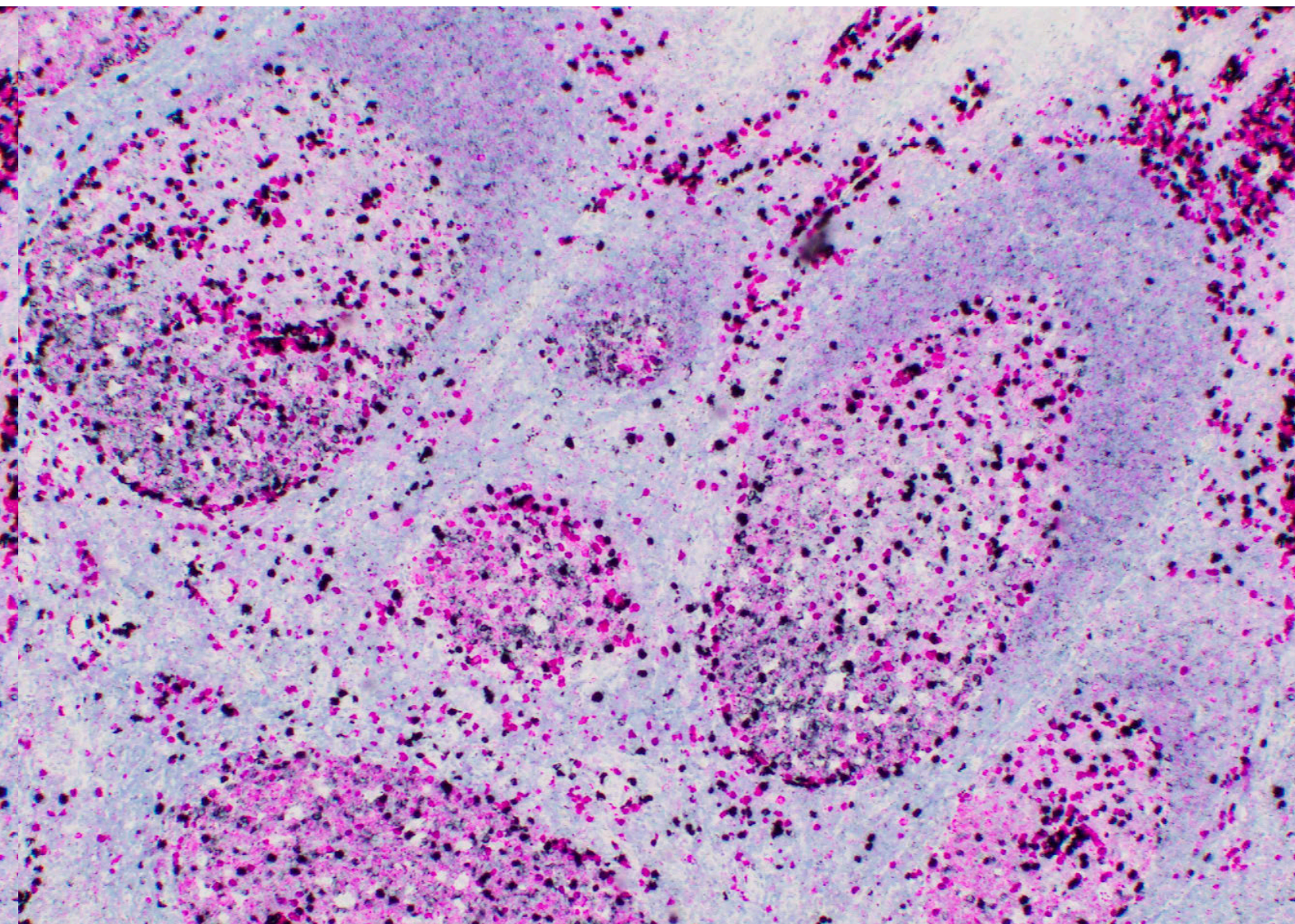


B細胞リンパ腫および形質細胞腫における
ベンタナ Kappa/Lambda DISH mRNA
プローブカクテル 判定ガイド



目次

はじめに	1
使用用途	2
本製品の使用目的	2
本判定ガイドの目的	2
判定方法	3
染色パターンの評価	3
検査フロー	4
スコアリング基準	5
精度管理用コントロール	6
mRNAのIntegrityの評価	7
軽鎖制限のステータス	8
Kappa restricted：低発現	8
Kappa restricted：中等度の発現	9
Kappa restricted：高発現	10
Lambda restricted：低発現	11
Lambda restricted：中等度の発現	12
Lambda restricted：高発現	13
軽鎖制限なし	14
判定に苦慮する症例	15
IGLL-5 Homologyが見られる場合	15
単一細胞においてKappaとLambdaの二重発現がみられる場合	17
単一細胞におけるKappaとLambdaの二重発現のパターン	18
染色性が薄い場合	19
参考文献	20

はじめに

B細胞リンパ腫や形質細胞腫が疑われる症例の診断において、B細胞のクローナリティーを評価することは非常に有用です。現在、B細胞のクローナリティーを判断するための一般的な方法の一つとして、免疫染色によるFFPE標本中のKappa軽鎖およびLambda軽鎖のタンパク質の発現の評価が含まれます。しかしながら、正常なB細胞およびB細胞リンパ腫におけるKappaとLambdaの発現量は分化の段階に大きく依存しており、感度が不十分な従来法では、発現量が少ない症例においてはターゲットmRNAの検出が困難なケースが多く見受けられます。

ベンタナ Kappa/Lambda DISH mRNA プローブカクテル (以後ベンタナ Kappa/Lambda プローブカクテル ; 518-636616) は1枚のFFPE標本上でKappa鎖とLambda鎖の両方のmRNAを高感度に検出することを目的としており、すべての成熟段階におけるB細胞において臨床的な有用性を提供します。

ベンタナ Kappa/Lambda プローブカクテル はベンゾフラザン (BF) およびジゴキシゲニン (DIG) ハプテンで標識された2'-O-メチル オリゴヌクレオチド プローブの混合物であり、それぞれがKappa鎖またはLambda鎖領域のmRNA転写産物の約80塩基を認識します。Lambda軽鎖のmRNAはベンタナ Silver ISH BFキットによって黒色で染色され、一方でKappa軽鎖のmRNAはベンタナ Magenta ISH DIGキットにより赤色に染色されます。軽鎖制限のステータスはKappa/Lambdaシグナル比率を以て評価されます。

使用用途

本製品の使用目的

ベンタナ Kappa/Lambda プローブカクテルの詳しい使用方法については、本製品の添付文書をご覧ください。

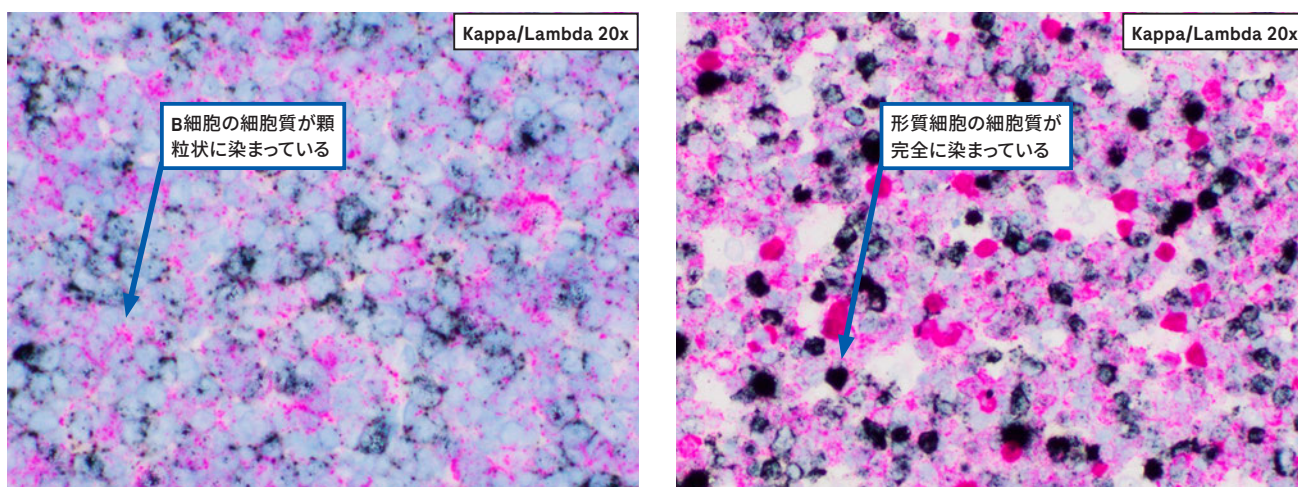
本判定ガイドの目的

- 骨髄およびリンパ組織のホルマリン固定パラフィン包埋標本 (FFPE標本) における本製品の判定方法を解説します。
- 骨髄やリンパ組織標本を本製品で染色した際の染色パターンや染色強度を示す染色画像を提示します。
- 症例画像と共に、判定に苦慮する症例についてのガイダンスを提示します。
- 本アッセイの精度管理に関して、コントロール組織の使用や、ベンタナ U6 BF プローブを用いたmRNAのIntegrityの確認方法を解説します。

