

October 2019

White paper

検出キットの違いによるKi67ラベリングインデックスへの影響



執筆

黒住 昌史先生

亀田メディカルセンター

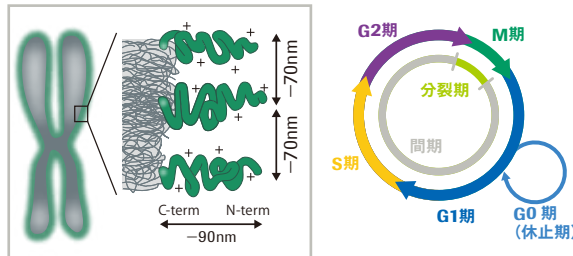
乳腺科・病理 乳腺病理部長

増殖因子としてのKi67

Ki67は細胞周期cell cycleの休止期 (G0期) 以外の全期 (G1期、S期、G2期、M期) において発現する核タンパク質であるが、その機能は良く分かっていなかった。しかし、2016年になって、生物学的界面活性剤としての機能があり、細胞分裂時に染色体が絡み合うことを防いでいることが明らかにされた¹⁾。一方、Ki67の免疫染色 (IHC) では、増殖周期にある細胞の核のみが染色されてくるため、細胞増殖能を示す有力なマーカーとして重要視されている。ルーチンの病理診断にも使われており、特に膵・消化管の神経内分泌腫瘍では組織型分類にKi67の陽性率が因子として組み込まれている^{2、3)}。

乳癌におけるKi67の意義

2009年のザンクトガレン・コンセンサス会議では、ER陽性・HER2陰性乳癌における化学内分泌療法への適応を決めるための因子としてKi67が取り上げられており、陽性率によって3群に分け、ラベリングインデックスが30%以上のhigh群には相対的な適応があるとされている⁴⁾。2011年にはサブタイプ分類にKi67を用いており、14%未満をLuminal A、14%以上をLuminal Bと定義している⁵⁾。一方、日本人を対象にした予後の検討では、low、intermediate、highの3群に分けるためには、10%と30%が最も有意なカットオフ値であることが明らかにされている⁶⁾。

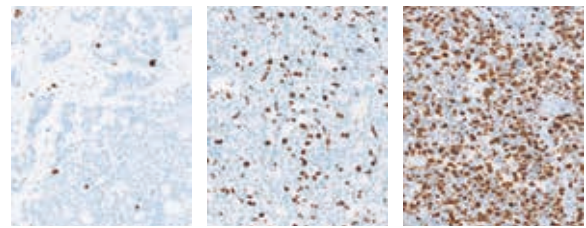


Nature. 2016 Jul 14;535(7611):308-12より引用

Ki67評価法の実際

乳癌患者の予後を推測する因子として組織学的グレード分類 (histological grading) が世界中で広く使われているが、その中の

増殖能の評価には核分裂数が用いられている。この方法では顕微鏡の強拡大の10視野の核分裂数を算定し、3段階のスコアに分けている。ある程度は正しい増殖能を反映するが、細胞数の多寡や細胞密度に影響されることが知られている。その問題を解決する方法としては核分裂指数 mitotic index が有用であるが、核分裂像の形態評価が難しく、観察者による差がやすいという欠点がある。IHC法によるKi67の評価は、核分裂指数とは異なり、陽性細胞の核が明瞭に染色されるため、観察者間の差は少ないとされている。腫瘍細胞総数に対する陽性細胞数の割合をパーセンテージで示すラベリングインデックス (LI) が用いられている。評価方法は統一されていないが、予後を推測する場合には、hot spotを選択し、500個以上の腫瘍細胞でLIを評価している報告が多い⁷⁾。



Ki67抗体と検出キット

日本では、Ki67の診断薬は体外診断用医薬品の承認を受けていないため、使用抗体や染色条件は統一されていない。一般には、表1に示すような一次抗体が用いられているが、ロシュ・ダイアグノスティクス社のKi67抗体 (クローン: 30-9) を用いる場合には、ベンタナ社の自動免疫染色装置によって染色することが必須になる。一方、検出については複数の検出用キットが提供されているため、検出キットの違いがKi67 LIへ与える影響を把握しておくことが重要である。

▶表1 代表的なKi67抗体

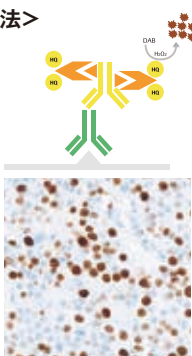
| クローン | 動物種 |
|-------|------------|
| 30-9 | ウサギモノクローナル |
| MIB-1 | マウスモノクローナル |
| SP6 | ウサギモノクローナル |
| MM-1 | マウスモノクローナル |

