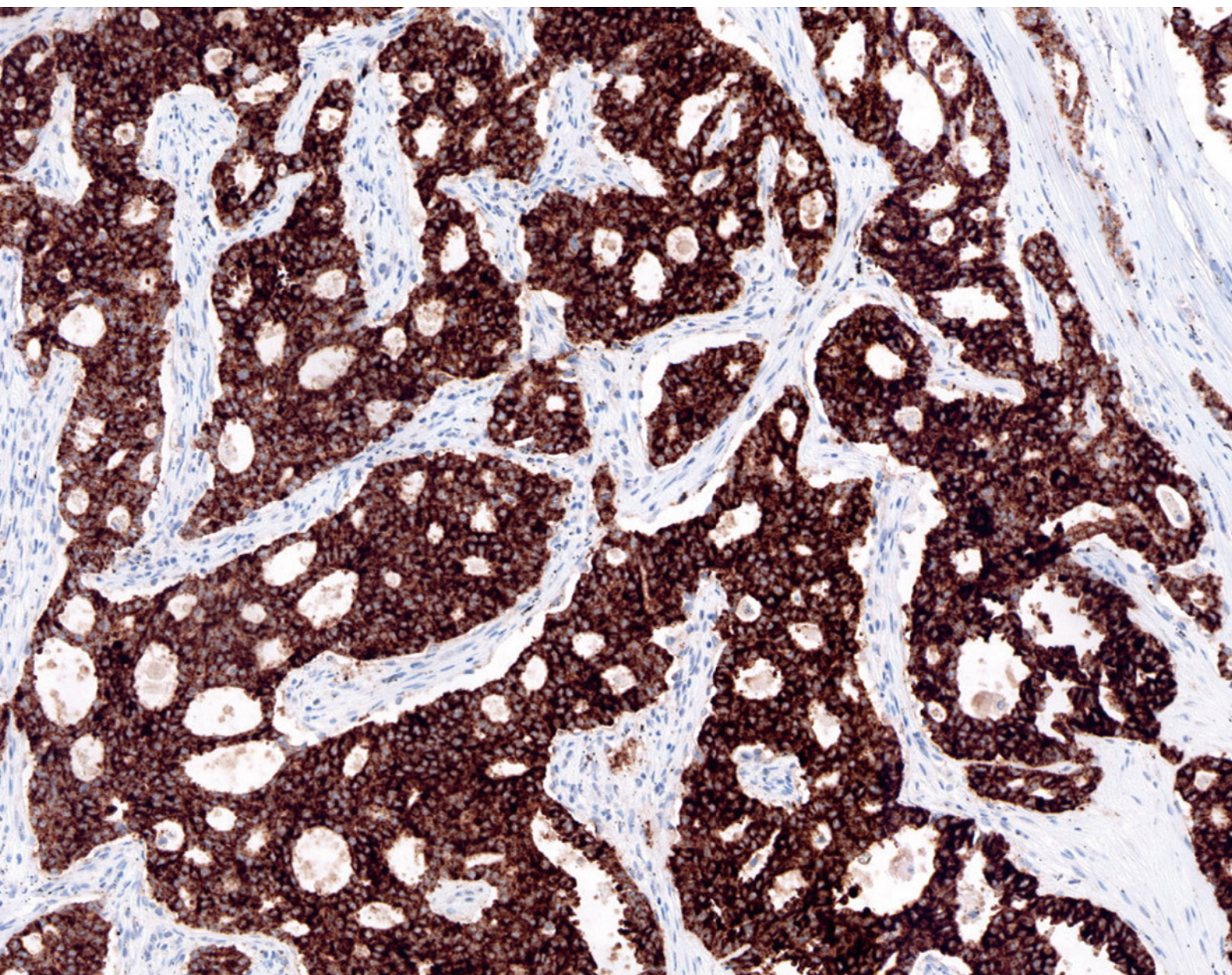


体外診断用医薬品

非小細胞肺癌 (NSCLC) における ベンタナ OptiView ALK (D5F3) 検査ガイド



目次

はじめに	2
I. 製品概要	3
II. 試薬の準備(試薬の登録・バッファーの充填)	5
III. スライド標本の準備	5
IV. 機器の定期メンテナンス	5
V. 検体処理(検体採取～包埋)	5
VI. 検体スライドの作製(薄切～染色前処理)	6
VII. 精度管理	7
VIII. 測定(操作)方法	7
IX. 推奨プロトコール	8
スコアリングガイド	9
検査フロー	11
精度管理用コントロールスライド	12
評価フロー	14
陰性例	15
陽性例	17
判定困難な例および起こりうるアーチファクト	22
判定困難な例: 非特異的なバックグラウンド	23
判定困難な例: 肺胞マクロファージの細胞質への顆粒状の染色	25
判定困難な例: リンパ球浸潤における散在性リンパ球への顆粒状染色	26
判定困難な例: 正常な腺上皮細胞細胞質への顆粒状の染色	27
判定困難な例: 神経節細胞への顆粒状の染色	28
判定困難な例: 細胞膜への強い顆粒状の染色	29
判定困難な例: 粘液成分への染色	30
判定困難な例: DABアーチファクト	31
ベンタナ OptiView ALK (D5F3) 染色の再現性	31
検体処理の条件と染色に与える影響	32
固定条件の検討	32
固定条件がベンタナ OptiView ALK (D5F3) に及ぼす影響の例	32
10%NBF固定における他の肺癌マーカーとの比較	33
薄切後の安定性	33
参考文献	34

はじめに

ALK (Anaplastic Lymphoma Kinase ; 未分化リンパ腫キナーゼ) はインスリン受容体スーパーファミリーに属する受容体型チロシンキナーゼです¹。ALKは、成人の正常細胞においては神経系細胞でのみ発現するI型膜糖タンパク質です²。

2007年、ALKと同じく2番染色体単腕(2p)内に位置するEML4 (echinoderm microtubule-associated protein-like 4 ; 微小管会合タンパク-4)との逆位の結果生じる、“EML4-ALK融合遺伝子”が、非小細胞肺癌(NSCLC)の細胞株内および保存された臨床検体内で発見されました³。その後の研究では、EML4-ALK融合遺伝子には少なくとも9種類のバリエーションがあり、それらは全てALKのC末端キナーゼ領域の同一部分により構成されていること、また、恒常的に活性化されて強力な発がん能を有していることが示されています⁴⁻⁸。このことは、トランスジェニックマウスの肺胞上皮細胞においてEML4-ALK融合遺伝子を発現させたところ、短期間で肺癌を発がんしたという研究結果からも証明されています⁹。ALK遺伝子は正常では細胞膜に存在していますが、この遺伝子融合の結果、細胞質に局在を示します³。

現在では、ALKはNSCLCにおける主な発がん因子として認識されており、その主な融合パートナーはEML4ですが、その他の遺伝子も融合パートナーとなりえることが知られています^{10,11}。ALK遺伝子の再構成はNSCLC患者の2~7%で確認され、新たにALK陽性と診断される肺癌患者の数は世界中で年間約40,000人とされています^{3,4,7}。注目すべきことに、ALK遺伝子再構成の大半は肺腺癌の患者において確認され、扁平上皮癌または小細胞癌で認められることは稀です³⁻⁸。また、ALK遺伝子再構成は「非喫煙者」または「軽度喫煙者」の患者と相関関係があることを示すエビデンスも存在しています^{3,4,7,9}。重要な点として、ALK遺伝子再構成はEGFR、HER2またはKRAS変異と同時に起こることは滅多になく、相互排他的である場合がほとんどであることが報告されています⁹。

■ALK IHC検査

ロシュ・ダイアグノスティクス(株)では、自動染色装置であるベンチマークシリーズで使用可能な全自動免疫組織化学染色(IHC)として、ベンタナ ALK (D5F3) RxDx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 ALK (D5F3)”が体外診断用医薬品として承認されています。本法はタイラマイドによる増感を採用しており、非常に高感度であるため、微量なタンパク発現の症例においても強陽性に発色させることが可能なため、陽性/陰性の簡便なスコアリング法で判定者間の良好な一致率や高い再現性を提供します。製造元であるVentana Medical Systems, Inc社の開発データでは、ALK IHC法において、切除検体、針生検検体、経気管支生検検体、および穿刺吸引細胞診からのセルブロックなど、種々のホルマリン固定パラフィン包埋(FFPE)された原発および転移性の非小細胞肺癌検体から採取した広範囲な検体を使用して検証されています。

ベンタナ OptiView ALK (D5F3) は、ホルマリン固定パラフィン包埋(FFPE)の非小細胞肺癌(NSCLC)組織・細胞中の未分化リンパ腫キナーゼ(ALK)を定性的に検出することを目的としています。本品の使用目的および対象となるALK阻害剤については、ベンタナ OptiView ALK (D5F3)の添付文書を参照ください。

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

ベンタナ OptiView ALK (D5F3) 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、癌組織又は細胞中に発現するALK融合タンパクの検出を目的とした検査キットです。詳細な使用目的および対象となるALK阻害剤については、ベンタナ OptiView ALK (D5F3) の添付文書を参照ください。

1. 製品概要

ベンタナ OptiView ALK (D5F3)

体外診断用医薬品製造販売承認番号:22900EZ00041000

■**キット構成** ※一次抗体と各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 ALK (D5F3) RxDx 商品コード:518-113735

構成試薬	成分	包装単位
一次抗体	抗ALKウサギモノクローナル抗体(D5F3)	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	25 mL (250テスト)
マルチマー-HRP	抗ウサギIgG	25 mL (250テスト)
DAB試薬	ヤギポリクローナル抗体	25 mL (250テスト)
H ₂ O ₂ 試薬	ペルオキシダーゼ標識	25 mL (250テスト)
COPPER試薬	抗ヒドロキシキノキサリン	25 mL (250テスト)

ベンタナ OptiView 増感試薬 商品コード:518-113742

構成試薬	成分	包装単位
増感用 タイラマイド-HQ	ヒドロキシキノキサリン標識 タイラマイド	5 mL (50テスト)
増感用 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	5 mL (50テスト)
増感用H ₂ O ₂ 試薬	過酸化水素	5 mL (50テスト)

■**適応機種**

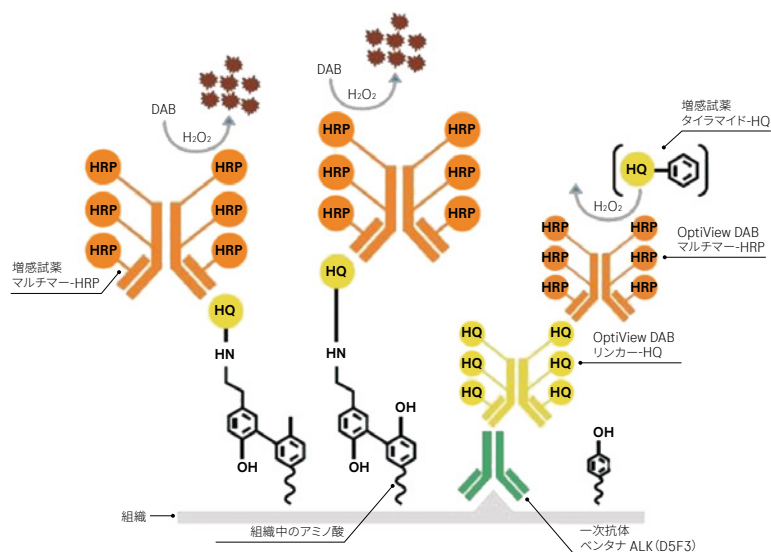
- ベンタナ ベンチマークGX (医療機器:13B1X00201000053)
- ベンタナ XTシステム ベンチマークXT (医療機器:13B1X00201000043)
- ベンタナ ベンチマークULTRA (医療機器:13B1X00201000050)
- ベンチマーク ULTRA PLUS (医療機器:13B1X00201000088)

■反応原理

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

- ①スライド標本上の抗原に一次抗体を反応させると、組織切片上に存在する対象抗原と結合します。
- ②次にベンタナ OptiView DAB ユニバーサルキットのヒドロキシキノキサリン(HQ)で標識したリンカー-HQ及びペルオキシダーゼで標識したマルチマー-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、ベンタナ OptiView 増感試薬の増感用タイラミド-HQ及び増感用H₂O₂試薬を反応させると、ペルオキシダーゼの触媒作用によりタイラミド化合物がラジカル化され、HRP近傍の組織中アミノ酸に結合します。
- ④この結合物のヒドロキシキノキサリン(HQ) に対して増感用マルチマー-HRPを反応させた後、ベンタナ OptiView DAB ユニバーサルキットの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、陽性・陰性の判定を行います。



■別途必要な器具および試薬等

●バッファー類、補助試薬、バーコードラベル

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

※ベンチマークULTRA, ULTRA PLUSの場合

○その他

器具/試薬	掲載ページ
コーティング スライドガラス	p.6 スライドガラスの準備
イムノブロック (DSファーマバイオメディカル社) またはスキムミルク	p.6 撥水防止処理
キシレン、アルコール(透徹用)	
カバーガラス、封入剤	
精製水又は脱イオン水	
光学顕微鏡	
精度管理用コントロールスライド	p.7 自家製精度管理用 コントロールスライド

II. 試薬の準備 (試薬の登録・バッファの充填)

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

III. スライド標本の準備

1. 適切な方法により固定、包埋した検体を薄切し、シラン等がコートされたスライドガラスに貼り付けます。
2. 薄切後、スライド標本は約40°Cで一晩乾燥させることを推奨します。高温での乾燥は、60°Cで30分間以内の処理を推奨します。長時間、高温に置くことは避けてください。
3. バーコードラベルプリンターより、染色プロトコール認識用バーコードラベルを印刷し、スライドガラスのフロスト部分に貼付します。

IV. 機器の定期メンテナンス

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

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

V. 検体処理 (検体採取～包埋)

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

- 検体採取後は速やかに固定液に入れてください。1時間以内が推奨されます。
- 固定は10%中性緩衝ホルマリンを用いて、6時間以上72時間以内の処理が推奨されます¹²⁻¹⁵。
- 固定液は組織に対してじゅうぶんな液量をご用意ください。組織の10倍以上の量が推奨されます。
- ティッシュプロセッサの薬液は適度に交換してください。

VI. 検体スライドの作製 (薄切～染色前処理)

■スライドガラスの準備

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

■薄切

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

■ラベルの貼付

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



■撥水防止処理

撥水とは、スライドガラス表面の変質などにより、バッファーなどの溶液をはじいてしまう現象で、染色不良(染まらない、染色ムラなど)の原因となります。スライドガラス表面の変質の要因として、製造後から長期間経過した場合や高温多湿で保管された場合、薄切後の乾燥で60 $^{\circ}$ C以上の高温に1時間以上置いた場合等があげられます。

