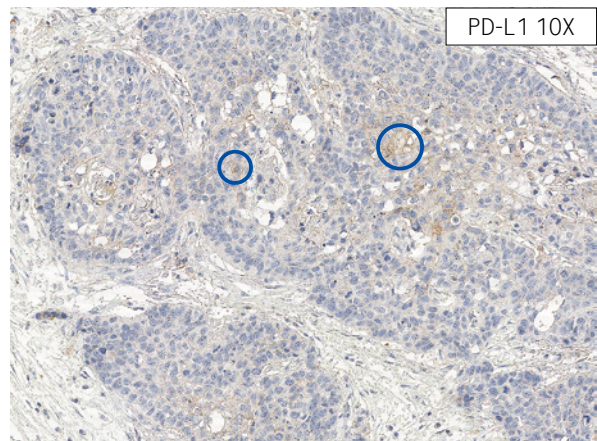


PD-L1 10X

症例5 腫瘍細胞の約2%に陽性反応が認められる

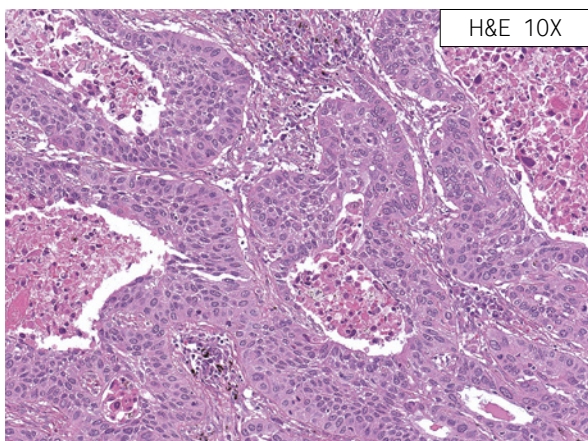


H&E 10X

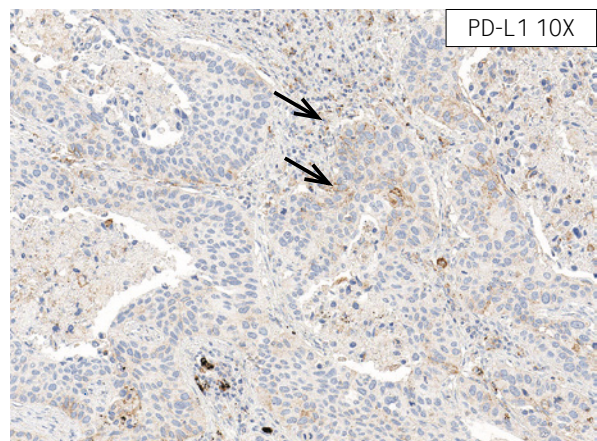


PD-L1 10X

症例6 腫瘍細胞の約3%に陽性反応が認められる。細胞質にかすかな染まりが認められるが、陽性とは判定しない(青い円)。

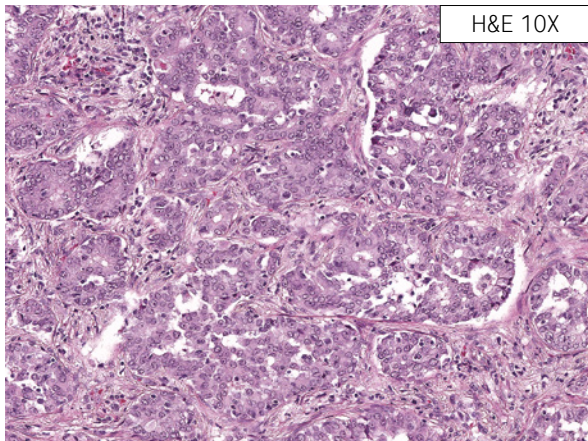


H&E 10X

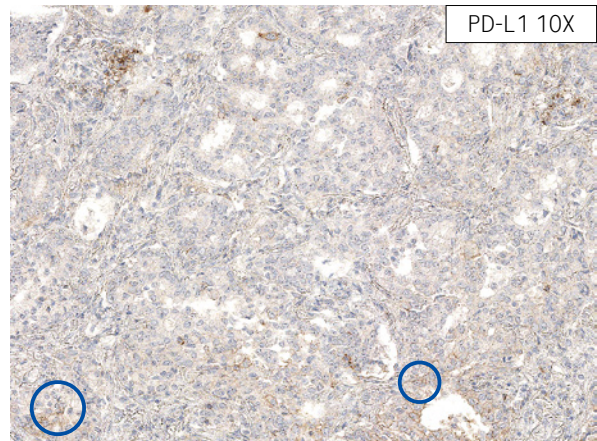


PD-L1 10X

症例7 腫瘍細胞の約4%に陽性反応が認められる。免疫細胞にも弱い染まりが認められるが、陽性細胞には含めない(黒矢印)。

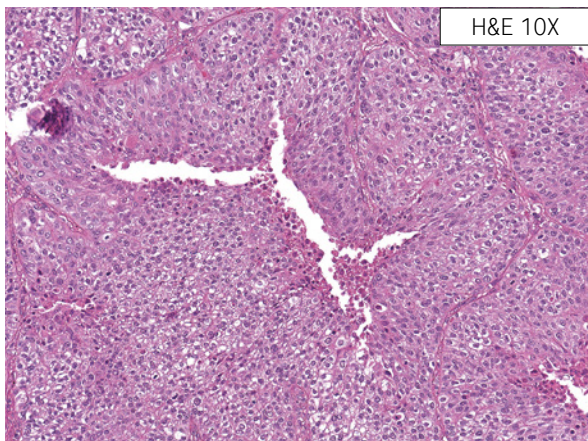


H&E 10X

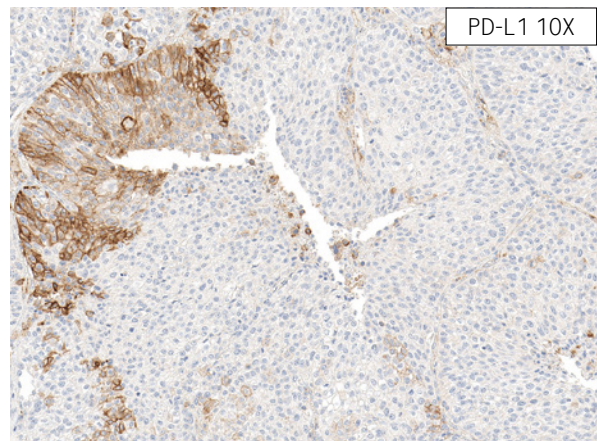


PD-L1 10X

症例8 腫瘍細胞の約7%に陽性反応が認められる。弱い染まりであっても腫瘍細胞の細胞膜への染まりは陽性と判定する。

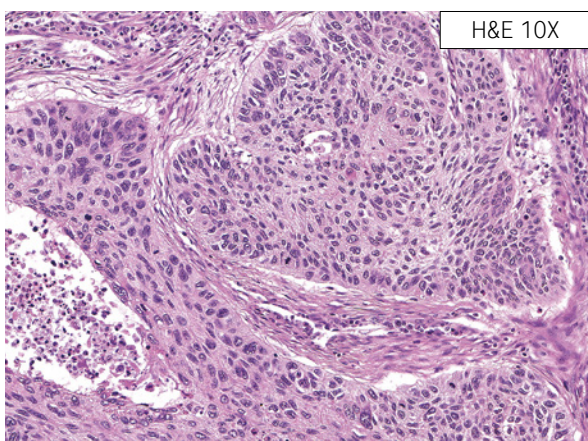


H&E 10X

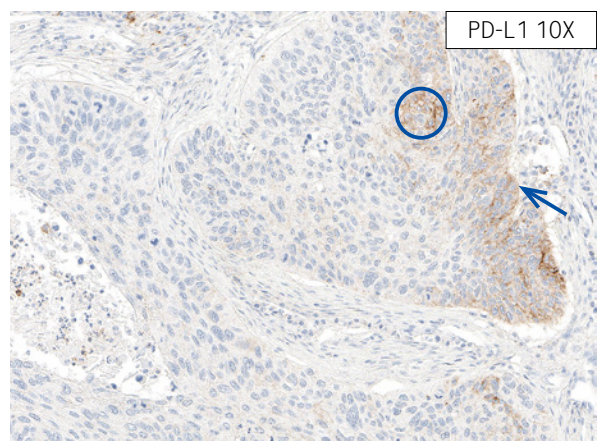


PD-L1 10X

症例9 細胞膜に陽性反応が認められる腫瘍細胞が約9%存在する。強い染まり以外にも腫瘍細胞の細胞膜への弱い染まりも陽性細胞に含める。

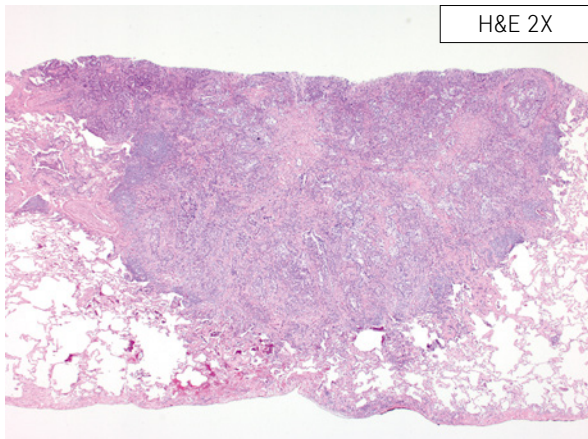


H&E 10X

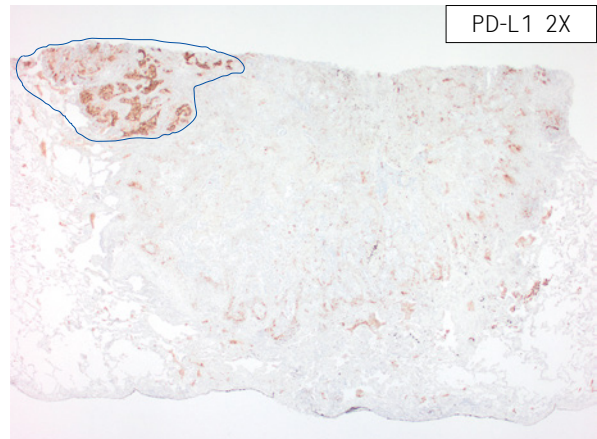


PD-L1 10X

症例10 腫瘍細胞の約12%に陽性反応が認められる。腫瘍細胞の細胞膜への染まり(青い円)に加えて、腫瘍細胞の細胞質への染まり(青矢印)も認められるが、細胞質のみへの染まりは陽性と判定しない。

