

体外診断用医薬品

ミスマッチ修復機能欠損検出キット

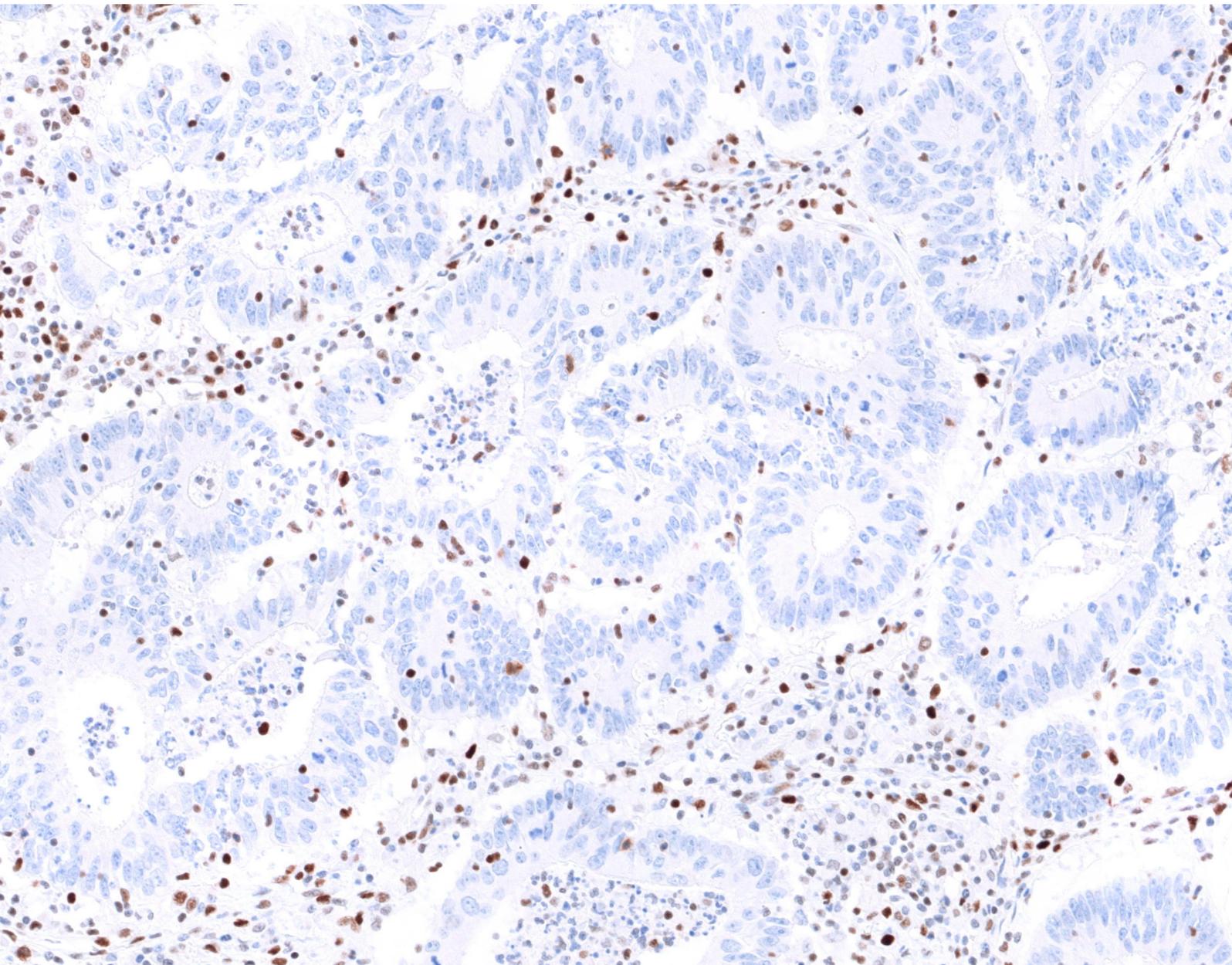
ロシュ MMR IHC パネル判定ガイド

ベンタナ OptiView MLH1 (M1)

ベンタナ OptiView PMS2 (A16-4)

ベンタナ OptiView MSH2 (G219-1129)

ベンタナ OptiView MSH6 (SP93)



目次

はじめに	4
ロシュ MMR IHC パネル判定ガイド	6
使用目的	6
製品の使用目的	6
判定ガイドの目的	6
臨床評価	7
染色の特徴	7
染色様式と強度	8
臨床評価の症例基準	8
スコアリングアルゴリズム	9
コントロール	11
内部陽性コントロール	11
検体ワークフロー	13
参考画像	15
pMMR症例	15
dMMR症例	26
判定に苦慮する症例	30
プレアナリシスの影響	45
最適な染色結果を得るための固定条件	45
未染スライドの安定性	49
組織厚	49
参考文献	50

はじめに

DNAミスマッチ修復 (MMR) は、DNA複製時に不適切な塩基が挿入された際に形成される塩基ミスマッチを修復する、DNA修復機構の1つです¹。MMR機能に異常をきたすと、マイクロサテライトとよばれる短い繰り返し配列の長さに変化が生じることが知られており、PCR法によりその変化を検出できることが示されています²⁻⁴。解析対象となるマイクロサテライト遺伝子座の40%以上に変化がみられた場合には、高頻度マイクロサテライト不安定性 (MSI-H) と評価されます。MMR機構の欠損は主に4つのMMR遺伝子MLH1、PMS2、MSH2、およびMSH6のいずれかの突然変異に起因しています。

MLH1とPMS2タンパク、および、MSH2とMSH6タンパクは、それぞれヘテロ二量体複合体を形成し機能します。MMRが正常に機能している場合、MSH6/MSH2ヘテロ二量体はミスマッチDNAに結合します。この結合によりMSH6/MSH2複合体の立体構造が変化し、MLH1/PMS2ヘテロ二量体のMSH2/MSH6複合体への結合を誘導し、その後エキソヌクレアーゼやDNAポリメラーゼを介したミスマッチDNAの修復反応が起こります^{4,5}。これらのタンパクをコードする遺伝子の突然変異または欠失は、複製エラーによるMSIおよび体細胞突然変異をもたらします。MMR 免疫組織化学 (IHC) 検査は、生殖細胞系列または体細胞遺伝子変異を含む可能性が高いMMR遺伝子を同定するのに有効であることが示されています。

近年広がりを見せる免疫療法、特にPD-1またはPD-L1タンパクを介する免疫チェックポイント経路を阻害する免疫療法は、がん治療戦略を大きくかえつつあります。T細胞活性化後にT細胞上に発現する抑制性レセプターPD-1のリガンドであるPD-L1は免疫細胞や悪性腫瘍細胞に発現します。腫瘍細胞におけるPD-L1過剰発現は抗腫瘍免疫を阻害し、免疫回避につながる事が報告されています^{7,8}。そのため、PD-L1/PD-1経路の阻害は、腫瘍特異的T細胞免疫を再活性化する効果的な戦略と考えられています。

MMRタンパク (MLH1、PMS2、MSH2、およびMSH6) は増殖中の正常細胞および悪性腫瘍細胞において普遍的に発現します⁹。一部のがんはMMR機能に欠損 (dMMR) を有しており、MSIを示します¹⁰。複数の研究により、MMR機能欠損はPD-1またはPD-L1タンパクの発現と相関することが示されています¹¹⁻¹³。したがって、1つ以上のMMRタンパクの発現消失は、PD-1標的治療の効果予測バイオマーカーとして有用であることが示唆されています¹³⁻¹⁵。抗PD-1阻害薬は、dMMR/MSI-Hがみられる固形がんにおいて、がんの原発組織にかかわらず奏功が期待できることから、PD-1標的療法を検討している患者群においてdMMRの有無を評価することは有益と考えられます^{14,15}。

MLH1、PMS2、MSH2、またはMSH6を含むMMRタンパクのいずれかの発現の消失は、MMR機能欠損を引き起こします。腫瘍細胞において4つのMMRタンパクが全て発現している場合はMMR機能が正常 (pMMR) であることを示し、いずれか1つでも発現が消失している場合は、dMMRであることを示しています。

使用目的

■製品の使用目的

ロシュ MMR IHCパネルは、下記の4種類の製品から構成されます:

ベンタナ OptiView MLH1 (M1) (製造販売承認番号:30300EZX00104000)

ベンタナ OptiView PMS2 (A16-4) (製造販売承認番号:30300EZX00101000)

ベンタナ OptiView MSH2 (G219-1129) (製造販売承認番号:30300EZX00102000)

ベンタナ OptiView MSH6 (SP93) (製造販売承認番号:30300EZX00103000)

これらの製品は、ベンチマークシリーズ*(ロシュ社製 自動染色装置)を用いて、ホルマリン固定パラフィン包埋 (FFPE) された固形がん組織中のMLH1、PMS2、MSH2、MSH6タンパクをそれぞれ検出する検査キットで、これらの4製品の検査結果を組み合わせることによりMMR機能欠損の有無を評価します。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。

*適用機種は、

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)

です。

■判定ガイドの目的

本誌はベンタナ MMR IHCパネルにより、MMRタンパクの発現およびMMR機能を適切に評価していただくことを目的とし、それぞれの判定基準を記載したガイドです。

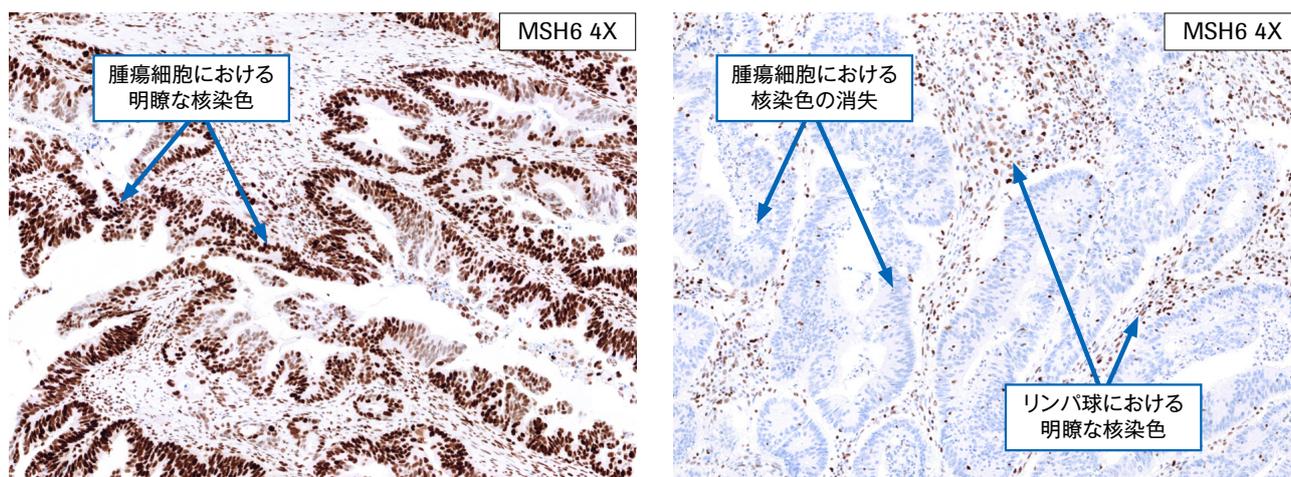
■染色の特徴

ロシュ MMR IHC パネルの各キットで染色した組織について、ジアミノベンジジン (DAB) シグナルの有無を評価します。全てのがん細胞において、ベンタナ MMR パネルで染色を行うと、いずれのMMRタンパクも核に陽性を示します。ロシュ MMR IHC パネルによって検出された MMRタンパクのいずれか1つが、腫瘍細胞の核において消失しているのが観察されます。MMRタンパクの発現は、明瞭な核へのDAB染色の有無に基づき、「保持」または「消失」に分類されます。

- MMRタンパク発現の「保持」は、バックグラウンド以上の内部陽性コントロール細胞の核への染色と同等またはそれ以上の強度で、腫瘍細胞の核に明瞭な染色を示す状態を指します。
- MMRタンパク発現の「消失」は、腫瘍細胞の核において、検出可能なDABシグナルがまったく存在しない状態を指します。症例によっては、核への弱いDAB変色を呈することがあります。

MMRタンパクのDABシグナルは、均一に分布し、腫瘍全体にわたって一定の均一な強度を示すこともあれば、分布が不均一でさまざまな強度を示すこともあります。通常は2xまたは4xのような低倍率で容易に検出できるはずですが、ロシュ MMR IHCパネルの染色例は、この判定ガイドの参照画像セクションに示されています。

アイソタイプが一致した陰性コントロール試薬 (NRC) を用いて、検体のバックグラウンド染色の有無を確認し、染色強度のベースラインを確認します。形態および背景の許容基準を表1に示します。ロシュ MMR パネルのそれぞれのアッセイによる腫瘍組織のMMRタンパク発現の状態を評価するための症例基準を表2に示します。



MMRタンパク発現の「保持」と「消失」: 左図の大腸癌症例では核は明瞭な染色を示し、これはMSH6発現の「保持」と判定される例です。一方、右図のように、腫瘍組織に核染色が全く認められない場合は、MSH6発現の「消失」と判定されます。腫瘍組織近傍の間質に存在する線維芽細胞およびリンパ球における明瞭な核染色は、内部陽性コントロールとして役立ちます。

■染色様式と強度

ロシユMMR IHCパネルで染色した各症例について、表1に記載の基準を用いて組織形態およびバックグラウンドを評価します。

表1 適切・不適切判定とする形態およびバックグラウンド染色

基準	適切	不適切
形態	対象とする細胞が観察されており、形態学的診断が可能	対象とする細胞が観察されておらず、形態学的診断が困難
バックグラウンド	バックグラウンド染色によって、判定が妨げられない	バックグラウンド染色によって、判定が妨げられる

■臨床評価の症例基準

表2は、ロシユ MMR IHCパネルでMMRタンパク発現の状態を評価する腫瘍組織を伴うスライドの基準をまとめたものです。

表2 評価可能基準および評価不能基準

臨床解釈	染色パターン基準
評価可能 (すべての条件を満たすこと)	<ol style="list-style-type: none"> 1. 50個以上の腫瘍細胞（壊死や変性した細胞を除く）を有する 2. 陰性試薬対照スライドが評価できる 3. 形態学的診断が可能である 4. バックグラウンドは許容範囲内にある 5. 内部の陽性対照細胞は明瞭な核染色を示す
評価不能 (本項の基準が1つでも該当する場合、染色を再度行うか、染色できない場合は判定不能とする)	<ol style="list-style-type: none"> 1. 腫瘍細胞（壊死や変性した細胞を除く）が50個未満である 2. 試薬対照スライドが評価できない 3. 形態学的診断が困難である 4. バックグラウンドが許容範囲にない 5. 内部陽性コントロール細胞に明瞭な核染色が認められない 6. 組織のはがれ、腫瘍の欠如、アーチファクトおよび/または端部のアーチファクトのために解釈できない

スコアリングアルゴリズム

ロシュ MMR IHCパネルで染色した腫瘍細胞について、DABシグナルの有無を評価します。

対応する試薬対照スライドを用いて、特定の組織要素により生じることが知られている非特異的なバックグラウンド染色を評価します（症例画像および欠損した症例画像を参照のこと）。

H&E染色スライドの鏡検により、組織検体が不適切であることが示された場合（例えば、腫瘍細胞が50個未満である場合）、新たな患者検体を用意し、H&E染色から実施してください。

特定のMMR IHCアッセイの染色（例えば、ペンタナOptiView MLH1 (M1)）において、その染色そのものが評価不能だった場合、または、対応する陰性コントロール染色が不適切だった場合、再度染色を実施する必要があります。再染色しても、内部陽性コントロール細胞の核に染色がない、アーチファクトが存在する、壊死などによりじゅうぶんな腫瘍細胞が存在しない、などに該当する場合は、その染色スライドの評価はできません。

陰性コントロール試薬を用いた試薬対照スライドの結果が許容範囲であり、ロシュ MMR IHCパネルによる染色スライドが評価可能であれば、下記の判定基準を理解した病理医がスライドを評価することができます。

ロシュ MMR IHCパネルのタンパク質発現およびMMR機能の判定基準を以下の表3および表4に示します。代表的な症例については、参考画像の項で考察します。

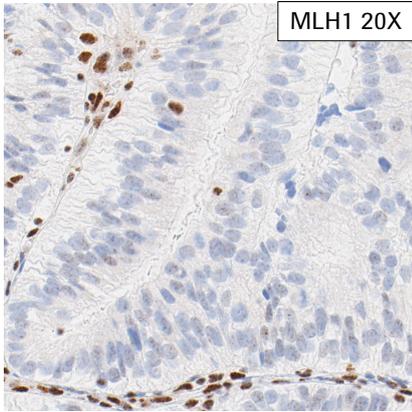
表3 ロシュ MMR IHCパネルによる各MMRタンパク発現の判定基準

保持	消失
内部陽性コントロール細胞における核への染色が確認できる状態で、腫瘍細胞の核に明瞭な核染色が認められる	内部陽性コントロール細胞における核への染色が確認できる状態で、腫瘍細胞の核に局所的で弱く不明瞭な染色が認められる、あるいは染色が全く認められない。点状の核染色は消失とする。

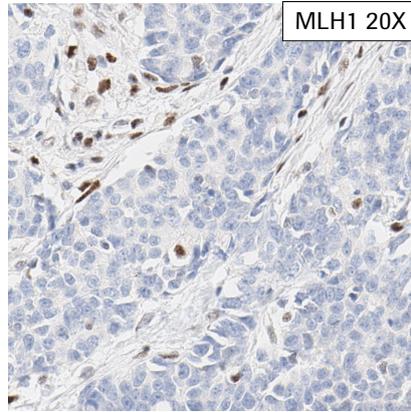
表4 ミスマッチ修復機能に対する判定基準

ミスマッチ修復機能正常 (pMMR)	ミスマッチ修復機能欠損 (dMMR)
MLH1、PMS2、MSH2及びMSH6タンパク発現が全て保持されている。	MLH1、PMS2、MSH2及びMSH6タンパク発現が一つ以上消失している。