判定方法

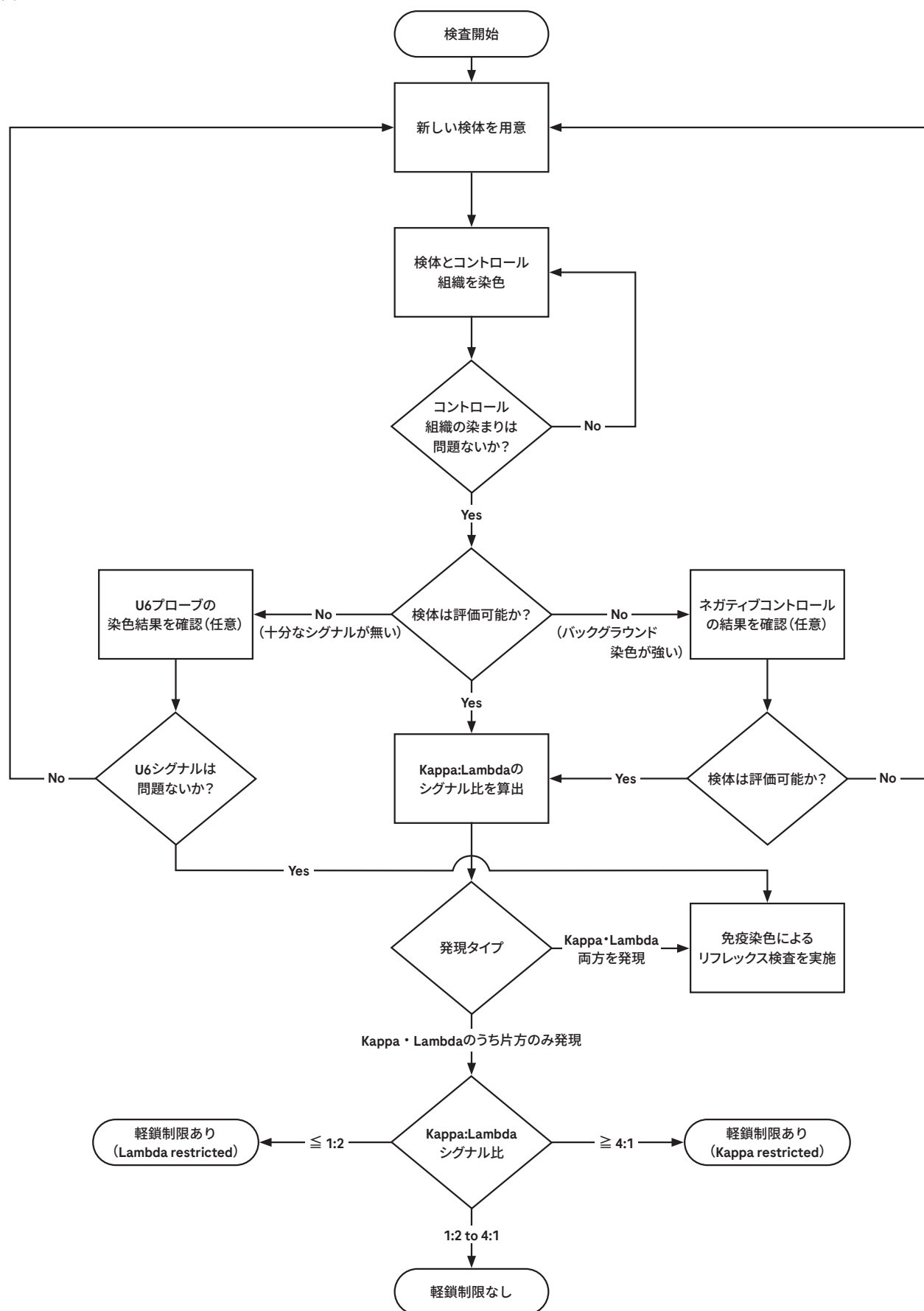
染色パターンの評価

ベンタナ Kappa/Lambda プローブカクテルは、KappaのmRNAを赤色に、LambdaのmRNAを黒色に染色します。B細胞の典型的な染色パターンは、顆粒状の細胞質への染まりで、部分的な染まりから完全なリング状の染まりまで様々です。一方、形質細胞はmRNA量が豊富なため細胞質全体が完全に染色されるのが一般的な染色パターンです。



染色パターン：上記の画像はベンタナ Kappa/Lambda プローブカクテルの染色パターンを示しています。左図ではB細胞の細胞質が顆粒状に染まっており、完全な環状のものや一部が欠けたものがみられます。一方で、右図では形質細胞の細胞質全体が完全に染まっている様子が見られます。

検査フロー



スコアリング基準

軽鎖制限のステータスを評価するために、KappaのmRNAを発現している細胞とLambdaのmRNAを発現している細胞の比率を算出します。正常な免疫応答では、Kappa:Lambdaが2~3:1の割合で産生されます。一方で軽鎖制限が発生していると、どちらか一方の軽鎖が過剰に産生されます。ベンタナ Kappa/Lambda プローブカクテルにおいては、Kappa/Lambda比が4:1以上の場合はKappa restricted、1:2以下の場合はLambda restrictedと解釈されます。(Table 1参照)

ベンタナ Kappa/Lambda プローブカクテルに加えて、「ISH陰性コントロール(統一商品コード：518-111144)」を用いて患者検体を染色することで、検出キット成分に由来するバックグラウンド染色を評価することができます。(ただし、軽鎖制限のステータスを評価する上ではISH陰性コントロール抗体による染色は不要です。)

Table 1：軽鎖制限のステータスを決定するためのスコアリング基準

軽鎖制限のステータス	Kappa:Lambda比
軽鎖制限あり (Kappa restricted)	4:1と同等かそれ以上
軽鎖制限なし	1:2を超えて4:1未満
軽鎖制限あり (Lambda restricted)	1:2と同等かそれ未満

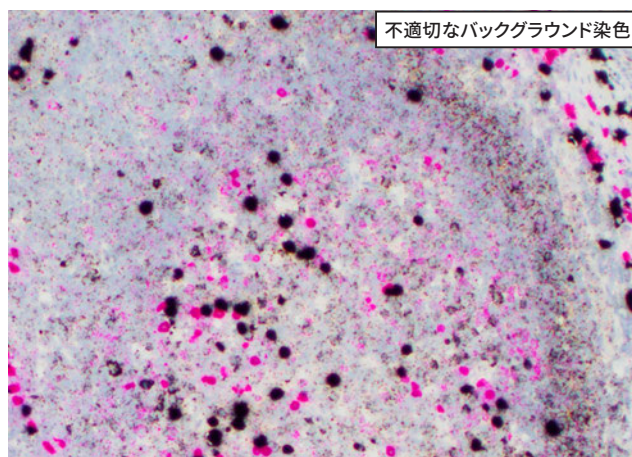
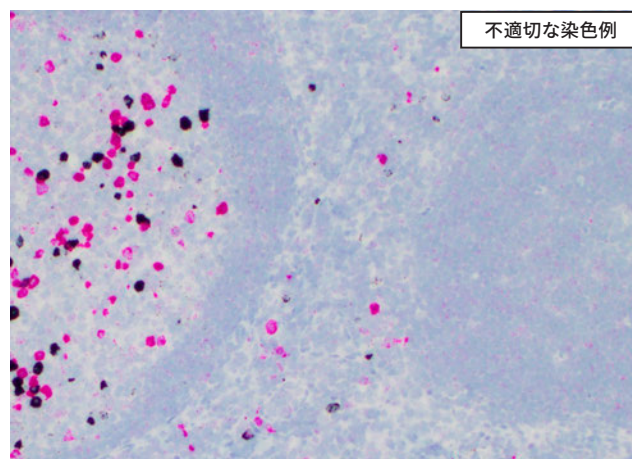
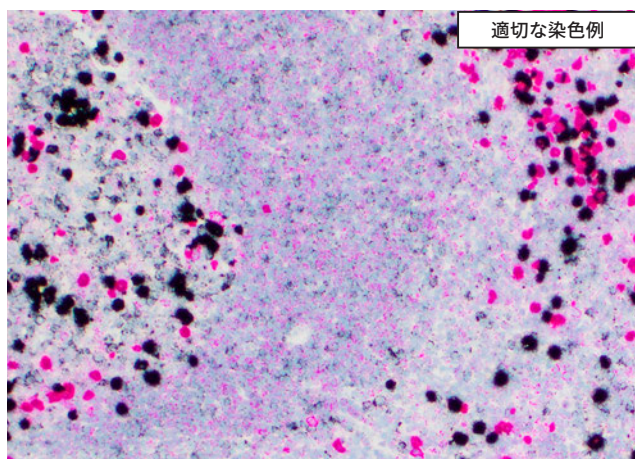
精度管理用コントロール

本染色が問題なく実施されたことを確認するために、患者検体だけでなく、扁桃組織を精度管理用コントロールとして同一スライド上に含めることが推奨されます。正常の扁桃組織であれば、B細胞や形質細胞に対しては陽性、T細胞や間質、扁平上皮細胞に対しては陰性を示すため、ポジティブ・ネガティブ両方を兼ねるコントロールとすることができます。

扁桃組織における適切な染色像として、10x対物レンズで観察した際に、ほぼ全てのMantle zone中の細胞においてKappaとLambda両方のシグナルが明瞭に観察できることが挙げられます。また、間質やB細胞領域外のエリアにおいてバックグラウンド染色が少ないことも適切な染色像の条件の一つです。これらの条件が揃った場合、この扁桃組織はコントロールとして適切だと判断され、ひいては本染色が問題なく機能していたと判断することができます。シグナルが著しく弱い場合や、バックグラウンド染色が強い場合、そのスライドの染色の際に何らかの問題が発生した可能性があります。

Table 2：精度管理用コントロール扁桃組織における判断基準

染色の部位	適切な染色	不適切な染色
陽性部位	10倍の対物レンズで観察した際に、Mantle zoneのほぼ全てのB細胞の細胞質において顆粒状の染色がみられ、Kappa/Lambda比は2:1-3:1程度である	Mantle zoneのほとんどのB細胞においてシグナルが顕著に弱く、20倍の対物レンズでないと観察ができない
陰性部位	間質において染色がみられない、またはごく薄い染色がランダムに散在している	Kappa/Lambda比の算定が困難になる程に扁平上皮細胞や間質へのバックグラウンド染色が強い