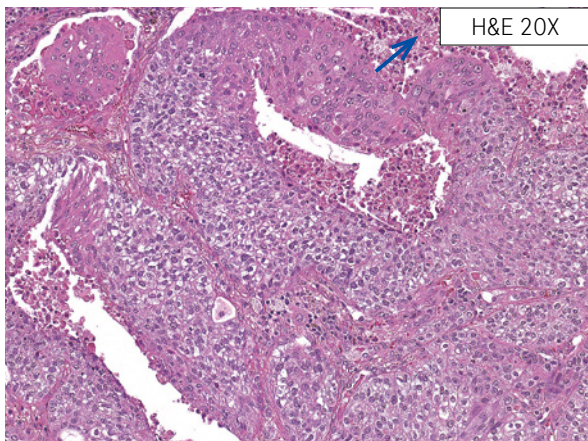


H&E 2X

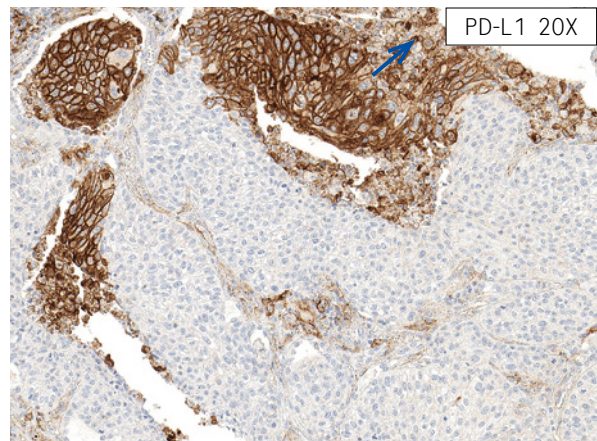


PD-L1 2X

症例11 腫瘍細胞の約15%に陽性反応が認められる(青枠内)。腫瘍浸潤の免疫細胞にも染色が認められるが、陽性細胞には含まない。

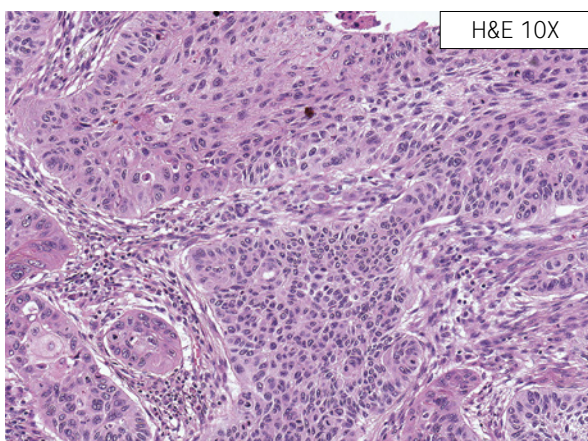


H&E 20X

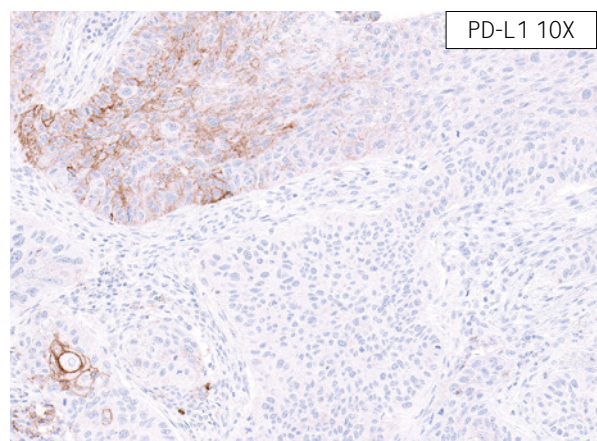


PD-L1 20X

症例12 細胞膜に染色が認められる腫瘍細胞が全体の約20%を占める。壊死部(青矢印)にも着色が認めらるが、陽性細胞に含めない。

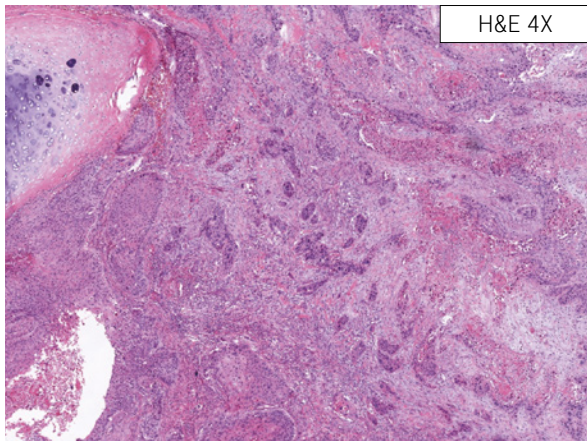


H&E 10X

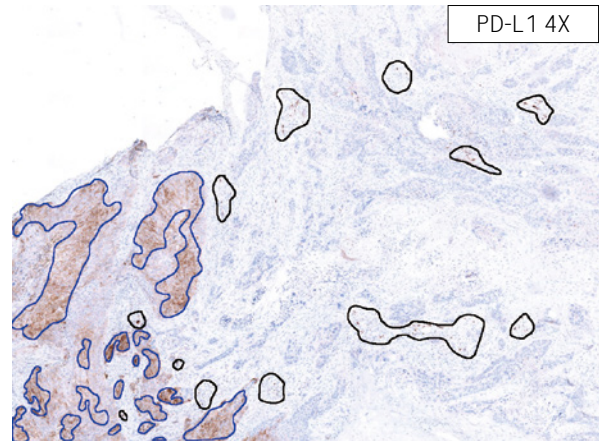


PD-L1 10X

症例13 腫瘍細胞の約25%に陽性反応が認められる。

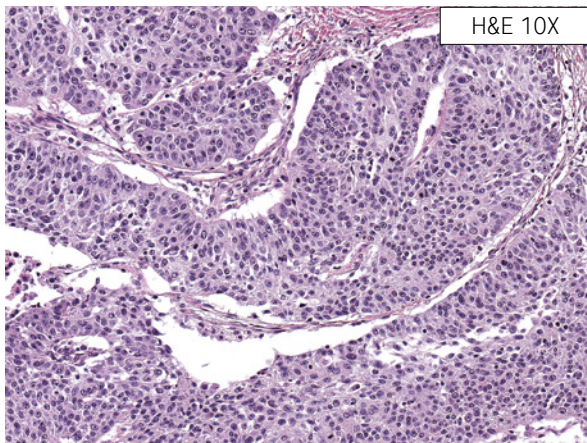


H&E 4X

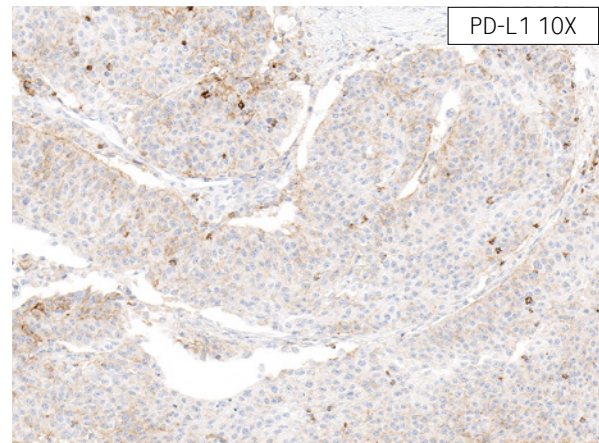


PD-L1 4X

症例14 腫瘍細胞の35%に膜染色が認められ(青枠)、PD-L1発現を示す免疫細胞も含まれている(黒枠)。

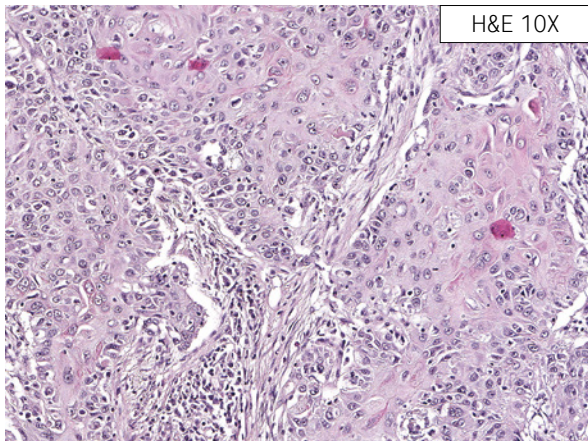


