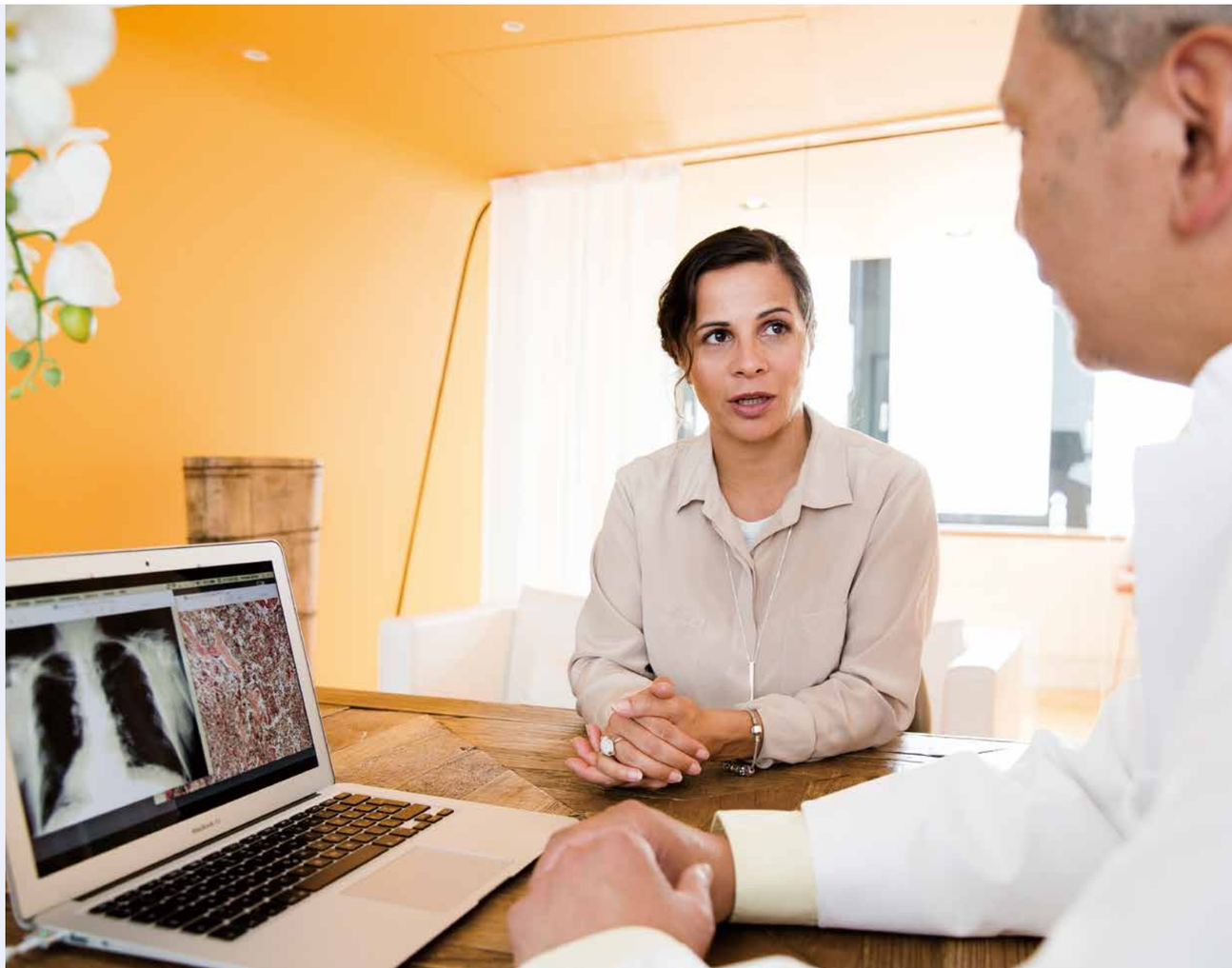
ロシュ・ダイアグノスティックス株式会社
〒108-0075 東京都港区港南1-2-70
http://www.roche-diagnostics.jp
カスタマーソリューションセンター ☎0120-600-152

「VENTANA」は、ロシュ社の登録商標です。

体外診断用医薬品

ベンタナ OptiView PD-L1（SP142）判定ガイド ～ 肺癌編 ～



371062002C

目次

はじめに 2

検査フロー 3

精度管理用コントロールスライドの評価 4

非小細胞肺癌におけるスコアリングガイド 5

判定基準 (非小細胞肺癌) 6

実際の染色例 7

腫瘍細胞 (TC) 染色 8

腫瘍浸潤免疫細胞 (IC) 染色 9

腫瘍細胞 (TC) 染色と腫瘍浸潤免疫細胞 (IC) 染色の鑑別 12

判定方法 14

凝集している腫瘍浸潤免疫細胞 (IC) のスコアリング 15

分散している腫瘍浸潤免疫細胞 (IC) のスコアリング 16

判定上の注意および間違いやすい症例 17

参照画像 20

TC発現 (腫瘍細胞における染まり) 20

IC発現 (免疫細胞における染まり) ー凝集タイプ 21

IC発現 (免疫細胞における染まり) ー散在性タイプ 22

実際の症例 23

判定に注意が必要な症例 32

アーチファクト 36

参考文献 38

はじめに

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

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

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

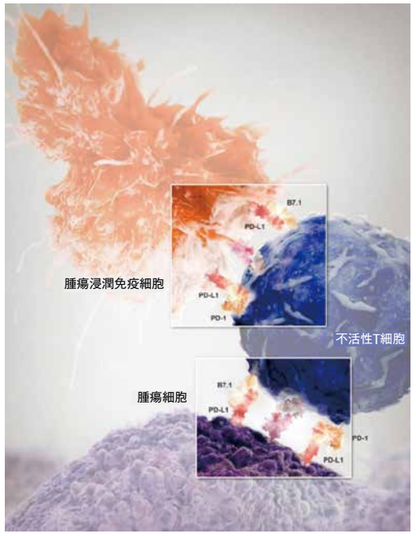


図1　PD-1、PD-L1経路
アテゾリズマブはPD-L1に結合して、PD-L1がPD-1およびB7.1受容体と結合することを妨げる、Fc組換えヒト化モノクローナル抗体です。アテゾリズマブは、非グリコシル化IgG1カッパ免疫グロブリンであり、分子量は145 kDです。

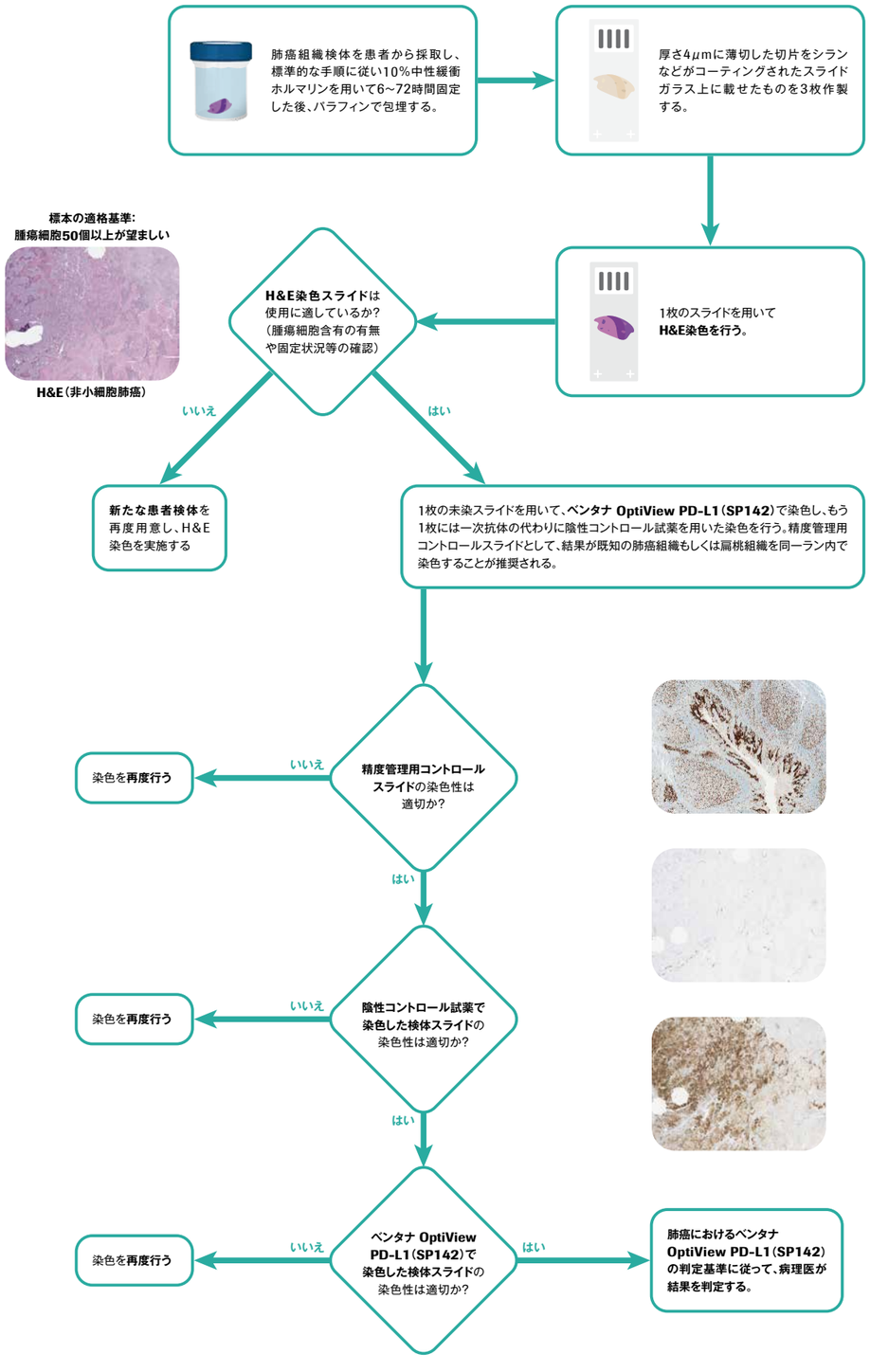
PD-L1 IHC検査

ベンタナ OptiView PD-L1 (SP142) は、抗PD-L1 (クローンSP142) ウサギモノクローナル抗体およびベンタナ OptiView DAB ユニバーサルキット、ベンタナ OptiView 増感試薬を用いて、組織・細胞中のプログラム細胞死リガンド-1 (PD-L1) タンパクを免疫組織化学的に検出します。

ロシュ・ダイアグノスティックス (株) では、自動染色装置であるベンタナ
ベンチマークULTRAやベンタナ ベンチマークGXなどで使用可能な全自動免疫組織化学染色 (IHC) として、ベンタナ PD-L1 (SP142) RxDx (一次抗体)、ベンタナ OptiView DAB ユニバーサルキットおよびベンタナ OptiView 増感試薬から成る“ベンタナ OptiView PD-L1 (SP142)”が体外診断用医薬品として承認されています。本品は、ホルマリン固定パラフィン包埋切片 (FFPE) において組織・細胞中のPD-L1タンパクを検出することを目的としています。ベンタナ OptiView PD-L1 (SP142) により腫瘍細胞および腫瘍浸潤免疫細胞におけるPD-L1タンパク発現の程度を確認することは、テセントリク ® (アテゾリズマブ) の効果予測に有用であることが臨床試験にて示されています。

本品の使用目的等については、ベンタナ OptiView PD-L1 (SP142) の添付文書を参照ください。

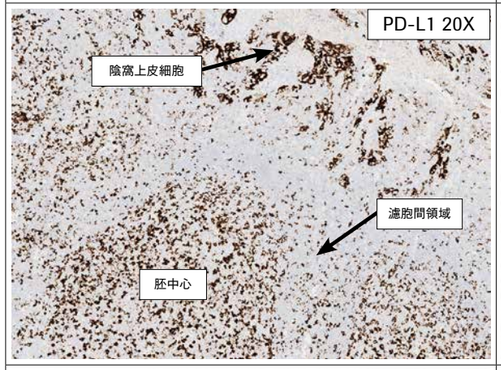
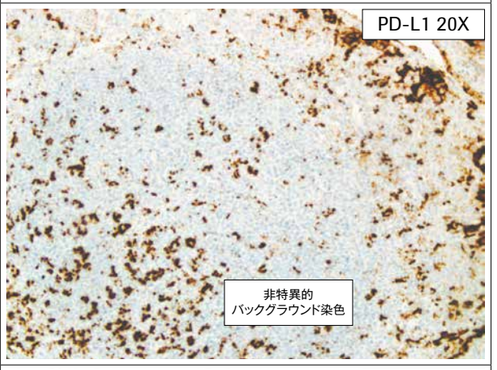
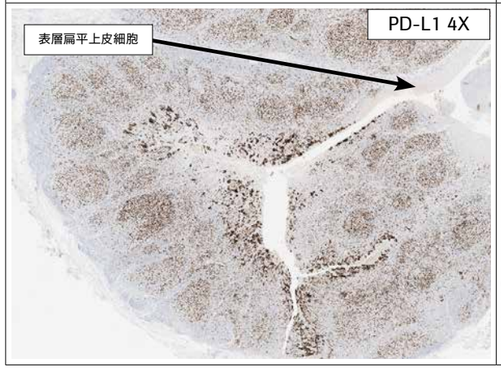
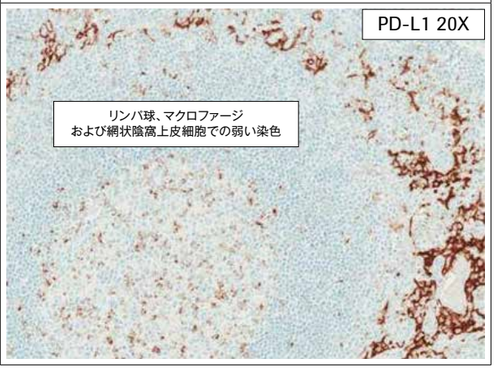
検査フロー



精度管理用コントロールスライドの評価

精度管理用コントロールスライドとして、陽性および陰性に染色される細胞を含んだ扁桃組織、またはPD-L1の発現率が既知である肺癌組織のいずれかの使用が推奨されます。扁桃組織をコントロールスライドとして用いる場合は、患者検体と同様に10%中性緩衝ホルマリン(10% NBF)で固定・処理された扁桃組織の使用が推奨されます。扁桃組織においては、胚中心に存在するリンパ球およびマクロファージが陽性となります。濾胞間領域では、PD-L1陰性細胞の間にPD-L1陽性の免疫細胞が点在します。さらに、網状陰窩上皮細胞にびまん性に陽性となり、表層扁平上皮細胞には染まりません。結果が既知である肺癌組織をコントロールスライドとして用いる場合の評価は、p.6 表2に記載された肺癌における判定基準に従って行ってください。

表1　精度管理用コントロールスライド(扁桃組織)染色結果における判断基準

コントロールとして適切な結果	再染色が必要
・胚中心に存在するリンパ球およびマクロファージに中程度から強い陽性染色が認められる。 ・網状陰窩上皮細胞にびまん性に陽性染色が認められる。	判定の妨げとなるほどの非特異的なバックグラウンド染色が認められる。
・表層扁平上皮細胞に陽性染色が認められない。 ・濾胞間領域において陰性の免疫細胞が認められる(陰性の免疫細胞の間には陽性の免疫細胞が点在する)。	胚中心におけるリンパ球およびマクロファージ、および網状陰窩上皮細胞に、陽性染色を認めない、またはごく弱い陽性染色しか認められない。
	
	

非小細胞肺癌におけるスコアリングガイド

ベンタナ OptiView PD-L1（SP142）による免疫染色（IHC）は、腫瘍細胞や免疫細胞に陽性像を示します。
非小細胞肺癌において、アテゾリスマブの投与判断を行う際には、腫瘍細胞（TC、図2）に加えて、腫瘍浸潤免疫細胞（IC、図3）におけるPD-L1の発現を確認する必要があります。