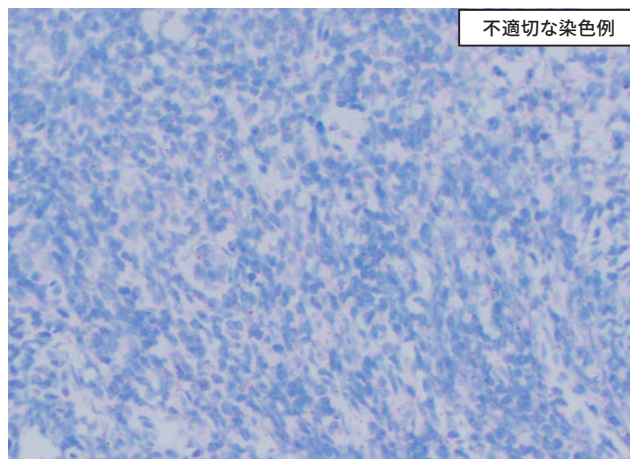
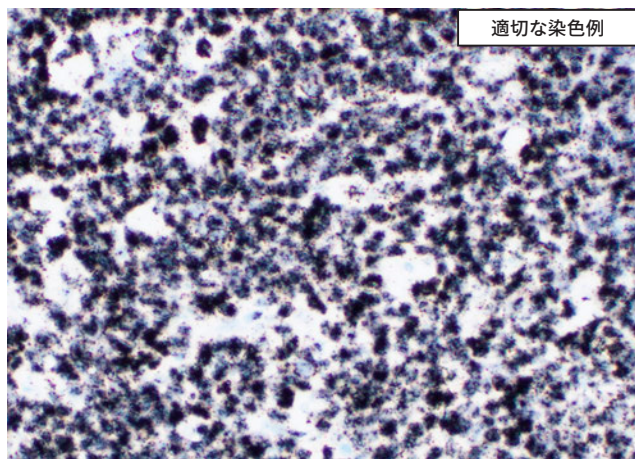


mRNAのIntegrityの評価

検体中のmRNAのIntegrity (完全性) が低下している場合、ベンタナ Kappa/Lambda プローブカクテルの検出の性能が落ちる場合があります。RNAは不安定で分解されやすいため、コビキタスに発現しているU6 snRNA転写産物は、RNAのIntegrityを確認する際に、サロゲートとしてよく使用されます。ベンタナ U6 BF プローブ(統一商品コード：518-636654)は、ベンタナ Silver ISH BF キット(統一商品コード：518-636630)と共に、RNAの分解が進んでいることが疑われる症例において、RNAのIntegrityを確認する用途でご使用頂けます。ベンタナ U6 BF プローブはベンゾフラゾン(BF) 標識の2'-O-メチル オリゴヌクレオチドプローブであり、約80塩基のU6 snRNA転写産物を認識します。U6はベンタナ Silver ISH BFキットによって黒色に染色されます。U6のシグナルが観察可能であれば、その標本においてRNAが完全に分解されてはいないと判断することができます。

Table 3 : U6 mRNAプローブを用いた染色における判断基準

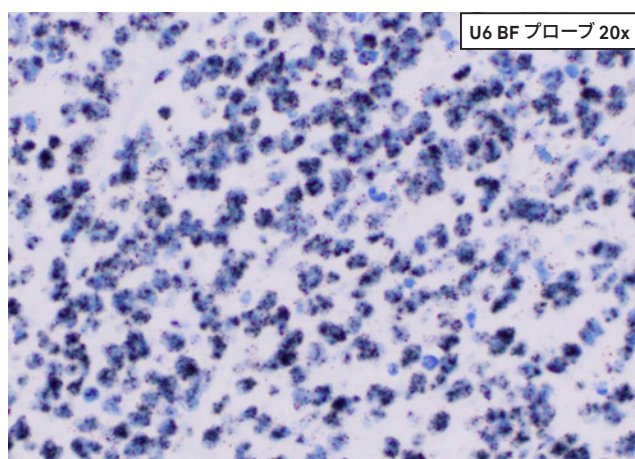
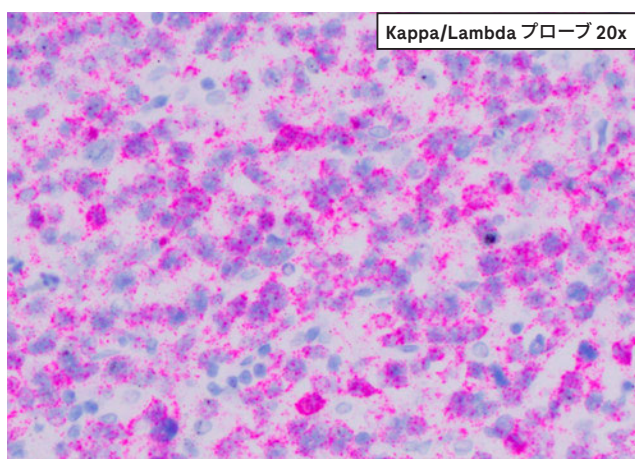
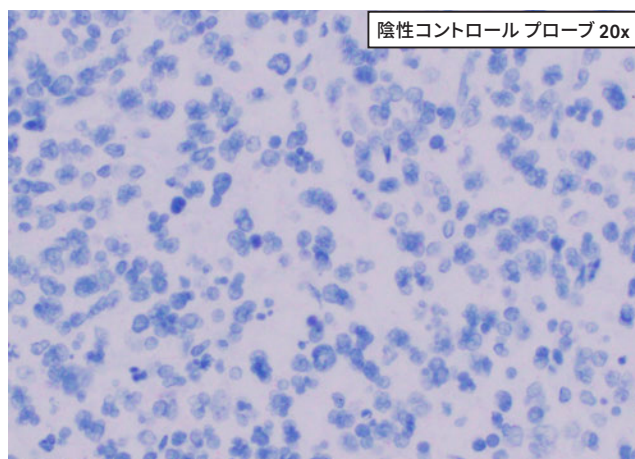
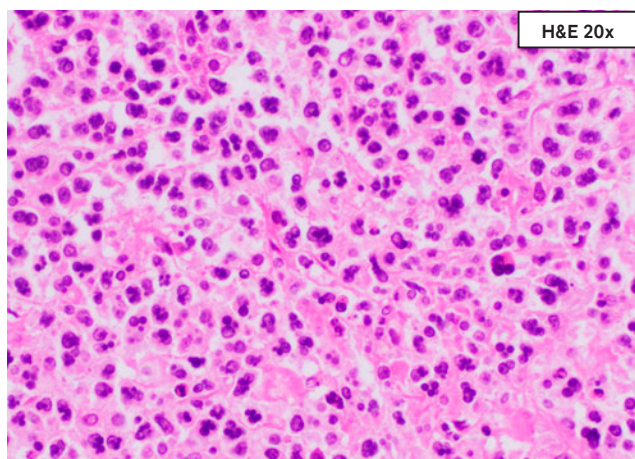
染色の部位	適切な染色	不適切な染色
陽性部位	大半の腫瘍細胞の核においてシグナルが明瞭に観察できる	大半の腫瘍細胞の核においてシグナルが明瞭に観察できない
陰性部位	各細胞の細胞質においてシグナルが認められない、またはごく少ないシグナルが散在性に認められる	各細胞の細胞質において非特異的なバックグラウンド染色が強く、U6プローブによるシグナルの評価が困難



軽鎖制限のステータス

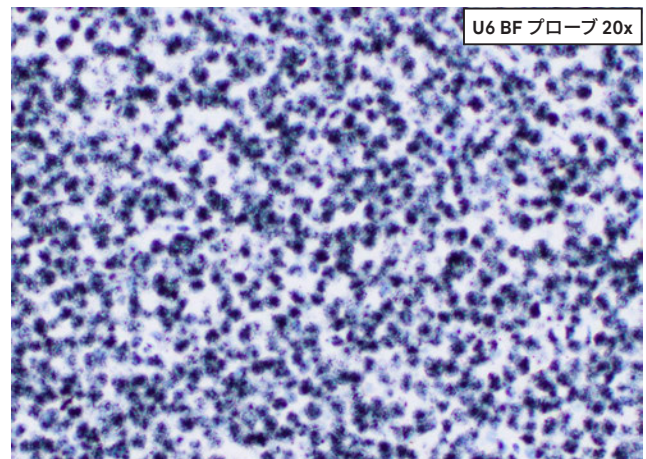
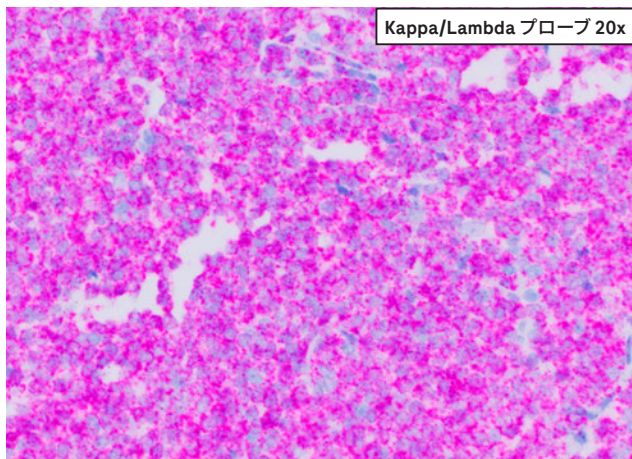
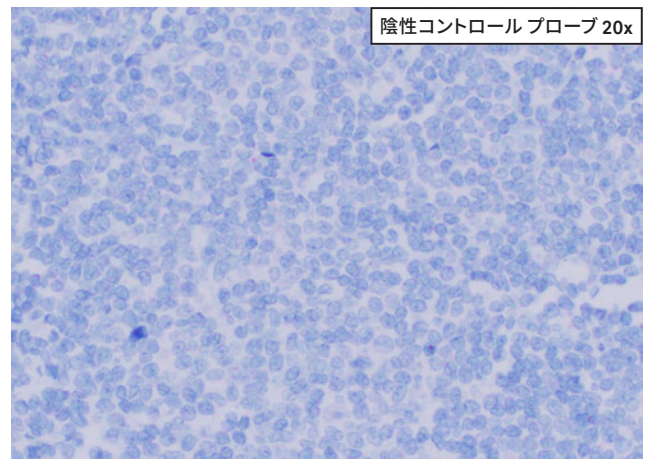
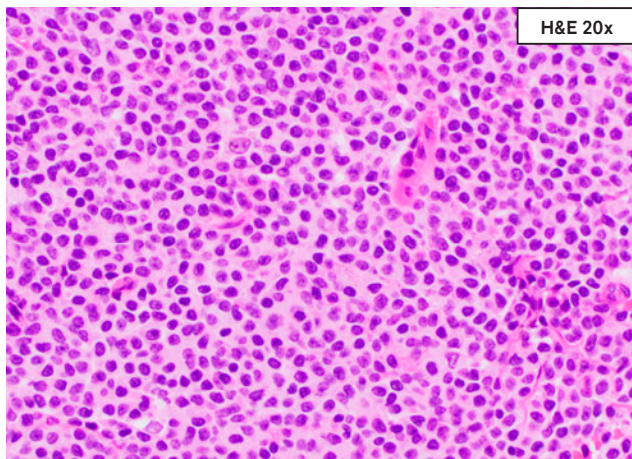
Kappa restricted：低発現