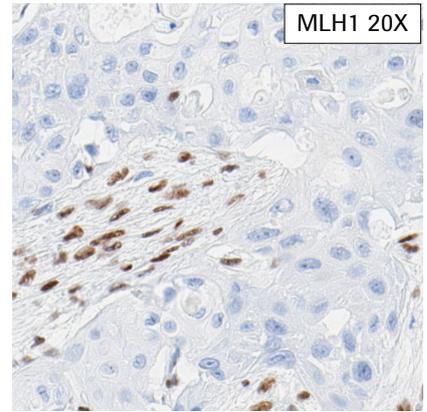
臨床診断:「消失」



子宮内膜癌におけるMLH1タンパク発現消失の例

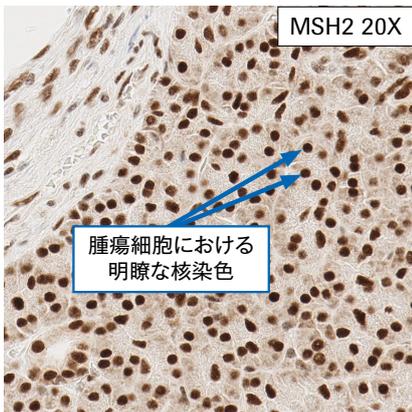


大腸癌におけるMLH1タンパク発現消失の例

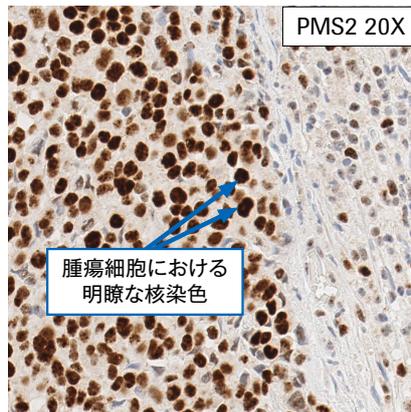


膀胱癌におけるMLH1タンパク発現消失の例

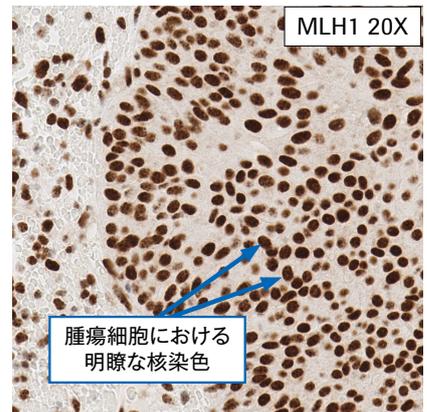
臨床診断:「保持」



膀胱癌におけるMSH2タンパク発現保持の例



悪性黒色腫におけるPMS2タンパク発現保持の例



膀胱癌におけるMLH1タンパク発現保持の例

※いずれの症例においても、内部陽性コントロール細胞への核染色が確認できることに留意してください。

コントロール

ロシュ MMR IHCパネルで染色すると、腫瘍近傍のリンパ球、線維芽細胞または正常上皮細胞などがMMRタンパクの核染色を示します。これらは内部陽性コントロールとして、各アッセイについて染色スライドを評価するための基準となります。腫瘍近傍のリンパ球、線維芽細胞あるいは正常上皮細胞における核への明瞭な核染色が確認できない場合は、染色スライドは「判定不能」とします。

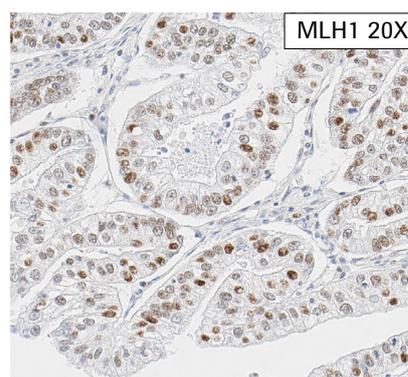
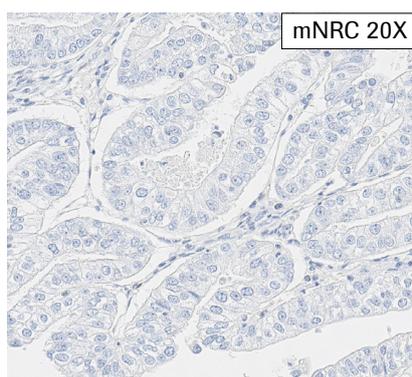
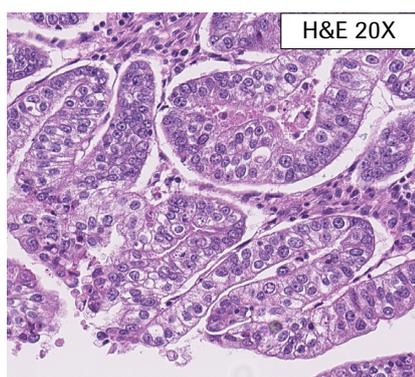
表5に、許容可能な内部コントロール染色の基準を記載します。

表5 内部陽性コントロール細胞の染色基準

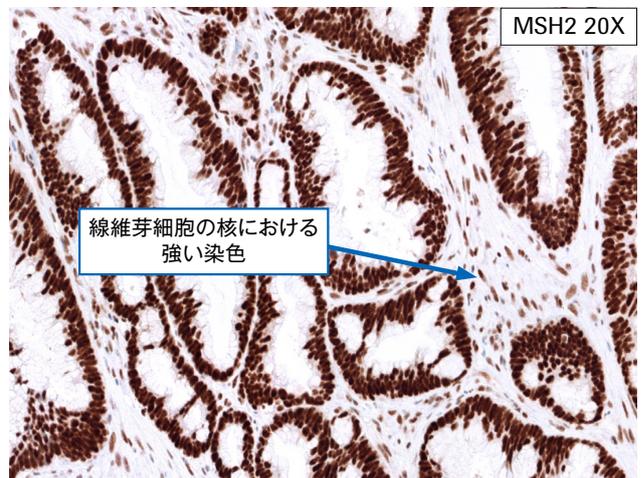
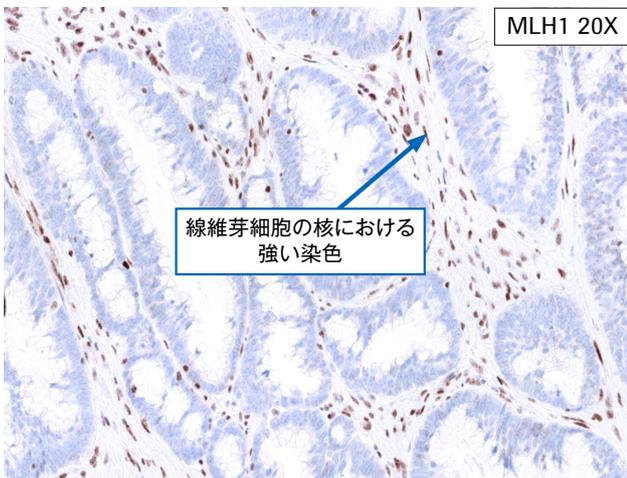
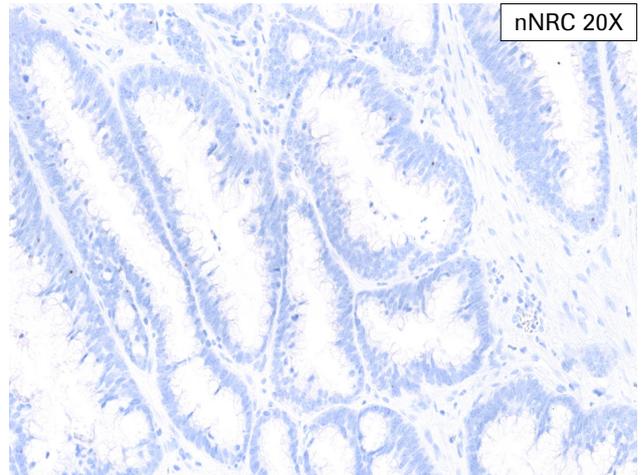
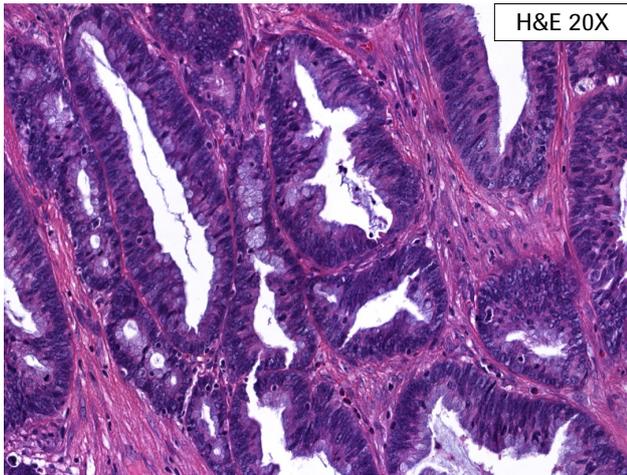
判定可能	判定不能
腫瘍近傍の陽性コントロール細胞（リンパ球、線維芽細胞または正常上皮細胞など）における核への明瞭な染色が確認できる	腫瘍近傍の陽性コントロール細胞（リンパ球、線維芽細胞または正常上皮細胞など）における核への明瞭な染色が確認できない

内部陽性コントロール

ロシュ MMR IHCパネルの内部陽性コントロール細胞の染色画像を以下に示します。



内部陽性対照症例1：この子宮内膜腺癌検体では腫瘍細胞の近傍の内部陽性コントロール細胞への染色が確認できないため、腫瘍細胞におけるMLH1タンパク発現状態は評価できません。mNRC:陰性コントロール マウスモノクローナル抗体用



内部陽性対照症例2： 腫瘍細胞の近傍の内部陽性コントロール細胞における明瞭な核染色が確認できる状態で、腫瘍細胞の核におけるMLH1タンパク発現の消失が認められる大腸癌症例です。mNRC:陰性コントロール マウスモノクローナル抗体用

検体ワークフロー

ロシュ MMR IHCパネルでは、7枚の連続した組織切片を必要とします。ベンタナ OptiView MLH1 (M1)、ベンタナ OptiView PMS2 (A16-4)、ベンタナ OptiView MSH2 (G219-1129)、ベンタナ OptiView MSH6 (SP93)の4種類のアッセイのそれぞれで染色するには、それぞれ1枚の組織切片が必要です。さらに、H&Eおよび2種類の陰性コントロール試薬による染色にそれぞれ組織切片が必要です。

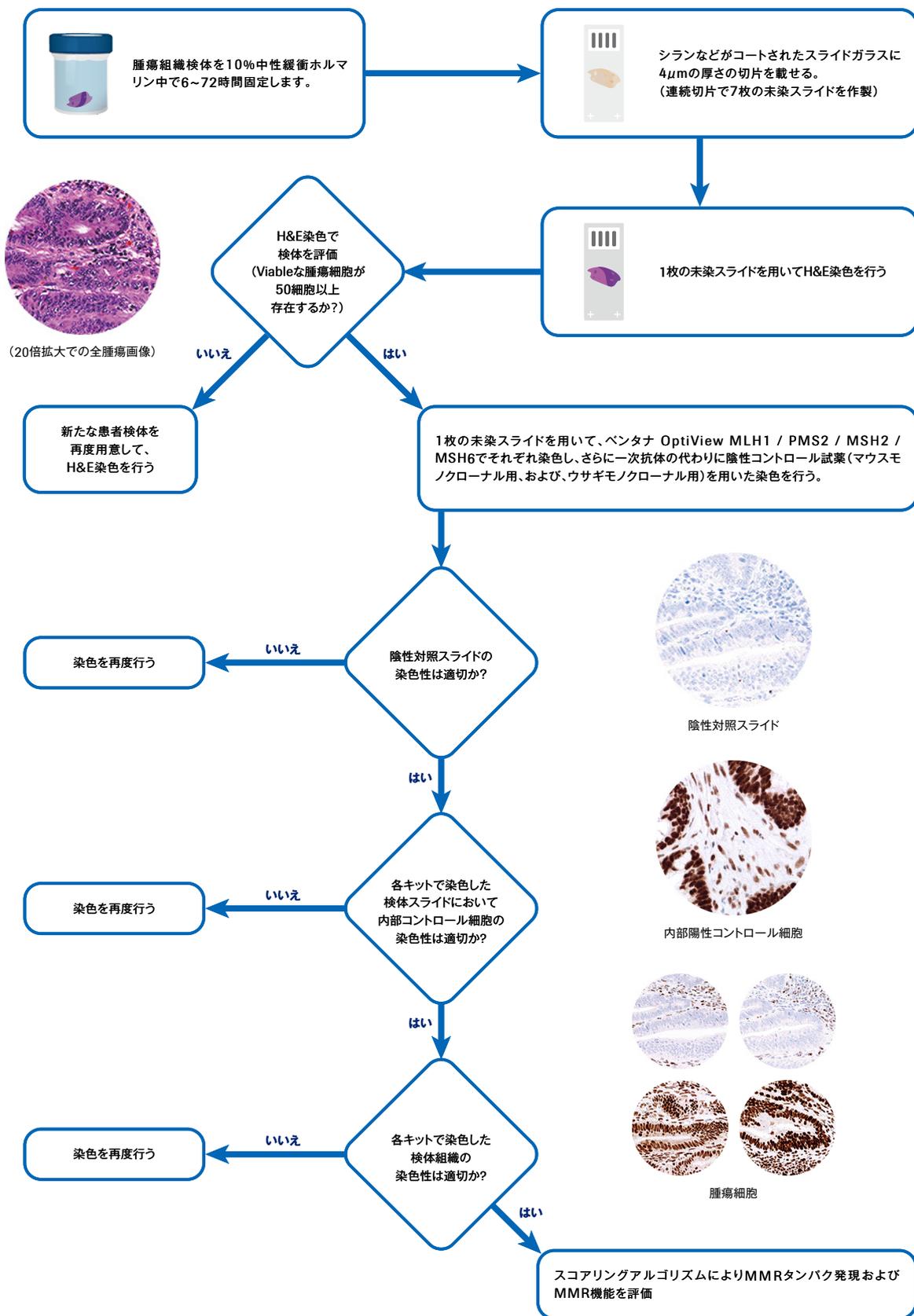
H&E染色の評価により、患者検体が不適切であることが示された場合（例えば、腫瘍細胞が50個未満である場合）、新しい検体を採取することが望ましいです。

特定のMMR IHCアッセイの染色（例えば、ベンタナOptiView MLH1 (M1)）において、その染色そのものが評価不能だった場合、または、対応する陰性コントロール染色が不適切だった場合、新たな未染スライドを用意し、再度染色を実施する必要があります。

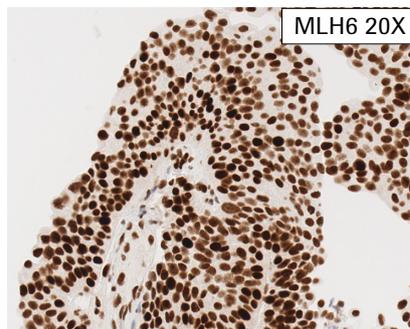
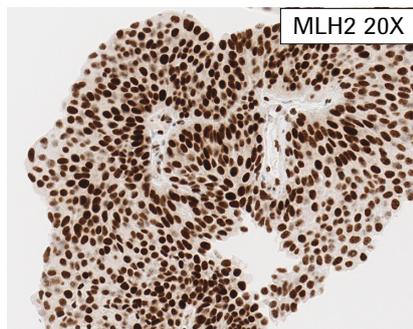
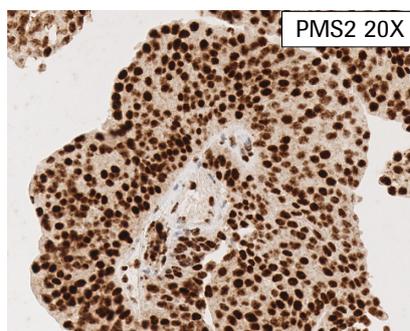
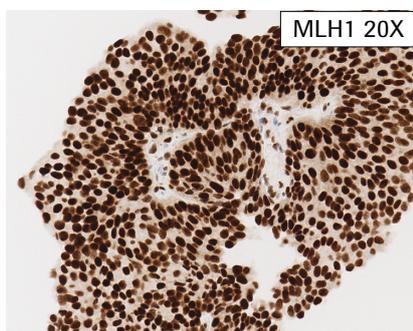
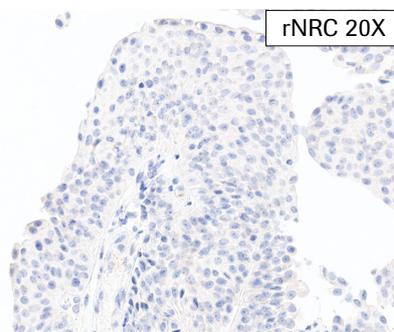
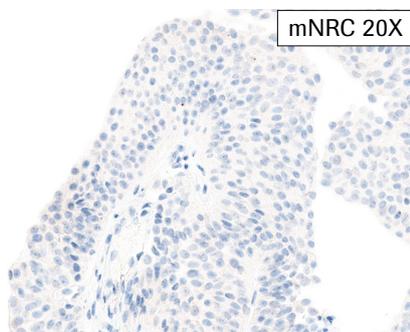
再染色しても、内部陽性コントロール細胞の核に染色がない、アーチファクトが存在する、壊死などによりじゅうぶんな腫瘍細胞が存在しない、などに該当する場合は、その染色スライドの評価はできません。

陰性コントロール染色の結果が許容範囲であり、ロシュ MMR IHCパネルによる染色スライドが評価可能であれば、スコアリングアルゴリズムに記載されている判定基準を理解した病理医がスライドを評価することができます。

