

MMR IHC Panel pharmDx「ダコ Omnis」* 染色結果判定マニュアル：大腸癌

MLH1 IHC pharmDx「ダコ Omnis」一次抗体

PMS2 IHC pharmDx「ダコ Omnis」一次抗体

MSH2 IHC pharmDx「ダコ Omnis」一次抗体

MSH6 IHC pharmDx「ダコ Omnis」一次抗体

MMR 一次抗体陰性コントロール（マウス）

MMR 一次抗体陰性コントロール（ウサギ）

体外診断用医薬品

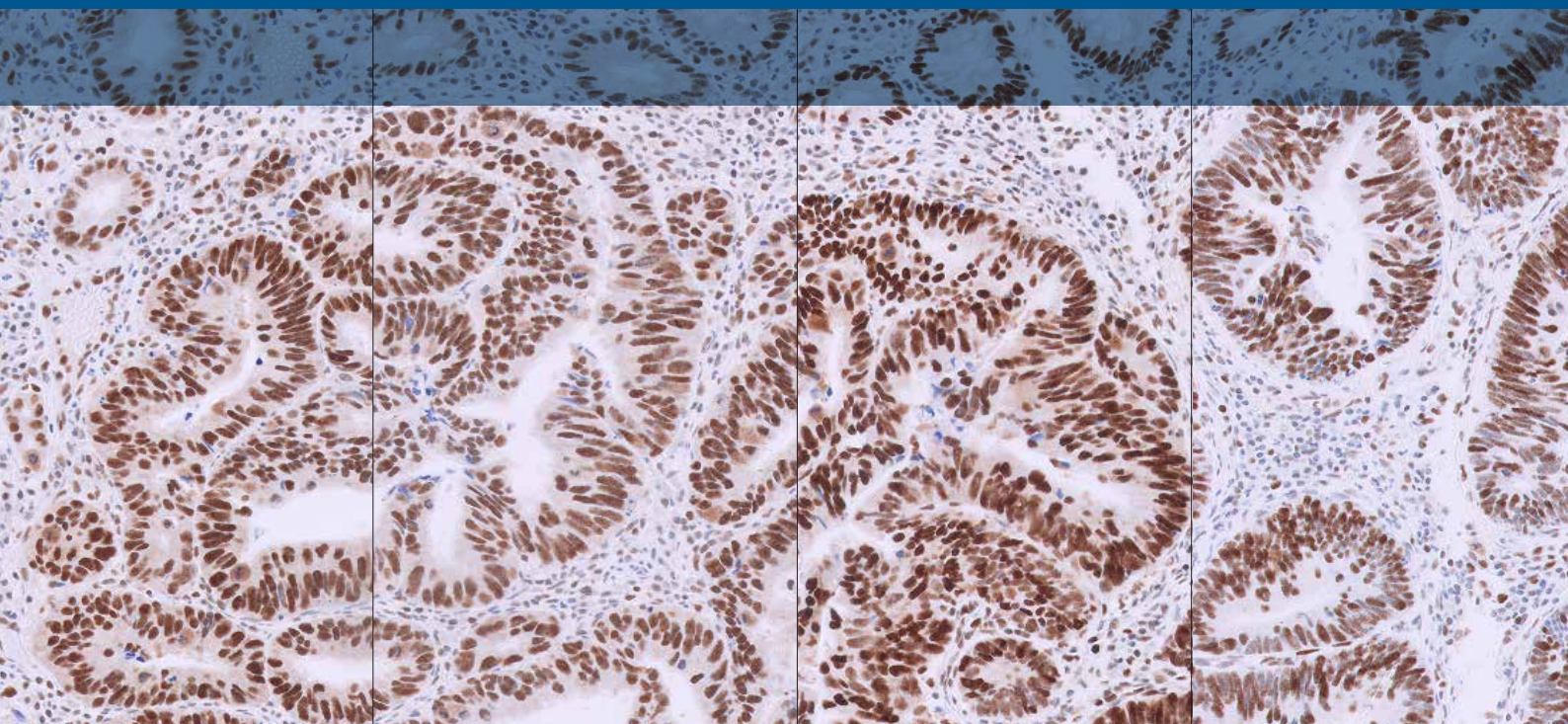
*MMR IHC Panel pharmDx「ダコ Omnis」は上記4種のMMR一次抗体を含む総称で便宜上使用します。
MLH1 IHC pharmDx「ダコ Omnis」（製造販売承認番号 30700EZX00026000）

PMS2 IHC pharmDx「ダコ Omnis」（製造販売承認番号 30700EZX00027000）

MSH2 IHC pharmDx「ダコ Omnis」（製造販売承認番号 30700EZX00025000）

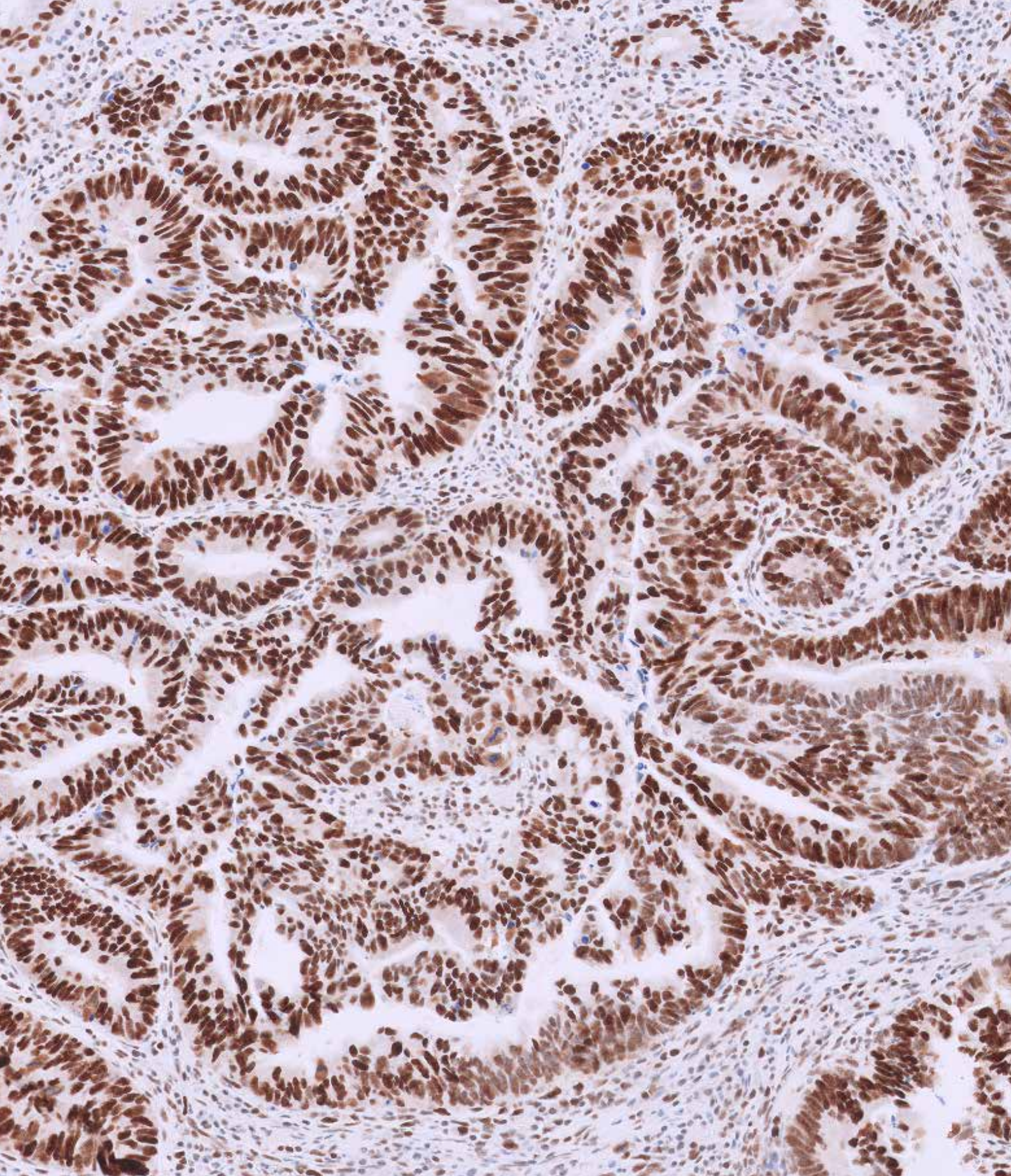
MSH6 IHC pharmDx「ダコ Omnis」（製造販売承認番号 30700EZX00028000）

*ダコ Omnis シリーズには以下のモデルがあります：ダコ Omnis 165 Duo、ダコ Omnis 165、ダコ Omnis 110、ダコ Omnis



目次

| | |
|--|-----------|
| はじめに | 4 |
| 使用目的 | 4 |
| MMR IHC Panel pharmDx「ダコ Omnis」 染色結果判定マニュアル：概要 | 4 |
| MMR の概要 | 5 |
| MMR IHC Panel pharmDx「ダコ Omnis」の概要 | 6 |
| 技術的留意点 | 7 |
| 検体採取と作製 | 7 |
| テクニカルチェックリスト | 8 |
| MMR IHC Panel pharmDx「ダコ Omnis」の染色結果判定 | 9 |
| スライド評価フローチャート | 9 |
| 検体の妥当性 | 10 |
| 特異的染色の基準 | 10 |
| 非特異的染色 | 11 |
| システムレベルのコントロール | 12 |
| 一次抗体陰性コントロールスライド | 14 |
| バイオマーカー発現状況の評価 | 15 |
| MMR 診断状況の判定 | 16 |
| dMMR IHC パターン | 17 |
| 結果の報告 | 18 |
| 大腸癌の MMR IHC Panel pharmDx「ダコ Omnis」免疫染色例 | 19 |
| 正常（pMMR）症例 | 19 |
| 欠損（dMMR）症例 | 21 |
| アーチファクトおよび非特異的染色の例 | 26 |
| MMR IHC Panel pharmDx「ダコ Omnis」の トラブルシューティングガイド | 32 |
| ご確認事項 | 34 |
| 参考文献 | 35 |



MMR IHC Panel pharmDx「ダコ Omnis」
染色結果判定マニュアル：大腸癌

はじめに

使用目的

がん組織中の MLH1、PMS2、MSH2 および MSH6 タンパクの検出（ニボルマブ（遺伝子組換え）の結腸・直腸癌患者への適応を判定するための補助）

MMR IHC Panel pharmDx「ダコ Omnis」染色結果判定マニュアル：概要

目的

MMR IHC Panel pharmDx「ダコ Omnis」で検査した FFPE 大腸癌（CRC）検体における MMR タンパク（MLH1、PMS2、MSH2 および MSH6）発現を適切に評価するため、この染色結果判定マニュアルをご活用ください。参考のため、症例の顕微鏡写真も掲載しています。

地域固有の機器および臨床データに関する詳細は、以下の試薬に対応する[電子添文](#)を参照してください。

- MMR IHC Panel pharmDx「ダコ Omnis」の一次抗体：MLH1（GE079）、PMS2（GE087）、MSH2（GE085）および MSH6（GE086）
- 一次抗体陰性コントロール（NCR）：MMR 一次抗体陰性コントロール（マウス）（GE101）、および MMR 一次抗体陰性コントロール（ウサギ）（GE102）

電子添文には、高品質の染色を確実に行うためのガイドラインと技術的留意点が記載されています。

結果の判定

染色または染色欠如に関する臨床的解釈は適切なコントロールを評価することによって裏付けられる必要があります。評価は、患者の病歴や他の検査結果を考慮し、病理医によって行われる必要があります。

MMR の概要

MMR タンパクは DNA 変異を修復します

MMR タンパクは DNA 修復に重要な役割を果たします。これらのタンパクは、DNA 鎖のミスマッチや小さなループなど、DNA 複製中に生じるエラーを検出し修正します。MMR タンパクである MLH1、PMS2、MSH2 および MSH6 は不正確な塩基を同定して除去し、正しい塩基に置き換える働きがあります。このような働きにより、DNA の完全性が維持され、有害な変異の蓄積が回避されやすくなります。

MMR 機能欠損がん細胞は免疫療法への感受性が高くなります

4 種類の MMR タンパクのいずれかの機能が欠損した場合、ゲノム不安定性が生じ、がんの発達に寄与する遺伝的変異の蓄積が生じる可能性があります。MMR機能欠損（dMMR）のがんは免疫細胞の浸潤が高頻度で認められます。このエビデンスにより、dMMR の診断状況は、がん治療での免疫療法に対する治療効果の予測に使用できることが示唆されます。

MMR IHC Panel pharmDx「ダコ Omnis」は大腸癌検体の MMR 機能欠損を検出します

アジレントは、免疫療法の恩恵を受ける dMMR 大腸癌患者を特定する際の補助となるコンパニオン診断薬として使用するために、MMR IHC Panel pharmDx「ダコ Omnis」を開発しました。MMR IHC Panel pharmDx「ダコ Omnis」はダコ Omnis 装置上で全自動免疫組織化学染色（IHC）アッセイとして EnVision FLEX 検出システムと共に使用します。MMR IHC Panel pharmDx「ダコ Omnis」の MMR タンパク質のいずれかの IHC 染色の消失は患者症例の dMMR の診断状況を示します。

MMR IHC Panel pharmDx「ダコ Omnis」の概要

MMR IHC Panel pharmDx「ダコ Omnis」は MLH1、PMS2、MSH2 および MSH6 に対する MMR 一次抗体および 2 種類の一次抗体陰性コントロール（NCR）から構成されています。各抗体のバイアルは個別包装されており、60 回の検査に十分な量の 12 mL が入っています。

表 1：MMR IHC Panel pharmDx「ダコ Omnis」に対応する一次抗体と一次抗体陰性コントロール。

| MMR IHC Panel pharmDx「ダコ Omnis」 | 一次抗体陰性コントロール（NCR） |
|--|-------------------------------------|
| MLH1 IHC pharmDx「ダコ Omnis」一次抗体、型番 GE07961-5J | MMR一次抗体陰性コントロール（マウス）、型番 GE10161-5J |
| MSH2 IHC pharmDx「ダコ Omnis」一次抗体、型番 GE08561-5J | |
| MSH6 IHC pharmDx「ダコ Omnis」一次抗体、型番 GE08661-5J | MMR 一次抗体陰性コントロール（ウサギ）、型番 GE10261-5J |
| PMS2 IHC pharmDx「ダコ Omnis」一次抗体、型番 GE08761-5J | |