Kappa (赤)：Lambda (黒) 比が4:1以上の場合には、その症例は軽鎖制限あり (Kappa restricted) と判断されます。Kappaを発現している細胞の中でも発現量は様々で、一つの細胞あたりいくつかの赤いシグナルが散在している程度のものであれば、赤いシグナルで細胞全体が染まっているものも認められます。



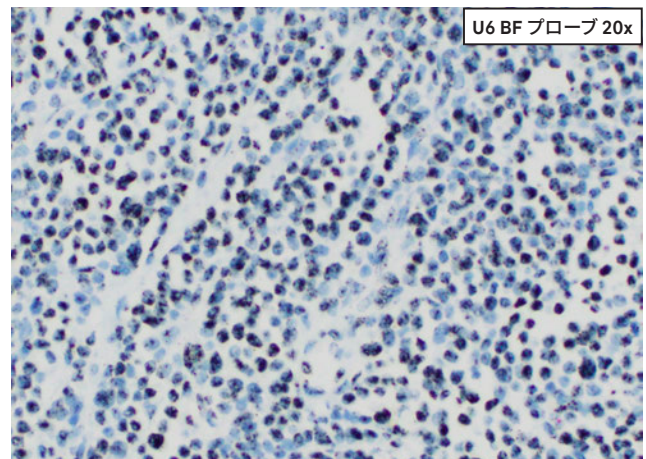
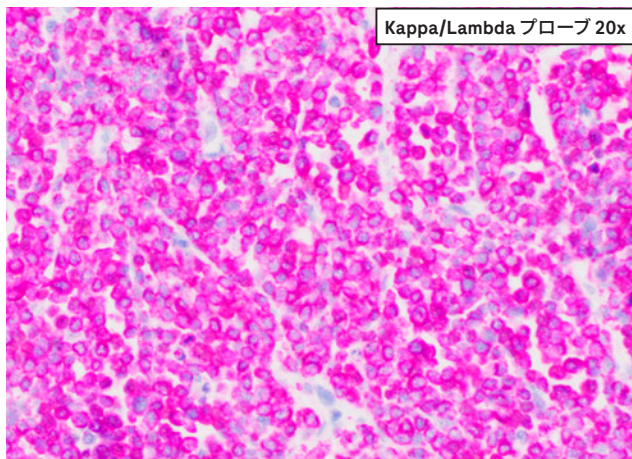
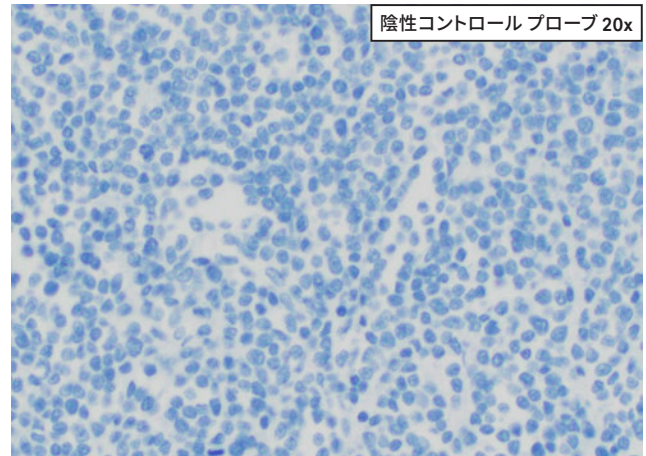
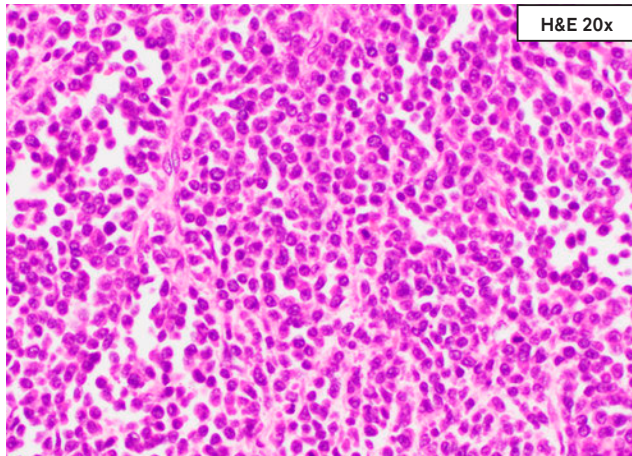
Kappa restricted (低発現)：上記の画像は、びまん性大細胞型B細胞リンパ腫 (DLBCL) 症例です。それぞれの画像は、H&E 染色 (左上)、陰性コントロール プローブによる染色 (右上)、ベンタナ Kappa/Lambda プローブカクテルによる染色 (左下)、ベンタナ U6 BF プローブによる染色 (右下) です。

Kappa restricted : 中等度の発現



Kappa restricted (中等度の発現) : 上記の画像は辺縁帯リンパ腫 (MZL) 症例です。それぞれの画像は、H&E染色 (左上)、陰性コントロール プローブによる染色 (右上)、ベンタナ Kappa/Lambda プローブカクテルによる染色 (左下)、ベンタナ U6 BF プローブによる染色 (右下) です。

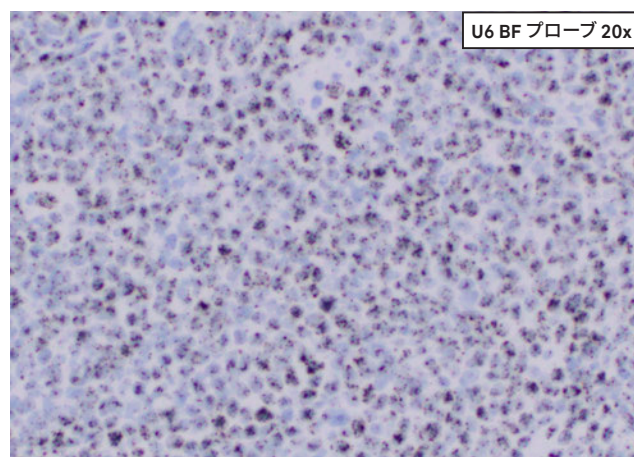
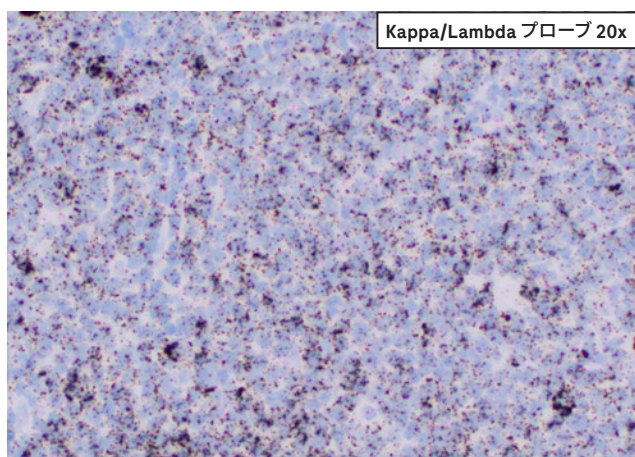
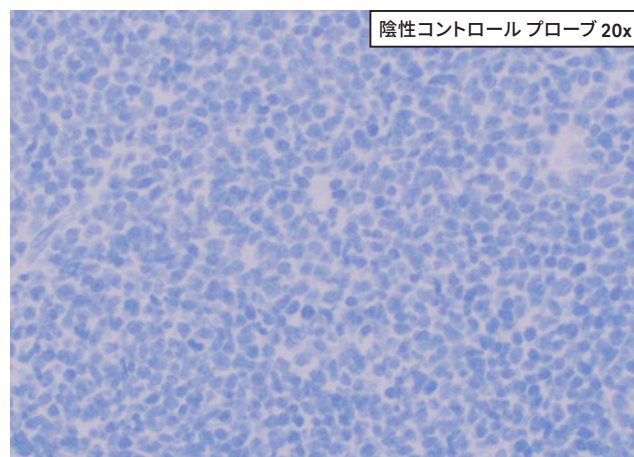
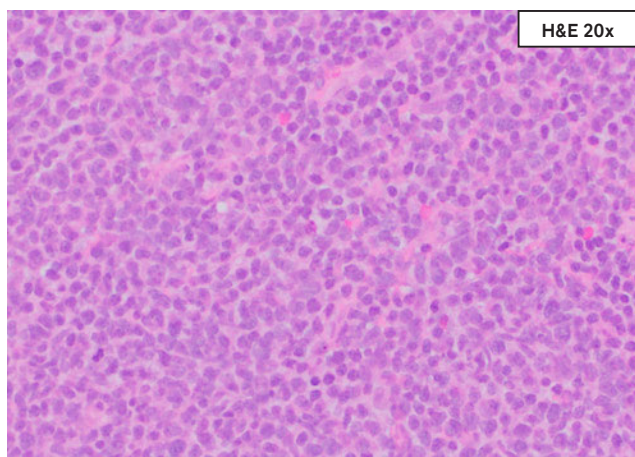
Kappa restricted : 高発現



Kappa restricted (高発現) : 上記の画像は形質細胞腫症例です。それぞれの画像は、H&E染色(左上)、陰性コントロールプローブによる染色(右上)、ベンタナ Kappa/Lambda プローブカクテルによる染色(左下)、ベンタナ U6 BF プローブによる染色(右下)です。