検出キット

<IV法>

I-VIEW DAB ユニバーサルキット

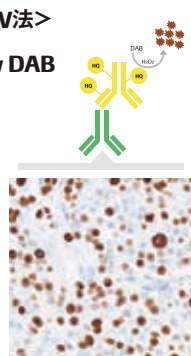
ビオチン・アビジン結合を介して、一次抗体を検出するLSAB法による検出系。内因性ビオチンの影響を受けるため、ビオチンを多く含有する臓器で使用する場合には、ビオチンのブロッキングが推奨される。



<UV法>

ベンタナ ultraView DAB ユニバーサルキット

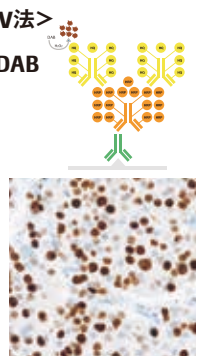
複数のペルオキシダーゼ (HRP) を二次抗体に標識したマルチマーを用いたビオチンフリーの検出系。効率よく安定した抗原抗体反応によって標的抗原を高い感度および特異度で染色する。



<OV法>

ベンタナ OptiView DAB ユニバーサルキット

マルチマーへの標識物を増やし、さらにリンカー抗体を用いることで高感度を実現。リンカー抗体には独自の非内因性ハプテンであるヒドロキシキノキサリン (HQ) を用いることにより、背景染色も軽減されている。



検出キットによるKi67 LIの差異に関する検討

【検体】

2018年4月以降に浸潤性乳癌（浸潤径1.0cm以上）と診断された50症例のホルマリン固定パラフィン包埋（FFPE）ブロックを用いた。診断時のKi67 LIを参考に、0～10%、10～20%、20～30%、30～40%、40%以上の症例が均等に含まれるように選択した。

【染色】

各症例において連続切片を作製し、一次抗体はロシュ・ダイアグノスティクス株式会社から市販されているKi67ウサギモノクローナル抗体（クローン：30-9）を用いた。検出には、同社が提供している3種類の検出キットである、I-VIEW DAB ユニバーサルキット（IVと略）、ペンタナ ultraView DAB ユニバーサルキット（UVと略）、ペンタナ OptiView DAB ユニバーサルキット（OVと略）を使用した。一連の染色はベンチマーク ULTRAを用いて、表2に示す染色条件に沿って実施した。

【評価】

全症例について、3種類の検出キットによって染色された3セットのスライドについて、同一エリア（浸潤部分、hot spot、癌細胞500個程度）を指定した後に、各スライドにおいてエリア内の癌細胞総数とKi67陽性癌細胞数をカウントし、Ki67 LIを算出した。計測者はどの検出キットを使用しているかの情報が全くないブラインドの状態で行った。

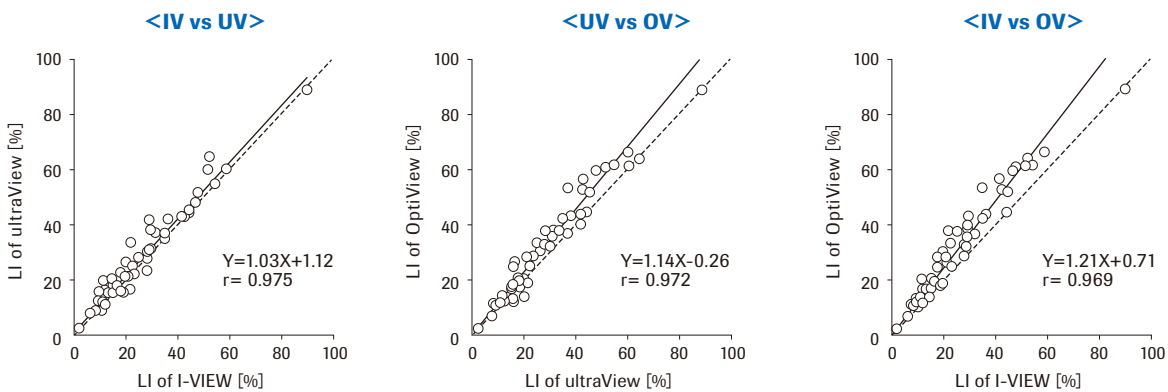
▶表2 各検出キットにおける染色条件

| | IV | UV | OV |
|-------|------------------------|-----------|-----------------------|
| 熱処理 | CC1 Standard (60m) | CC1 32m | |
| 一次抗体 | 16m / 36°C | | |
| 検出試薬 | ビオチンIg: 8m アビジン: 8m | マルチマー: 8m | リンカー: 8m マルチマー: 8m |
| オプション | AB Block | ultraWash | — |
| 核染色 | ヘマトキシリン核染色試薬Ⅱ: 8m | | |
| 色だし | 炭酸リチウム試薬: 8m | | |