各試薬は、ダコ Omnis* を使用して FFPE 検体の IHC 染色手順の完了に必要なプロトコールに合わせて最適化されています。検体を 4 種類の一次抗体のうちの 1 つ、または 2 種類の NCR のうちの 1 つと反応させた後、パーオキシダーゼブロッキング試薬、2 種類のリンカー試薬、デキストランポリマー骨格に二次抗体分子とパーオキシダーゼ分子が結合したポリマー試薬で反応させます（図 1）。その後、基質溶液を添加すると、酵素変換により生成された反応生成物の沈殿物が抗原部位に形成されます。さらに、必要に応じて検体を対比染色し、カバーガラスで封入します。検査結果は明視野顕微鏡を使用して判定します。

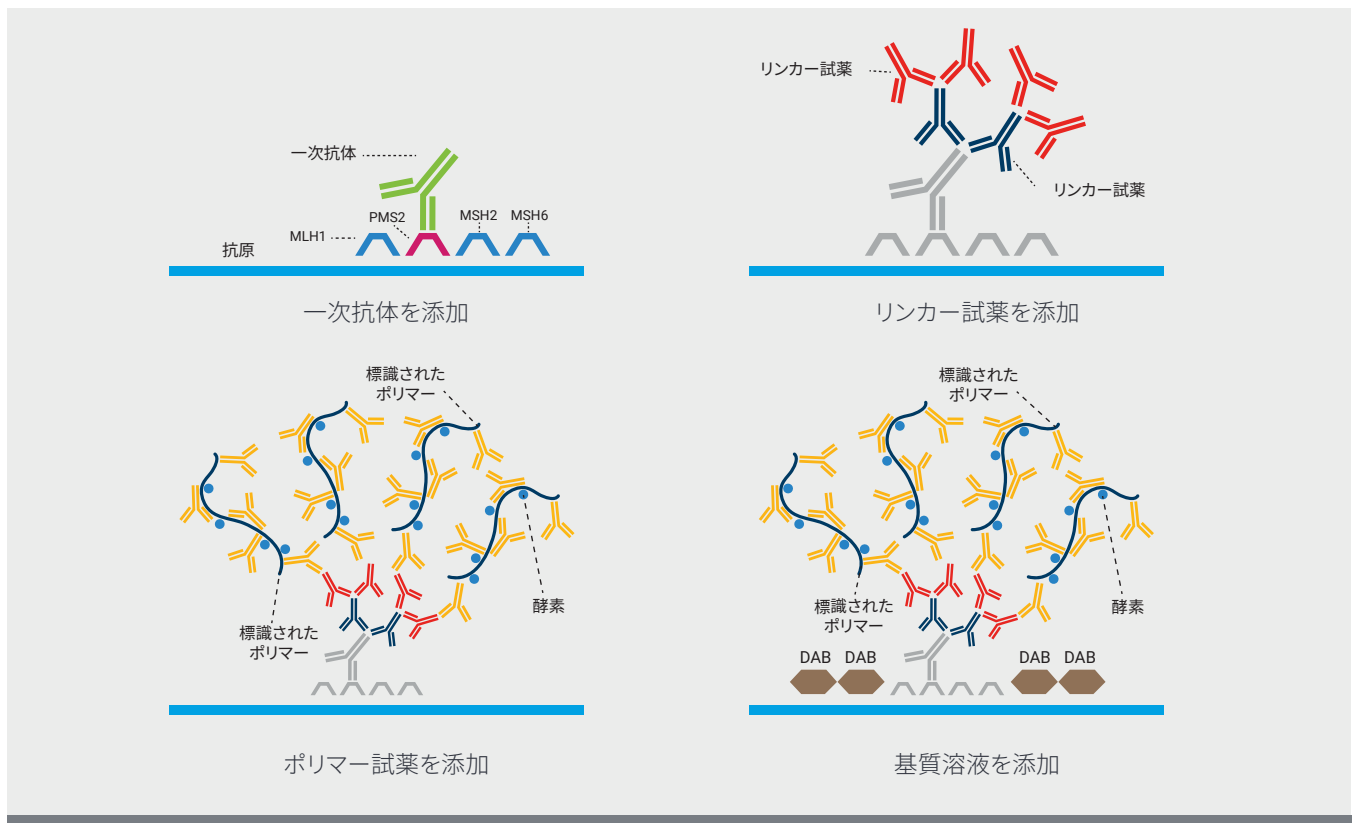


図 1. MMR IHC Panel pharmDx「ダコ Omnis」染色手順。

* なお、ダコ Omnis シリーズには以下のモデルがあります：
ダコ Omnis 165 Duo、ダコ Omnis 165、ダコ Omnis 110、ダコ Omnis

技術的留意点

組織固定、プロセッシングおよび包埋を含む推奨手順からの逸脱は、結果に重大な影響を与えることがあります。以下に、内部陽性対照のコントロール組織および検査室が供給した陰性対照のコントロール組織を含む品質管理について説明します。

検体採取と作製

検体は、免疫組織化学染色に適した状態に保つことを主眼に取り扱われる必要があります。腫瘍形態がインタクトな状態に保持され、評価に十分な細胞の数が存在してはなりません。検体処理方法は、標準的な方法で実施してください。

コントロール組織

処理方法および包埋方法の違いは結果に重大な影響を与えることがあります。コントロール組織は生検/外科的切除検体とし、患者検体と同様の方法でできる限り素早く、固定、プロセッシングおよび包埋を行ってください。対照組織は、試薬の妥当性を評価するためのものであり、検体処理の適正を判断するためのものではありません。

内部陽性対照組織や陰性対照組織で妥当な染色を示さない場合は、該当するすべての組織検体の結果を無効とみなします。陽性対照および陰性対照組織の組織学的要件に関する説明については、12 ページのシステムレベルのコントロールの項を参照してください。

組織の前処理

検証には、10 % の中性緩衝ホルマリンで固定した FFPE 組織が用いられています。その他の組織処理方法（例、細胞診検体、骨脱灰、その他の種類の固定組織）は検証されていません。

検体を厚さ 3 ~ 4 mm に切り出し、10 % 中性緩衝ホルマリンで固定します。次に、アルコールとキシレンで順に処理した後、パラフィンを浸透させます。パラフィンの温度は 60 °C を超えないようにします。組織切除から固定開始時間までを 1 時間未満とし、その後、10 % の中性緩衝ホルマリンに 6 ~ 48 時間浸漬することが推奨されます。

組織検体は 4 μm に薄切します。薄切後、組織をスライドガラスに載せ、校正済みのオープンに入れて、58 ± 2 °C で 1 時間ベーキングします。すべての組織、検体および対照組織をスライドの検証済み染色範囲内に載せます。その他の詳細はダコ Omnis 取扱説明書を確認してください。

抗原性を保つために、スライドに載せた大腸癌の組織切片は 2 ~ 8 °C（推奨）または室温 25 °C 以下の暗所で保管し、薄切から 2 か月以内に染色してください。

テクニカルチェックリスト

以下のチェックリストを使用して、MMR IHC Panel pharmDx「ダコ Omnis」を正しく使用してください。

施設名/所属： _____

氏名および職名： _____

装置のシリアル番号： _____ ソフトウェアバージョン： _____

| | はい | いいえ |
|--|--------------------------|--------------------------|
| 1. 装置の指示に従って、ダコ Omnis* に対し定期的にユーザーメンテナンスを実施しています。 | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| 2. MMR IHC Panel pharmDx「ダコ Omnis」および試薬は箱の外装に印字された使用期限前に使用しています。 | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| 3. MMR IHC Panel pharmDx「ダコ Omnis」および試薬はヘマトキシリンを除き、2～8℃で保存しています。 | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| 4. 大腸癌から適切な陰性対照組織を選定しています。 | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| 5. 組織は、10%中性緩衝ホルマリンで固定しています。 | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| 6. 組織へのパラフィン浸透は60℃以下で実施しています。 | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| 7. 4µmの組織切片をスライドガラスに載せています。 | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| 8. 組織切片を、58±2℃で1時間ベーキングしています。 | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| 9. 検体およびコントロール組織はダコ Omnis* に対して検証済みの染色範囲内に載せています。 | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| 10. 保管されていた未染色スライドを使用した場合、そのスライドは、薄切後2か月以内かつ2～8℃（推奨）または室温25℃以下の暗所で保管していたものです。 | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| 11. 濃縮抗原賦活液（pH 9、50x）（Omnis用）は適切に調製しています。1xの抗原賦活液はpH 9.0±0.2であることを確認しています。 | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| 12. 洗浄液は適切に調製しています。 | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| 13. スライドはダコ Envision FLEX ヘマトキシリン（Omnis用）または同等品で対比染色しています。 | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| 14. 判定に関連するスライドに対して正しいプロトコールをダコ Omnis 装置上で選択しています（例：MMR MLH1 IHC pDx GE079、MMR PMS2 IHC pDx GE087、MMR MSH2 IHC pDx GE085、MMR MSH6 IHC pDx GE086、MMR NCR Mo GE101、MMR NCR Rb GE102） | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| 15. MMR IHC Panel pharmDx「ダコ Omnis」での検査を実施するにあたり、必要な器具・試薬などがすべて用意されていますか？ 用意されていない場合、不足しているものを以下のコメント欄に明記してください。 | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |

上記のいずれかの質問で「いいえ」を選択した場合は、アジレント病理製品担当者にご相談ください。

特記事項：

* なお、ダコ Omnis シリーズには以下のモデルがあります：

ダコ Omnis 165 Duo、ダコ Omnis 165、ダコ Omnis 110、ダコ Omnis

MMR IHC Panel pharmDx「ダコ Omnis」の染色結果判定

スライド評価フローチャート

各症例に対して、以下の図に従って7枚の組織切片を評価する必要があります。

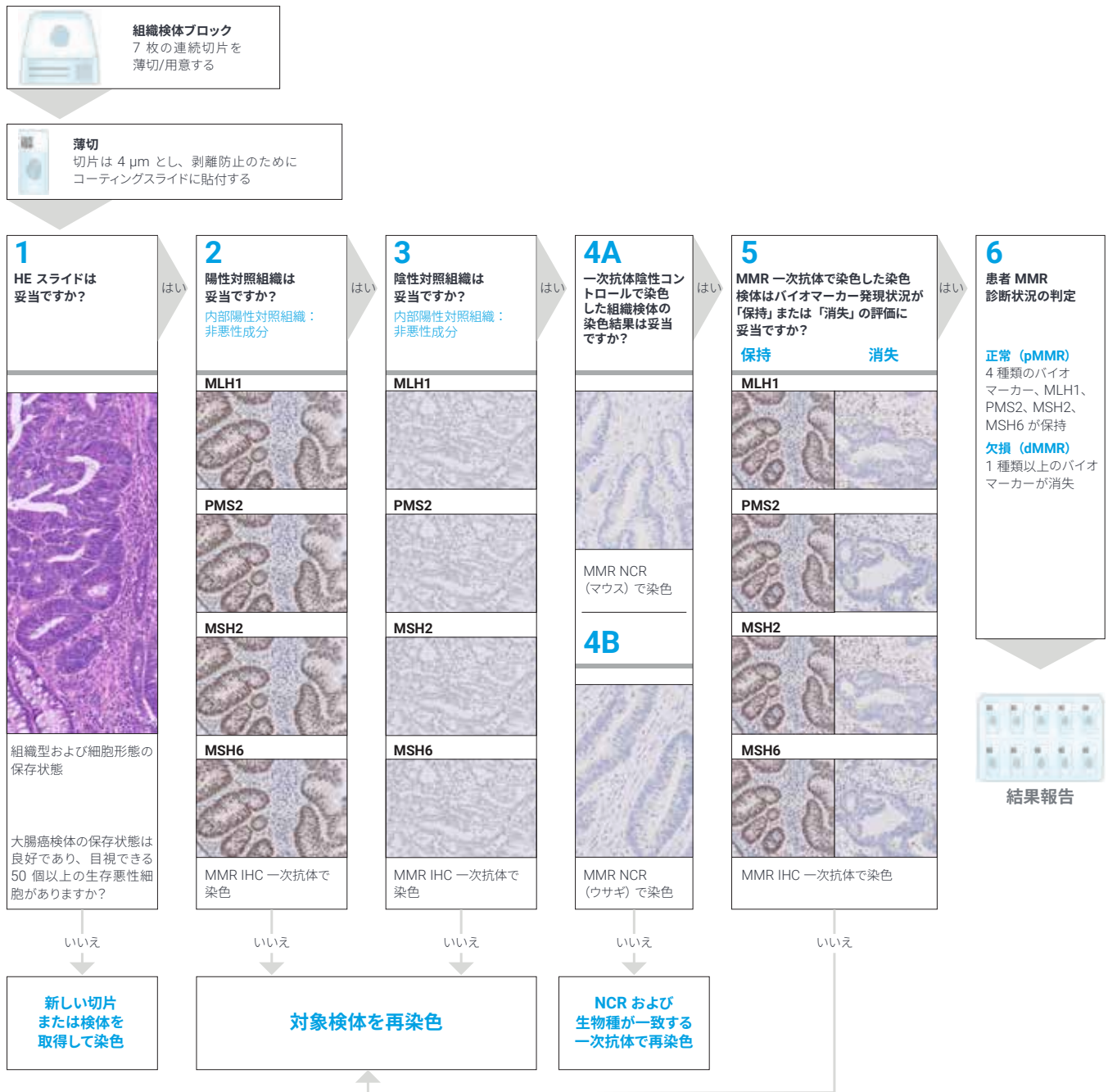


図 2. スライド評価フローチャート

検体の妥当性

染色検体が妥当であるかの決定にはヘマトキシリン・エオジン（HE）染色切片を使用します。MMR IHC Panel pharmDx「ダコ Omnis」を用いた染色は、HE 染色と同一パラフィンブロックの連続切片に対して実施し、以下を確認します。

1. 大腸癌の組織学的診断を確認する
2. 検体には目視できる少なくとも 50 個の生存悪性細胞が含まれる
3. 検体は IHC 解析用に適切に固定され、処理されている。診断状況の決定には、保存状態および染色状態が良好な組織検体領域のみを使用する。