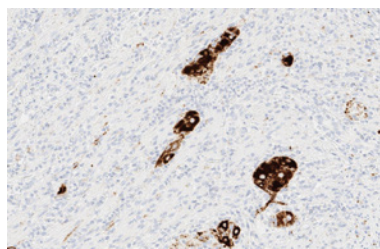
- マニュアルで行う場合：5%SMEZ前処理法
 1. 希釈済EZバッファーに5%の濃度になるようにスキムミルクを溶解します。
50mL調製する場合：希釈済EZバッファー50mL+スキムミルク2.5g
150mL調製する場合：希釈済EZバッファー150mL+スキムミルク7.5g
 2. ドーゼに移し、バーコードを貼付した脱パラフィン前のスライドを10分間浸漬します。
 3. スライド裏面をしっかりと拭き、染色モジュールにセットします。このとき、スライド表面の5%SMEZは拭き取らず、そのまま残してください。
- 自動で行う場合：IMBR自動撥水防止処理法 (ULTRAおよびULTRA PLUSのALK専用プロシージャでは使用できません)
 1. イムノブロック (DSファーマバイオメディカル社) の原液とリアクションバッファーの原液を4:1の割合で調製します。
25mL調製する場合：イムノブロック (原液) 20mL+リアクションバッファー (原液) 5mL
 2. 前処理用ディスペンサーに充填し、染色モジュールにセットします。
 3. プロトコールのPretreatmentを選択し、処理時間は24minを選択してください。
 4. 調製後は4 $^{\circ}$ Cで保管します。6週間までの安定性が確認されています。

VII. 精度管理

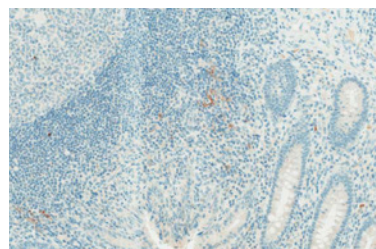
染色を行う場合には、必ず同時に精度管理用コントロールスライドの染色を行い、染色操作が適切に行われていることを確認してください。

■自家製精度管理用コントロールスライド

NordiQC (北欧品質保証機関) において、虫垂組織がALK IHC染色の良いコントロール組織であることが示されています。虫垂組織にはALK陽性細胞と陰性細胞の両方が存在しているため、一枚で陽性コントロール組織と陰性コントロール組織両方の役割を果たします。陽性対照としては、神経節細胞の細胞質に顆粒状の強いDAB発色が認められ、陰性対照としては、腺上皮細胞、筋組織、リンパ組織においてDAB発色が認められないことを確認してください。



神経節細胞におけるALK染色 (陽性対照)



腺上皮、リンパ組織におけるALK染色 (陰性対照)

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

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

VIII. 測定 (操作) 方法

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

■操作手順

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

脱パラフィンおよび前処理

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

一次抗体の反応および検出

- (1) スライド上の検体にインヒビターを1滴加え、4分間反応します。
- (2) スライド上のインヒビターを洗浄後、一次抗体を1滴加え、16分間反応します。
- (3) スライド上の一次抗体を洗浄後、リンカー-HQを1滴加え、12分間反応します。
- (4) スライド上のリンカー-HQを洗浄後、マルチマー-HRPを1滴加え、12分間反応します。
- (5) スライド上のマルチマー-HRPを洗浄後、増感用タイラミド-HQと増感用H₂O₂試薬を1滴ずつ加え、8分間反応します。
- (6) スライド上の増感用タイラミド-HQと増感用H₂O₂試薬を洗浄後、増感用マルチマー-HRPを1滴加え、8分間反応します。
- (7) スライド上の増感用マルチマー-HRPを洗浄後、DAB試薬とH₂O₂試薬を1滴ずつ加え、4分間反応します。
- (8) スライド上のDAB試薬とH₂O₂試薬を洗浄後、COPPER試薬を1滴加え、4分間反応します。
- (9) スライド上のCOPPER試薬を洗浄します。

対比染色

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

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

IX. 推奨プロトコール

■ベンチマークXT, GX

【プロシージャ名: OptiView DAB v4】

Cell Conditioning	CC1 92min
Pre-Primary Peroxidase Inhibitor	Selected
Antibody	16 min
OptiView HQ Univ Linker	12 min
OptiView HRP Multimer	12 min
OptiView Amplification	Selected
OV AMP H ₂ O ₂ , OV Amplifier	8 min
OV AMP Multimer	8 min
Counterstain	Hematoxylin II , 4 min
Post Counterstain	Bluing, 4 min

■ベンチマークULTRA, ULTRA PLUS

【プロシージャ名: U VENTANA ALK (D5F3)】

ベンチマークULTRA, ULTRA PLUSではALK専用プロシージャによる染色が必要となります。

プロトコールステップ	設定内容
Antibody (Primary)	VENTANA ALK AB - 16 min ("-7155"を選択) もしくは Negative Control
Counterstain	Hematoxylin II , 4 min
Post Counterstain	Bluing, 4 min

スコアリングガイド

非小細胞肺癌におけるベンタナ OptiView ALK (D5F3) の評価

ベンタナ OptiView ALK (D5F3) では、各症例ごとに一次抗体としてベンタナ ALK (D5F3) RxDx (商品コード：518-113735) および陰性対照として陰性コントロール ウサギモノクローナル抗体用 (商品コード：518-111182) を用いて染色することが推奨されます。染色後は、初めに陰性対照スライドにおいて、非特異的な染色やバックグラウンド染色の程度を評価し (下記の陽性および陰性の画像を参照)、その後、ベンタナ ALK (D5F3) RxDxを用いて染色されたスライドについて、腫瘍細胞におけるDAB発色の有無や程度を評価します。

注意：非小細胞肺癌においてALKの免疫染色を実施する場合、適切なクローンの一次抗体を使用することに加え、高感度の検出試薬が必要となります。ベンタナ OptiView ALK (D5F3) の染色には、ベンタナOptiView 増感試薬の使用が必須となります。

ベンタナ OptiView ALK (D5F3) のスコアリング方法を下の表1に示します。各症例について画像および説明文を参照ください。

表1: 非小細胞肺癌におけるベンタナ OptiView ALK (D5F3) の判定基準

判定	染色態度
ALK陽性	陽性腫瘍細胞数にかかわらず、腫瘍細胞の細胞質において強い顆粒状の染まりが認められる
ALK陰性	腫瘍細胞の細胞質において強い顆粒状の染まりが認められない

判定上の注意

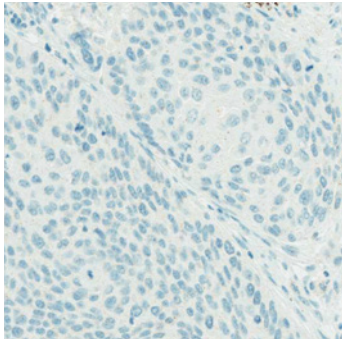
(1) 以下の染色はアーチファクトとして知られているものであるため、判定対象から除外してください。

- ・肺泡マクロファージにおける細胞質への薄い染まり
- ・神経由来細胞への染まり
- ・腺上皮細胞への染まり
- ・リンパ球浸潤による散在性リンパ球への染まり

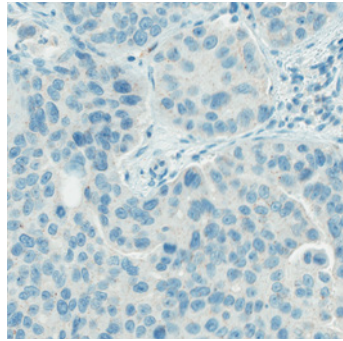
(2) 非小細胞肺癌における正常粘液細胞や壊死部分においてもバックグラウンド染色が認められることがありますが、これらの反応も判定対象から除外してください。

(3) 本品はALK融合タンパク以外に全長ALKタンパクにも反応するため、神経内分泌分化を示す腫瘍などにおいて、陽性反応が認められる場合があります。全長ALKタンパクによる染色が疑われる場合には、細胞形態や組織構築および、他の抗体染色 (クロモグラニン、シナプトフィジン、CD56など) の結果から総合的に判断することが推奨されます。

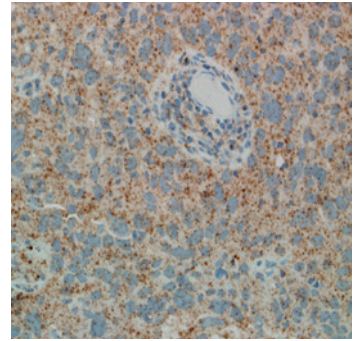
陰性症例



染色が認められない

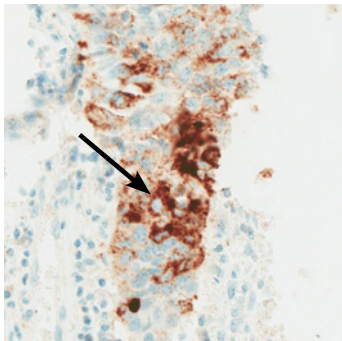


腫瘍細胞内に薄い点状の染色が認められる

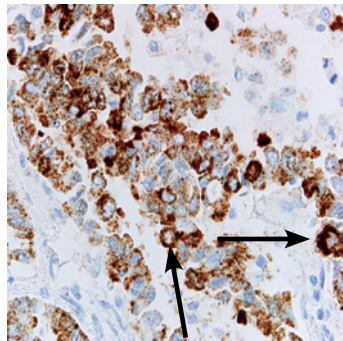


非特異的にびまん性の顆粒状染色が認められる

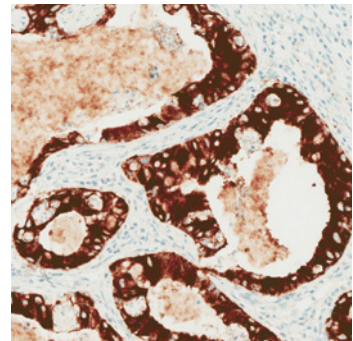
陽性症例



少数の腫瘍細胞に強い細胞質染色が認められる



複数の腫瘍細胞に強い細胞質染色が認められる

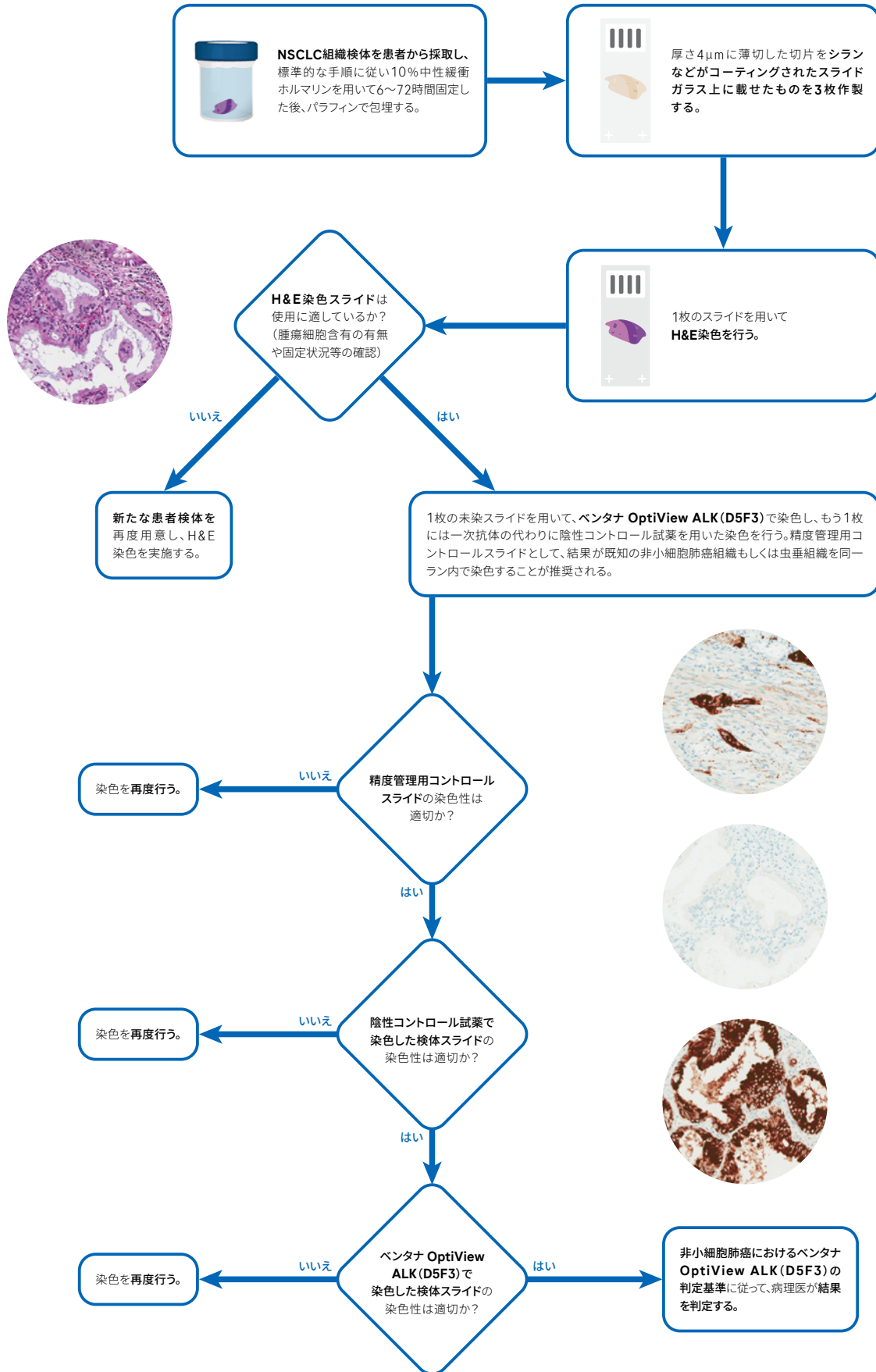


腫瘍全体に均一な強い細胞質染色が認められる

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 ALK (D5F3) 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入手し、ベンタナ OptiView ALK (D5F3) および陰性対照の染色を行う必要があります。

表1に示したスコアリング方法に従ってALK陽性およびALK陰性であるとあらかじめ判定された非小細胞肺癌組織を、対照スライドとして使用することが推奨されます。非小細胞肺癌症例の用意が難しい場合は、虫垂組織を代わりに使用することも可能です。虫垂組織にはALK陽性細胞と陰性細胞の両方が存在しているため、一枚で陽性コントロール組織と陰性コントロール組織両方の役割を果たします。正しく検査が行われたことを確認するために、陽性および陰性対照について、ランごとに非小細胞肺癌における判定基準(表1)または虫垂の判断基準(表2)に従って適切に染色されていることを確認する必要があります。対照スライドが適切に染色されていない場合、患者検体の染色を再度行う必要があります。ベンタナ OptiView ALK (D5F3) 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。