3検出キットによるKi67 LIの差異

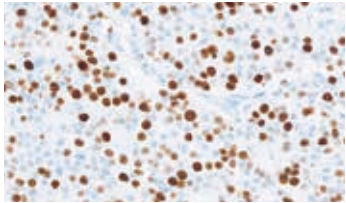
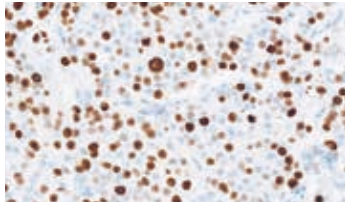
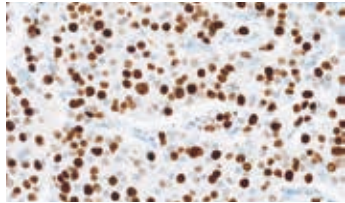
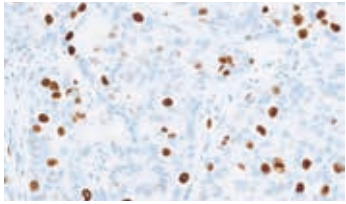
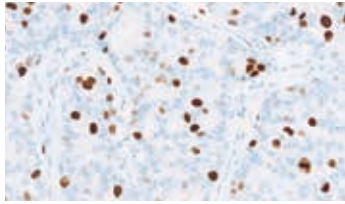
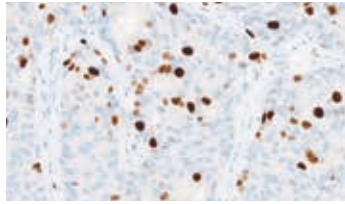
各症例において、IVとUV、UVとOV、IVとOVの組み合わせによる相関図を作成し、各相関図についてピアソンの相関係数およびスピアマンの順位相関係数を求めて相関関係について評価を行った。

- ・図1に示すように、いずれの組み合わせにおいても良好な相関関係が示され、明らかな乖離は認められなかった。
- ・最小値、最大値にはほとんど差はないが、中央値または平均値を比べると、IV、UV、OVの順に高くなっていった。UVとOVの比較では傾きが1.14、IVとOVの比較では傾きが1.21であり、OVが他の2検出キットに比べて高値となった。



| | IV vs UV | UV vs OV | IV vs OV |
|---------|---|---|---|
| Y=Xとの比較 | 差があるとは言えない 傾き: 1.03(95%CI:0.98 ~ 1.11) | OVが有意に高い 傾き: 1.14(95%CI:1.05 ~ 1.25) | OVが有意に高い 傾き: 1.21(95%CI:1.14 ~ 1.31) |
| 相関関係 | 良好(r=0.975) | 良好(r=0.972) | 良好(r=0.969) |
| 乖離検体 | なし | なし | なし |

▶図1 各検出キット間でのLIの相関図(実線: Passing-Bablok 回帰直線、破線: Y=X)

| | IV | UV | OV |
|-----|---|--|---|
| 症例A |  |  |  |
| 症例B |  |  |  |

▶図2
各検出キットによるKi67(クローン:30-9)染色画像

コメント

- ・ER陽性・HER2陰性乳癌においてKi67は有意な予後因子である。
- ・Ki67は乳癌のサブタイプであるLuminal AとLuminal Bの判別に有用である。
- ・analyticalな面では、一次抗体、検出キット、染色装置を統一することによって、Ki67の染色状況を安定化することが可能である。
- ・Ki67は乳癌患者の治療に関わる重要な因子であるので、精度管理や判定の標準化は重要である。
- ・今回の検討を行った3検出キット間では、IV、UVに比べてOVでインデックスが高く算出される傾向にあったが、良好な相関が認められた。
- ・カットオフ値に関しては、pre-analytical、analyticalな過程で様々な影響を受けるため、各施設において予後に関する統計学的な検討を行った上で、個別に設定することが望ましい。



黒住 昌史先生
亀田メディカルセンター
乳腺科・病理 乳腺病理部長

文献

- 1) Cuylen S, et al. Ki-67 acts as a biological surfactant to disperse mitotic chromosomes. Nature. 2016 Jul 14;535 (7611) : 308-12
- 2) WHO Classification of Tumours of the Digestive System, 4th ed.
- 3) WHO Classification of Tumours of Endocrine Organs, 4th ed.
- 4) Goldhirsch A, et al. Thresholds for therapies: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the primary therapy of early breast cancer 2009. Ann Oncol. 2009 Aug;20(8):1319-29
- 5) Goldhirsch A, et al. Strategies for subtypes--dealing with the diversity of breast cancer: highlights of the St. Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2011. Ann Oncol. 2011 Aug;22(8):1736-47
- 6) Kurozumi S, et al. Power of PgR expression as a prognostic factor for ER-positive/HER2-negative breast cancer patients at intermediate risk classified by the Ki67 labeling index. BMC Cancer. 2017 May 22;17(1):354.
- 7) Kobayashi T, et al. A simple immunohistochemical panel comprising 2 conventional markers, Ki67 and p53, is a powerful tool for predicting patient outcome in luminal-type breast cancer. BMC Clinical Pathology. 2013, 13:5