特異的染色の基準

各検体は 4 ～ 20 倍の対物レンズを使って評価します。特異的な染色パターンは核であり、以下のルールに従って評価します。

1. 核染色のみ考慮する。細胞質染色は除外する
2. 褐色の DAB 呈色は明瞭でなければならない
3. 核全体が染色されていなければならない

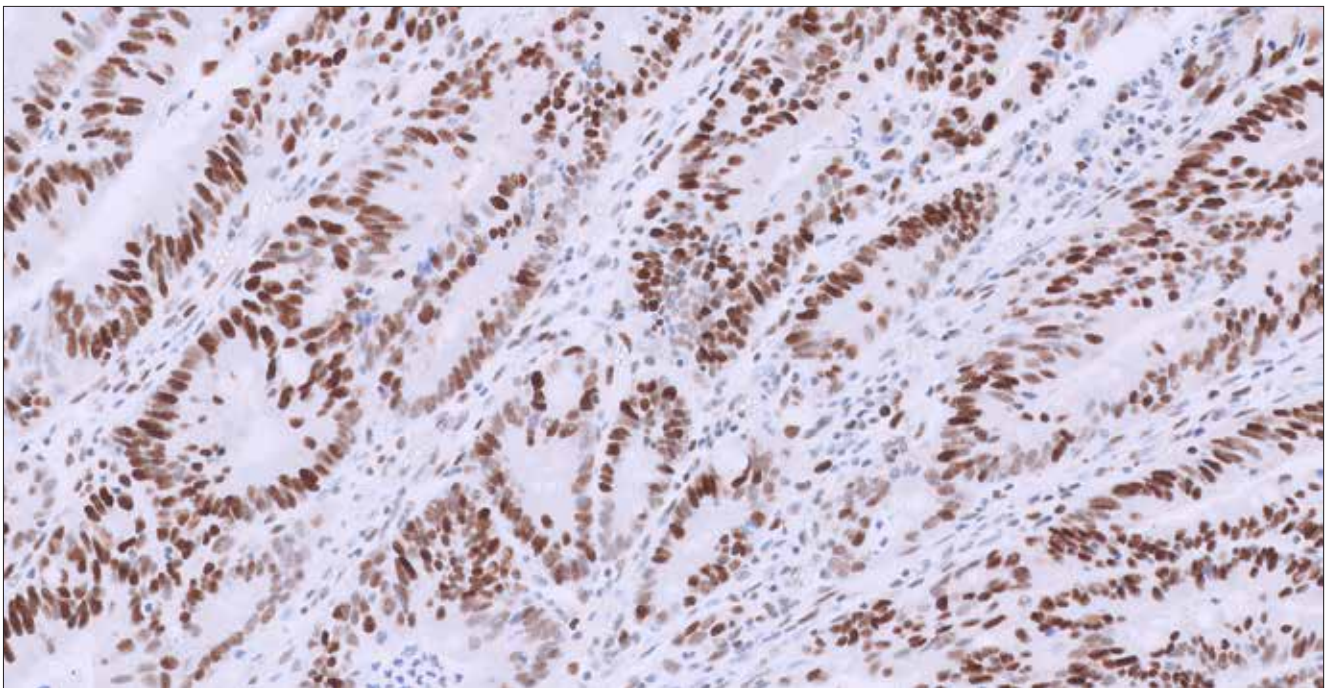


図 3. 強い核染色、細胞質染色なし

非特異的染色

非特異的細胞質染色

非特異的細胞質染色は一部の組織に存在することがあります。細胞質染色がバイオマーカー発現状況の評価を妨げない限り、そのスライドは妥当であると考えます。細胞質染色がバイオマーカーステータスの評価を妨げる場合、その検体は再染色します。

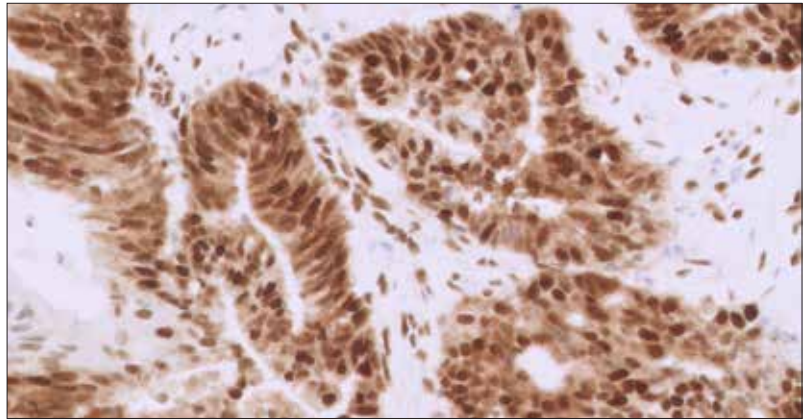


図 4. 細胞質の染色強度が強いにもかかわらず核の特徴および染色が識別可能であり、妥当な非特異的染色を示す MSH6 発現が保持された大腸癌組織。

スコアに入れるべきではない 腫瘍領域とアーチファクト

MMR タンパクが高頻度で検出されますが、スコアに組み入れない腫瘍領域には以下が含まれます。

1. リンパ球、間質細胞、上皮細胞などの正常細胞 (図 5A)
2. エッジアーチファクト (図 5B)
3. 壊死領域 (図 5C)
4. 腺腫成分のある領域 (図 6)
5. 明らかな固定アーチファクトのある領域はスコアに組み入れない、または組み入れには注意が必要

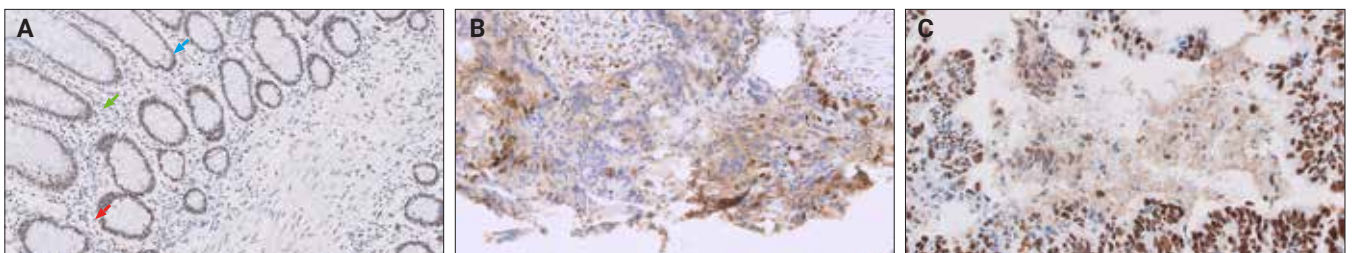


図 5. (A) リンパ球 (緑)、間質細胞 (赤)、正常上皮細胞 (青) の染色は陽性ですが、スコアに組み入れません。これらの細胞は内部陽性対照として扱います。(B) エッジアーチファクトのある組織領域は避けます。(C) 壊死領域は避けます。

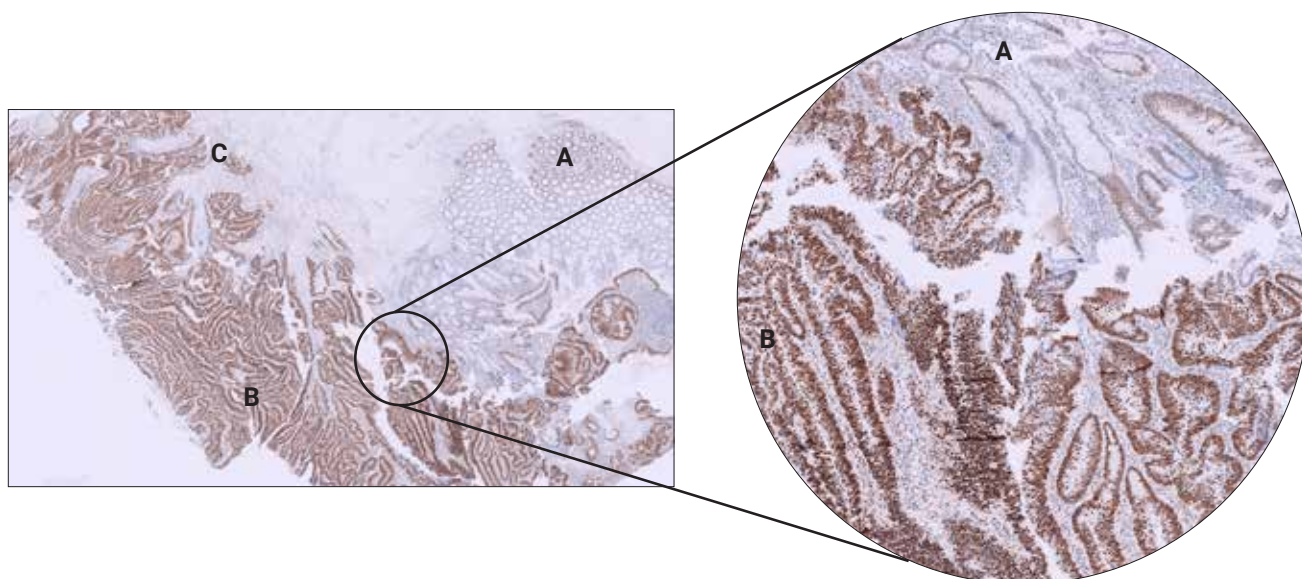


図 6. (A) リンパ球、間質細胞、正常上皮細胞の染色は陽性ですが、スコアに組み入れません。これらの細胞は内部陽性対照として扱います。
(B) 腺腫領域は染色陽性ですが、スコアに組み入れません。(C) 浸潤性腫瘍はスコアに組み入れます。

システムレベルのコントロール

システムレベルのコントロールは、試薬、組織処理および装置性能を含む染色手順の妥当性を確保するために行います。コントロールが検査検体と同一の方法で固定されていない場合、その組織は染色コントロールとしてのみ使用できます。

陽性対照組織

陽性対照はバイオマーカー発現が陽性の組織でなければなりません。外部陽性対照組織の代わりに内部陽性対照として、可能であれば、患者組織の陽性非悪性構成成分（リンパ球、間質細胞、正常上皮）を利用します。非常にまれですが、非悪性成分でバイオマーカーが発現していない場合があります。この場合、陰性対照組織の非悪性成分を染色手順の適格性判定に使用できます。

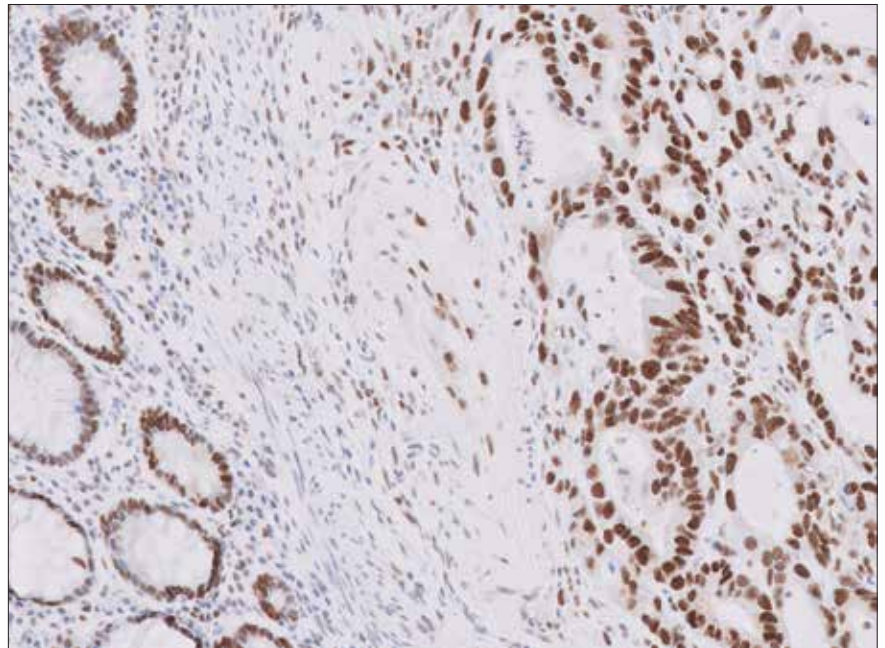


図 7. 大腸癌の内部陽性対照の妥当な染色（正常上皮細胞および間質細胞）。

陰性対照組織

バイオマーカーの発現状況が既知である陰性対照組織（検査室供給）は各染色手順に対して実施する必要があります。陰性対照組織は悪性細胞中にバイオマーカー発現の消失が確認された大腸癌組織であらかじめスクリーニングしておき、隣接する内部陽性対照の中等度から強度の核染色と比較します。事前スクリーニングした大腸癌組織は 2 回目の検査で確定することが推奨されます。陰性対照組織は患者組織と同じスライド上で染色することが推奨されます。

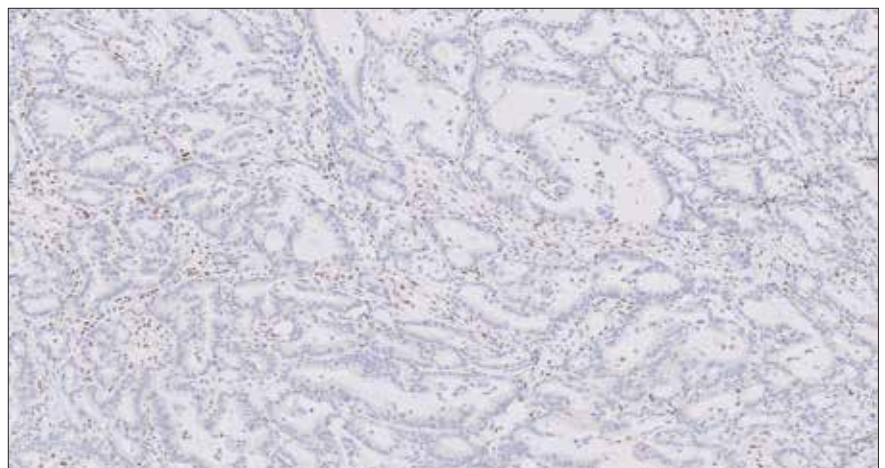


図 8. 大腸癌の陰性対照コントロール組織の妥当な染色。間質細胞とリンパ球はバイオマーカーの発現が保持されていますが、悪性細胞は発現がありません。

一次抗体陰性コントロールスライド

一次抗体陰性コントロール（NCR）は生物種が一致する一次抗体と共にアイソタイプコントロール抗体として使用し、非特異的染色を評価します。MMR IHC Panel pharmDx「ダコ Omnis」は2種類のマウス IgG1 一次抗体（MLH1 および MSH2）および2種類のウサギIgG一次抗体（MSH6 およびPMS2）で構成されています。そのため、1枚はマウス、1枚はウサギの2枚のNCR スライドが各組織検体のパネルと共に染色する必要があります。