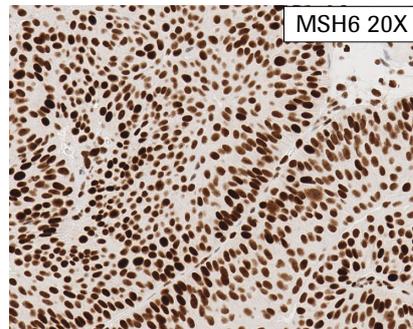
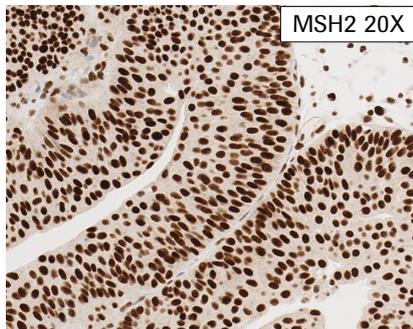
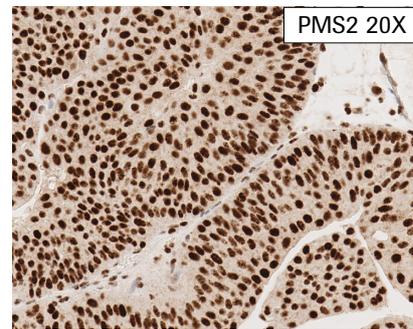
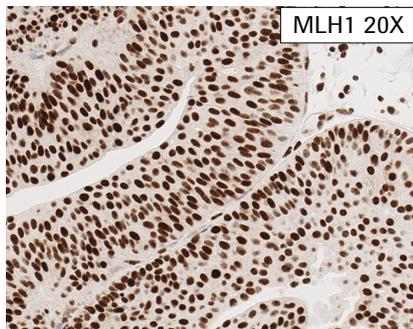
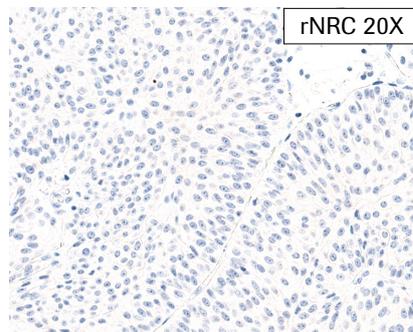
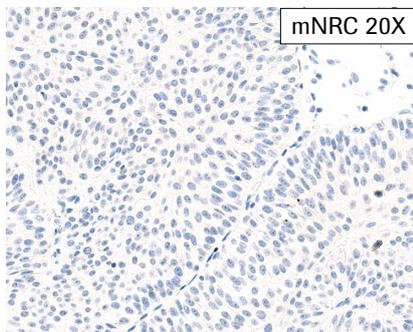
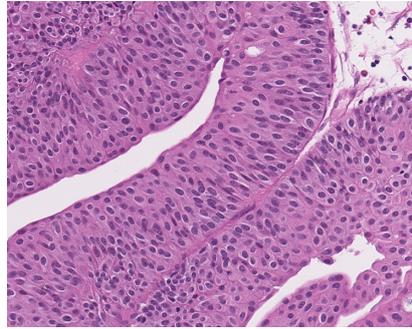
■ 検査フロー



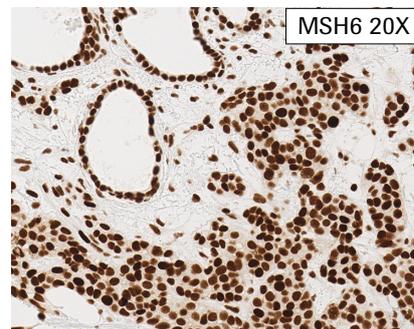
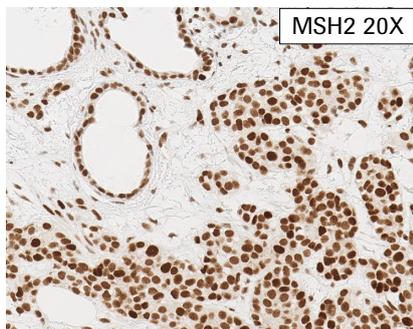
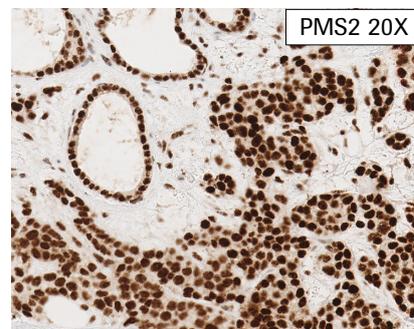
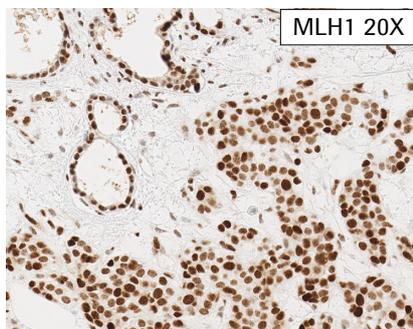
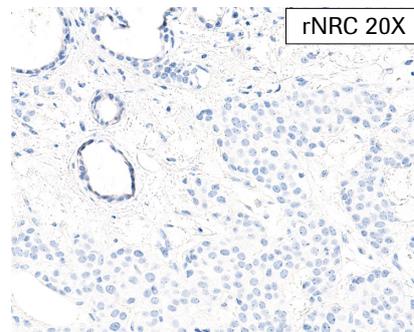
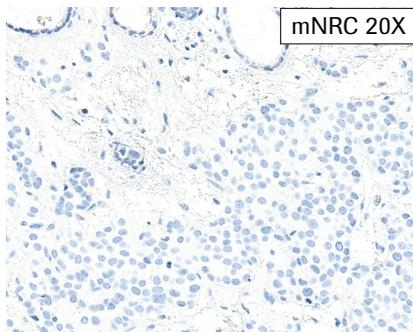
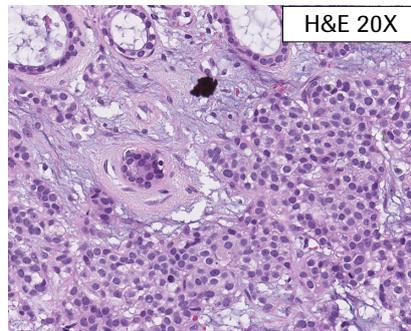
ミスマッチ修復機能正常 (pMMR) 症例



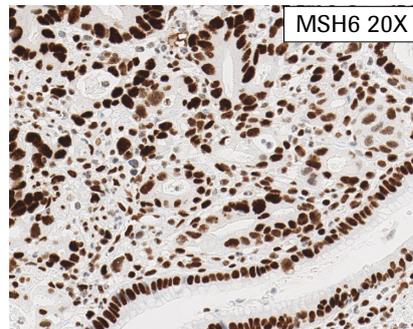
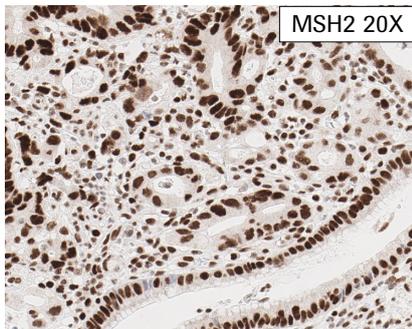
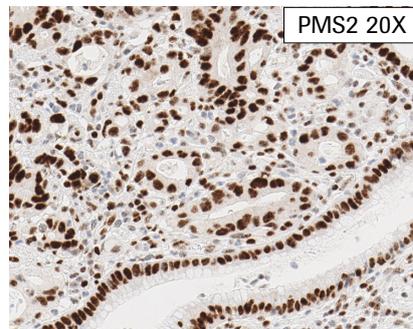
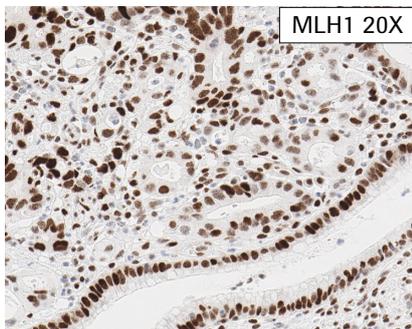
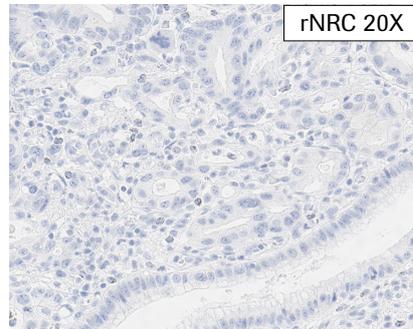
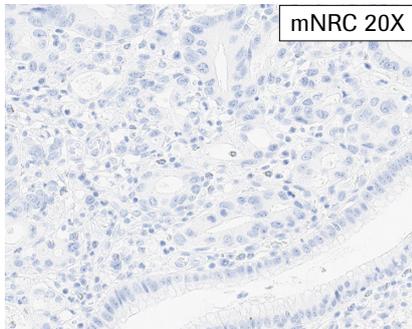
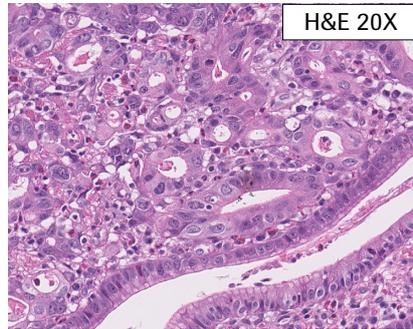
症例1：尿路上皮癌 (MLH1、PMS2、MSH2およびMSH6タンパク発現保持) 内部陽性コントロール細胞の核への明瞭な染色が確認でき、かつ、4種類のMMR抗体いずれを用いた場合においても腫瘍細胞の核に明瞭な染色が認められる。陰性コントロール試薬は、マウスモノクローナル用 (mNRC) およびウサギモノクローナル用 (rNRC) をそれぞれ使用している。



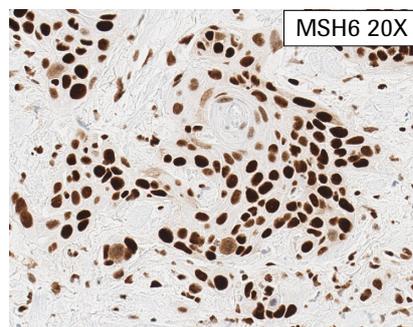
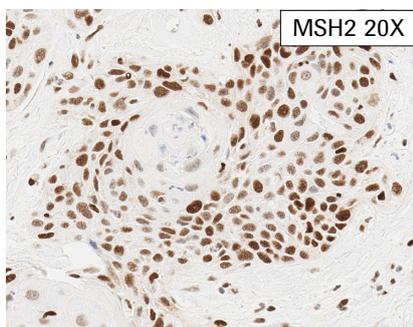
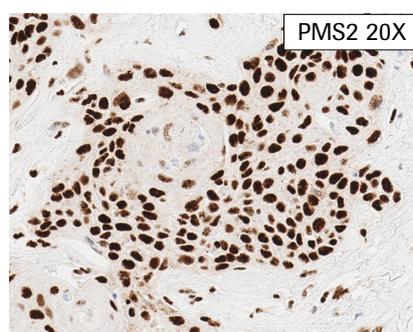
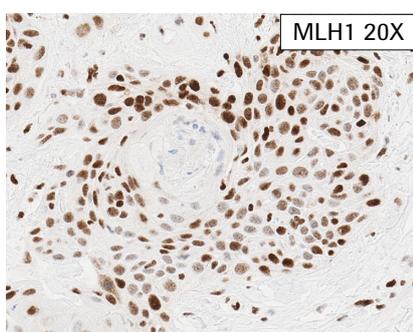
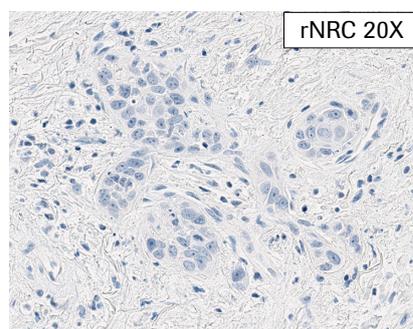
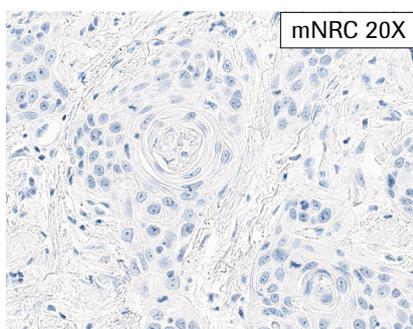
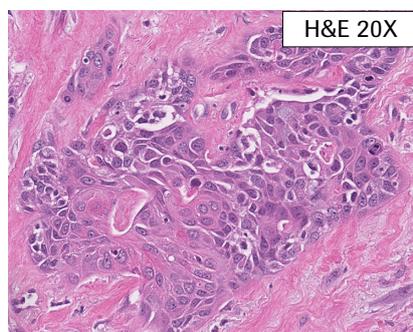
症例2：尿路上皮癌 (MLH1、PMS2、MSH2およびMSH6タンパク発現保持) 内部陽性コントロール細胞の核への明瞭な染色が確認でき、かつ、4種類のMMR抗体いずれを用いた場合においても腫瘍細胞の核に明瞭な染色が認められる。陰性コントロール試薬は、マウスモノクローナル用 (mNRC) およびウサギモノクローナル用 (rNRC) をそれぞれ使用している。



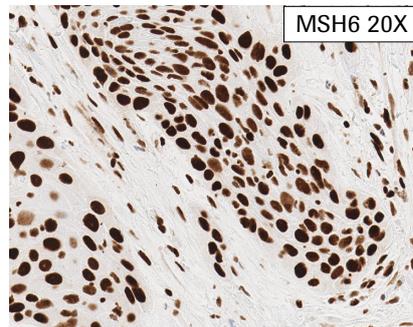
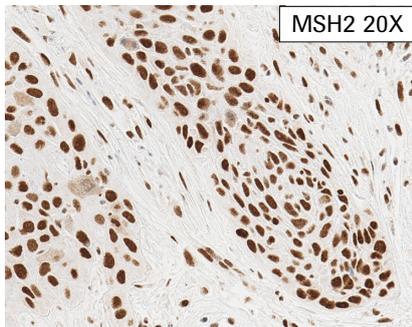
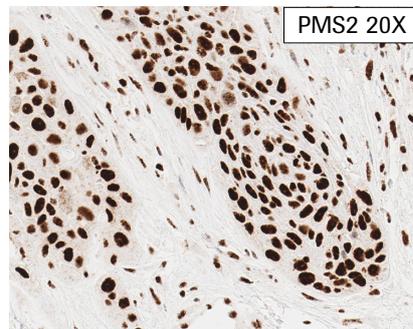
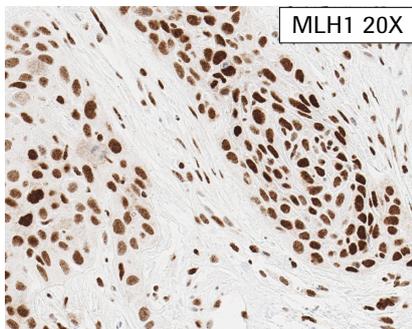
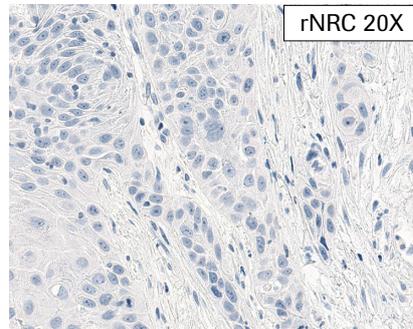
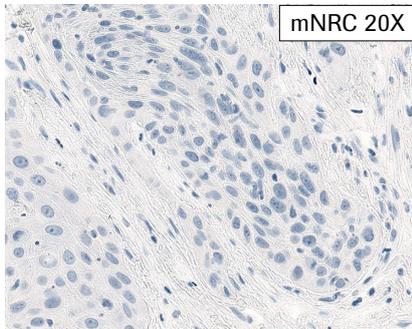
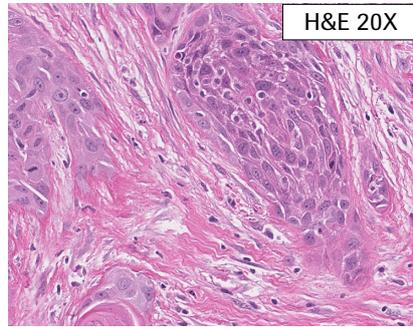
症例3：浸潤性乳管癌 (MLH1、PMS2、MSH2およびMSH6タンパク発現保持) 内部陽性コントロール細胞の核への明瞭な染色が確認でき、かつ、4種類のMMR抗体いずれを用いた場合においても腫瘍細胞の核に明瞭な染色が認められる。陰性コントロール試薬は、マウスモノクローナル用 (mNRC) およびウサギモノクローナル用 (rNRC) をそれぞれ使用している。



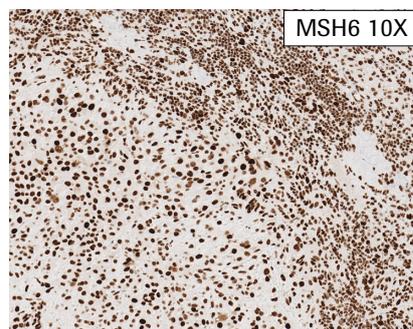
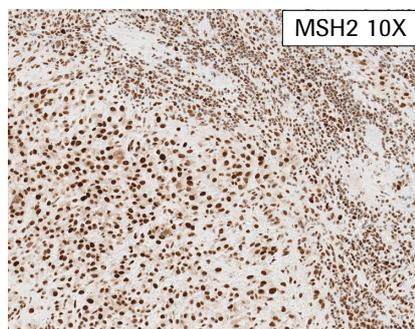
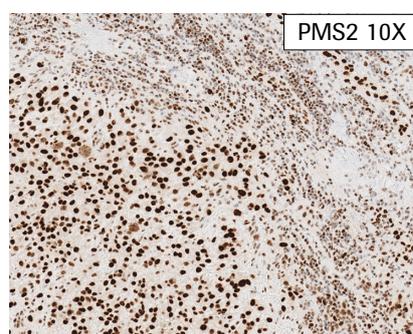
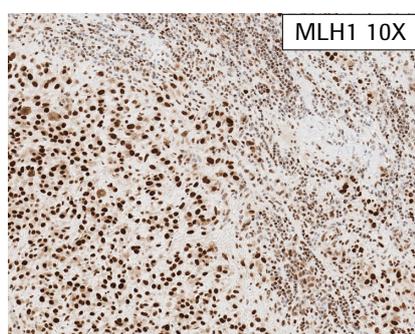
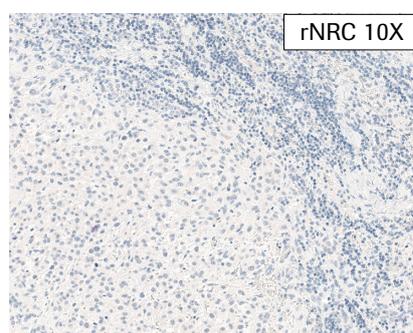
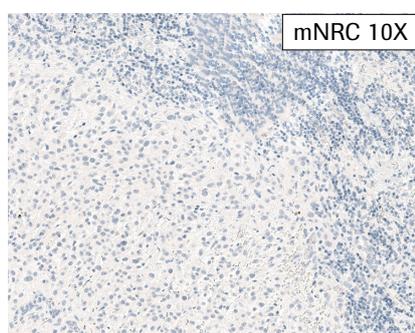
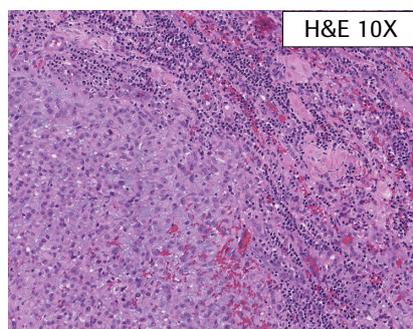
症例4：胃腺癌 (MLH1、PMS2、MSH2およびMSH6タンパク発現保持) 内部陽性コントロール細胞の核への明瞭な染色が確認でき、かつ、4種類のMMR抗体いずれを用いた場合においても腫瘍細胞の核に明瞭な染色が認められる。陰性コントロール試薬は、マウスモノクローナル用 (mNRC) およびウサギモノクローナル用 (rNRC) をそれぞれ使用している。