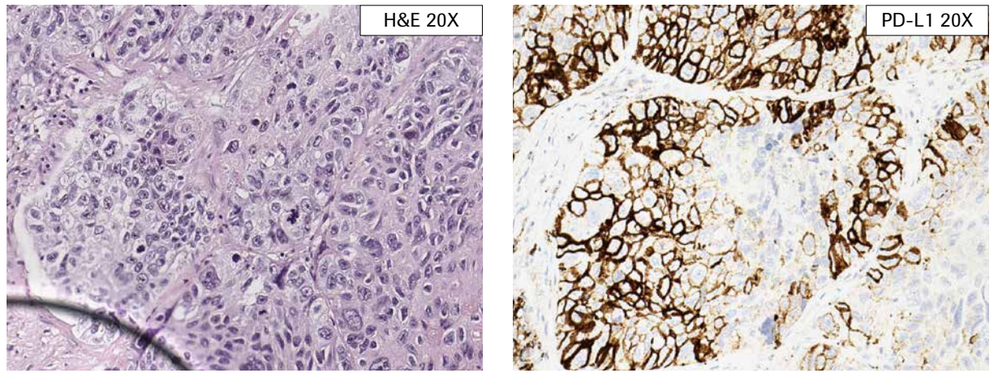


図2　中程度～強陽性の円周状のDAB発色を示す、腫瘍細胞（TC）へのPD-L1発現（NSCLC）

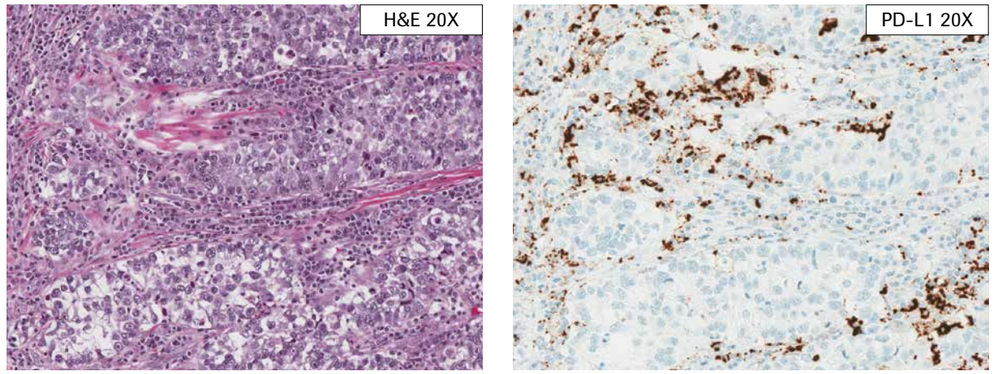


図3　顆粒状および線状のDAB発色を示す、腫瘍浸潤免疫細胞（IC）へのPD-L1発現（NSCLC）

ベンタナ OptiView PD-L1（SP142）の評価

手術検体および生検検体、原発または転移巣のいずれにおいても、ベンタナ OptiView PD-L1（SP142）を評価することが可能です。一方で、細胞診検体または脱灰した骨標本における染色は確立されていません。組織標本の場合、50個以上の腫瘍細胞を含んでいる検体が、ベンタナ OptiView PD-L1（SP142）の評価に適しています。

染色には、各検体から薄切した3枚の連続切片が必要となります。1枚目の切片はH&E用、2枚目は陰性対照の陰性コントロールウサギモノクローナル抗体用を用いて染色、3枚目はベンタナ OptiView PD-L1（SP142）による染色を行います。H&E染色の結果、検体の状態が不適切であると判定された場合は新たな検体を入手し、ベンタナ OptiView PD-L1（SP142）および陰性対照の染色を行う必要があります。

ベンタナ OptiView PD-L1（SP142）を用いて染色した患者検体の評価は病理医により行ってください。

判定基準（非小細胞肺癌）

PD-L1が発現している場合、腫瘍細胞の細胞膜および免疫細胞が茶褐色に染色されます。表2に示す判定基準に従い、ベンタナ OptiView PD-L1（SP142）による染色結果を評価します。腫瘍細胞全体に対して、染色強度にかかわらず細胞膜に茶褐色の染色が認められる腫瘍細胞の割合を算出し、腫瘍細胞におけるPD-L1発現率（TC）を測定します。また、腫瘍領域に対して、染色強度にかかわらず茶褐色の染色が認められる腫瘍浸潤免疫細胞（腫瘍組織内及び腫瘍組織の辺縁部に局在する免疫細胞）の割合を算出し、腫瘍浸潤免疫細胞におけるPD-L1発現率（IC）を測定します。なお、腫瘍領域以外の免疫細胞にもPD-L1陽性となる可能性がありますが、判定対象とはなりません。

表2　PD-L1発現率のスコアリングアルゴリズム（非小細胞肺癌）

腫瘍細胞におけるPD-L1発現率（TC）	スコア
腫瘍細胞全体に対して、染色強度に関係なく、細胞膜にPD-L1による陽性反応が認められる腫瘍細胞の割合が50%以上を占める	TC3
腫瘍細胞全体に対して、染色強度に関係なく、細胞膜にPD-L1による陽性反応が認められる腫瘍細胞の割合が5%以上50%未満を占める	TC2
腫瘍細胞全体に対して、染色強度に関係なく、細胞膜にPD-L1による陽性反応が認められる腫瘍細胞の割合が1%以上5%未満を占める	TC1
腫瘍細胞全体に対して、細胞膜にPD-L1の陽性反応が認められない 又は、染色強度に関係なく、細胞膜にPD-L1による陽性反応が認められる腫瘍細胞が1%未満を占める	TC0
腫瘍浸潤免疫細胞におけるPD-L1発現率（IC）	**スコア**
腫瘍領域※に対して、染色強度に関係なく、PD-L1による陽性反応が認められる腫瘍浸潤免疫細胞の割合が10%以上を占める	IC3
腫瘍領域※に対して、染色強度に関係なく、PD-L1による陽性反応が認められる腫瘍浸潤免疫細胞の割合が5%以上10%未満を占める	IC2
腫瘍領域※に対して、染色強度に関係なく、PD-L1による陽性反応が認められる腫瘍浸潤免疫細胞の割合が1%以上5%未満を占める	IC1
腫瘍領域※に対して、PD-L1の陽性反応が認められない 又は、染色強度に関係なく、PD-L1による陽性反応が認められる腫瘍浸潤免疫細胞が1%未満を占める	IC0

※腫瘍領域:壊死していない腫瘍細胞および腫瘍細胞間に存在する腫瘍内間質と腫瘍の周囲に存在する腫瘍周囲間質により占められている領域を指します。断片化した組織検体（生検を含む）において、腫瘍内間質や腫瘍周囲間質の判断が難しい場合、個々の腫瘍巣に隣接する間質のみを腫瘍領域として含めます。

表3　アテゾリズマブ投与基準（化学療法未治療の非小細胞肺癌）

対象患者	投与基準
化学療法未治療の非小細胞肺癌	表2のスコアリングアルゴリズムを用いてPD-L1発現率を測定した際にTC3又はIC3と判定される

実際の染色例

本資材は肺癌を対象としたスコアリングガイドとなり、染色写真は扁平上皮癌、非扁平上皮癌の両組織型が含まれています。
本キットの使用目的は添付文書を参照ください。

腫瘍細胞 (TC) 染色

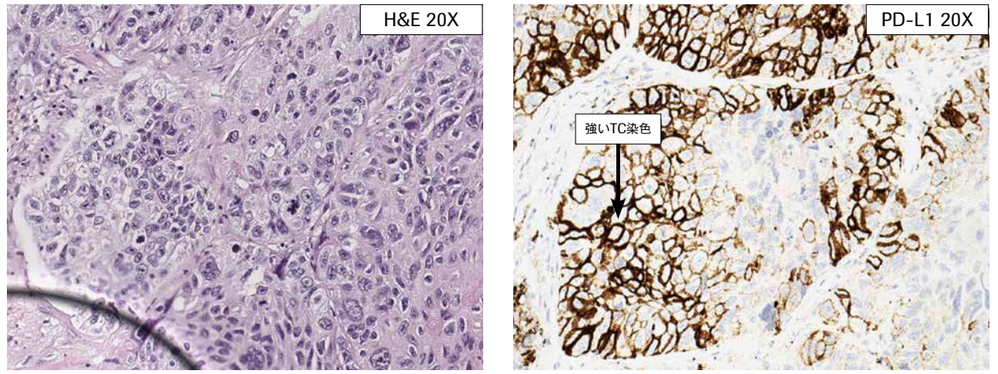


図4　腫瘍細胞 (TC) への染色は、全周性または不完全な円周状の、中程度から強い膜染色 (細胞質への染まりを伴う場合もある) を示すことが多い。

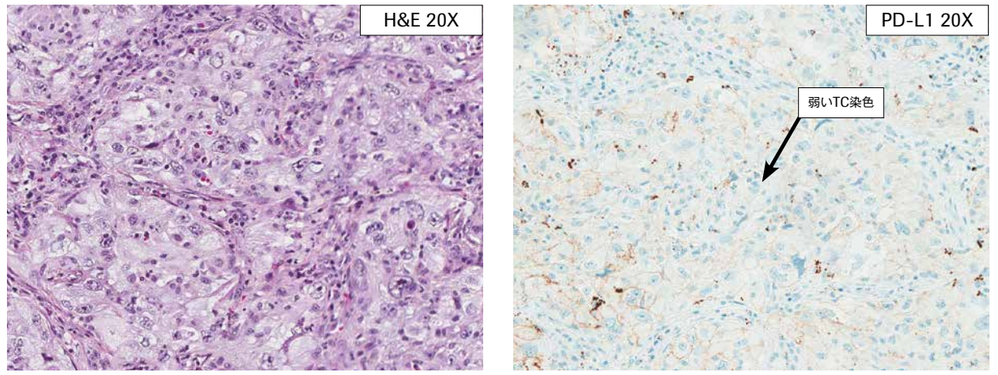


図5　腫瘍細胞 (TC) に弱い膜染色が観察されることがあるため、高倍率での観察を必要とする。

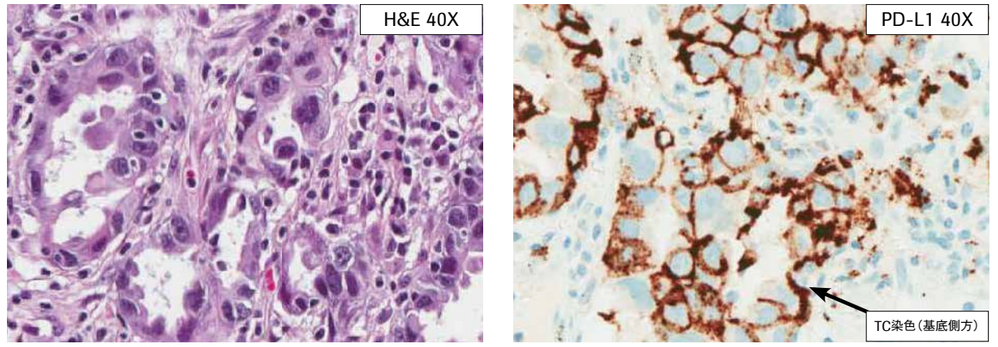


図6　腺癌においては、基底側方の膜染色が観察されることがある。

腫瘍浸潤免疫細胞（IC）染色

腫瘍浸潤免疫細胞（IC）は、腫瘍内の間質および腫瘍に隣接する腫瘍周囲間質に存在する免疫細胞を指します。ベンタナ OptiView PD-L1（SP142）染色は、様々な免疫細胞に染まります。多くはリンパ球、マクロファージ、樹状細胞で、まれに顆粒球へも染まります。

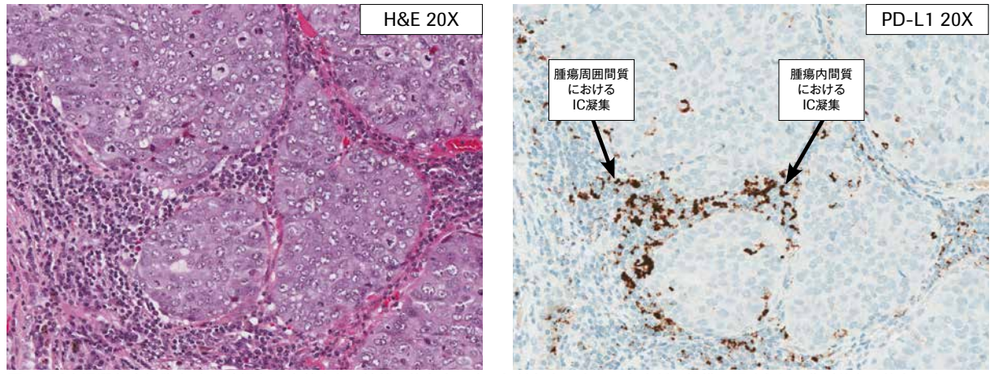


図7　腫瘍浸潤免疫細胞（IC）は暗褐色の点状または線状の染色を示すことが多く、これはほとんどの組織に認められる典型的なIC染色パターンである。IC染色は、腫瘍内間質および腫瘍周囲間質（腫瘍-間質の境界部）またはその両方の場所において凝集した状態で認められることが多い。

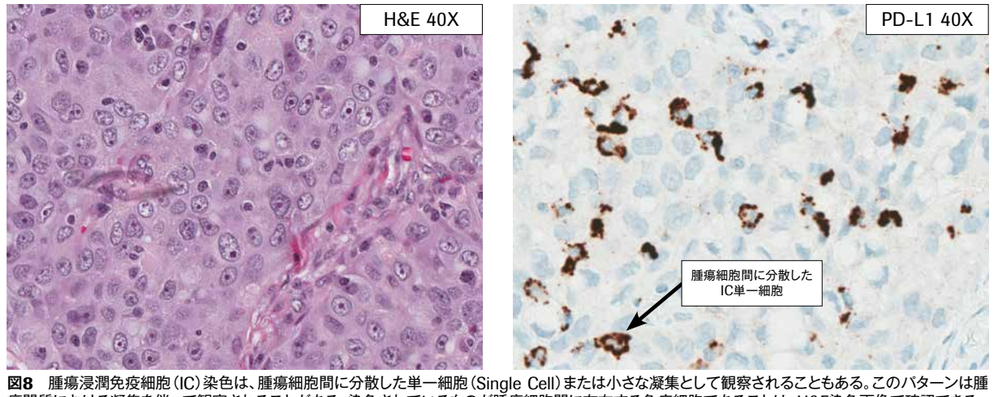


図8　腫瘍浸潤免疫細胞（IC）染色は、腫瘍細胞間に分散した単一細胞（Single Cell）または小さな凝集として観察されることもある。このパターンは腫瘍間質における凝集を伴って観察されることがある。染色されているものが腫瘍細胞間に存在する免疫細胞であることは、H&E染色画像で確認できる。

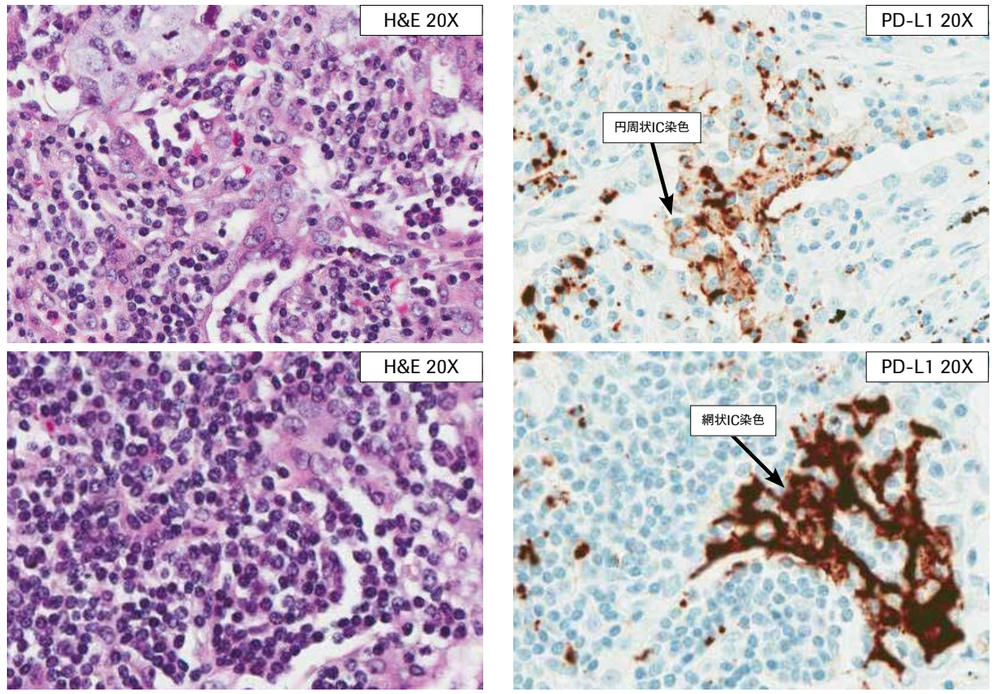
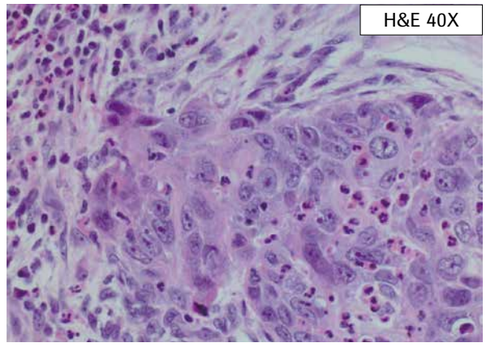