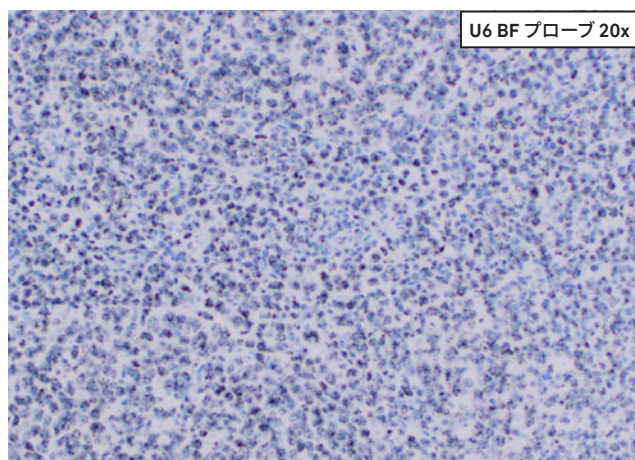
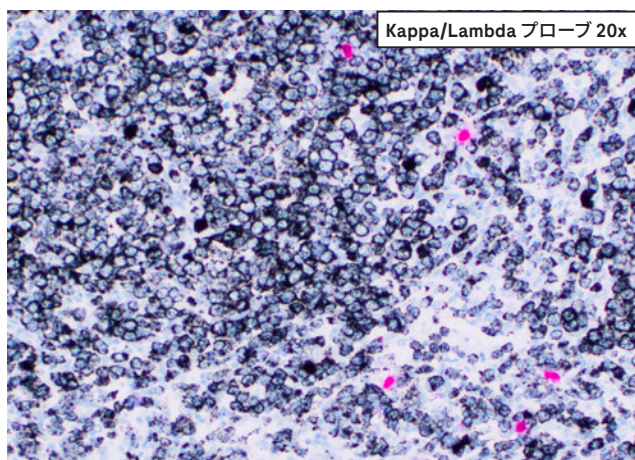
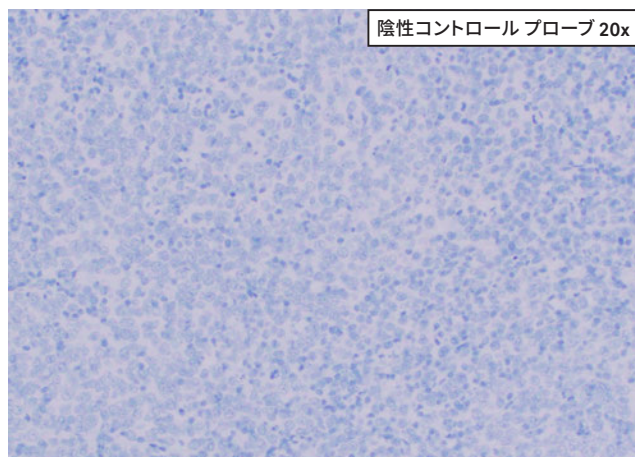
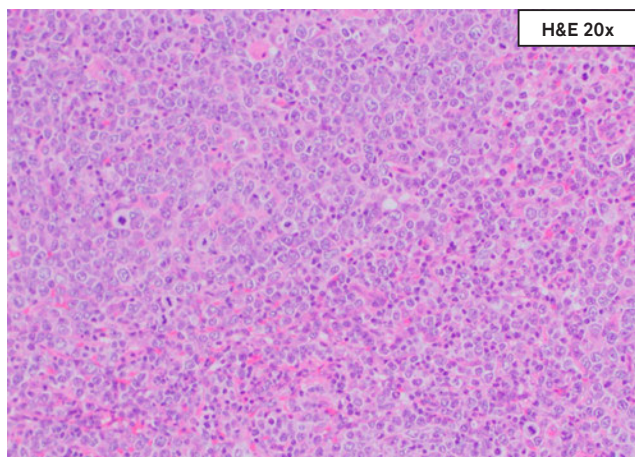
Lambda restricted : 低発現

Kappa (赤) : Lambda (黒) 比が1:2以下の場合には軽鎖制限あり (Lambda restricted) と判断されます。Lambdaを発現している細胞の中でも発現量は様々で、一つの細胞あたりいくつかの黒いシグナルが散在している程度のものであれば、黒いシグナルで細胞全体が染まっているものも認められます。発現レベルに関わらず、このような染色像がみられる細胞はLambda発現細胞と判断されます。



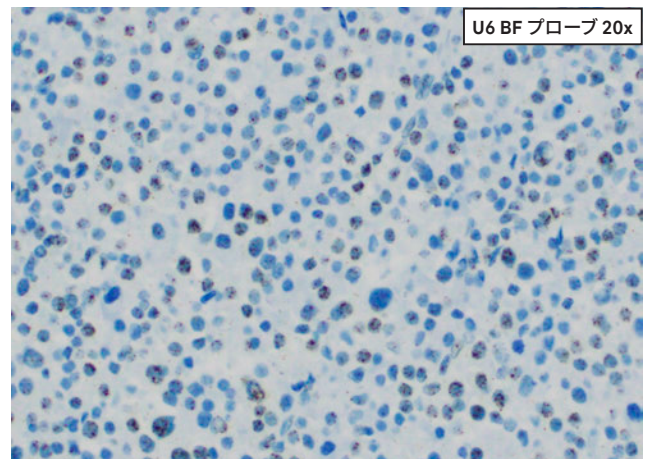
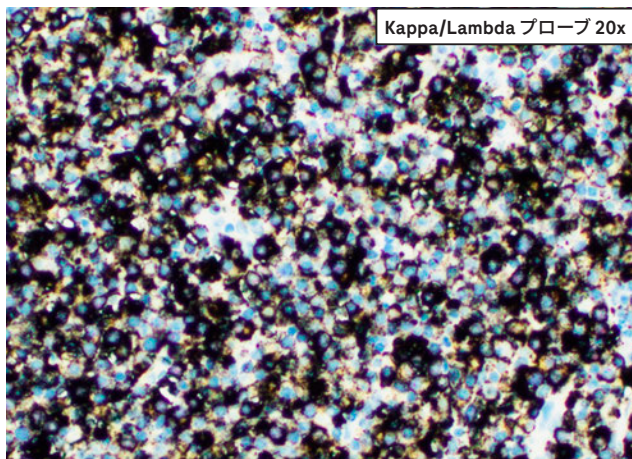
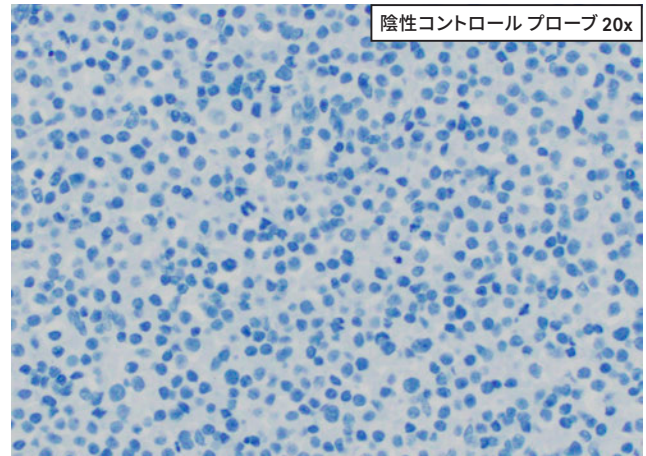
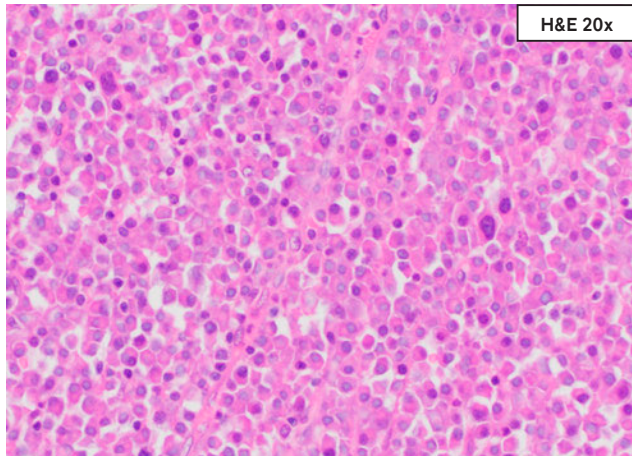
Lambda restricted (低発現) : 上記の画像は濾胞性リンパ腫症例です。それぞれの画像は、H&E染色 (左上)、陰性コントロールプローブによる染色 (右上)、ベンタナ Kappa/Lambda プローブカクテルによる染色 (左下)、ベンタナ U6 BF プローブによる染色 (右下) です。

Lambda restricted : 中等度の発現



Lambda restricted (中等度の発現) : 上記の画像は濾胞性リンパ腫症例です。それぞれの画像は、H&E染色(左上)、陰性コントロールプローブによる染色(右上)、ベンタナ Kappa/Lambda プローブカクテルによる染色(左下)、ベンタナ U6 BF プローブによる染色(右下)です。