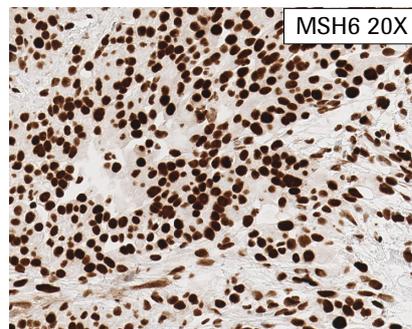
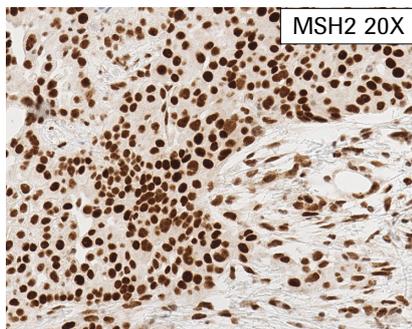
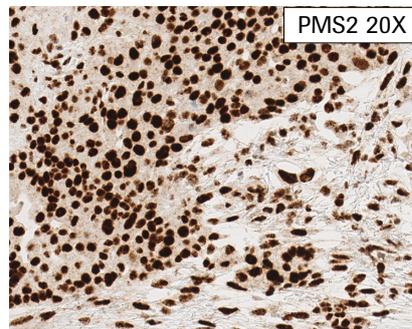
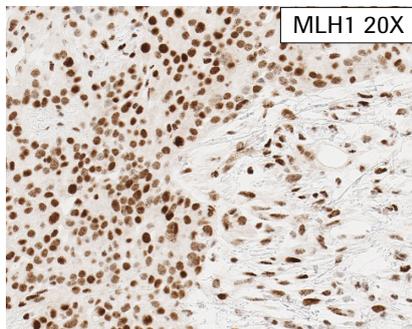
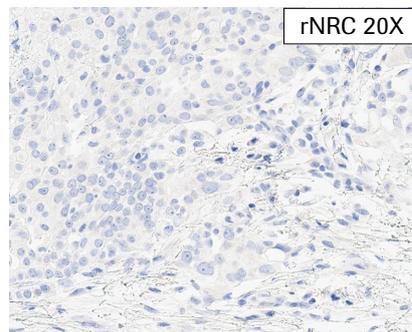
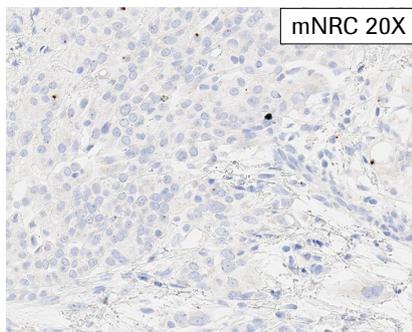
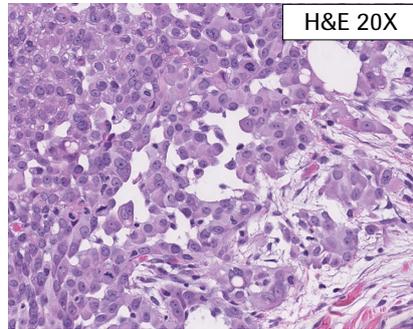
症例5：頭頸部扁平上皮癌（MLH1、PMS2、MSH2およびMSH6タンパク発現保持）内部陽性コントロール細胞の核への明瞭な染色が確認でき、かつ、4種類のMMR抗体いずれを用いた場合においても腫瘍細胞の核に明瞭な染色が認められる。陰性コントロール試薬は、マウスモノクローナル用（mNRC）およびウサギモノクローナル用（rNRC）をそれぞれ使用している。



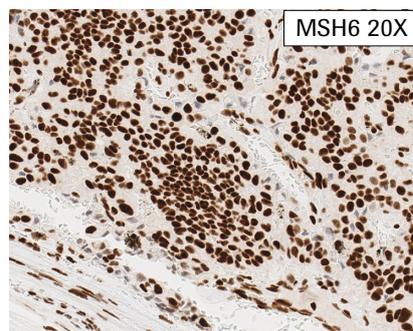
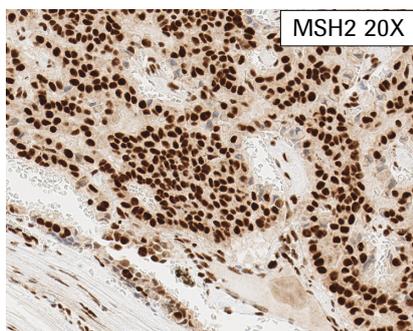
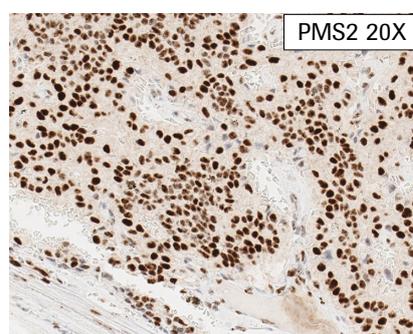
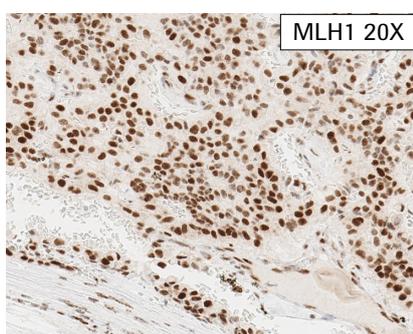
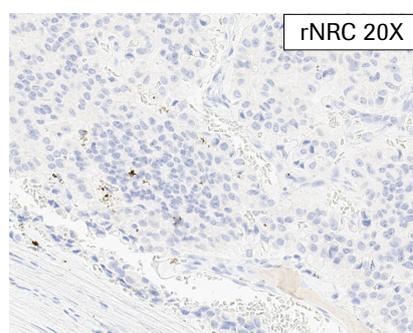
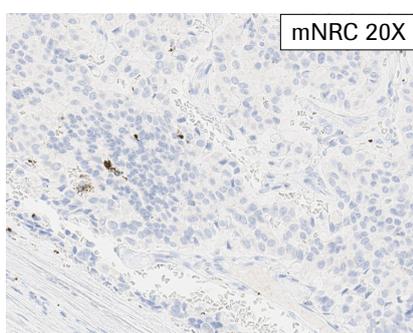
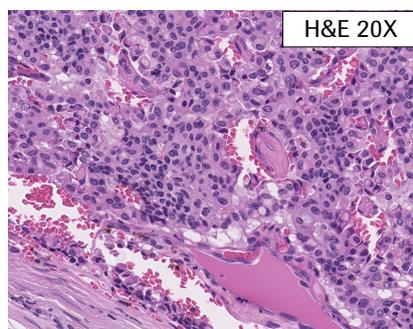
症例6：頭頸部扁平上皮癌（MLH1、PMS2、MSH2およびMSH6タンパク発現保持） 内部陽性コントロール細胞の核への明瞭な染色が確認でき、かつ、4種類のMMR抗体いずれを用いた場合においても腫瘍細胞の核に明瞭な染色が認められる。陰性コントロール試薬は、マウスモノクローナル用（mNRC）およびウサギモノクローナル用（rNRC）をそれぞれ使用している。



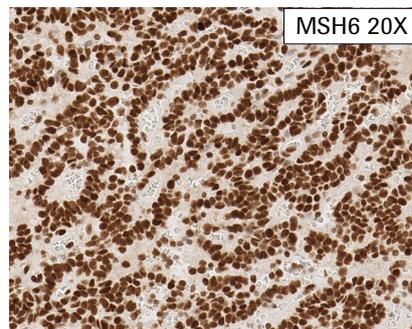
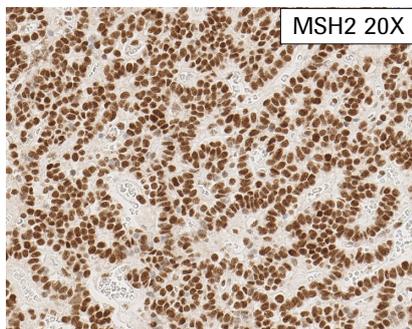
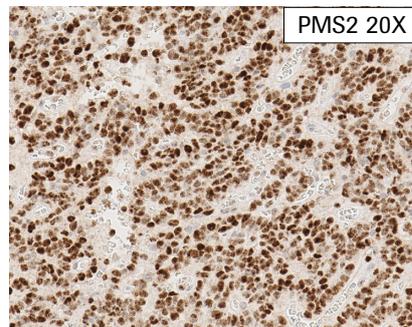
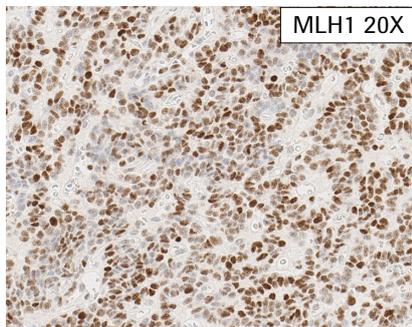
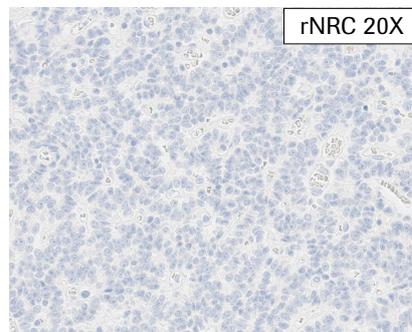
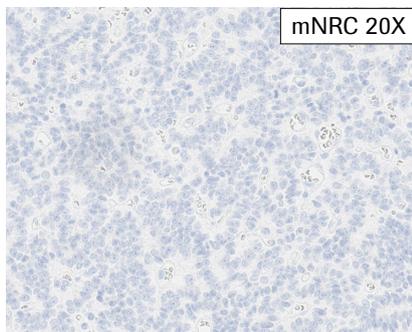
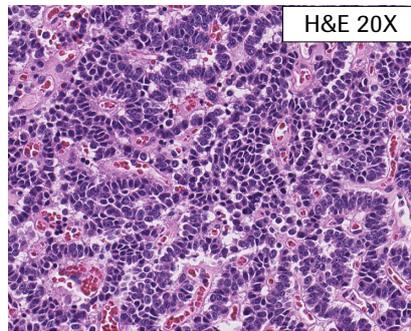
症例7：リンパ節転移した悪性黒色腫（MLH1、PMS2、MSH2およびMSH6タンパク発現保持） 内部陽性コントロール細胞の核への明瞭な染色が確認でき、かつ、4種類のMMR抗体いずれを用いた場合においても腫瘍細胞の核に明瞭な染色が認められる。陰性コントロール試薬は、マウスモノクローナル用（mNRC）およびウサギモノクローナル用（rNRC）をそれぞれ使用している。



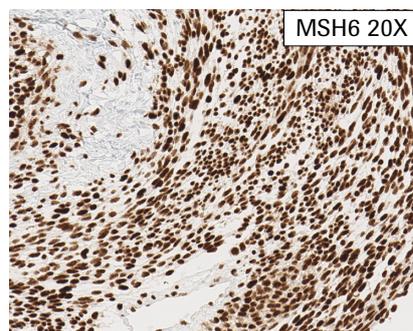
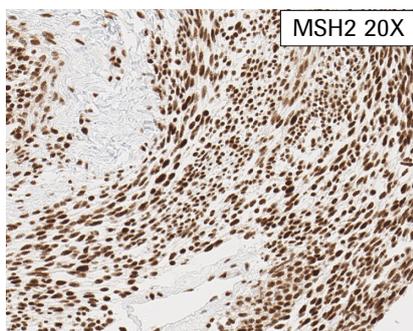
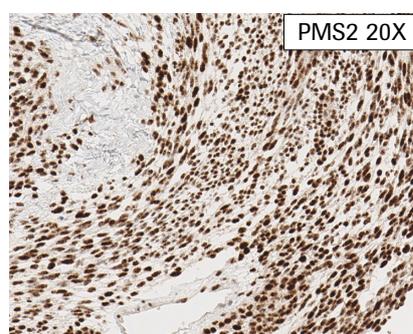
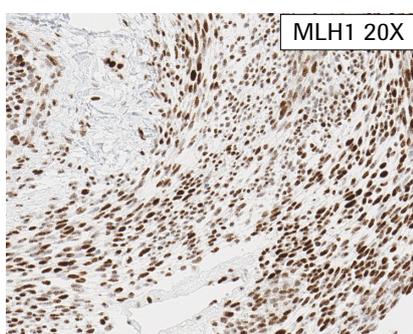
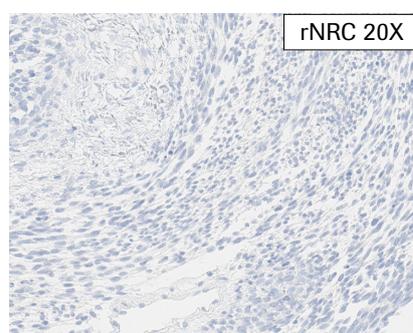
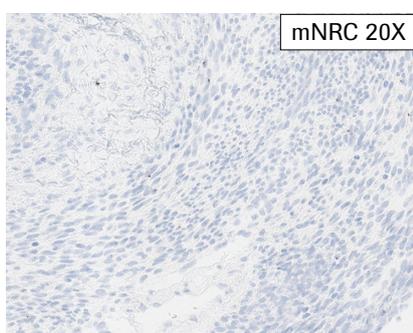
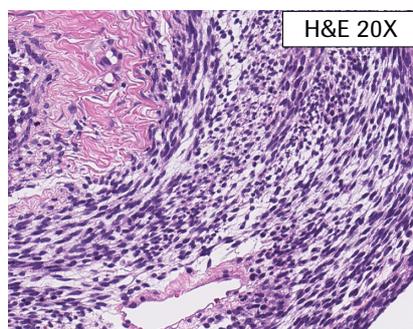
症例8：胸膜悪性中皮腫（MLH1、PMS2、MSH2およびMSH6タンパク発現保持） 内部陽性コントロール細胞の核への明瞭な染色が確認でき、かつ、4種類のMMR抗体いずれを用いた場合においても腫瘍細胞の核に明瞭な染色が認められる。陰性コントロール試薬は、マウスモノクローナル用（mNRC）およびウサギモノクローナル用（rNRC）をそれぞれ使用している。



症例9：十二指腸神経内分泌癌（MLH1、PMS2、MSH2およびMSH6タンパク発現保持）内部陽性コントロール細胞の核への明瞭な染色が確認でき、かつ、4種類のMMR抗体いずれを用いた場合においても腫瘍細胞の核に明瞭な染色が認められる。陰性コントロール試薬は、マウスモノクローナル用（mNRC）およびウサギモノクローナル用（rNRC）をそれぞれ使用している。

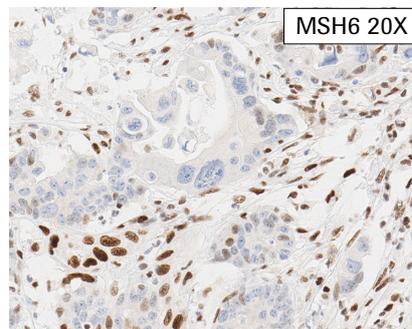
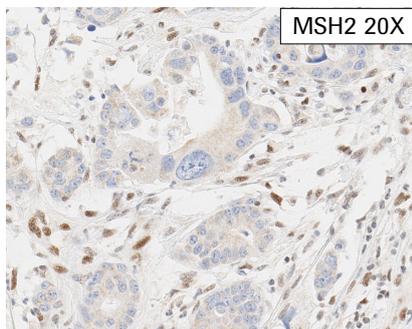
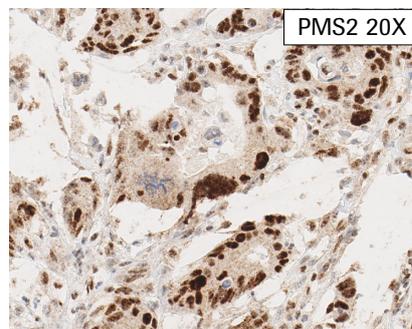
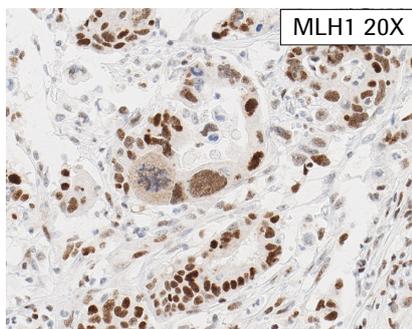
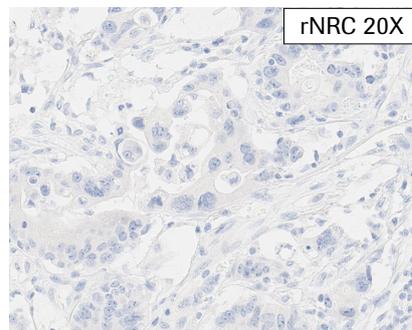
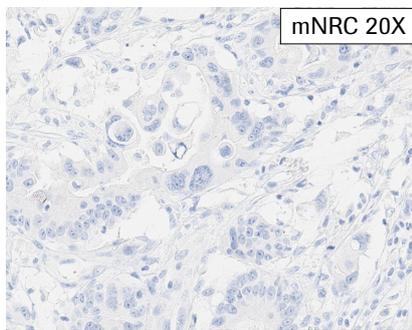
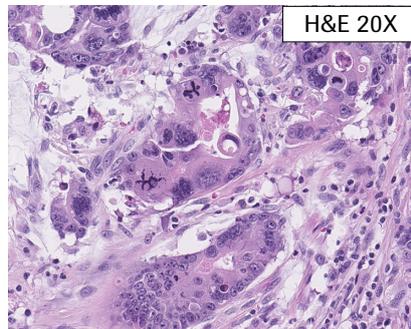