図9　細胞膜への円周状の染色や網状の染色パターンが、マクロファージや樹状細胞といったICで観察されることがある。



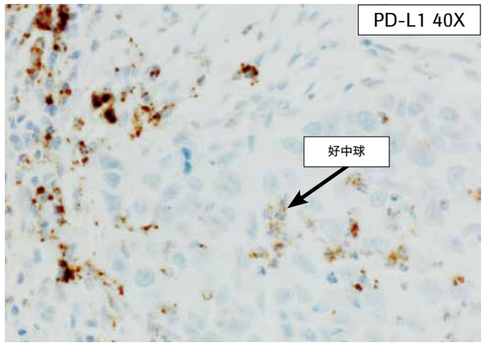
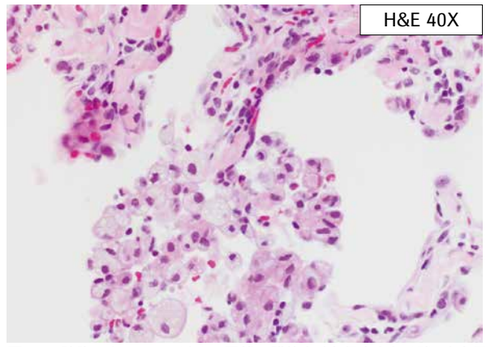


図10　まれに、IC染色は好中球における細かい点状の染色として、びまん性の顆粒状染色と一緒に観察されることがある。



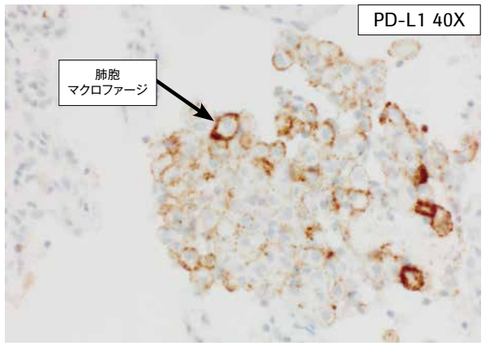
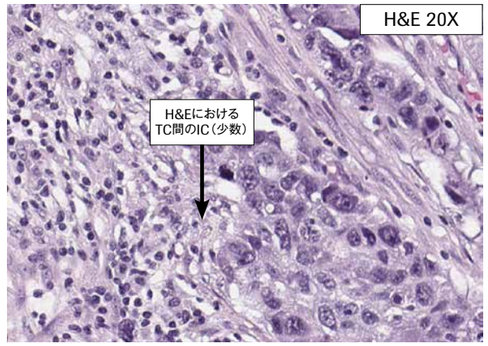


図11　肺胞マクロファージは円周状の膜染色（中程度または強い）を呈することがある。腫瘍細胞との鑑別には、対応するH&E染色スライドを確認することが有用である。

腫瘍細胞（TC）染色と腫瘍浸潤免疫細胞（IC）染色の鑑別

TC染色はIC染色を伴って認められることがあります。H&E染色スライドを観察することは、PD-L1染色スライドを高倍率で観察することと併せて、TCの中からICを鑑別するために有用です。以下の画像（**図12～14**）では、日常診療で遭遇しえる、TC染色とIC染色が同時に観察されるいくつかのパターンを紹介しています。



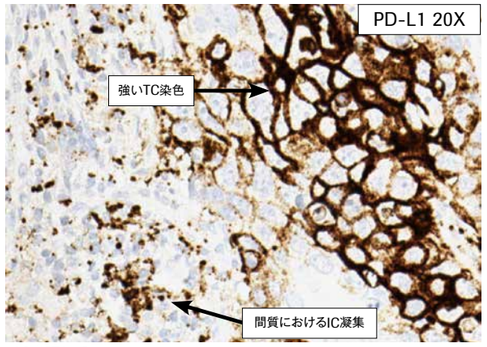
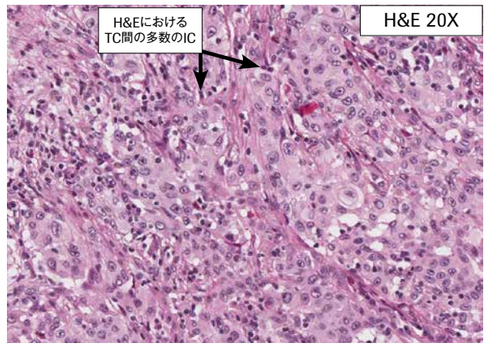


図12　TCは細胞膜への強い染色性を示し、H&Eでは腫瘍細胞間に数少ないICを認める。



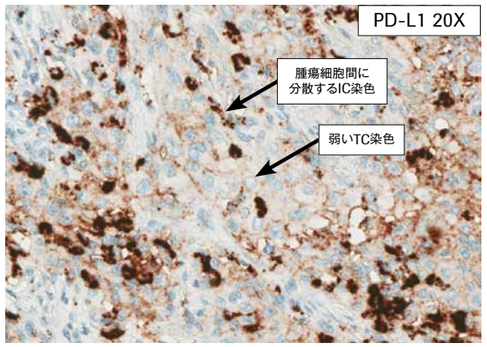


図13　TCは細胞膜への弱～中程度の染色性を示し、H&EではTC間に多数のICを認める。TCの間に強い点状のIC染色が存在することに注意が必要。

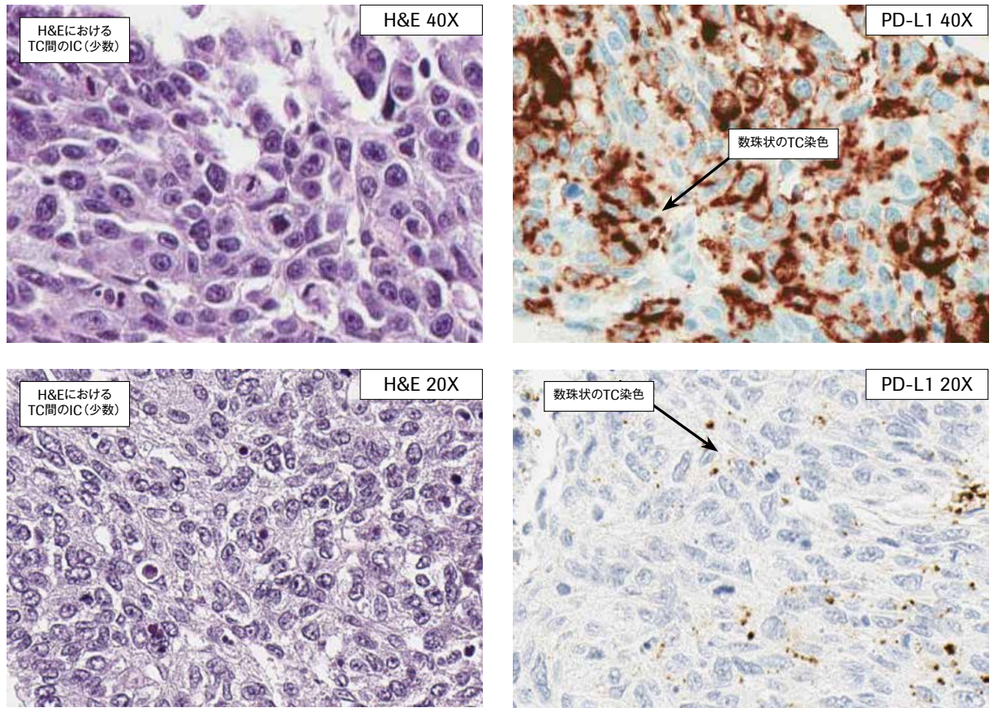


図14　H&E染色スライドにおいて多くのICが確認されず、PD-L1染色スライドにおいてTC間に顆粒状または数珠状の染色パターンが観察される場合、この染色はICではなくTCへの染色とみなすべきである。

判定方法

ベンタナ OptiView PD-L1（SP142）で染色した肺癌組織を、p.6 表2の判定基準を用いてTCおよびIC染色の両方について評価します。

- **腫瘍細胞（TC）のスコアリング：**腫瘍細胞全体に対して、**染色強度にかかわらず細胞膜に茶褐色の染色が認められる腫瘍細胞の割合**を算出し、腫瘍細胞におけるPD-L1発現率（TC）を測定します。細胞膜への染色は、顆粒状または数珠状のものであっても判定対象となりますが、腫瘍細胞の形に沿った曲線状の染色として見えることが必要です。細胞質染色は膜染色と一緒に観察されることがありますが、判定対象とはなりません。

- **腫瘍浸潤免疫細胞（IC）のスコアリング：**腫瘍領域に対して、染色強度にかかわらず茶褐色の染色が認められる腫瘍浸潤免疫細胞（腫瘍組織内及び腫瘍組織の辺縁部に局在する免疫細胞）の割合を算出し、腫瘍浸潤免疫細胞におけるPD-L1発現率（IC）を測定します。なお、腫瘍領域以外の免疫細胞にもPD-L1陽性となる可能性がありますが、判定対象とはなりません。

  - **腫瘍領域：**ベンタナ OptiView PD-L1（SP142）の判定対象となる“腫瘍領域”は、壊死していない**腫瘍細胞**および腫瘍細胞間に存在する**腫瘍内間質**と腫瘍の周囲に存在する間質（**腫瘍周囲間質**）により占められている領域と定義されます。壊死部は、腫瘍領域から除外してください。
  - 断片化した組織検体（生検を含む）において、腫瘍内間質や腫瘍周囲間質の判断が難しい場合、個々の腫瘍巣に隣接する間質のみを腫瘍領域として含めます。腫瘍細胞に隣接していない間質は除外してください。

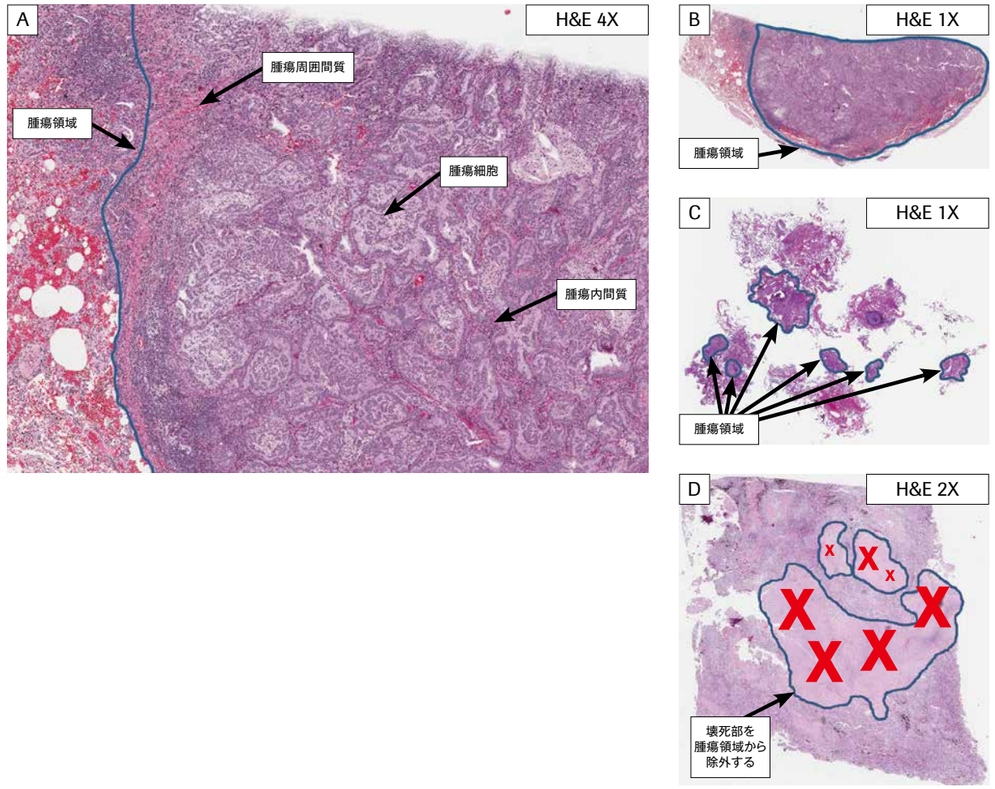
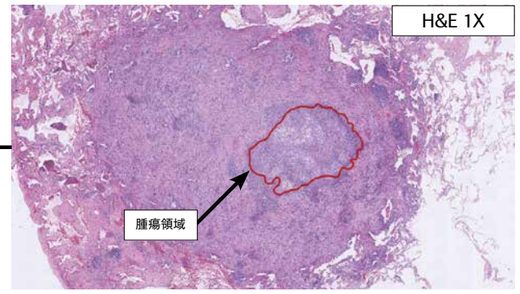


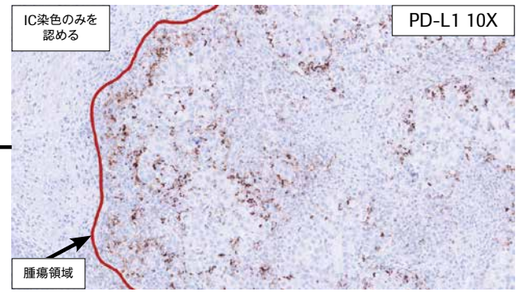
図15　**A**）腫瘍領域、**B**）切除標本における腫瘍領域、**C**）生検標本における腫瘍領域、**D**）壊死部を含む標本における腫瘍領域

凝集している腫瘍浸潤免疫細胞（IC）のスコアリング

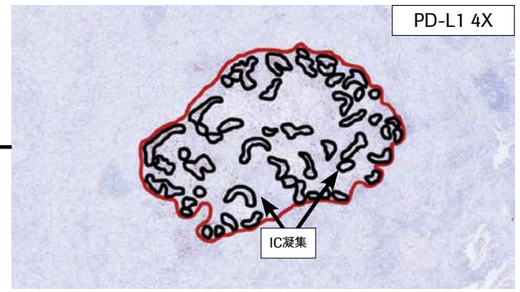
H&E染色スライドを鏡検して、
腫瘍の存在、壊死部の除外、適格性の確認
（50個以上の腫瘍細胞の存在）および
腫瘍領域を評価する。



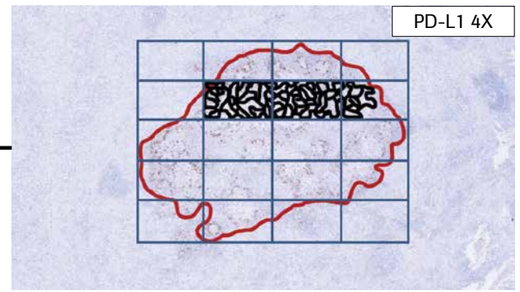
ベンタナ OptiView PD-L1 (SP142) で
染色されたスライドを対物レンズ10倍
または20倍にて観察し、
全体的な染色パターン（ICパターン、TCパターン、
または両方染色されているパターン）を確認する。