H&E 10X

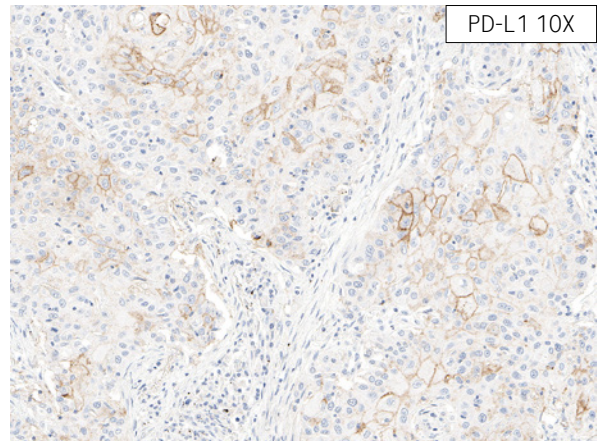


PD-L1 10X

症例15 腫瘍細胞の約35%に細胞膜への染色が認められる。腫瘍細胞の多くは細胞質におけるかすかな染色を示し、約3分の1では弱～中程度の細胞膜染色への染色が認められる。

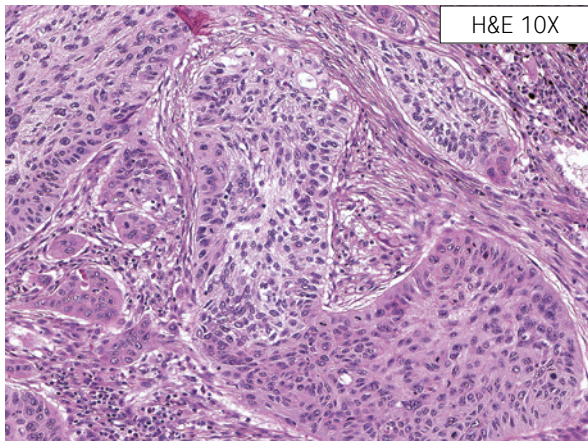


H&E 10X

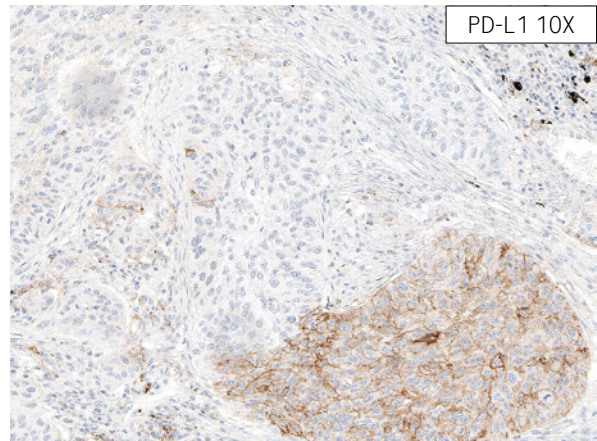


PD-L1 10X

症例16 腫瘍細胞の約40%に陽性反応が認められる。弱い染まりであっても、腫瘍細胞の細胞膜への染まりは陽性と判定する。

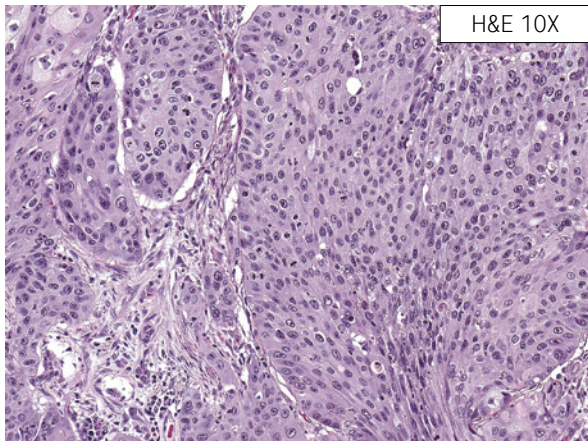


H&E 10X

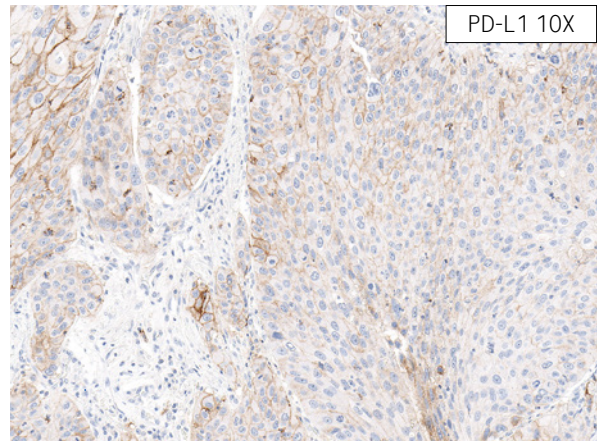


PD-L1 10X

症例17 約半数 (50%) の腫瘍細胞において陽性反応が認められる。

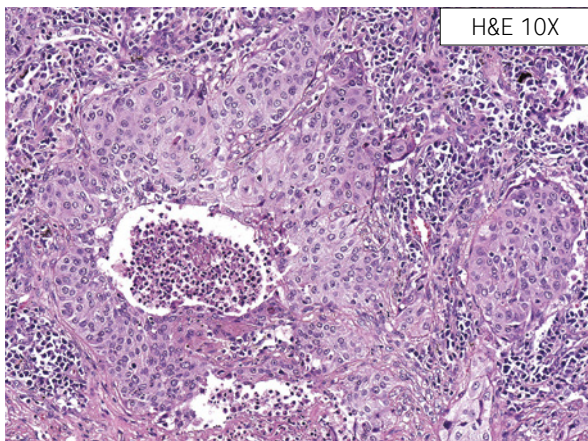


H&E 10X

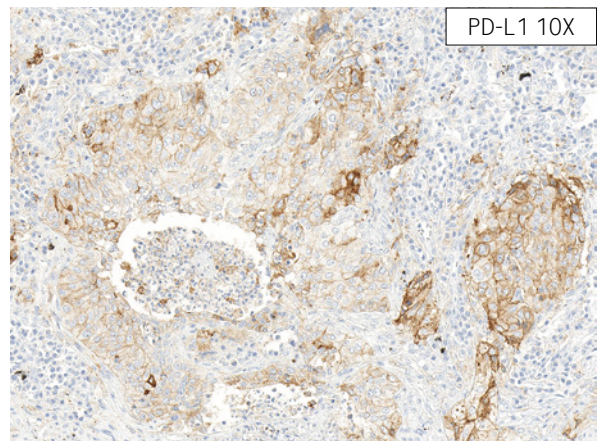


PD-L1 10X

症例18 腫瘍細胞の約75%において陽性反応が認められる。

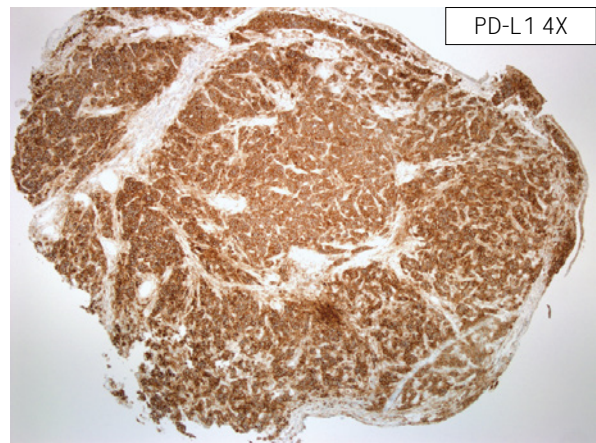
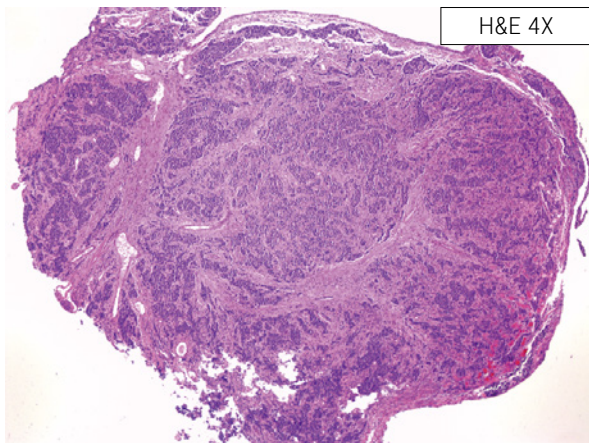


