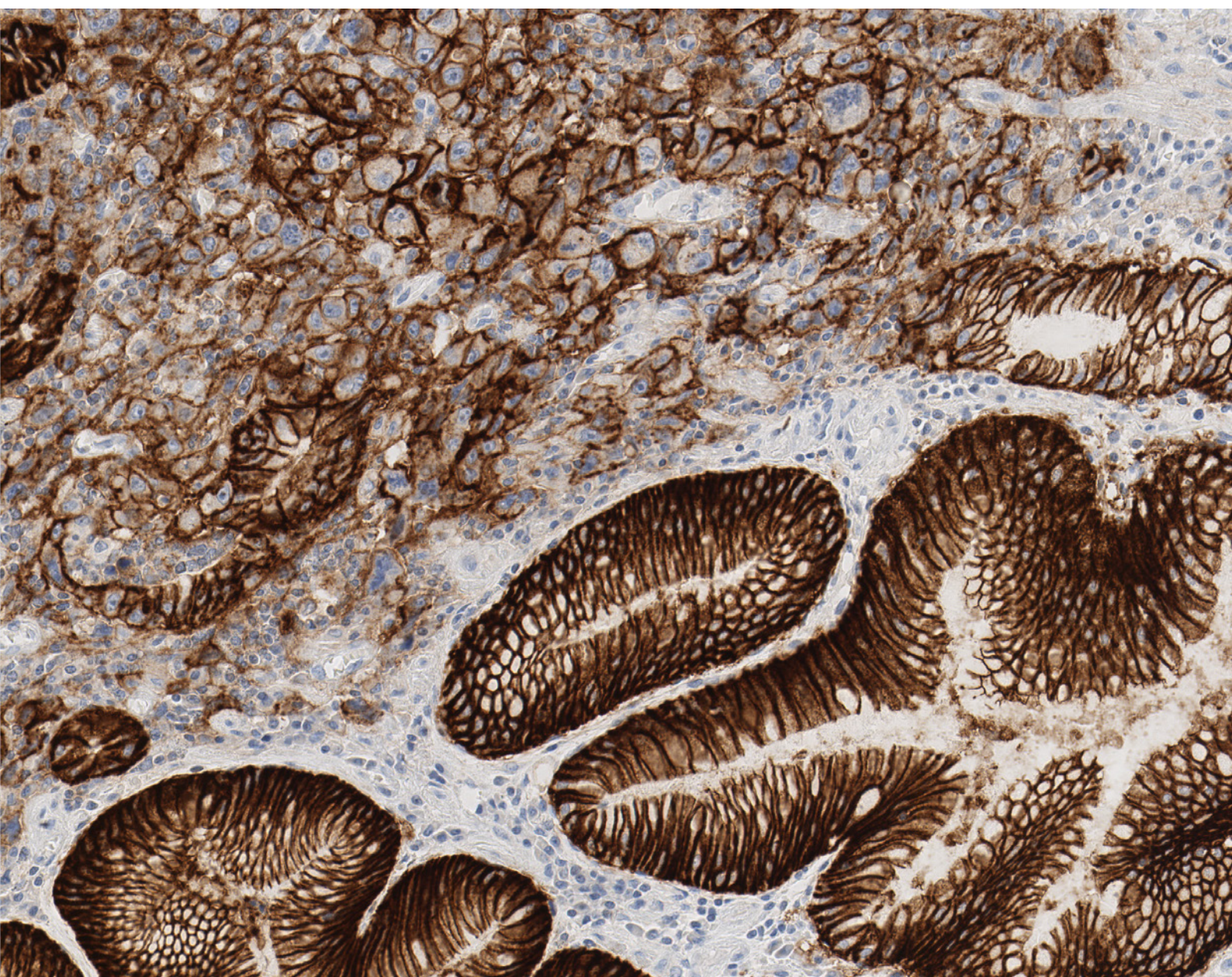


体外診断用医薬品

CLDN タンパクキット

ベンタナ OptiView CLDN18 (43-14A)

判定ガイド～胃癌編～



目次

はじめに	2
使用目的	3
製品の使用目的	3
判定ガイドの目的	3
製品概要	3
キット構成	3
別途必要な試薬等	3
反応原理	4
適用機種	4
推奨プロトコール	4
染色結果の判定	5
染色の特徴	5
染色パターンおよび染色強度の評価	5
腫瘍細胞のスコアリング	7
染色様式とバックグラウンド染色の許容基準	8
スコアリングアルゴリズム	8
スコアリング方法	10
精度管理用コントロール	11
検査フロー	14
参考画像	16
陰性例	16
陽性例	24
判定に苦慮する症例	32
アーチファクト	47
プレアナリシスの影響	51
薄切済み未染色スライドの安定性	52
参考文献	54

はじめに

ベンタナ OptiView CLDN18 (43-14A) は、胃食道接合部を含む胃癌のホルマリン固定パラフィン包埋標本 (FFPE標本) において、マウスモノクローナル抗体 (クローン43-14A) を用いて、膜貫通Claudin18 (CLDN18) タンパク質を検出するための免疫組織化学的検査です。希釈済み一次抗体であるベンタナ CLDN18 (43-14A) RxDxと検出用試薬であるベンタナ OptiView DAB ユニバーサルキットとの組み合わせで、自動染色装置ベンタナ ベンチマークシリーズを用いて染色する体外診断用医薬品として承認されています*。

胃癌は世界で4番目に多い癌であり、2020年には約769,100人が亡くなり、新規罹患数は100万人を超えると推定されています^{1,2}。全世界の胃癌報告数の約70%は発展途上国からの報告であり、全世界の症例の45.7%は東アジアからのものです³。日本においては、胃癌は大腸癌や肺癌に続き三番目に多い癌で、2019年における新規罹患数は124,319人と報告されています⁴。進行性・転移性胃癌に対する現在の治療法として化学療法が挙げられますが、その効果は限定的です。新たな標的分子となるバイオマーカーを特定し、新しい治療法を開発することが、胃癌の臨床的アウトカム改善に繋がると期待されます。

CLDN18はCLDNスーパーファミリーに属するタンパク質です⁵。Claudinは、2つの細胞外ループと細胞内のN末端とC末端をもつ4回膜貫通型タンパク質で、細胞間接着の一様式であるタイトジャンクションを形成するのに重要であるといわれています^{5,6}。Claudinファミリータンパク質は、透過性バリアの維持、細胞移動の調節、および上皮細胞における極性の付与に不可欠な役割を果たしています⁵。

CLDN18にはCLDN18.1およびCLDN18.2という2つのアイソフォームが存在します**。両アイソフォーム共に長さは261アミノ酸であり、C末端領域では相同性を示しますが、N末端領域ではアミノ酸配列に差異がみられます^{5,6,7}。

CLDN18.1は、主に正常および腫瘍性の肺組織に発現しています^{5,6}。一方でCLDN18.2は、胃粘膜の分化した上皮細胞でのみ発現し、他臓器の正常組織ではほとんど発現がみられません^{5,6,8}。CLDN18.2の発現は、胃癌およびその転移巣において高頻度に保持され、他の腫瘍性組織 (例えば、膵臓、肺、卵巣) においても認められる場合があります^{5,6,8}。さらに、様々な固形癌 (例えば胃癌、膵臓癌など) におけるCLDN18.2の異常な発現は、細胞間接着の喪失、上皮間葉転換、腫瘍の進行および転移との関連がみられます^{5,6}。このことから、CLDN18は分子標的薬のターゲットとして有用なバイオマーカーといえます。

* 本製品の詳細な使用目的や自動染色装置ベンチマークシリーズの対応機種については、ベンタナ OptiView CLDN18 (43-14A) の電子添付文書をご参照ください。

**ベンタナ OptiView CLDN18 (43-14A) で使用される一次抗体は、CLDN18タンパク質の保存されたC末端領域を標的とするため、CLDN18.1をCLDN18.2と区別することができません。

使用目的

■製品の使用目的

ベンタナ OptiView CLDN18 (43-14A) はRoche社製の自動染色装置であるベンチマーク用に開発され、がん組織中のCLDN18タンパクの検出を目的とした検査キットです。

■判定ガイドの目的

- 本ガイドはベンタナ OptiView CLDN18 (43-14A) で染色した胃食道接合部組織を含む胃癌組織のFFPE標本を適切に評価して頂くことを目的としています。
- 胃食道接合部組織を含む胃癌組織における本アッセイの染色パターンおよび強度を評価する際に参考となる画像を提示します。
- 陽性コントロール組織となる腸上皮化生組織を評価する際のガイダンスを提供します。
- 判定に苦慮する症例やアーチファクトについても取り扱います。

製品概要

ベンタナ OptiView CLDN18 (43-14A) 体外診断用医薬品製造販売承認番号:30600EZ00009000

■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 CLDN18 (43-14A) RxDx 商品コード:518-633691

構成試薬	成分	包装単位
一次抗体	抗CLDN18マウスモノクローナル抗体 (43-14A)	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 抗マウスIgG、抗マウスIgM、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)
H ₂ O ₂ 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)

■別途必要な試薬等

●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
518-100834	陰性コントロール (MOPC21)	250テスト
518-103095	SLS/E-bar ラベルII	1個 (540枚)

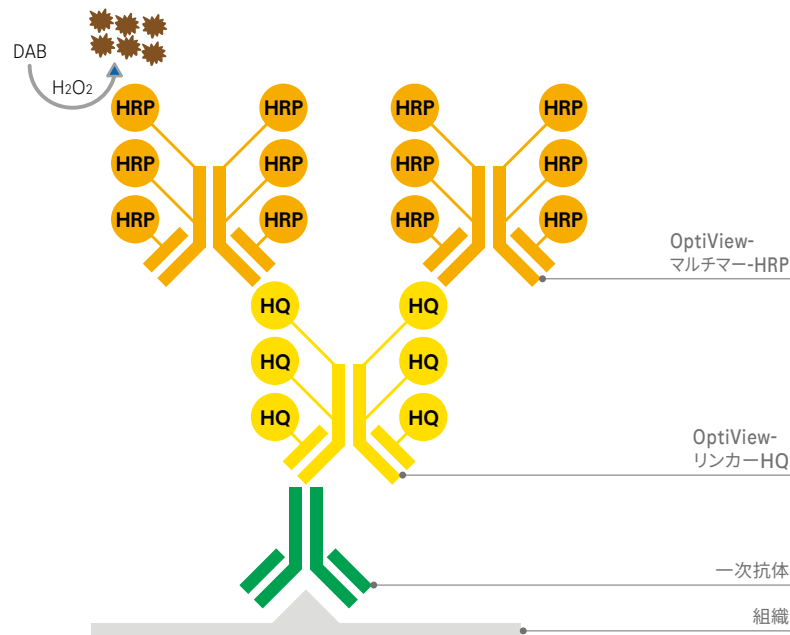
※ベンチマークGX,XTの場合

■ 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、がん組織中のCLDN18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（NCR）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、CLDN18発現率を測定します。



■ 適用機種

- ペンタナ ベンチマークGX (医療機器製造販売届出番号：13B1X00201000053)
- ペンタナXTシステム ベンチマークモジュールXT (製造販売終了)
- ペンタナ ベンチマークULTRA (医療機器製造販売届出番号：13B1X00201000050)
- ベンチマークULTRA PLUS (医療機器製造販売届出番号：13B1X00201000088)

■ 推奨プロトコール

染色工程	設定内容		
	GX	XT	ULTRA / ULTRA PLUS
プロシージャ名	GX CLDN18 (43-14A) RxDx W	XT CLDN18 (43-14A) RxDx W	U CLDN18 (43-14A) RxDx W
Baking (ベーキング)	選択不要		
Antibody (一次抗体) または Negative Control (陰性コントロール試薬)	16 minutes, 37°C	32 minutes, 37°C	16 minutes, 36°C
Post Counterstain (色出し)	Bluing-4min		

染色結果の判定

■染色の特徴

ペンタナ OptiView CLDN18 (43-14A) によって検出された胃食道接合部を含む胃癌の腫瘍細胞において、陽性率およびDAB発色強度を評価します。

胃癌組織の腫瘍細胞の染色パターンとして、細胞膜において完全な陰性から非常に強い染まりまで、幅広い染色強度がみられます。また、細胞質にも発色が認められることがあります。スコアリング対象外となります。

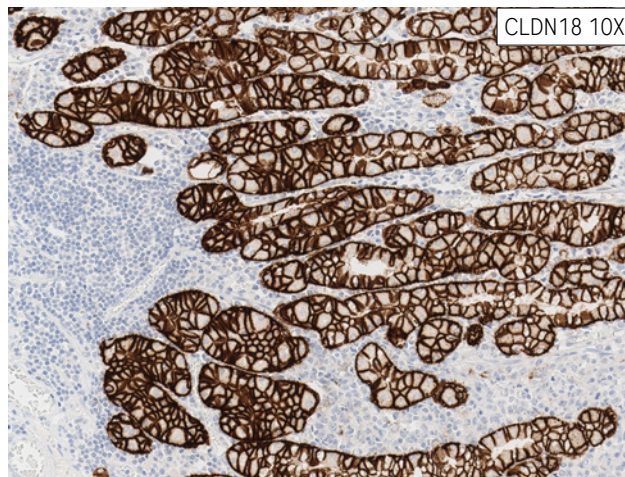
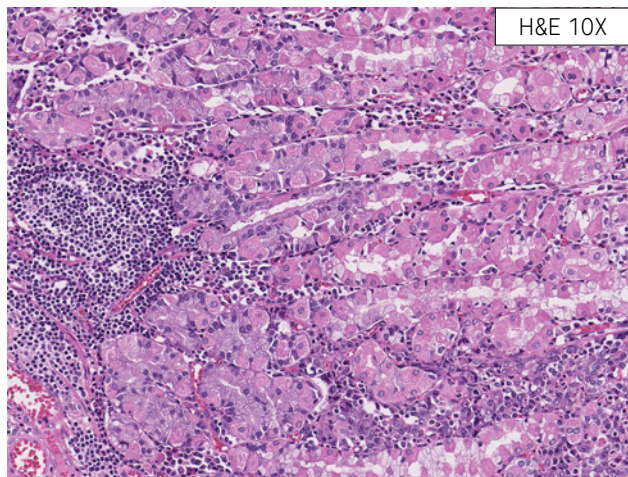
また、同一組織切片内でも染色の不均一性がみられる場合があります。腫瘍細胞への染まりは細胞膜に沿って線状であることが最も一般的です。細胞膜に中等度～強い染まりがみられる腫瘍細胞が占める割合によって、CLDN18陽性か陰性かを判断します。また、各症例について、陰性対照スライドを用いて、非特異的なバックグラウンド染色を評価します。

■染色パターンおよび染色強度の評価

ペンタナ OptiView CLDN18 (43-14A) は、胃組織の非腫瘍部、腸上皮化生、および胃食道接合部を含む胃癌において、様々な染色強度で細胞膜への染色パターンを示します。

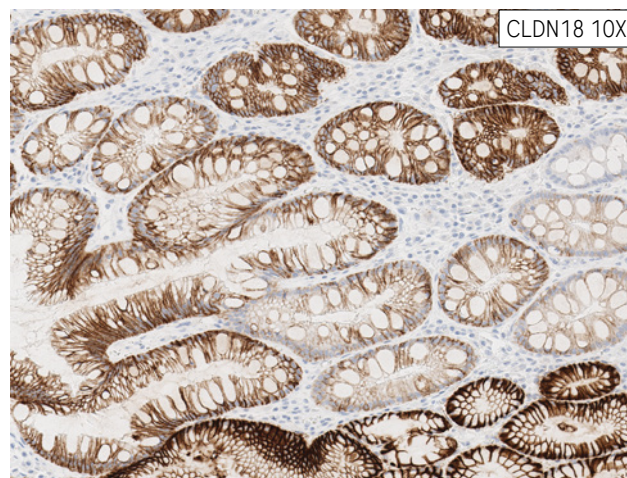
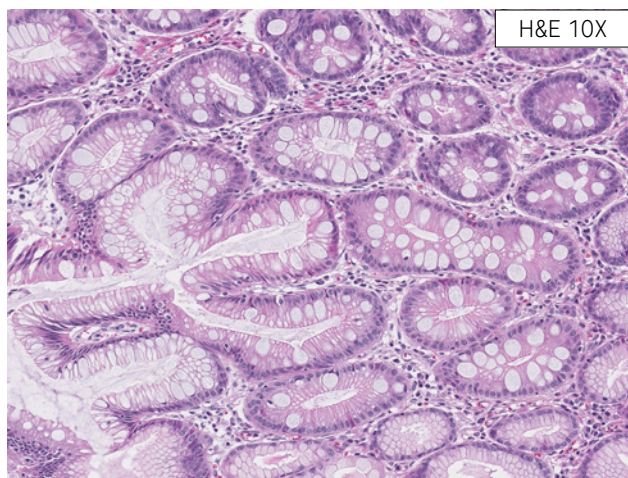
- 弱い染まり：淡い茶褐色に染色され、部分的または全周性の細胞膜への染まりがみられる。
- 中等度の染まり：茶褐色に染色され、部分的または全周性の細胞膜への染まりがみられる。
- 強い染まり：暗褐色～黒色に染色され、部分的または全周性の細胞膜への染まりがみられる。多数のDAB分子の集積によって細胞膜が肥厚して見える。

非腫瘍性胃上皮：非腫瘍性の胃上皮細胞に強い膜染色がみられます。これは内部陽性コントロールとして有用ですが、標本のスコアリングの際に考慮に入れる必要はありません。細胞質への染色がみられることもあります。こちらもスコアリング判定基準には含まれません。

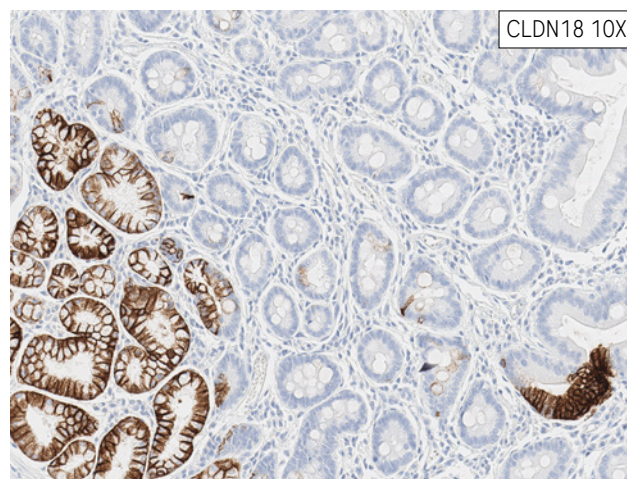
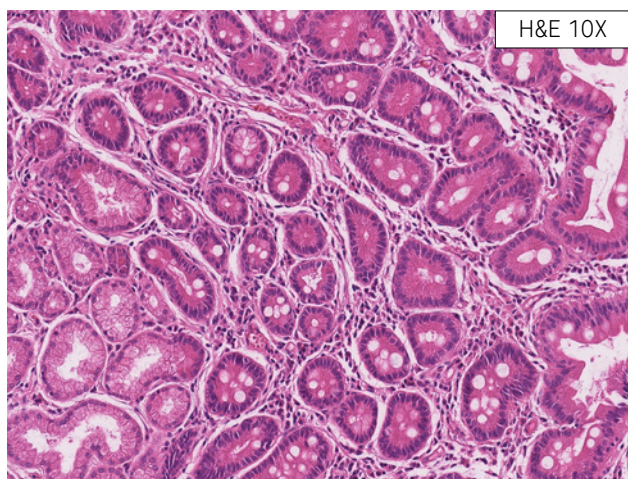


非腫瘍性胃上皮の例：非腫瘍性胃上皮に強い膜染色が認められる。局所的な細胞質への染色も散見されるが、スコアリング判定基準には含まれない。

腸上皮化生：胃組織切片に腸上皮化生がある場合、CLDN18染色は様々な染色強度を示します。腸上皮化生へのCLDN18染色の許容基準は、精度管理用コントロールのみに適用されます(表2)。腸上皮化生部分は、スコアリングの判定には含まれません。



腸上皮化生(不完全型)：腸上皮化生(不完全型)では、陰性～強い染まりまで様々な強度の膜染色が認められる。腸上皮化生部分は、スコアリングの判定には含まれない。



腸上皮化生(完全型)を伴う胃腺窩上皮(非腫瘍性上皮)：左のHE染色像では、非化生胃上皮細胞(左下角)と杯細胞を伴う腸上皮化生が認められます。一方で、画像中央にある腸上皮化生には杯細胞が認められません。右側のCLDN18染色像のように、非化生胃上皮細胞は強い膜染色を示します。一方で、完全型腸上皮化生では、不完全型腸上皮化生とは異なり、全く染まっていないか、ごく弱い染色しかみられません。

■腫瘍細胞のスコアリング

腫瘍細胞におけるCLDN18の膜染色は、総生存腫瘍細胞数のうち、中等度～強い膜染色を示す生存腫瘍細胞のパーセンテージを算出してスコアリングされます。細胞膜への染まりは、顆粒状の部分に伴っている場合でも、線状の染色が認められます。

腫瘍細胞の総数については生存腫瘍細胞のみを考慮し、壊死領域または管腔内の壊死組織の腫瘍細胞染色は除外されます。腫瘍細胞のスコアリング基準を表1に示します。

本アッセイでは、各検体について3つの連続切片を用意し、HE染色、陰性コントロール試薬を用いた染色（陰性コントロール抗体：商品コード518-100834）、およびベンタナ CLDN18 (43-14A) RxDxを用いた染色を実施する必要があります。ベンタナ CLDN18 (43-14A) RxDxを用いて染色した患者標本はスコアリング判定基準を正しく理解した病理医による評価が必要です。すべてのコントロール（精度管理用コントロールスライドおよび陰性コントロール試薬を用いて染色したスライド）の結果が許容範囲である場合、CLDN18染色の結果を評価することができます。

HE染色結果により患者検体が不適格であることが判断された場合（例えば、生存腫瘍細胞が50個未満の場合など）、新たな検体を用意し、再検査を実施してください。CLDN18染色の精度管理用コントロールスライドの結果が許容範囲でない場合は、その患者検体の再染色を行ってください。陰性コントロール試薬を用いて染色したスライドの結果が許容範囲でない場合は、その症例の新しい連続組織切片を用いて再染色を行ってください。

以下の場合、未染色スライドを用いて再染色を実施してください。

(1) HE染色結果が許容範囲でない場合、(2) 陰性対照スライド染色結果が許容範囲でない場合、(3) CLDN18染色スライドが評価不能である場合

CLDN18染色スライドはアーチファクト（エッジ効果、DAB分子のトラッピング、組織の重なり皺や裂け目）、過度のバックグラウンド染色、壊死、腫瘍の欠如、またはその他の理由により、結果の判定が困難となる場合があります。CLDN18染色スライドが解釈不能の場合、そのスライドを臨床評価に使用することはできません。（p.14 検査フロー参照）

表1：腫瘍細胞スコアリング基準

腫瘍細胞スコアリング基準	適格条件
組織中の含有細胞数	50個以上の生存腫瘍細胞
染色強度	中等度～強い染まり
染色パターン	頂端側（Apical）、側方・基底膜側（Basolateral）、側方（Lateral）、全周性（完全でなくても可）、微細管腔内（Microluminal） ※基底膜側（Basal）のみに染まっている場合はカウント対象外です。
スコアリングの分母	生存腫瘍細胞の総数

■染色様式とバックグラウンド染色の許容基準

CLDN18で染色した各患者症例について、表2および表3に記載された基準を用いて組織形態およびバックグラウンド（患者検体における本来の検出対象ではない部分への染まり）を評価します。

表2：形態の判定基準

解釈	顕微鏡観察
適合	対象とする細胞が問題なく観察されており、染色結果の臨床的評価が可能
不適合	対象とする細胞が適切に検出されておらず、染色結果の臨床的評価が困難

表3：バックグラウンドの許容基準

解釈	顕微鏡観察
適合	バックグラウンド染色によって、本来の検出対象の判定が妨げられない
不適合	バックグラウンド染色によって、本来の検出対象の判定が妨げられる

■スコアリングアルゴリズム

ベンタナ OptiView CLDN18 (43-14A) では、胃および胃食道接合部癌の腫瘍細胞で陽性反応がみられ、膜染色の染色強度としては様々なパターンがみられます。

- 弱い染まり：淡い茶褐色に染色され、部分的または全周性の細胞膜への染まりがみられる。
- 中等度の染まり：茶褐色に染色され、部分的または全周性の細胞膜への染まりがみられる。
- 強い染まり：暗褐色～黒色に染色され、部分的または全周性の細胞膜への染まりがみられる。多数のDAB分子の集積によって細胞膜が肥厚してみえる。

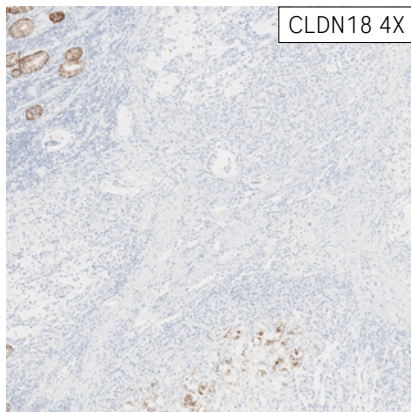
CLDN18免疫染色の結果は、判定基準を正しく理解した病理医が、細胞膜に中等度～強い染色が認められる腫瘍細胞の割合を算出し、評価してください。ベンタナ OptiView CLDN18 (43-14A) のスコアリングアルゴリズムは表4をご参照ください。

ベンタナ OptiView CLDN18 (43-14A) で染色した胃および胃食道接合部組織検体において、全生存腫瘍細胞総数のうち、中等度～強い膜染色を示す生存腫瘍細胞の割合を算出しスコアリングを行います。膜染色の陽性パターンは、頂端側 (Apical)、側方・基底膜側 (Basolateral)、側方 (Lateral)、全周性 (完全でなくても可)、微細管腔内 (Microluminal) を含みます。ただし、基底膜側 (Basal) のみに染まっている場合はカウント対象外です。生存腫瘍細胞の75%以上で中等度またはそれ以上の強度で膜染色が認められる場合は、CLDN18陽性であると判定されます。