検査フロー



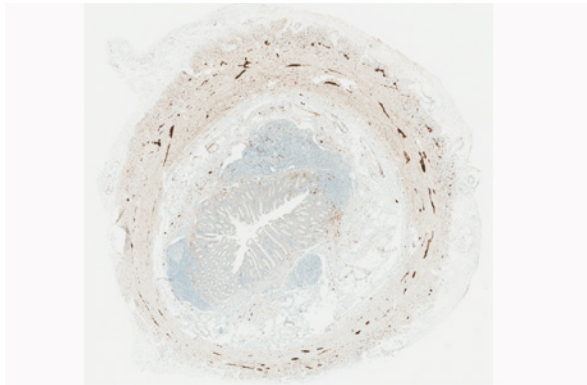
精度管理用コントロールスライド

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虫垂組織、またはALK陽性およびALK陰性の結果が既知である非小細胞肺癌組織のいずれかの使用が推奨されます。虫垂組織における陽性対照としては、神経節細胞の細胞質に顆粒状の強いDAB発色が認められ、陰性対照としては、腺上皮細胞、筋組織、リンパ組織においてDAB発色が認められないことを確認してください(表2)。結果が既知である非小細胞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、表1に記載された非小細胞肺癌における判定基準に従って行ってください。

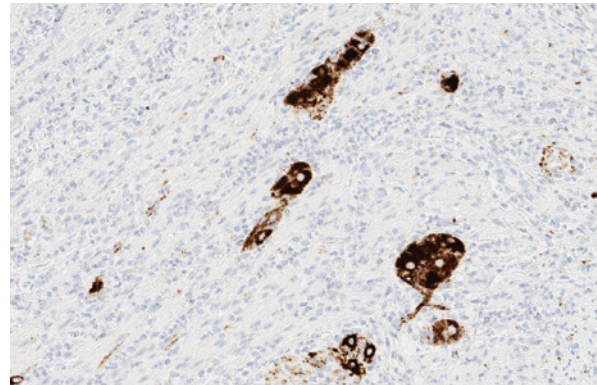
虫垂の著しい炎症領域において、リンパ組織の神経/神経内分泌構造および組織球への染色性が増加することがありますが、これは神経構造の反応性過形成によるものか、またはその他の正常な構造が炎症によって崩れることによるものであると考えられます。これらの構造が神経/神経内分泌構造および組織球であるということは、S100、Synaptophysin、CD68などの他の抗体を用いた染色によって確認されています。

表2: 精度管理用コントロールスライド(虫垂組織) 染色結果における判断基準

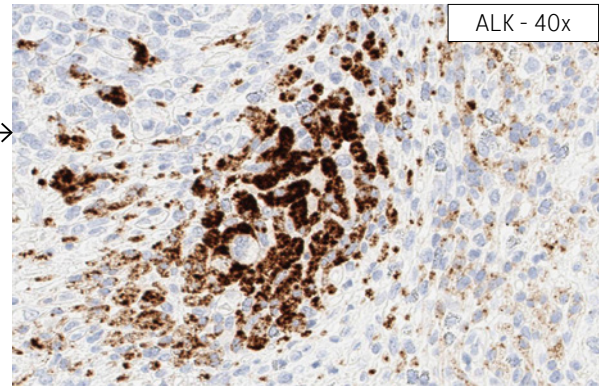
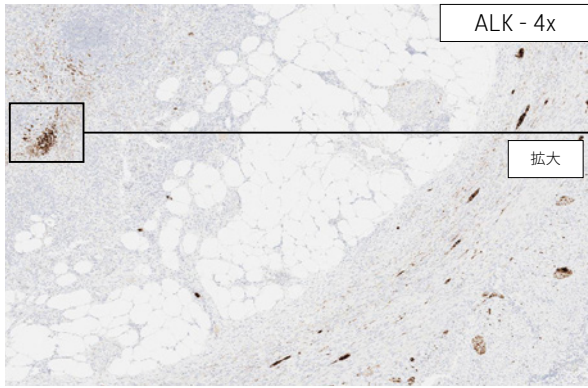
コントロールとして適切な結果	再染色が必要
神経節細胞の細胞質に強い顆粒状の染色が認められる(虫垂筋層内の神経細胞に陽性染色が認められる)	神経節細胞の細胞質に強い顆粒状の染色が認められない
腺上皮細胞、筋組織、リンパ組織に強い顆粒状の染色が認められない(リンパ球凝集部でリンパ球に弱い染色が認められる場合もある)	腺上皮細胞、筋組織、リンパ組織に、判定の妨げとなるほどの非特異的なバックグラウンド染色が認められる



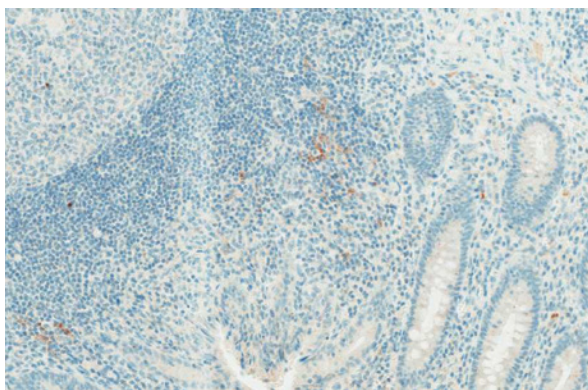
ベンタナ OptiView ALK (D5F3) で染色された虫垂(適切)。



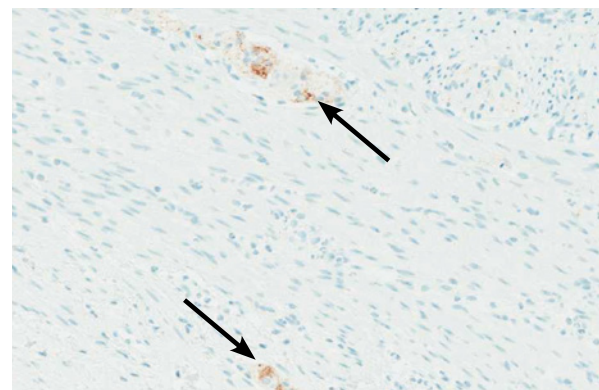
虫垂の神経節細胞の細胞質に強い顆粒状の染色が認められ、筋層に過剰な非特異染色が生じていない(適切)。



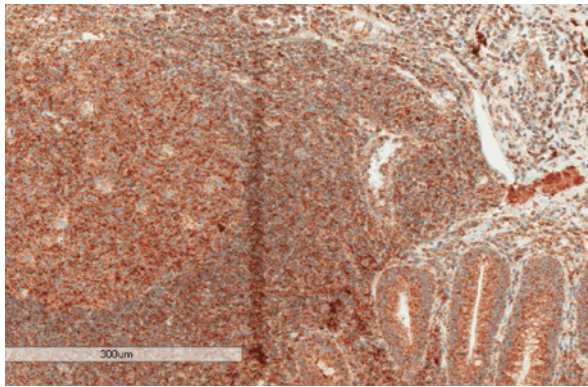
ペンタナ OptiView ALK (D5F3) を用いて染色した際、著しい炎症が生じている虫垂において神経細胞への染色が増加することがある。神経構造の反応性過形成によるものか、またはその他の正常な構造が炎症によって崩れることによるものであると考えられ、この染色は、虫垂組織の評価から除外する(みとめられた場合にも正常な染まりとして判断する)。



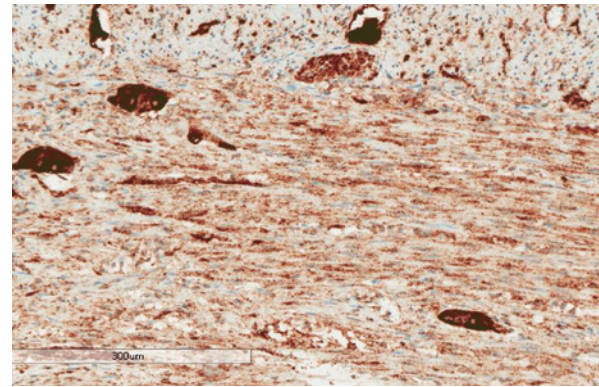
リンパ組織および腺上皮細胞の細胞質に強い顆粒状の染色が認められない(適切)。



本来陽性である、虫垂の神経節細胞の細胞質に強い顆粒状の染色が認められない(矢印部分)(適切)。



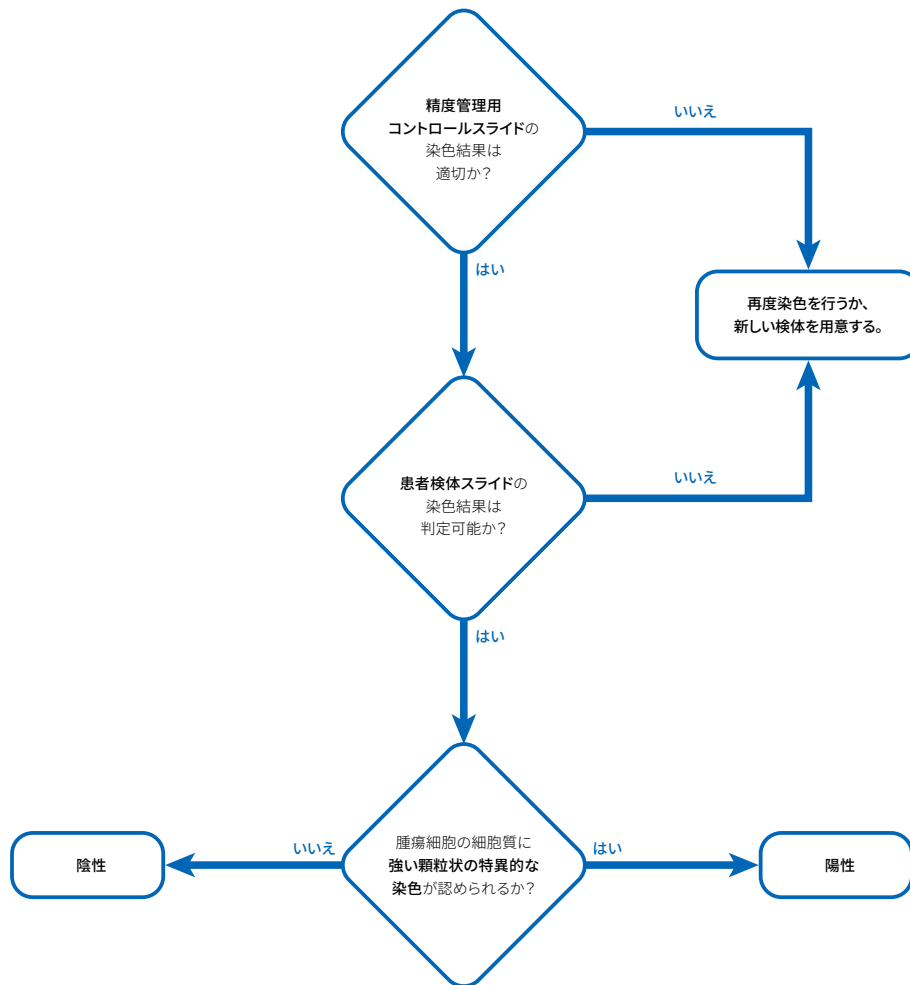
リンパ組織および腺上皮細胞に強い非特異染色が認められる(不適切)。



虫垂の筋層に強い非特異染色が認められる(不適切)。

評価フロー

ペンタナ OptiView ALK (D5F3) を用いて染色したスライドは、下図の方法で評価してください。

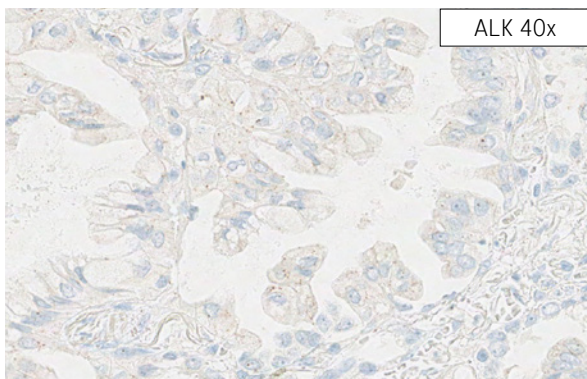
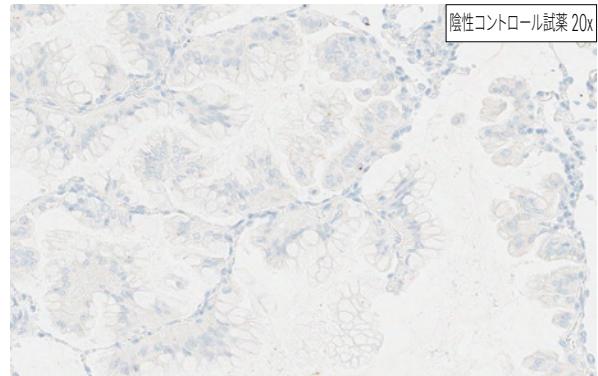
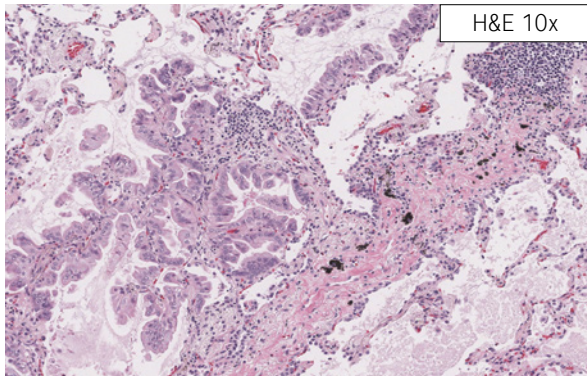