H&E 10X

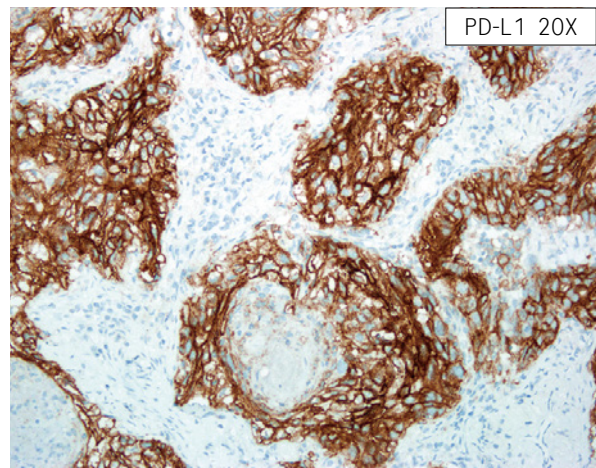
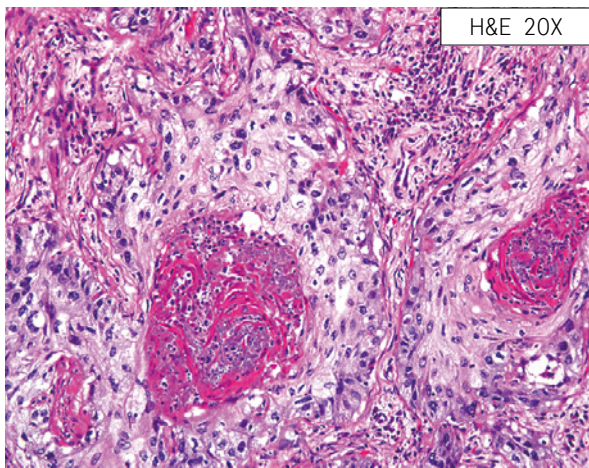


PD-L1 10X

症例19 腫瘍細胞の約85%において陽性反応が認められる。



症例20 すべての腫瘍細胞(100%)の細胞膜に染色が認められる。



症例21 腫瘍細胞のすべてに陽性反応が認められ、腫瘍浸潤免疫細胞および腫瘍周囲免疫細胞への染まりは認められない。

判定に注意が必要なケース

染色パターンや細胞の形態などによって、腫瘍細胞への染色性の判定および陽性率の算出を難しくさせる場合があります。

以下の現象によって、特に判定が難しくなる症例があります。

細胞質への弱い染まり

腫瘍細胞の細胞質にのみ弱い染色性を示す場合があります。低倍率での観察では、腫瘍細胞の細胞膜への染まりのように見えることがあるため、細胞膜と細胞質への染まりを鑑別するために、より高倍率での確認が必要です。

PD-L1発現が認められる腫瘍細胞に重なっている免疫細胞への強い染まり

腫瘍の周囲および腫瘍内に浸潤した広範囲な炎症成分を含んでいる症例があります。腫瘍細胞と免疫細胞の両方に強い染まりが認められる場合、腫瘍細胞のPD-L1発現のみを選んで陽性率を算出することが難しいことがあります。腫瘍に浸潤している免疫細胞は、H&Eスライドで形態学的に確認してください。また、形態学的な特徴に加えて、PD-L1の染色態度（腫瘍細胞は線状の膜染色、マクロファージや樹状細胞以外の免疫細胞の多くは点状）が両者を見分けるのに役立ちます。

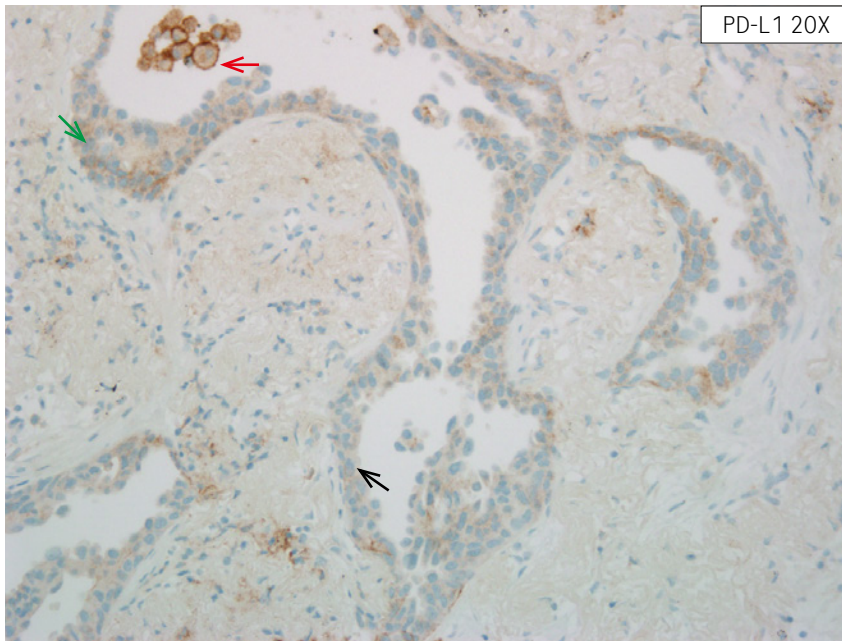
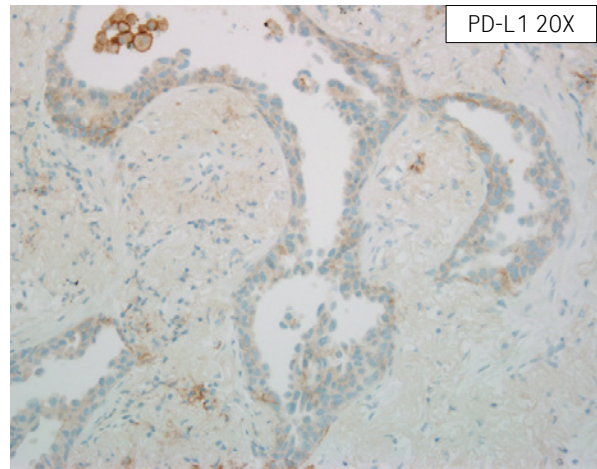
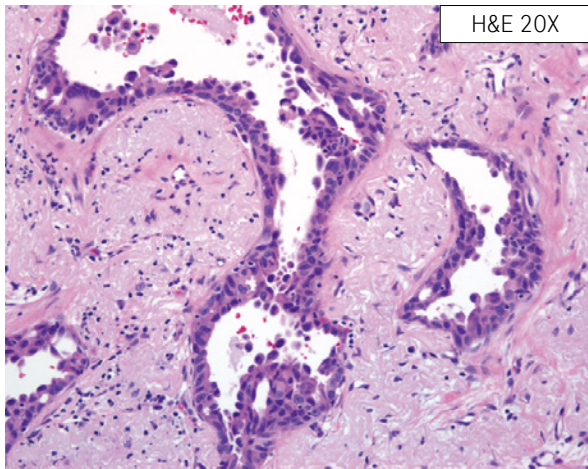
内因性／外因性の含有物

非小細胞肺癌検体では、時折、炭粉色素、メラニン色素、ヘモジデリンなどのような内因性および外因性の物質が、腫瘍および免疫細胞へのPD-L1(SP263)染色の解釈の際に邪魔になることがあります。陰性コントロール試薬を用いて染色した検体スライドと比較することで、特異的なPD-L1発現と内因性／外因性物質を鑑別することが可能になります。ケラチン形成を伴う非小細胞肺癌では、異物巨細胞の中に組織球応答が誘発されることがあり、腫瘍細胞の細胞膜への染色に似ている場合があります。