NCR スライドは悪性細胞で染色されない、または弱い染色強度でなければなりません。腫瘍細胞の核が弱い染色強度である場合ベースラインとして使用し、生物種が一致する一次抗体スライドを評価します。生物種が一致する一次抗体スライドで生じる同一またはそれよりも弱い強度の染色は、結果の判定時に無視します。

悪性細胞が中程度または強い染色のNCR スライドは無効であり、生物種が一致する一次抗体スライドは評価困難とします。例えば、ウサギ NCR スライドが有効で、マウス NCR スライドが無効の場合、マウス NCR および2種類のマウス抗体（MLH1 および MSH2）のみ再検査が必要です。

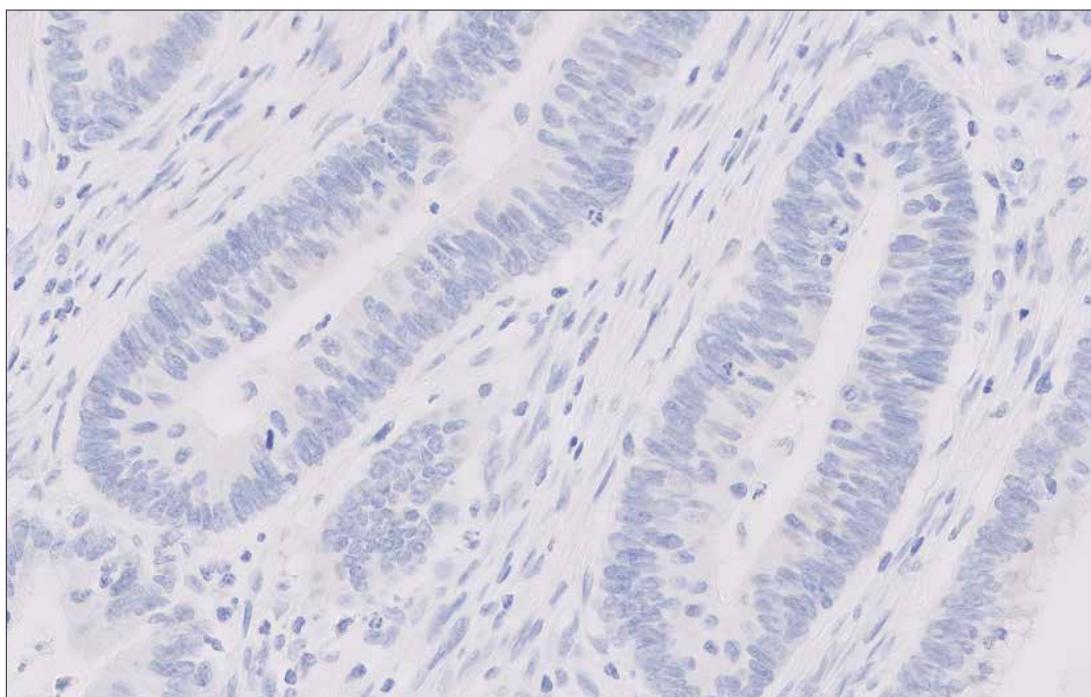


図 9. 一次抗体陰性コントロールで染色した大腸癌組織。悪性細胞で染色が認められません。

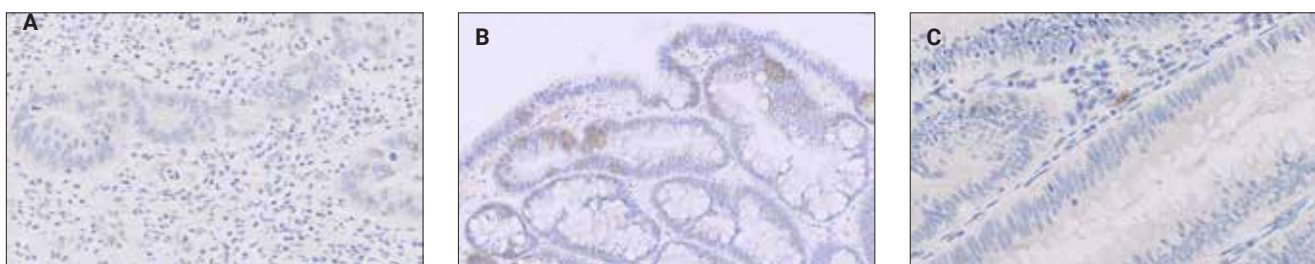


図 10. 一次抗体陰性コントロールで染色した大腸癌組織。(A) 許容可能な弱い核染色と細胞質染色のない腫瘍領域。(B) 無細胞性のDABアーチファクトのある非腫瘍領域は除外します。(C) 非腫瘍細胞の染色は無視します。

バイオマーカー発現状況の評価

免疫組織化学染色の評価には、4～20倍の対物レンズが適しています。組織切片全体を検討し、エッジアーチファクト、腺腫成分、壊死領域、固定による明らかなアーチファクトを認める領域は評価しません。内部陽性対照（リンパ球、間質細胞、正常上皮）に核染色が見られない腫瘍領域は除外します。

MLH1、PMS2、MSH2 および MSH6 それぞれに対する、**保持**または**消失**のタンパク発現状況は、以下のガイドラインに従って判定します。

| | |
|-----------|--|
| 保持 | <p>生存腫瘍細胞の核染色は明瞭でなければならず、少なくとも隣接する内部陽性対照と全体の染色強度が同じでなければなりません。</p> <p>局所的な染色が存在する場合、その組織は次の場合保持と判断します。</p> <ol style="list-style-type: none"> 複数の腫瘍腺/腫瘍巣に連続して認められる かつ 内部陽性対照と同等またはそれよりも強い染色強度 |
| 消失 | <p>隣接する内部陽性対照の中等度または強い染色強度の核染色と比べて、目視できる悪性細胞の核染色がないまたは不明瞭。</p> <p>局所的な染色が存在する場合、その組織は次の場合消失と判断します。</p> <ol style="list-style-type: none"> 単一の腫瘍腺/腫瘍巣にのみ連続して認められる 複数の腫瘍腺/腫瘍巣に不連続に認められる または 内部陽性対照よりも弱い染色強度 |

消失および保持された局所染色の例は、それぞれ図 20 および 21 を参照してください。

検体が内部陽性対照で不明瞭な染色を示し、バイオマーカーの1つのタンパク発現状況が判定できない場合、初めにすべてのバイオマーカーと一緒に評価することが推奨されます。MMR 診断状況がすべてのバイオマーカーを使って判定できない場合、不明瞭な染色の再検査を実施する必要があります。

MMR 診断状況の判定

特定の検体について、タンパク発現状況（保持または消失）を各バイオマーカーに割り当てたら、以下の定義に従って正常（pMMR）または欠損（dMMR）の診断状況が得られます。

| | |
|----------|-------------------|
| 正常（pMMR） | 4種類すべてのバイオマーカーが保持 |
| 欠損（dMMR） | 1つ以上のバイオマーカーの消失 |

図 11 の症例は、MLH1 および PMS2 の発現が保持、MSH2 および MSH6 の発現が消失である dMMR の診断状況を示しています。

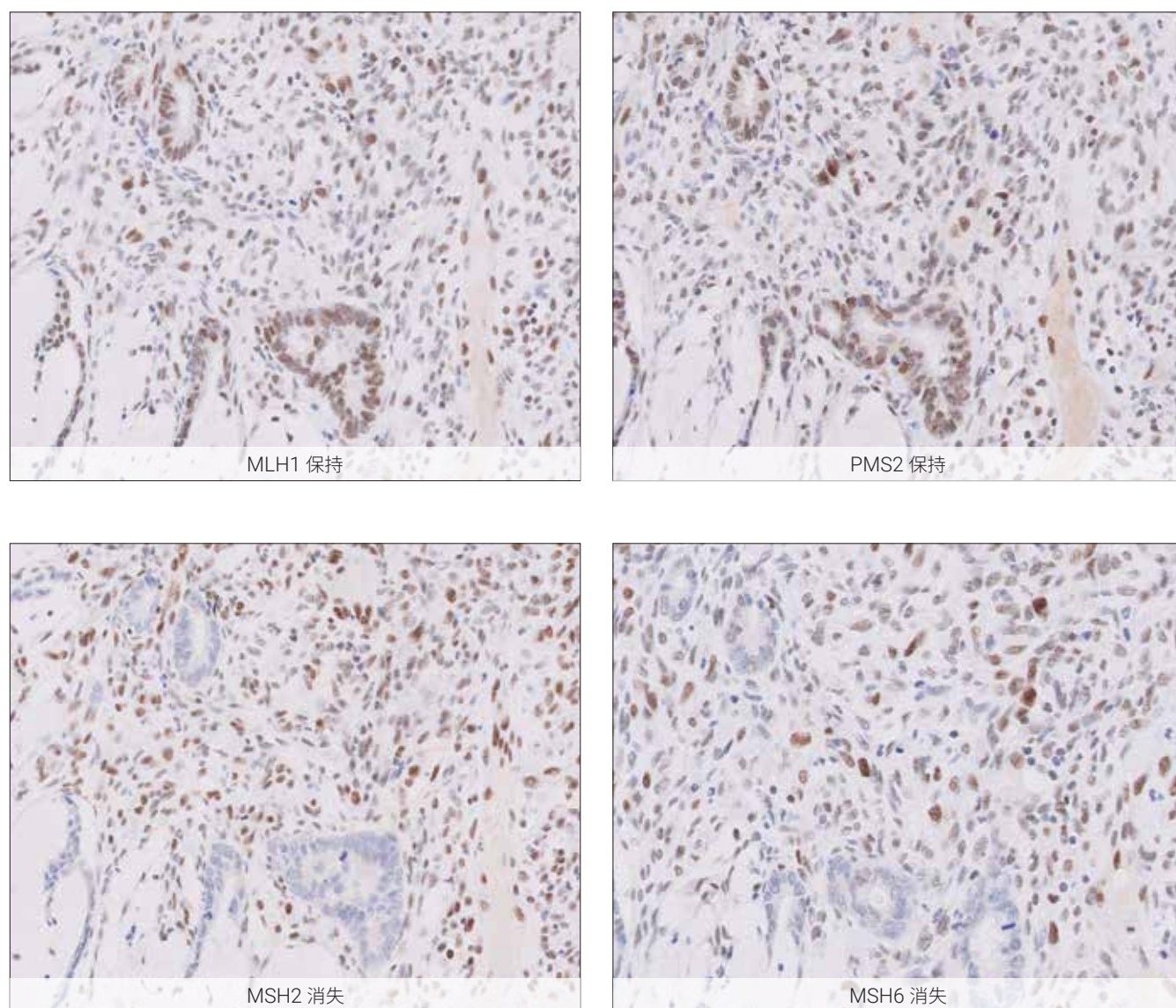


図 11. MLH1（保持）、PMS2（保持）、MSH2（消失）および MSH6（消失）で染色された dMMR 大腸癌組織。

dMMR IHC パターン

4種類のMMRタンパクは2つのヘテロダイマー複合体、MLH1とPMS2、およびMSH2とMSH6を構成します。PMS2とMSH6タンパクの安定性は、それぞれMLH1とMSH2タンパクの存在に依存しています。そのため、MLH1とMSH2が消失している場合、そのヘテロダイマーペアも消失しています。ただし、MLH1とMSH2はそれらのヘテロダイマーペアがなくても安定しています。従って、PMS2またはMSH6の消失は単独で認められることがあります。これらタンパクの依存性により、以下のdMMR発現パターンが一般的に認められます。



図 12. dMMR IHC の組み合わせ。

結果の報告

MMR IHC Panel pharmDx「ダコ Omnis」の染色結果報告時の推奨記載事項

検査検体の MMR IHC Panel pharmDx「ダコ Omnis」の概要：

検査日： _____

染色 Log ID： _____

検体 ID： _____

患者番号： _____

検査タイプ： マニュアル判定による IHC 染色

その他： _____

MMR 検査結果：

| | | |
|------------------------|-----------------------------|------------------------------|
| 妥当な大腸癌腫瘍細胞（50 個以上）： | 合格 <input type="checkbox"/> | 不合格 <input type="checkbox"/> |
| MLH1 陽性対照組織の結果： | 合格 <input type="checkbox"/> | 不合格 <input type="checkbox"/> |
| PMS2 陽性対照組織の結果： | 合格 <input type="checkbox"/> | 不合格 <input type="checkbox"/> |
| MSH2 陽性対照組織の結果： | 合格 <input type="checkbox"/> | 不合格 <input type="checkbox"/> |
| MSH6 陽性対照組織の結果： | 合格 <input type="checkbox"/> | 不合格 <input type="checkbox"/> |
| MLH1 陰性対照組織の結果： | 合格 <input type="checkbox"/> | 不合格 <input type="checkbox"/> |
| PMS2 陰性対照組織の結果： | 合格 <input type="checkbox"/> | 不合格 <input type="checkbox"/> |
| MSH2 陰性対照組織の結果： | 合格 <input type="checkbox"/> | 不合格 <input type="checkbox"/> |
| MSH6 陰性対照組織の結果： | 合格 <input type="checkbox"/> | 不合格 <input type="checkbox"/> |
| MMR 一次抗体陰性コントロール（マウス）： | 合格 <input type="checkbox"/> | 不合格 <input type="checkbox"/> |
| MMR 一次抗体陰性コントロール（ウサギ）： | 合格 <input type="checkbox"/> | 不合格 <input type="checkbox"/> |

主治医への MMR IHC Panel pharmDx「ダコ Omnis」の判定結果：

| | | |
|------------|-----------------------------------|-----------------------------------|
| MLH1 発現状況： | 保持 <input type="checkbox"/> | 消失 <input type="checkbox"/> |
| PMS2 発現状況： | 保持 <input type="checkbox"/> | 消失 <input type="checkbox"/> |
| MSH2 発現状況： | 保持 <input type="checkbox"/> | 消失 <input type="checkbox"/> |
| MSH6 発現状況： | 保持 <input type="checkbox"/> | 消失 <input type="checkbox"/> |
| MMR 診断状況： | 正常（pMMR） <input type="checkbox"/> | 欠損（dMMR） <input type="checkbox"/> |

病理医のコメント： _____

大腸癌の MMR IHC Panel pharmDx 「ダコ Omnis」 免疫染色例

pMMR 症例

pMMR 症例 1

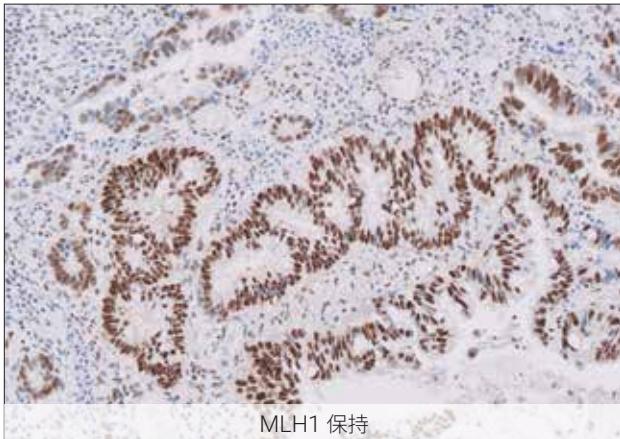


図 13a.