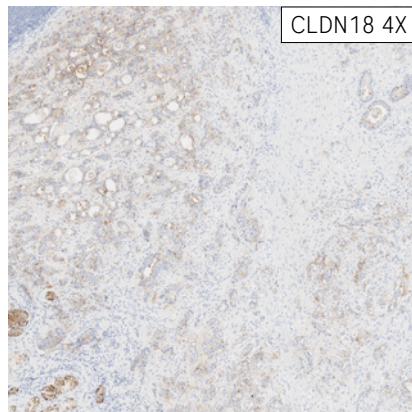
表4：胃食道接合部を含む胃癌のスコアリングアルゴリズム (75%カットオフ)

判定	染色結果
CLDN18 陽性	75%以上の腫瘍細胞において、細胞膜に中等度～強い染色が認められる
CLDN18 陰性	75%未満の腫瘍細胞において、細胞膜に中等度～強い染色が認められる

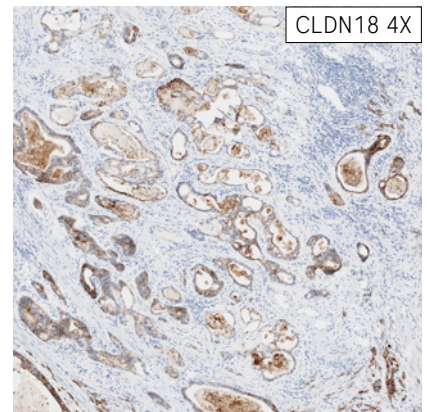
陰性:CLDN18染色が認められる腫瘍細胞が75%未満



5%

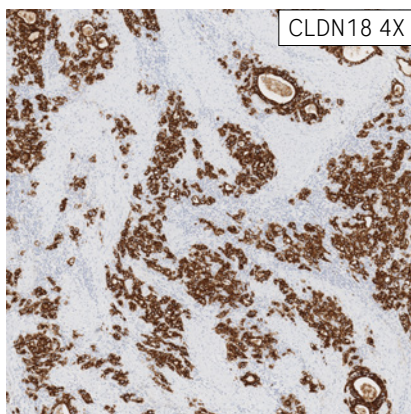


20%

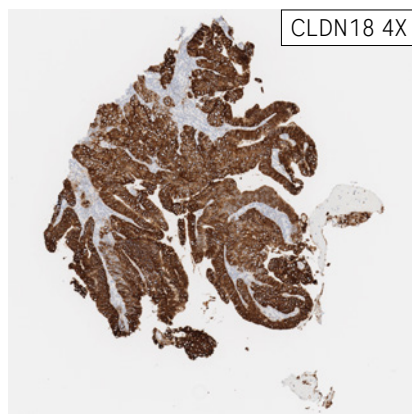


70%

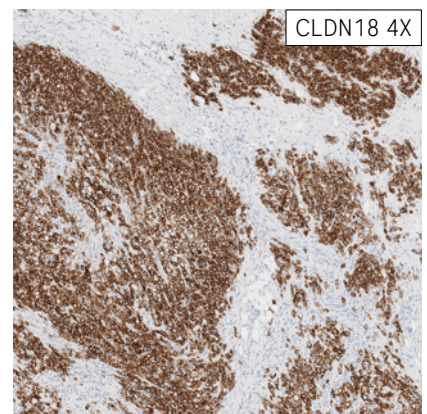
陽性:CLDN18染色が認められる腫瘍細胞が75%以上



100%

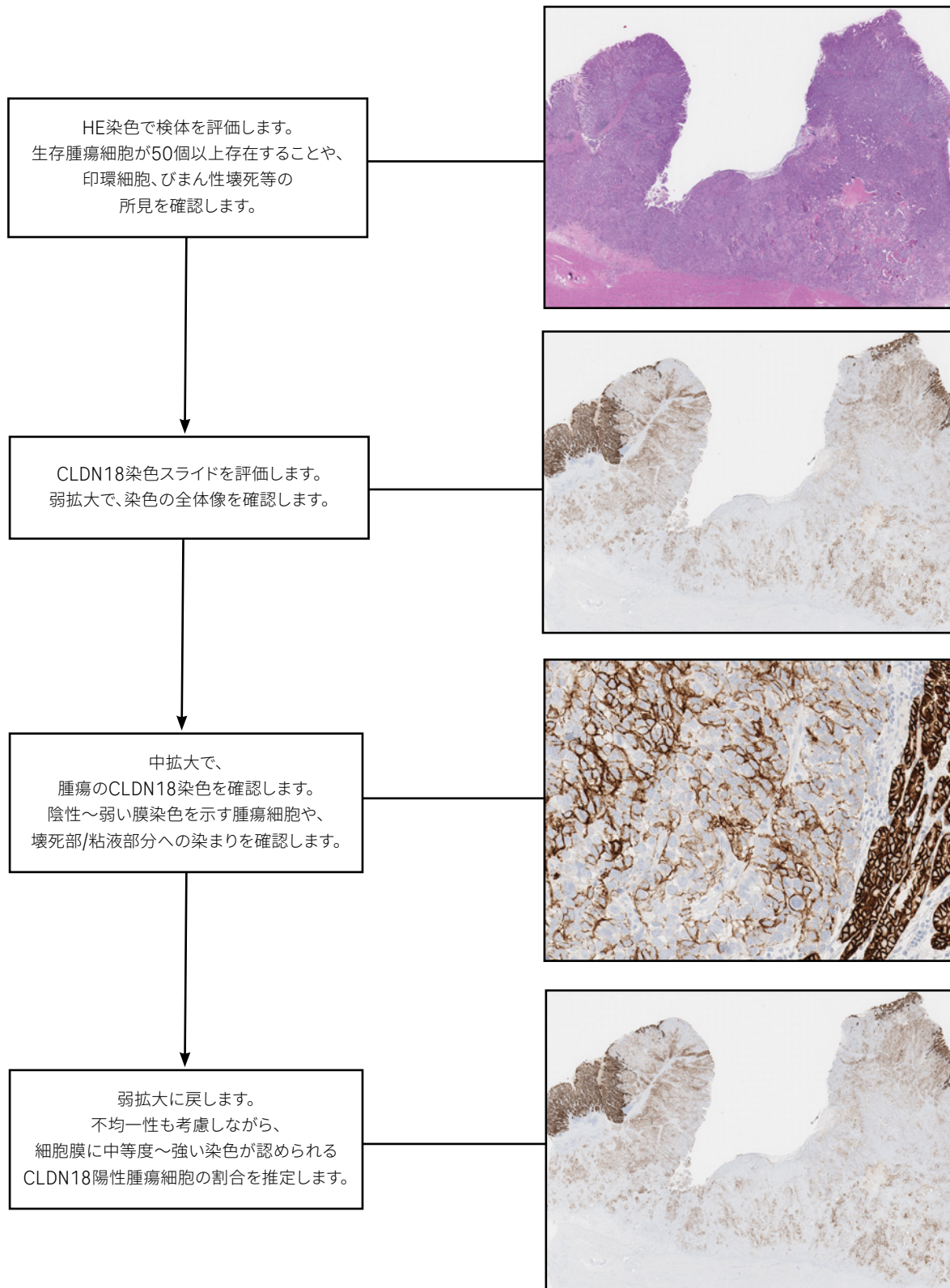


95%



100%

■スコアリング方法



■精度管理用コントロール

精度管理用コントロールは、染色手順中に機器または試薬の不具合を発見するのに役立ちます。

精度管理用コントロール組織は新鮮な生検または手術材料から作製し、可能な限り迅速に固定を行い、検体と同一の手順で処理してください。精度管理用コントロールは、試薬及び機器の性能を判断する際のみを利用し、検体の診断結果を決定する際の補助として考慮しないでください。精度管理用コントロールの染色結果が適切でない場合、患者検体の結果は判定不能とみなしてください。

ベンタナ OptiView CLDN18 (43-14A) においては、患者検体と一緒に精度管理用コントロールスライドを毎回の染色ランごとに染色し、そのランにおいて試薬および機器が適切に機能していることを確認してください。精度管理用コントロール組織は患者検体と同様の手順で固定・処理してください。患者検体と異なる固定方法・処理方法でコントロールが用意された場合、試薬や染色のコントロールとして使用できませんが、プレアナリシス（固定や組織の処理）のコントロールとすることはできません。自己融解や変性が認められる検体や固定が不適切な標本は精度管理用コントロールとして使用できません。

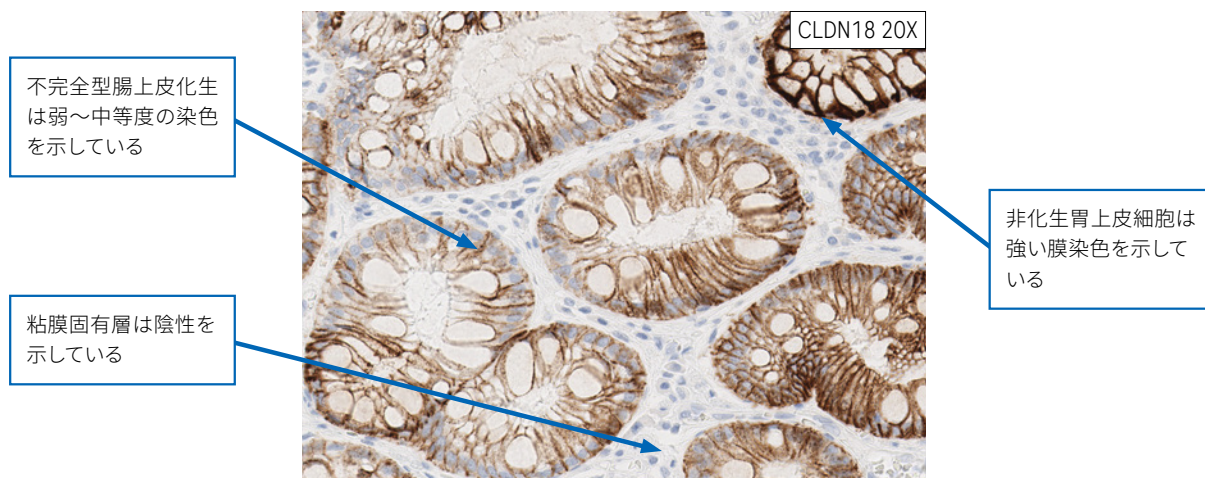
不完全型腸上皮化生を含む胃組織は、CLDN18陽性部と陰性部の両方を有するため、ベンタナ OptiView CLDN18 (43-14A) の精度管理用コントロールとして有用です。精度管理用コントロールでの適切な染色パターンとしては、非腫瘍性胃上皮細胞では強い膜染色、不完全型腸上皮化生部分では弱～中等度の膜染色を示し、粘膜固有層、リンパ球、平滑筋、血管、末梢神経においては陰性となります（表5）。

ただし完全型腸上皮化生の場合には弱～中等度の膜染色を示さないため、精度管理用コントロール組織としては不完全型腸上皮化生を含む胃組織を選ぶことが重要です。

表5：精度管理用コントロールスライド（腸上皮化生を含む胃組織）の適格性評価基準

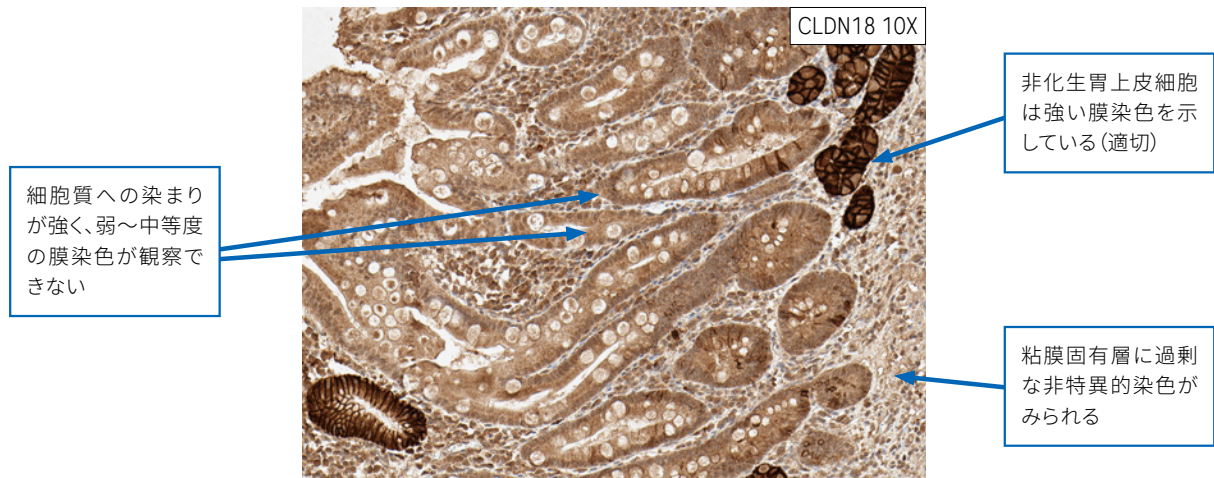
染色要素	適合	不適合
CLDN18 陽性対照	正常胃上皮細胞における強い膜染色が認められる および不完全型腸上皮化生部分における上皮細胞への弱～中等度の膜染色が認められる	正常胃上皮細胞に強い膜染色が認められない または不完全型腸上皮化生部分における上皮細胞への弱～中等度の膜染色が認められない
CLDN18 陰性対照	粘膜固有層、リンパ球、平滑筋、血管、および末梢神経においてCLDN18染色が認められない。	粘膜固有層、リンパ球、平滑筋、血管、および末梢神経に非特異的バックグラウンド染色が認められる

精度管理用コントロール組織における適切な染色パターン



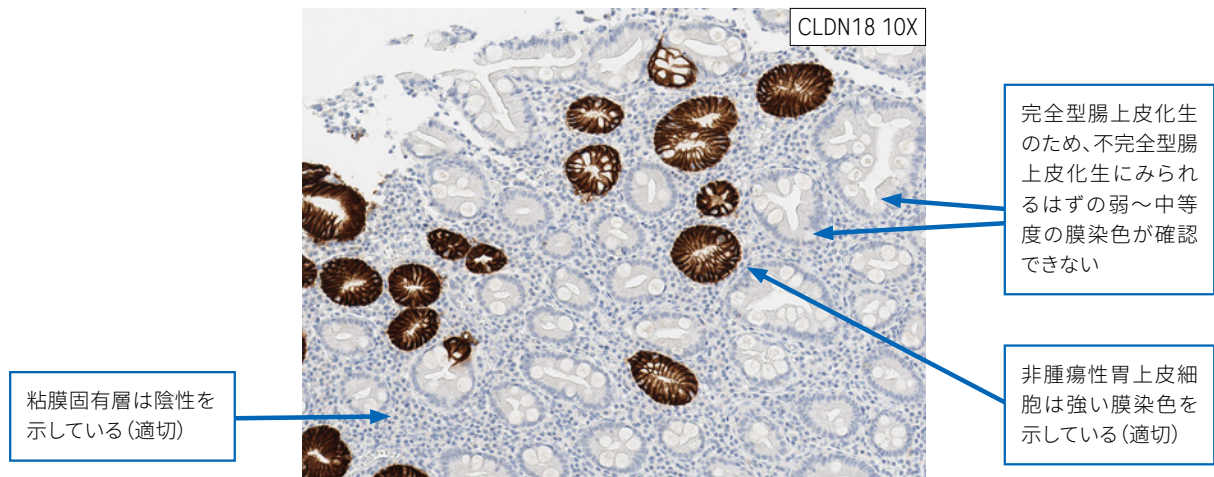
精度管理用コントロール組織における適切な染色パターン： 非化生胃上皮細胞では強い膜染色、不完全型腸上皮化生部分では弱～中等度の膜染色を示す。一方で粘膜固有層、リンパ球、平滑筋、血管、末梢神経においてはCLDN18染色が認められない。

精度管理用コントロール組織として不適切な染色パターン



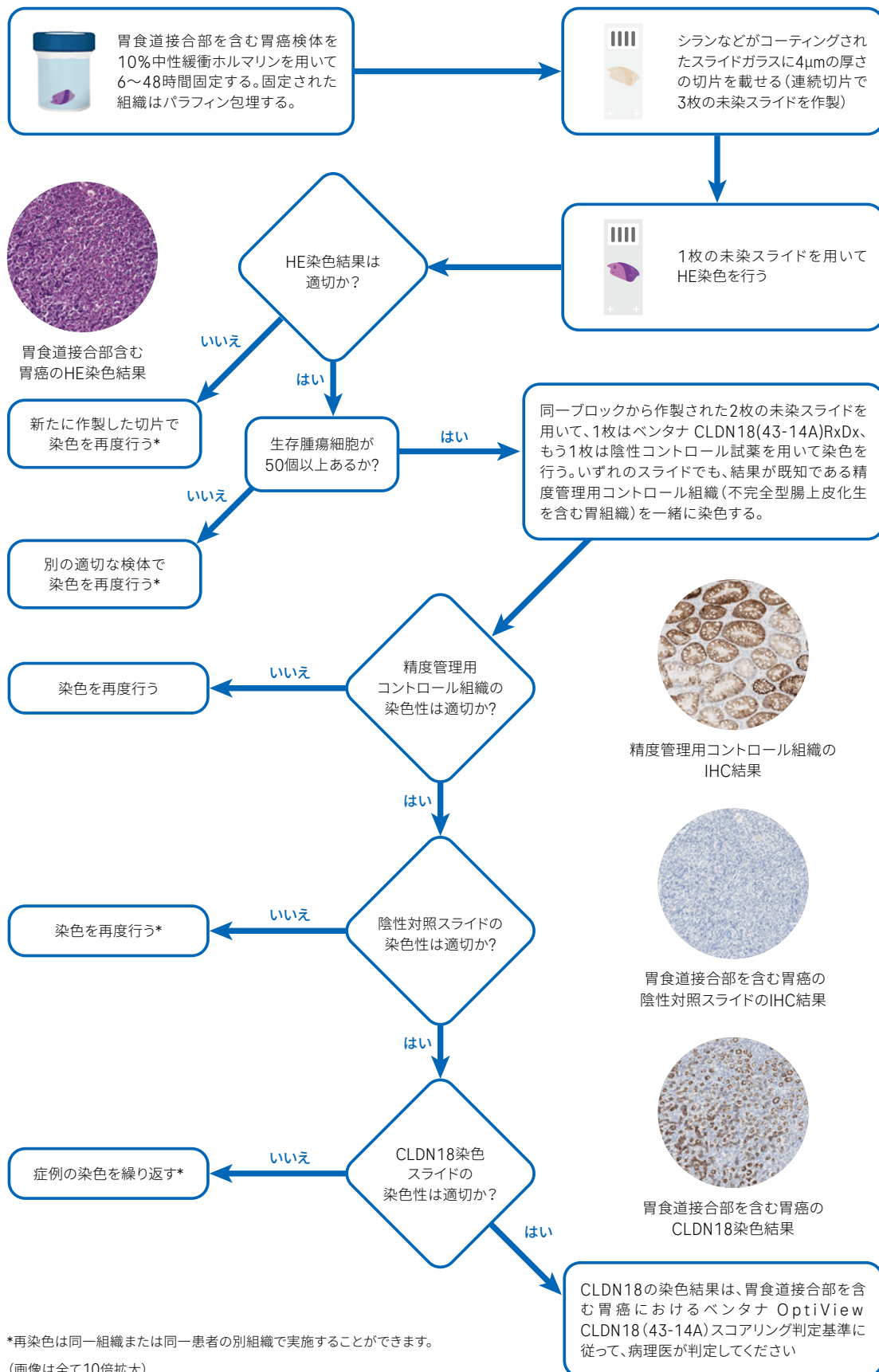
精度管理用コントロール組織における不適切な染色パターン： 非化生胃上皮細胞において強い膜染色を示す一方、腸上皮化生では細胞質への染まりが強く、弱～中等度の膜染色がみられない。また、陰性となるべき要素 (粘膜固有層、リンパ球、血管) に染色がみられる。さらに、細胞質にびまん性の染色が認められる。

精度管理用コントロール組織として不適切な検体



精度管理用コントロール組織として不適切な検体： 非腫瘍性胃上皮細胞は適切な強い膜染色を示し、陰性となるべき部位でも不適切な染色は認められない。しかしながら本例に認められる腸上皮化生は完全型であるため、膜染色が認められない。精度管理用コントロール組織としては、不完全型腸上皮化生細胞における弱～中等度の膜染色が認められることが好ましい。

■検査フロー

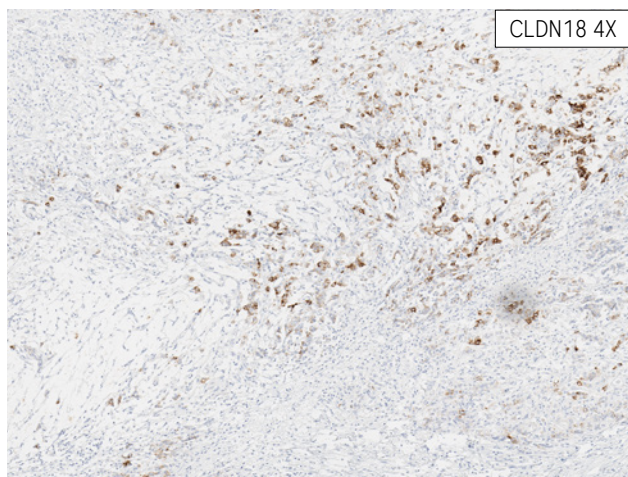
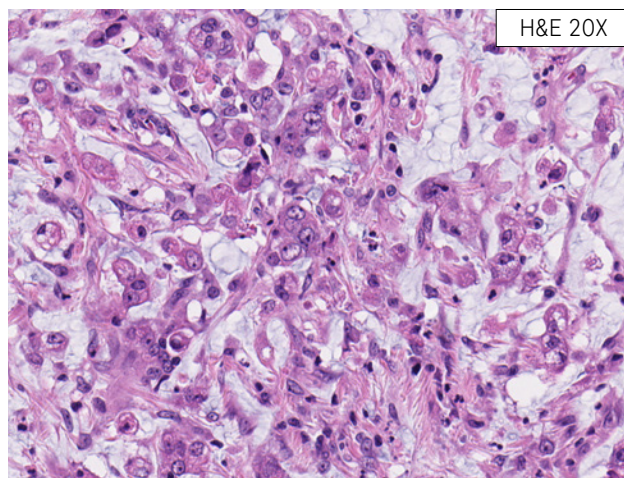
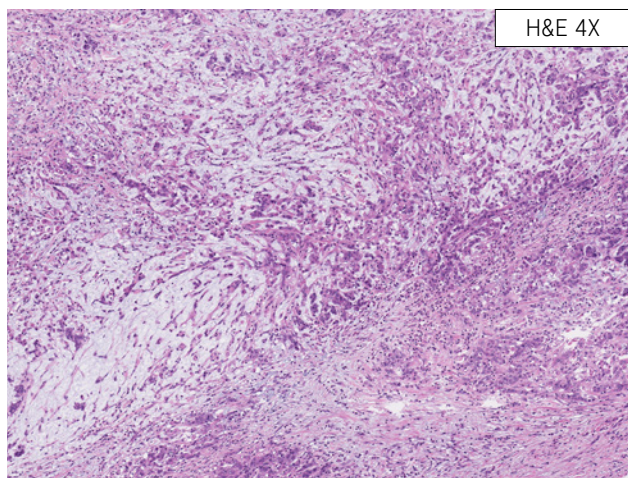




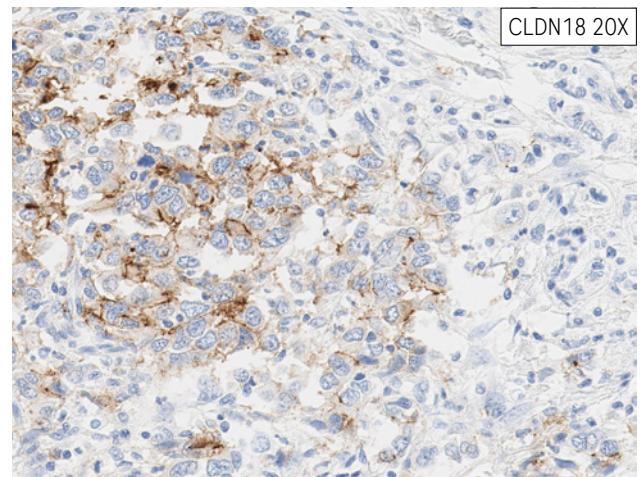
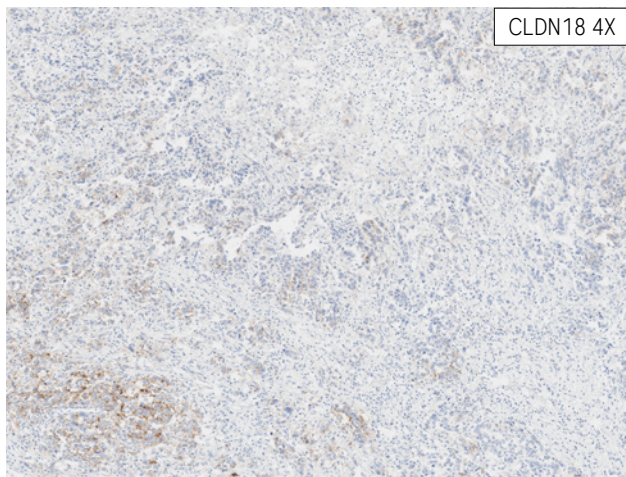
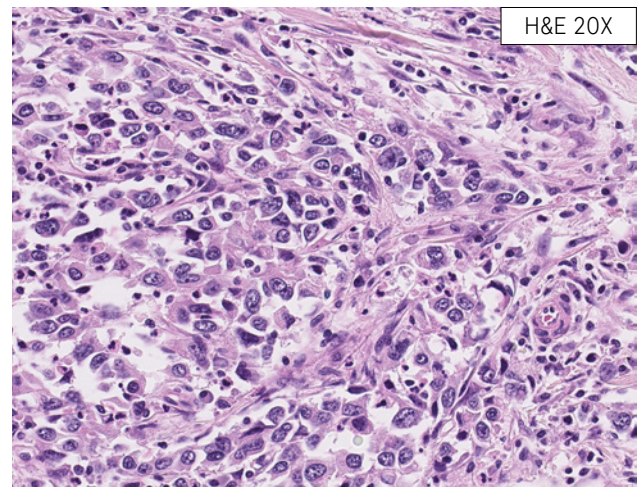
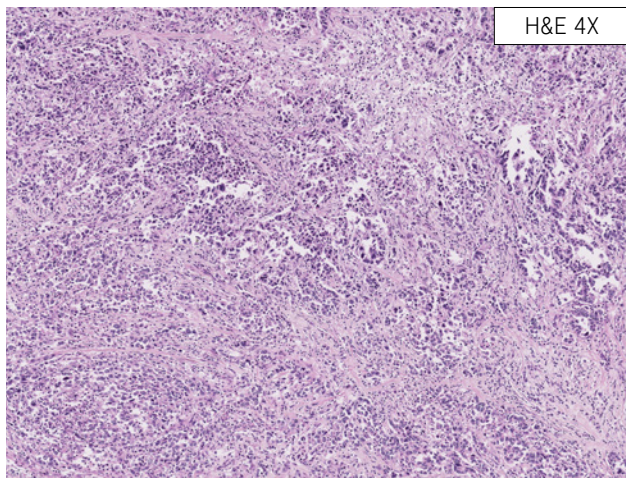
参考画像