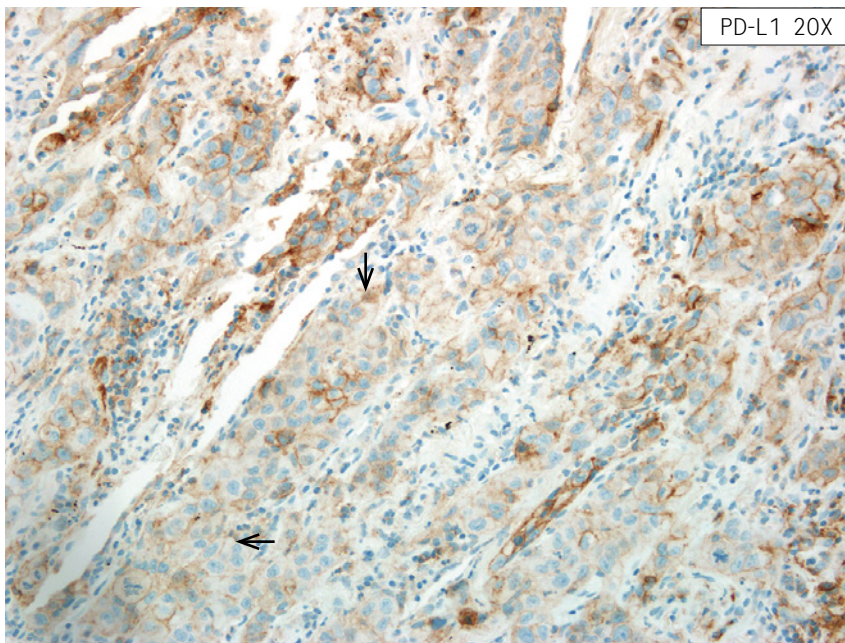
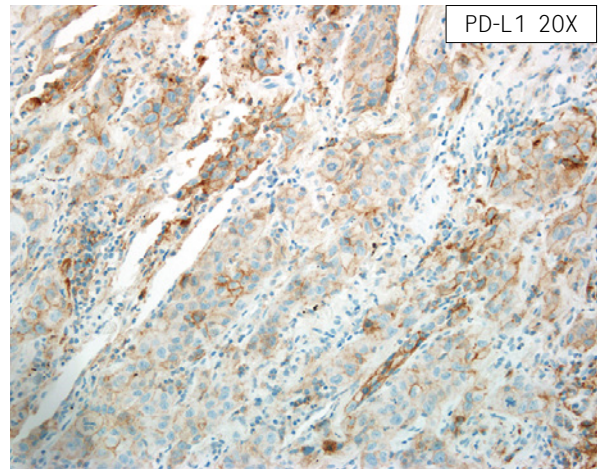
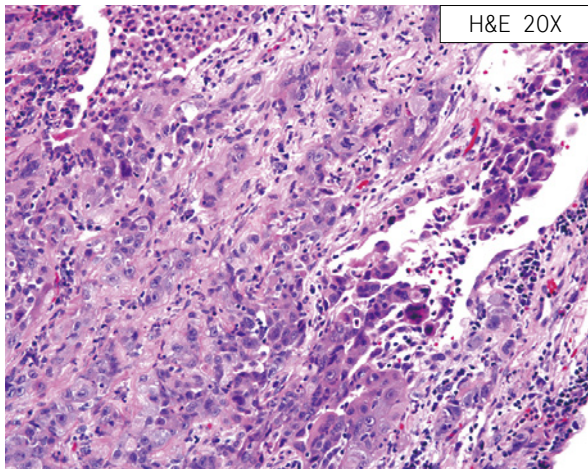
発現の不均一性

PD-L1染色の不均一な発現分布が認められる場合、腫瘍細胞における陽性率の算定が難しくなります。腫瘍全体をいくつかの小さなエリアに等分し、各エリアでの陽性率を算出した後、平均化する方法が有用です。

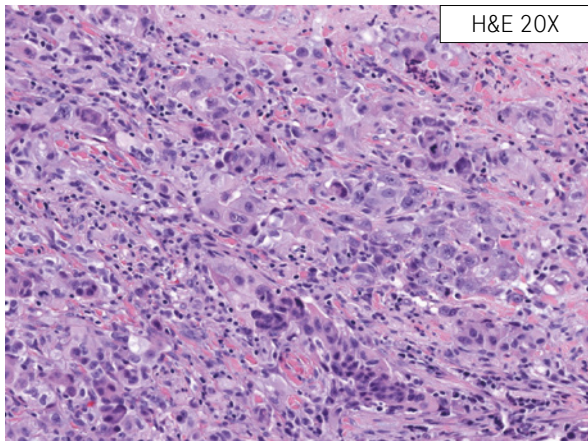
次ページ以降に、判定が難しい症例を例示します。



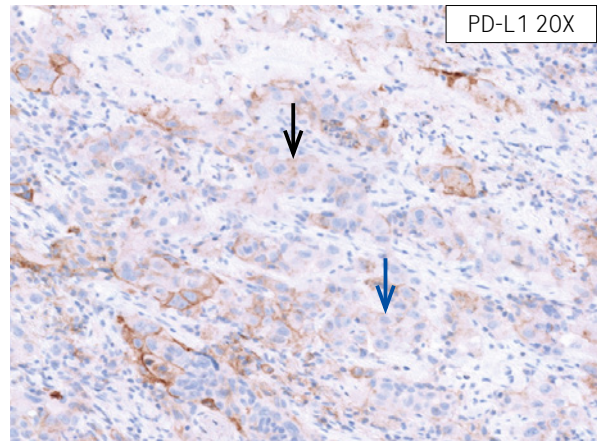
症例22 腫瘍細胞の細胞膜への弱い染色(緑矢印)と細胞質に弱い染色(黒矢印)が認められる。また、肺泡マクロファージ(赤矢印)にも染まっているため、腫瘍細胞と免疫細胞(マクロファージ)、細胞膜/細胞質への染色を鑑別するためには、高倍率での観察が有用となる。この視野内では、腫瘍細胞の約10%に細胞膜染色を認める。



症例23 多くの腫瘍細胞では細胞質への染まりを伴っているが、強度にかかわらず細胞膜への染まりがあれば陽性と判断されるため、この視野では腫瘍細胞の約90%が陽性と判定される。

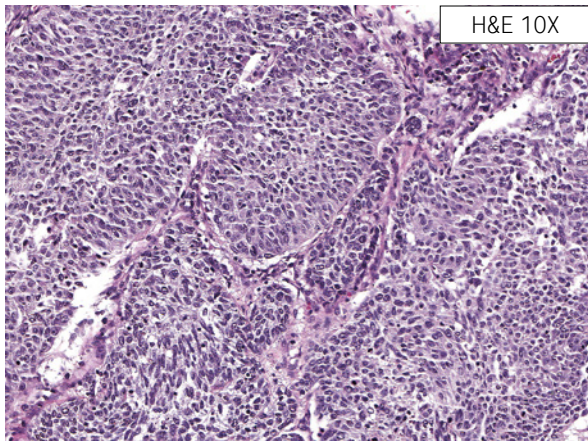


H&E 20X

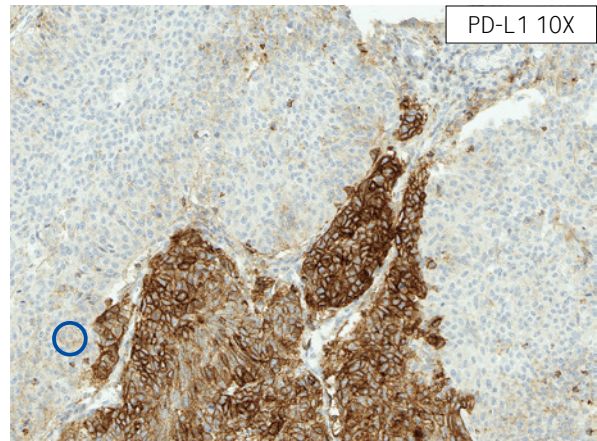


PD-L1 20X

症例24 細胞膜への弱い染色(青矢印)と細胞膜と細胞質の両方へ弱い染まりを示す腫瘍細胞(黒矢印)を認める。この視野内では、約90%の腫瘍細胞に細胞膜染色を認める。

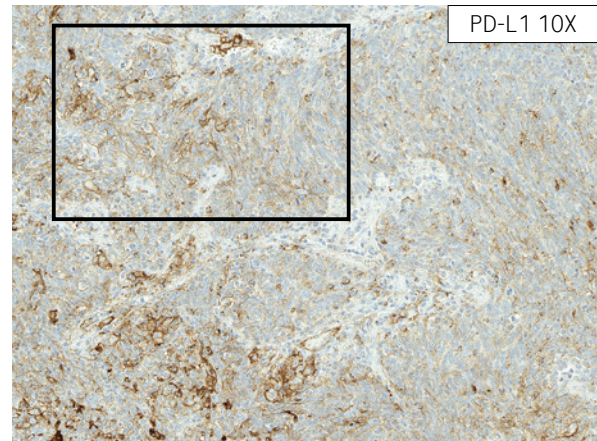
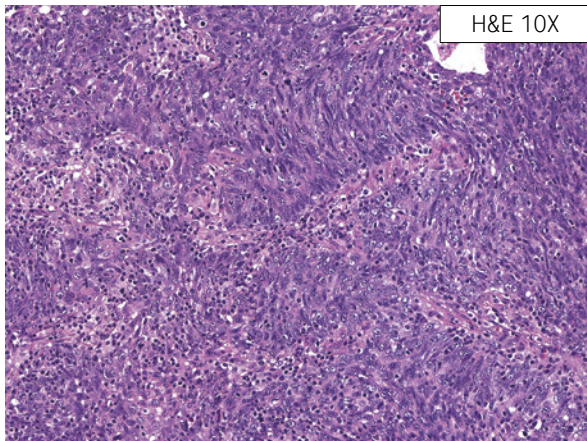