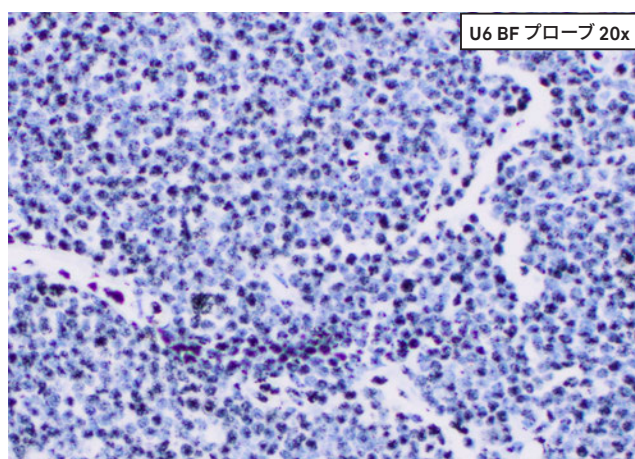
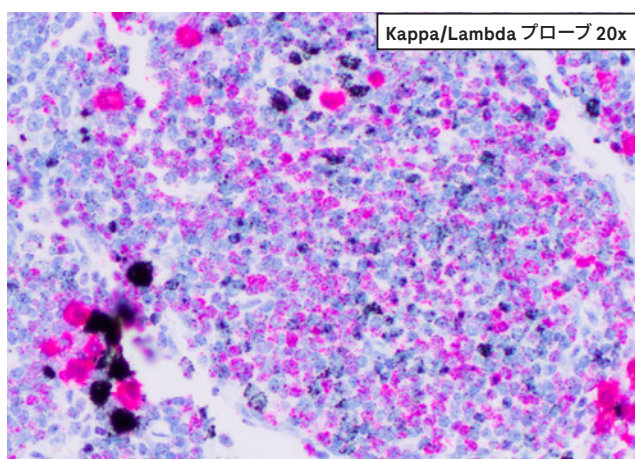
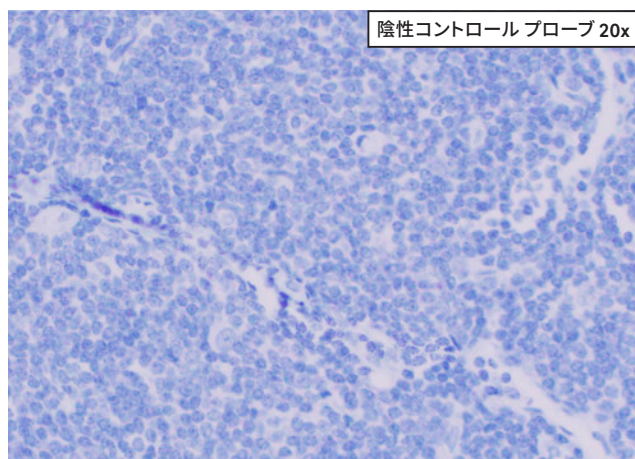
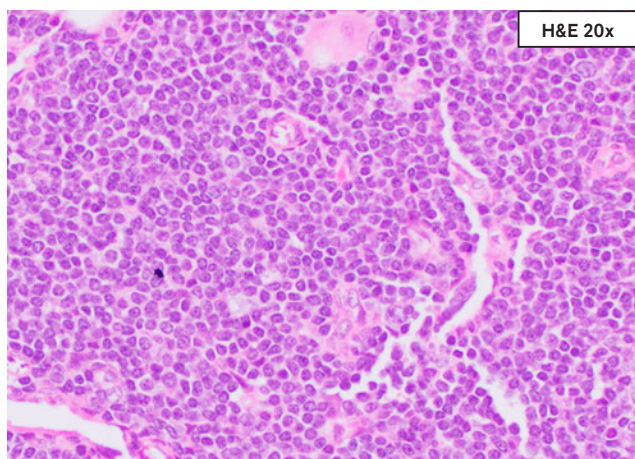
Lambda restricted : 高発現



Lambda restricted (高発現) : 上記の画像は形質細胞腫症例です。それぞれの画像は、H&E染色(左上)、陰性コントロールプローブによる染色(右上)、ベンタナ Kappa/Lambda プローブカクテルによる染色(左下)、ベンタナ U6 BF プローブによる染色(右下)です。

軽鎖制限なし

Kappa (赤) : lambda (黒) 比が1:2を超えて4:1未満の場合、その症例は軽鎖制限なしと判断されます。そのような症例の場合、B細胞および形質細胞において、発現レベルは様々であるものの、正常な比率でKappaとLambdaの両方を発現している様子が認められます。



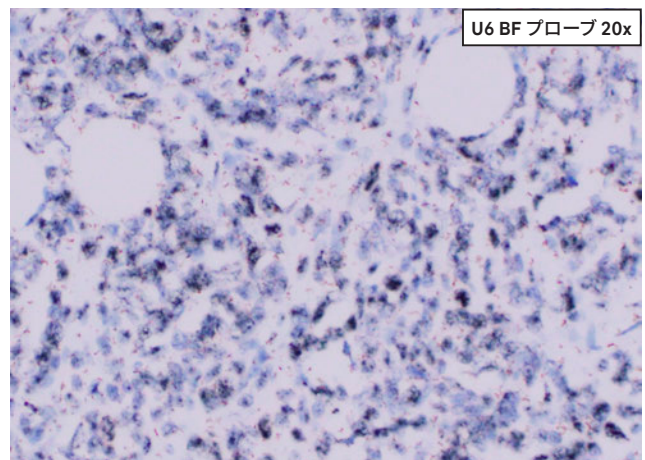
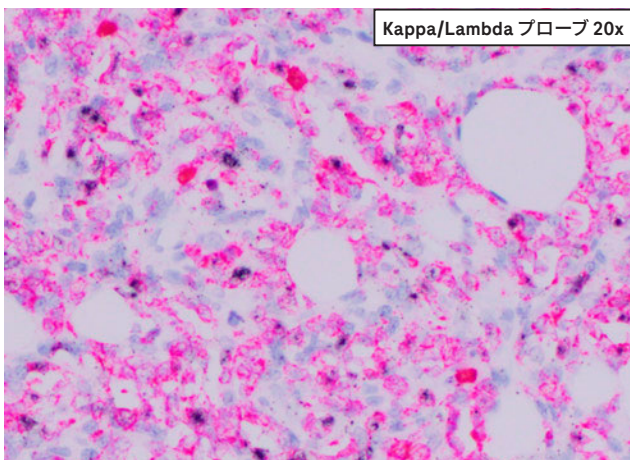
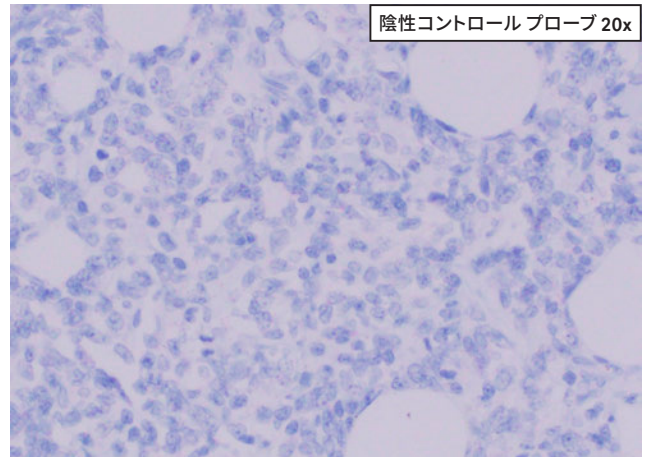
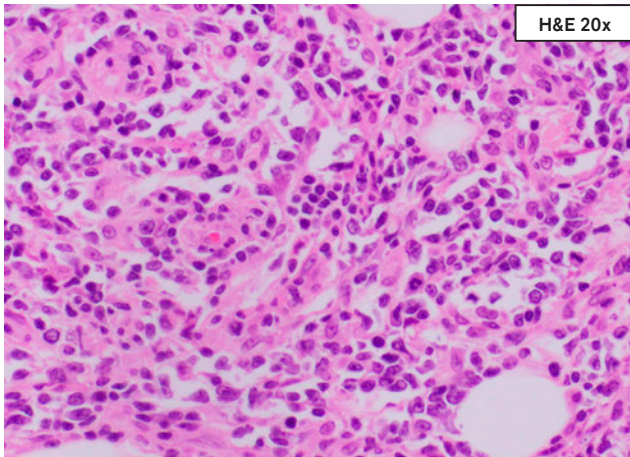
軽鎖制限なし： 上記の画像は反応性リンパ節における染色像を示しています。それぞれの画像は、H&E染色(左上)、陰性コントロール プローブによる染色(右上)、ベンタナ Kappa/Lambda プローブカクテルによる染色(左下)、ベンタナU6 BF プローブによる染色(右下)です。それぞれのB細胞や形質細胞においてmRNA発現量は様々で、またKappa発現細胞とLambda発現細胞が混在している様子が認められます。