■ 陰性例

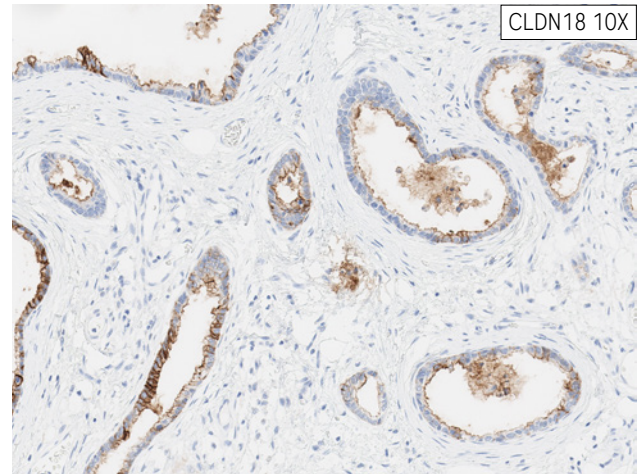
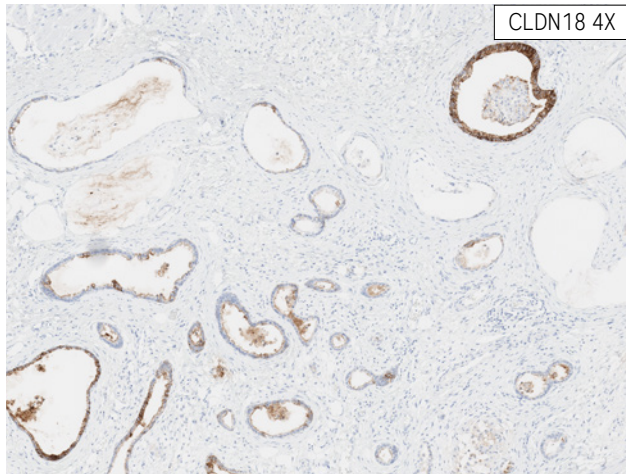
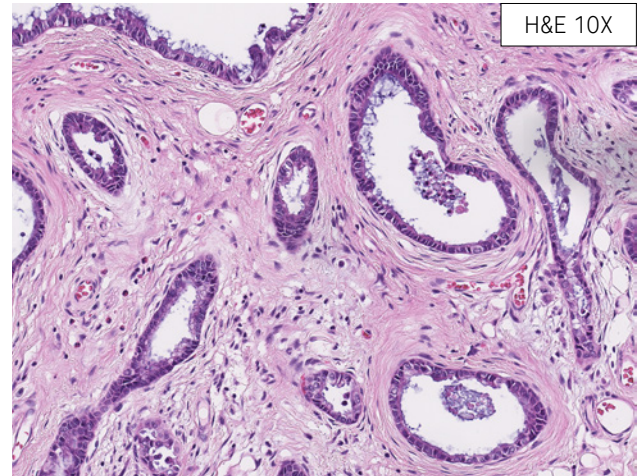
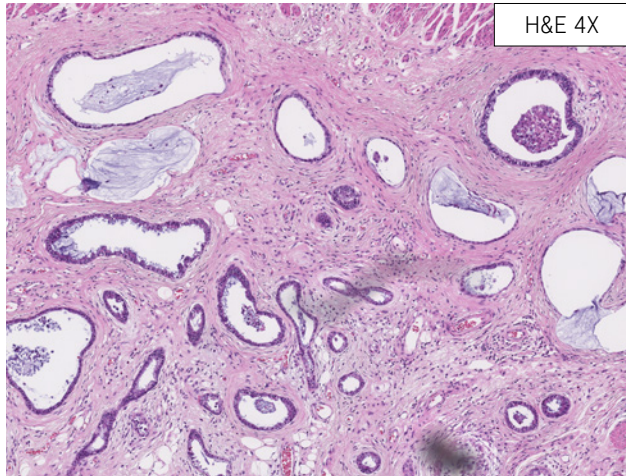
中等度～強い膜染色を示す腫瘍細胞の割合が75%未満であり、バックグラウンドへの染色も許容範囲内である場合、CLDN18陰性と判定されます。



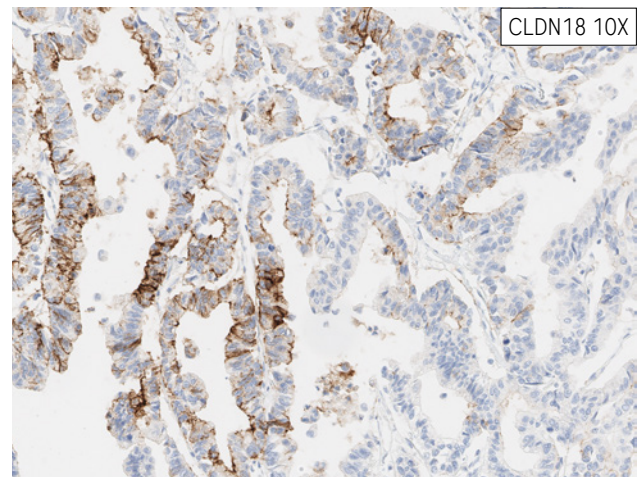
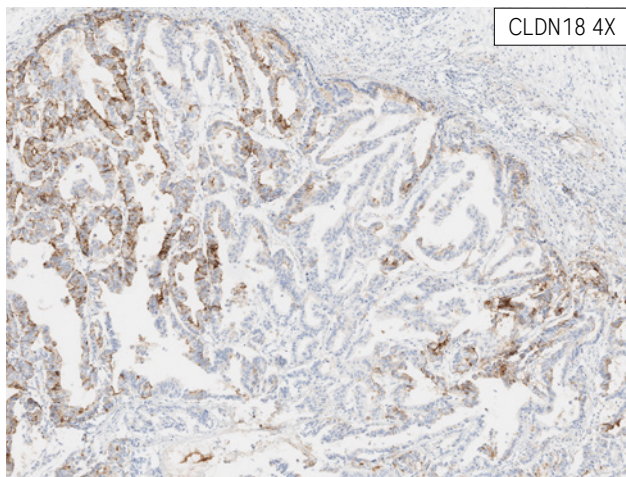
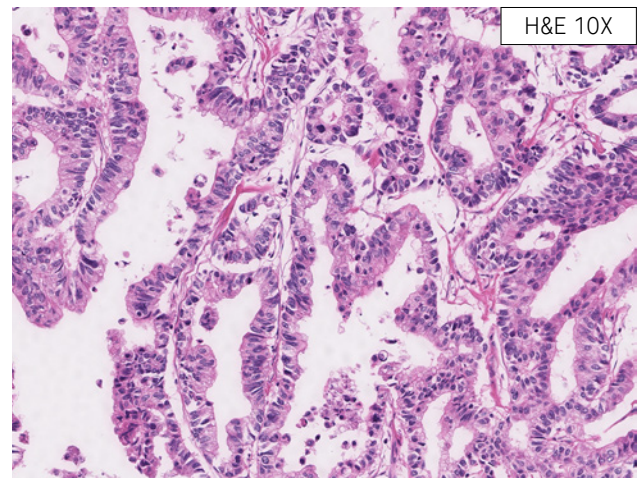
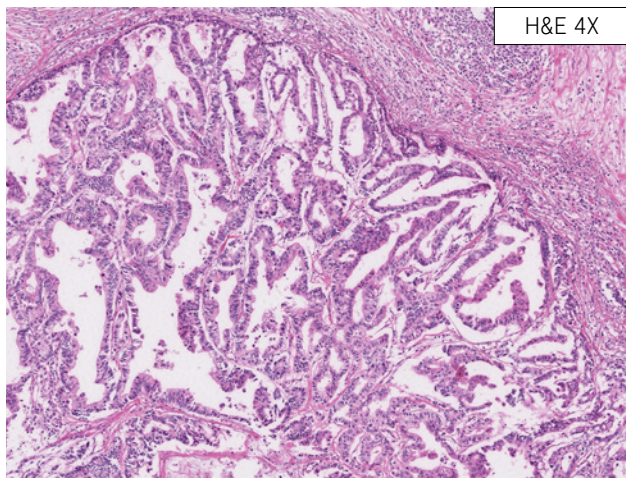
陰性症例1：びまん型胃癌の本症例では顆粒状の膜染色がみられる。顆粒状の膜染色がみられた際には、染色強度が中等度～強く、腫瘍細胞の細胞膜に沿って染まっている細胞は、陽性染色としてカウントする。本症例は腫瘍細胞の25%で中等度～強い膜染色を呈している。本症例はCLDN18陰性である。



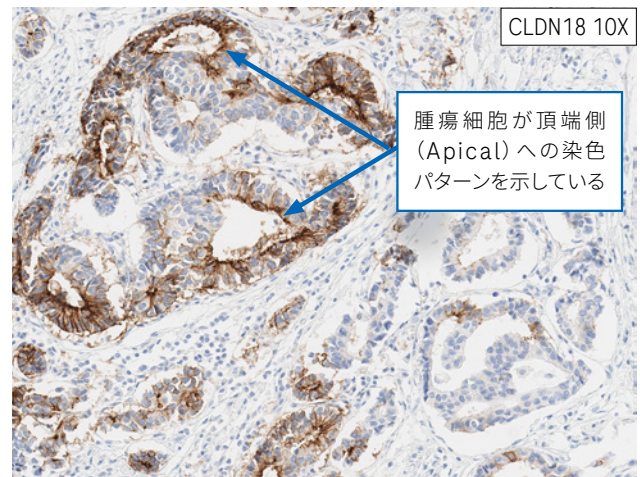
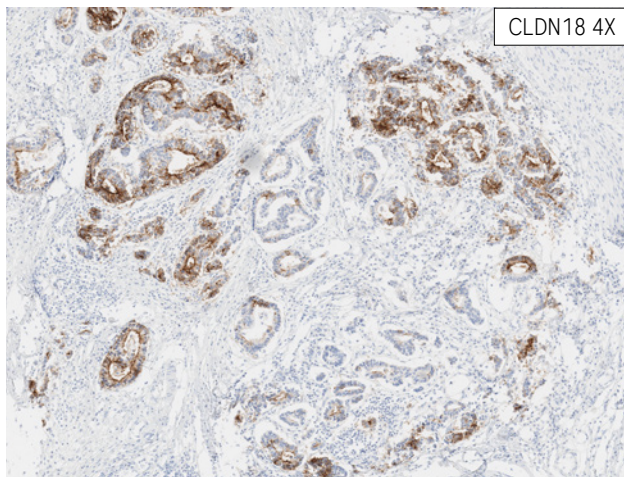
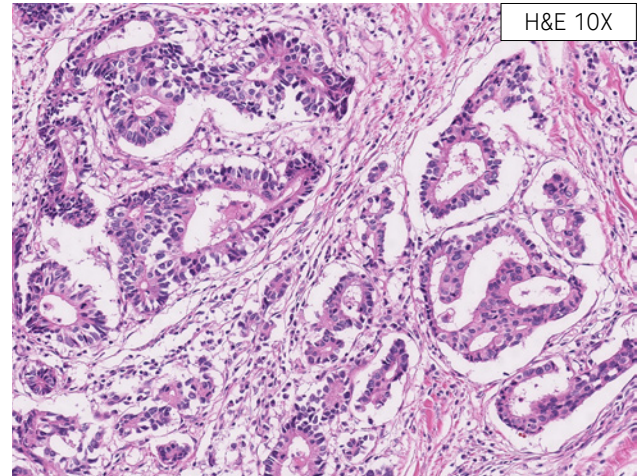
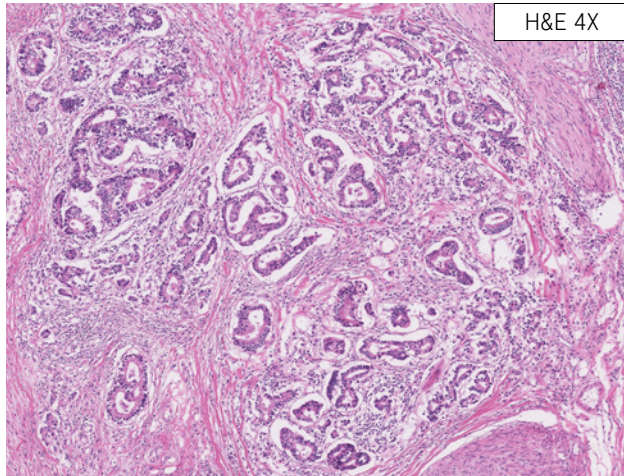
陰性症例2：本症例は腫瘍細胞の30%で中等度～強い膜染色を呈している。本症例はCLDN18陰性である。



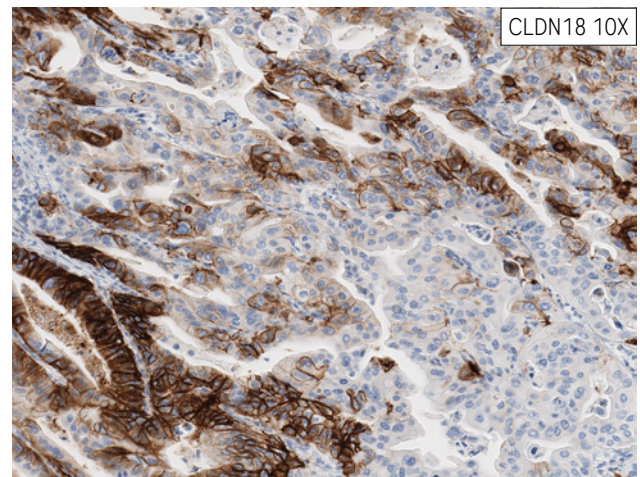
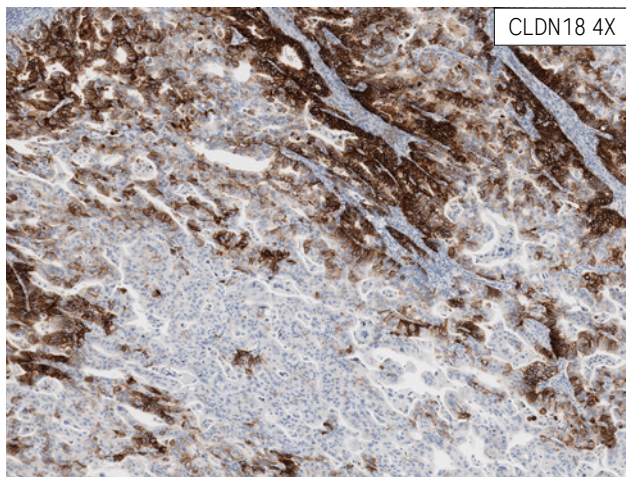
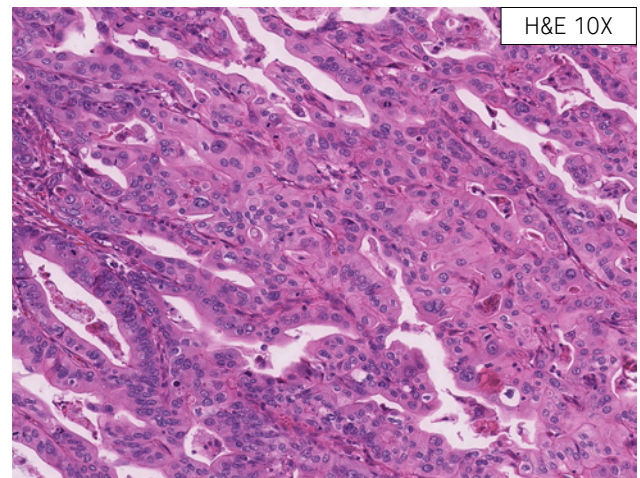
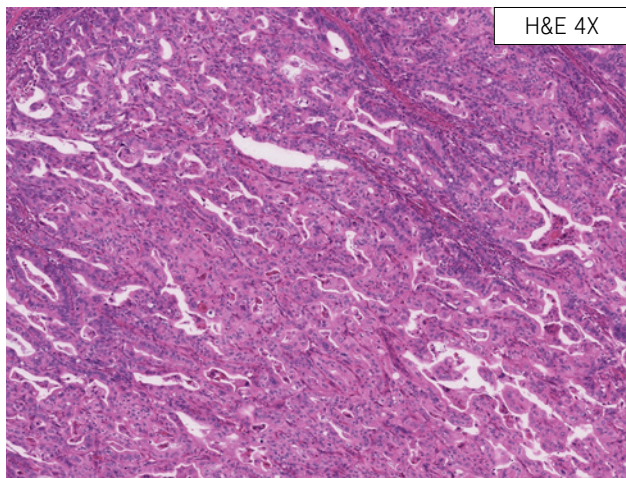
陰性症例3：本症例は腫瘍細胞の40%で中等度～強い膜染色を呈している。本症例はCLDN18陰性である。



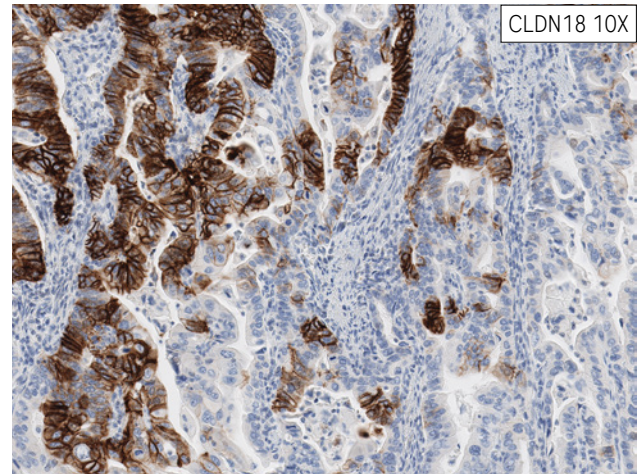
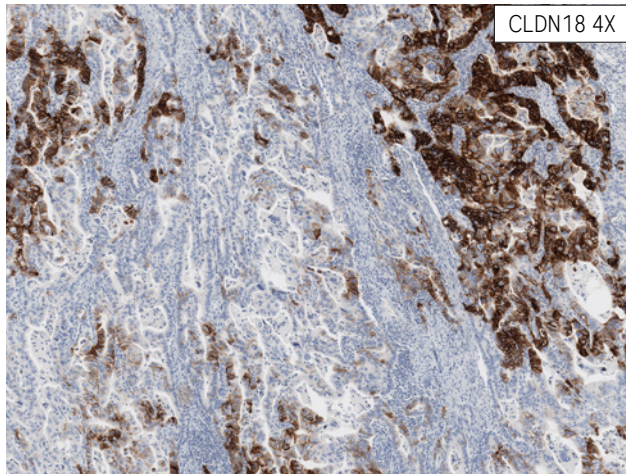
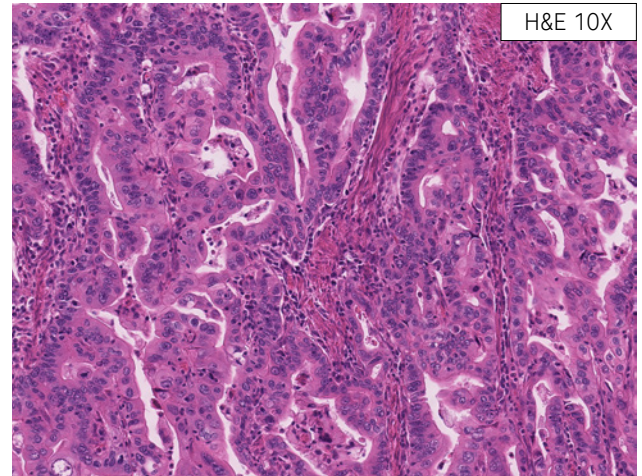
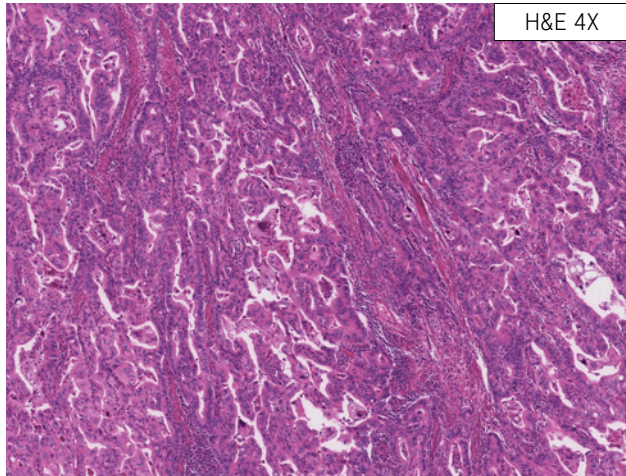
陰性症例4：本症例は腫瘍細胞の50%で中等度～強い膜染色を呈している。染色パターンとしては、主に側方・基底膜側 (Basolateral) や側方 (Lateral) への染色が多く、頂端側 (Apical) への染まりも観察される。本症例はCLDN18陰性である。



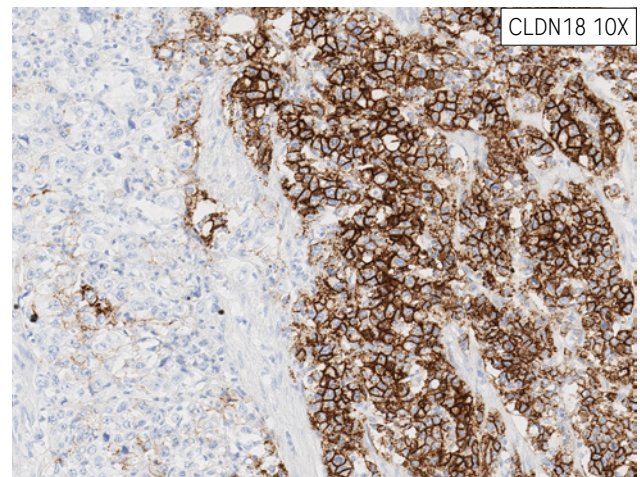
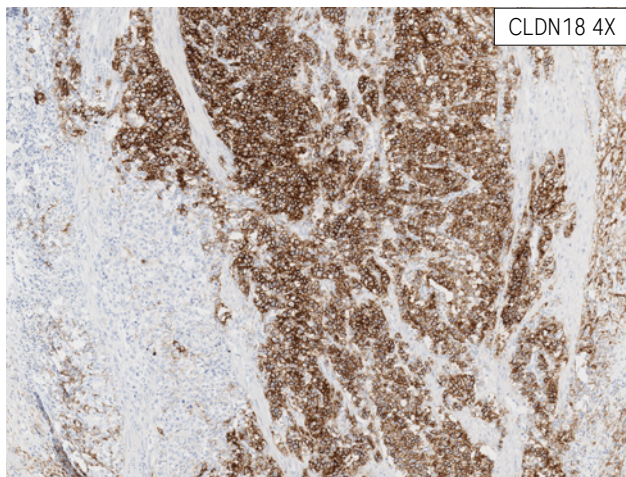
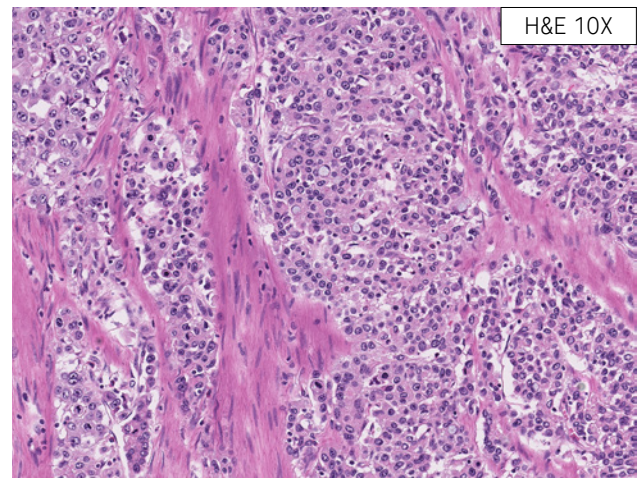
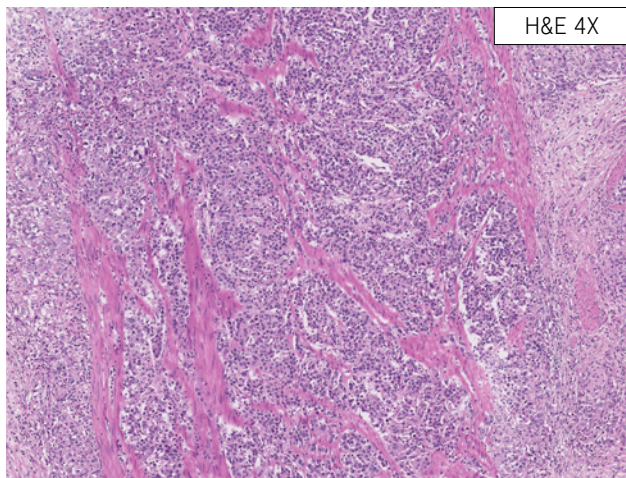
陰性症例5：本症例は腫瘍細胞の60%で中等度～強い膜染色を呈している。膜染色パターンとしては頂端側 (Apical) への染色がみられる。本症例はCLDN18陰性である。