症例10：腺癌（MLH1、PMS2、MSH2およびMSH6タンパク発現保持） 内部陽性コントロール細胞の核への明瞭な染色が確認でき、かつ、4種類のMMR抗体いずれを用いた場合においても腫瘍細胞の核に明瞭な染色が認められる。陰性コントロール試薬は、マウスモノクローナル用（mNRC）およびウサギモノクローナル用（rNRC）をそれぞれ使用している。

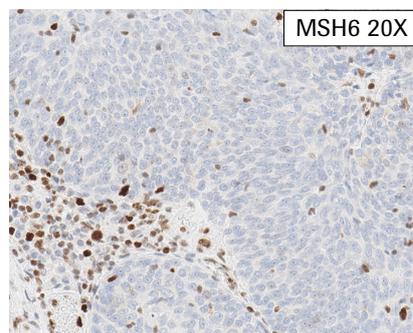
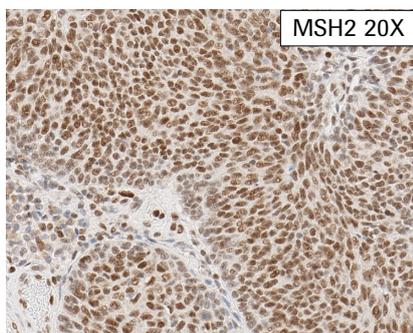
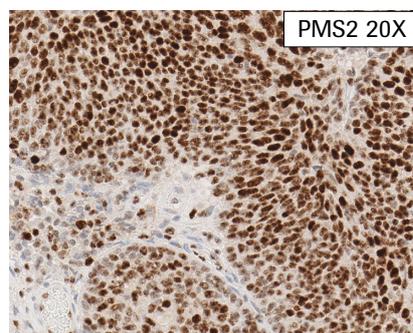
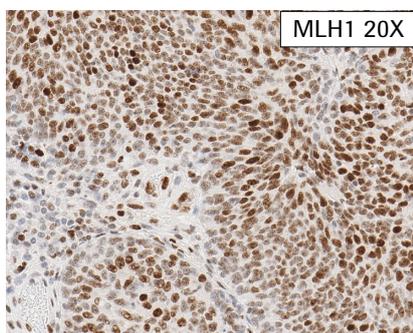
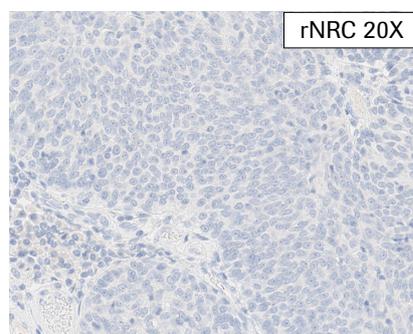
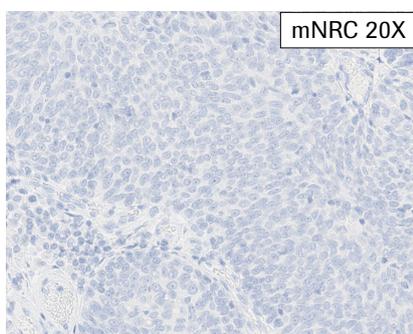
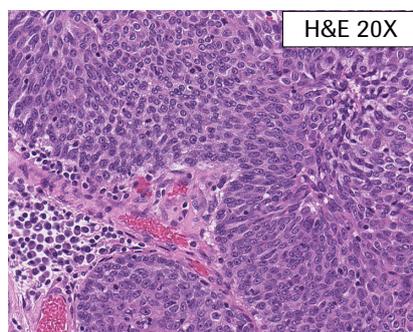


症例11：軟部肉腫（MLH1、PMS2、MSH2およびMSH6タンパク発現保持） 内部陽性コントロール細胞の核への明瞭な染色が確認でき、かつ、4種類のMMR抗体いずれを用いた場合においても腫瘍細胞の核に明瞭な染色が認められる。陰性コントロール試薬は、マウスモノクローナル用（mNRC）およびウサギモノクローナル用（rNRC）をそれぞれ使用している。

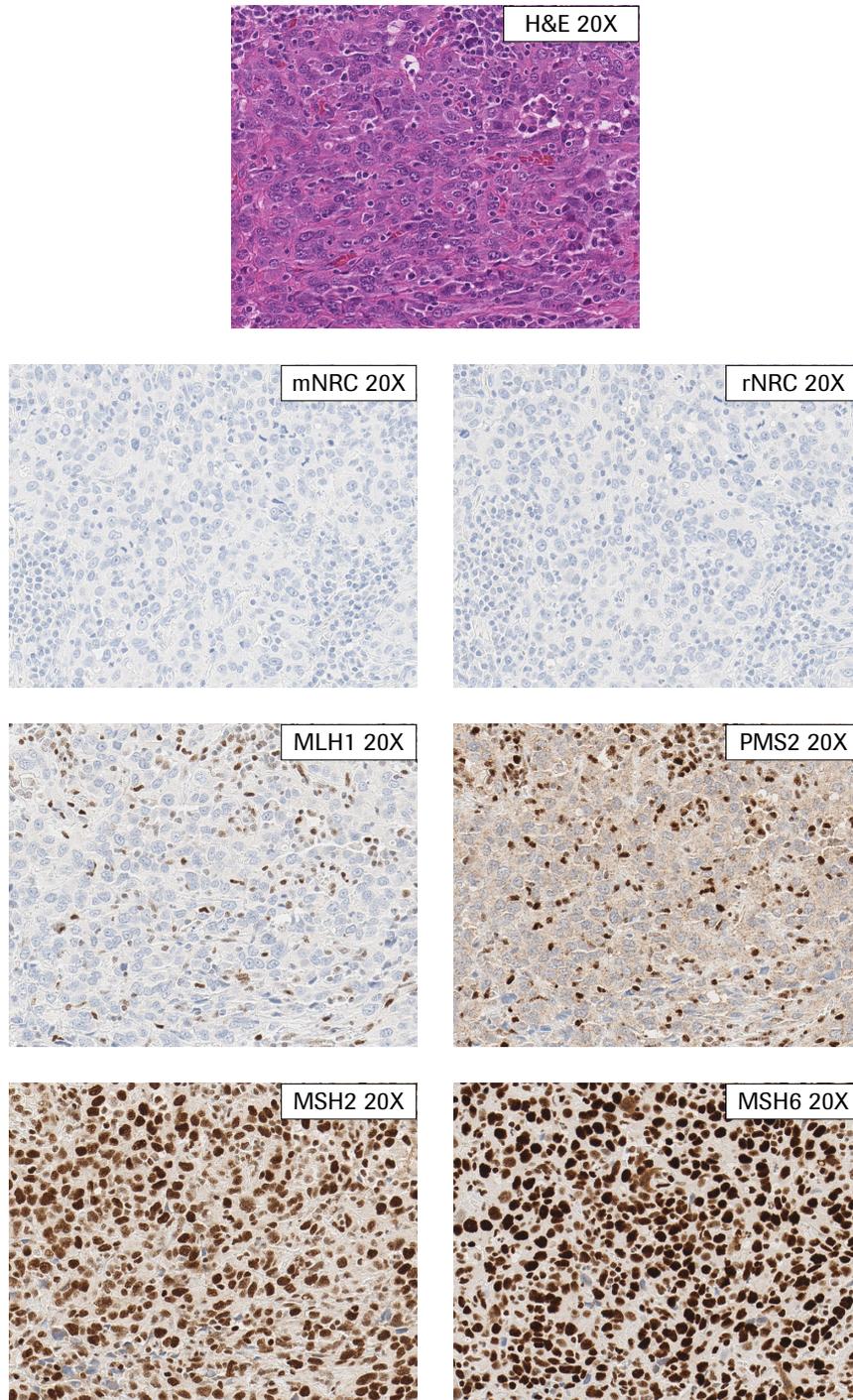
ミスマッチ修復機能欠損 (dMMR) 症例



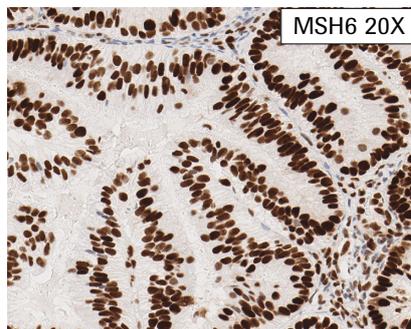
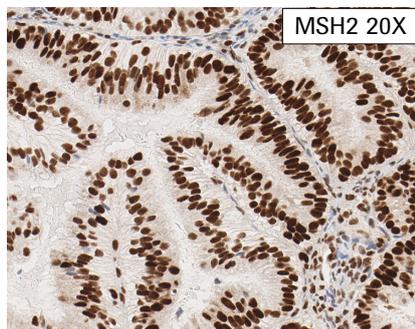
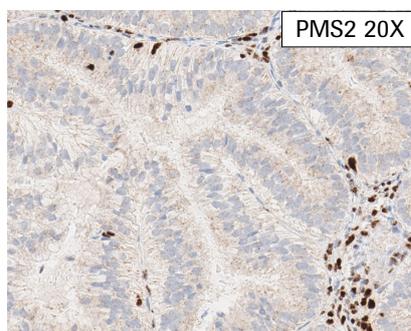
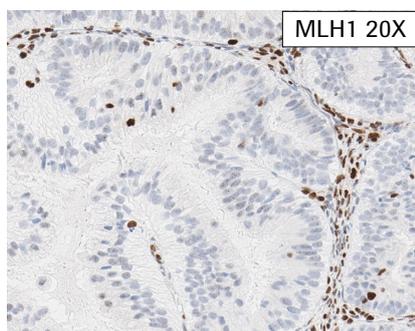
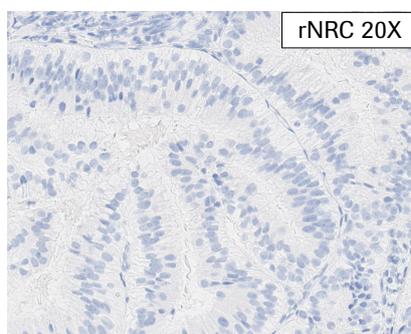
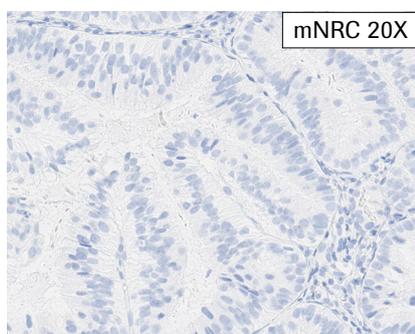
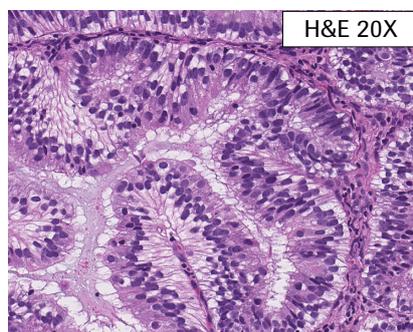
dMMR症例1 : MSH2およびMSH6タンパク発現の消失がみられる胃腺癌症例。内部陽性コントロール細胞の核への明瞭な染色が確認でき、MLH1、PMS2タンパク発現が保持されているが、MSH2およびMSH6タンパク発現の消失が認められる。細胞質染色は、評価対象としません。陰性コントロール試薬は、マウスモノクローナル用 (mNRC) およびウサギモノクローナル用 (rNRC) をそれぞれ使用している。



dMMR症例2：MSH2およびMSH6タンパク発現の消失がみられる腎盂尿路上皮癌症例。内部陽性コントロール細胞の核への明瞭な染色が確認でき、MLH1およびPMS2タンパク発現が保持されているが、MSH2およびMSH6タンパク発現の消失が認められる。細胞質への染色は、評価対象としません。陰性コントロール試薬は、マウスモノクローナル用(mNRC)およびウサギモノクローナル用(rNRC)をそれぞれ使用している。



dMMR症例3：MLH1およびPMS2タンパク発現の消失がみられる肺腺癌症例。内部陽性コントロール細胞の核への明瞭な染色が確認でき、MSH2およびMSH6タンパク発現が保持されているが、MLH1およびPMS2タンパク発現の消失が認められる。細胞質への染色は、評価対象としません。陰性コントロール試薬は、マウスモノクローナル用 (mNRC) およびウサギモノクローナル用 (rNRC) をそれぞれ使用している。



dMMR症例4：MLH1およびPMS2タンパク発現の消失がみられる子宮内膜腺癌症例。内部陽性コントロール細胞の核への明瞭な染色が確認でき、MSH2およびMSH6タンパク発現が保持されているが、MLH1およびPMS2タンパク発現の消失が認められる。細胞質への染色は、評価対象としません。陰性コントロール試薬は、マウスモノクローナル用(mNRC)およびウサギモノクローナル用(rNRC)をそれぞれ使用している。

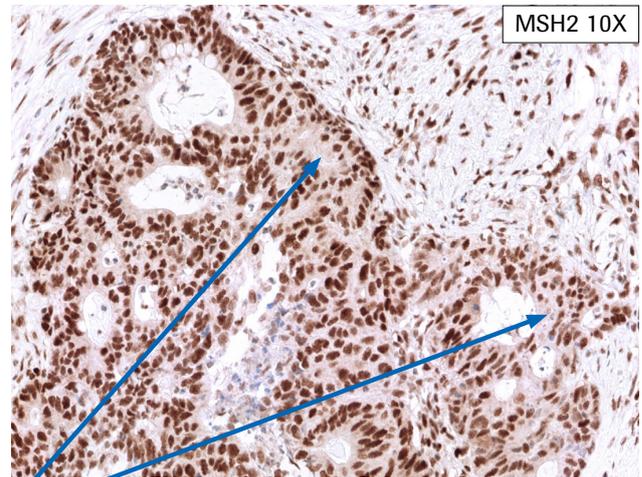
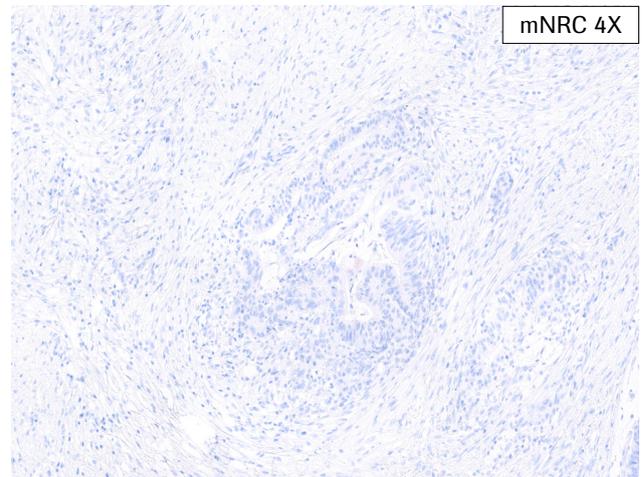
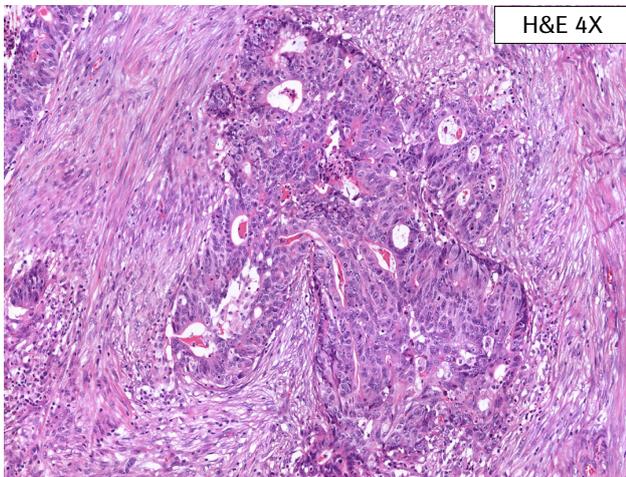
判定に苦慮する症例

ロシユMMR IHCパネルで染色された症例の大半は、染色結果が明らかに熟達していないか欠損している一方で、判定に注意を要する場合があります。

- 非特異的背景染色:一部の標本は、非特異的背景染色を示すことがあるため、非特異的背景染色のレベルを決定するために、スライドと陰性試薬コントロールスライドとの比較を含めなければなりません。MMRタンパク発現の評価では、細胞質染色は評価対象から除外してください。
- 限局性の染色:腫瘍細胞に限局性に陽性を示すことがあり、染色強度は弱いものから強いものまで様々です。MMR RxDxスコアリングアルゴリズムに基づき、内部陽性コントロール細胞における核染色が確認できる状況で、腫瘍細胞での局所的で弱い核染色は「消失」と判定されるべきです。一方、内部陽性コントロール細胞における核染色が確認できる状況で、腫瘍細胞における限局性の強い明瞭な核染色には、「保持」と判定してください。
- 点状染色:腫瘍内のいくつかの核内で点状の染色を示すことがあります。染色強度は様々ですが、この染色パターンは判定から無視してください。このタイプの染色パターンしか認められない場合には、「消失」と判定してください。
- スペクリング:点状染色とは対照的に、スペクリングはより細かい顆粒状の外観を呈し、限局性であったり、多くの腫瘍細胞にわたって発生したりすることがあります。この染色パターンが腫瘍細胞の核にみられても判定から除外してください。
- 組織または染色アーチファクト:検体処理および薄切プロセスに起因する組織学的アーチファクトは、本品の判定を困難にする可能性があります。これらのアーチファクトには、固定不良およびエッジ効果、DABトラッピング、核バブルリング、組織の一部の領域における染色の欠如、組織の引き裂きまたは折り畳み、および組織切片の欠損等が含まれます。場合によっては、新しい切片の再染色、または新しい検体の取得が必要になることがあります。