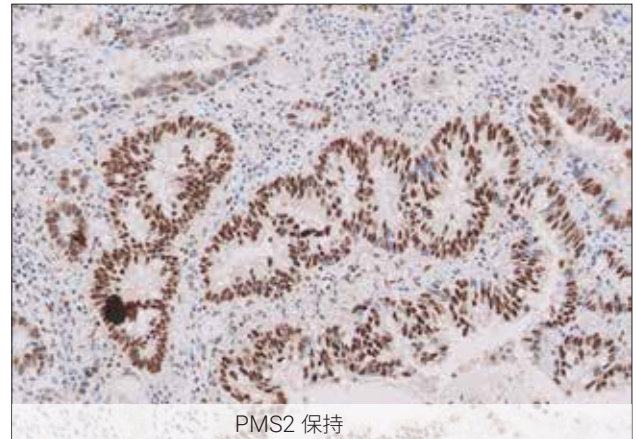


図 13b.

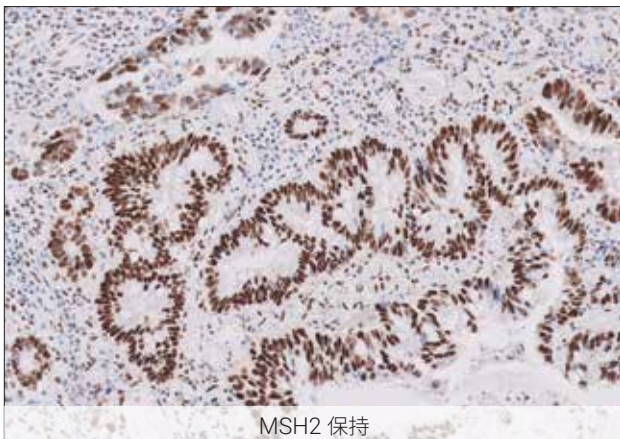


図 13c.

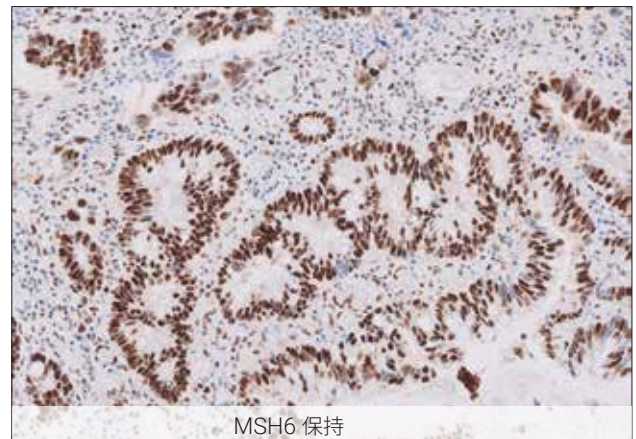


図 13d.

図 13. MLH1 (a)、PMS2 (b)、MSH2 (c) および MSH6 (d) の発現状況が保持を示す pMMR 大腸癌組織。

pMMR 症例 2

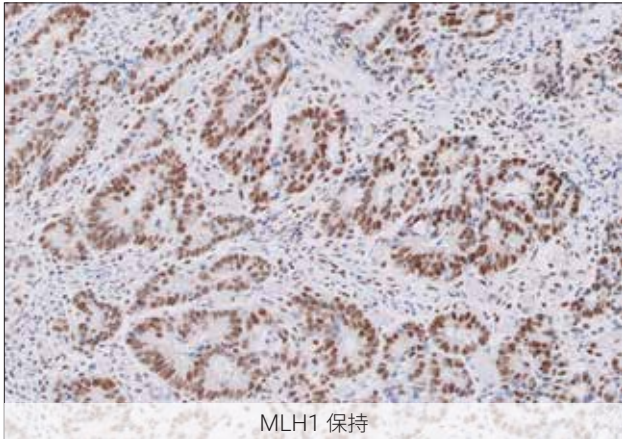


図 14a.

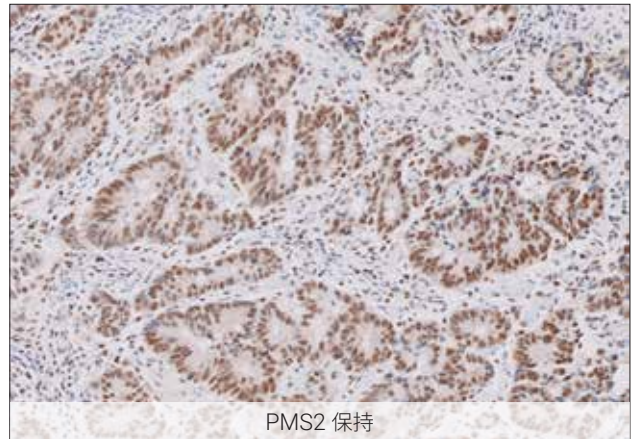


図 14b.

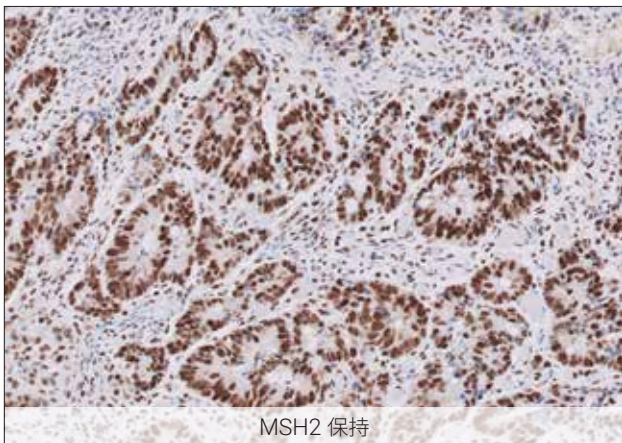


図 14c.

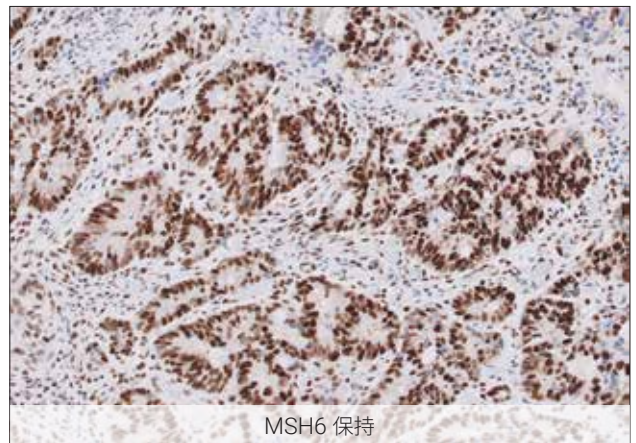


図 14d.

図 14. MLH1 (a)、PMS2 (b)、MSH2 (c) および MSH6 (d) の発現状況が保持を示す pMMR 大腸癌組織。

dMMR 症例

dMMR 症例 1

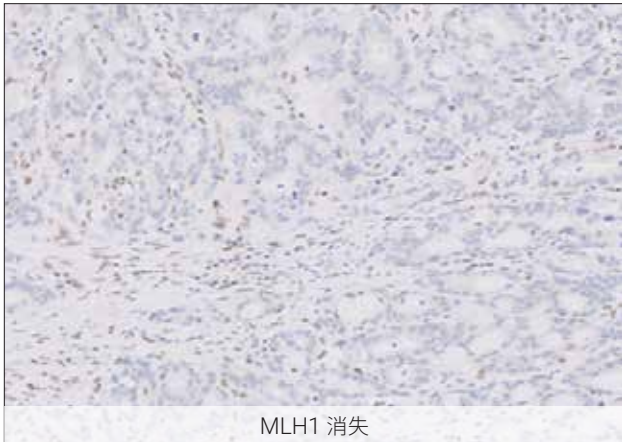


図 15a.

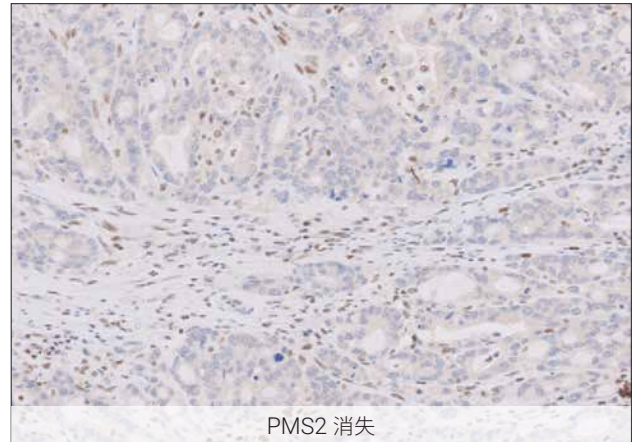


図 15b.

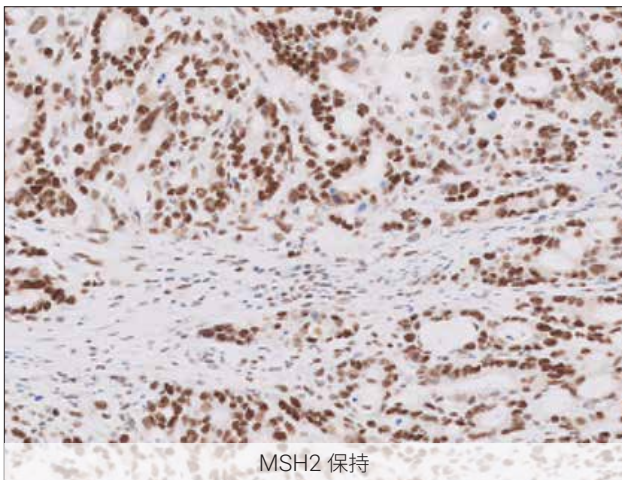


図 15c.

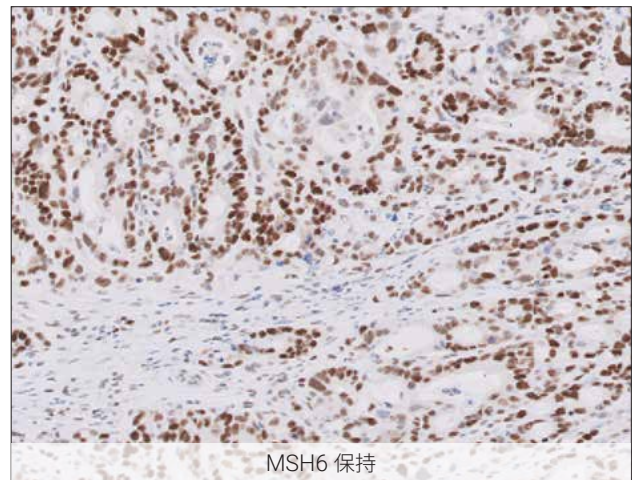


図 15d.

図 15. MLH1 (a) および PMS2 (b) が欠失、MSH2 (c) および MSH6 (d) の発現状況が保持を示す dMMR 大腸癌組織。

dMMR 症例 2

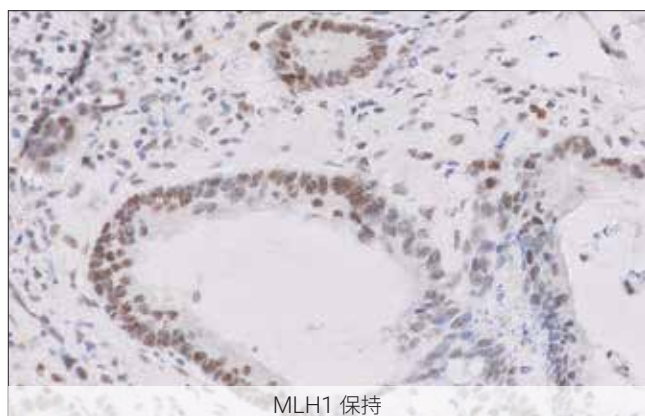


図 16a.

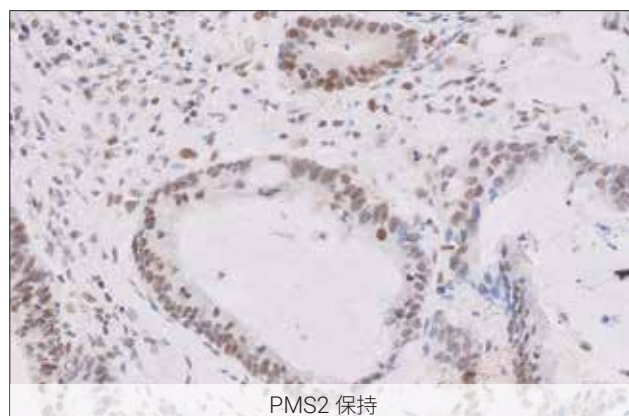


図 16b.