陰性症例6：本症例は腫瘍細胞の65%で中等度～強い膜染色を呈している。本症例はCLDN18陰性である。



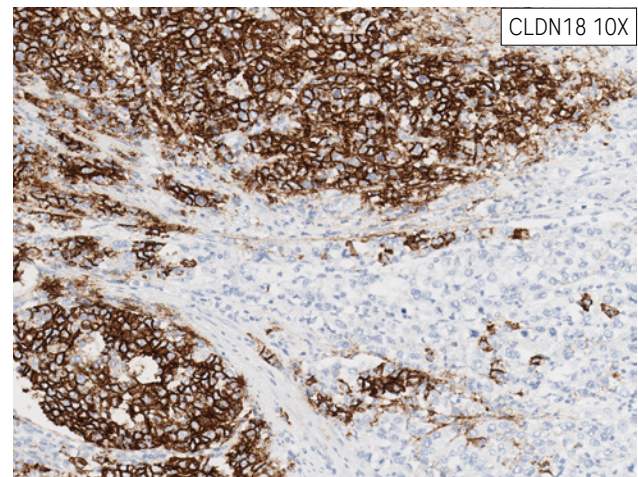
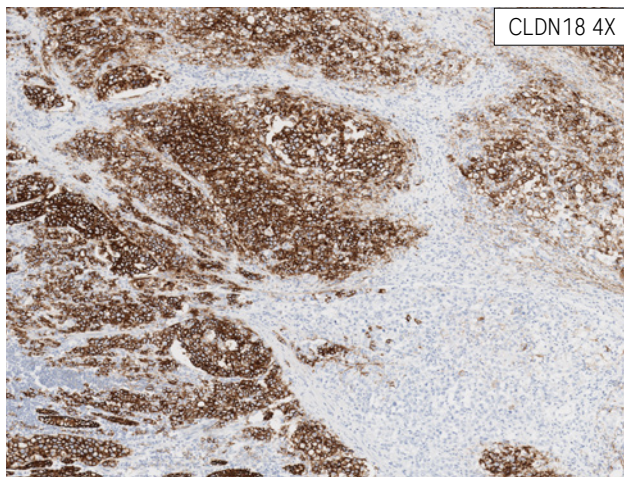
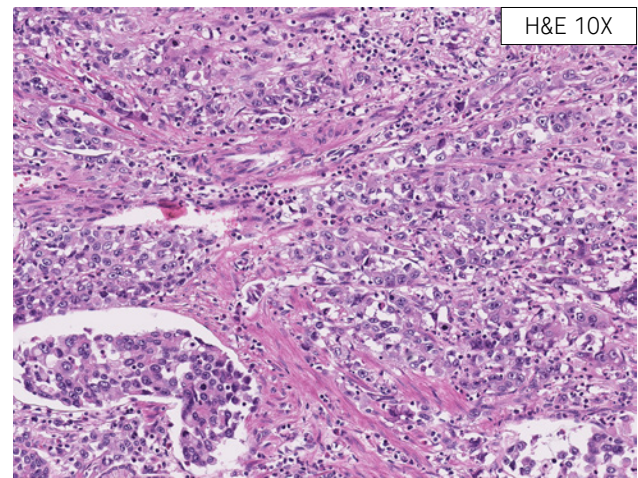
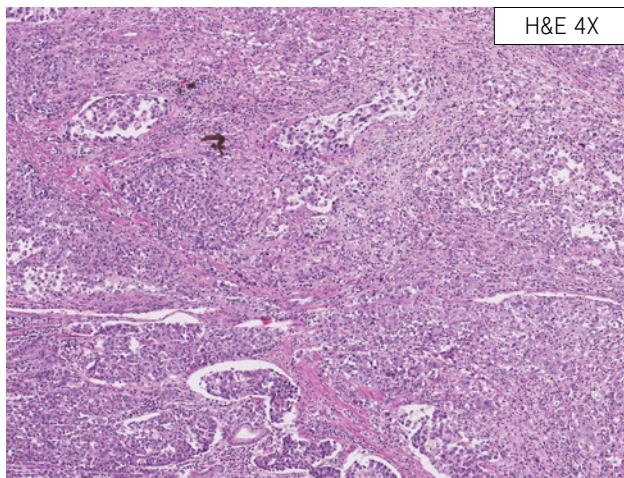
陰性症例7：本症例では腫瘍細胞の65%において中等度～強い膜染色がみられ、染色パターンは主に側方・基底膜側 (Basolateral) や側方 (Lateral) への染色が認められる。本症例はCLDN18陰性である。



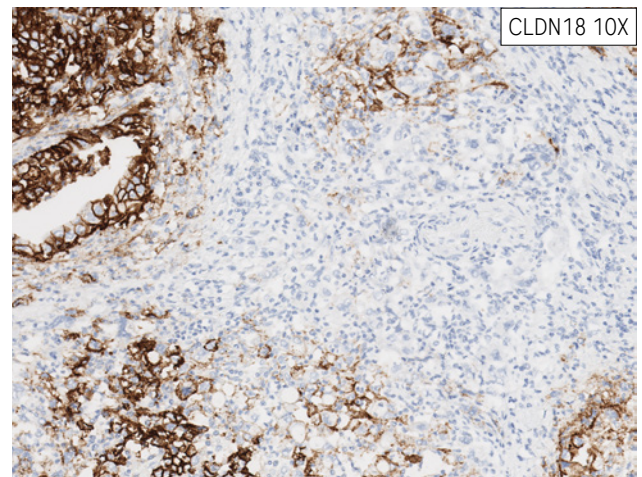
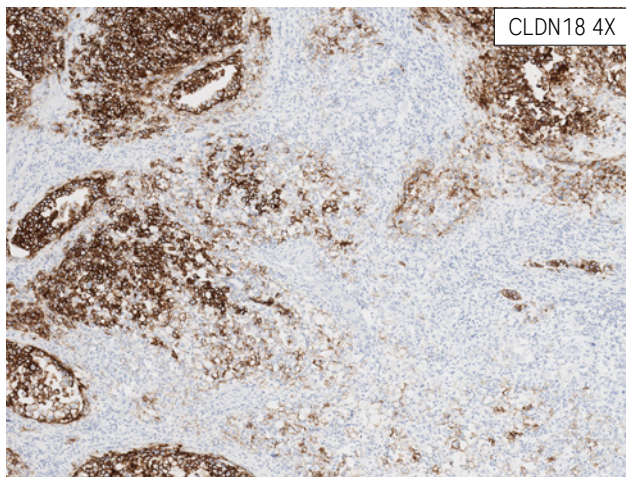
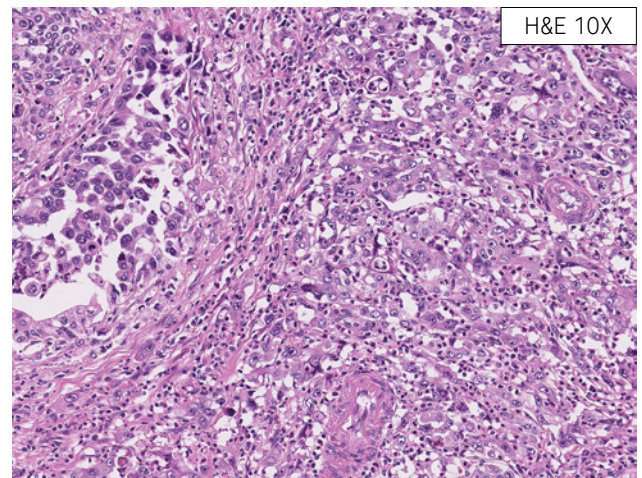
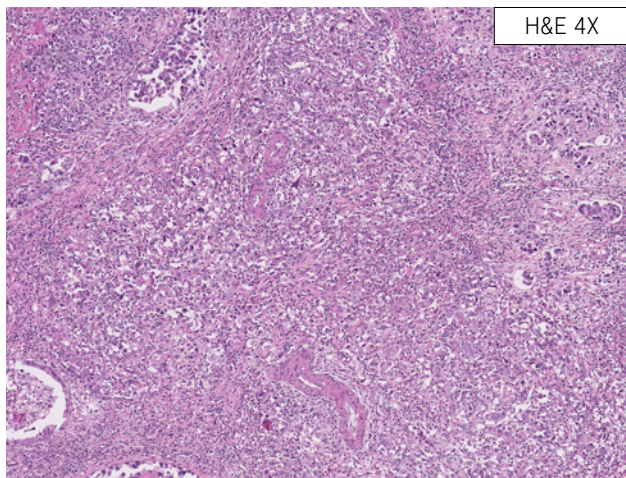
陰性症例8：本症例は腫瘍細胞の65%において中等度～強い膜染色を呈し、細胞膜への全周性の染まりが顕著である。本症例はCLDN18陰性である。

■陽性例

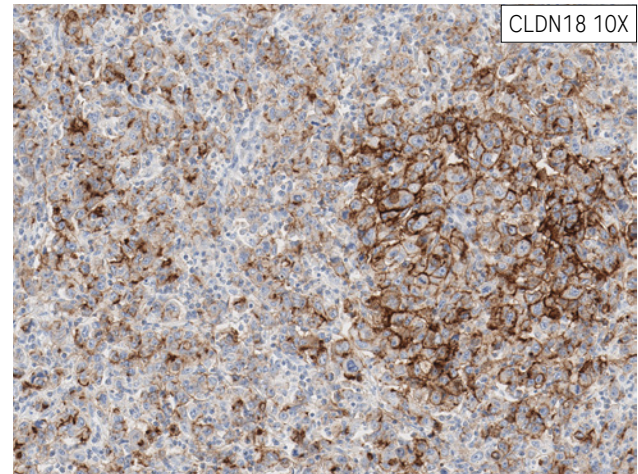
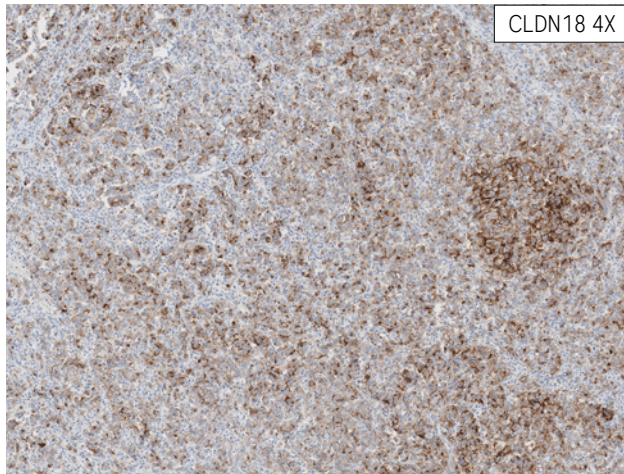
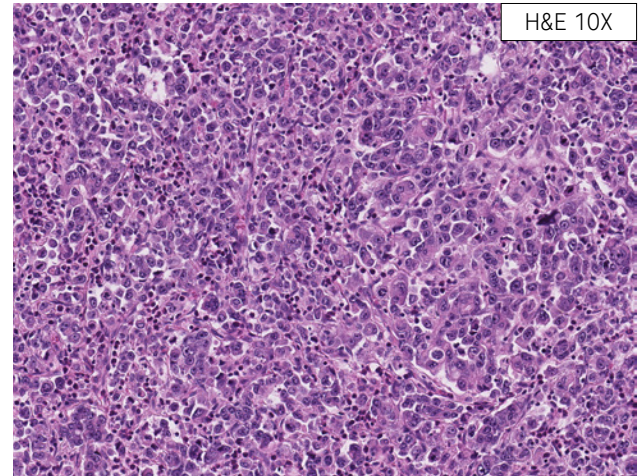
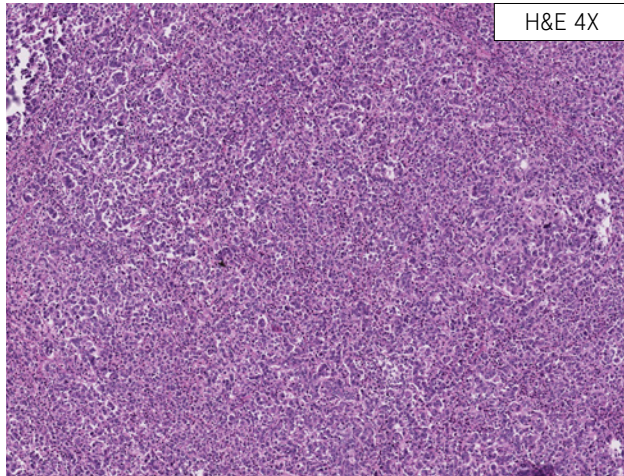
中等度～強い膜染色を示す腫瘍細胞の割合が75%以上であり、バックグラウンドへの染色も許容範囲内である場合、CLDN18陽性と判定されます。



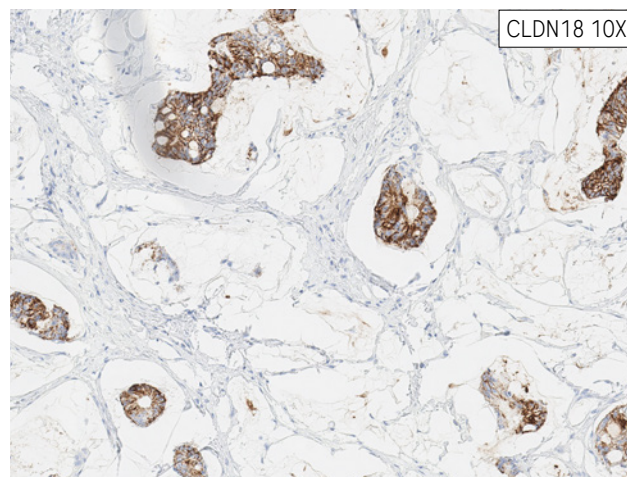
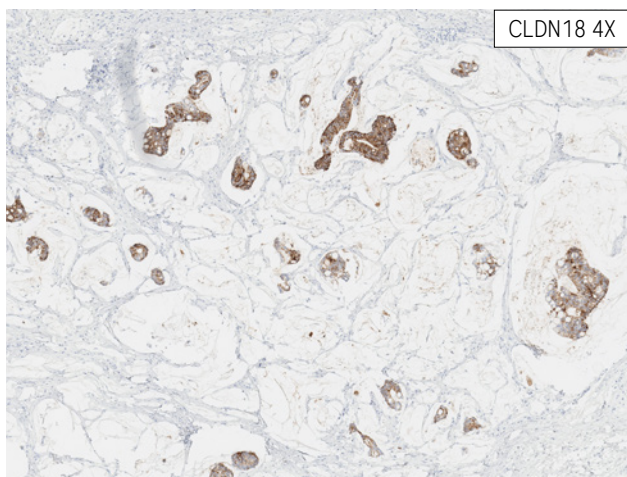
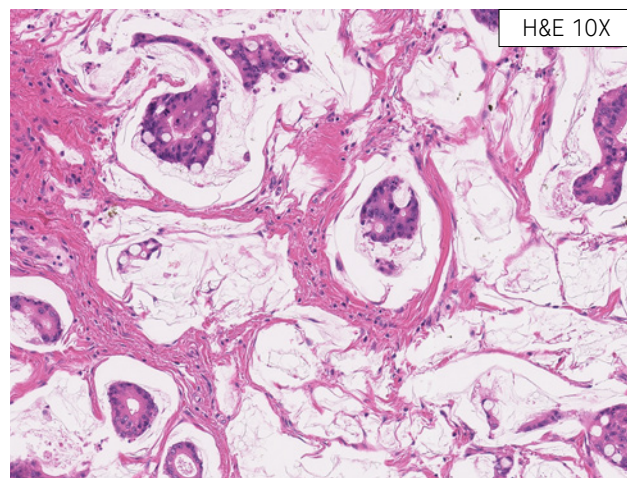
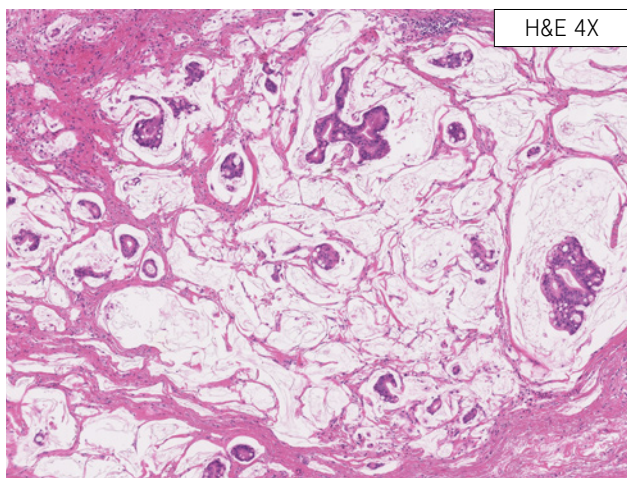
陽性症例1：本症例は腫瘍細胞の75%で中等度～強い膜染色を呈している。また、これらの腫瘍細胞では細胞質にも強い染まりがみられるが、スコアリングには含まれない。本症例はCLDN18陽性である。



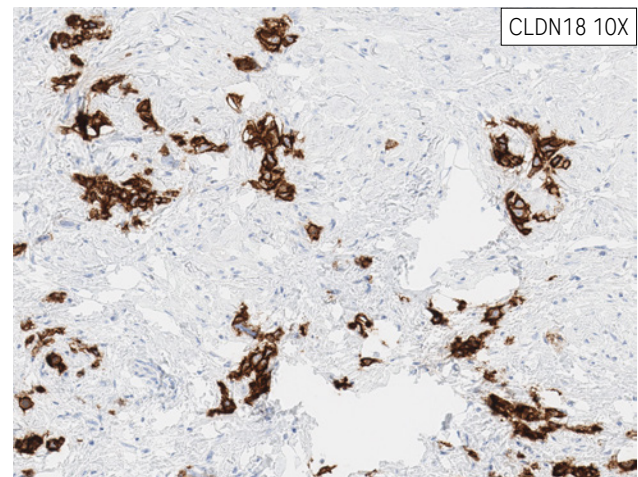
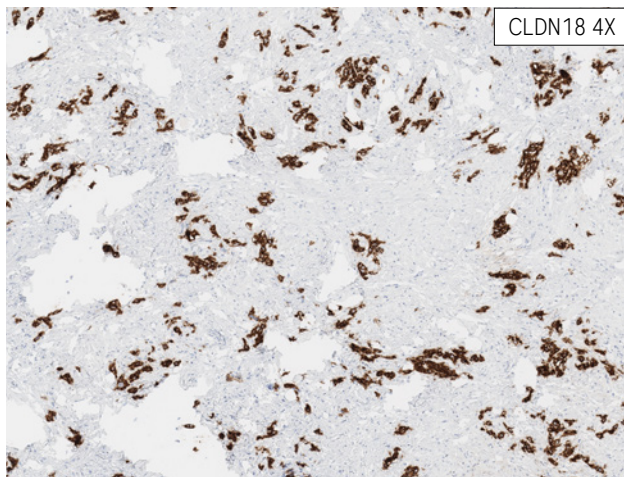
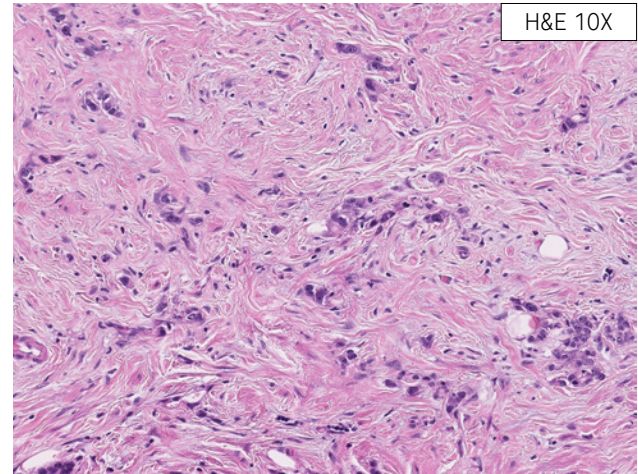
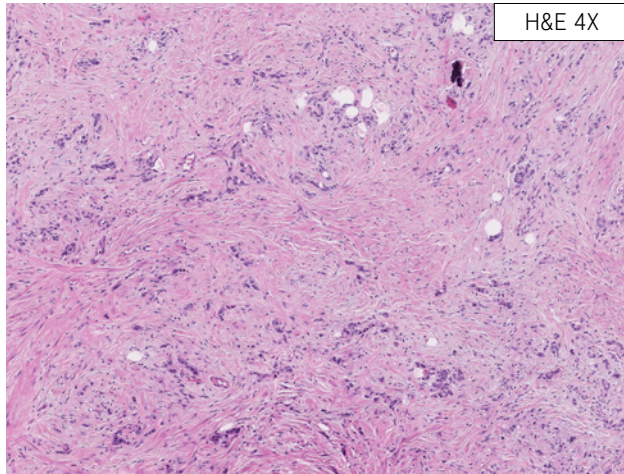
陽性症例2：本症例は腫瘍細胞の80%で中等度～強い膜染色を呈しており、細胞膜への全周性の染まりが多くみられる。本症例はCLDN18陽性である。



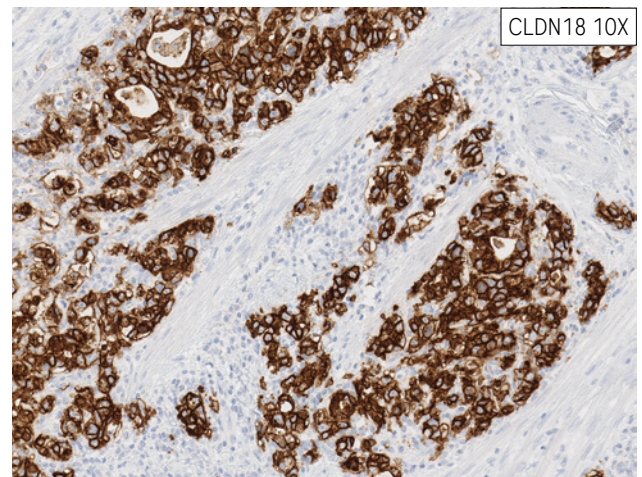
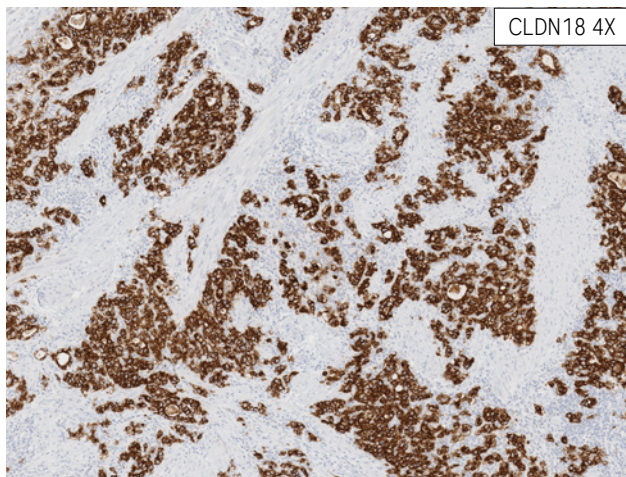
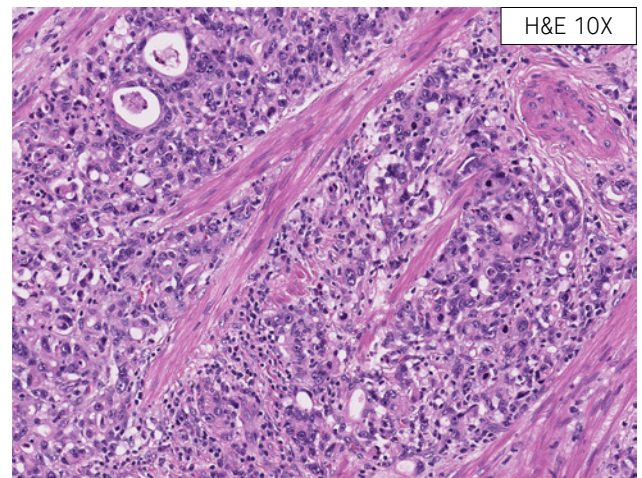
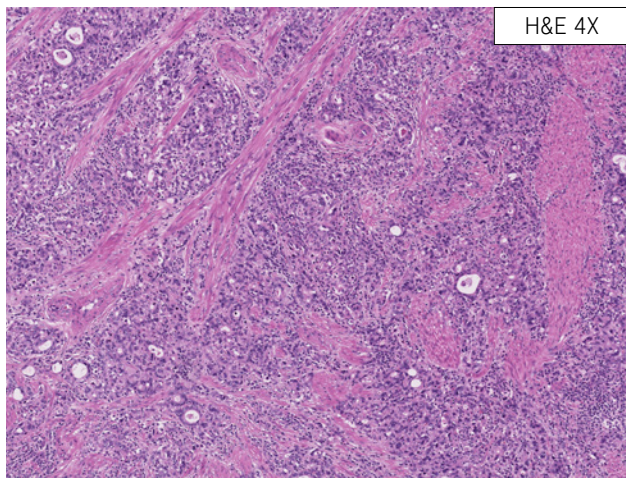
陽性症例3：本症例はびまん性浸潤を示す腫瘍であり、腫瘍細胞の85%で中等度～強い膜染色（部分的または完全な全周性）を示している。本症例はCLDN18陽性である。