陰性例

いずれの腫瘍細胞の細胞質にも強い顆粒状の染色が認められない場合、陰性と判定します。

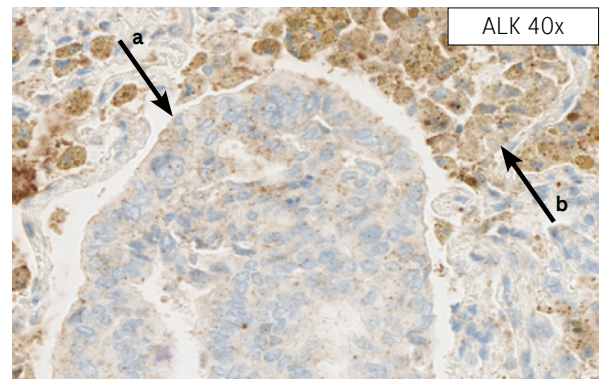
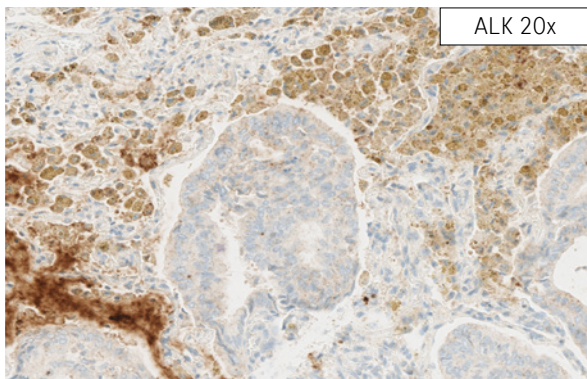
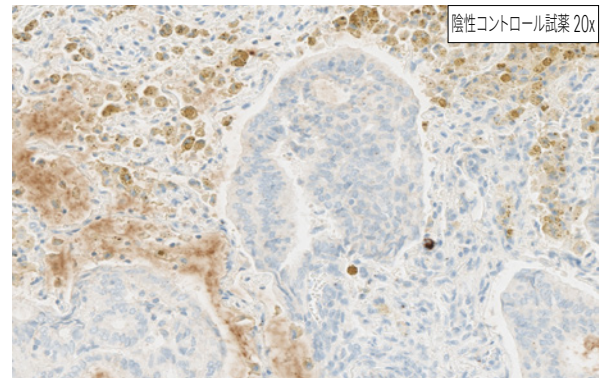
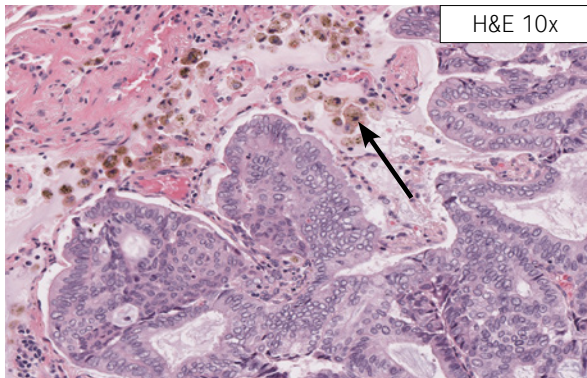
陰性例1

精度管理用コントロールスライドの陰性対照部分と比較して、顕著に強い陽性染色像がまったく認められない。



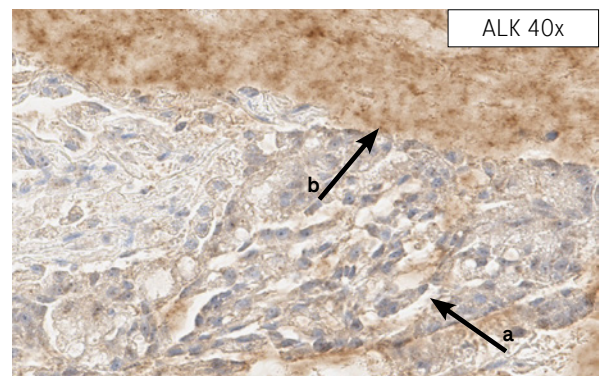
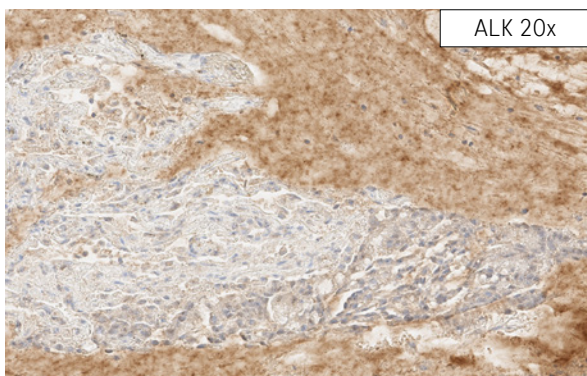
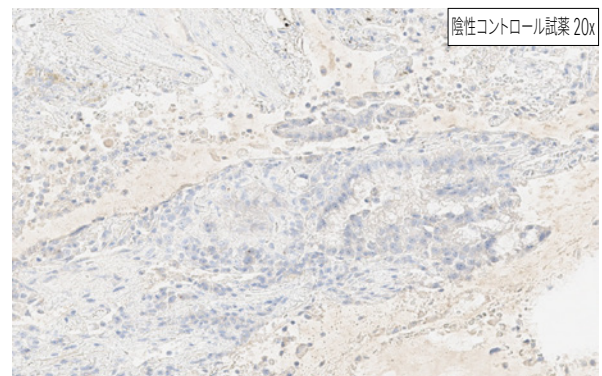
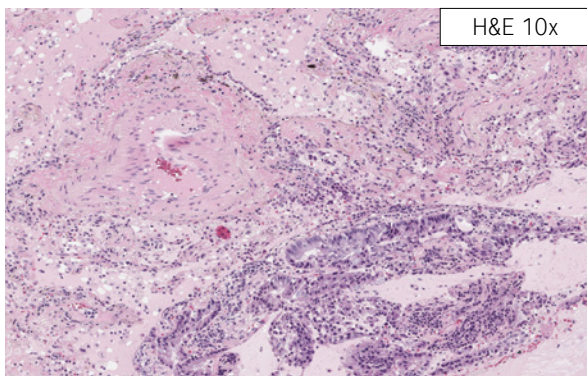
陰性例2

腫瘍細胞に弱い非特異的なびまん性で顆粒状の染色(a)、および肺胞マクロファージに染色(b)が認められる。腫瘍細胞の細胞質には強い顆粒状の細胞質染色が認められない。



陰性例3

腫瘍細胞の細胞質に弱い染色(a)、および壊死部分に非特異的な顆粒状のバックグラウンド染色(b)が認められる。

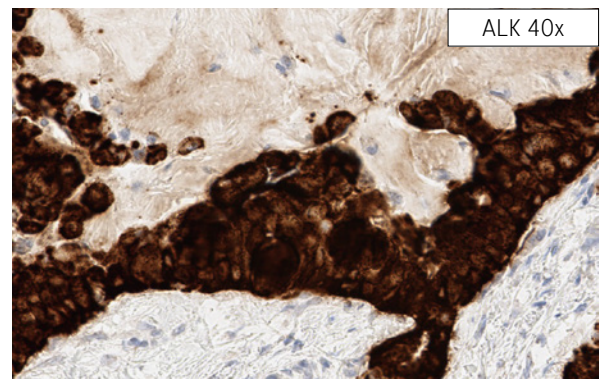
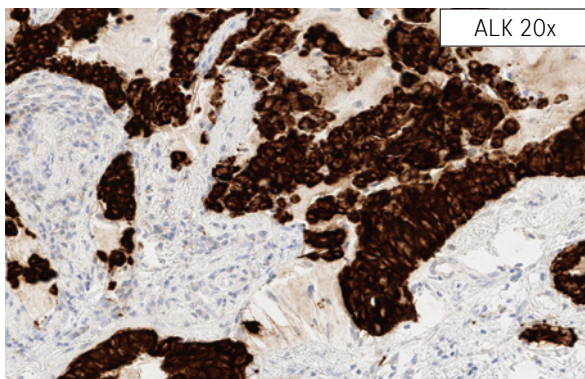
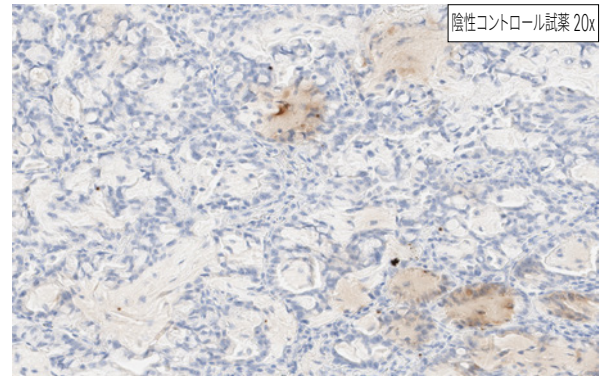
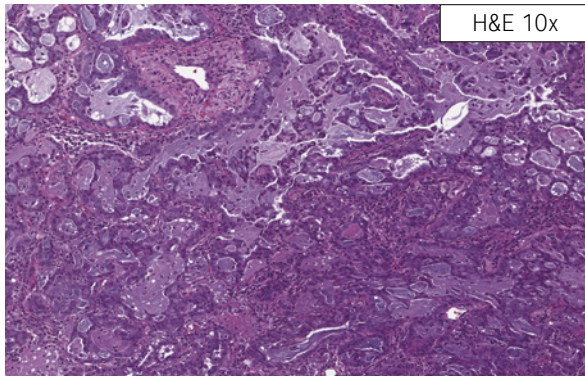


陽性例

腫瘍細胞の細胞質に強い顆粒状の染色が認められる場合、陽性と判定します。

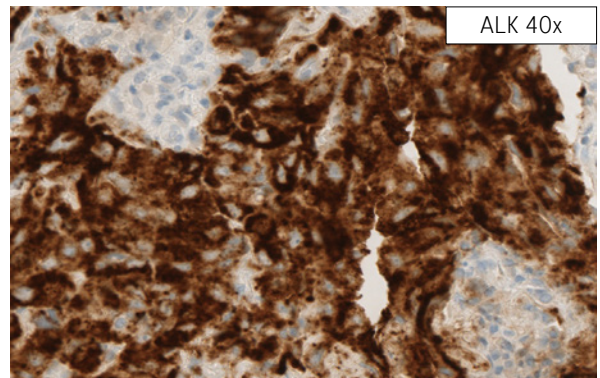
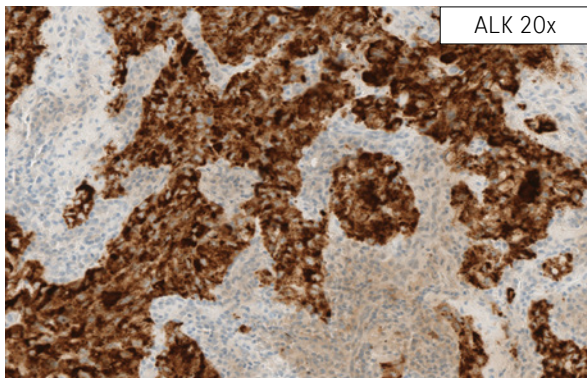
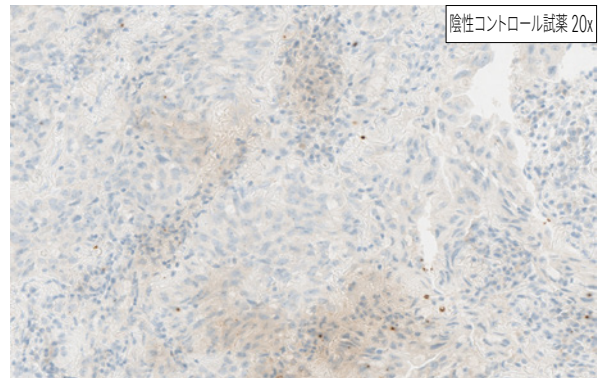
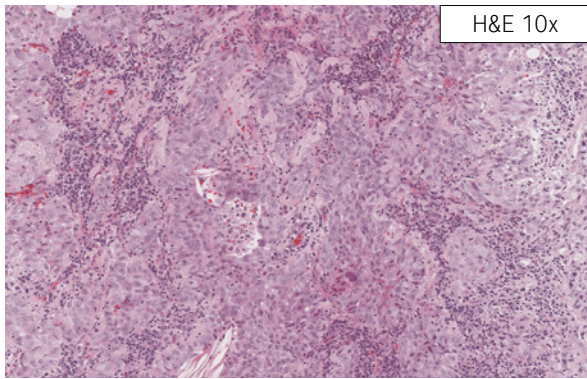
陽性例1

腫瘍全体に均一な強い顆粒状の細胞質染色が認められる。



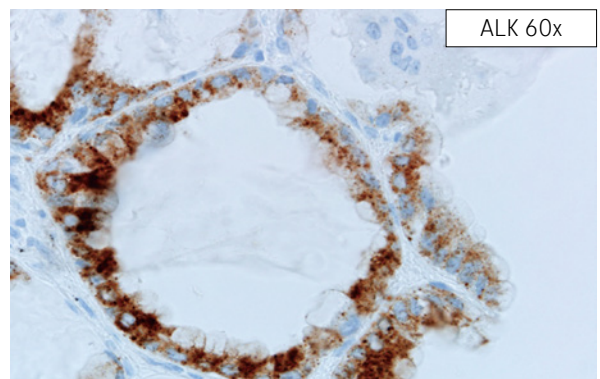
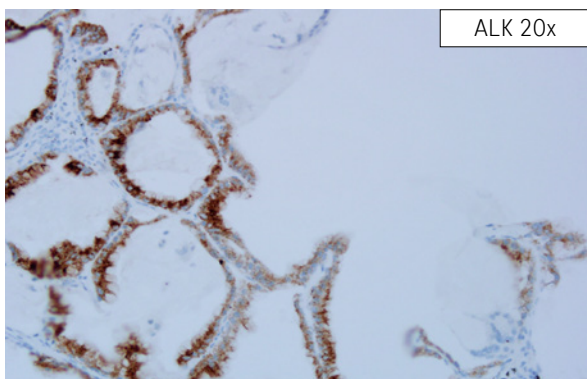
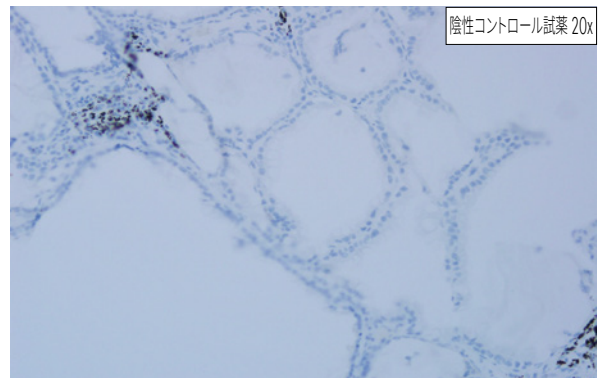
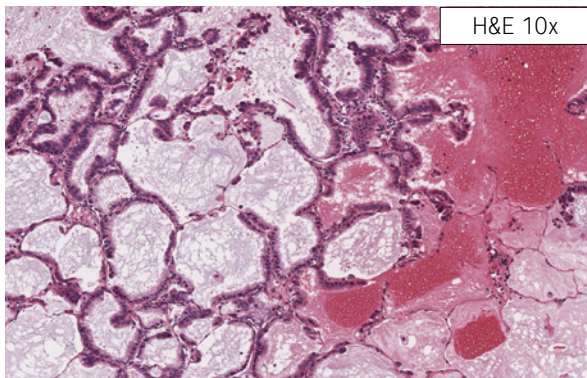
陽性例2