H&E 10X

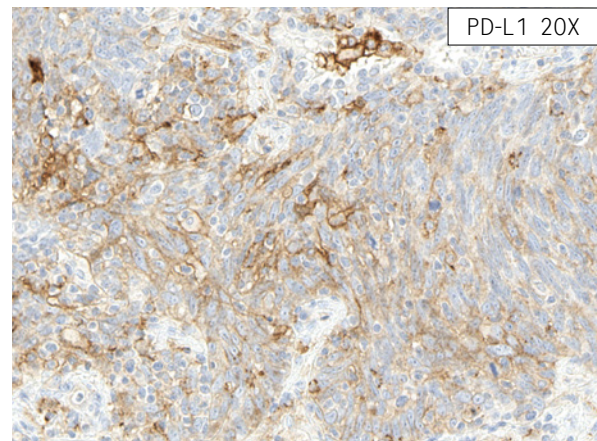
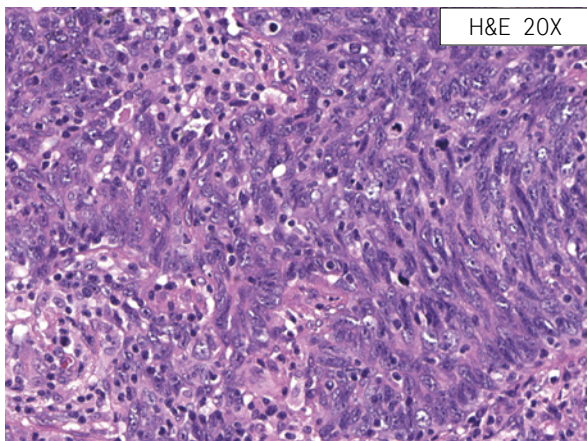


PD-L1 10X

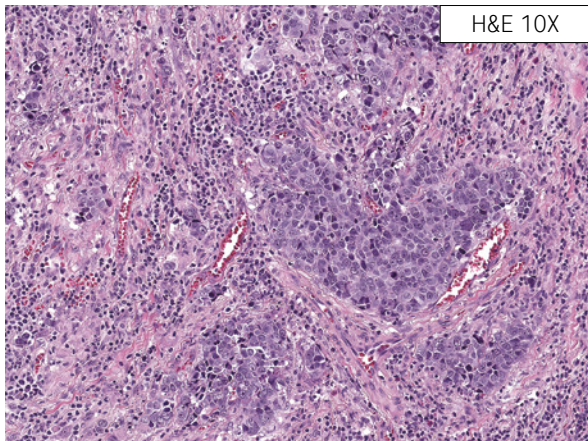
症例25 強陽性の腫瘍細胞だけでなく、弱い染まりの腫瘍細胞(青い円)も見落とさないように高倍率で観察する。



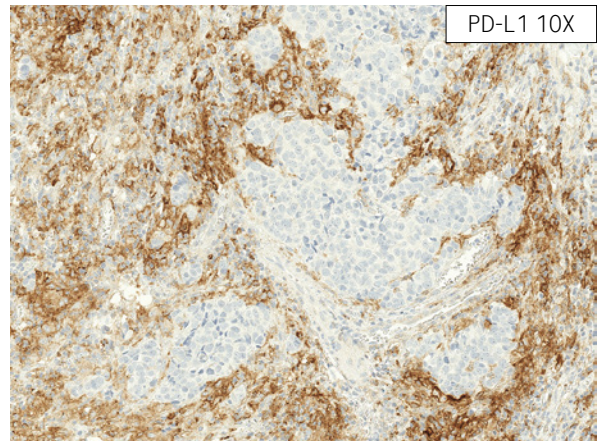
症例26-1 腫瘍細胞と免疫細胞の両方に染まりが認められる症例。



症例26-2 症例26-1の黒枠部分の拡大像。陽性反応が腫瘍細胞への染まりであるか免疫細胞への染まりであるかを判断するためには、高倍率でH&Eと比較し、染色の特徴を確認する。
この例では腫瘍細胞における細胞膜染色(陽性に含む)、腫瘍細胞における細胞質染色(陽性に含めない)、免疫細胞への染まり(陽性に含めない)が認められる。

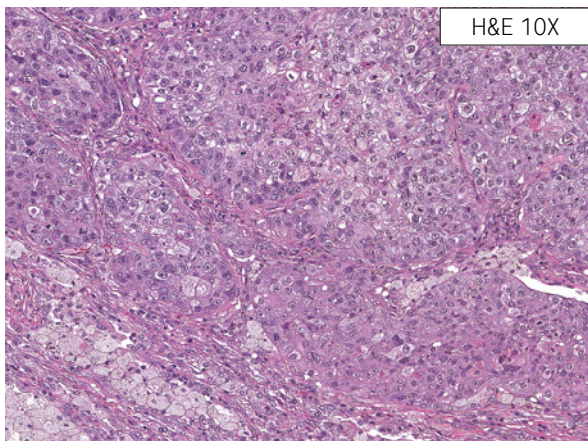


H&E 10X

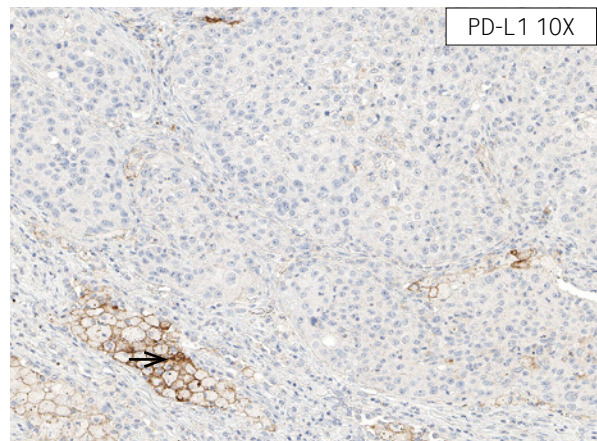


PD-L1 10X

症例27 免疫細胞への染まりがメインの症例。免疫細胞への染まりは陽性細胞には含めない。

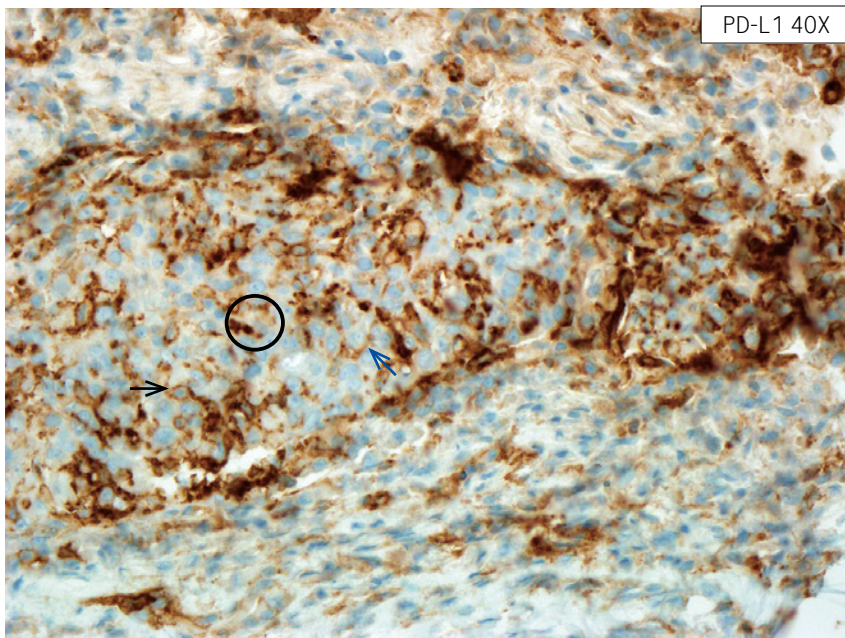
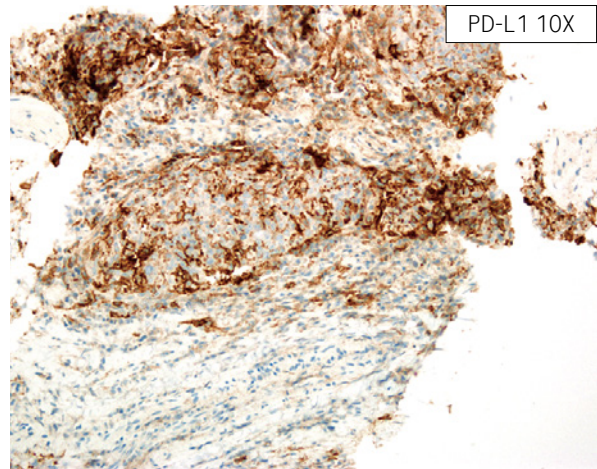
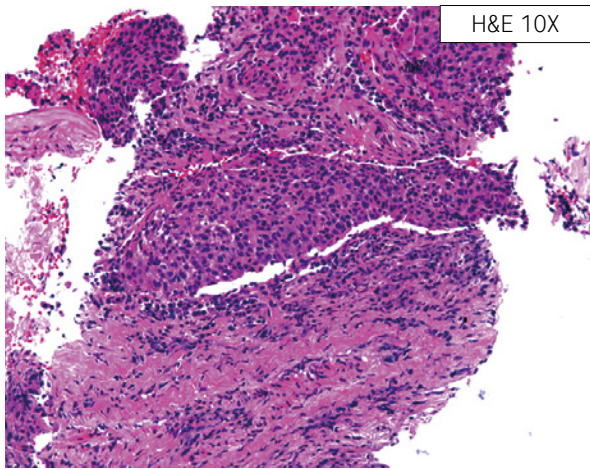