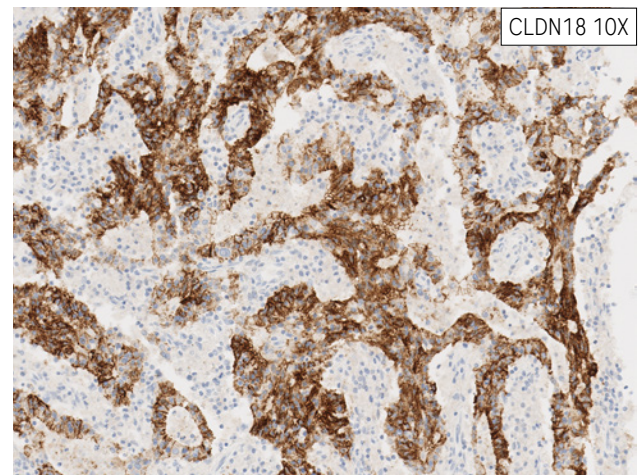
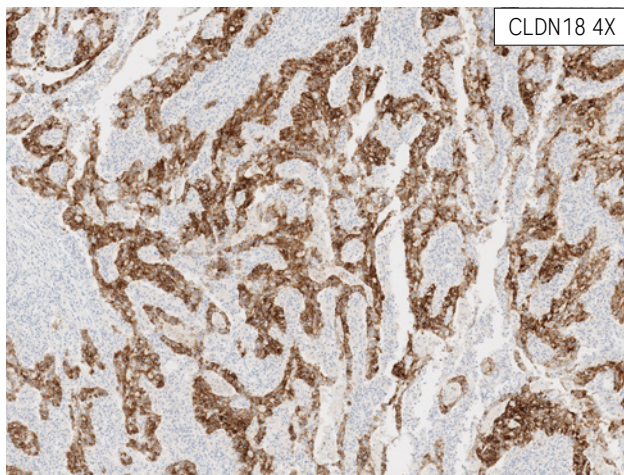
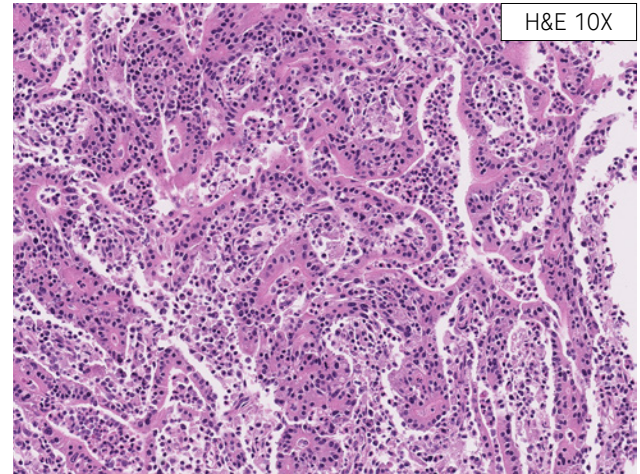
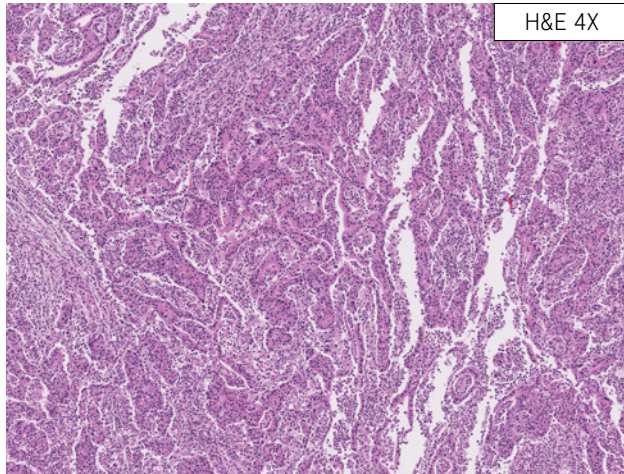
陽性症例4：本症例では腫瘍細胞の90%で中等度～強い膜染色を呈している。この粘液癌(分化型由来)では、細胞膜への完全な全周性の染まりと頂端側(Apical)への染まりの2パターン染色がみられる。本症例はCLDN18陽性である。



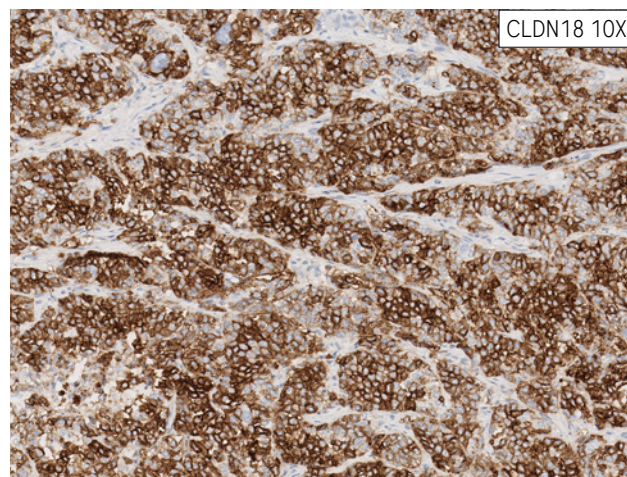
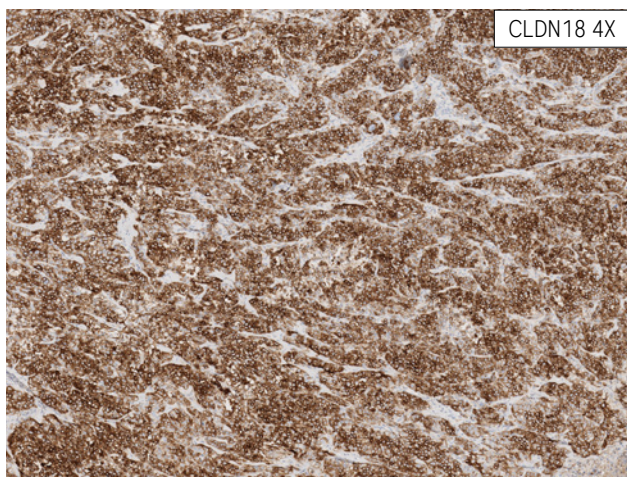
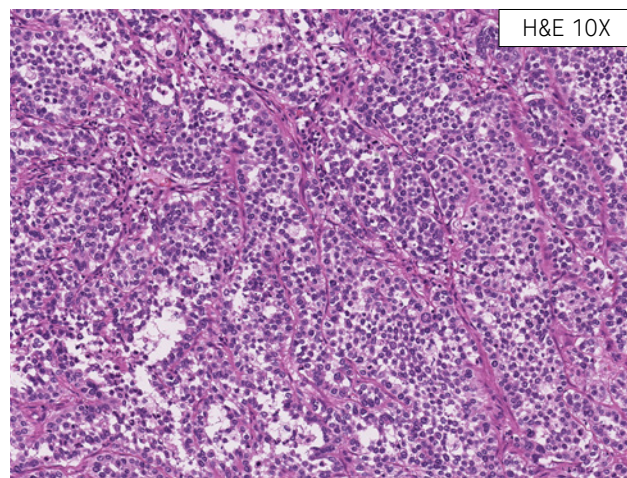
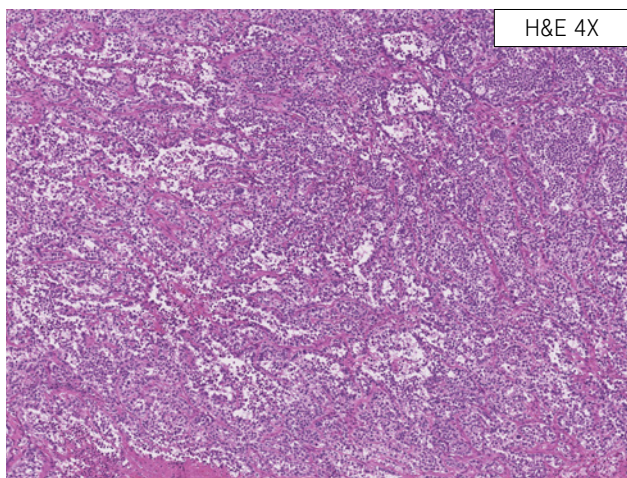
陽性症例5：本症例は腫瘍細胞の95%で中等度～強い膜染色を呈している。本症例はCLDN18陽性である。



陽性症例6：本症例は腫瘍細胞の95%で中等度～強い膜染色を呈している。本症例はCLDN18陽性である。



陽性症例7：本症例は腫瘍細胞の95%で中等度～強い膜染色を呈している。本症例はCLDN18陽性である。



陽性症例8：本症例は腫瘍細胞の100%で中等度～強い膜染色を呈している。本症例はCLDN18陽性である。

■判定に苦慮する症例

一般に、胃癌でのCLDN18のスコアリングには主に2つの課題があります。

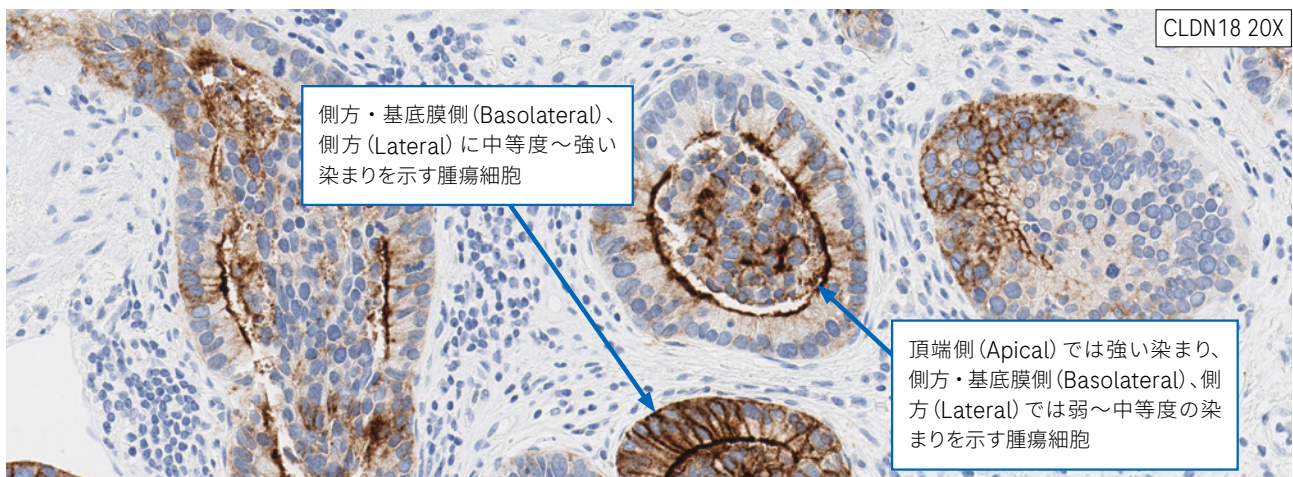
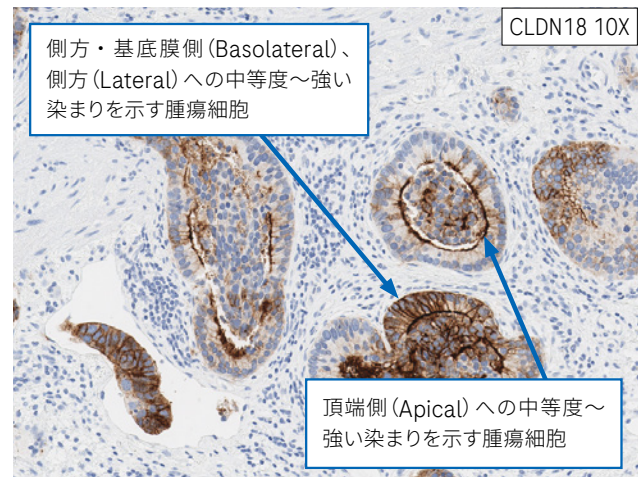
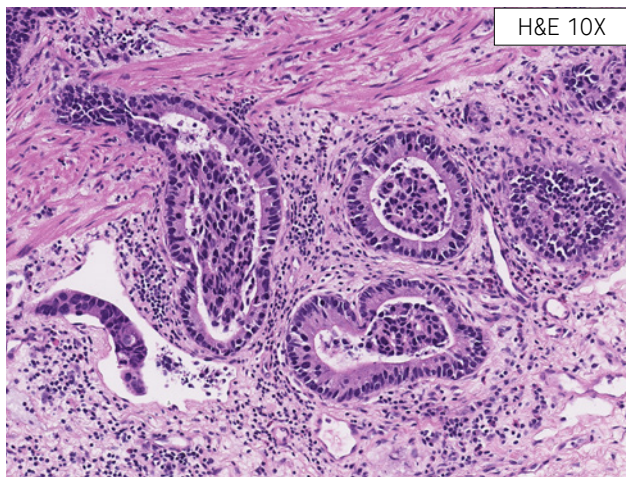
腫瘍の形態：通常、腸型の腫瘍を評価することは困難ではありません。しかし、形態がびまん型の場合や印環細胞を多く含む場合、浸潤性腫瘍細胞と他の細胞を区別することが困難なことがあります。

CLDN18染色における非特異的な染色が粘液部分や壊死部で見られることがあり、これにより症例の解釈が困難になる可能性があります。

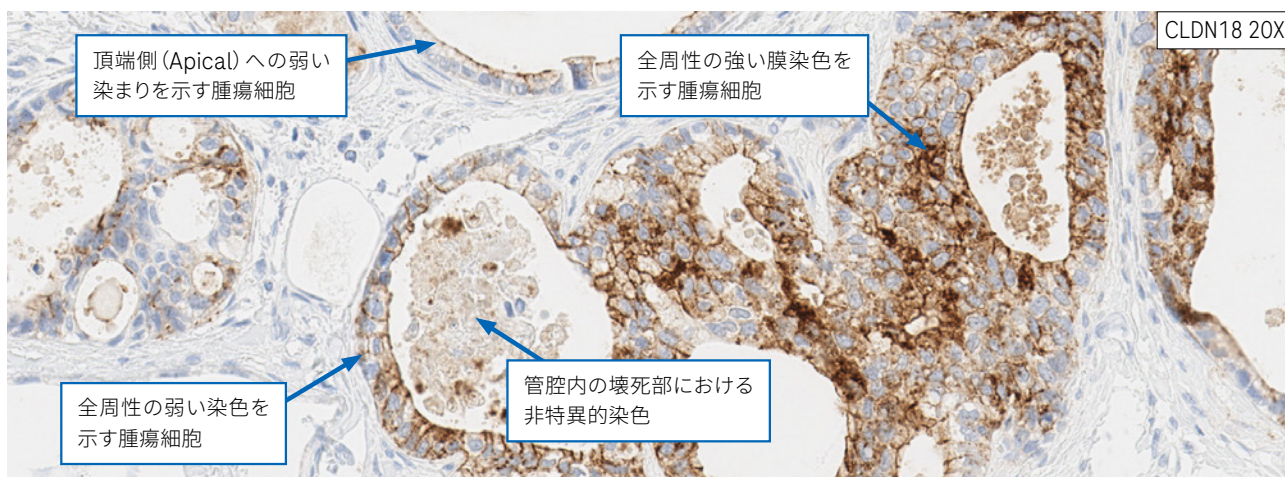
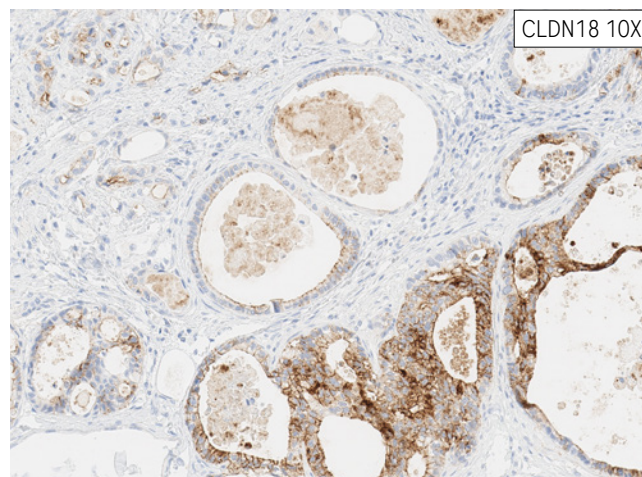
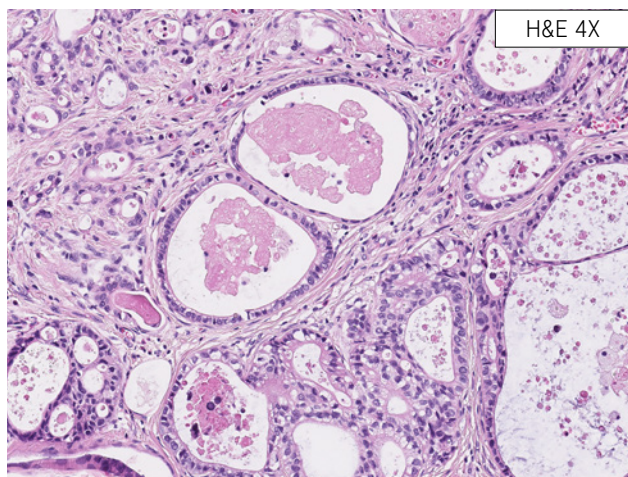
CLDN18陽性率の判定：CLDN18陽性率がカットオフ値である75%に近い症例においては、陰性が陽性かの判断が難しい場合があります。ベンタナ OptiView CLDN18 (43-14A) で染色される症例の大部分は、明らかな陽性または陰性に二分されますが、判定に苦慮する陽性率の症例も存在します。

以降に、判定に苦慮する症例を提示します。

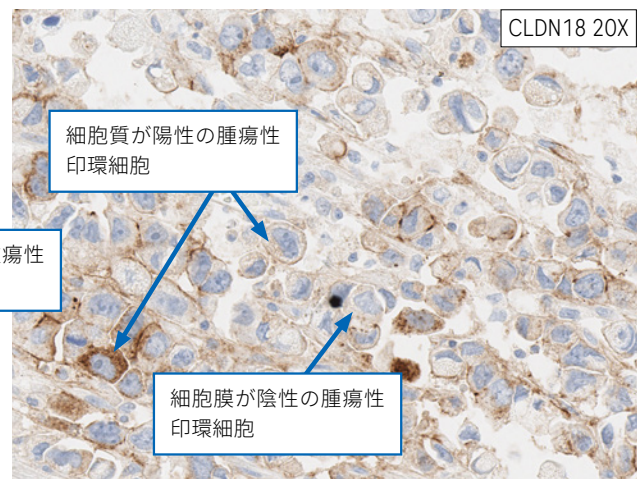
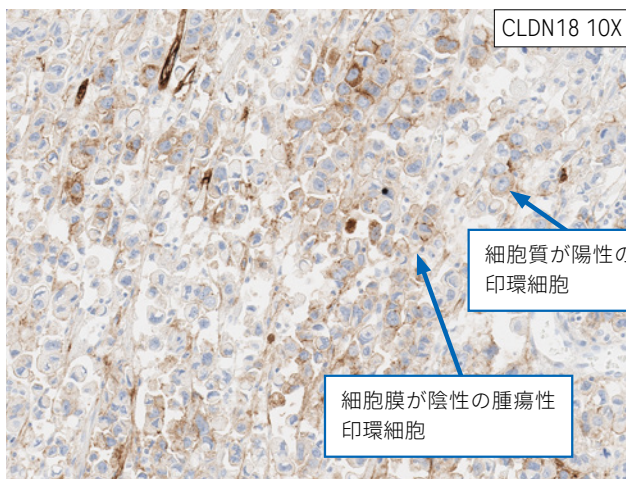
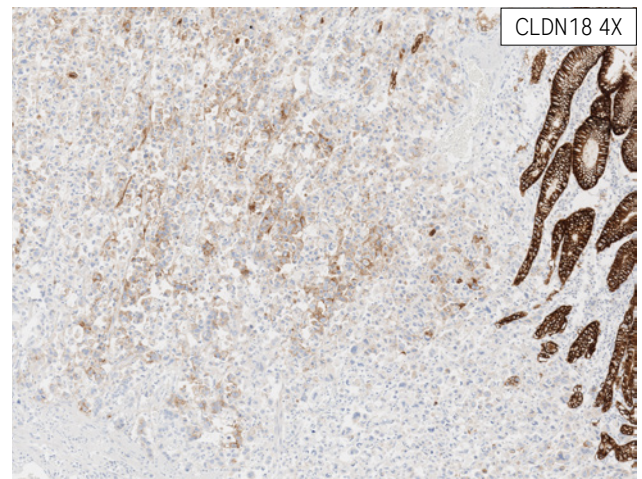
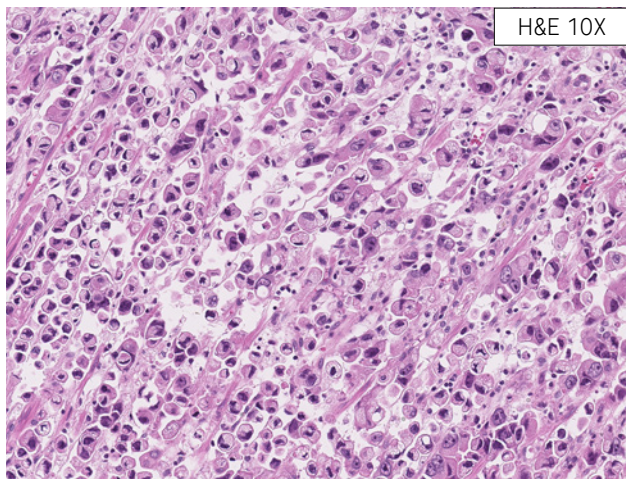
腫瘍細胞の細胞膜への染色パターンは、主に全周性(完全でなくても可)、頂端側(Apical)が多くみられ、次いで側方・基底膜側(Basolateral)や側方(Lateral)もみられます。頂端側への染まりと全周性の染まりはしばしば同時に観察されます。複数の染色パターンが存在する場合は、その腫瘍細胞で強い方の染色パターンの強度でスコアリングします。例えば、頂端側が強い染まり、全周性の染まりまたは側方・基底膜側(Basolateral)、側方(Lateral)への染まりが弱い染まりを示している場合、その腫瘍細胞は強い染まりとスコアリングします。



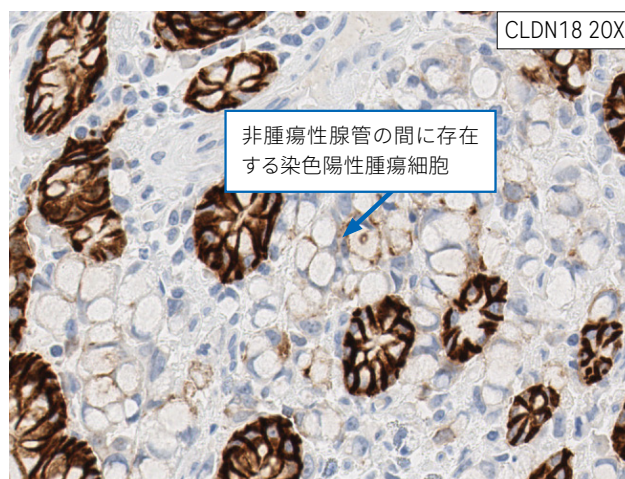
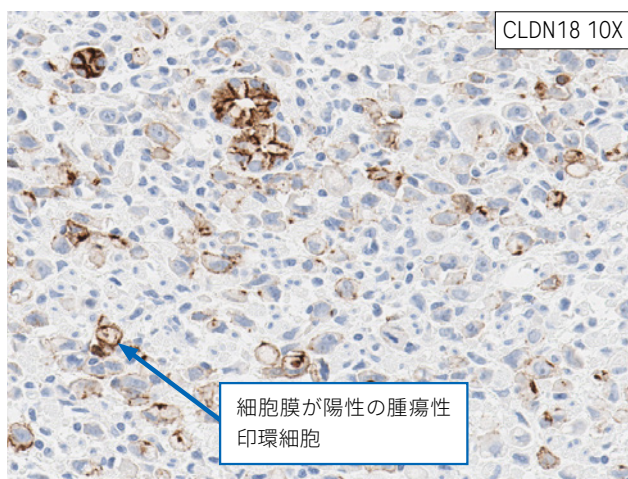
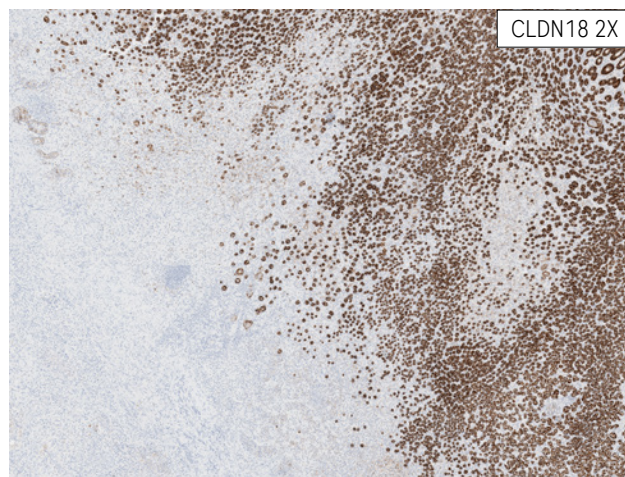
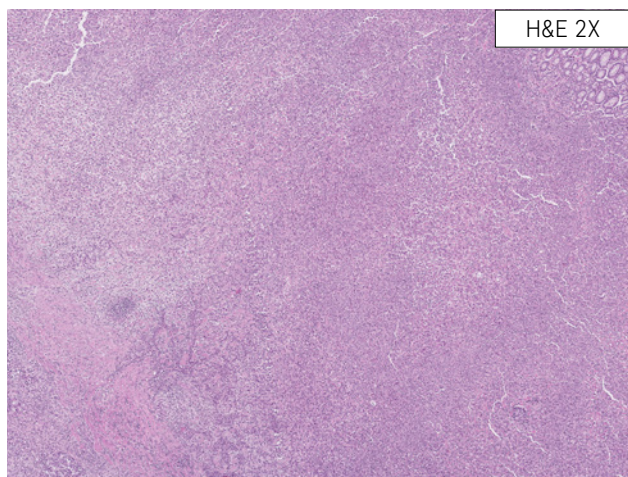
判定に苦慮する症例1：腸型の組織型を示す本症例では、90%の腫瘍細胞において側方・基底膜側(Basolateral)、側方(Lateral)および頂端側(Apical)で強い染色強度を示している。弱～中等度の側方・基底膜側(Basolateral)、側方(Lateral)への染色も散見される。この胃腺では、ほぼ全ての腫瘍細胞において頂端側(Apical)が強く染まっており、陽性細胞としてカウント対象となる。複数の染色パターンが存在する場合は、その腫瘍細胞で一番強い染色パターンの強度を採用しスコアリングすること。本症例はCLDN18陽性である。