腫瘍全体に均一な強い顆粒状の細胞質染色が認められる。



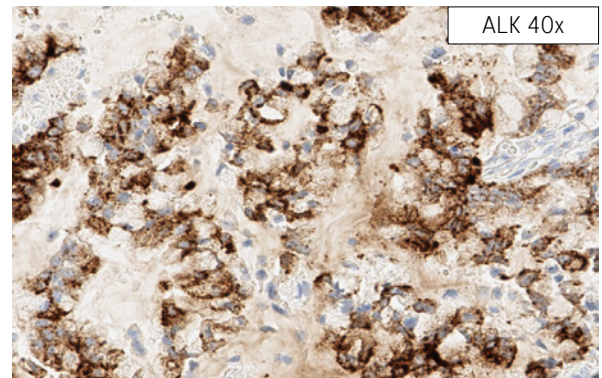
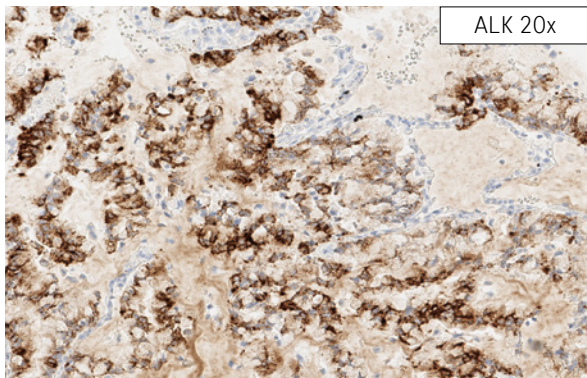
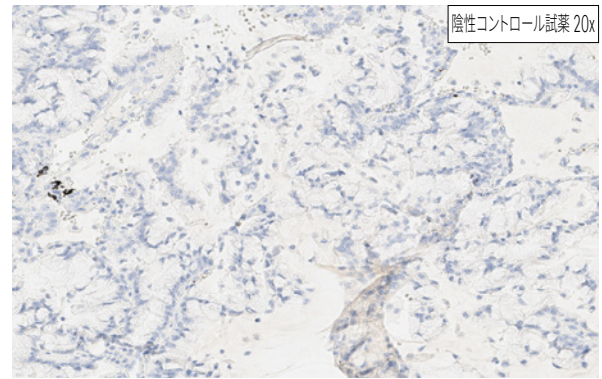
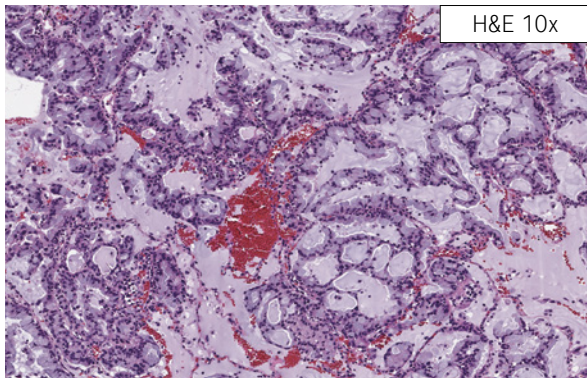
陽性例3

腫瘍全体に不均一な顆粒状の細胞質染色が認められ、一部の腫瘍細胞の細胞質に強い顆粒状の染色が認められる。



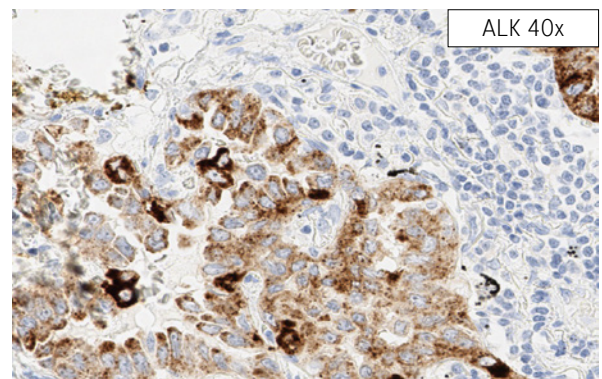
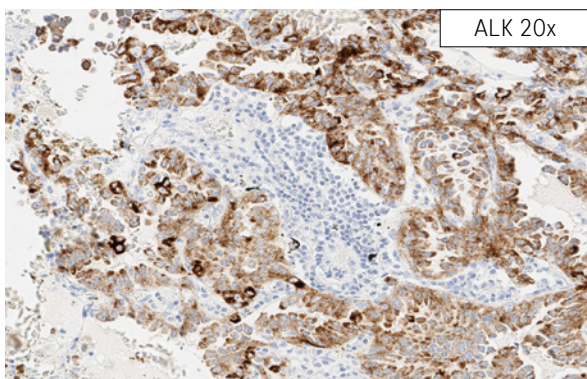
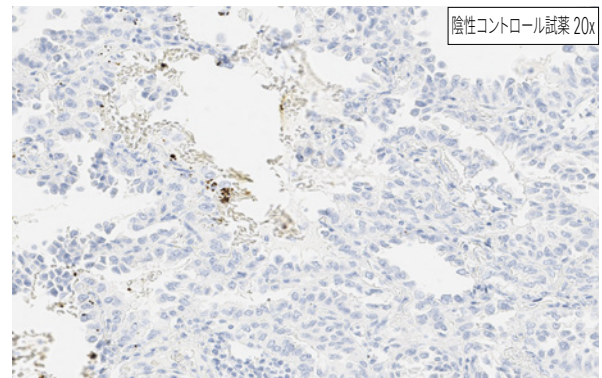
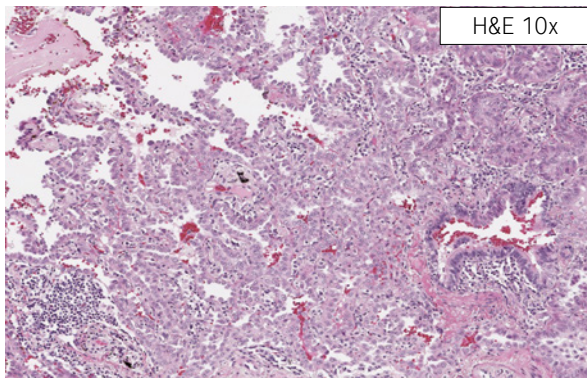
陽性例4

腫瘍全体に不均一な顆粒状の細胞質染色が認められ、一部の腫瘍細胞の細胞質に強い顆粒状の染色が認められる。



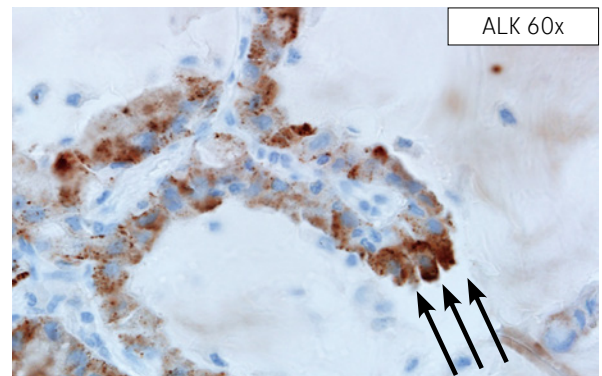
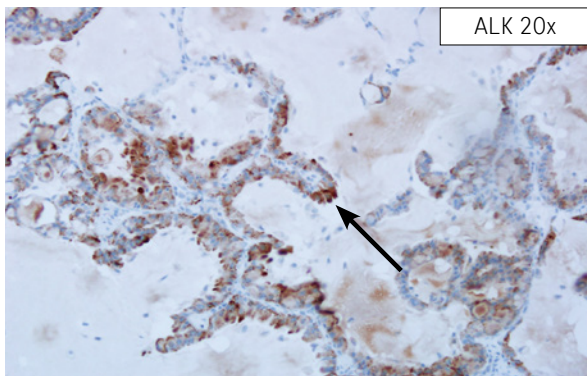
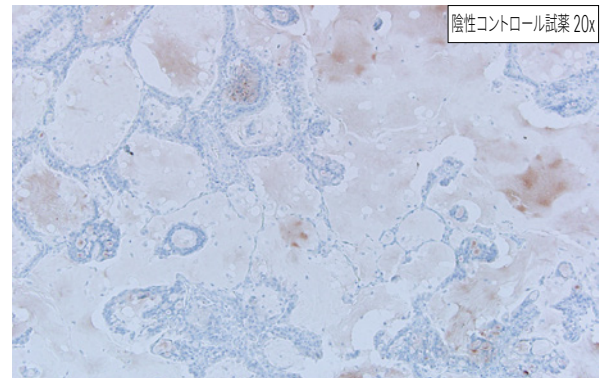
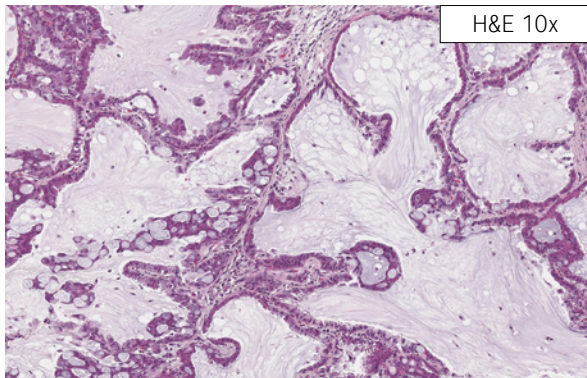
陽性例5

腫瘍全体に不均一な顆粒状の細胞質染色が認められ、少数の腫瘍細胞の細胞質に強い顆粒状の染色が認められる。



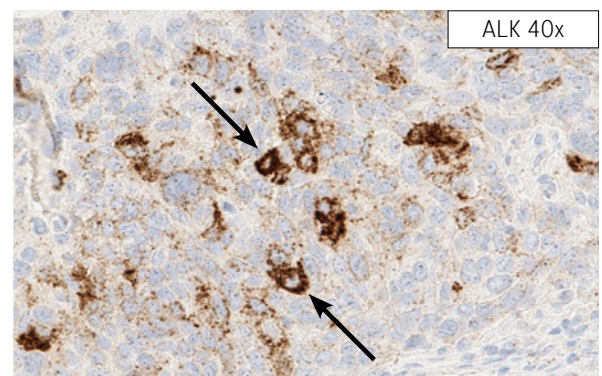
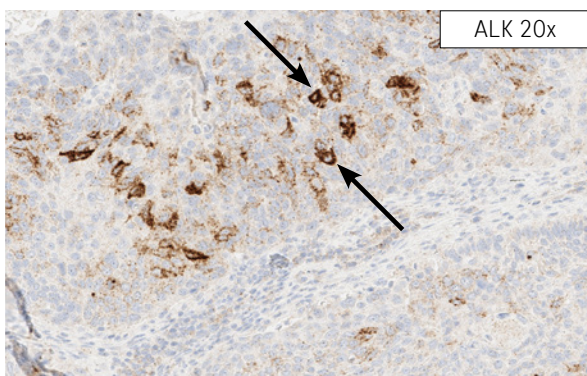
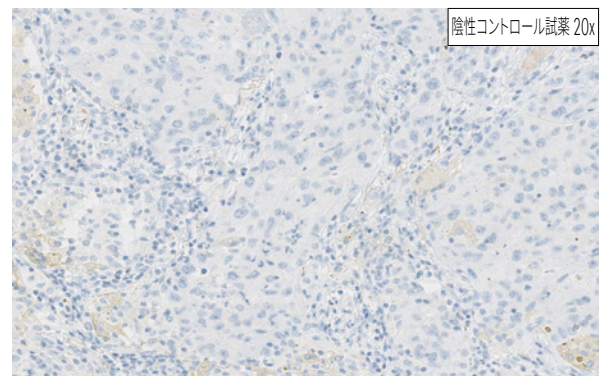
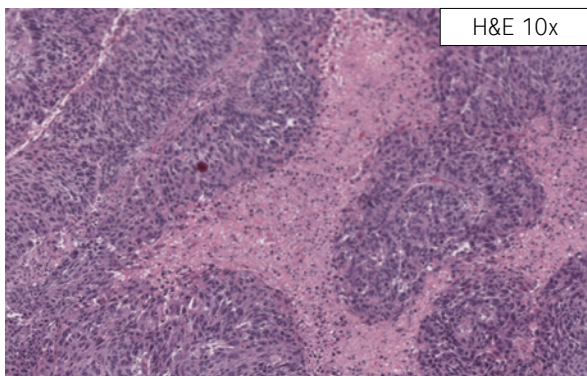
陽性例6

少数の腫瘍細胞の細胞質に強い顆粒状の染色が認められる(矢印参照)。
染まっている腫瘍細胞数にかかわらず判断されるため、陽性と判定する。



陽性例7

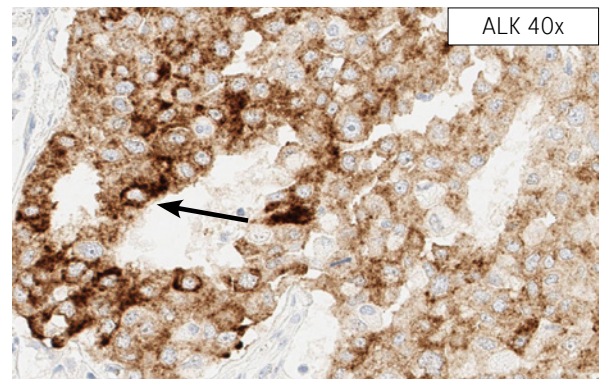
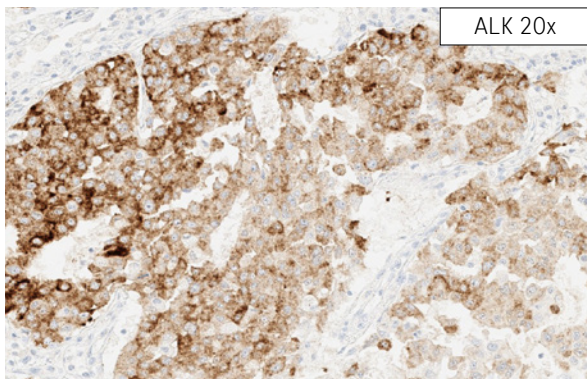
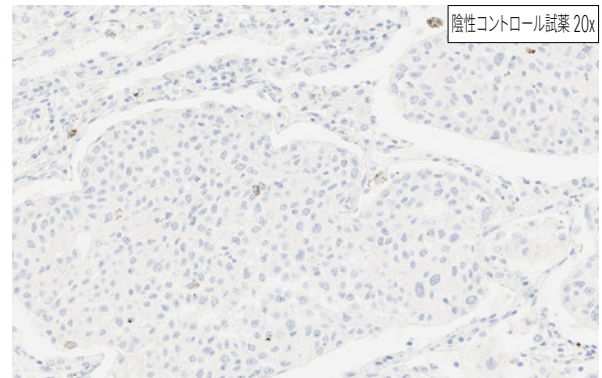
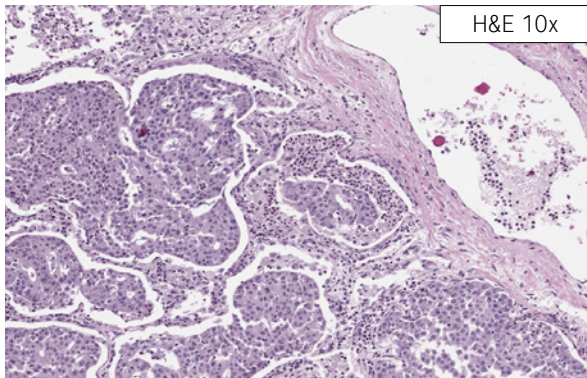
少数の腫瘍細胞の細胞質に強い顆粒状の染色が認められる(矢印参照)。
弱陽性の染まりは陽性とらないが、染まっている腫瘍細胞数にかかわらず判断されるため、陽性と判定する。