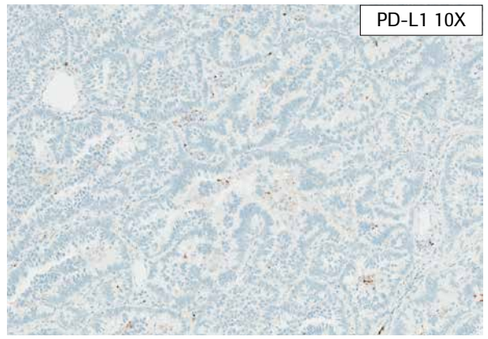
低倍（対物レンズ4倍）にて、
IC凝集を目視でできる限り厳密に取り囲む。



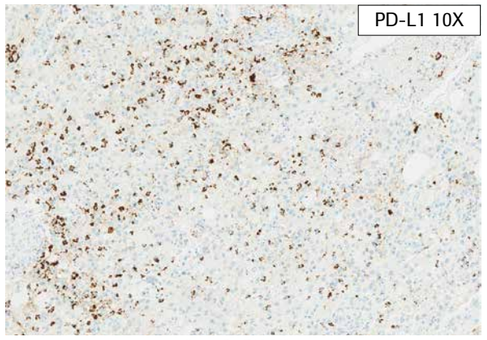
取り囲んだICエリアを、
イメージとして寄せ集めることで、
IC凝集が腫瘍領域に占める割合を推定する。
例として示したケースではPD-L1発現は
「≥10% IC」と判定される。



分散している腫瘍浸潤免疫細胞（IC）のスコアリング



分散しているICの割合
<1%



分散しているICの割合
≥10%

分散しているICは、上図を参考に、単一のIC細胞の密度に基づいてスコアを付ける。

判定上の注意および間違いやすい症例

1.壊死部および腺管内含有物への染色

壊死またはアポトーシス領域周辺における壊死性残屑および免疫細胞にPD-L1染色が認められることがあります。この染色は顆粒状を示すことがあるため、特異的なIC染色と間違えられる可能性があります。このような染まりや凝集として観察される好中球への染色は、スコアリングから除外してください。

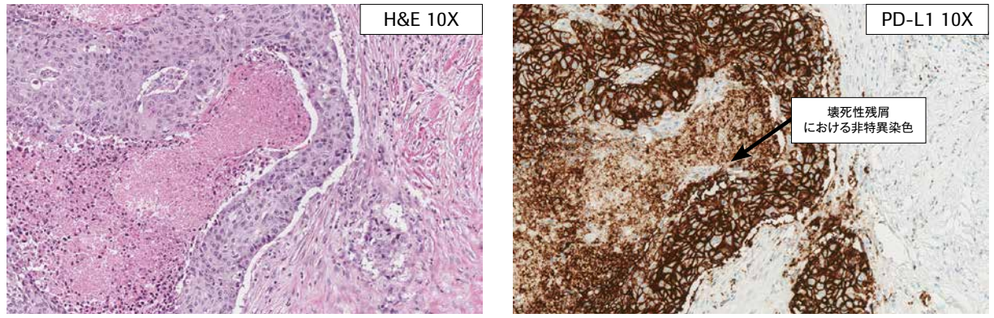


図16　PD-L1染色を示す壊死性残屑。判定対象からは除外する。

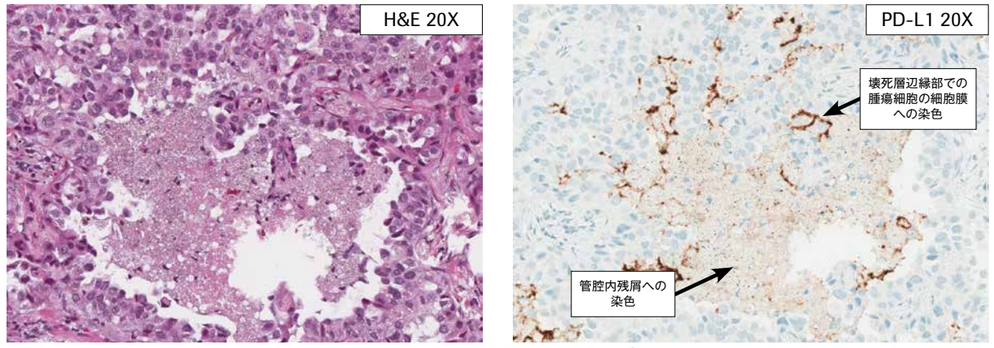


図17　PD-L1染色を示す管腔内残屑。判定対象からは除外する。壊死層辺縁部に認められるわずかな腫瘍細胞へのPD-L1染色はTCの判定対象となる。

2.リンパ節転移

原発巣および転移巣のいずれの検体に対しても、ベンタナ OptiView PD-L1 (SP142) 染色を実施可能ですが、骨転移の検体は不適です。PD-L1陽性を示す正常の免疫細胞があることを踏まえ、リンパ節転移検体の判定には特に注意してください。ICのスコアリングには、腫瘍細胞に隣接している腫瘍浸潤免疫細胞のみを対象としてください。

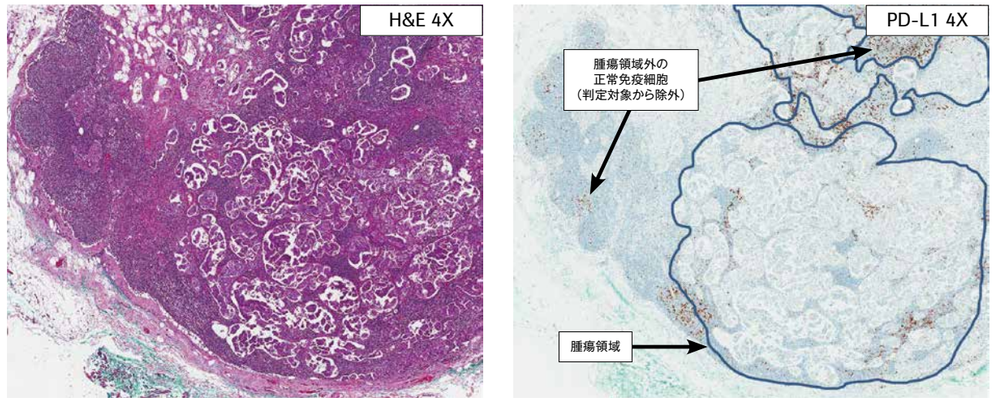


図18　リンパ節転移非小細胞肺癌におけるPD-L1染色

3.肺胞マクロファージ

肺胞マクロファージにおけるPD-L1染色は、これらが腫瘍領域内に存在しており、かつ腫瘍細胞に隣接している場合に限り、ICのスコアリングに含めることができます。肺胞マクロファージへの強い染まりは腫瘍細胞と似ているため、H&E染色スライドにて形態を確認してください。

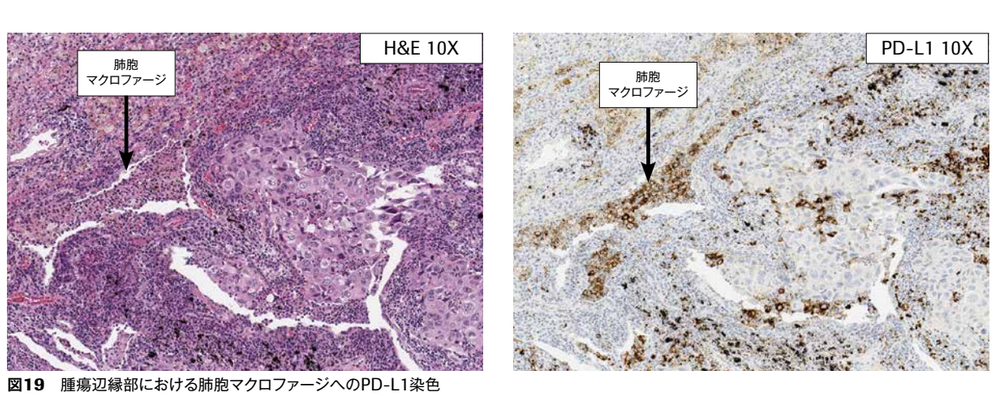


図19　腫瘍辺縁部における肺胞マクロファージへのPD-L1染色

4.血管内の免疫細胞

腫瘍間質の血管内にPD-L1陽性の免疫細胞を示すことがあります。これらはICのスコアリングには含みません。

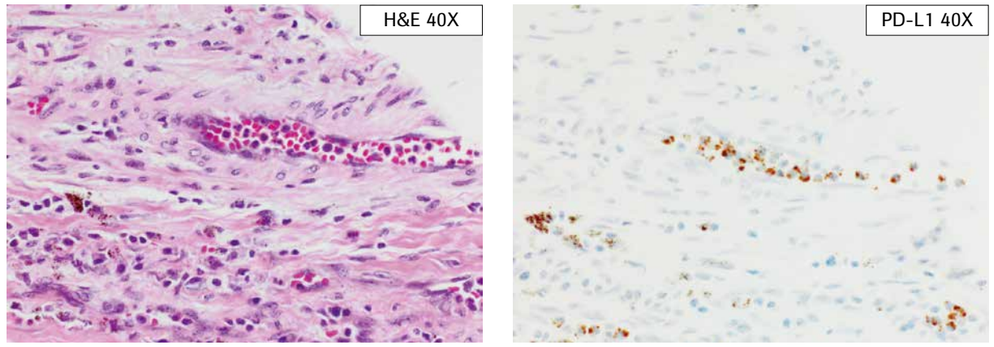


図20　血管内の免疫細胞（この写真は好中球）はICスコアリングに含めない。

5.ヘモジデリンおよび炭粉色素

炭粉色素およびヘモジデリン色素はIC染色と紛らわしいことがあります。高倍率での観察ならびに陰性コントロール試薬の結果を確認することが必要となることがあります。

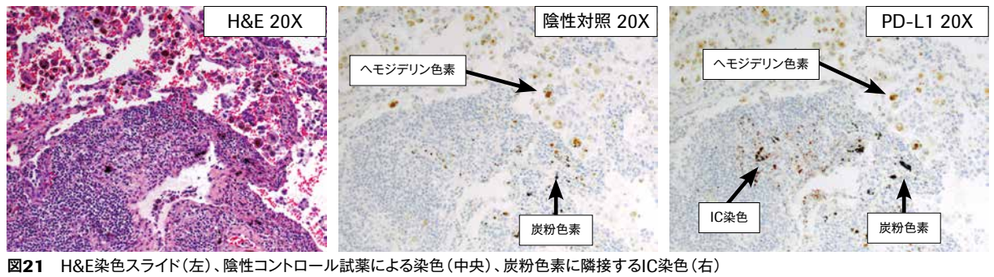
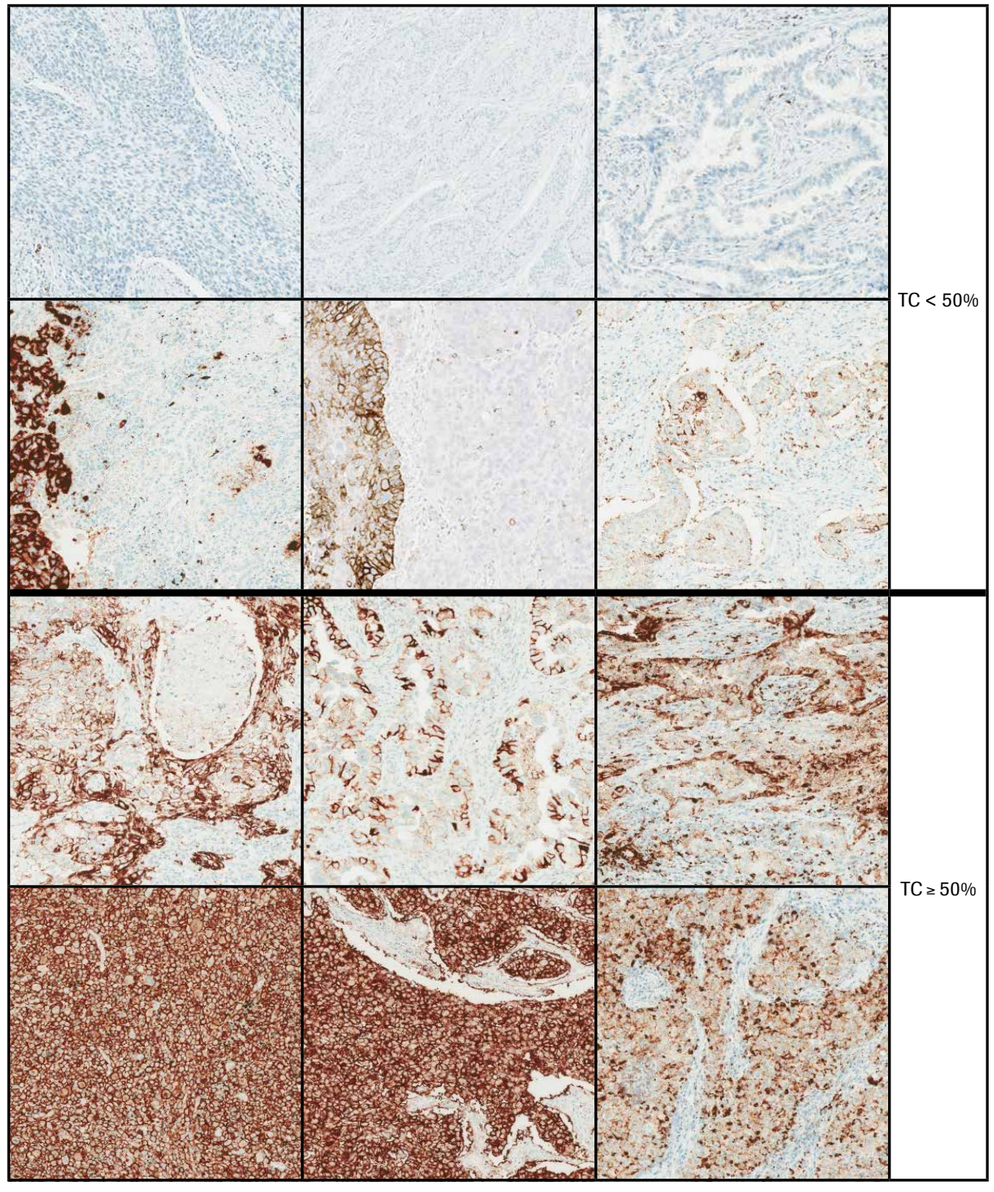