判定に苦慮する症例

IGLL-5 Homologyが見られる場合

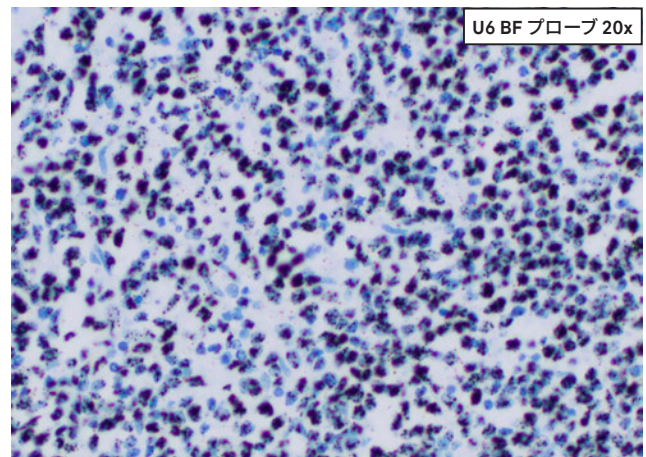
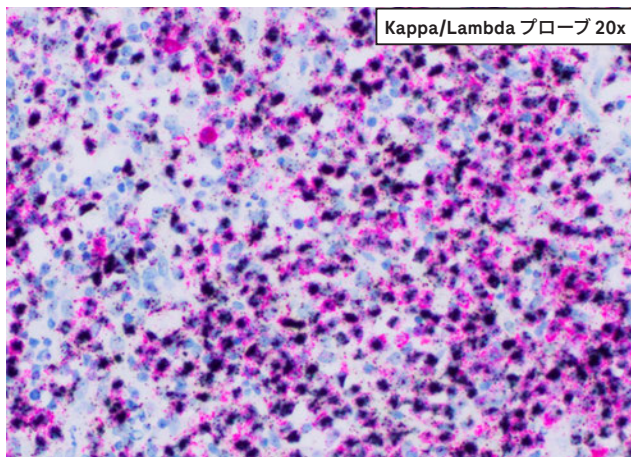
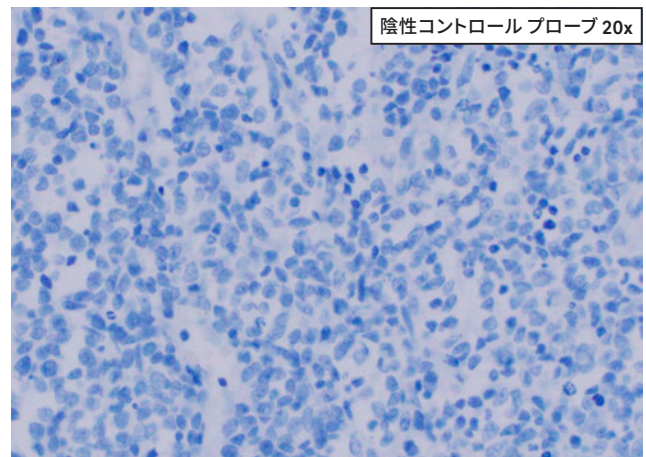
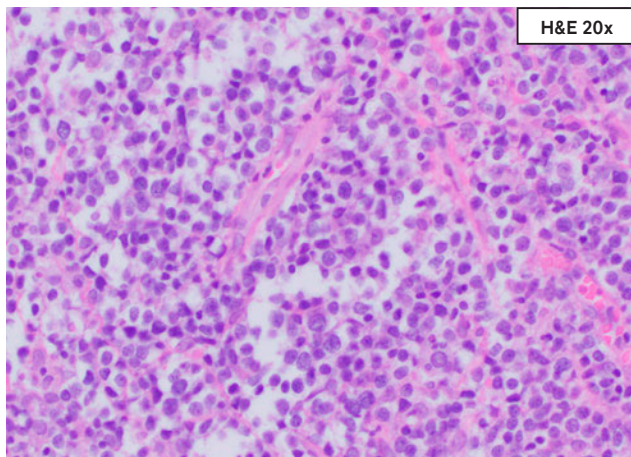
軽鎖制限がみられる症例の約15%において、同一細胞の核と細胞質両方にシグナルがみられる稀な染色パターンを示すことがあります¹。核におけるシグナルは黒い顆粒状、またはクラスター状で、通常のmRNAのシグナルより大きいものが一般的です。このような核における黒いシグナルはLambda プローブがIGLL-5と呼ばれる転写産物に結合した結果生じるものです²。この転写産物はLambda転写産物と100%配列が同じため、本染色においてIGLL-5が検出されてしまうのは不可避です¹。

特にKappa restrictedの症例の判定においては、IGLL-5のオフターゲット染色によって判定が困難になる場合があります。このような症例では、同一細胞上でKappaが細胞質に染まり、IGLL-5が核に染まるためです。このようなオフターゲット染色は症例によってはヘテロジニアスで、一部の細胞のみ染まるケースや、稀に細胞質への染まりを呈することもあります。このような症例の場合、IGLL-5による染色は判定対象外とし、Kappa restrictedと判定する必要があります。IGLL-5による染色を認識し、軽鎖制限なしの染色パターンや、後述する「単一細胞においてKappaとLambdaの二重染色がみられる場合」と区別するようご注意ください。



IGLL-5 (低発現) : 上記の画像はびまん性大細胞型B細胞リンパ腫 (DLBCL) 症例における染色例を示しています。それぞれの画像は、H&E染色 (左上)、陰性コントロール プローブによる染色 (右上)、ベンタナ Kappa/Lambda プローブカクテルによる染色 (左下)、ベンタナ U6 BF プローブによる染色 (右下) です。このDLBCL症例は軽鎖制限が認められ (Kappa restricted)、IGLL-5もわずかに発現している様子がみられます。

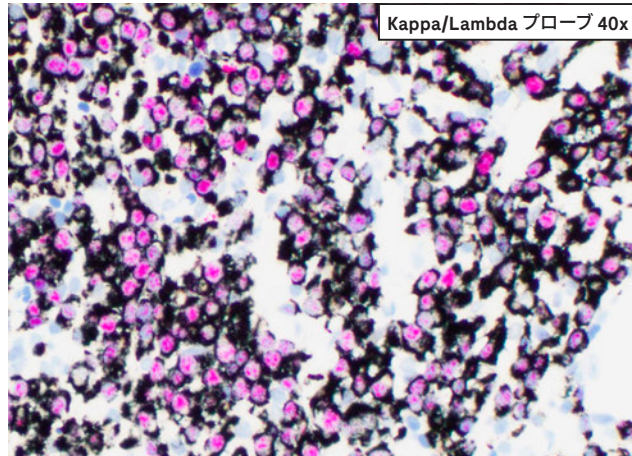
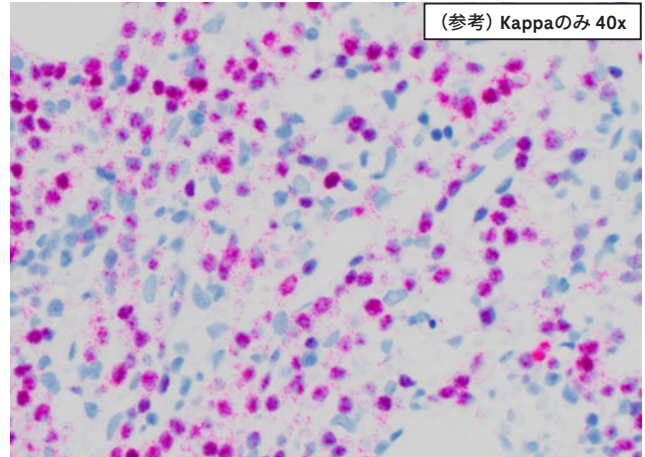
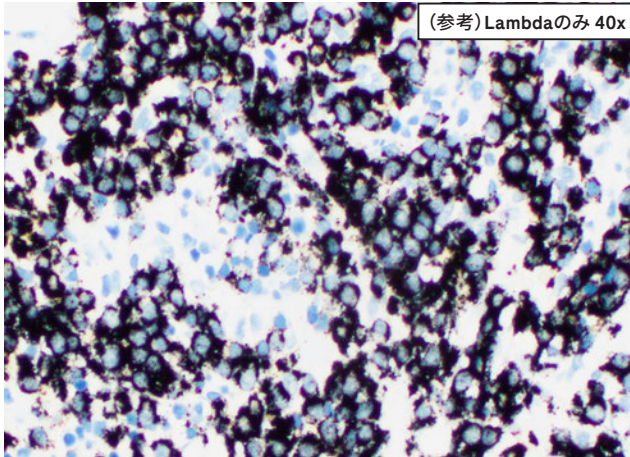
IGLL-5 Homologyが見られる場合



IGLL-5(高発現)：上記の画像は辺縁帯リンパ腫症例の染色例を示しています。それぞれの画像は、H&E染色(左上)、陰性コントロール プローブによる染色(右上)、ベンタナ Kappa/Lambda プローブカクテルによる染色(左下)、ベンタナ U6 BF プローブによる染色(右下)です。こちらの辺縁帯リンパ腫症例は軽鎖制限が認められ(Kappa restricted)、またIGLL-5を高発現している様子が認められます。

単一細胞においてKappaとLambdaの二重発現がみられる場合

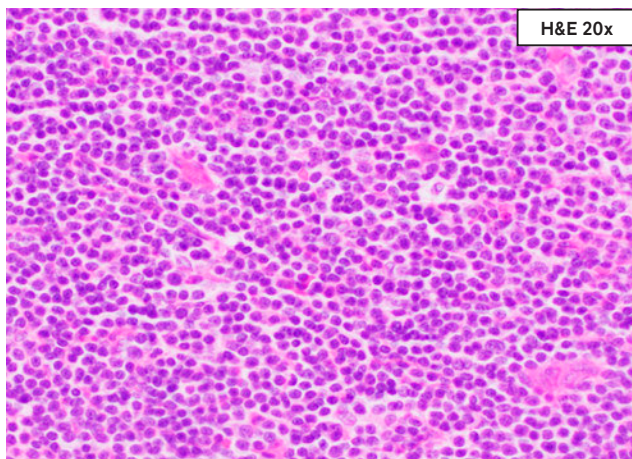
大半のB細胞リンパ腫や形質細胞腫では、各腫瘍細胞においてKappaまたはLambdaのどちらかを発現している染色パターンを示しますが、ごく一部の症例(約5%程)では、同一腫瘍細胞中でKappaとLambda両方のmRNAの発現がみられることがあります。この通常とは異なる染色パターンは、Kappa、Lambdaそれぞれの単染色のアッセイにて確認することができます。以下の下段の二重染色画像例から見て取れる通り、Lambdaが細胞質に、Kappaが核に、発現している染色パターンとなっています。参考として上段のKappaとLambdaの単染色画像で各細胞を見ると、Kappaは核に、Lambdaは細胞質に局在している様子が認められます。(※上段のKappa、Lambdaそれぞれの単染色は製品開発テスト時に製造元で実施されたものです。単染色用プローブは販売されておりませんのでご注意ください。)



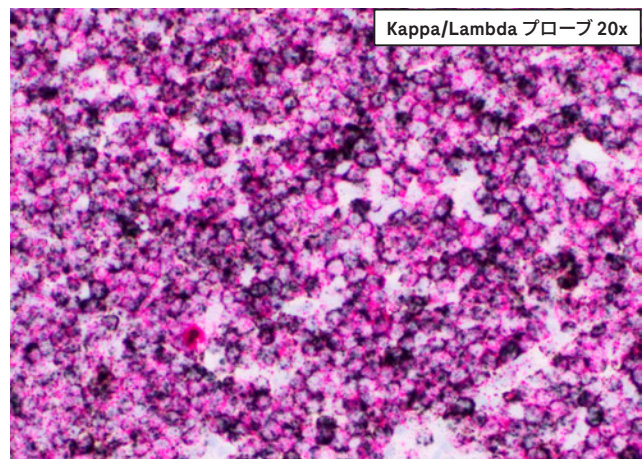
単一細胞におけるKappaとLambdaの二重発現のパターン

KappaとLambdaの二重発現のパターンで最も頻度が高いのが、下記のPattern Aに示されるような、細胞質にKappaとLambdaの両方が発現しているパターンです。これらのケースでは、同一細胞上においてKappaとLambdaで発現レベルに差があり、判定が困難な場合があります。次によくみられる染色パターンとしては、Lambdaが細胞質、Kappaが核に発現するPattern Bです。KappaのDNAとのクロスハイブリダイゼーションの可能性を除外するための研究は限定的にしか進んでいませんが、この核へのシグナルはトラップされたKappa RNAである可能性が示唆されています。