H&E 10X

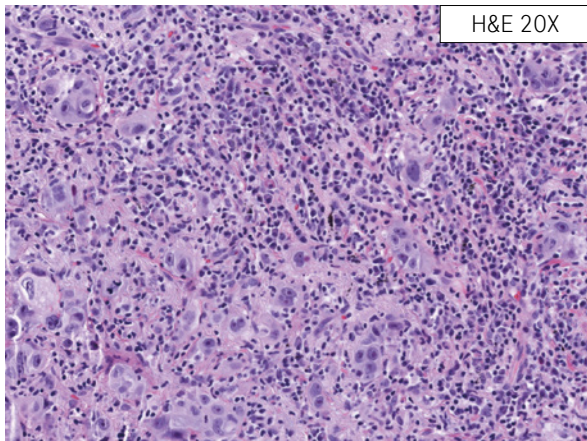


PD-L1 10X

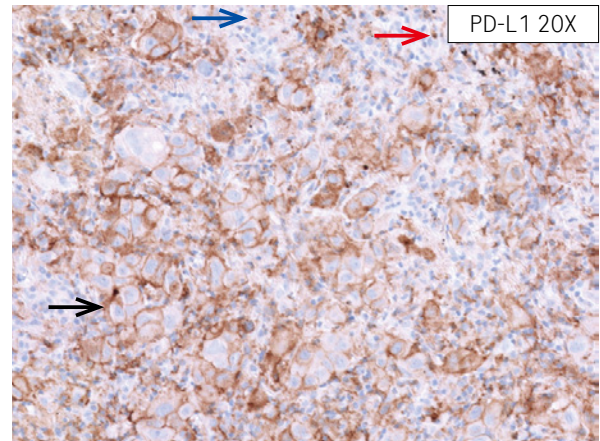
症例28 マクロファージへの染色(黒矢印)。マクロファージは中程度から強い膜染色を示すことがあるが、陽性細胞には含めない。



症例29 炎症性細胞を多く含んだ症例。部分的な膜染色を示す腫瘍細胞(青矢印)に混在して、免疫細胞への膜状の染色(黒矢印)および点状の染色(黒い円)を認める。この視野内では、腫瘍細胞の約40%で細胞膜染色が認められる。免疫細胞と腫瘍細胞の鑑別はH&E染色にて確認する。

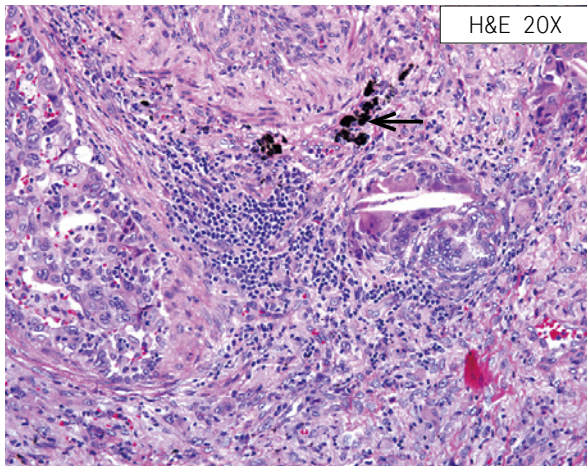


H&E 20X

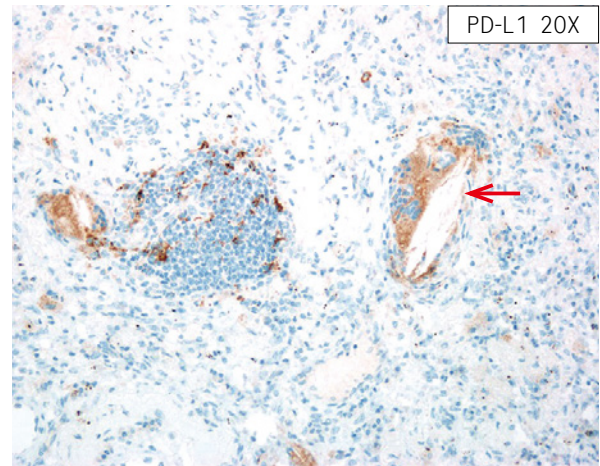


PD-L1 20X

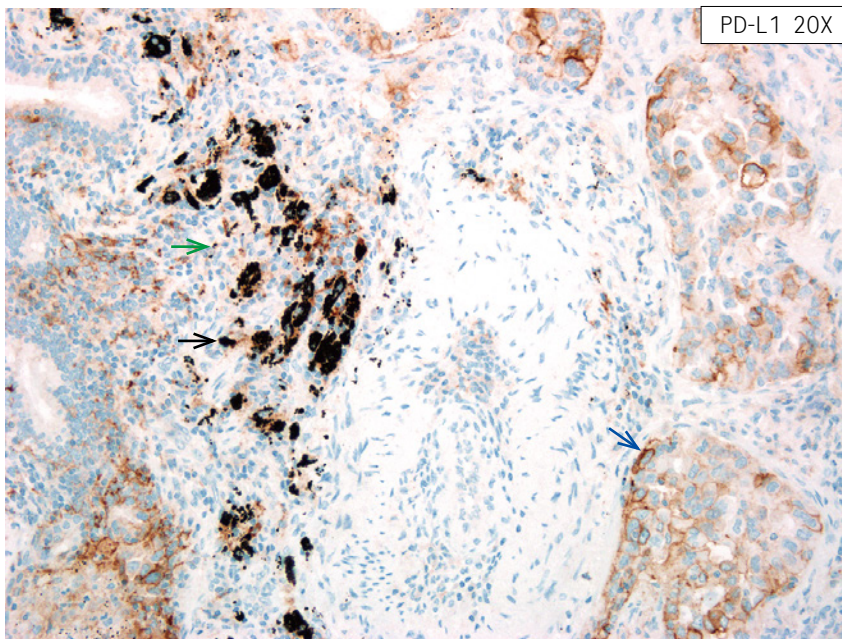
症例30 腫瘍細胞の細胞膜への染色(黒矢印)と、免疫細胞への点状(赤矢印)およびびまん性染色(青矢印)が混在している。この視野内では、ほぼすべての腫瘍細胞(100%)の細胞膜に染色を認める。



H&E 20X

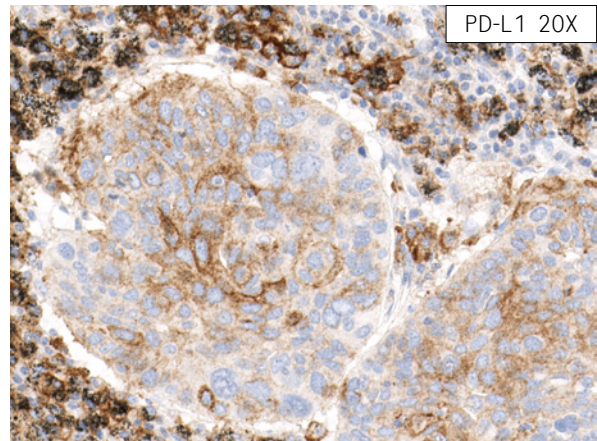
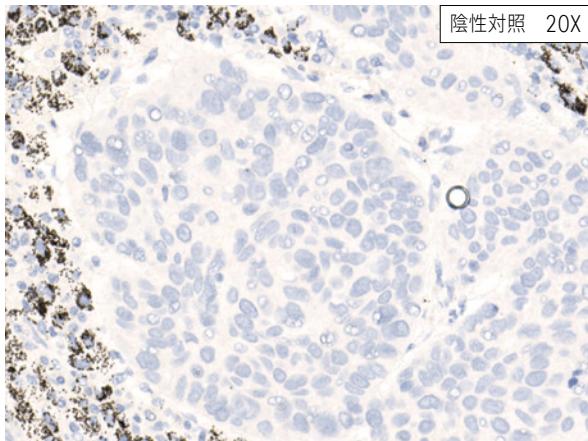