陽性例8

少数の腫瘍細胞の細胞質に強い顆粒状の染色が認められる(矢印参照)。

弱陽性の染まりは陽性とらないが、染まっている腫瘍細胞数にかかわらず判断されるため、陽性と判定する。



判定困難な例および起こりうるアーチファクト

ベンタナ OptiView ALK (D5F3) を用いて染色した結果の大半は陽性または陰性に明確に分けることが可能ですが、一部症例では解釈に困るケースがあります。

▪ 非特異的なバックグラウンド

陰性例のごく一部では、腫瘍細胞の細胞質において弱いびまん性の顆粒状パターン(陰性コントロール試薬を用いて染色された陰性対照スライドで認められるバックグラウンド染色よりも強い染まり)が認められる場合があります。製造元であるVentana Medical Systems, Inc社の検討では、このようなケースは全体の1~2%以下であり、FISH法では陰性になると考えられています。

▪ 正常細胞の細胞質における顆粒状の染色

ベンタナ OptiView ALK (D5F3) を用いて染色されたスライドおよび陰性コントロール試薬による染色スライドの両方で、肺胞マクロファージおよび正常な腺上皮細胞の細胞質に顆粒状の染色が認められる場合があります。また、神経由来の細胞は多くの場合陽性となります。これらの染色は正常細胞内で認められる染色であることから、判定対象からは除外してください。

▪ 粘液成分への非特異的な染色

検体スライドの評価に影響を及ぼすような染まりでない限り、粘液成分への非特異的な染色は問題とせず、評価対象から除外してください。

▪ 検体作製および染色工程により生じるアーチファクト

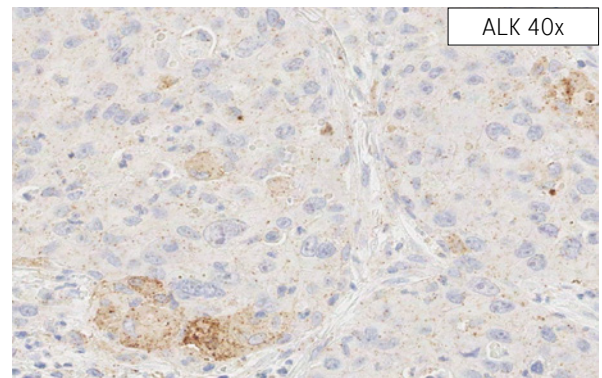
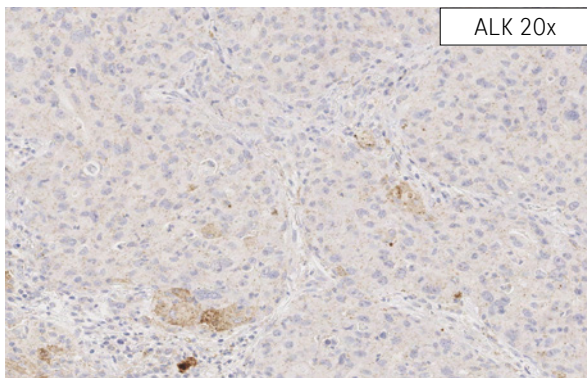
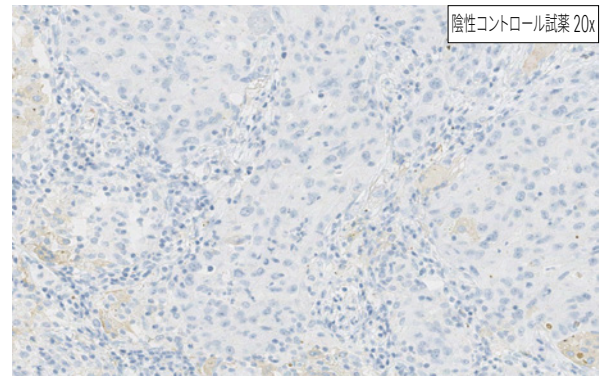
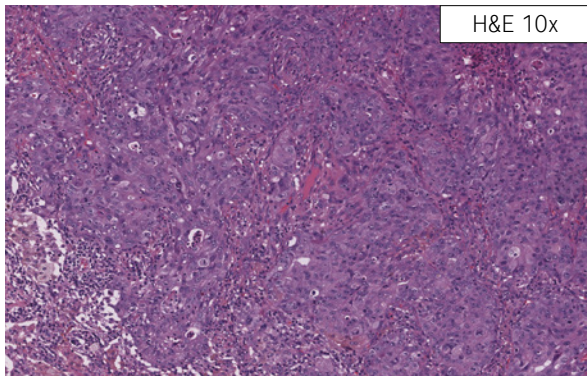
検体処理や薄切、染色工程などの過程で生じるアーチファクトもまた、染色結果の判定を困難なものにする可能性があります。固定液に入れるまでの時間や固定条件が不適切なために起こる固定ムラ、薄切の影響と思われる組織の折り目や組織の欠損、染色工程の何らかの原因により起こる組織の一部領域での染色の欠如などを始めとする様々な現象があります。アーチファクトが激しい場合には、再薄切した切片の再染色や新しい検体の入手が必要となる場合もあります。

判定が困難な例を、次ページ以降に紹介します。

判定困難な例: 非特異的なバックグラウンド

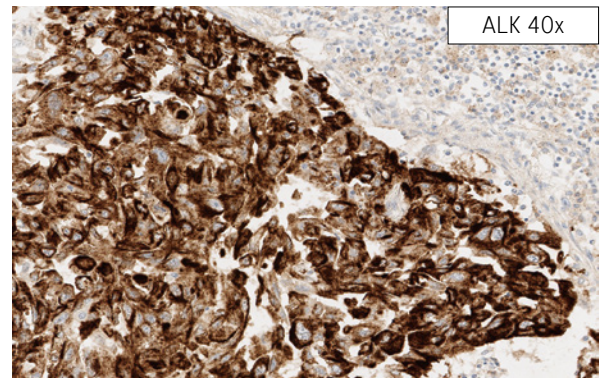
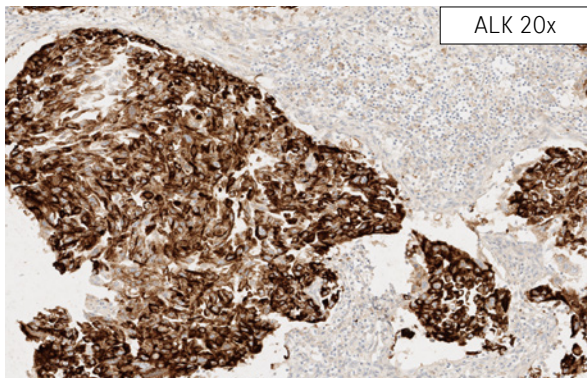
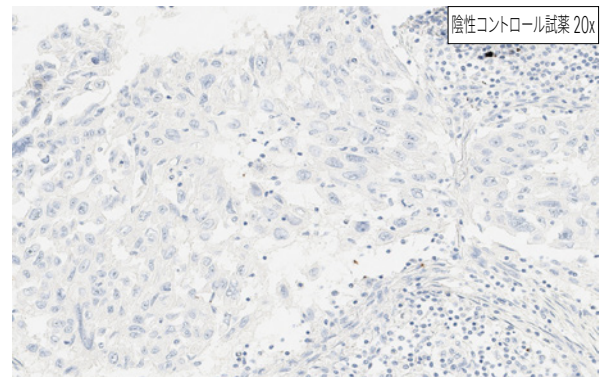
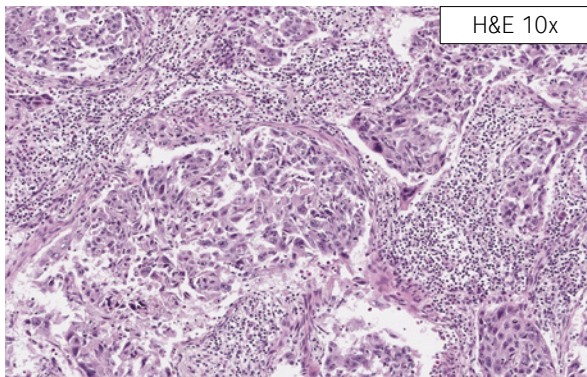
判定困難な例1: 陰性

組織全体にわたる細胞質への弱い非特異的なびまん性の顆粒状の染色が認められる。陰性コントロール試薬を用いて染色された陰性対照スライドで認められるバックグラウンド染色よりも強い染まりではあるが、弱陽性であるため、陰性と判定する。



判定困難な例2:陽性

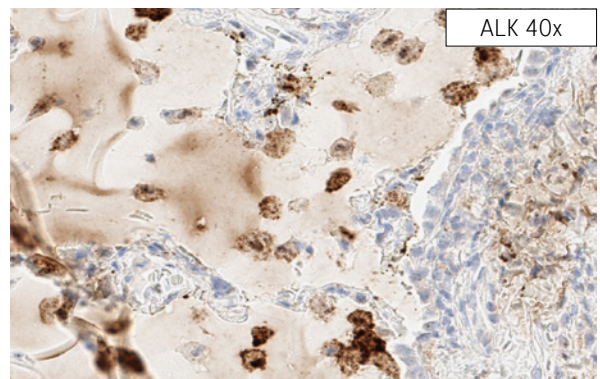
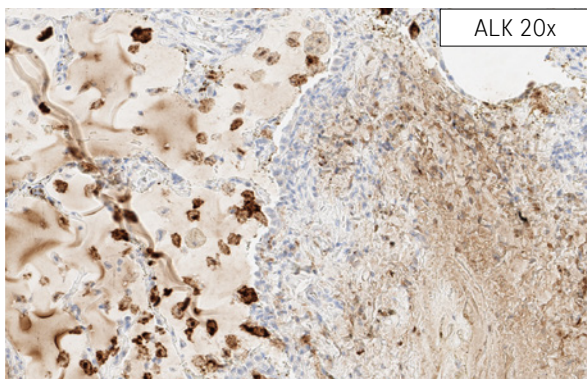
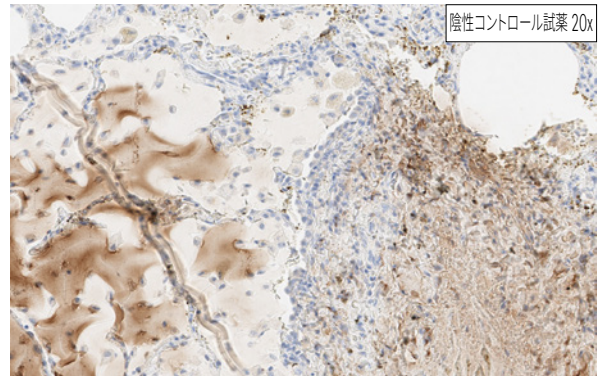
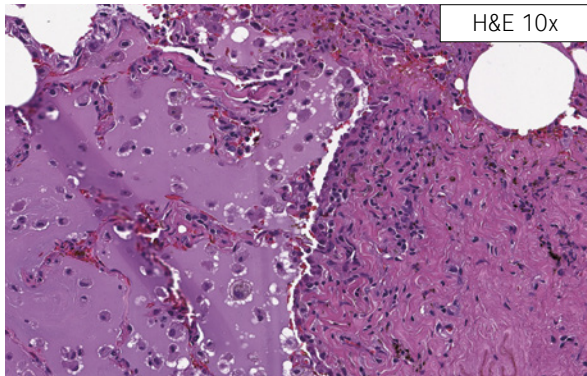
間質の細胞質に非特異的なびまん性の顆粒状の染色が認められる。陰性コントロール試薬を用いて染色された陰性対照スライドで認められるバックグラウンド染色よりも強い染まりではあるが、弱陽性程度の染まりであり腫瘍細胞への解釈に影響を与えないため、間質の染色は除外して判定を行う。腫瘍細胞自体は細胞質へ強陽性の顆粒状の染色が認められており、判定は陽性となる。



判定困難な例: 肺泡マクロファージの細胞質への顆粒状の染色

判定困難な例3: 陰性

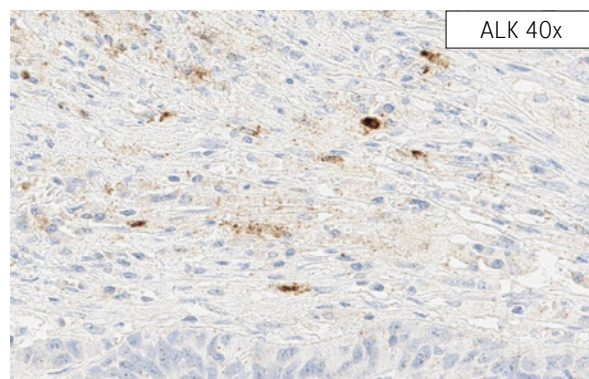
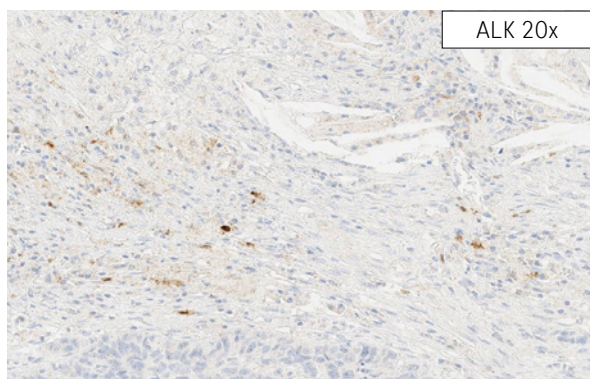
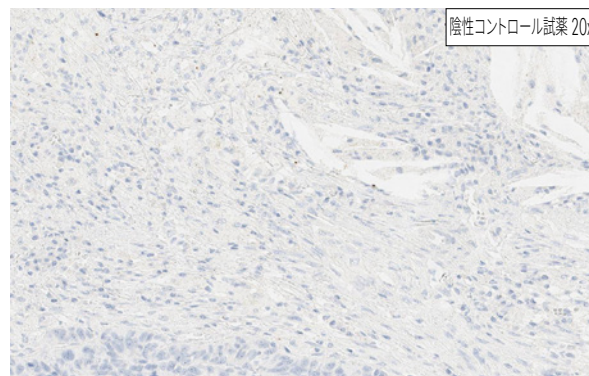
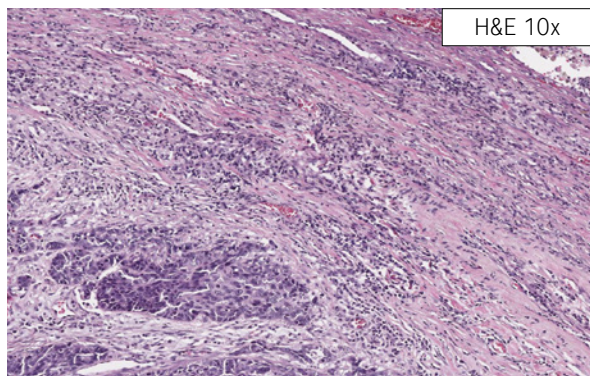
肺泡マクロファージの細胞質に強い顆粒状の染色が認められる場合があり、腫瘍細胞との鑑別が重要となる。非小細胞肺癌におけるALK染色の評価を行う際には、染色されている細胞が腫瘍細胞であることをH&E染色スライドなどでしっかりと確認することが重要である。マクロファージへの染まりは正常細胞における染色であるため、判定対象から除外する。マクロファージ以外に腫瘍細胞が染まっている場合には陰性と判断する。