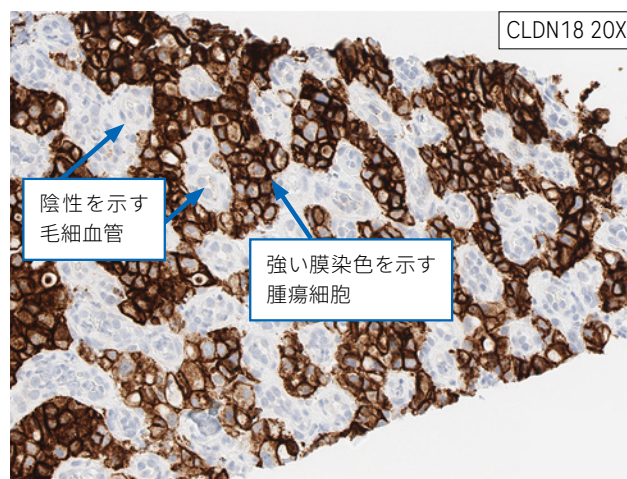
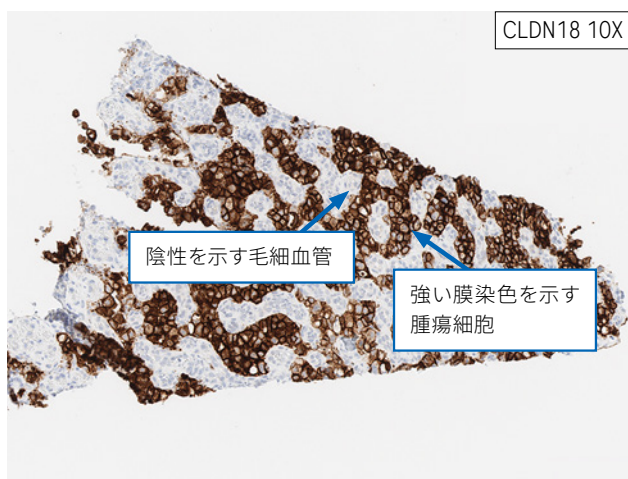
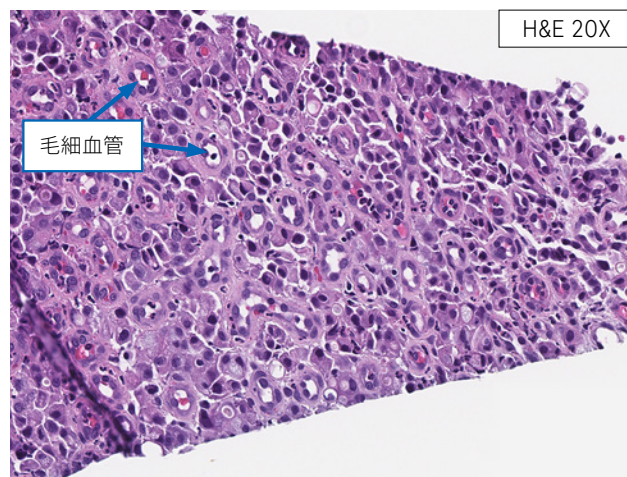
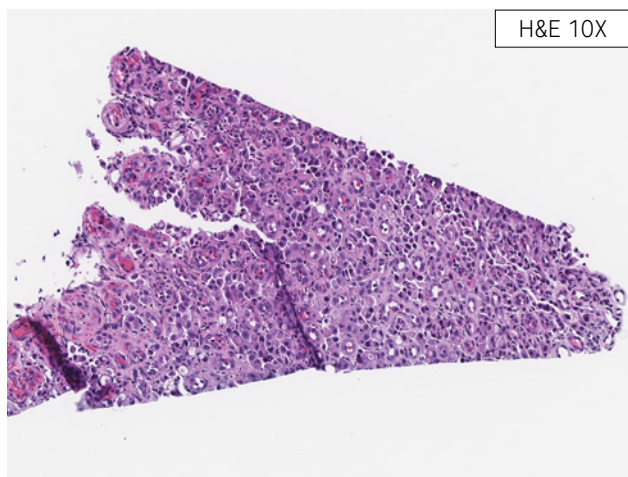
判定に苦慮する症例2：本症例は腸型の組織型で、不均一な染色強度を有している。頂端側 (Apical) および全周性の膜染色パターンが存在する。また、腺の大きさにばらつきがみられるため、腫瘍細胞数の推定が難しい。管腔内の壊死部分に非特異染色も存在する。本症例では中等度～強い膜染色を有する腫瘍細胞の割合が55%と評価される。本症例はCLDN18陰性である。



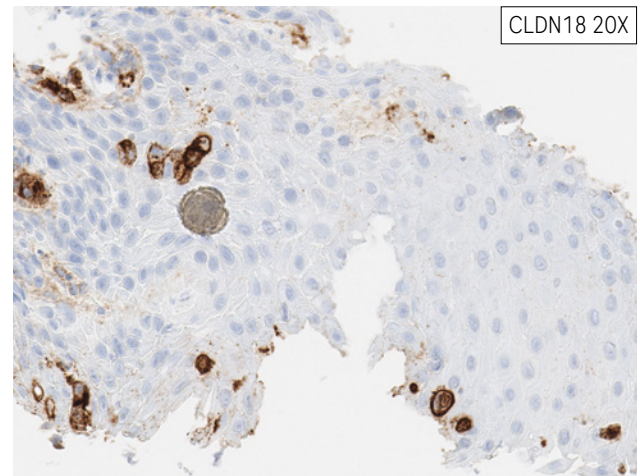
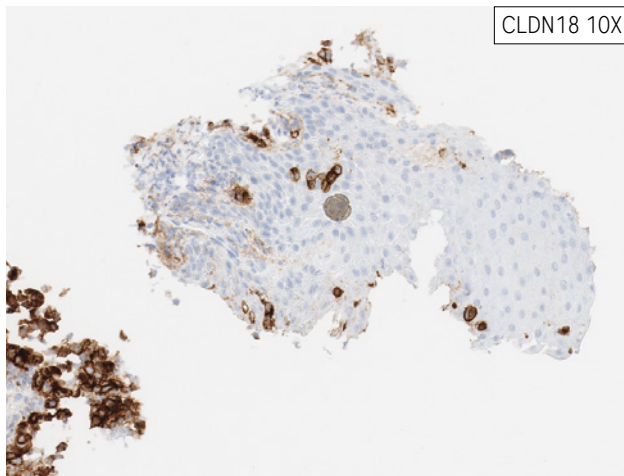
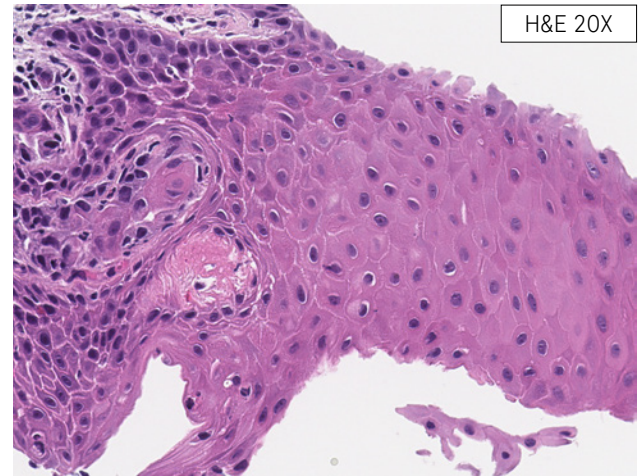
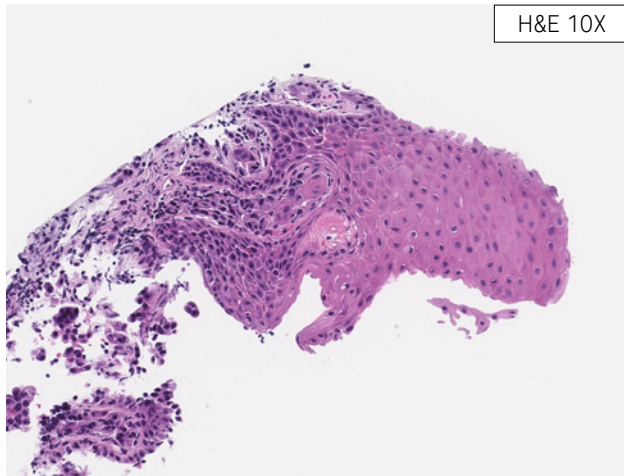
判定に苦慮する症例3： 本症例では、炎症細胞浸潤を伴う非腫瘍上皮がみられ、それに隣接して印環細胞の浸潤がみられる。腫瘍細胞の30%に強い膜染色がみられる。下段の画像の印環細胞では、全く染まっていないものや、細胞質や細胞膜に染色を示すものもみられる。本症例はCLDN18陰性である。



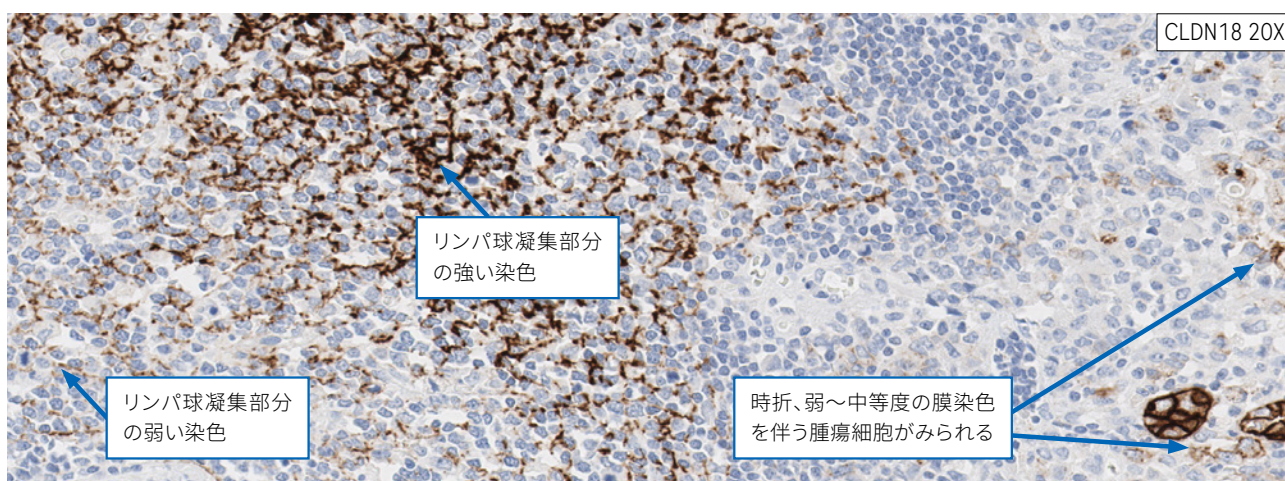
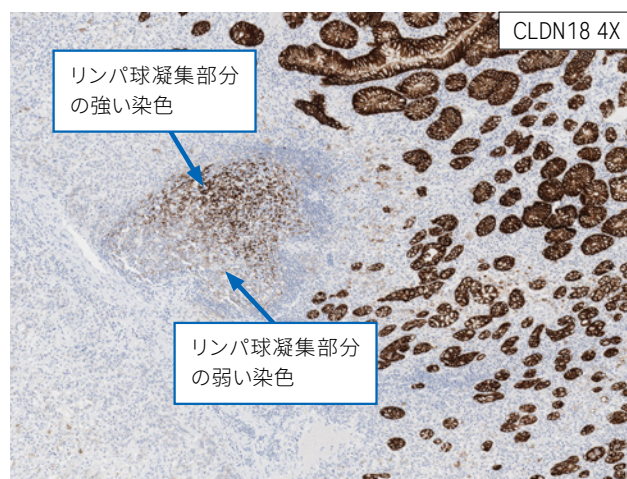
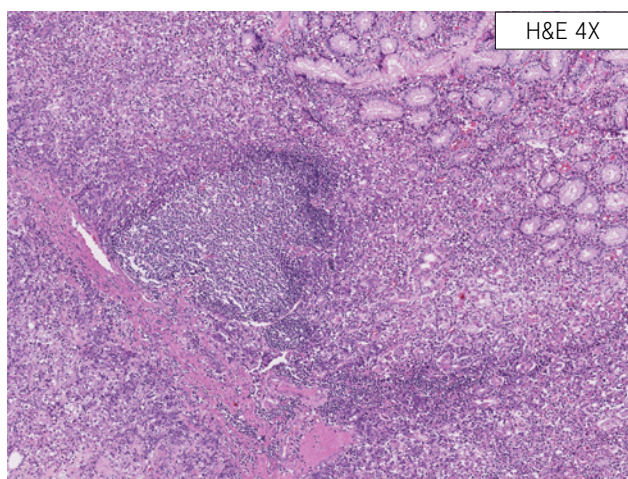
判定に苦慮する症例4： 本症例は印環細胞の形態を示している。腫瘍細胞の大部分は陰性だが（下段）、膜染色がみられる腫瘍細胞が散在しており（下段左）、非腫瘍性腺管の間に存在する染色陽性腫瘍細胞（下段右）もみられる。本症例は10%の腫瘍細胞が陽性を示している。本症例はCLDN18陰性である。



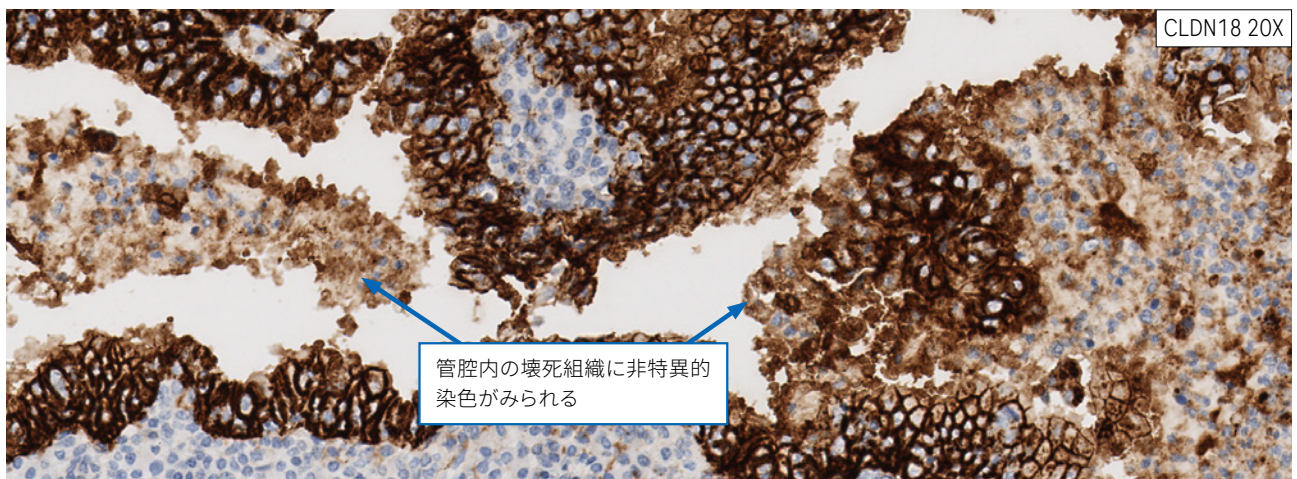
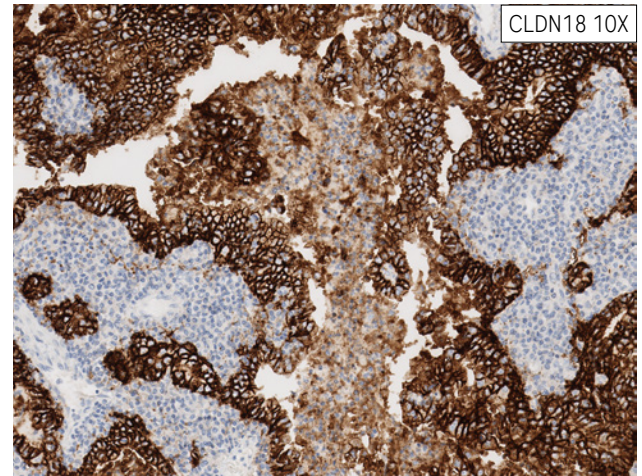
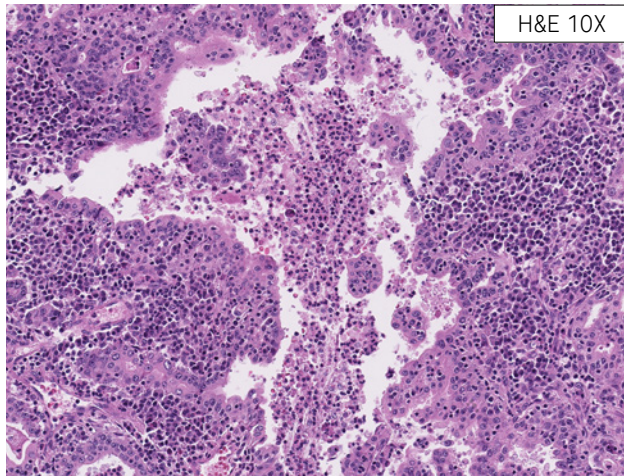
判定に苦慮する症例5：本症例は、腫瘍細胞で強い膜染色を示す一方で、内皮細胞で裏打ちされた毛細血管では陰性を示している。このような症例では、HE染色スライドをさかのぼって参照し、CLDN18染色スライドを強拡大で観察することが推奨される。本症例では85%の腫瘍細胞が陽性染色を示している。CLDN18陽性である。



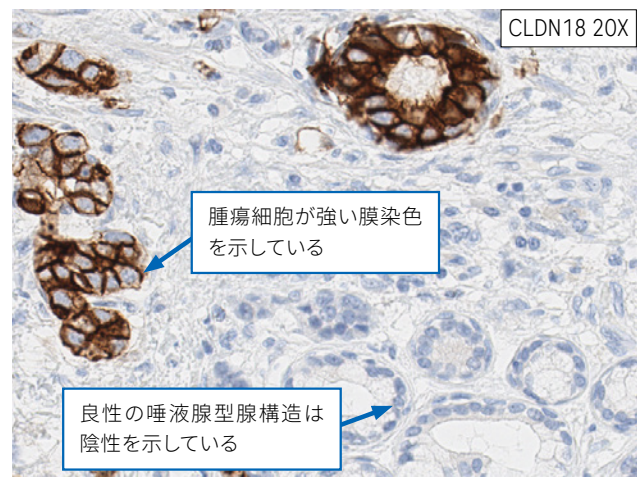
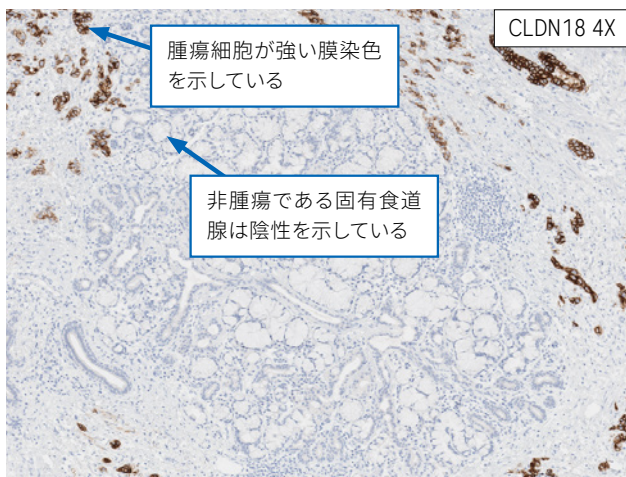
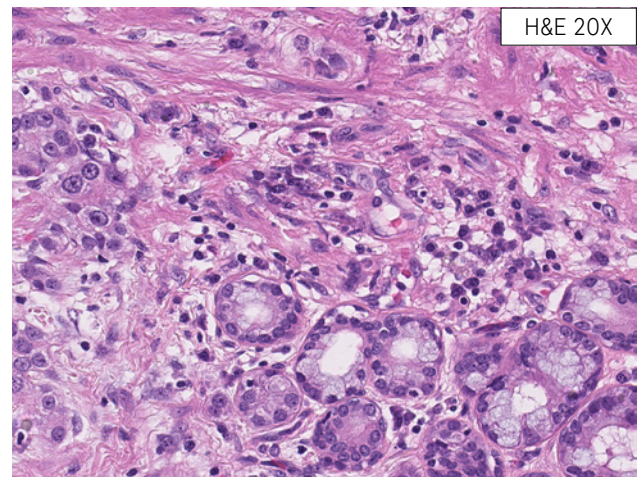
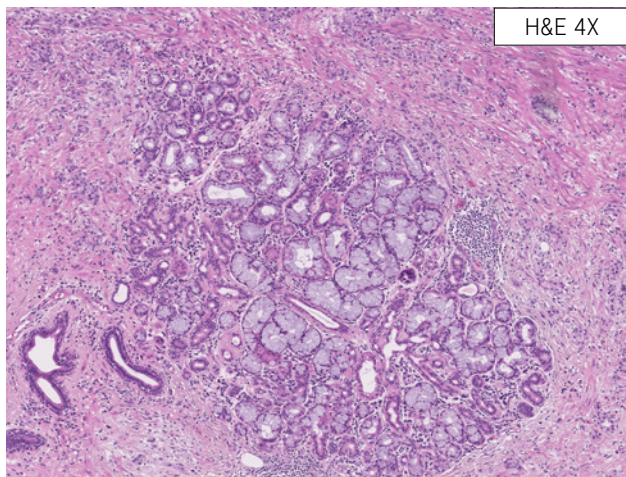
判定に苦慮する症例6：本症例では扁平上皮細胞が強い膜染色を示している。扁平上皮内の細胞は、それらが(血管乳頭内もしくはpagetoid進展を
しめす)腫瘍細胞であると確証がない限りスコアリングしないこと。本症例は腫瘍細胞の95%が中等度～強い膜染色を示している。本症例はCLDN18
陽性である。



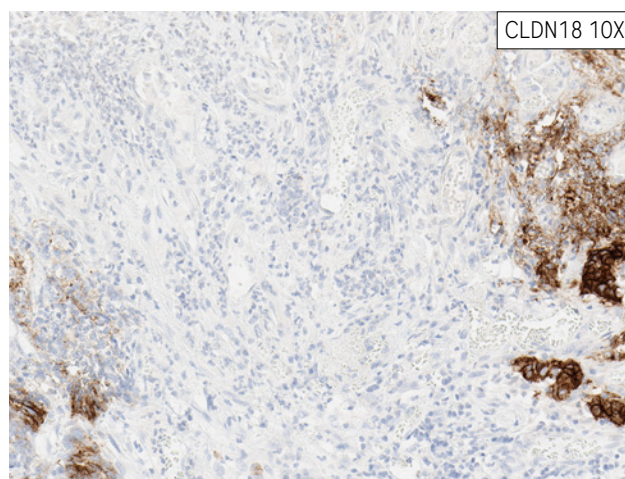
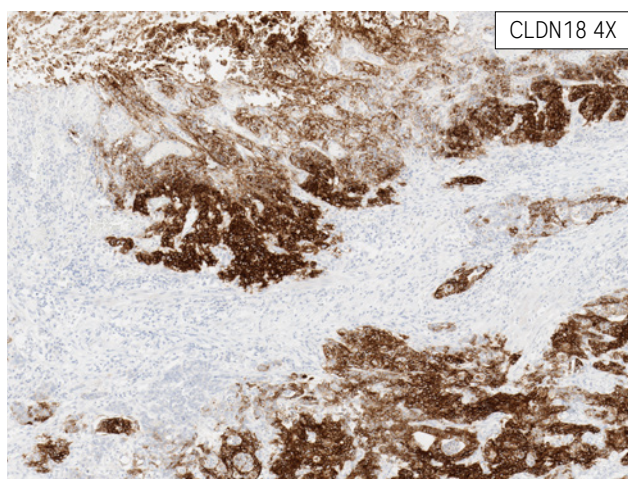
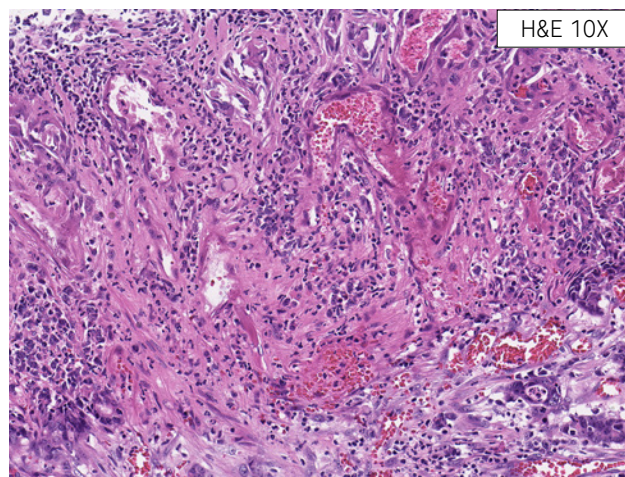
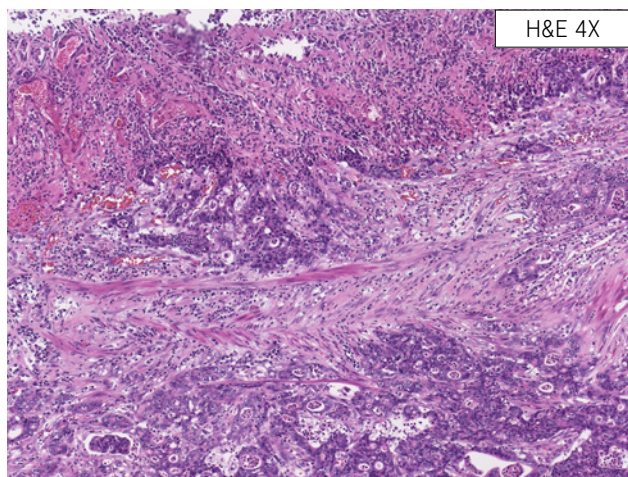
判定に苦慮する症例7：この症例では胚中心を伴うリンパ球の集塊が多くみられる。(上段右) 非腫瘍性の腺上皮が強い膜染色を示しており、リンパ球の凝集部分にも陽性を示している。(下段) 樹状細胞にも弱～強い染色がみられる。時折このような組織学的特徴がみられることがあり、腫瘍細胞の膜染色と混同しないよう注意が必要である。ごく弱～中等度の膜染色を示す腫瘍細胞が、画像右側のリンパ球凝集部分に浸潤している様子がみられる。強い膜染色を伴う非腫瘍性の腺上皮も存在する。この症例は、腫瘍細胞の15%で中等度～強い膜染色を示し、CLDN18陰性である。