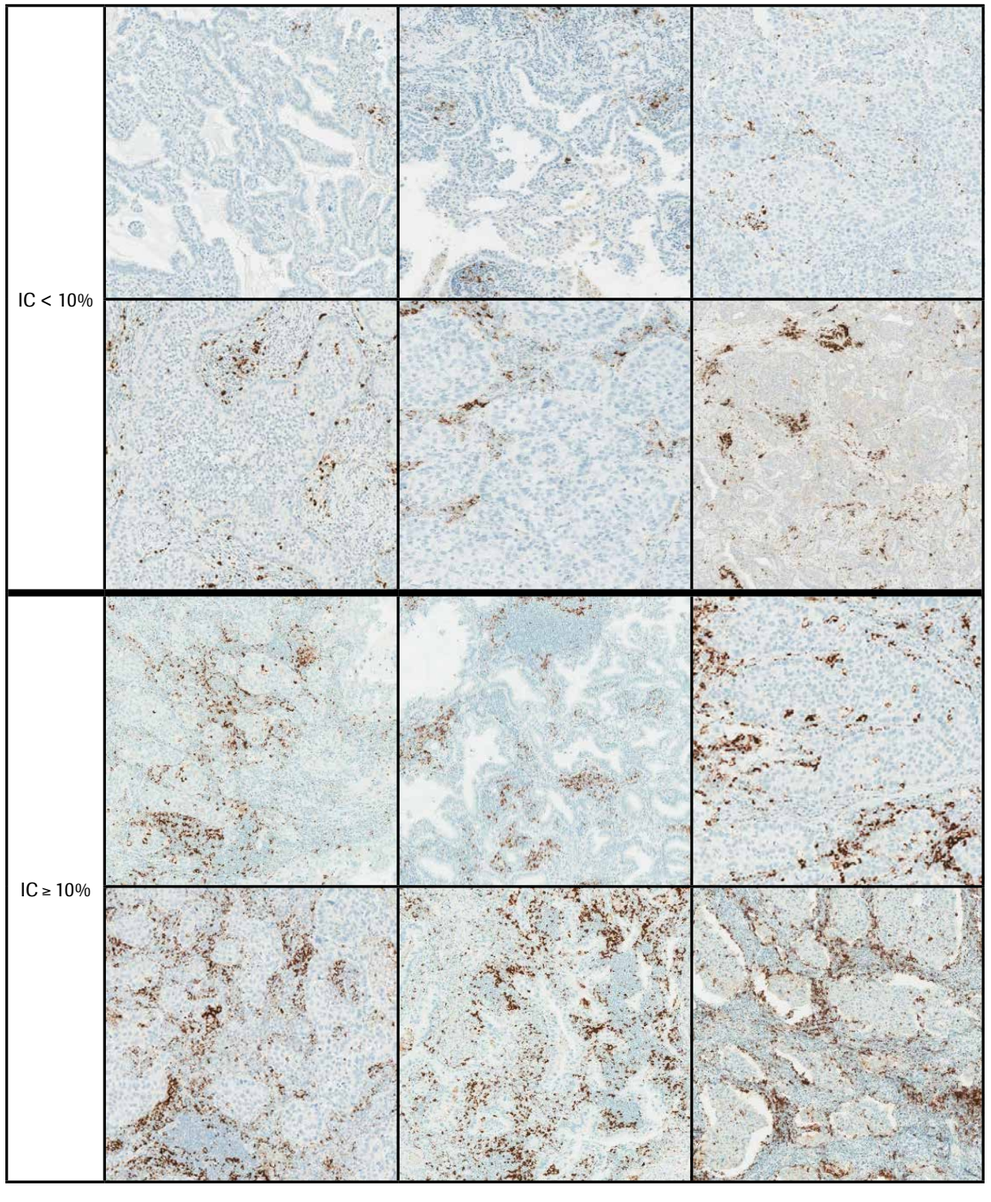
図21　H&E染色スライド（左）、陰性コントロール試薬による染色（中央）、炭粉色素に隣接するIC染色（右）

参照画像

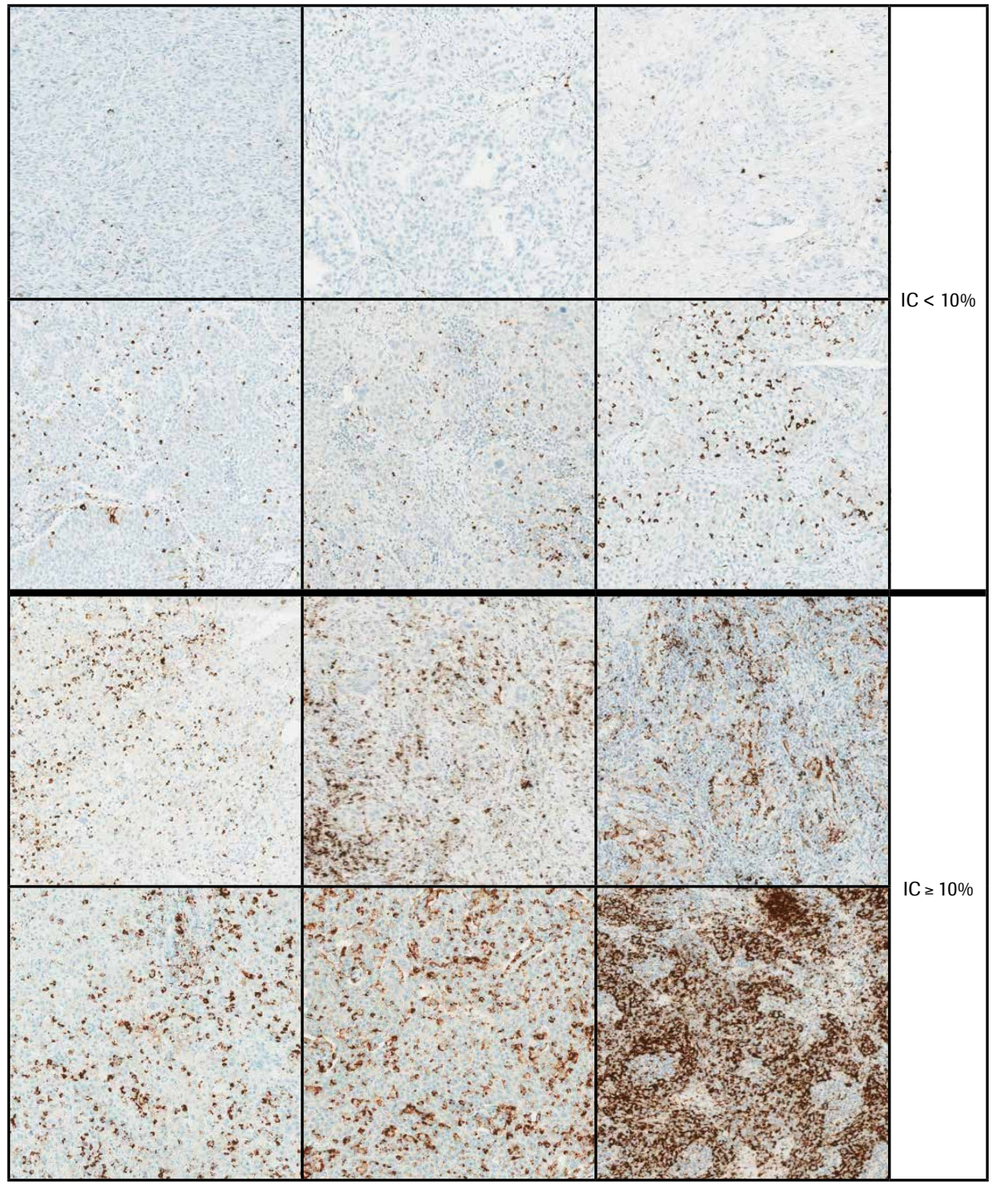
TC発現（腫瘍細胞における染まり）



IC発現（免疫細胞における染まり）ー凝集タイプ

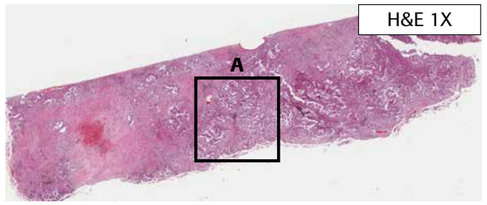


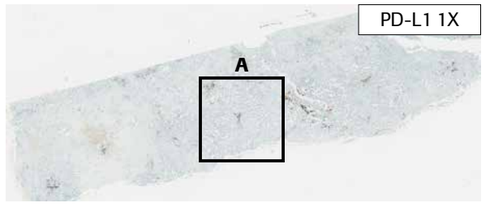
IC発現（免疫細胞における染まり）ー散在性タイプ

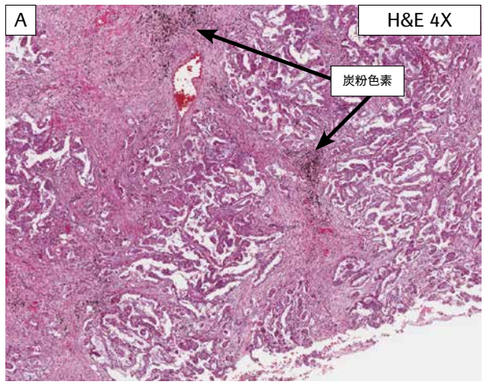


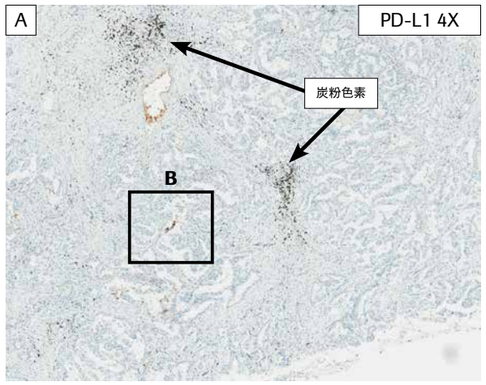
実際の症例

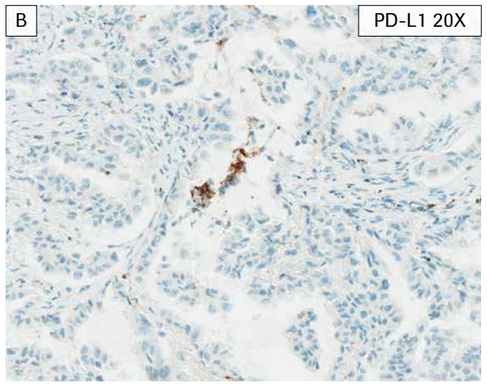
【TC0、IC0】





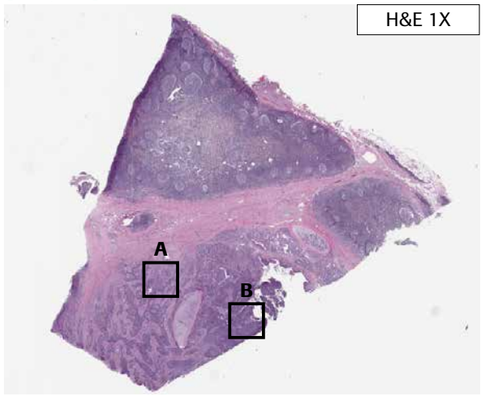


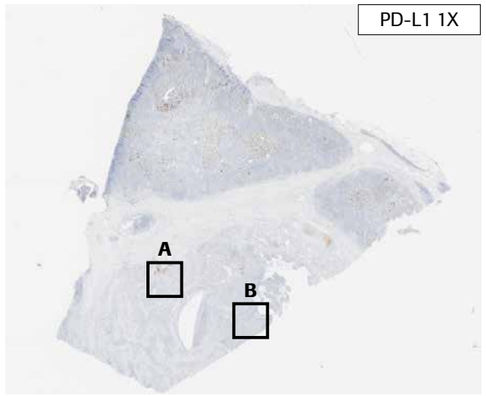


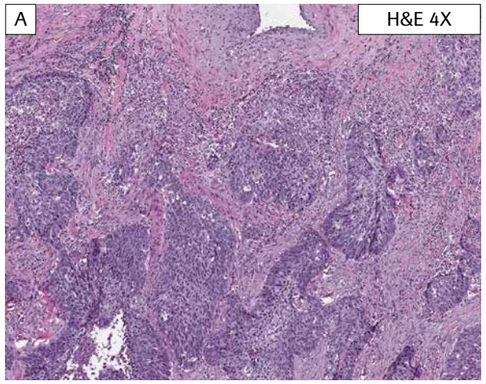


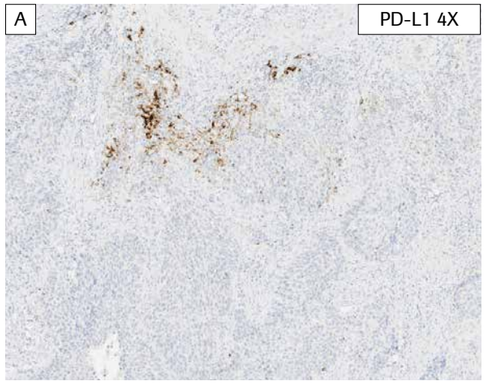
症例1：TC 0%、IC <1%。ICスコアリングから除外すべき管腔内残屑の染色を示している。炭粉染色の存在も認められる。

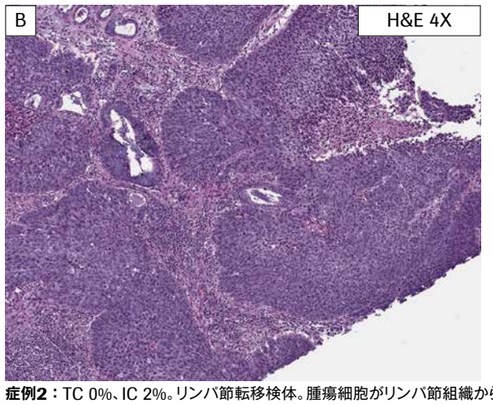
【TC0, IC1】

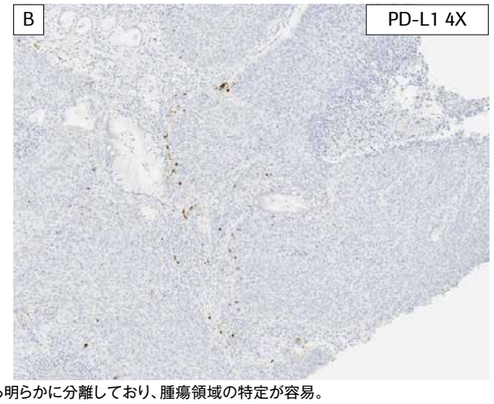






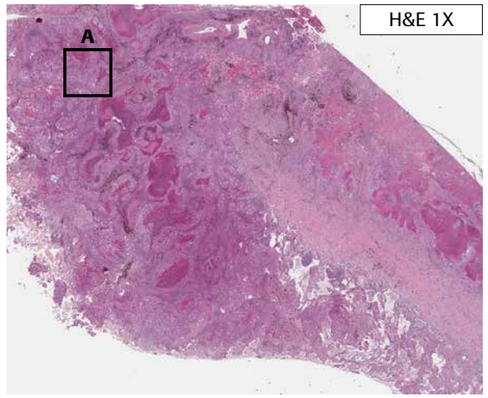


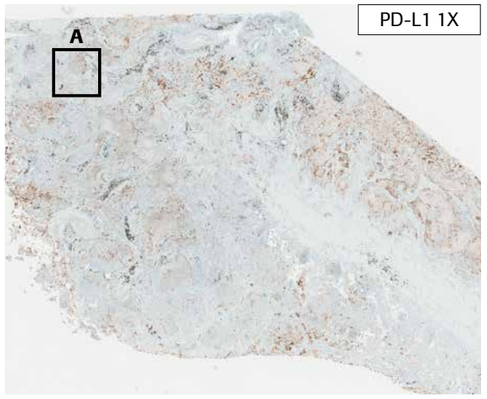


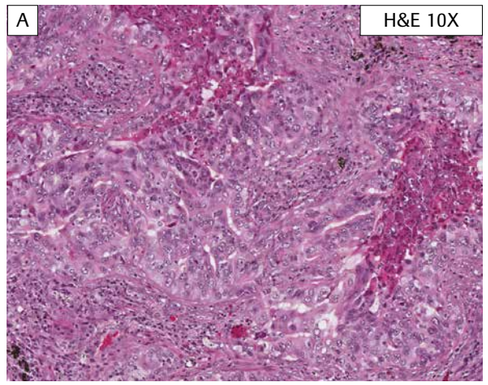


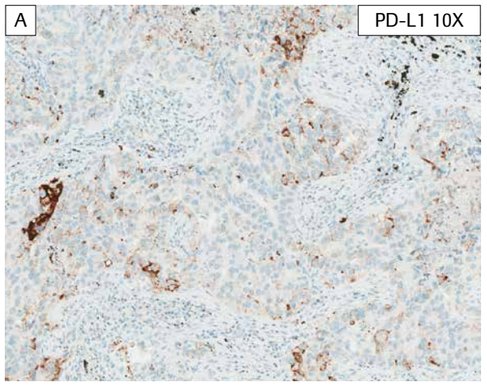
症例2：TC 0%、IC 2%。リンパ節転移検体。腫瘍細胞がリンパ節組織から明らかに分離しており、腫瘍領域の特定が容易。