判定困難な例:リンパ球浸潤における散在性リンパ球への顆粒状染色

判定困難な例4:陰性

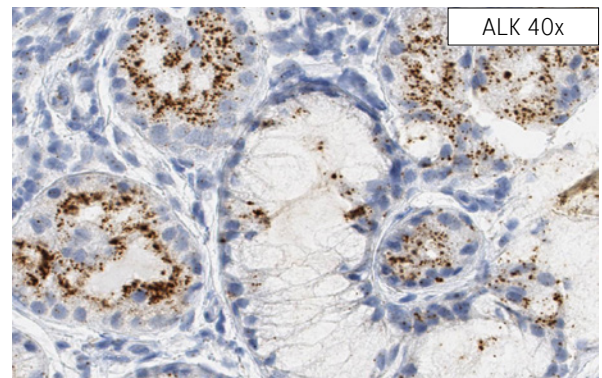
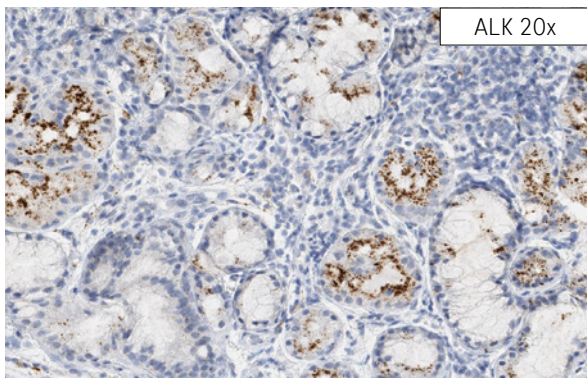
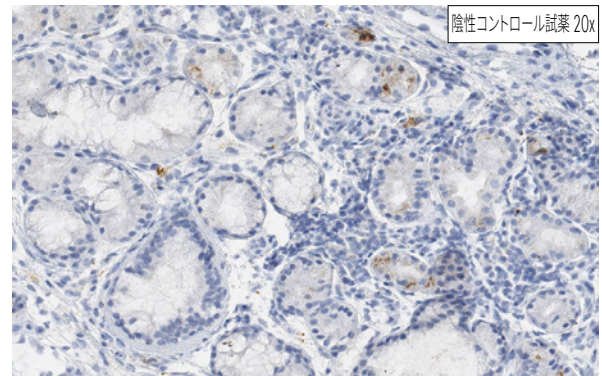
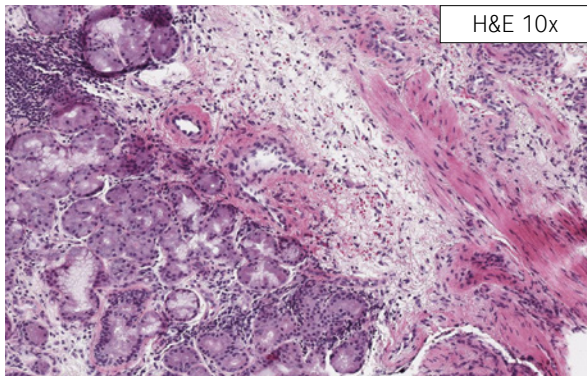
リンパ球浸潤における散在性リンパ球において強い顆粒状の染色が認められる場合がある。ベンタナ OptiView ALK (D5F3) を用いた非小細胞肺癌におけるALK染色の評価を行う際は、染色されている細胞が腫瘍細胞であることをしっかりと確認することが重要である。リンパ球への染まりは正常細胞における染色であるため、判定対象からは除外する必要がある。



判定困難な例: 正常な腺上皮細胞細胞質への顆粒状の染色

判定困難な例5: 陰性

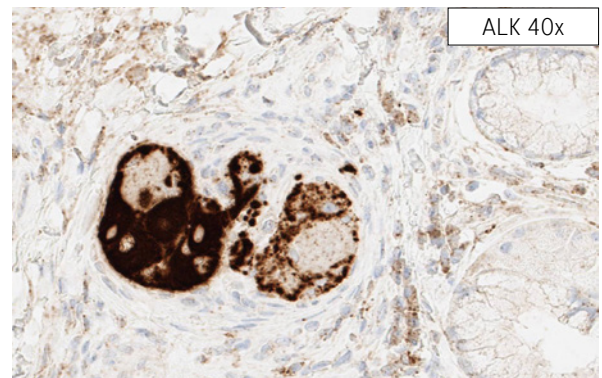
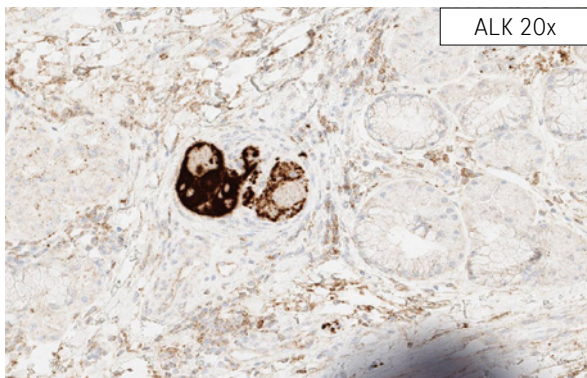
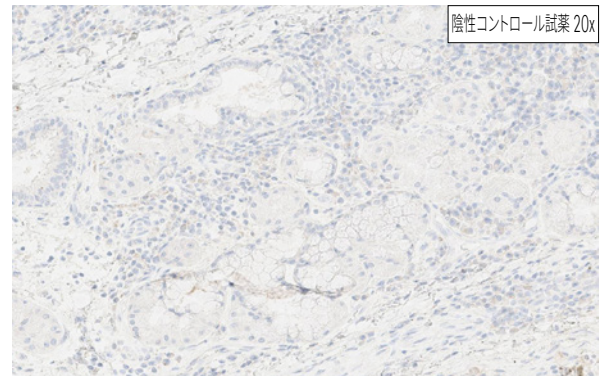
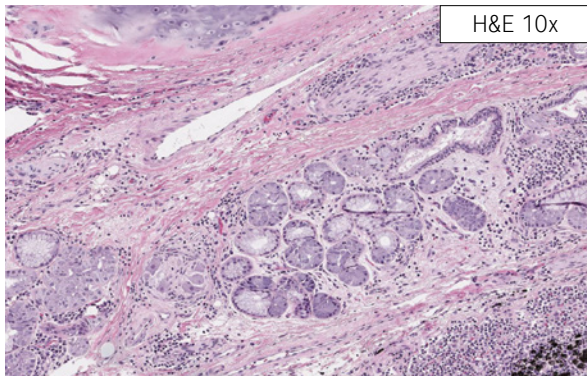
正常な腺上皮細胞の細胞質に顆粒状の染色が認められる場合がある。ペンタナ OptiView ALK (D5F3) の判定対象は腫瘍細胞のみであることから、正常腺上皮細胞への染まりは陽性と判定しない。



判定困難な例: 神経節細胞への顆粒状の染色

判定困難な例6: 陰性

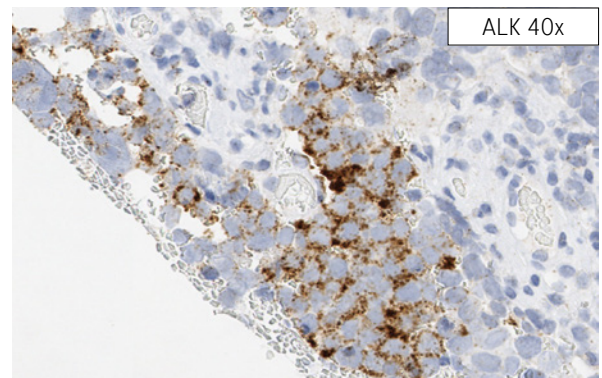
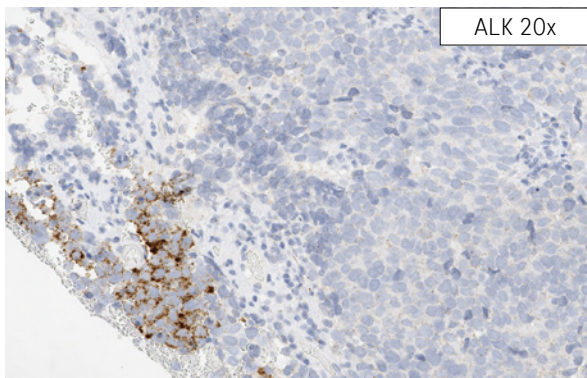
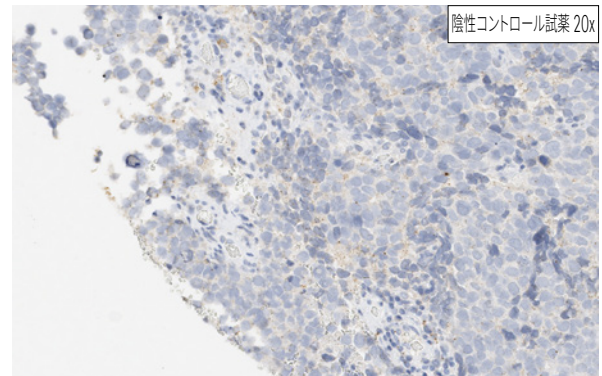
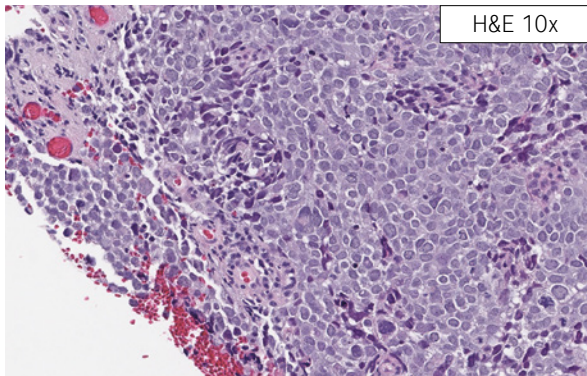
神経節細胞に顆粒状の染色が認められる場合がある。ペンタナ OptiView ALK (D5F3) の判定対象は腫瘍細胞のみであることから、判定対象からは除外する。



判定困難な例:細胞膜への強い顆粒状の染色

判定困難な例7:陰性

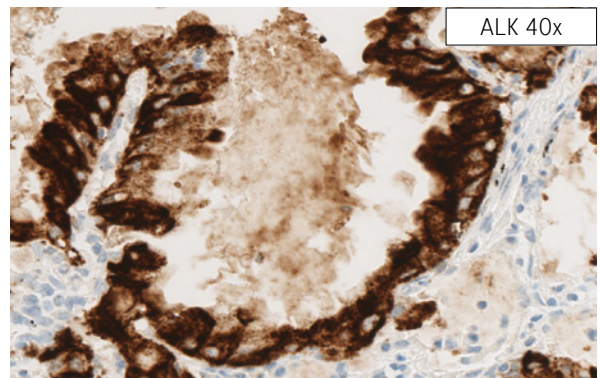
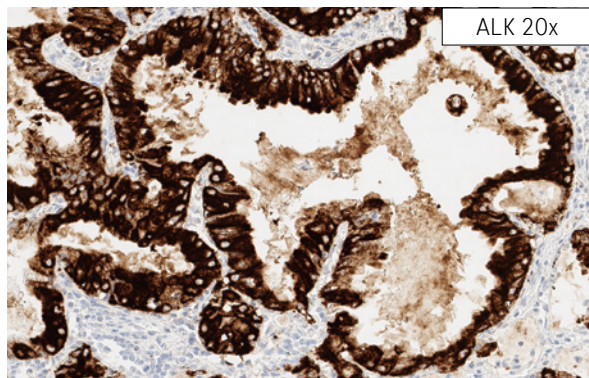
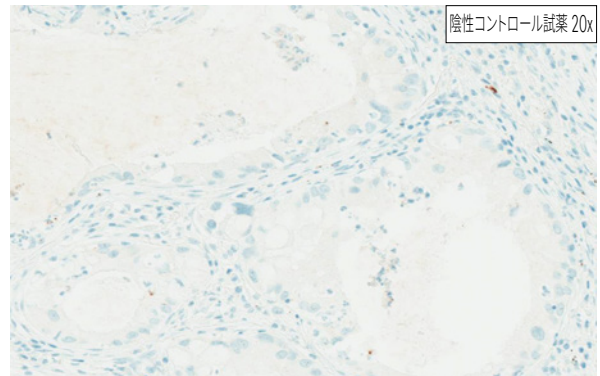
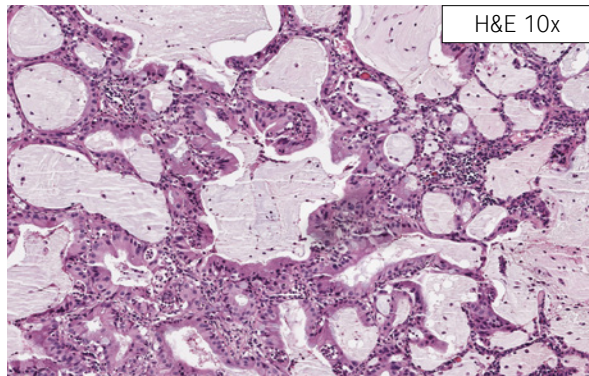
細胞膜への染まりなど、細胞質以外への染色は陽性と判定してはならない。ペンタナ OptiView ALK (D5F3) の判定対象となるのは、腫瘍細胞の細胞質のみである。



判定困難な例: 粘液成分への染色

判定困難な例8: 陽性

腫瘍細胞の染色性評価に影響を及ぼすようなものでない限り、粘液成分への染色は問題とせず、判定対象から除外する。
この症例においては腫瘍細胞の細胞質において強い顆粒状の染色が認められることから、陽性と判定される。