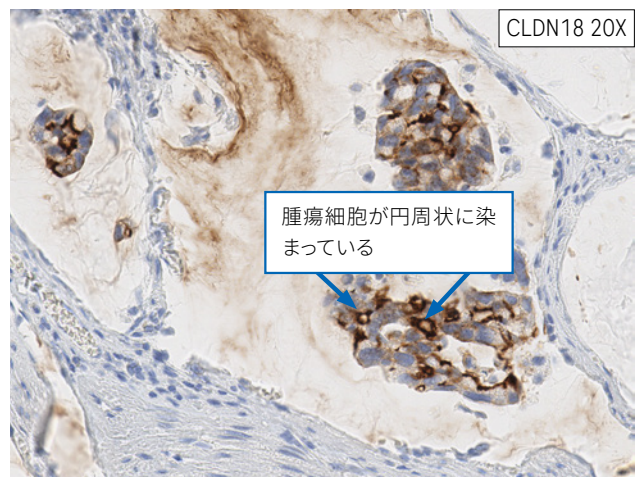
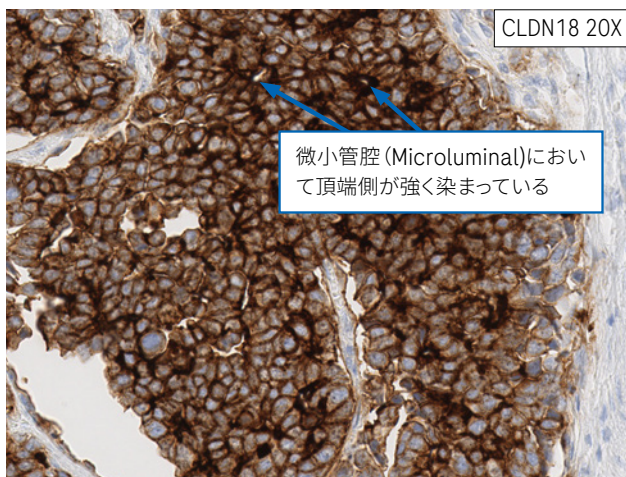
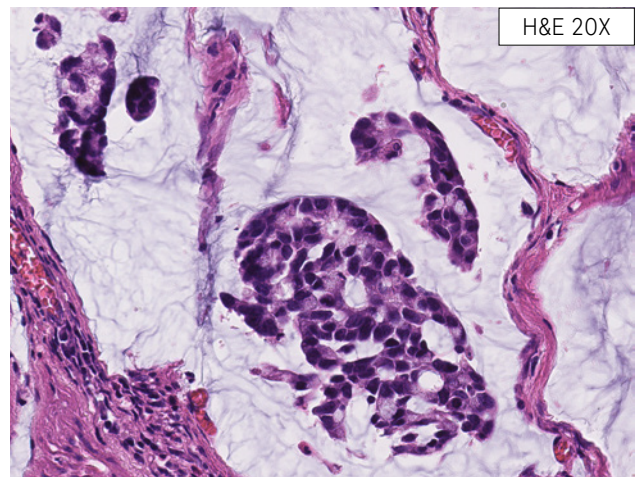
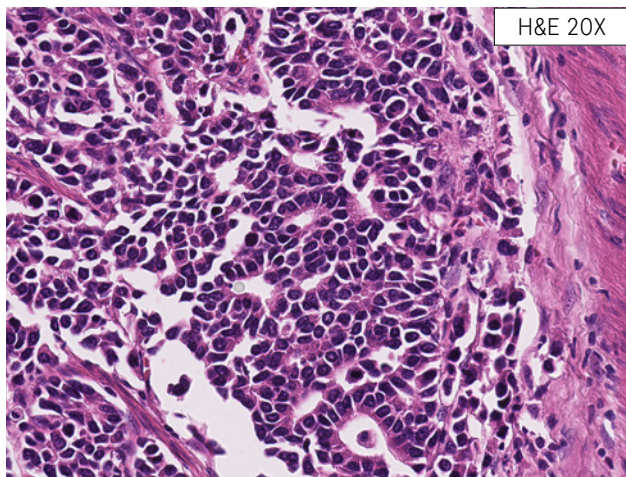
判定に苦慮する症例8：本症例では壊死組織の非特異的染色がみられる。壊死組織内の非生存腫瘍細胞は、腫瘍細胞のスコアリングから除外する。腺構造を構成する腫瘍細胞は強い膜染色を示している。本症例は100%の腫瘍細胞において中等度～強い膜染色がみられると評価され、CLDN18陽性である。



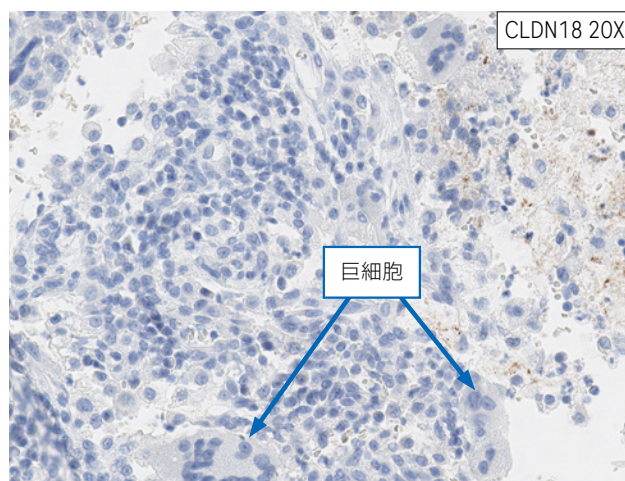
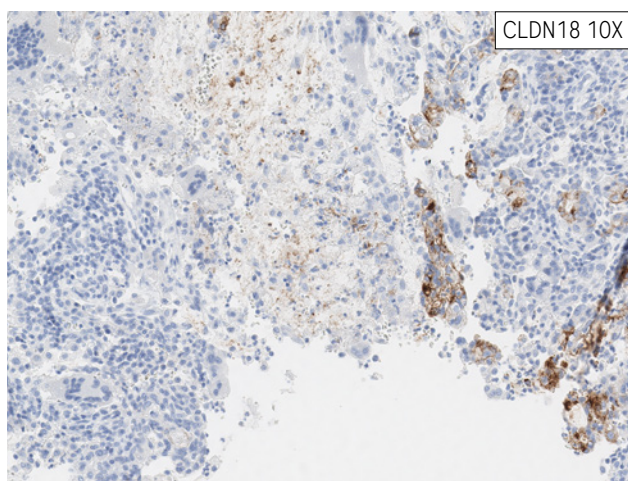
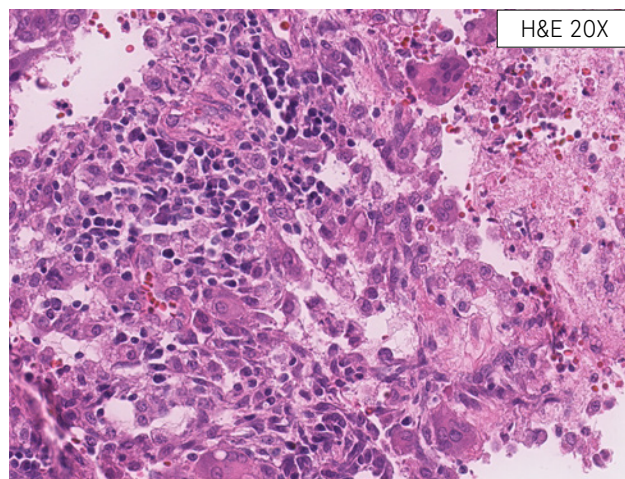
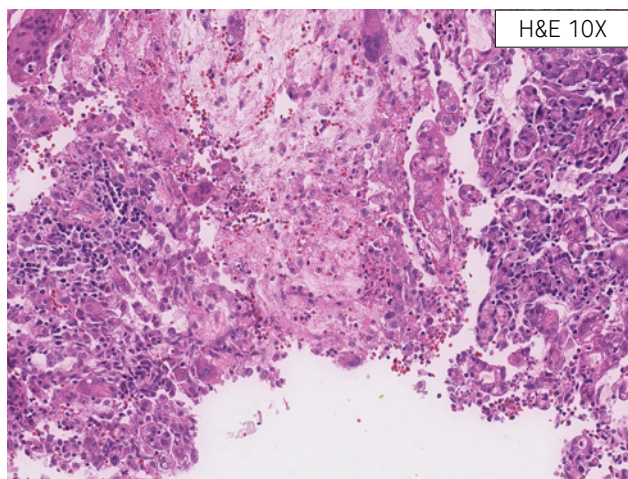
判定に苦慮する症例9：本症例では下部食道や胃食道接合部において時折認められる唾液腺に類似した腺構造である固有食道腺が認められるが、CLDN18陰性を示す。隣接する腫瘍細胞では、ほぼ100%の細胞で強い膜染色を示している。スコアリングの際には非腫瘍細胞を含めないように注意すること。本症例はCLDN18陽性である。



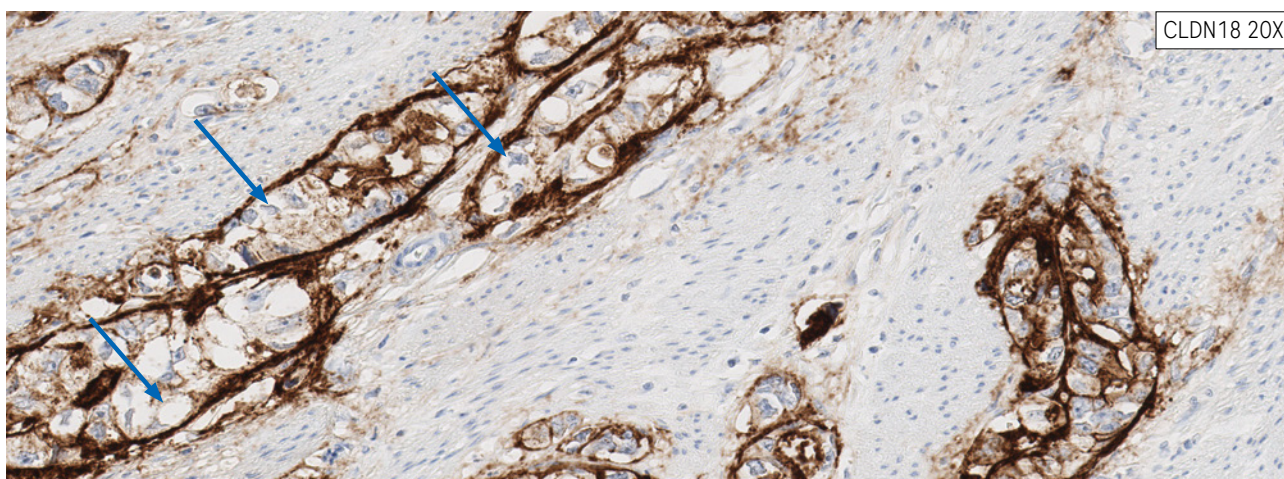
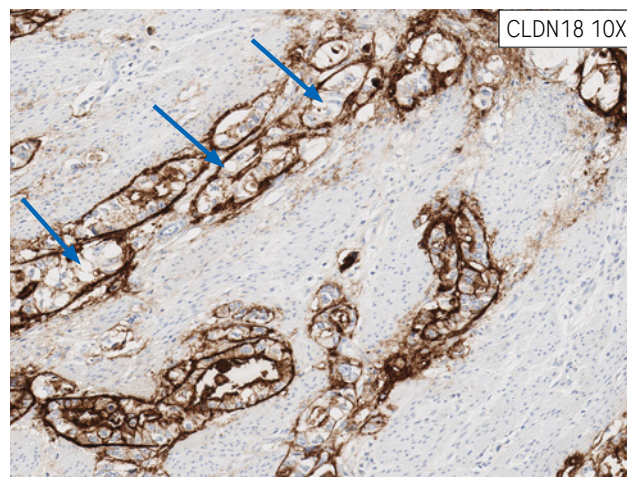
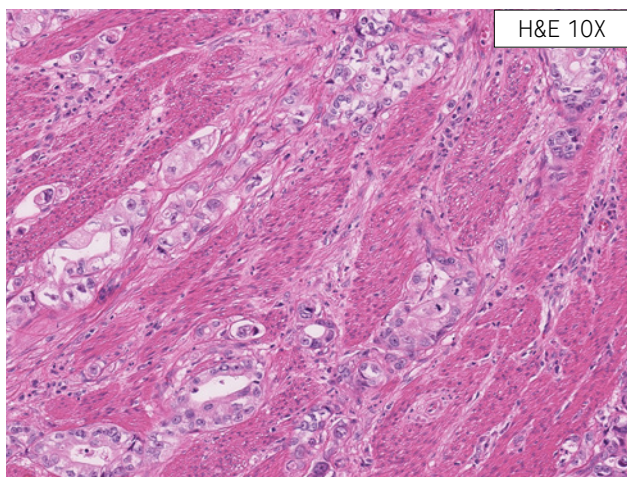
判定に苦慮する症例10：胃癌ではしばしば潰瘍化がみられる。こういった症例では、陰性の反応性内皮細胞や間質細胞を陰性の腫瘍細胞として誤認し偽陰性とする、もしくは陰性の腫瘍細胞を陰性の潰瘍底として誤認し、対象から除外することで、偽陽性としてしまうことを避けるため、HE染色スライドにて潰瘍底を入念に観察する必要がある。本症例は、腫瘍細胞の90%で中等度～強い膜染色を示すと評価され、CLDN18陽性である。



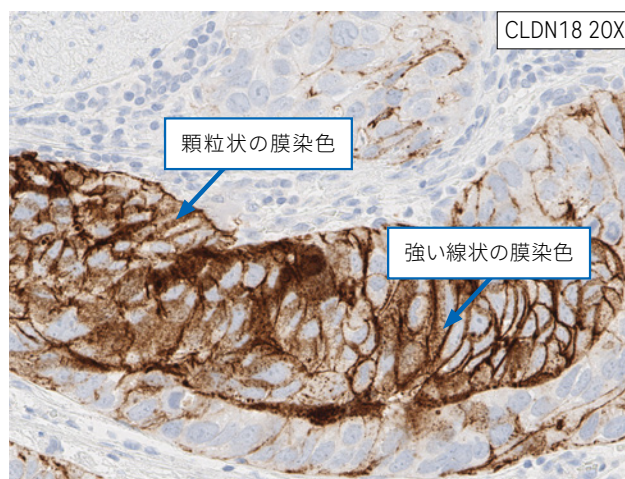
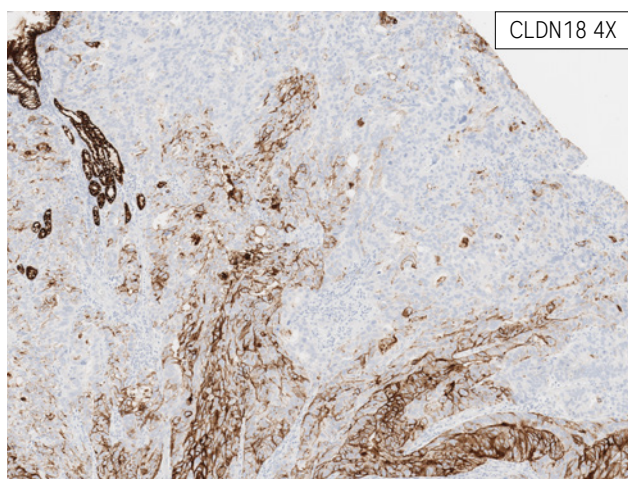
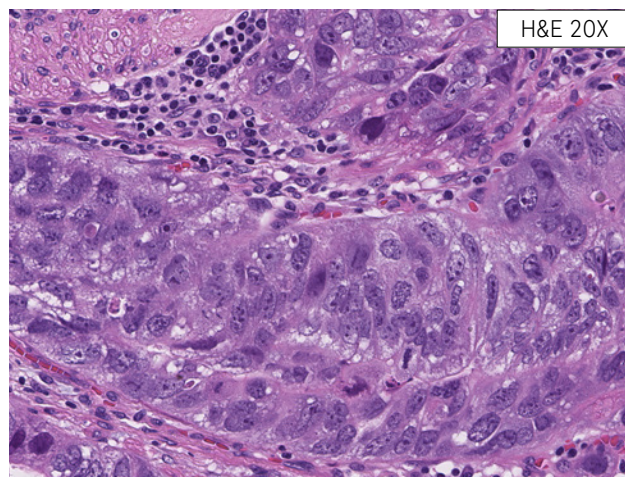
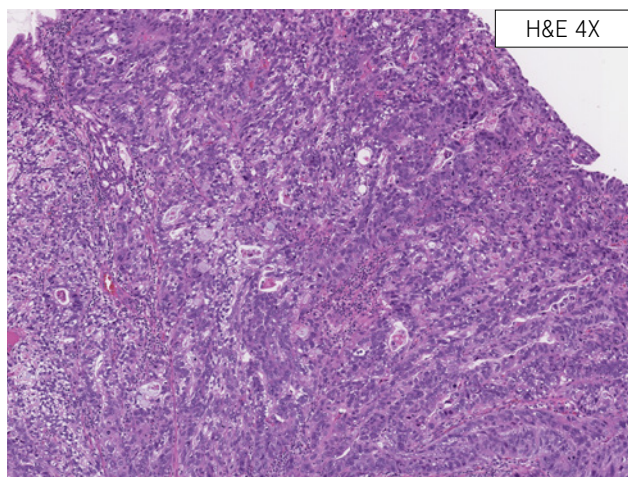
判定に苦慮する症例11：本症例は、明らかな腺形成領域を伴う腸型の形態を示しており、腫瘍細胞集塊が浮遊している粘液湖や、より充実性の領域が局所的にみられる。(下段左) CLDN18染色の腫瘍細胞では、全周性の膜染色を示している。さらに、腺構造や微小管腔が形成されている領域では強い頂端側 (Apical) への染まりがみられる。管腔が容易に観察できることもあるが、そうでない場合も多い。この染色パターンが中等度～強い染色強度でみられる場合、この稀な頂端側 (Apical) の染色パターンを有する腫瘍細胞はすべて陽性染色としてカウントする。本症例は、80%の腫瘍細胞で中等度～強い膜染色を示し、CLDN18陽性である。



判定に苦慮する症例12：この症例では、胃癌に特徴的である潰瘍形成部が含まれ、その付近に異物巨細胞がみられる。(下段右)マクロファージと同様に、異物巨細胞は陰性を示す。異物巨細胞はスコアリング対象外である。本症例は、70%の腫瘍細胞で中等度～強い膜染色がみられる。本症例はCLDN18陰性である。



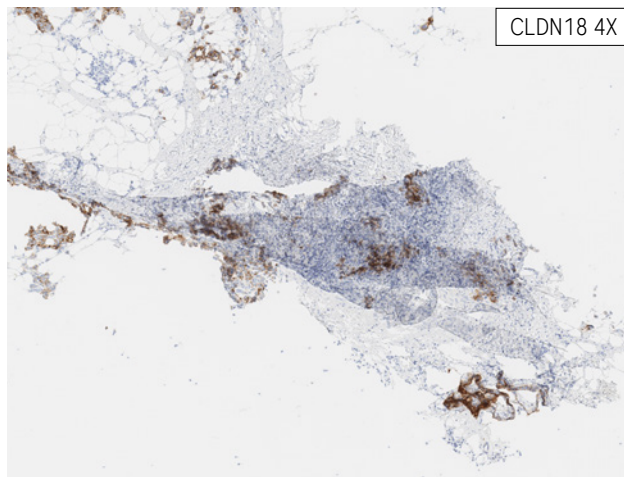
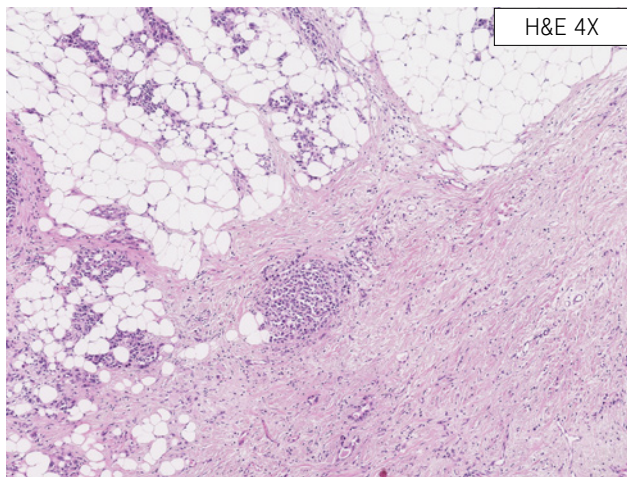
判定に苦慮する症例13：本症例は、腫瘍腺管の大部分において、基底膜側のみ (Basal) への強い染色を示している。加えて、強い頂端側 (Apical) への染まりと弱～中等度の側方 (Lateral) への染まりも存在している。CLDN18検査では、頂端側 (Apical)、側方・基底膜側 (Basolateral)、側方 (Lateral)、全周性 (完全でなくても可)、微細管腔内 (Microluminal) において中等度～強い膜染色を示す腫瘍細胞をカウントし、陽性腫瘍細胞割合を算出する。基底膜側のみへの中等度～強い染色がみられても、他のいずれのパターンの染色もみられない場合、CLDN18陽性腫瘍細胞としてカウントしない。本症例は50%の腫瘍細胞で中等度～強い膜染色を呈している。本症例はCLDN18陰性と判定される。



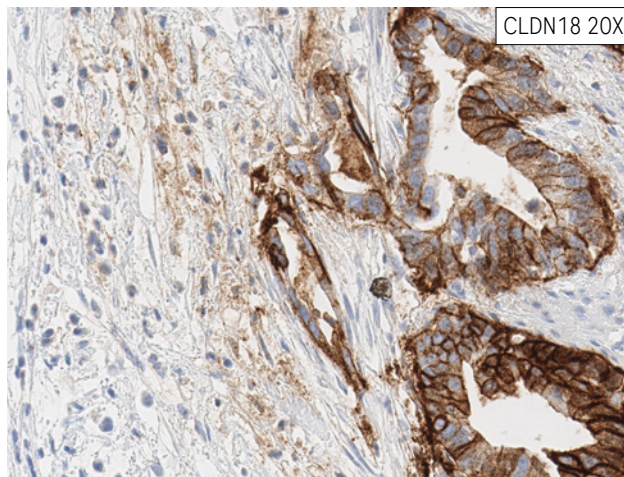
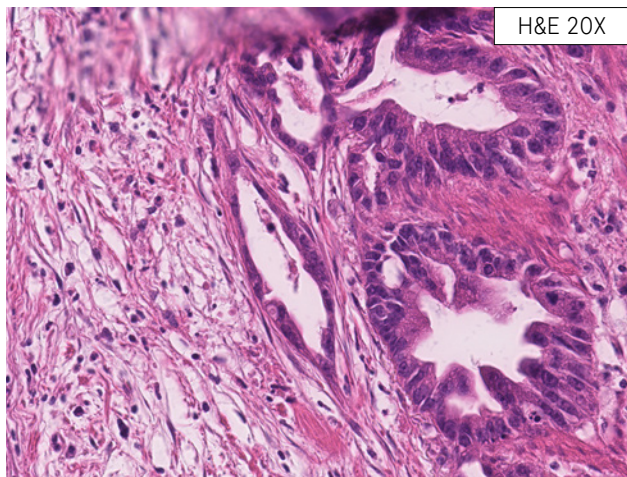
判定に苦慮する症例14：本症例では、50%の腫瘍細胞において、強い線状の膜染色や顆粒状の膜染色の両方を示している（下段右）。顆粒状または点状の膜染色が顆粒状の細胞質染色とともにみられる部位が散見される。顆粒状の膜染色は、中等度から強い染色強度で、細胞膜に沿って並んでいる場合、陽性腫瘍細胞としてカウントされる。本症例はCLDN18陰性である。