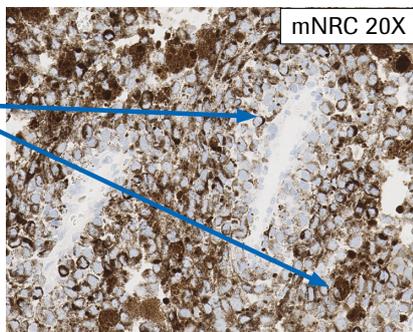
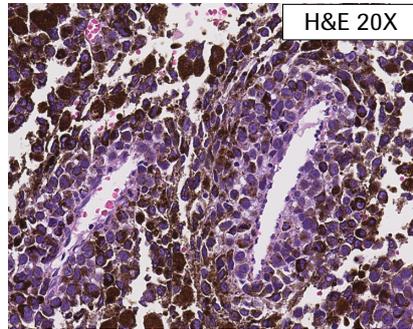
次ページ以降に、該当する事例を紹介します。

非特異的バックグラウンド染色

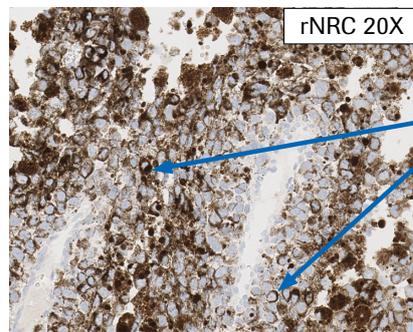


腫瘍細胞の細胞質への非特異的バックグラウンド染色

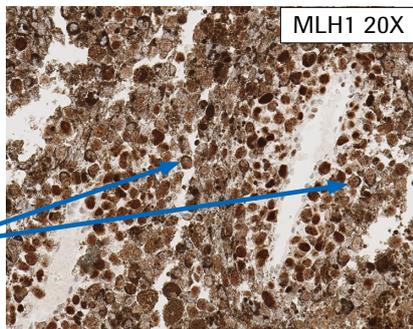
判定に注意を要する症例1：MSH2発現が保持されている大腸腺癌症例。適切に染色された内部陽性コントロール細胞の存在下で腫瘍細胞への強い核染色と細胞質への非特異的バックグラウンド染色が認められる。腫瘍細胞の細胞質におけるバックグラウンド染色は評価対象となりません。陰性コントロール試薬はマウスモノクローナル用 (mNRC) を使用している。



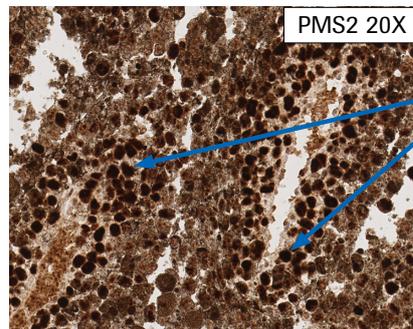
腫瘍細胞の細胞質におけるメラニン色素



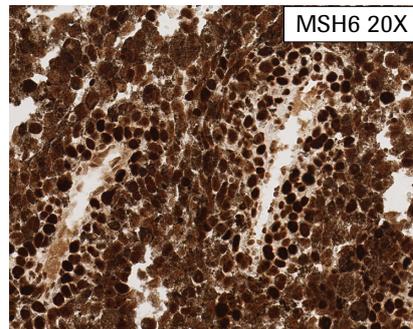
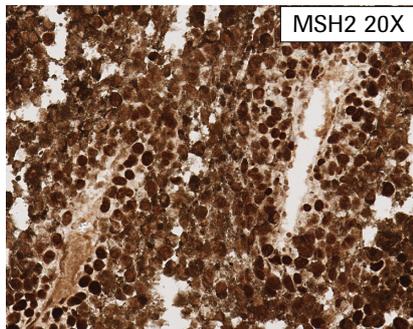
腫瘍細胞の細胞質におけるメラニン色素



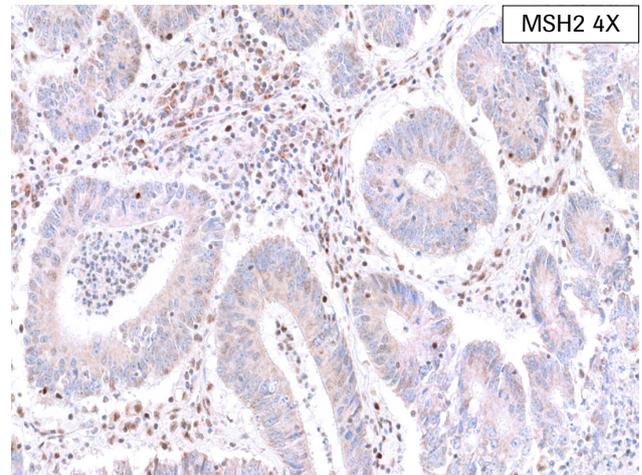
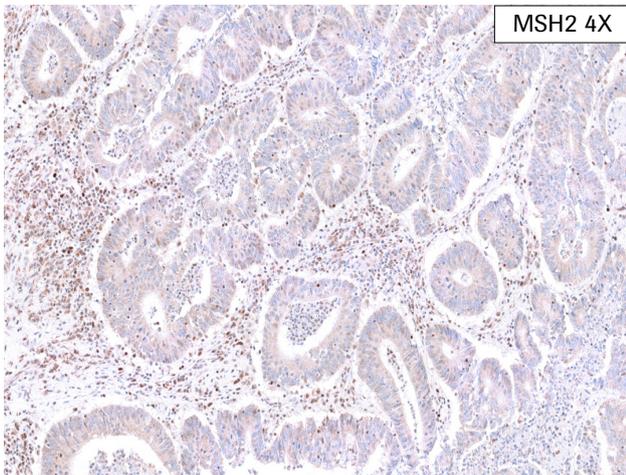
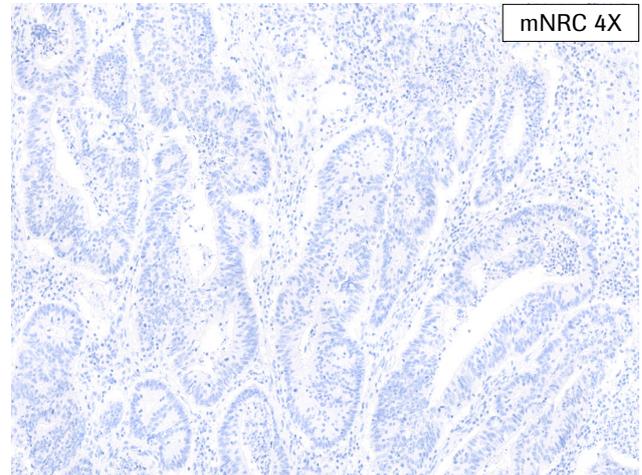
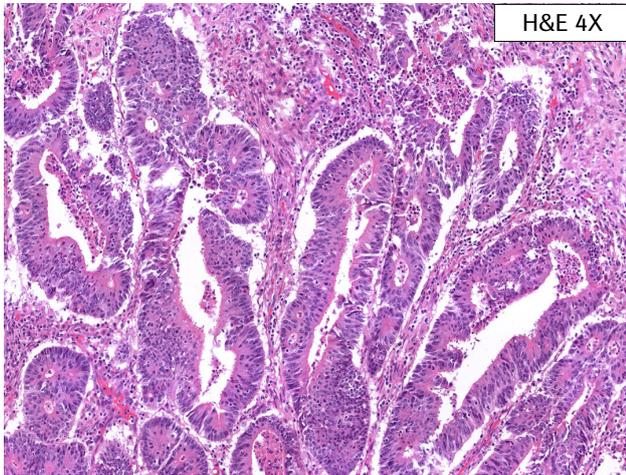
腫瘍細胞の核への明瞭な染色



腫瘍細胞の核への明瞭な染色

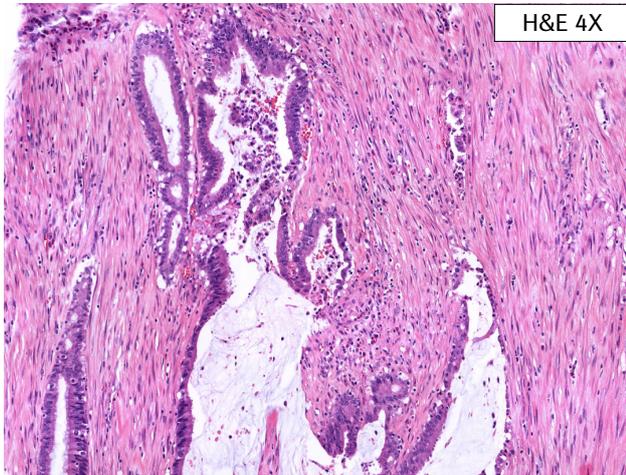


判定に注意を要する症例2：MLH1、PMS2、MSH2およびMSH6発現が保持されている転移性悪性黒色腫症例。腫瘍細胞の細胞質にメラニン色素の含有を認めるが、MMRタンパク発現の評価からは除外します。陰性コントロール試薬は、マウスモノクローナル用 (mNRC) およびウサギモノクローナル用 (rNRC) を使用している。

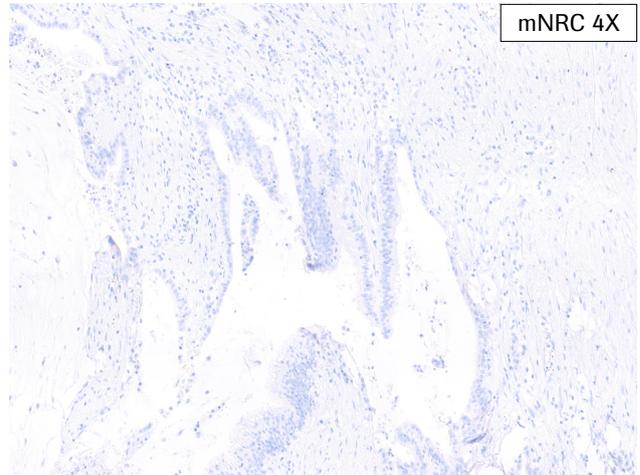


判定に注意を要する症例3：MSH2タンパク発現の消失がみられる大腸腺癌症例。腫瘍細胞の細胞質に淡いバックグラウンド染色がみられるが、判定に考慮しない。MSH2染色において内部陽性コントロール細胞の核への明瞭な染色が確認でき、腫瘍細胞の核への染色は認められない。陰性コントロール試薬はマウスモノクローナル用(mNRC)を使用している。

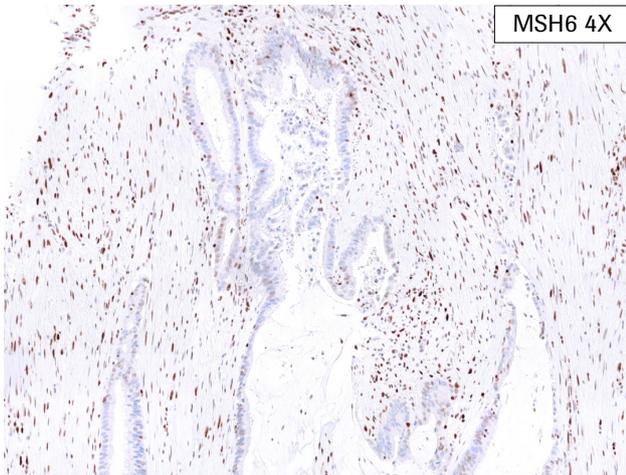
限局性の染色



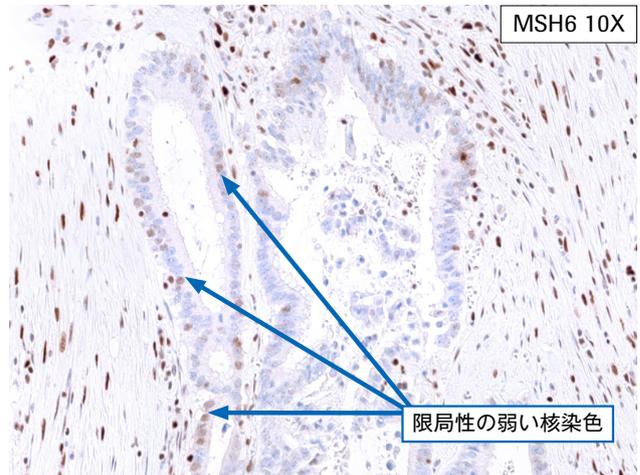
H&E 4X



mNRC 4X



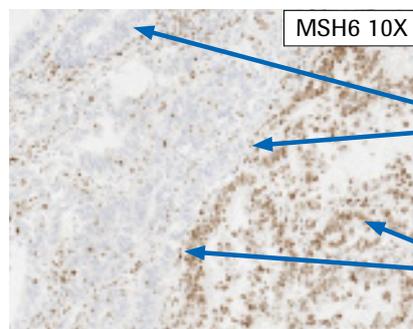
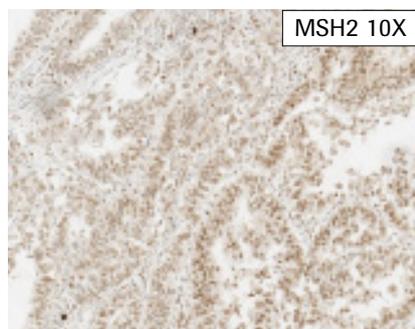
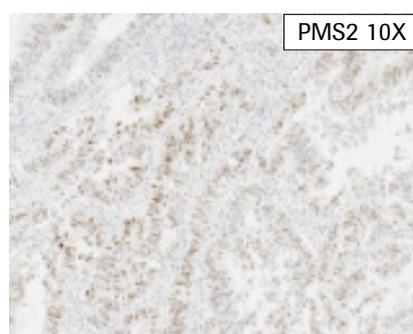
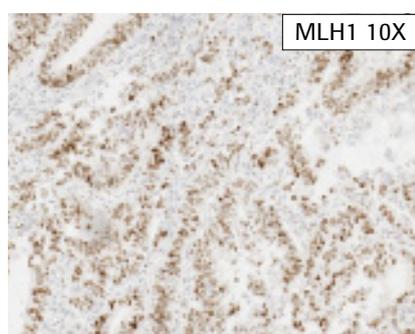
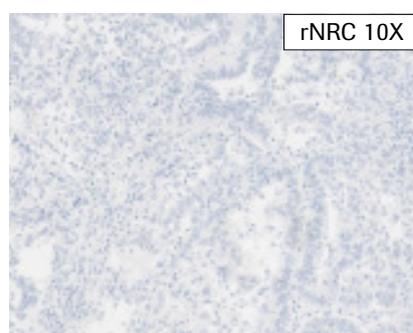
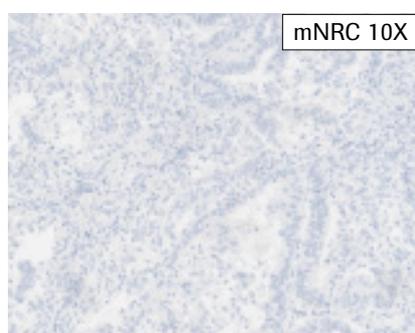
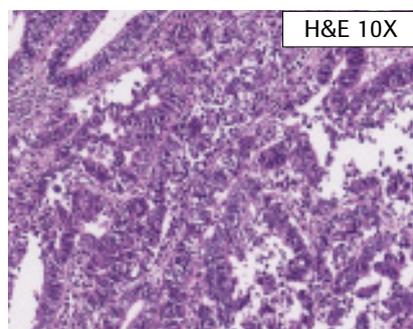
MSH6 4X



MSH6 10X

限局性の弱い核染色

判定に注意を要する症例4：MSH6発現の消失がみられる大腸癌症例。適切に染色された内部陽性コントロール細胞の存在下で、腫瘍細胞に限局性の弱い核染色が認められる。限局性の核染色の強度は内部陽性コントロール細胞の核染色の強度よりも弱い。陰性コントロール試薬はマウスモノクローナル用 (mNRC) を使用している。

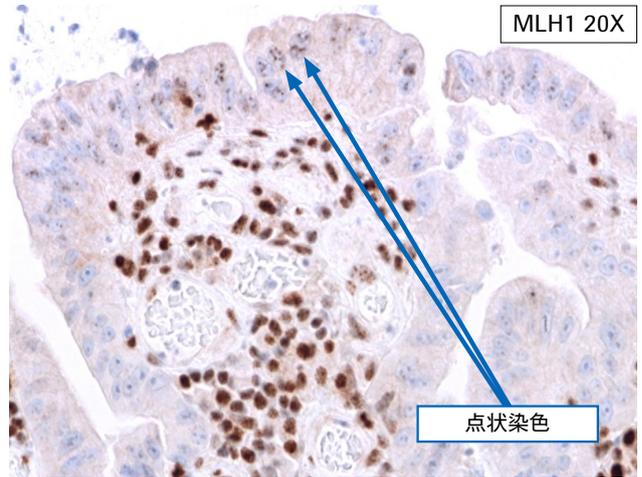
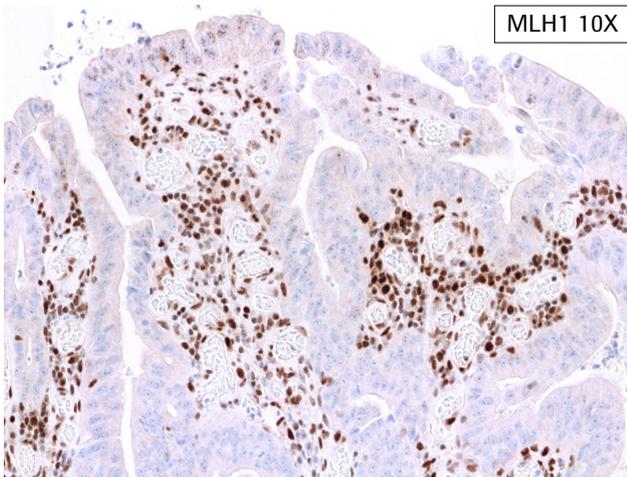
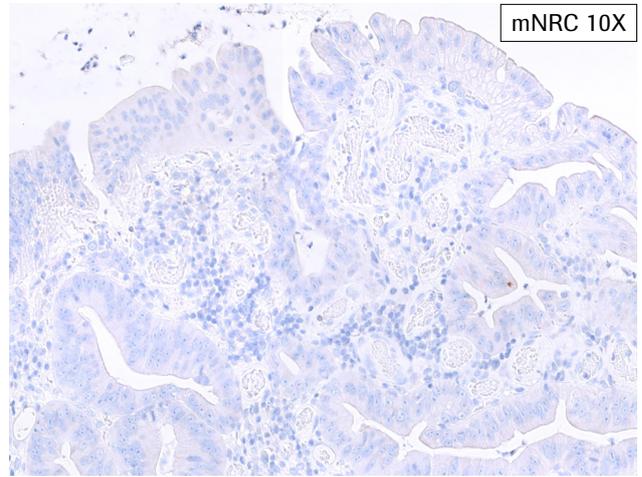
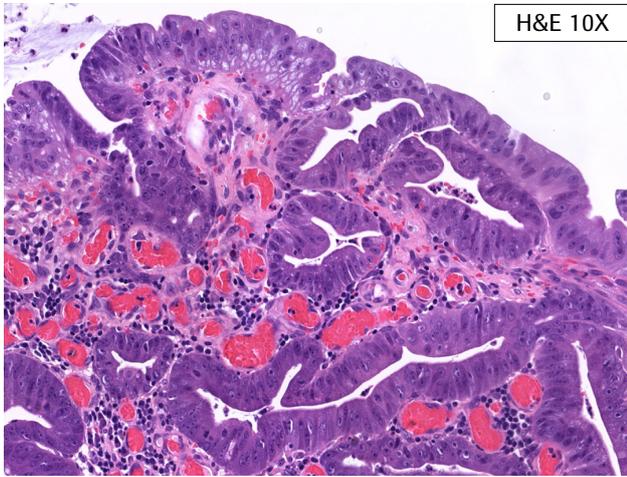