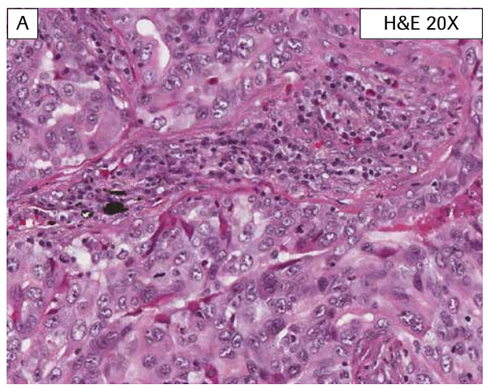
【TC2, IC1】

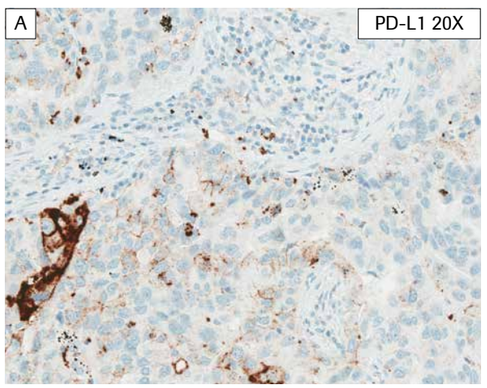






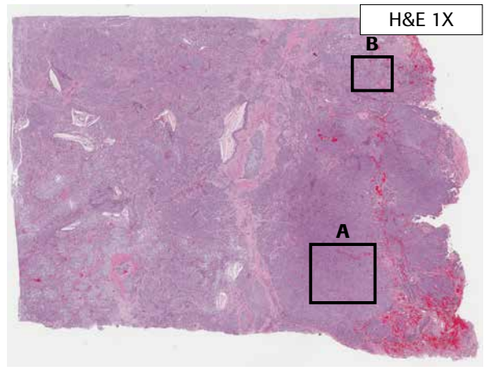


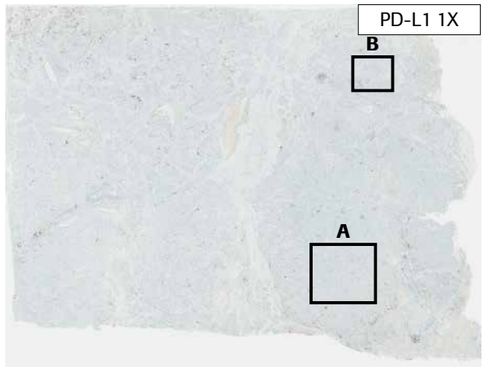


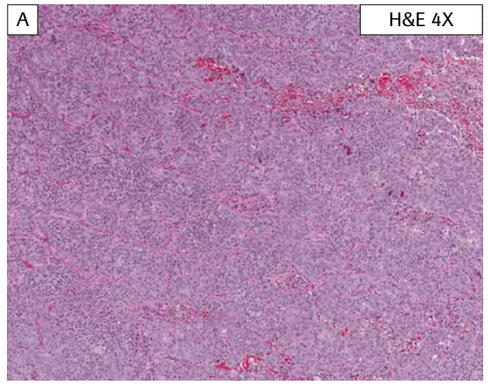


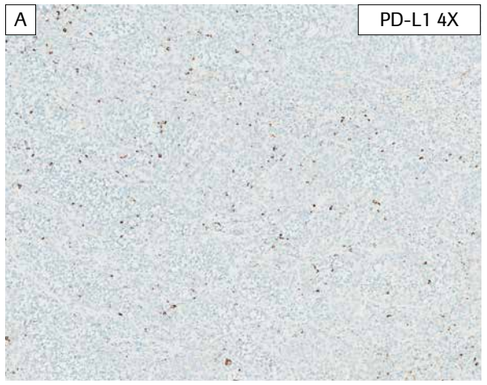
症例3：TC 15%、IC 1%。弱いTC染色が認められる（陽性細胞として判定）。

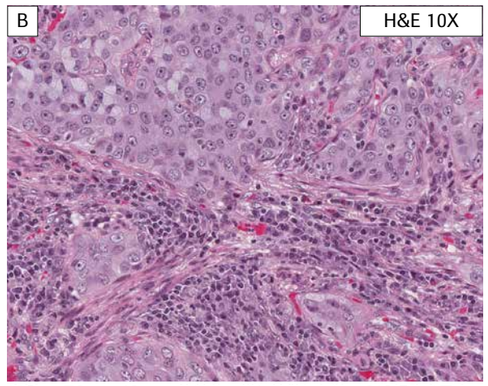
【TC0, IC2】

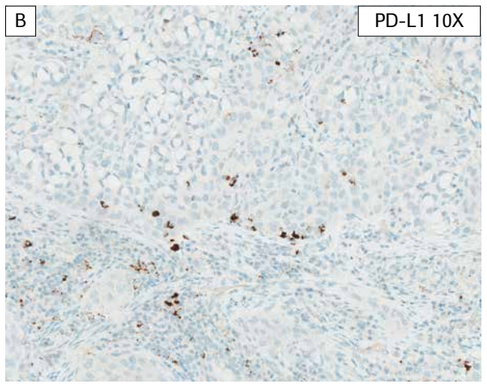






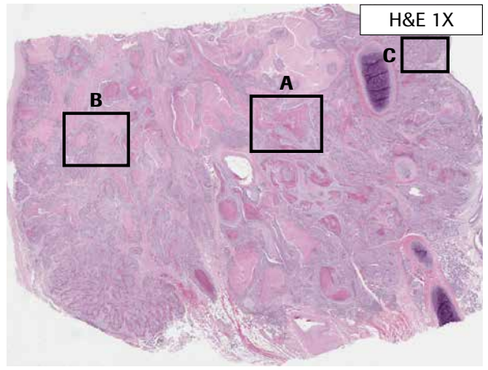


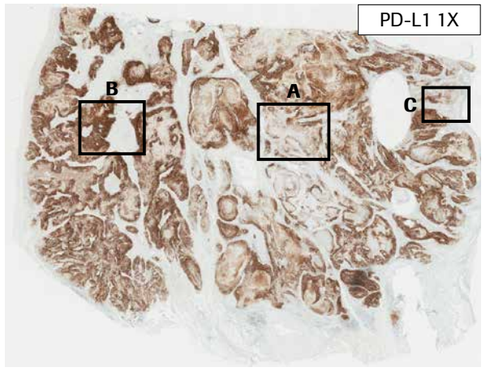


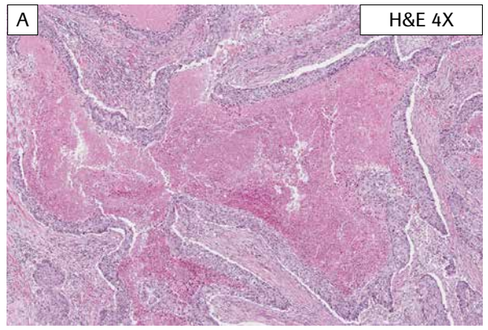


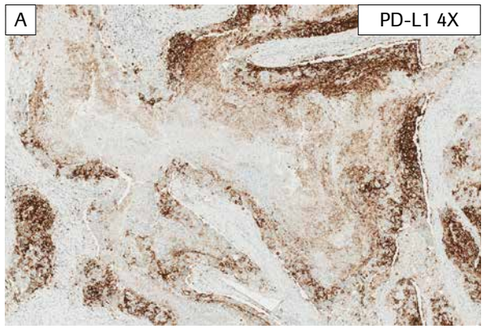
症例4：TC 0%、IC 5%。比較的一様に拡散した単一のIC細胞を示す。

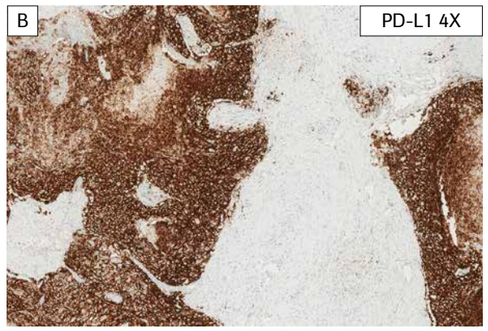
【TC3, IC1】

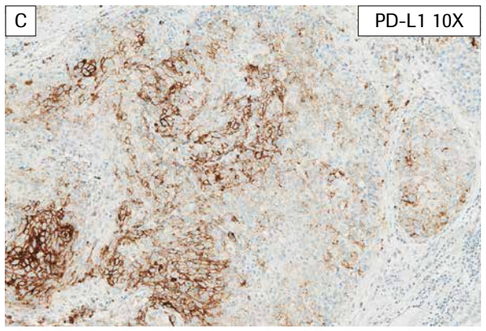






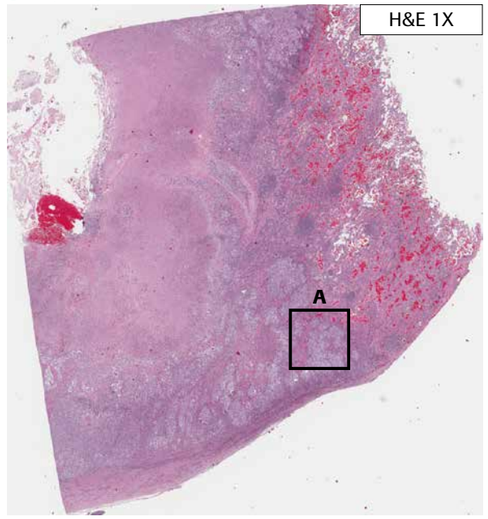


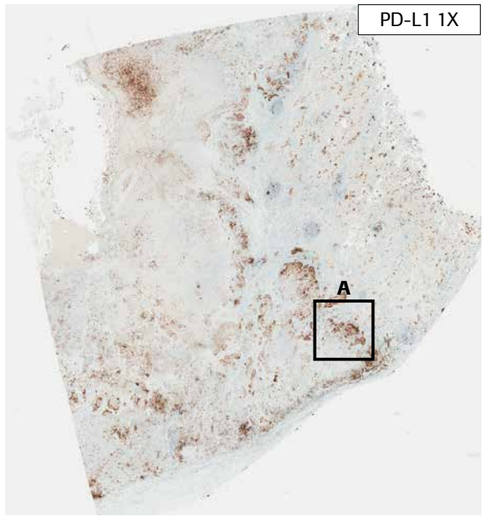


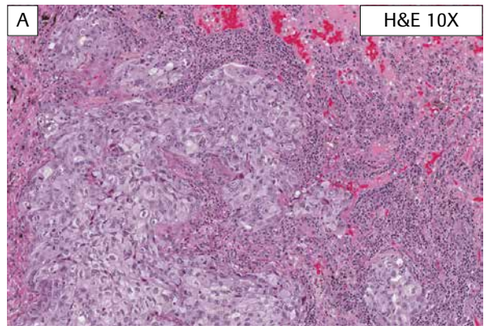


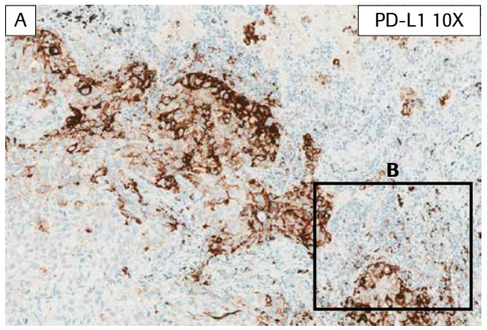
症例5：TC 80%、IC 2%。IC染色を伴うさまざまな強度のTC染色が混在している例。強いTC染色の領域においては、腫瘍内間質を注意深く観察する必要がある。弱～中程度のTC染色領域においては、ICを比較的容易に評価できる。TC染色とIC染色の鑑別は、H&E染色スライドを観察する。壊死部はICのスコアリングに含めない。

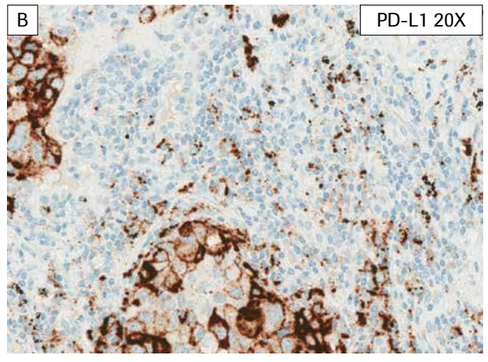
【TC3, IC2】





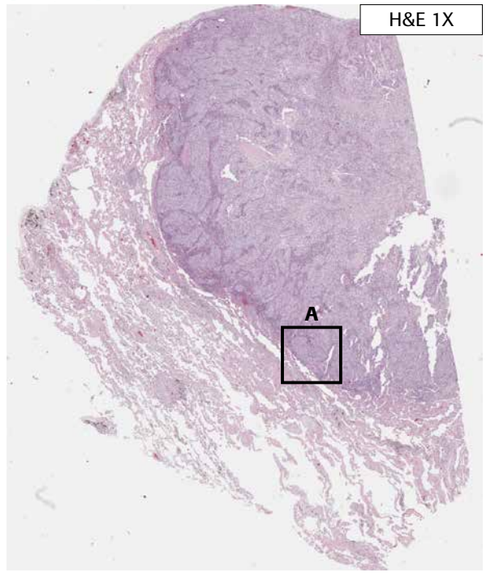


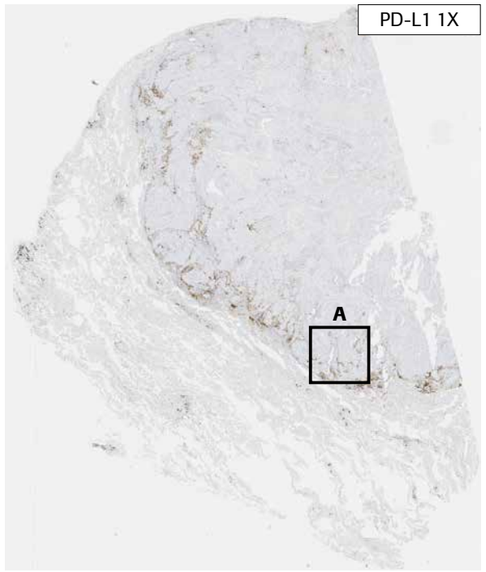


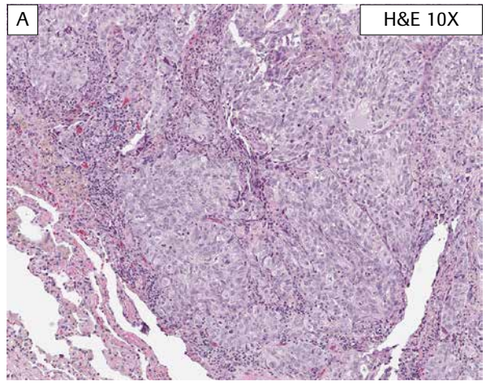


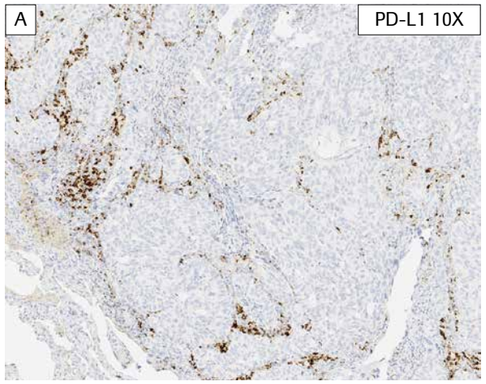
症例6：TC 60%、IC 5%。TC染色とIC染色を鑑別するために高倍率による評価およびH&E染色スライドの観察を必要とする例を示す。