PD-L1 20X

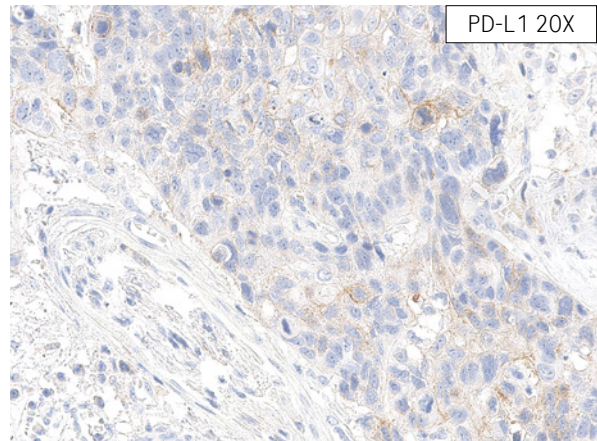
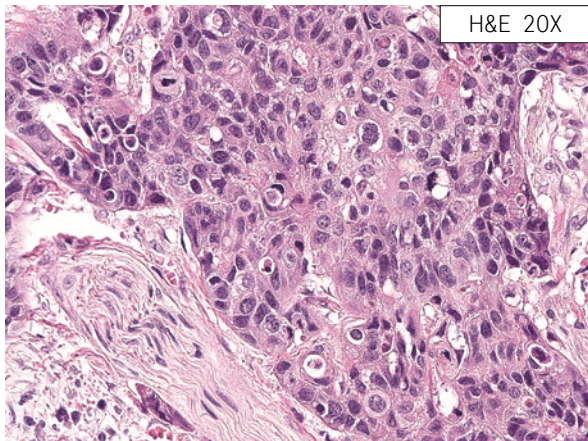


PD-L1 20X

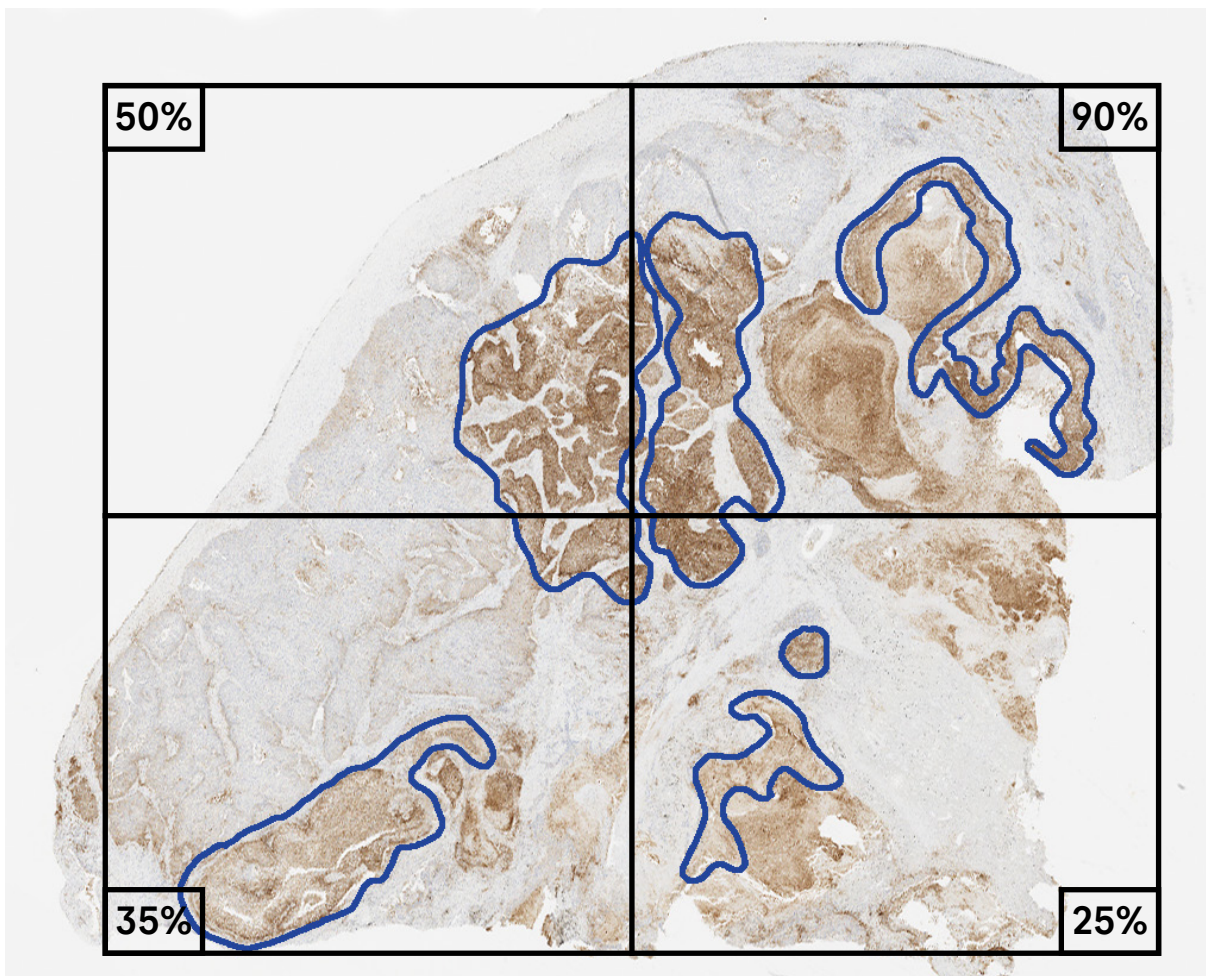
症例31 上段の画像では、炭粉(黒矢印)や、異物巨細胞(赤矢印)が認められる。下段の画像で示される別のエリアでは、腫瘍細胞の細胞膜への染色(青矢印)に加えて、免疫細胞への点状染色(緑矢印)や炭粉(黒矢印)が含まれている。下段画像の視野内では、腫瘍細胞の約80%が細胞膜染色を認める。



症例32 炭粉色素は、陰性コントロール標本でも観察されるため、PD-L1染色スライドを陰性対照スライドを見比べて、特異的な染色と炭粉色素との鑑別を行う。



症例33 腫瘍細胞の細胞膜への弱い染まりのみの症例。陰性としないう、高倍率での観察が重要である。



腫瘍細胞におけるPD-L1発現が不均一性を示している場合、腫瘍全体をいくつかに分け、各エリアでの陽性率（腫瘍細胞全体に対する細胞膜に染色が認められる腫瘍細胞（青枠）の割合）を算出した後、平均化する。その際、壊死部分は判定対象から除外する。この症例では、4分割したエリアそれぞれで陽性率を算出し（50%、90%、35%、25%）平均化した結果、全体の陽性率は50%となる。

参考文献

1. Blank C, Mackensen A. Contribution of the PD-L1/PD-1 pathway to T-cell exhaustion: an update on implications for chronic infections and tumor evasion. *Cancer Immunol Immunother.* 2007;56(5):739-45.
2. Dong H, Zhu G, Tamada K, et al. B7-H1, a third member of the B7 family, co-stimulates T-cell proliferation and interleukin-10 secretion. *Nat Med.* 1999;5(12):1365-9.
3. Herbst RS, Soria JC, Kowanetz M, et al. Predictive correlates of response to the anti-PD-L1 antibody MPDL3280A in cancer patients. *Nature.* 2014;515:563-7.
4. Butte MJ, Keir ME, Phamduy TB, et al. Programmed death-1 ligand 1 interacts specifically with the B7-1 costimulatory molecule to inhibit Tcell responses. *Immunity.* 2007;27(1):111-22.
5. Sheehan DC, Hrapchak BB. *Theory and practice of Histotechnology*, 2nd edition. St. Louis: C.V. Mosby Company; 1980.
6. Carson F, Hladik C. *Histotechnology: A Self Instructional Text*, 3rd edition. Hong Kong: American Society for Clinical Pathology Press; 2009.
7. College of American Pathologists Laboratory Accreditation Program, *Anatomic Pathology Checklist*, 2011.
8. CLSI. *Quality Assurance for Design Control and Implementation of Immunohistochemistry Assays: Approved Guideline-Second Edition*. CLSI document I/ LA28-A2 (ISBN 1-56238-745-6). CLSI, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, PA 19087-1898 USA, 2011.

VENTANA はロシュの登録商標です。

Published by

ロシュ・ダイアグノスティクス株式会社

〒108-0075 東京都港区港南1-2-70

<https://www.roche-diagnostics.jp>

☎0120-600-152

diagnostics.roche.com