腫瘍細胞の染色の欠如

腫瘍細胞の限局性染色

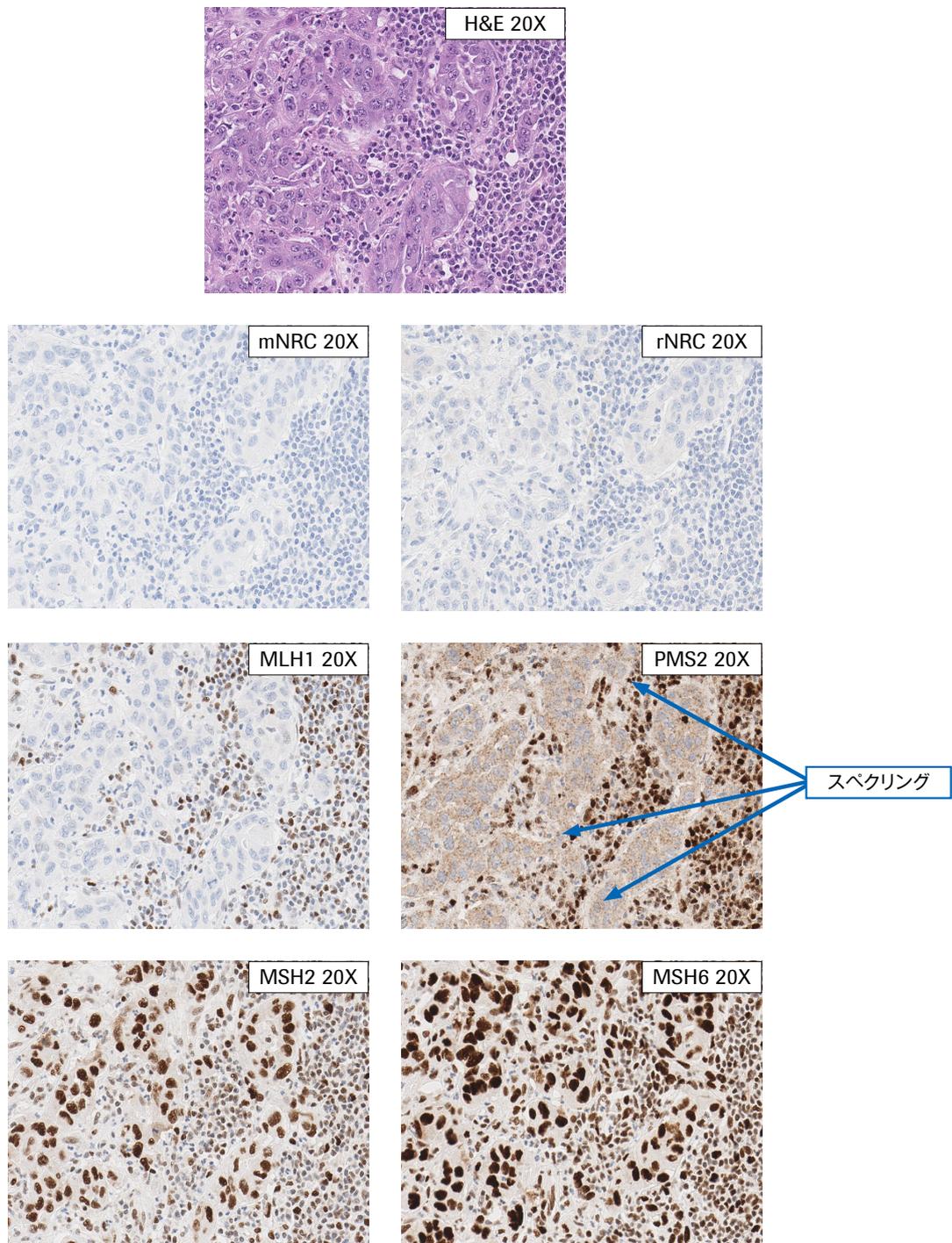
判定に注意を要する症例5：MLH1,PMS2,MSH2,MSH6発現が保持されている子宮内膜腺癌症例。MSH6染色スライドにおいて、許容可能な内部陽性コントロール細胞の存在下で、腫瘍細胞内で局所的だが明瞭な核染色がみとめられることから、「保持」と判定される。PMS2は、適切に染色される内部対照細胞の存在下で不均一な核染色強度を示します。陰性コントロール試薬は、マウスモノクローナル用(mNRC)およびウサギモノクローナル用(rNRC)をそれぞれ使用している。

点状染色

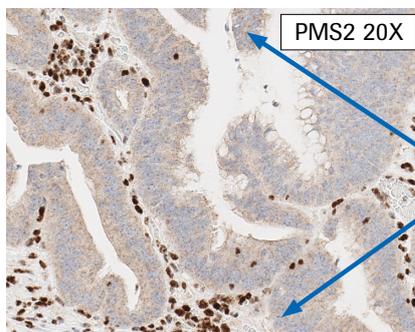
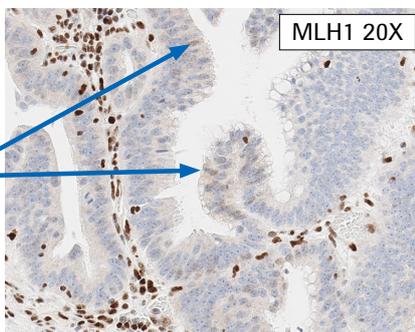
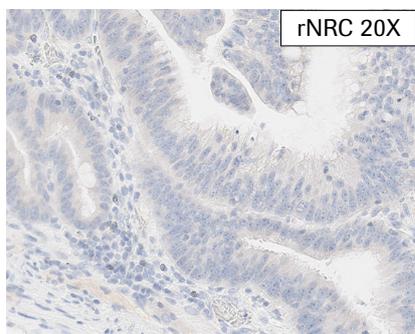
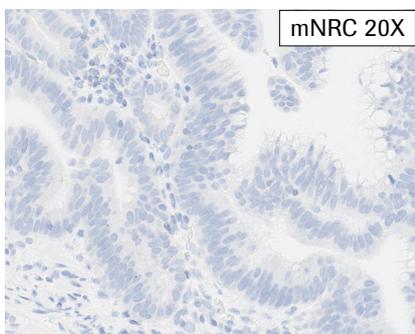
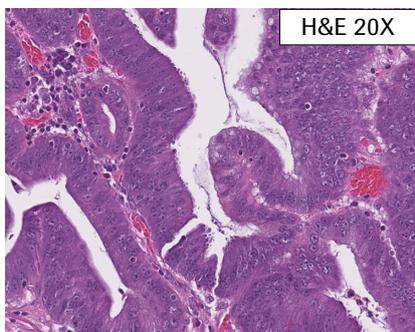


判定に注意を要する症例6：MLH1発現の消失がみられる大腸癌症例。少数の腫瘍細胞の核に強い点状染色がみとめられる。しかしながら、適切に染色される内部陽性コントロール細胞の存在下で明瞭な核染色を示す腫瘍細胞は存在しないことから、「消失」と判定される。陰性コントロール試薬はマウスモノクローナル用 (mNRC) を使用している。

スペクリング

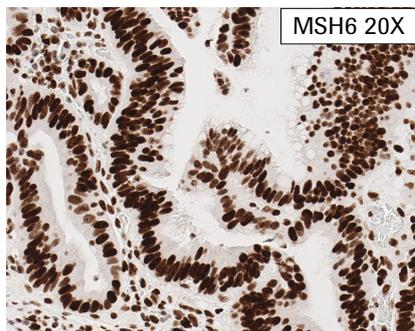
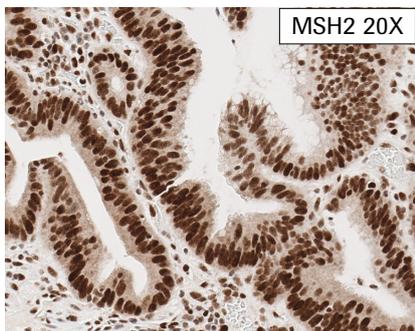


判定に注意を要する症例7：MLH1、PMS2発現の消失がみられる膀胱尿路上皮癌症例。適切に染色された内部コントロール細胞の存在下で腫瘍細胞にMLH1の核染色を認められない。一方、PMS2染色スライドにおいてスペクリングを認める。PMS2とMSH2染色は弱い細胞質染色を示すが、評価対象には含まない。陰性コントロール試薬は、マウスモノクローナル用(mNRC)およびウサギモノクローナル用(rNRC)をそれぞれ使用している。

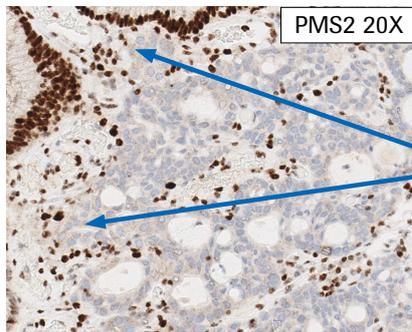
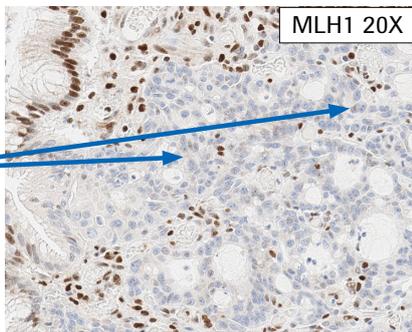
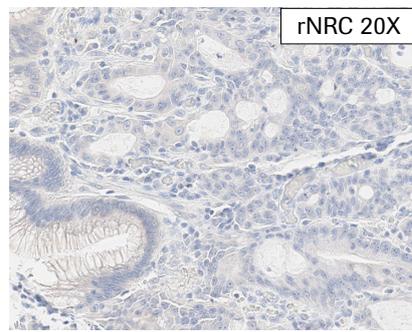
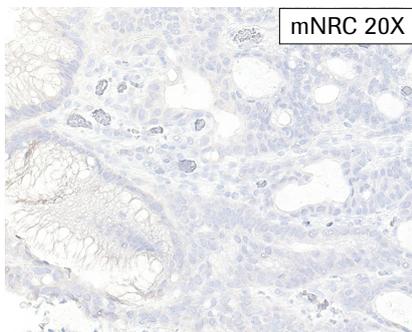
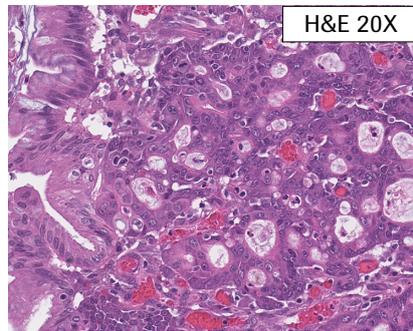


腫瘍細胞の核における強い点状染色

腫瘍細胞の核における強い点状染色

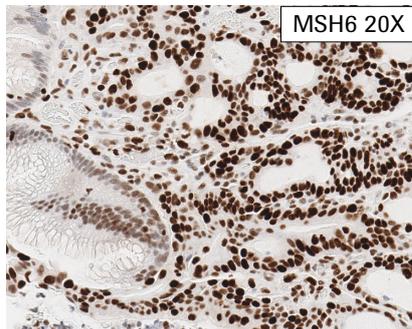
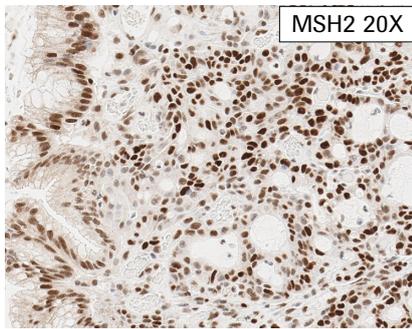


判定に注意を要する症例8： MLH1およびPMS2発現の消失がみられる大腸腺癌症例。適切に染色された内部陽性対照の存在下で、一部の腫瘍細胞の核に強い点状染色を示します。陰性コントロール試薬は、マウスモノクローナル用(mNRC)およびウサギモノクローナル用(rNRC)をそれぞれ使用している。陰性コントロール試薬は、マウスモノクローナル用(mNRC)およびウサギモノクローナル用(rNRC)をそれぞれ使用している。

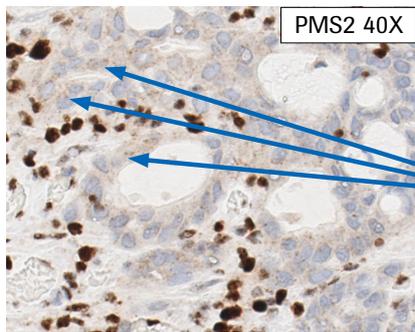
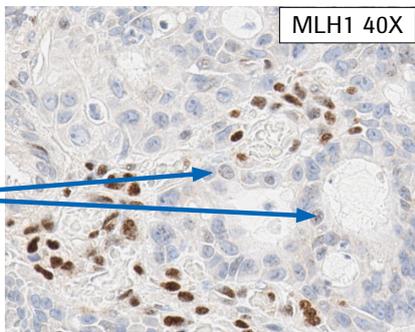
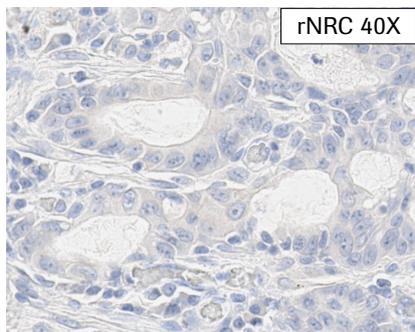
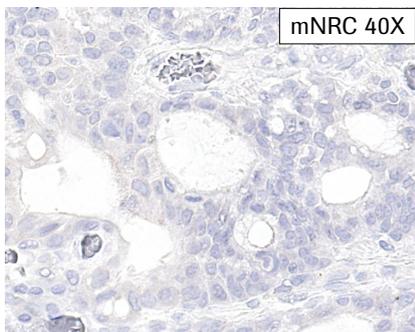
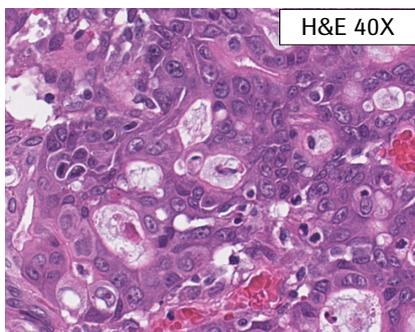


限局性の
スペクリング

限局性の
スペクリング

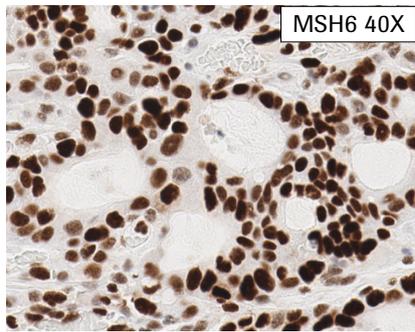
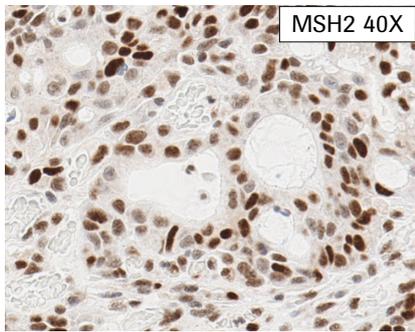


判定に注意を要する症例9： MLH1およびPMS2発現の消失がみられる胃腺癌症例。適切に染色された内部陽性対照の存在下で、腫瘍細胞に限局的にスペクリングがみられる。MSH2およびMSH6発現は保持されている。陰性コントロール試薬は、マウスモノクローナル用 (mNRC) およびウサギモノクローナル用 (rNRC) をそれぞれ使用している。



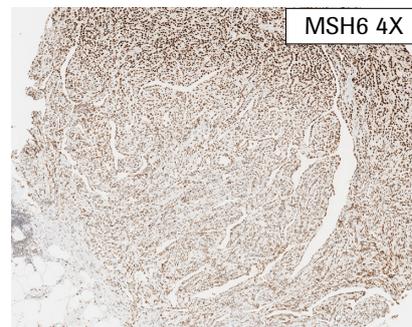
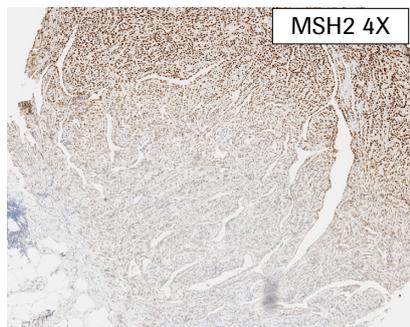
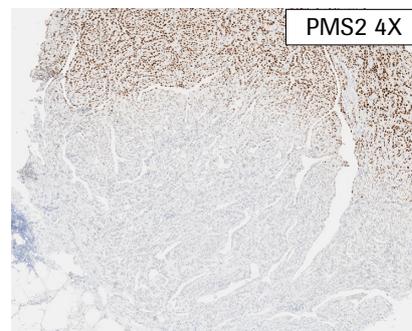
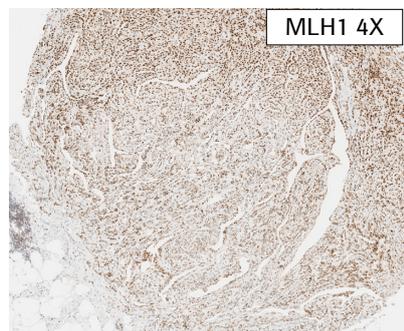
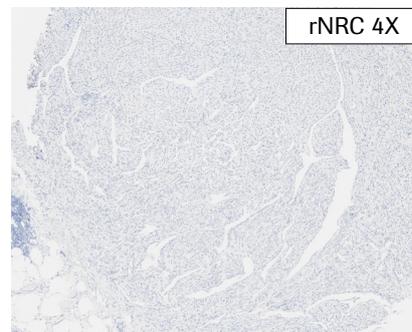
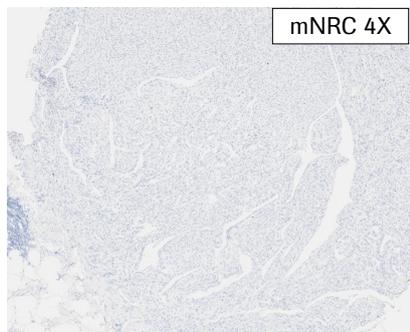
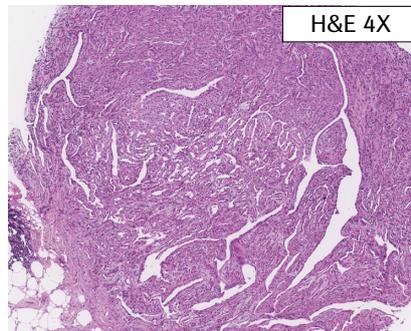
限局性の
スペクリング