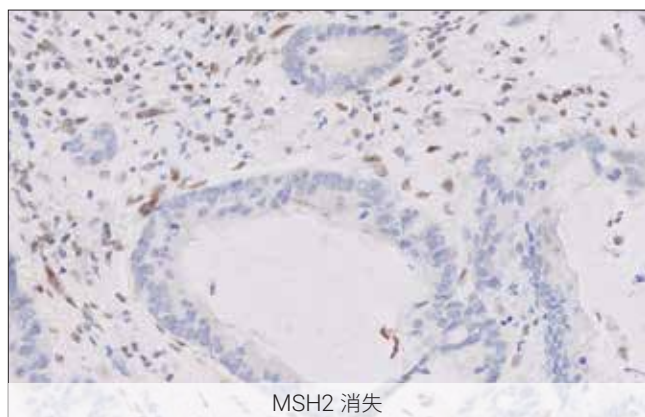


図 16c.

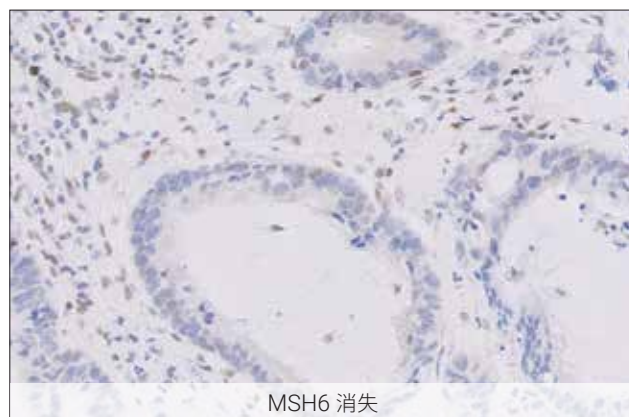


図 16d.

図 16. MLH1 (a) および PMS2 (b) が保持、MSH2 (c) および MSH6 (d) の発現状況が消失を示す dMMR 大腸癌組織。

dMMR 症例 3

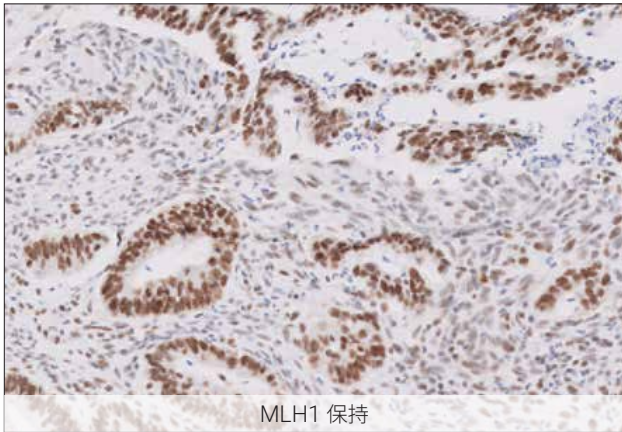


図 17a.

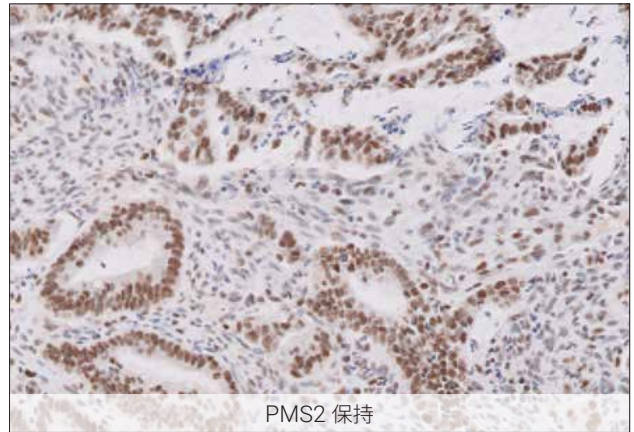


図 17b.

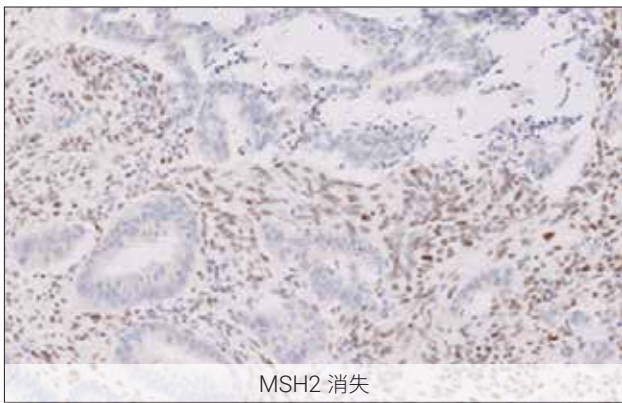


図 17c.

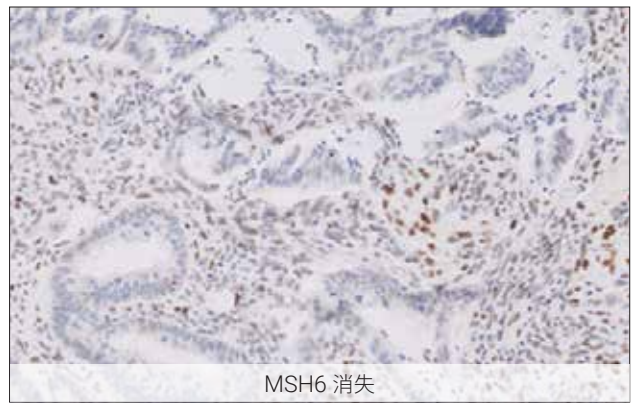


図 17d.

図 17. MLH1 (a) および PMS2 (b) が保持、MSH2 (c) および MSH6 (d) の発現状況が消失を示す dMMR 大腸癌組織。

dMMR 症例 4

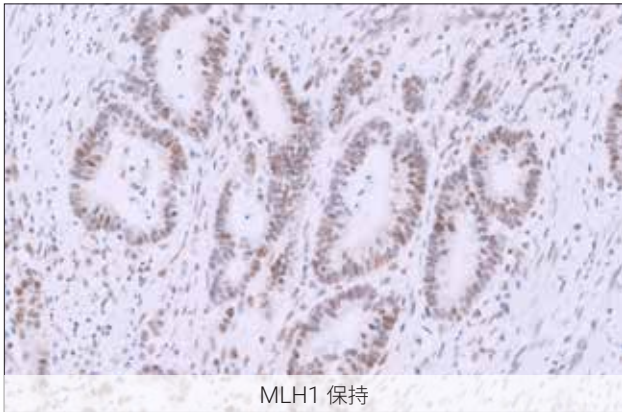


図 18a.

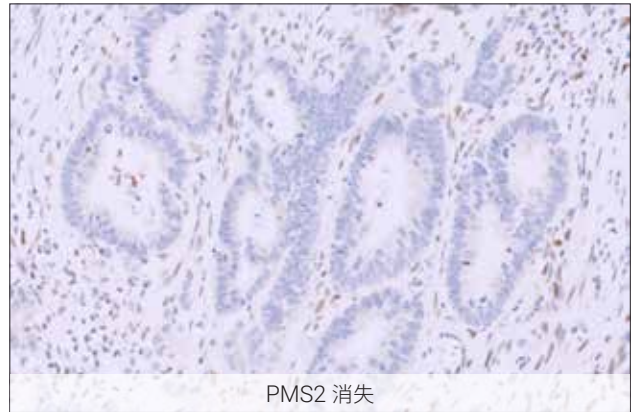


図 18b.

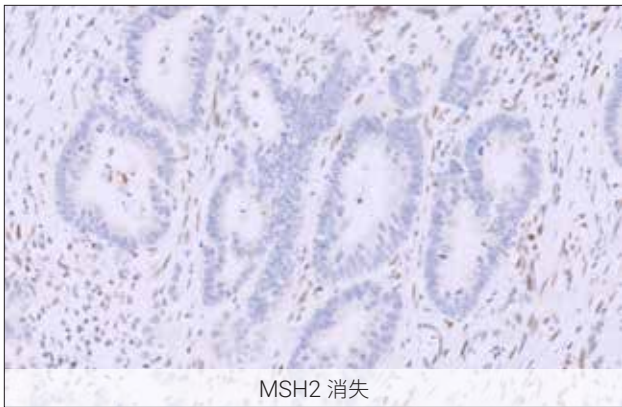


図 18c.

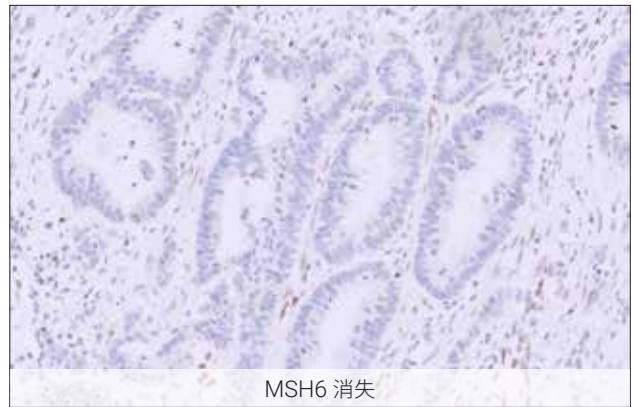


図 18d.

図 18. MLH1 (a) が保持、PMS2 (b)、MSH2 (c) および MSH6 (d) の発現状況が消失を示す dMMR 大腸癌組織。

dMMR 症例 5

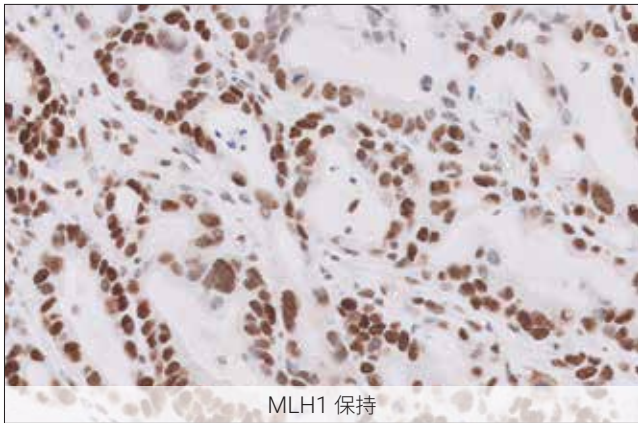


図 19a.

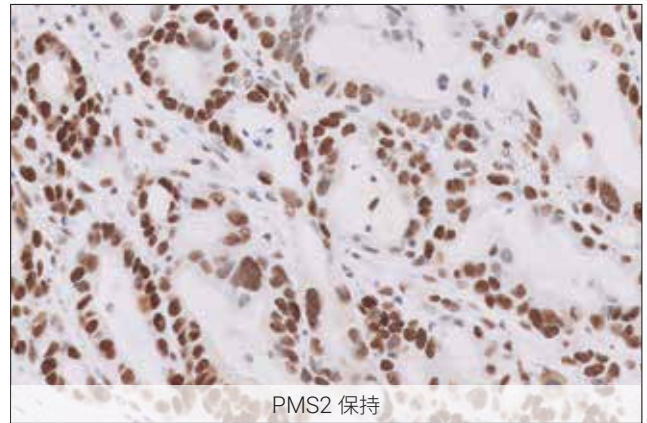


図 19b.

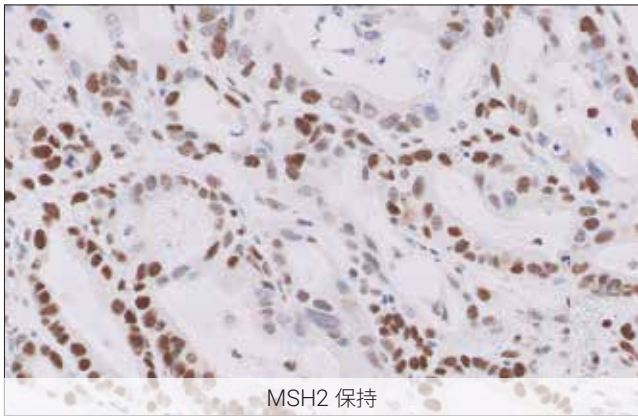


図 19c.

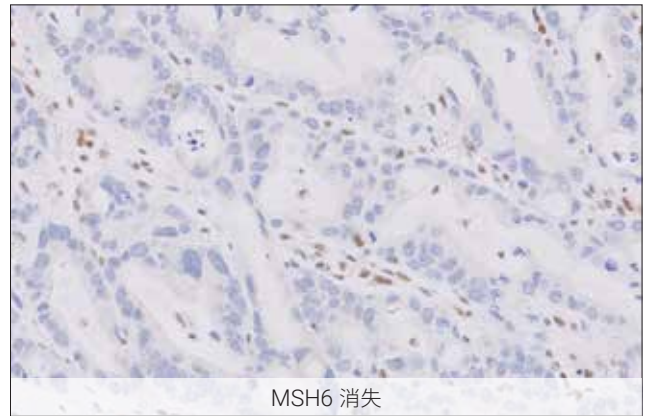


図 19d.