■アーチファクト

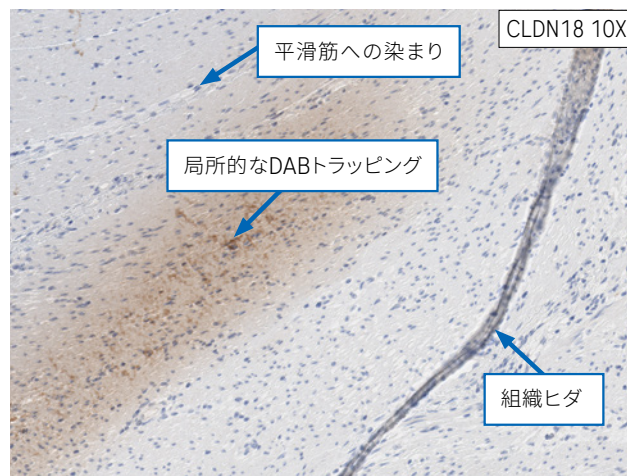
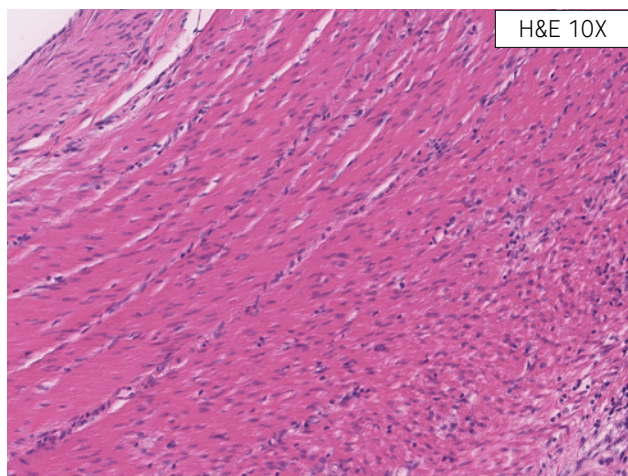
メラニン、ヘモジデリン等の内因性の色素は時折DAB染色に類似した様子を呈することがあります。そのような場合、患者検体を陰性コントロール試薬で染色した陰性対照スライドと注意深く比較することで、それが内因性色素かDAB染色かを判別することができます。さらに、検体処理や薄切に由来する組織学的なアーチファクトもまた、CLDN18のスコアリング判定を複雑にする要因の一つです。このようなアーチファクトの例として挙げられるのが、固定ムラ、エッジ効果、DAB分子の組織へのトラッピング、カバーガラスを載せる際のミス、一部の領域における染色の欠如、ライトスポット、組織の裂けや折れシワ、組織切片が剥がれて無くなる、などの事象です。これら以外にも、その他のアーチファクトが生じる場合もあります。アーチファクトによっては、新たに薄切して染色を繰り返すか、新たに標本を作製しなおす必要があります。



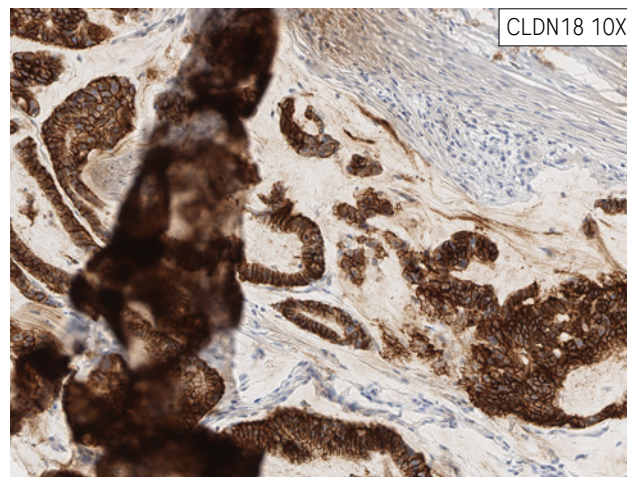
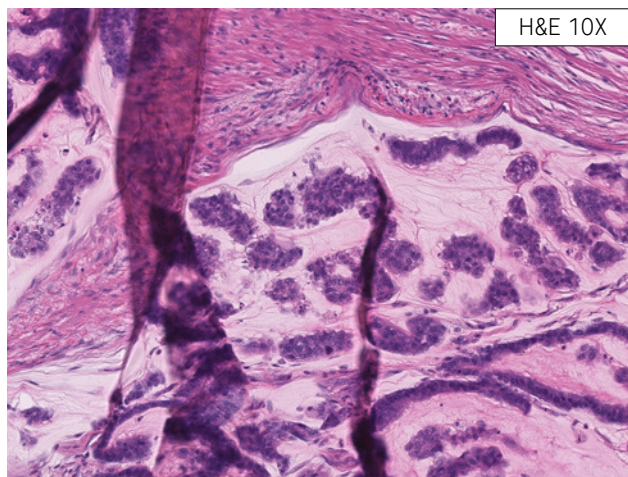
アーチファクト例1：本症例ではCLDN18染色スライドにおいて組織が破れて折り畳まれている。この場合、ペンタナ OptiView CLDN18 (43-14A) を用いた染色を再度実施する必要がある。組織の折り畳みや裂けの結果、腫瘍の50%以上が消失する場合、または生存腫瘍細胞が50個未満の場合、そのアッセイは判定不能とみなし、再検査が必要となる。



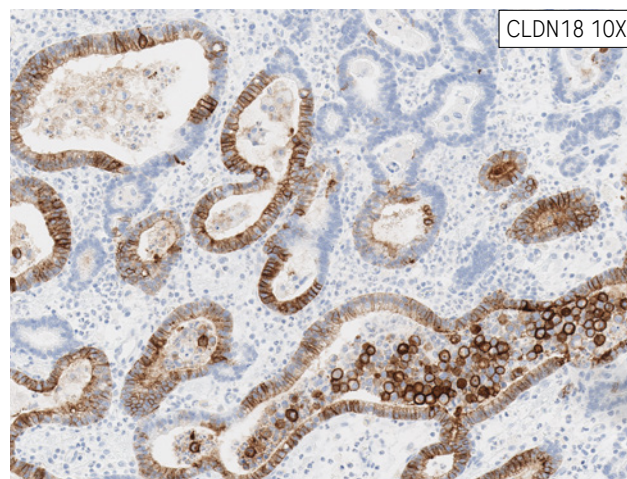
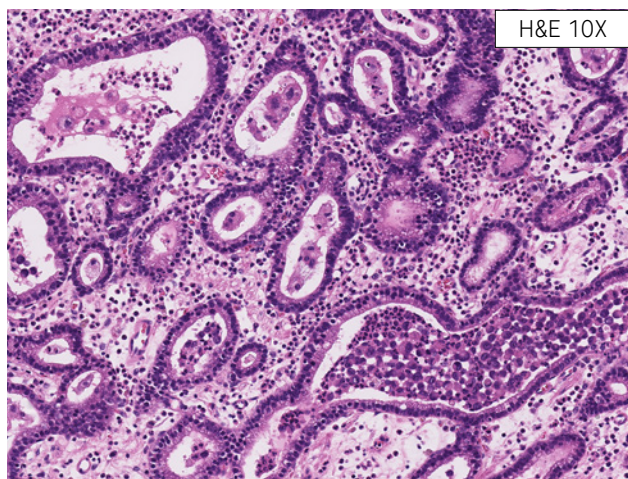
アーチファクト例2：左側のHE画像では、間質部分に腫瘍腺管がみられる。右側のCLDN18染色画像では、一部で間質が染まっている様子がみられる。こういったごく軽度の間質への染まりは時折観察され、通常は悪性の腺構造の近くでみられることが多い。通常であれば、間質への染まりによってペンタナ OptiView CLDN18 (43-14A) を用いた染色の評価が妨げられることはない。



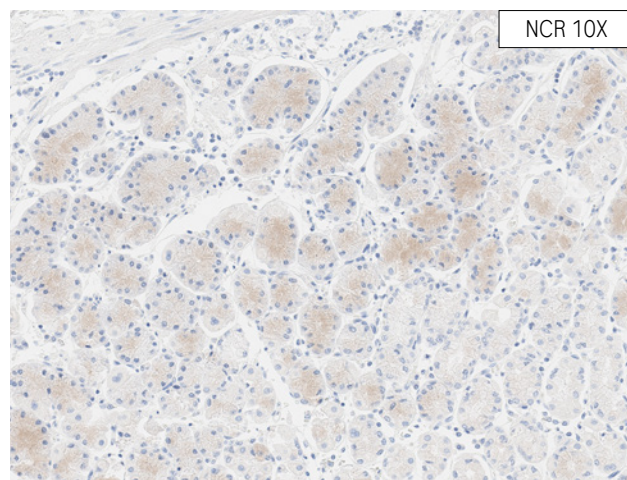
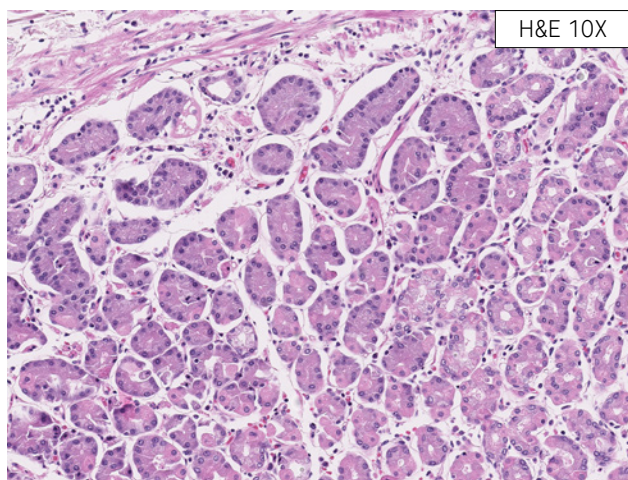
アーチファクト例3： 左のHE画像は視野の大部分が平滑筋で構成されている。右側のCLDN18染色スライドでは3つのアーチファクトを示している。第一に局所的にDABのトラッピングがみられる。第二に、平滑筋が染まっている様子もみられる。これらのアーチファクトは時折認められ、ベンタナ OptiView CLDN18 (43-14A) を用いた染色結果を解釈する上での妨げになってはならない。第三のアーチファクトは組織のシワである。組織の重なりによってCLDN18染色が濃くみえることがあるため、組織が折り畳まれている部分はスコアリング対象外とすること。



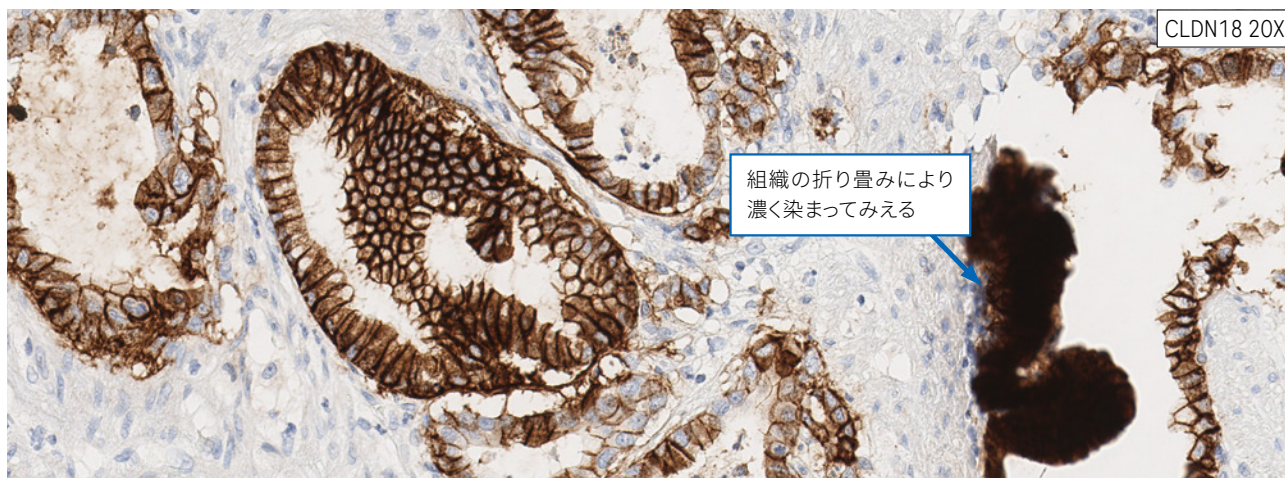
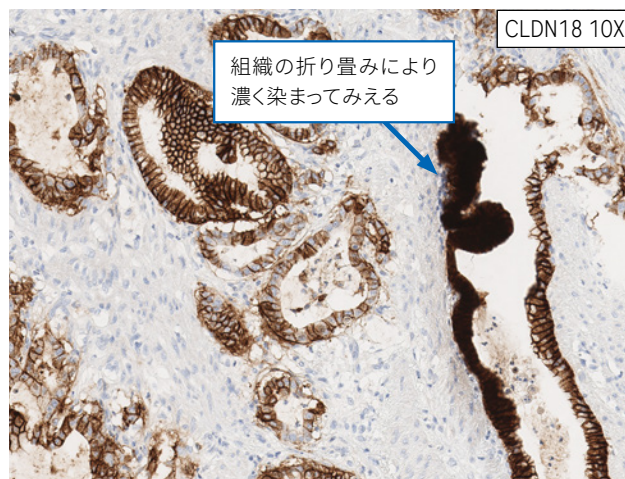
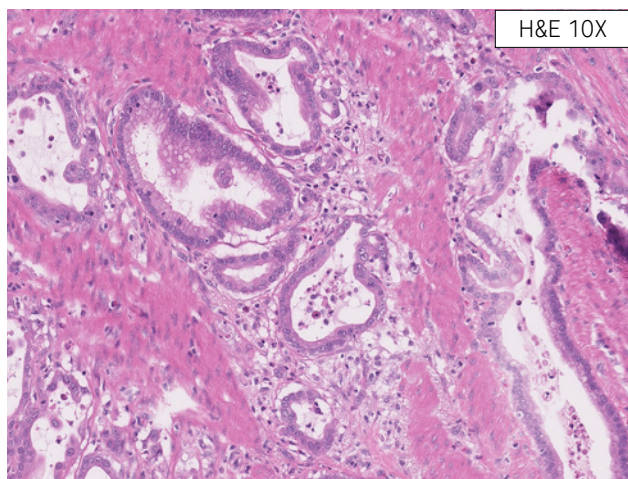
アーチファクト例4： 本症例は95%の腫瘍細胞で強い膜染色がみられる陽性例である。腫瘍巣は粘液湖内にあり、軽度の非特異的染色がみられる。切片に大きなシワがあり、腫瘍組織が重なり合っている。これにより、CLDN18染色がより濃くみえる可能性があるため、シワ部分の腫瘍細胞はスコアリング対象外となる。



アーチファクト例5： 腫瘍細胞の総数としてカウントされるのは生存腫瘍細胞のみであり、壊死部分または管腔内の壊死部分の腫瘍細胞染色はカウント対象から除外される。本症例は、大きな腺構造における管腔内壊死部に腫瘍細胞がみられる。これらの腫瘍細胞は、スコアリング対象外であり、陽性率のカウントからも除外される。全体として、本症例では、30%の腫瘍細胞が中等度～強い膜染色を示している。本症例はCLDN18陰性である。



アーチファクト例6： 右側の陰性コントロール抗体 (NCR) を用いたコントロールスライドでは、細胞質が淡い褐色に染まった胃底腺細胞がみられる。これは、陰性コントロールスライドで時々みられ、これ以外にアーチファクトがなければ、陰性コントロールスライドとして許容範囲内である。



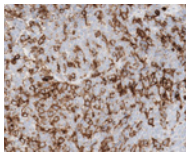
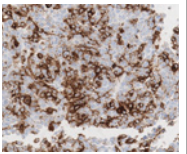
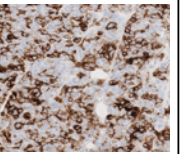
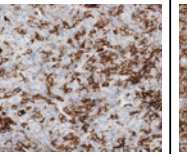
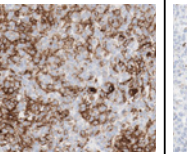
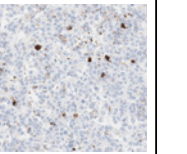
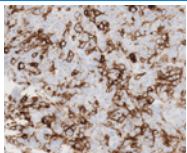
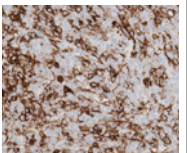
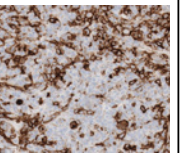
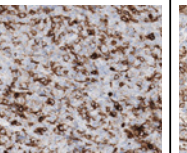
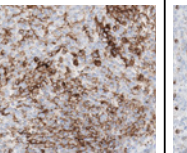
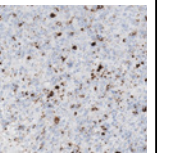
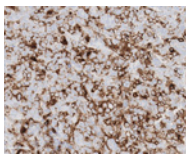
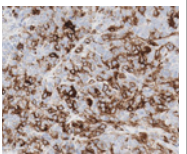
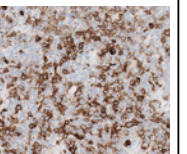
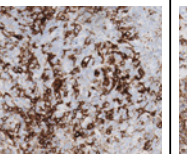
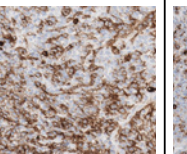
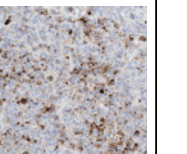
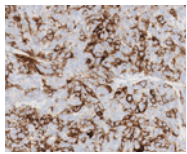
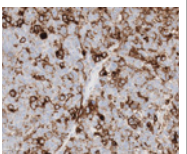
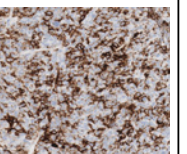
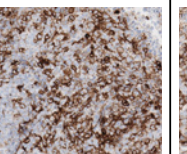
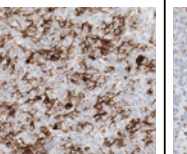
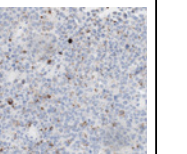
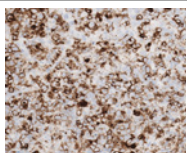
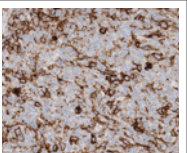
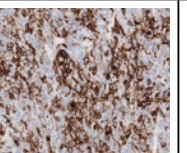
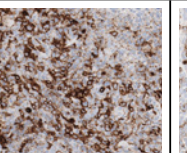
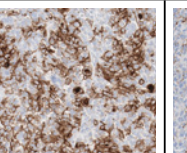
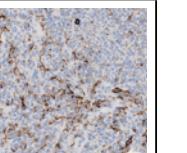
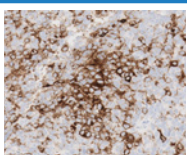
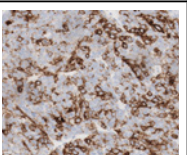
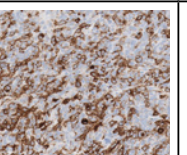
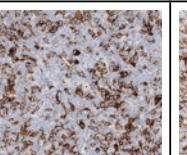
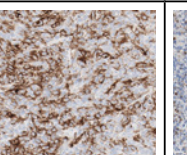
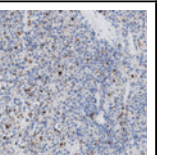
アーチファクト例7： 左上のHE画像は、いくつかの管腔内壊死を伴う胃腺癌を示している。右側のCLDN18染色スライドでは、腫瘍細胞の50%で側方・基底膜側 (Basolateral) や側方 (Lateral) に強い染色を示し、管腔内に非特異的染色がみられる。右端の腺構造では、組織が折り畳まれているために、腫瘍細胞が明らかに濃く染色されている様子がみられる。(下段) 強拡大でも本来の膜染色を見分けることは困難である。したがって、この濃く染色されたエリアはスコアリング対象外となる。本症例はCLDN18陰性である。

プレアナリシスの影響

推奨される固定条件は、10%中性緩衝ホルマリンを用い、固定時間は6～48時間です（下図青枠内）。

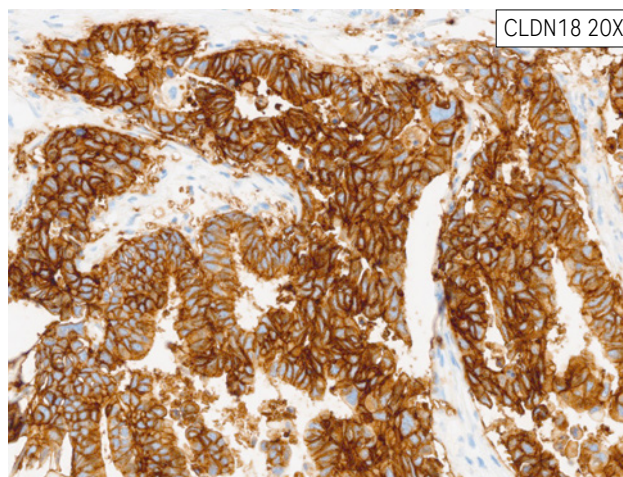
* 本アッセイでは、6時間以下および48時間を超えた固定時間は推奨されません。

**PREFER固定液は染色性が弱くなる傾向があり、亜鉛ホルマリンや、アルコール固定液（AFAや95%エタノールなど）はバックグラウンド染色が濃くなる傾向があるため、推奨されません。

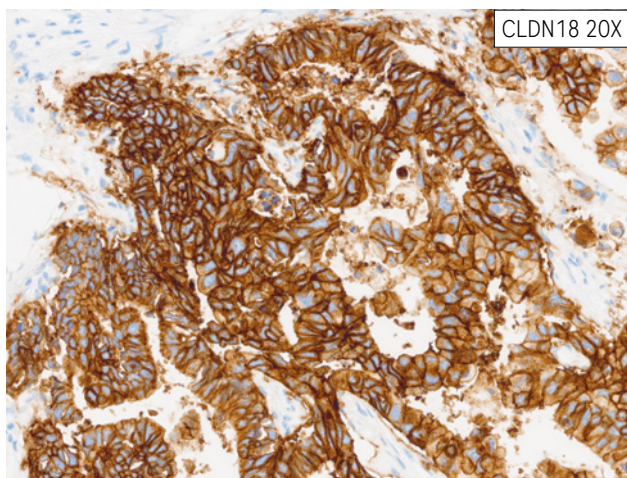
ベンタナ OptiView CLDN18 (43-14A) における固定液および固定時間の影響（ゼノグラフト組織を染色した場合）						
時間 (Hrs)	固定液					
	10%中性緩衝ホルマリン	アルコール性ホルマリン	AFA**	亜鉛ホルマリン**	95%エタノール**	PREFER固定液**
1*						
6						
12						
24						
48						
72*						

薄切済み未染色スライドの安定性

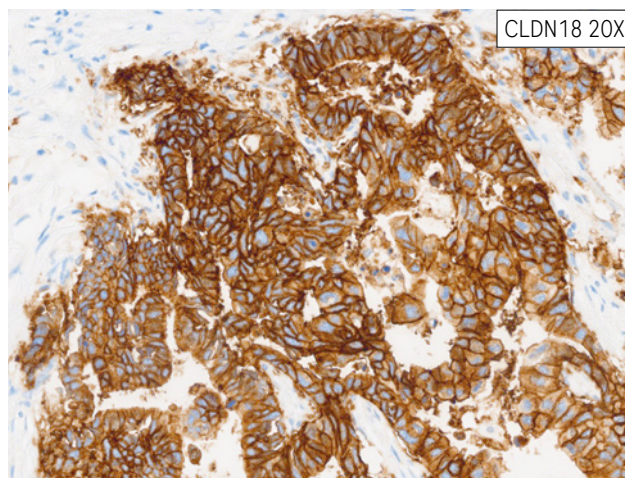
薄切済み未染色標本は時間の経過とともに抗原性が低下することがあるので、スライドは薄切後なるべく早く染色してください。直ちに染色しない場合はスライドを乾燥させ、室温で保存します。各種環境因子が切片の抗原安定性に影響を及ぼすことが知られている為、保存期間が45日を超えている場合には、抗原安定性に問題が無いか確認してください。



症例1(0日目:基準となる染色性)：ペンタナ OptiView CLDN18 (43-14A) で染色した胃食道接合部を含む胃腺癌症例



症例1(45日目、5°C)：スライドは5°Cで保管され、45日目にペンタナ OptiView CLDN18 (43-14A) を用いて染色された。



症例1(45日目、30°C)：スライドは室温(30°C)で保管され、45日目にペンタナ OptiView CLDN18 (43-14A) を用いて染色された。

0日目に染色された基準スライド(上図)と比較して、45日目に染色されたスライド(下図)では弱陽性を示していた部分が陰性となっています。

1. Sung H, Ferlay J, Siegel R, Dikshit R, Laversanne M, Soerjomataram I, Ahmedin J, et al. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin* 2021;71:209-49.
2. Global Cancer Facts and Figures, American Cancer Society 4th edition.2018.
3. Ferlay J, Ervik M, Lam F, Colombet M, Mery L, Pineros M, et al (eds). WHO Cancer Today. GLOBOCAN, 2020.
4. 国立がん研究センターがん情報サービス「全国がん登録罹患データ(2016年～2019年)」
5. Hashimoto I, Oshima T. Claudins and gastric cancer: an overview. *Cancers (Basel)* . 2022;14 (2):290.
6. Singh P, Toom S, Huang Y. Anti-Claudin 18.2 antibody as new targeted therapy for advanced gastric cancer. *J Hematol Oncol*. 2017;10(1):105.
7. Gunzel D, Yu A. Claudin and the modulation of tight junction permeability. *Physiol Rev*. 2013;93 (2):525-69.
8. Selim JH, Shaheen S, Sheu WC, et al. Targeted and novel therapy in advanced gastric cancer. *Exp Hematol Oncol*. 2019; 8:25.

VENTANA はロシュの登録商標です

Published by

ロシュ・ダイアグノスティックス株式会社

〒108-0075 東京都港区 港南1-2-70

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

☎ 0120-600-152

diagnostics.roche.com