限局性の
スペクリング

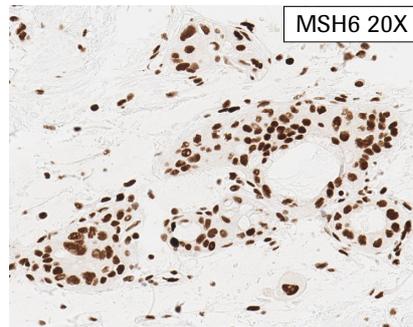
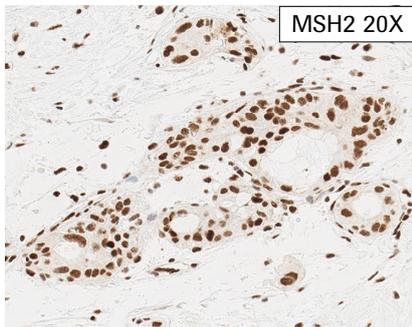
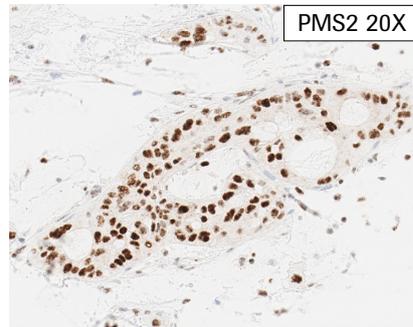
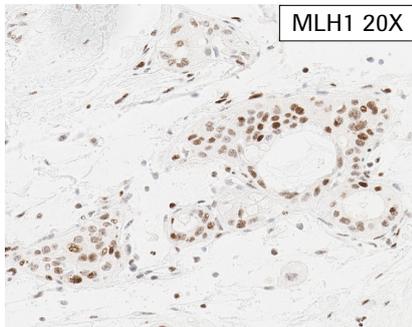
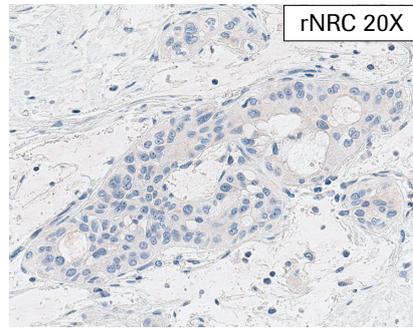
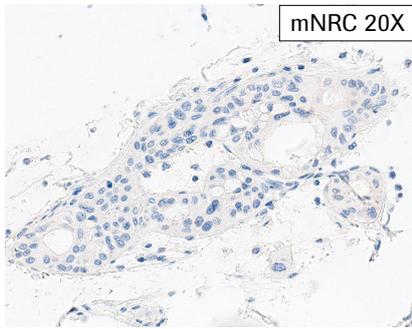
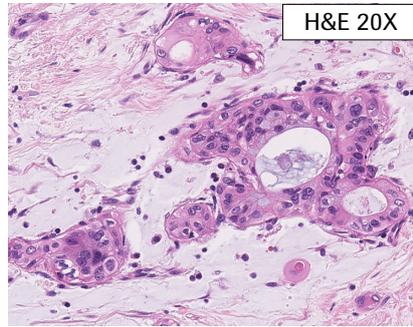


判定に注意を要する症例10：MLH1およびPMS2発現の消失がみられる胃腺癌症例。適切に染色された内部陽性対照の存在下で腫瘍細胞に限局的にスペクリングがみられる。MSH2およびMSH6発現は保持されている。陰性コントロール試薬は、マウスモノクローナル用 (mNRC) およびウサギモノクローナル用 (rNRC) をそれぞれ使用している。

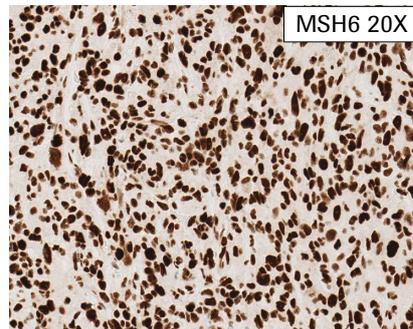
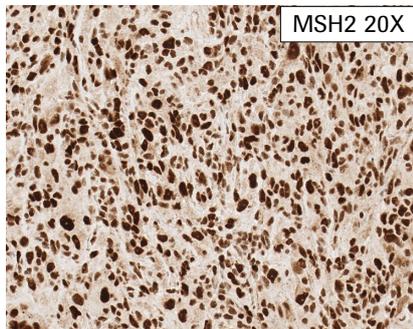
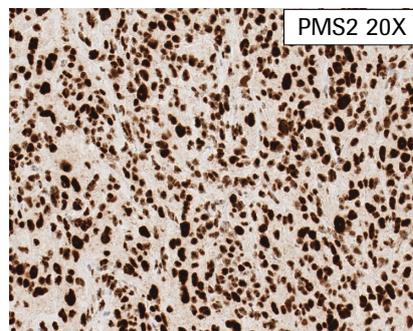
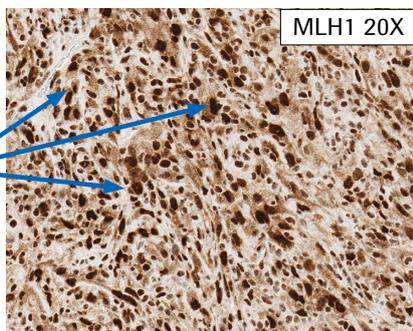
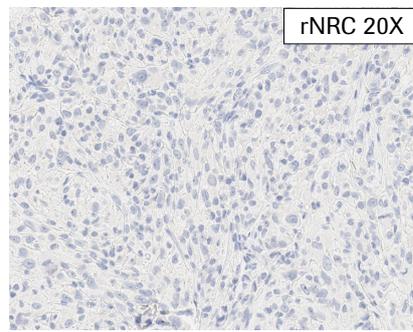
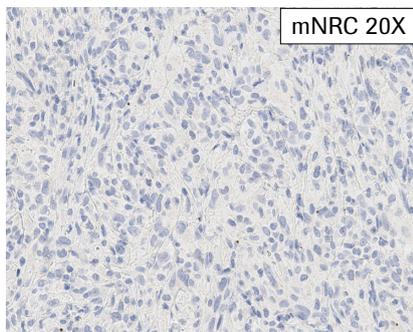
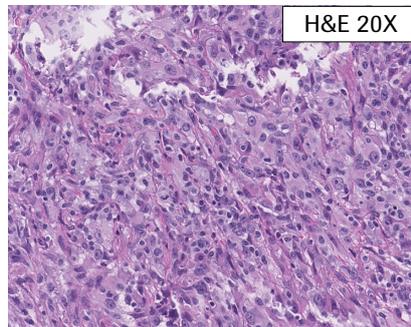
組織又は染色アーチファクト



判定に注意を要する症例11：MLH1、PMS2、MSH2、およびMSH6発現が保持されている尿路上皮癌症例。染色アーチファクトにより、腫瘍細胞および内部陽性コントロール細胞における核染色が不明瞭になる場合がある。その場合、許容できる内部陽性コントロール細胞が存在する場合にのみ評価を行う。陰性コントロール試薬は、マウスモノクローナル用 (mNRC) およびウサギモノクローナル用 (rNRC) をそれぞれ使用している。

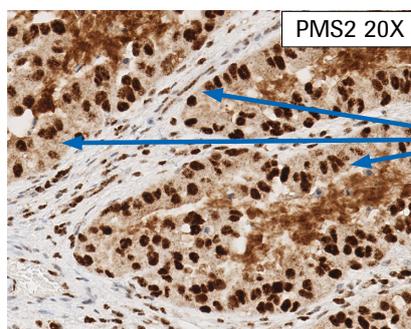
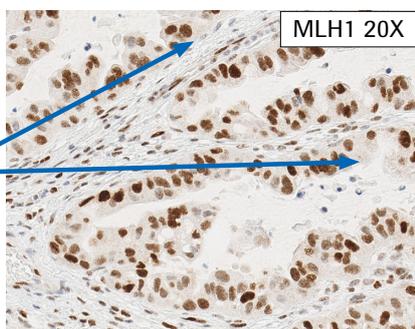
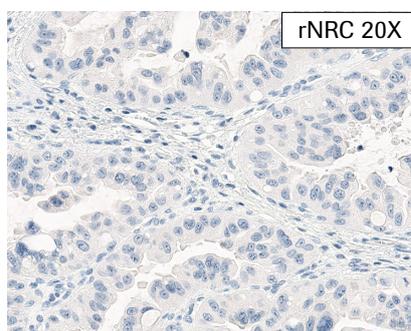
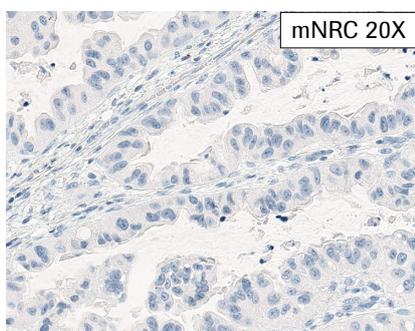
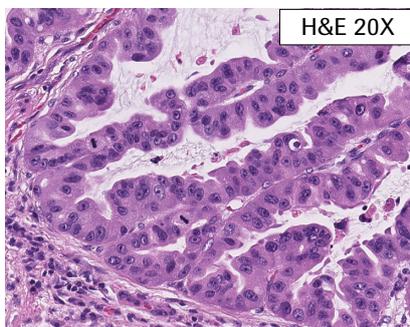


判定に注意を要する症例12：MLH1、PMS2、MSH2、および MSH6発現が保持されている膵臓腺癌症例。適切に染色された内部陽性コントロール細胞の存在下で、腫瘍細胞の核への染色強度が不均一となっている。陰性コントロール試薬は、マウスモノクローナル用 (mNRC) およびウサギモノクローナル用 (rNRC) をそれぞれ使用している。



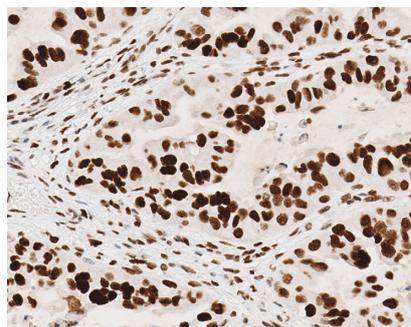
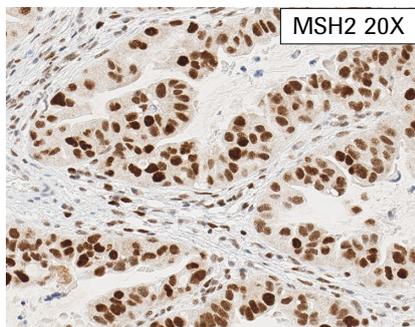
腫瘍細胞の
細胞質における
バックグラウンド染色

判定に注意を要する症例13：MLH1、PMS2、MSH2、およびMSH6発現が保持されている悪性中皮腫症例。適切に染色された内部陽性コントロール細胞の存在下で、腫瘍細胞の核に明瞭な染色がみとめられる。MLH1を有する腫瘍細胞では細胞質へのバックグラウンド染色がみられるが、MLH1発現の評価には考慮しない。陰性コントロール試薬は、マウスモノクローナル用(mNRC)およびウサギモノクローナル用(rNRC)をそれぞれ使用している。



細胞質ブラシ

細胞質背景染色



判定に注意を要する症例14：MLH1、PMS2、MSH2、および MSH6発現が保持されている膵臓腺癌症例。適切に染色された内部陽性コントロール細胞の存在下で、腫瘍細胞の核に明瞭な染色がみとめられる。PMS2スライドにおいて、腫瘍細胞内の細胞質への染色がみられるが、PMS2発現を評価する際に考慮しない。陰性コントロール試薬は、マウスモノクローナル用(mNRC)およびウサギモノクローナル用(rNRC)をそれぞれ使用している。

ブレアナリシスの影響

■最適な染色結果を得るための固定条件

推奨条件:

- 摘出後なるべく速やかな固定
- 検体の15~20倍量の10%中性緩衝ホルマリン中で6~72時間固定する。固定時間の影響等は表5-8を参照のこと。

表5 ベンタナ OptiView MLH1 (M1) 染色における固定条件の影響(ヒト良性扁桃組織)

時間 (Hrs)	固定剤					
	10%NBF	ホルマリン垂鉛**	Z-5**	PREFER**	AFA**	95%アルコール**
1*						
6						
12						
24						
72						

(全画像20倍)

注意

10%中性緩衝ホルマリン以外の固定液の使用は推奨されません。

表6 ベンタナ OptiView PMS2 (A16-4) 染色における固定条件の影響 (ヒト良性扁桃組織)

時間 (Hrs)	固定剤					
	10%NBF	ホルマリン垂鉛**	Z-5**	PREFER**	AFA**	95%アルコール**
1*						
6						
12						
24						
72						

(全画像20倍)

注意

10%中性緩衝ホルマリン以外の固定液の使用は推奨されません。

表7 ベンタナ OptiView MSH2 (G219-1129) 染色における固定条件の影響 (ヒト良性扁桃組織)

時間 (Hrs)	固定剤					
	10%NBF	ホルマリン垂鉛**	Z-5**	PREFER**	AFA**	95%アルコール**
1*						
6						
12						
24						
72						

(全画像20倍)

注意

10%中性緩衝ホルマリン以外の固定液の使用は推奨されません。

表8 ベンタナ OptiView MSH6 (SP93) 染色における固定条件の影響(ヒト良性扁桃組織)

時間 (Hrs)	固定剤					
	10%NBF	ホルマリン垂鉛**	Z-5**	PREFER**	AFA**	95%アルコール**
1*						
6						
12						
24						
72						

(全画像20倍)

注意

10%中性緩衝ホルマリン以外の固定液の使用は推奨されません。

未染スライドの安定性

薄切後 45日以上保存した切片スライドの使用は推奨されません。切り取った組織切片の抗原性は経時的に低下する可能性があるため、薄切後すみやかに染色することをお勧めします。

組織厚

切片は4 μ mの厚さで切断し、シランなどがコートされたスライドガラスに取り付けます。他の厚さは検証されていないです

1. Hsieh P, Yamane K. DNA mismatch repair: Molecular mechanism, cancer, and ageing. *Mech Ageing Dev.* 2008;129(7-8):391-407.
2. Naboush A, Roman C, Shapira I. Immune checkpoint inhibitors in malignancies with mismatch repair deficiency: a review of the state of the current knowledge. *J Investig Med.* 2017;65(4):754-758.
3. Chang L, Chang M, Chang HM, et al. Microsatellite instability: a predictive biomarker for cancer immunotherapy. *Appl Immunohistochem Mol Morphol.* 2018;26(2):e15-e21.
4. Buza N, Ziai J, Hui P. Mismatch repair deficiency testing in clinical practice. *Expert Rev Mol Diagn.* 2016;16(5):591-604.
5. Silva FCC, Torrezan GT, Ferreira JRO, et al. Germline mutations in MLH1 leading to isolated loss of PMS2 expression in Lynch syndrome: Implications for diagnostics in the clinic. *Am J Surg Pathol.* 2017;41(6):861-864.
6. Cunningham JM, Tester DJ, Thibodeau SN. Mutation detection in colorectal cancers: direct sequencing of DNA mismatch repair genes. *Methods Mol Med.* 2001;50:87-98.
7. 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):739-745.
8. 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(7528):563-567.
9. Kheirlesei EA, Miller N, Chang KH, et al. Mismatch repair protein expression in colorectal cancer. *J Gastrointest Oncol.* 2013;4(4):397-408.
10. Kawakami H, Zaanan A, Sinicrope FA. Microsatellite instability testing and its role in the management of colorectal cancer. *Curr Treat Options Oncol.* 2015;16(7):30.
11. Xiao X, Dong D, He W, et al. Mismatch repair deficiency is associated with MSI phenotype, increased tumor-infiltrating lymphocytes and PD-L1 expression in immune cells in ovarian cancer. *Gynecol Oncol.* 2018;149(1):146-154.
12. Yamashita H, Nakayama K, Ishikawa M, et al. Microsatellite instability is a biomarker for immune checkpoint inhibitors in endometrial cancer. *Oncotarget.* 2017;9(5):5652-5664.
13. Sloan EA, Ring KL, Willis BC, et al. PD-L1 expression in mismatch repair-deficient endometrial carcinomas, including Lynch Syndrome-associated and MLH1 promoter hypermethylated tumors. *Am J Surg Pathol.* 2017;41(3):326-333.
14. Le DT, Durham JN, Smith KN, et al. Mismatch repair deficiency predicts response of solid tumors to PD-1 blockade. *Science.* 2017;357(6349):409-413.
15. Dudley JC, Lin MT, Le DT, et al. Microsatellite instability as a biomarker for PD-1 blockade. *Clin Cancer Res.* 2016;22(4):813-820.

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

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

カスタマーソリューションセンター ☎0120-600-152

「VENTANA」は、ロシュ社の登録商標です。