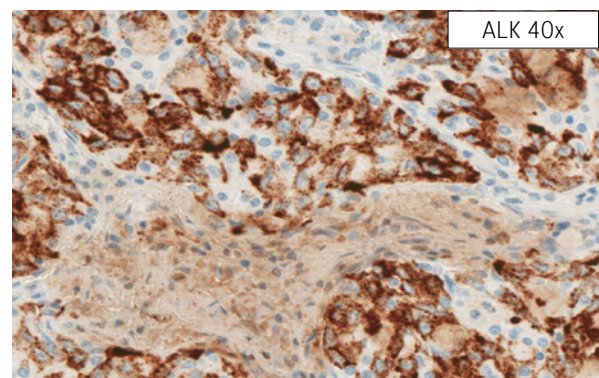
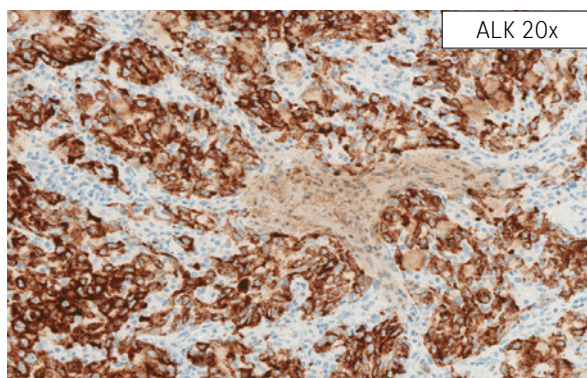
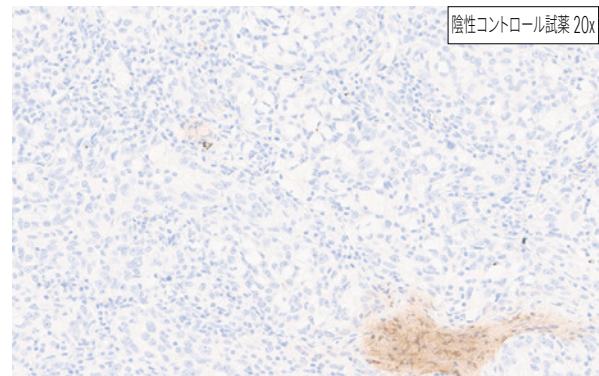
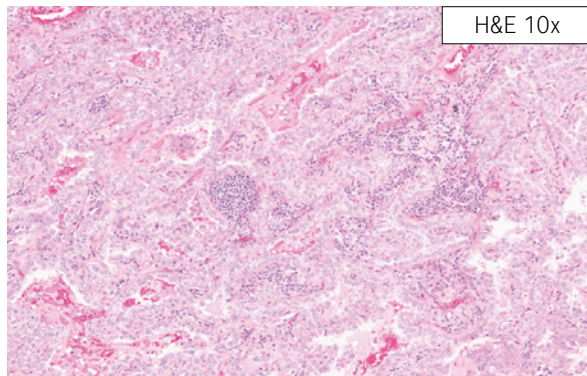


判定困難な例: DABアーチファクト

判定困難な例9: 陽性

まれに、組織内の一部の範囲に、DABの弱い発色が非選択的に認められることがある。スライド全体の評価に影響を及ぼすようなものでない限り、このアーチファクトは問題とせず、判定対象から除外して腫瘍細胞のみを判定する。腫瘍細胞の観察に影響する場合は、再染色しなくてはならない。

この症例においては腫瘍細胞の細胞質において強い顆粒状の染色が認められることから、陽性と判定される。



ベンタナ OptiView ALK (D5F3) 染色の再現性

ベンタナ OptiView ALK (D5F3) の一つの利点は、ベンタナ OptiView DAB ユニバーサルキットとベンタナ OptiView 増感試薬を使用することにより、大半の非小細胞肺癌において「陽性」か「陰性」のどちらかに明確に判定することができることです。タイラマイド法を用いた高感度な検出法であることから、判定者は、陽性腫瘍細胞の割合や染色強度といった半定量的な評価を行う必要がありません。陽性/陰性の単純な判定方法は、判定者間の一致率や再現性を高めます。

検体処理の条件と染色に与える影響

固定条件の検討

製造元であるVentana Medical Systems, Inc社では、検体処理部分の工程が染色に及ぼす影響を明らかにするため、スキッドマウスのゼノグラフトモデルで生成したNCI-H2228細胞株(ALK陽性)を用いて固定液の検討を行いました。異なる固定液を用いて様々な時間で固定された後、ベンタナ OptiView ALK (D5F3) で染色し、染色結果を比較しました。

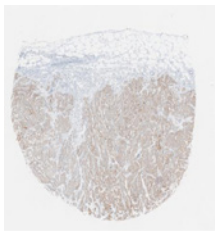
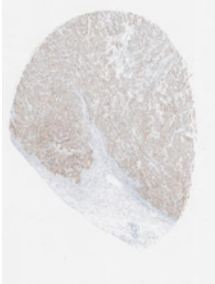
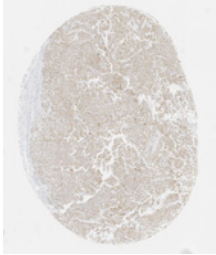
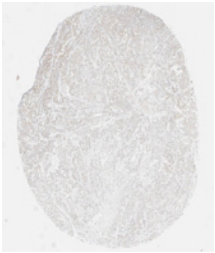
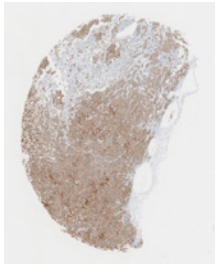
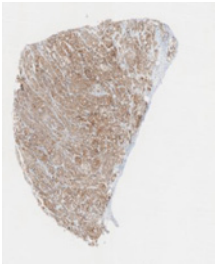
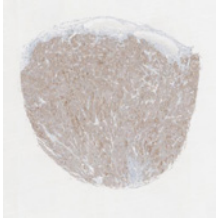
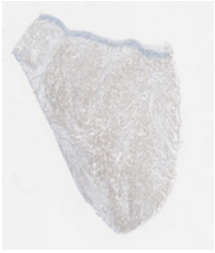
ベンタナ OptiView ALK (D5F3) の最適な染色結果を得るためには、HER2検査のASCO/CAPガイドラインに従い10%中性平衡化ホルマリン(NBF)で少なくとも6時間組織を固定させる必要があることが示されました¹²⁻¹⁵。亜鉛ホルマリンもまた、6時間以上の固定時間で許容可能な染色結果を得ることができたため、NBFと同様に使用することが可能です。ただし、NBFまたは亜鉛ホルマリンによる6時間未満での固定(固定不足)は染色強度の著しい低下をもたらしました。

NBFおよび亜鉛ホルマリン以外の、AFA(酢酸含有アルコールホルマリン)やブアン固定液などの固定液についても試験が行われましたが、検討された全ての固定時間において染色強度に著しい低下が認められたことから、これらの固定液はベンタナ OptiView ALK (D5F3) では使用できません。また、95%エタノールについては、わずか1時間の固定でALKの染色強度に大きな悪影響が認められたため、ベンタナ OptiView ALK (D5F3) の染色では使用できません。

また、固定液に浸漬するまでの時間がベンタナ OptiView ALK (D5F3) の染色結果に与える影響についても試験を行いました。ゼノグラフト検体を用いて、ベンタナ OptiView ALK (D5F3) の染色結果を比較した結果、NBFで固定するまでの時間が6時間を超えた場合、ベンタナ OptiView ALK (D5F3) に対する染色強度が著しく低下するということが示されました。

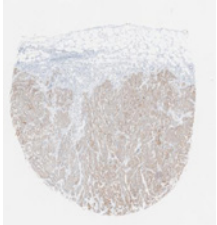
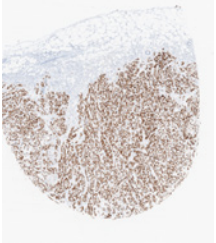
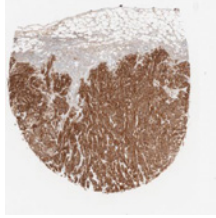
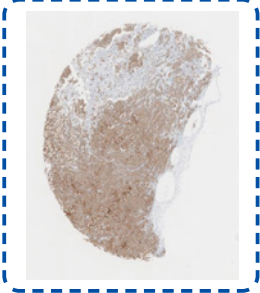
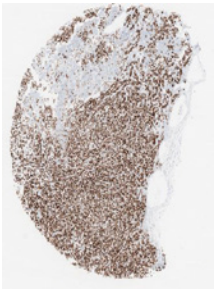
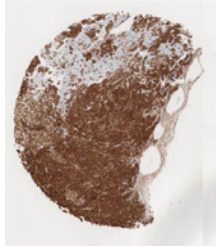
重要なポイントとしては、IHC法を用いて検出されるその他の肺癌マーカー(TTF1など)と比較して、ALKタンパクは検体処理、特に固定条件の影響を受けやすいと考えられる点です。代表的なデータを示します。ベンタナ OptiView ALK (D5F3) の最適な染色結果を確実に得るためには、固定を適切に実施される必要があります。

固定条件がベンタナ OptiView ALK (D5F3) に及ぼす影響の例

固定時間 (時間)	固定液			
	10%NBF	亜鉛ホルマリン	AFA	95%エタノール
1				
12				

Ventana Medical Systems, Inc社では、ベンタナ OptiView ALK (D5F3) の最適な染色結果を確実に得るために10%NBFを使用して6~48時間固定することを推奨しています。点線で囲まれた画像が許容される染色結果です。6時間以下の固定時間は推奨されません。ブアン(画像にはなし)、AFAや、95%エタノールなどのアルコール固定液の使用は、いずれの固定時間においても染色強度の低下を招くため推奨されません。

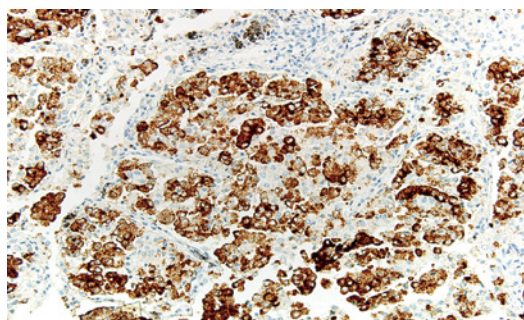
10%NBF固定における他の肺癌マーカーとの比較

10%NBF固定時間 (時間)	染色項目		
	ベンタナ OptiView ALK (D5F3)	TTF-1	EGFR
1			
12			

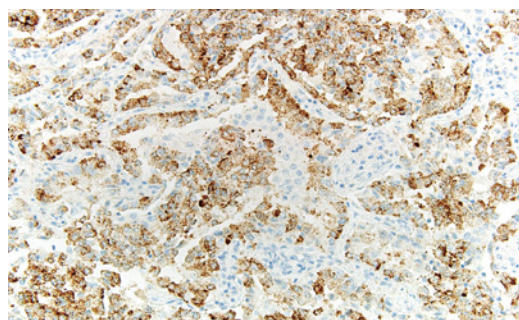
1時間と12時間の固定時間で比較した場合、TTF-1およびEGFRではベンタナ OptiView ALK (D5F3) ほど、染色強度の低下は認められません。点線で囲まれたベンタナ OptiView ALK (D5F3) の染色結果は判定基準に則ると陽性と判定できますが、固定時間が1時間の染色結果(写真上)では陰性となっています。Ventana Medical Systems, Inc社では10%NBFでの固定時間として6時間以上を推奨しています。

薄切後の安定性

製造元であるVentana Medical Systems, Inc社のデータによると、3ヶ月を超えて保管されている未染スライドをベンタナ OptiView ALK (D5F3) に使用することは避けるべきです。室温で3ヶ月以上保管したスライドでは、陽性が陰性化する症例は認められなかったものの、染色強度に顕著な低下が確認されました。以下に例を示します。このデータは10%NBFにより固定されたブロックから薄切されたスライドでのデータであり、その他の異なる固定液での検討は実施していないため、10%NBF以外の固定液では安定性が維持される期間は3ヶ月以下である可能性もあります。



薄切後すぐに染色



室温で4ヶ月間保管された後、染色

いずれの標本の染色もALK陽性と判定される染まりではあるが、薄切後すぐに染色されたスライド(左の画像)に比べて室温で4ヶ月間保管されたスライド(右の画像)では染色強度が低下している。

参考文献

1. Kutok JL, Aster JC. Molecular biology of anaplastic lymphoma kinase-positive anaplastic large-cell lymphoma. *J Clin Oncol.* 2002;20(17):3691-3702.
2. Iwahara T, et al. Molecular characterization of ALK, a receptor tyrosine kinase expressed specifically in the nervous system. *Oncogene.* 1997;14(4):439-449.
3. Soda M, et al. Identification of the transforming EML4-ALK fusion gene in non-small-cell lung cancer. *Nature.* 2007;448(7153):561-66.
4. Inamura K, et al. EML4-ALK fusion is linked to histological characteristics in a subset of lung cancers. *J Thorac Oncol.* 2008;3(1):13-17.
5. Choi YL, et al. Identification of novel isoforms of the EML4-ALK transforming gene in non-small cell lung cancer. *Cancer Res.* 2008;68(13):4971-76.
6. Koivunen JP, et al. EML4-ALK fusion gene and efficacy of an ALK kinase inhibitor in lung cancer. *Clin Cancer Res.* 2008;14(13):4275-83.
7. Shinmura K, et al. EML4-ALK fusion transcripts, but no NPM-, TPM3-, CLTC-, ATIC-, or TFG-ALK fusion transcripts, in non-small cell lung carcinomas. *Lung Cancer.* 2008;61(2):163-169.
8. Takeuchi K, et al. Multiplex reverse transcription-PCR screening for EML4-ALK fusion transcripts. *Clin Cancer Res.* 2008;14(20):6618-24.
9. Shaw AT, et al. Clinical features and outcome of patients with non-small-cell lung cancer who harbor EML4-ALK. *J Clin Oncol.* 2009;27(26):4247-4253.
10. Yi ES, et al. Correlation of IHC and FISH for ALK gene rearrangement in non-small cell lung carcinoma: IHC score algorithm for FISH. *J Thorac Oncol.* 2011;6(3):459-65.
11. McLeer-Florin A, et al. Dual IHC and FISH testing for ALK gene rearrangement in lung adenocarcinomas in a routine practice: a French study. *J of Thorac Oncol.* 2012;7(2):348-54.
12. Sheehan DC, Hrapchak BB. *Theory and practice of Histotechnology*, 2nd edition. St. Louis: C.V. Mosby Company; 1980.
13. Carson F, Hladik C. *Histotechnology: A Self Instructional Text*, 3rd edition. Hong Kong: American Society for Clinical Pathology Press; 2009.
14. College of American Pathologists Laboratory Accreditation Program, *Anatomic Pathology Checklist*, 2011.
15. CLSI. *Quality Assurance for Design Control and Implementation of Immunohistochemistry Assays: Approved Guideline-Second Edition.* CLSI document I/ LA28-A2 (ISBN 1-56238-745-6) . CLSI, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, PA 19087-1898 USA, 2011.

VENTANA はロシュの登録商標です。

Published by

ロシュ・ダイアグノスティクス株式会社

〒108-0075 東京都港区港南1-2-70

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

☎0120-600-152

diagnostics.roche.com