このようなKappaとLambdaの二重発現パターンの重要性は現時点では不明です。このような染色パターンはB細胞リンパ腫のどのサブタイプでも起こりうるもので、形質細胞腫でもみられます。また、タンパク質レベルでも、このような染色パターンと軽鎖制限のステイタスの関係については明らかになっていません。このような症例の場合、現時点では、タンパク質を検出するアッセイを用いて、軽鎖制限のステイタスを判断することが推奨されます。

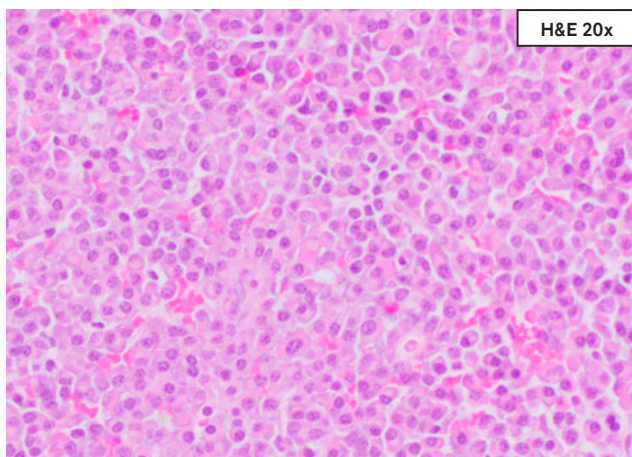


H&E 20x

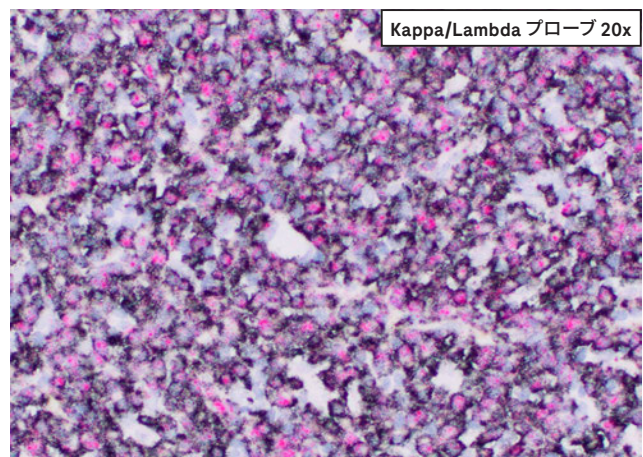


Kappa/Lambda プローブ 20x

二重発現 Pattern A : こちらが最も頻度が高いKappaとLambdaの二重発現パターンです。右画像では二重発現パターンを示しており、左画像では同一症例のH&E染色像を示しています。このパターンでは、細胞質中にKappaとLambda両方のシグナルが観察されることが特徴です。



H&E 20x

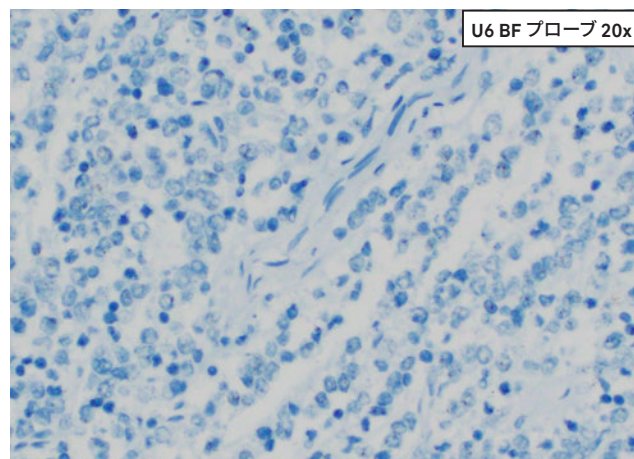
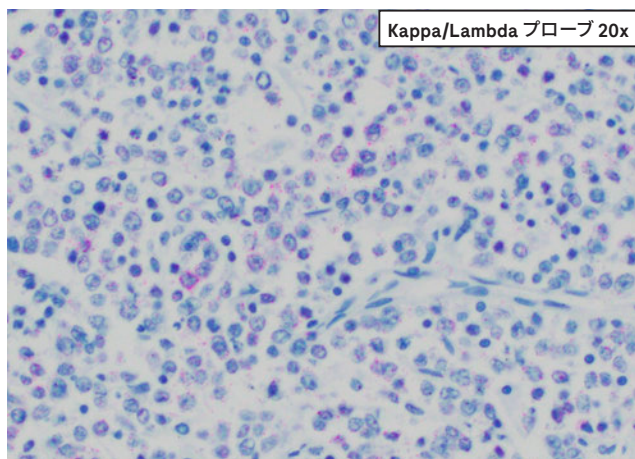


Kappa/Lambda プローブ 20x

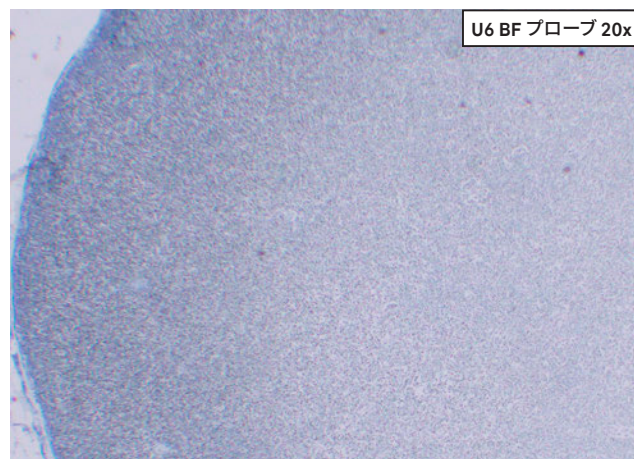
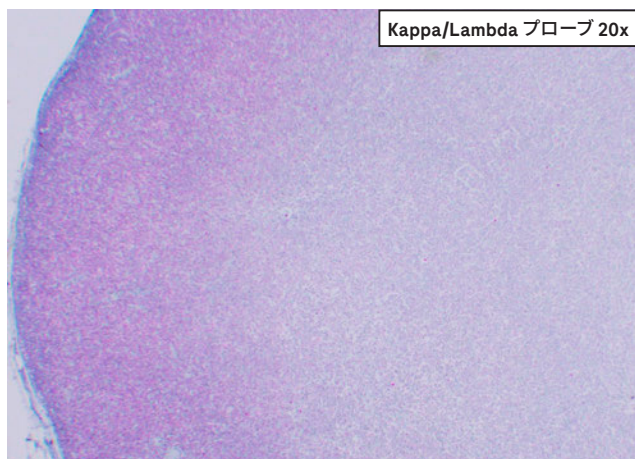
二重発現 Pattern B : こちらはPattern Aに比べると発生頻度が下がります。右画像は二重発現パターンを示し、左画像はH&E染色像を示しています。このパターンでは、Lambdaが細胞質に、Kappaが核に発現していることが特徴です。

染色性が薄い場合

ベンタナ Kappa/Lambda プローブカクテルを用いた染色においては、RNAの分解が進んでいると適切にKappa、LambdaのmRNAが検出できない場合があります。「mRNAのIntegrity評価」のセクションで記載の通り、U6 snRNA 転写産物はその検体におけるRNA integrityを評価する際のサロゲートとして用いることが可能です。ベンタナ Kappa/Lambda プローブカクテルの染色結果が薄く、ベンタナ U6 BF プローブの染色結果も同様である場合、その標本でRNAの分解が進んでいることが示唆されます。



判定に苦慮する症例：左の画像はベンタナ Kappa/Lambda プローブカクテルを用いた染色結果ですが、組織の中央部分において染色強度が減弱している箇所があり、固定不良が疑われます。右の画像は、mRNAのIntegrityを確かめるために、同一症例をベンタナ U6 BF プローブで染色したものです。ベンタナ U6 BF プローブでの染色の方が適切に染まっていないため、mRNAの分解が示唆されます。



判定に苦慮する症例：本症例を見ると、ベンタナ U6 BF プローブを使うことで組織中の固定不良の領域が明確になることがよくわかります。上記の画像では、ベンタナ Kappa/Lambda プローブカクテルとベンタナ U6 BF プローブ共にシグナルが減弱している部位があり、固定不良が示唆されます。mRNAが適切に保持されている部位においてのみ Kappa:Lambda比を算出してください。

参考文献

1. Tubbs RR, Wang H, Wang Z, Minca EC, Portier BP, Gruver AM, Lanigan C, Luo Y, Cook JR, Ma XJ: Ultrasensitive RNA *in situ* hybridization for detection of restricted clonal expression of low-abundance immunoglobulin light chain mRNA in B-cell lymphoproliferative disorders. *Am J Clin Pathol.* 2013, 140: 736-746.
2. Lisa M Rimsza, William A Day, Sarah McGinn, Anne Pedata, Yasodha Natkunam, Roger Warnke, James R Cook, Teresa Marafioti, and Thomas M Grogan. Kappa and lambda light chain mRNA *in situ* hybridization compared to flow cytometry and immunohistochemistry in B-cell lymphomas. *Diagn Pathol.* 2014 Jul 21;9:144. doi: 10.1186/1746-1596-9-144.

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

325040801 A