【TC0, IC3】



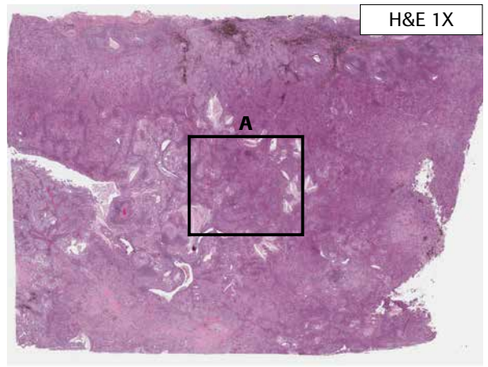


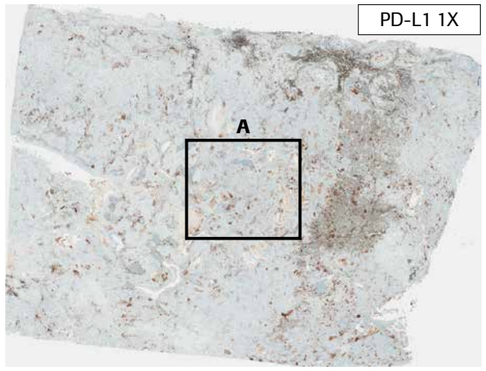


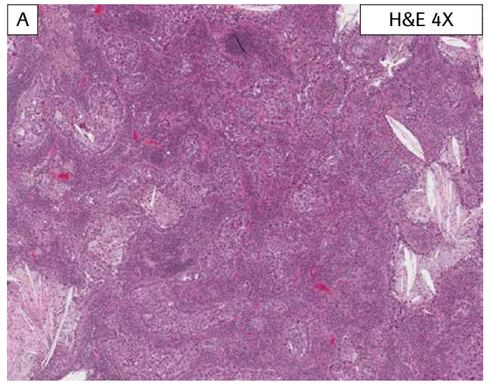


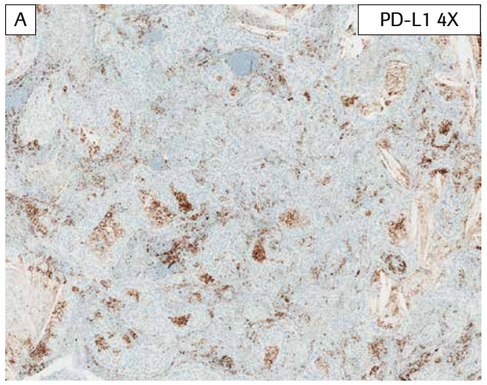
症例7：TC 0%、IC 10%。腫瘍辺縁に沿ってPD-L1陽性のICが密集している。

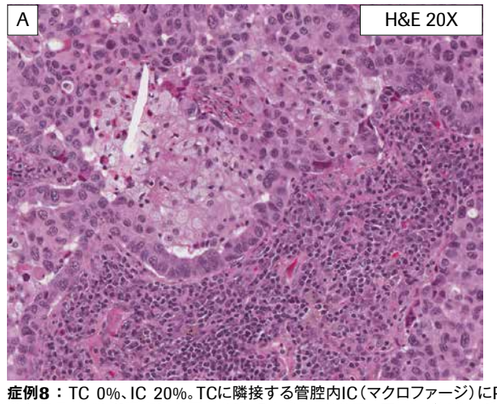
【TC0, IC3】

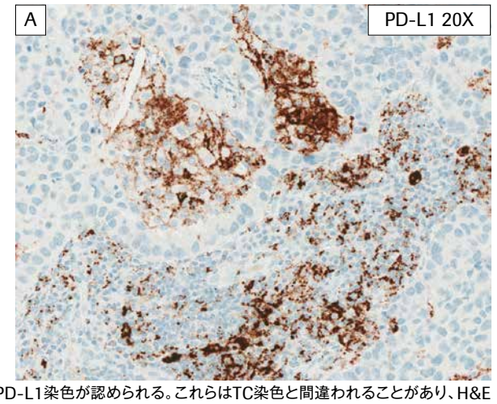






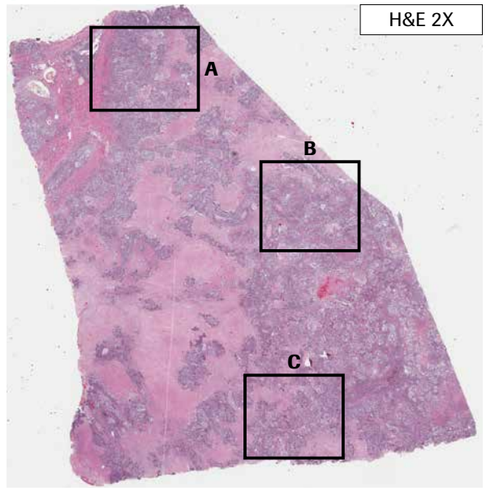


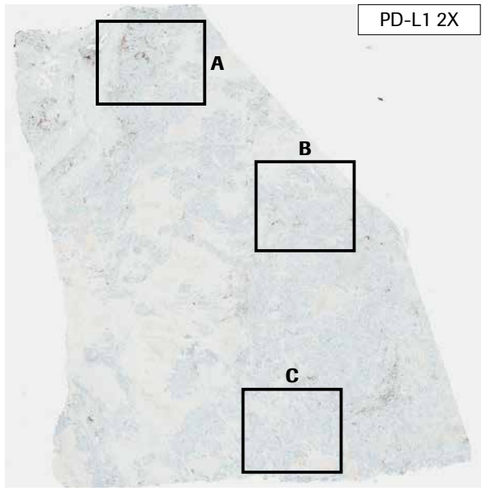


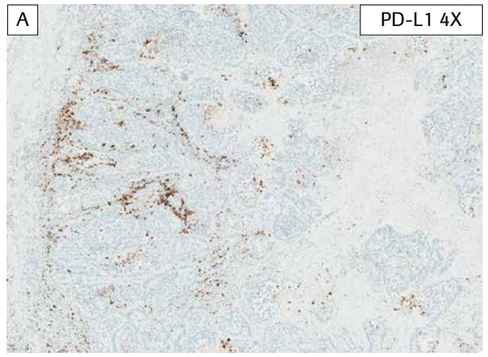


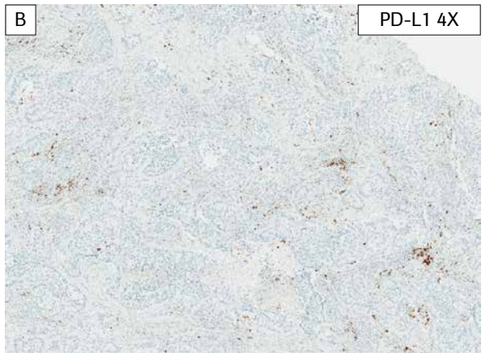
症例8：TC 0%、IC 20%。TCに隣接する管腔内IC（マクロファージ）にPD-L1染色が認められる。これらはTC染色と間違われることがあり、H&E染色スライドを確認する必要がある。これらは ICのスコアリングに含める。

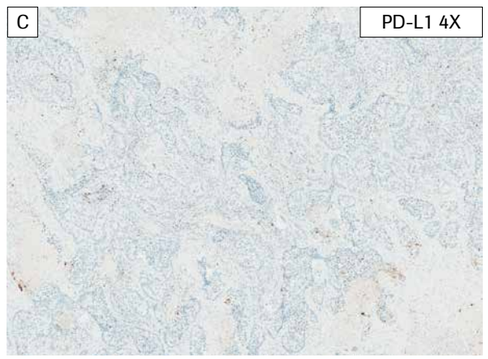
【TC0, IC3】







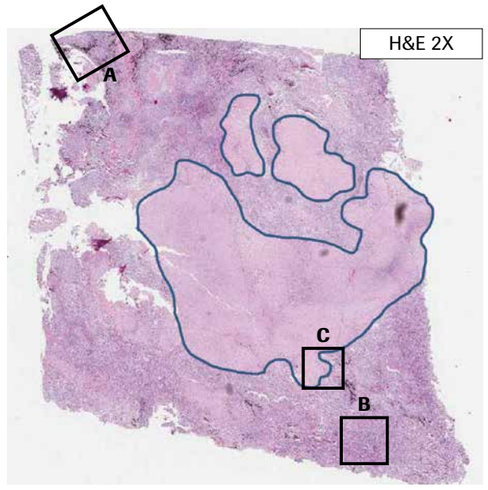


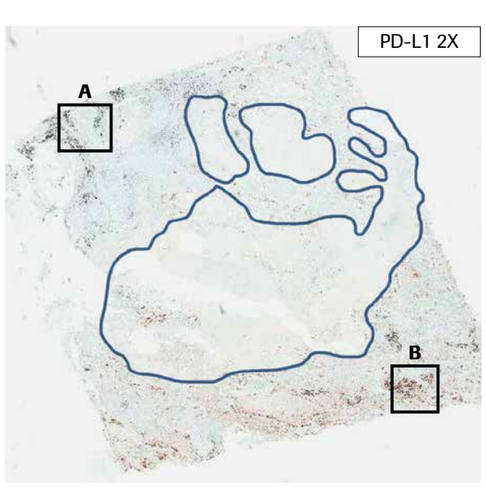


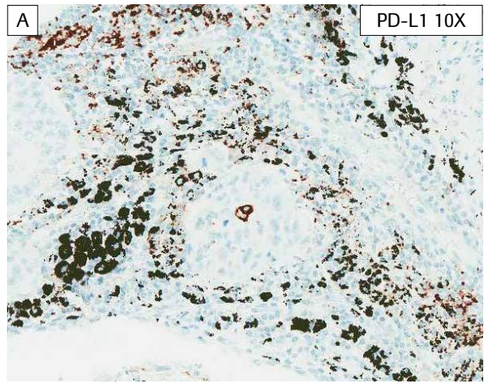
症例9：TC 0%、IC 10%。それぞれ異なる割合のIC染色を伴う、3つのエリアを示している。 全体として、この症例は10% ICである。スコアリングから除外すべき壊死部が存在することにも注意が必要。

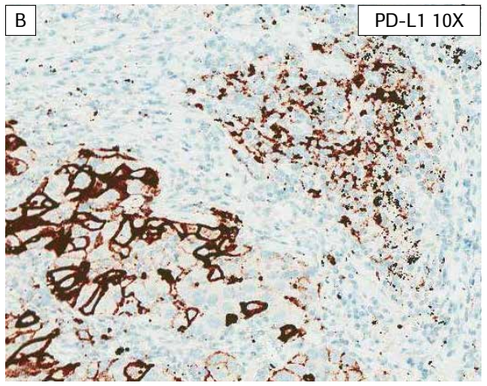
判定に注意が必要な症例

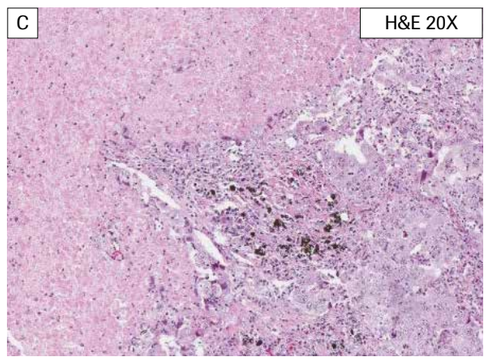
【壊死部の除外】





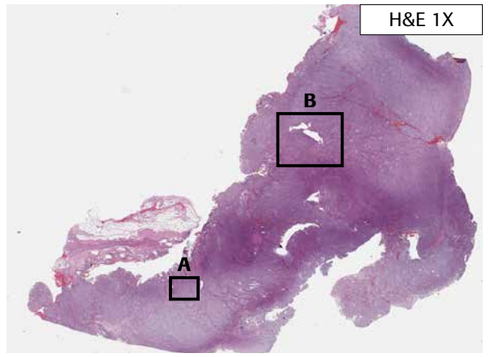


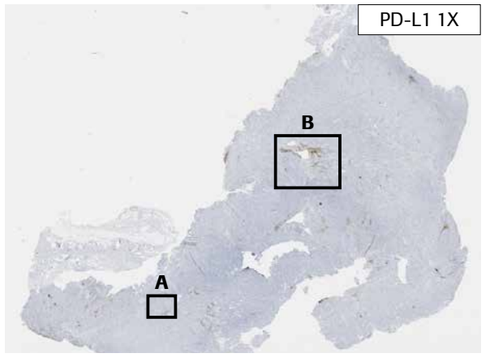


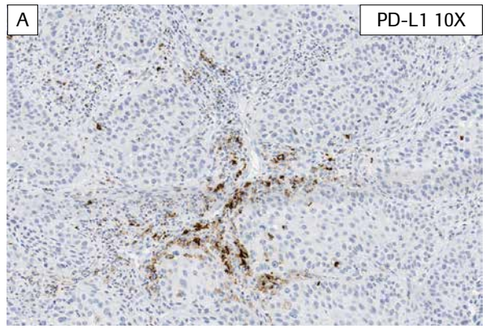


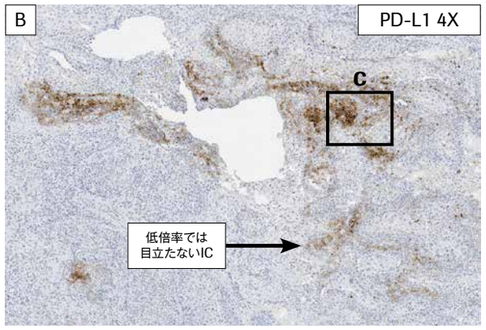
症例10：判定に注意が必要な例。TC 20%、IC 5%。スコアリングから除外すべき壊死部を有する。**領域A**および**B**の高倍率画像は、炭粉色素の中およびTC染色の隣にIC凝集を示している。判定対象から壊死部を除外し、この症例は5% ICとスコアリングされる。

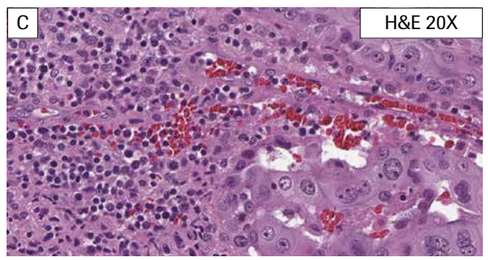
【薄い染まりのIC、TCとICの鑑別】

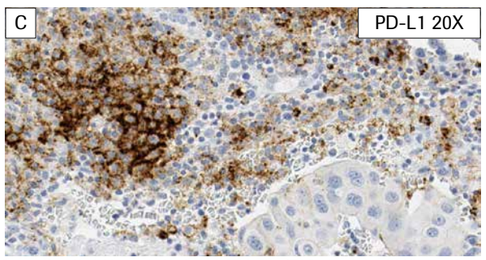






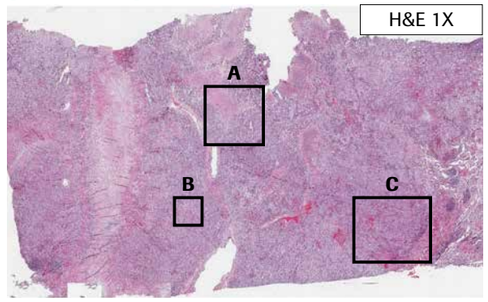


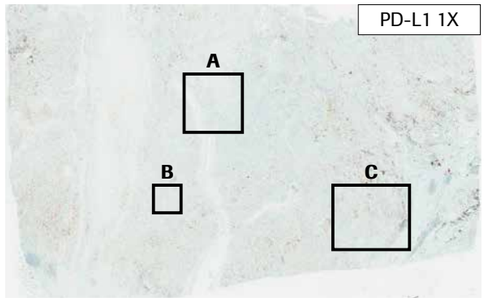


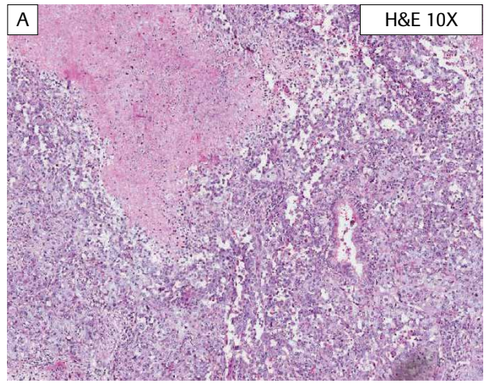


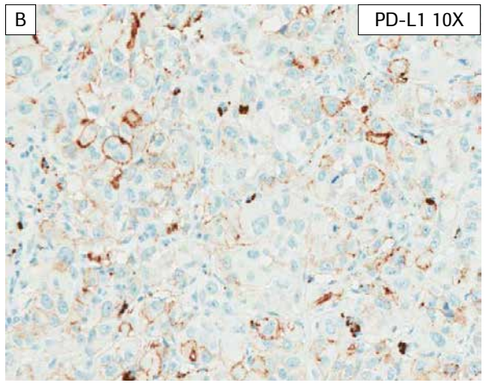
症例11：判定に注意が必要な例。TC 0%、IC 5%。低倍率では確認しづらい、薄い染まりのICに注意が必要な例（**領域B**）。また、巣状のIC染色およびマクロファージへの染色を示しており、円周状のTC染色と間違えられやすい。マクロファージへの染色をTC染色と鑑別するために、高倍率での評価およびH&E染色スライドの観察が重要（**領域C**）。