図 19. MLH1 (a)、PMS2 (b) および MSH2 (c) が保持、MSH6 (d) の発現状況が消失を示す dMMR 大腸癌組織。

アーチファクトおよび非特異的染色の例

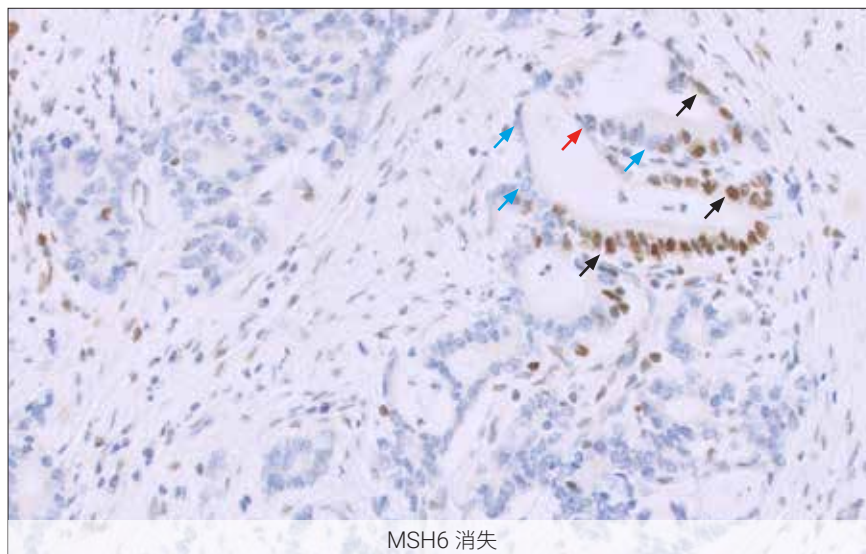
MMR 発現が消失している組織の
局所染色

図 20. MSH6 発現が消失している大腸癌組織。腫瘍細胞の核の局所染色強度は内部陽性対照と比べて弱く（赤色矢印）、腫瘍細胞の腺周辺での染色は連続していません（青色矢印）。内部陰性対照組織周辺は中程度から強い染色強度を認めます。一部の核は内部陽性対照組織と同一または強い強度で染色されていますが（黒色矢印）、染色は腺全体で連続していません。この検体は MSH6 発現消失としてスコアに組み入れられました。

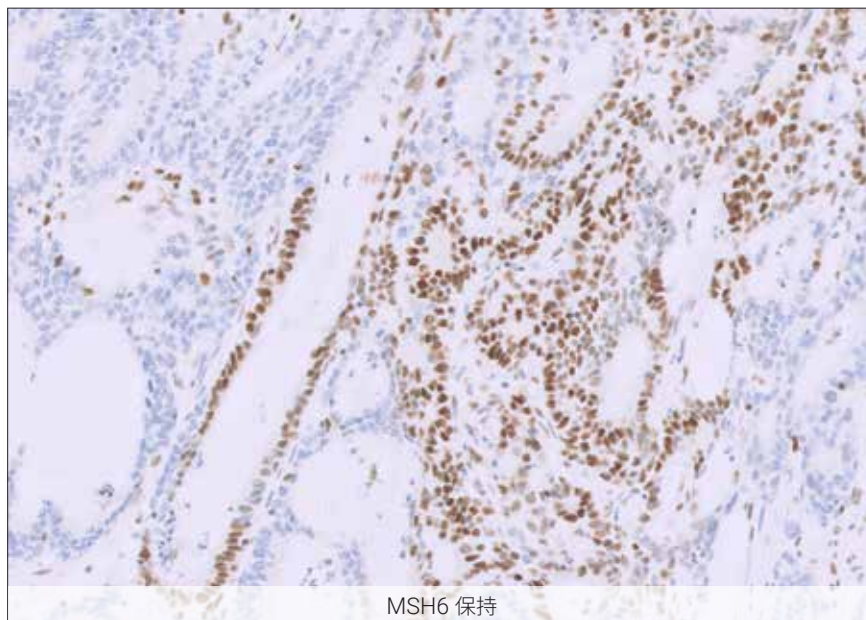
MMR 発現が保持された組織の
局所染色

図 21. MSH6 発現が保持された大腸癌組織。腫瘍細胞の核の局所染色強度は内部陽性対照周辺と少なくとも同程度以上の強度であり、複数の腫瘍細胞の腺周辺で連続しています。この検体は MSH6 発現が保持されているものとしてスコアに組み入れられました。

不均一な染色

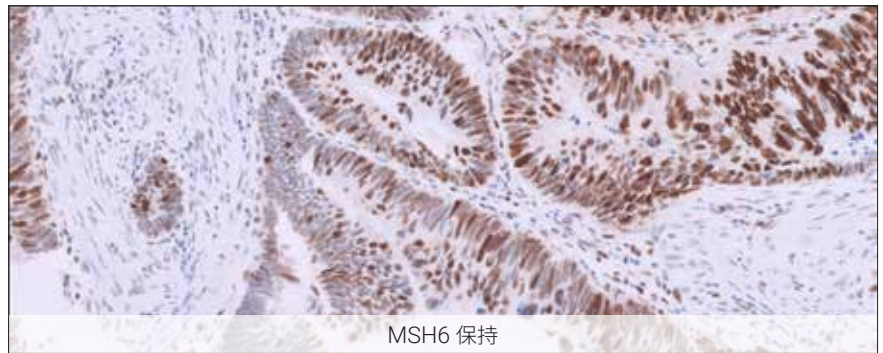


図 22. 不均一または不連続染色の多くは固定不良が原因です。内部陽性対照組織の染色から保存状態の良い領域のみを評価します。再処理を行ったところ、この検体はバイオマーカー発現が保持されているものとしてスコアに組み入れられました。

壊死

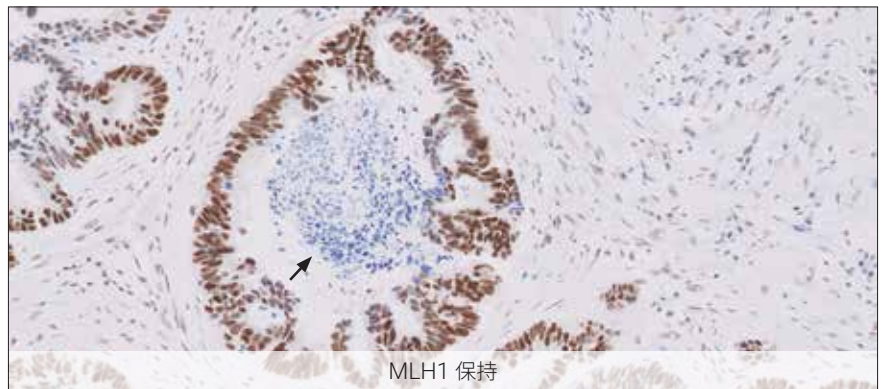


図 23. MLH1 (保持) で染色した大腸癌組織。腫瘍細胞の腺 (矢印) 内および周辺の壊死組織は除外します。

間質細胞染色

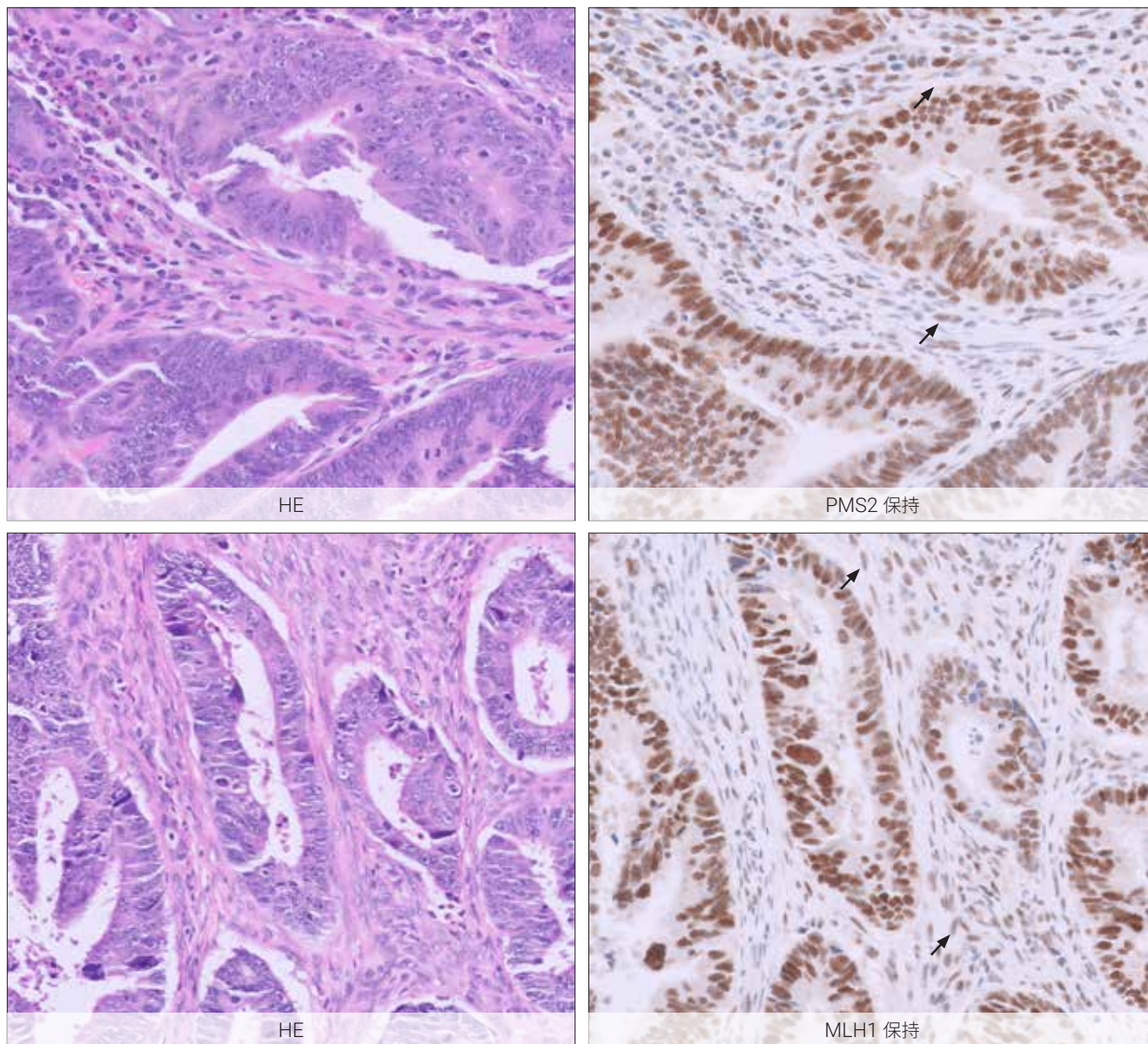


図 24. HE (左側) および PMS2 (上右側) または MLH1 (下右側) で染色した大腸癌組織。矢印は、腫瘍細胞と混同される可能性のある PMS2 または MLH1 陽性の間質細胞を示しています。HE は非腫瘍細胞と腫瘍細胞を区別しやすくするために使用する必要があります。これらの検体は、内部陽性対照の染色と比較して、腫瘍の腺細胞が連続した強染色を示すため、PMS2 および MLH1 は保持としてスコアに組み入れられました。

印環細胞腺癌

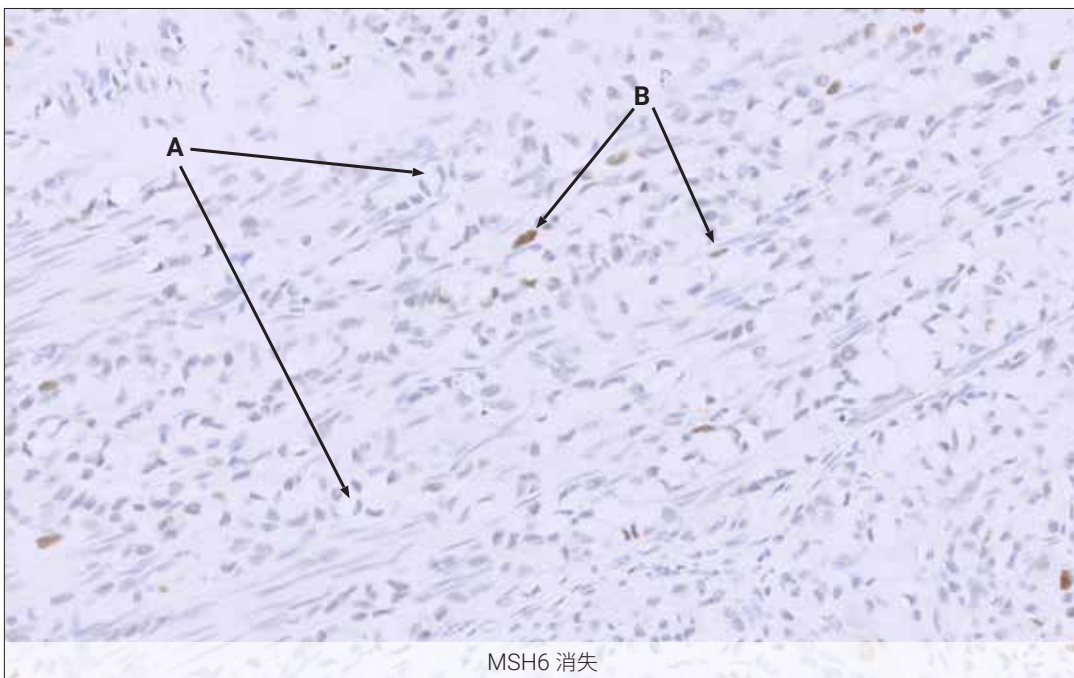
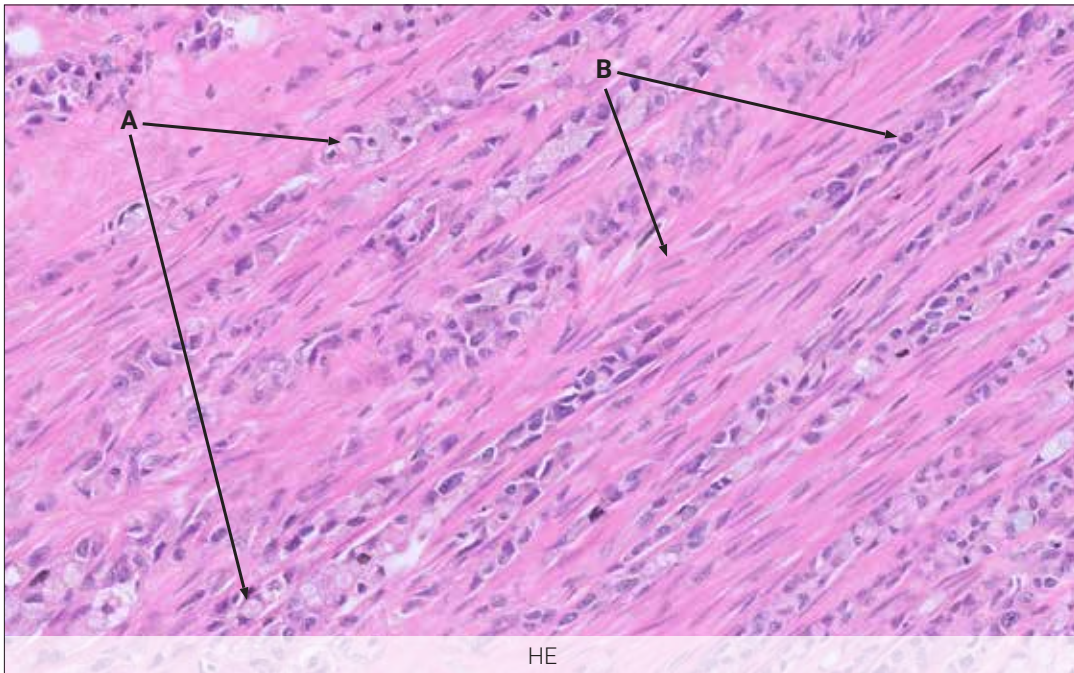