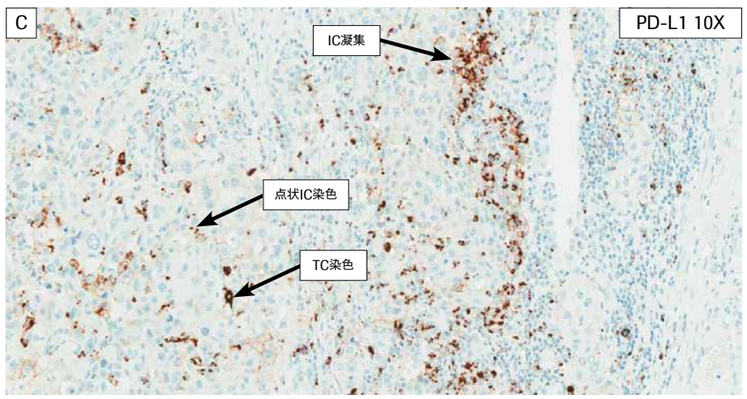
【TCとICの鑑別】





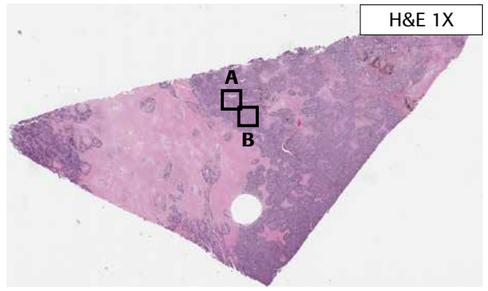


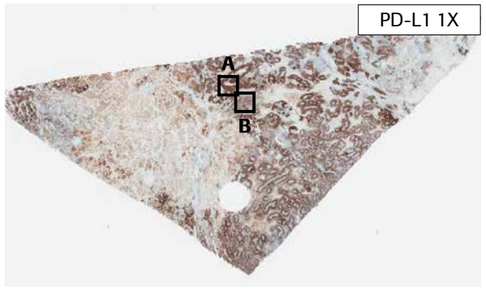


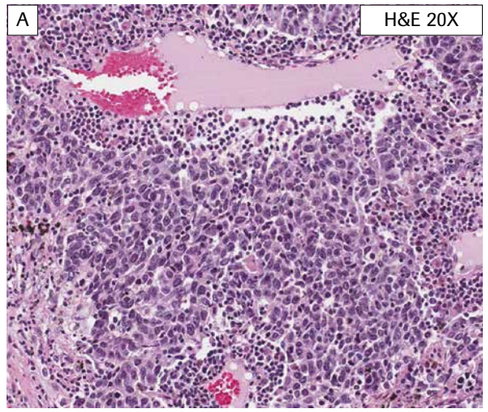


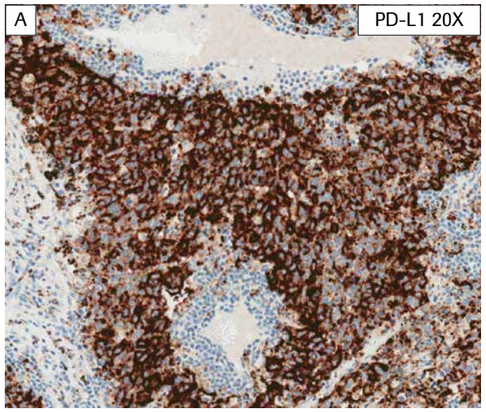
症例12：判定に注意が必要な例。TC 10%、IC 15%。高倍率で見ると、弱い膜染色の腫瘍細胞（領域B）および腫瘍細胞間に点在している強い点状のIC染色が認められる（**領域C**）。高倍率でIC染色とTC染色を鑑別することが重要。

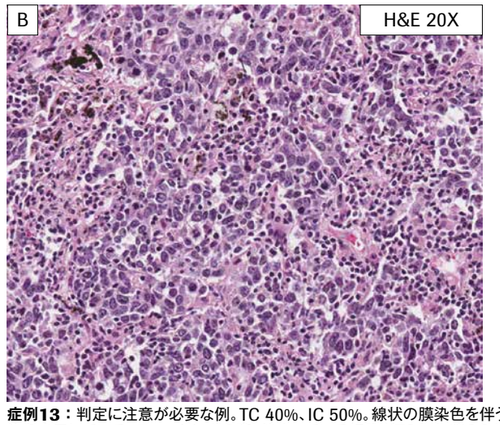
【TCとICの鑑別】

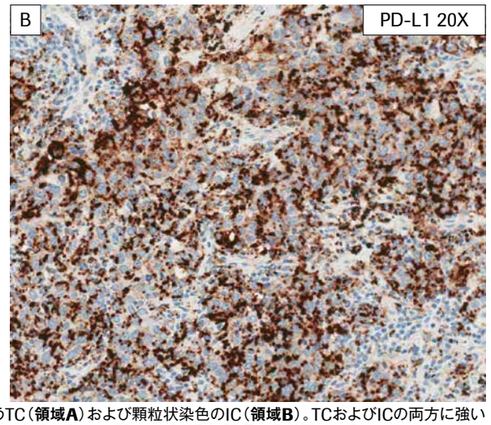








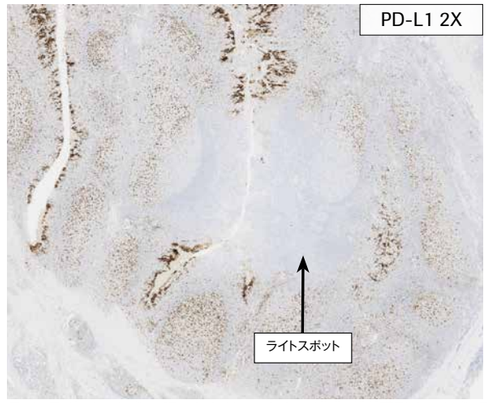


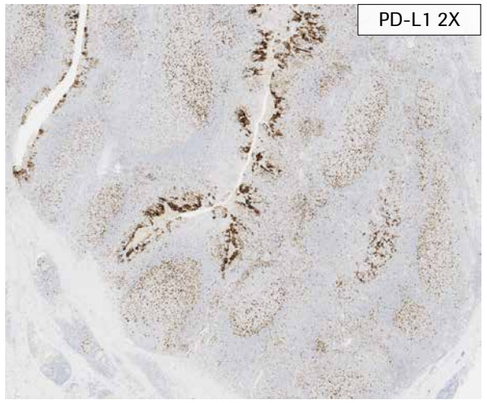


症例13：判定に注意が必要な例。TC 40%、IC 50%。線状の膜染色を伴うTC（**領域A**）および顆粒状染色のIC（**領域B**）。TCおよびICの両方に強い染色を示している。スコアリングの際、染まっている細胞がTCおよびICのどちらであるかを、高倍率で慎重に評価する必要がある。

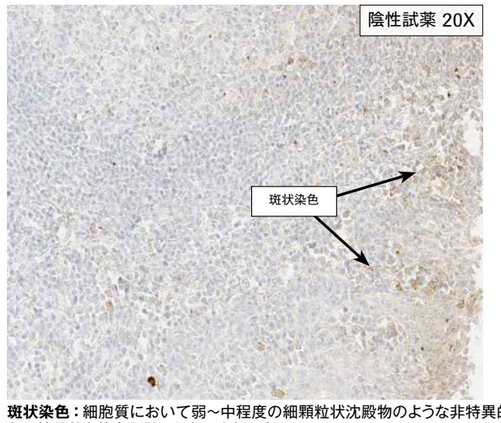
アーチファクト

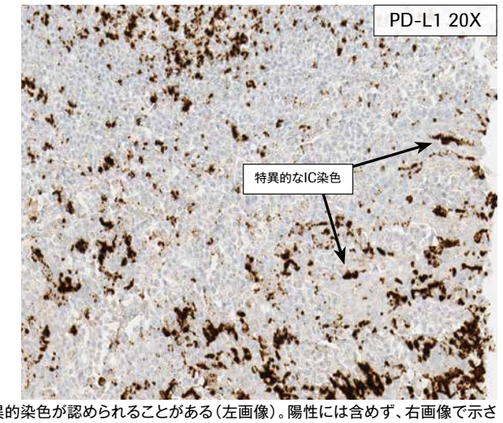
本項に示すアーチファクトは、ベンタナ OptiView PD-L1（SP142）染色スライドおよび陰性コントロール試薬にて染色されたスライドで観察される可能性のあるものです。このようなアーチファクトにより判定が困難な場合、染色を再度行うことが推奨されます。判定の際には、陰性コントロール試薬で染色されたスライドにおいて、バックグラウンド染色や非特異染色が許容範囲内にあることを確認することが推奨されます。



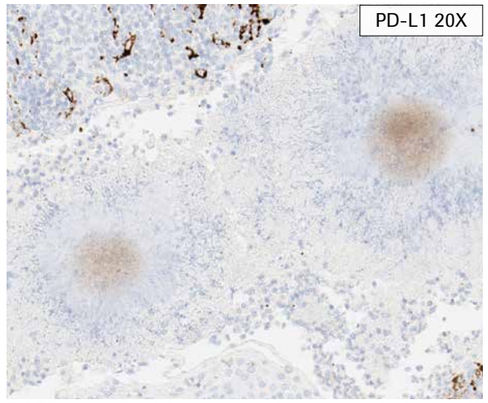


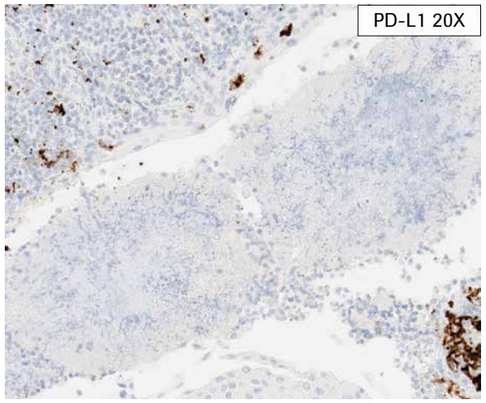
ライトスポット：染色工程中に生じた気泡により、小さな円形の非染色領域を生じることがある。左右の画像は同一切片であり、正常に染色された右側の画像に比べて、左側の画像では円形の非染色領域を認める。非染色領域が大きいもしくは複数あり、判定に支障が生じる場合には、再染色が推奨される。



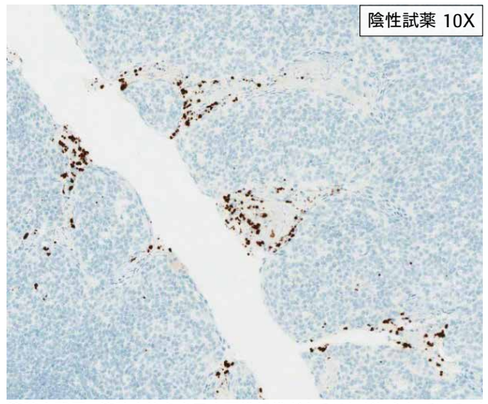


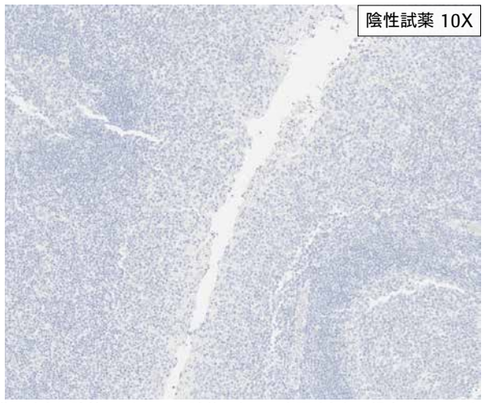
斑状染色：細胞質において弱～中程度の細顆粒状沈殿物のような非特異的染色が認められることがある（左画像）。陽性には含めず、右画像で示される特異的な染色と混同しないようにする。



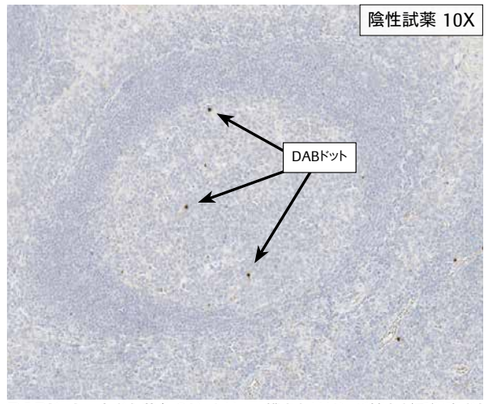


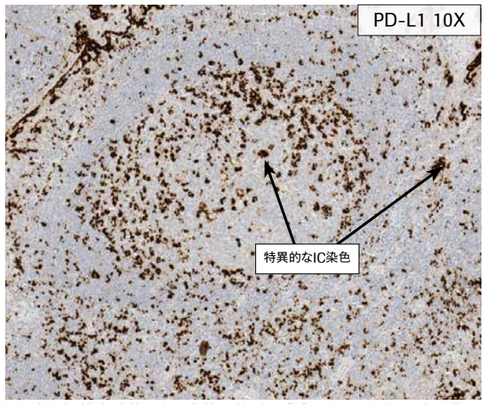
DABスポット：切片の浮きなどによってトラップされたDABによって円形の淡い着色が認められることがある。判定に影響する部分に生じている場合には、再染色が推奨される。（右画像は再染色の結果であり、DABスポットは認められない）。



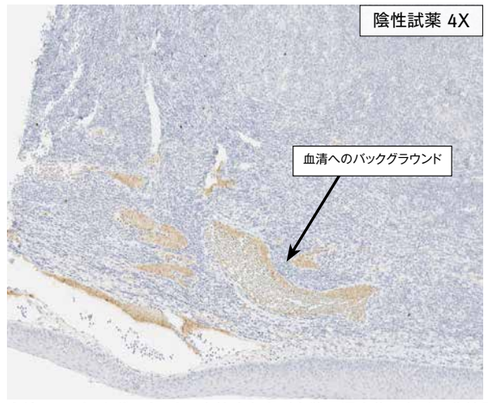


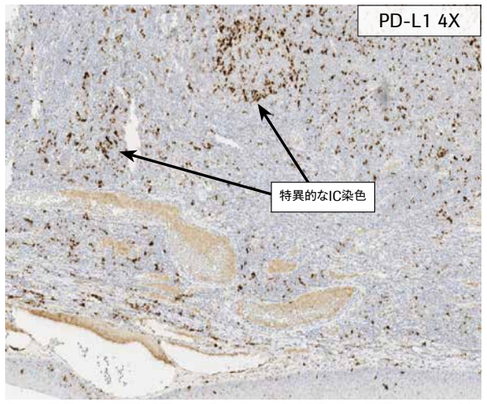
管腔内残屑：管腔内染色を示す扁桃組織があることが知られている。左画像のように陰性コントロール試薬においても認められる場合には、コントロール組織として使用しないようにする。右画像は、扁桃における適切な陰性コントロール試薬の染色結果を示している。





DABドット：小さな茶色のドットは、扁桃またはリンパ節などで観察されることがあり、検出試薬による非特異的バックグラウンドである。右画像に示される特異的なIC染色と比較して、左画像のDABドットは小さく、より明瞭な輪郭の特徴的な形態を示す。





血清へのバックグラウンド：血管内および血漿の漏出物における非特異染色（左画像）。右画像で示される特異的なDAB発色と混同しないように注意が必要。

参考文献

1. Blank C, Mackensen A. Contribution of the PD-L1/PD-1 pathway to T-cell exhaustion: an update on implications for chronic infections and tumor evasion. Cancer Immunol Immunother. 2007;56(5):739-45.

2. Dong H, Zhu G, Tamada K, et al. B7-H1, a third member of the B7 family, co-stimulates T-cell proliferation and interleukin-10 secretion. Nat Med. 1999;5(12):1365-9.

3. Herbst RS, Soria JC, Kowanetz M, et al. Predictive correlates of response to the anti-PD-L1 antibody MPDL3280A in cancer patients. Nature. 2014;515:563-7.

4. Butte MJ, Keir ME, Phamduy TB, et al. Programmed death-1 ligand 1 interacts specifically with the B7-1 costimulatory molecule to inhibit Tcell responses. Immunity. 2007;27(1):111-22.