図 25. HE (上) および MSH6 (消失) (下) で染色された大腸の印環細胞腺癌。(A) 腫瘍印環細胞は顕著な細胞質内ムチン液胞を示します。「三日月」型に核が細胞の辺縁部に押し込まれています。(B) 陽性染色の正常細胞は内部陽性対照として扱います。

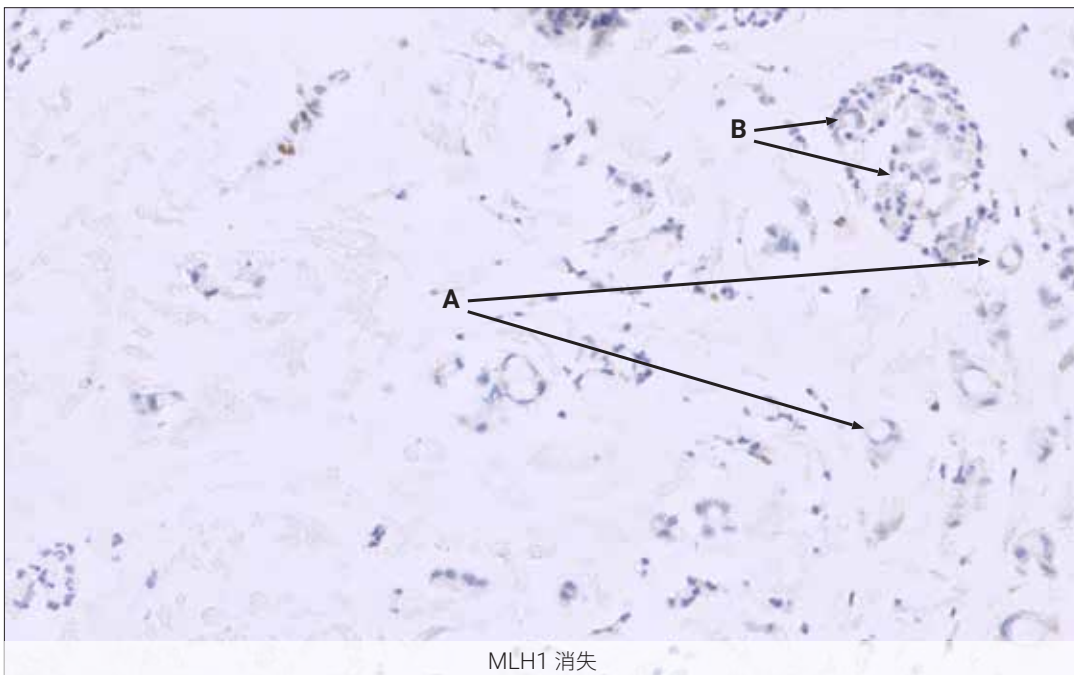
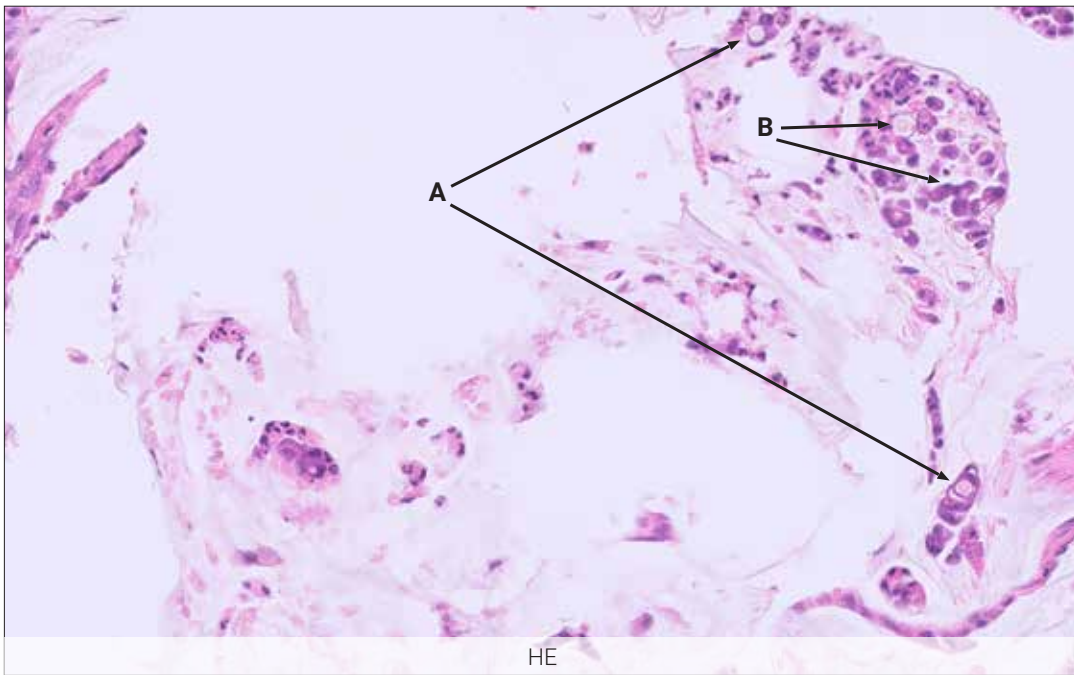


図 26. HE (上) 染色および MLH1 消失を示す (下) 大腸の印環細胞腺癌。(A) 腫瘍印環細胞は顕著な細胞質内ムチン液胞を示します。「三日月」型に核が細胞の辺縁部に押し込まれています。(B) マクロファージや好中球などの一部の炎症細胞およびその他の細胞デブリは、特に IHC スライドでは、印環細胞腺癌と誤って解釈されることがあります。細胞の種類確定については HE スライドと見比べて判定してください。

粘液性大腸癌

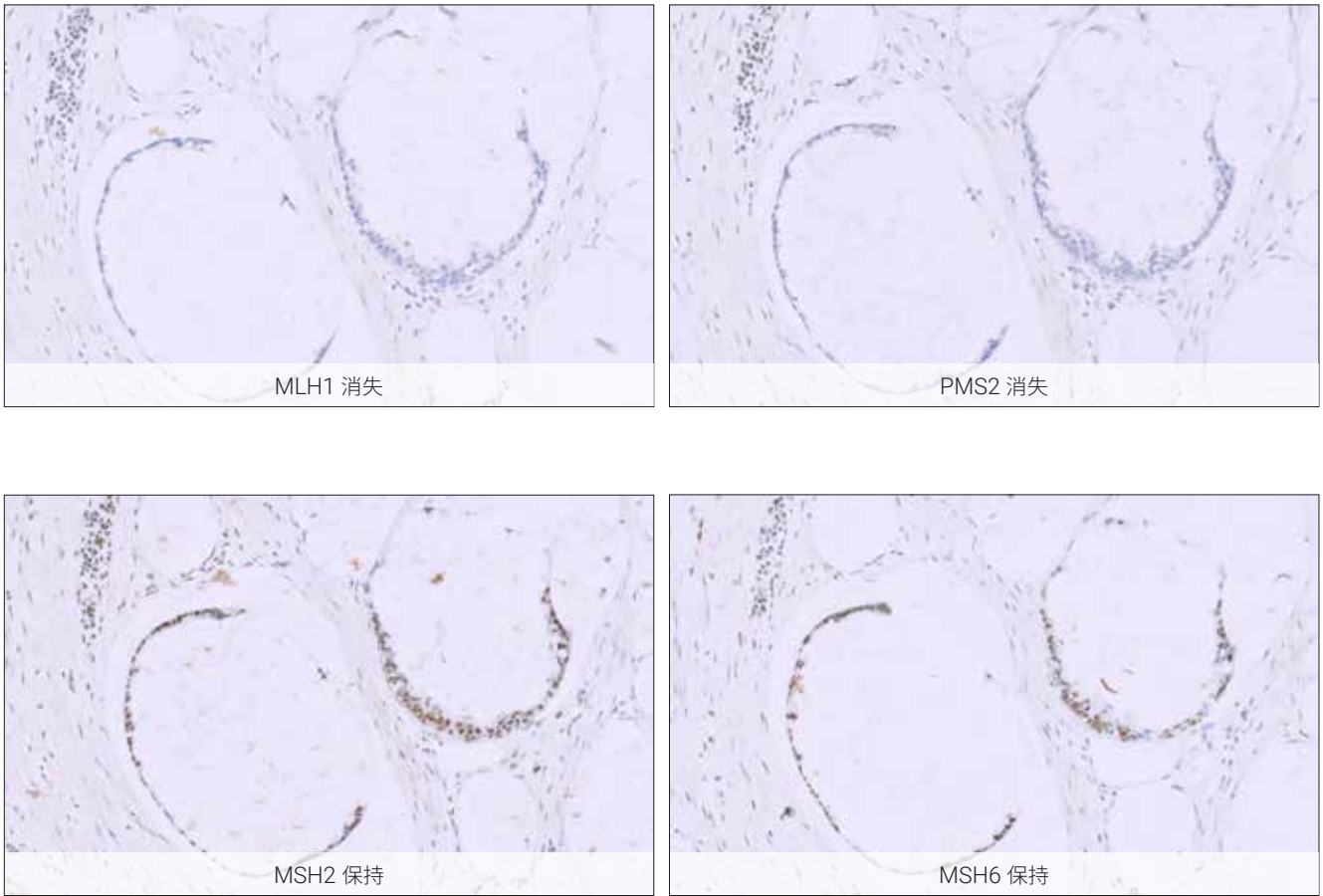


図 27. MSH2 および MSH6 発現が保持であり MLH1 および PMS2 の発現消失を示す粘液性大腸癌。粘液性大腸癌は dMMR 診断と高頻度に相関します。

MMR IHC Panel pharmDx「ダコ Omnis」の トラブルシューティングガイド

詳細なトラブルシューティングが必要な場合には、カスタマーサポートまでご連絡ください。

| 問題 | 考えられる原因 | 推奨される処置 | |
|----------------------|---|---|---|
| 1. スライドが染色されない、または弱い | 1a. ダコ Omnis* にセットする前に、検体を載せた組織切片を過度に加熱することにより MLH1 の免疫反応性や組織形態の損失が生じる可能性があります。 | 1a. 組織切片の乾燥は 58 ± 2 °C、最長 1 時間とし、均一に温度が保たれた校正済みのオープンを使用してください ⁶ | |
| | 1b. 試薬を誤った条件で保存した | 1b. 指定された保存条件に従って試薬が正しく保存されていることを確認します | |
| | 1c. 不適切な固定方法 | 1c. 患者組織の固定時間が短すぎたり長すぎたりしていない、虚血時間は最短時間で行い、正しい固定液（10 % NBF）を使用したことを確認してください | |
| | 1d. 使用期限を過ぎた試薬を使用している | 1d. DakoLink Omnis ワークステーションソフトウェアを確認し、スライドに suspicious のフラグが示されていないかを特定します。試薬は使用期限を過ぎていないものを使用してください | |
| | 1e. 装置上での使用期限を過ぎた試薬を使用している | 1e. DakoLink Omnis ワークステーションソフトウェアを確認し、スライドに suspicious のフラグが示されていないかを特定します。試薬は装置上での安定性が過ぎていないものを使用してください | |
| | 1f. 染色モジュールのダイナミックギャップリッドが正しく取り付けられていない | 1f. ダイナミックギャップリッドが正しく取り付けられているかどうか確認します | |
| | 1g. ダイナミックギャップリッドが損傷している | 1g. ダイナミックギャップリッドの完全性を確認します | |
| | 1h. 濃縮抗原賦活液（50 x）の希釈に蒸留水または脱イオン水を使用していない | 1h. 蒸留水または脱イオン水を使用して抗原賦活液（1 x）を調製していることを確認してください | |
| | 1i. 間違った抗原賦活液を使用している | 1i. セクション 5「供給されない必要な試薬および装置」またはセクション 9「試薬調製」に指定された正しい抗原賦活液を使用していることを確認してください | |
| | 1j. 抗原賦活液（1 x）が pH 仕様を満たしていない | 1j. 抗原賦活液（1 x）の pH を確認します。pH が許容範囲（pH 9.0 ± 0.2）外である場合、抗原賦活液（1 x）を廃棄してください。新しい抗原賦活液（1 x）を調製し pH を確認します。 | |
| | 2. スライドの非特異的染色が過剰に染色されている | 2a. スライドガラスへの切片接着時にデンブレン性の添加剤を使用した | 2a. スライドガラスへの切片の接着にはデンブレン性の添加剤を使用しないでください。多くの添加剤は免疫反応を示します。 |
| | | 2b. 染色後/封入前に切片を乾燥させた | 2b. 取り出しステーションが十分の水で満たされていることを確認します 染色完了後染色スライドを乾燥させないようにしてください（例：ダコ Omnis からの取り出しと封入の間） |
| 2c. 不適切な固定方法 | | 2c. 適切な固定液を使用していたことを確認してください。適切ではない固定液は過度な非特異的染色の原因になることがあります | |
| 2d. 脱パラフィン不良 | | 2d. Clarify バルクボトルのカップリングの外観を確認してください。詳細はダコ Omnis 取扱説明書を確認してください | |

* なお、ダコ Omnis シリーズには以下のモデルがあります：

ダコ Omnis 165 Duo、ダコ Omnis 165、ダコ Omnis 110、ダコ Omnis

MMR IHC Panel pharmDx「ダコ Omnis」染色結果判定マニュアル：大腸癌

| | | |
|------------------|---------------------|---|
| | 2e. 組織への試薬の非特異吸着 | 2e. 正しい固定方法で検体を固定していること確認し、広範囲な壊死領域を避けてください |
| | 2f. DAB 調整ストリップの再利用 | 2f. 新しいDAB 調整ストリップを使用していることを確認してください |
| 3. 染色が強すぎる | 3a. 不適切な固定方法 | 3a. 適切な固定液と固定方法で実施していることを確認してください |
| 4. 組織がスライドから剥離する | 4a. 不適切なスライドガラスを使用 | 4a. 適切なスライドガラスを使用してください（剥離防止コーティングスライド） |

注意事項：問題が上記の原因のいずれにも当てはまらない、または推奨された是正措置で問題が解決しない場合は、カスタマーサポートにお問い合わせいただき、詳細なサポートを受けてください。

ご確認事項

顕微鏡写真

デジタルスキャンから記載した画像は画像説明で指定したものと同一の大腸癌領域の画像です。

注意事項：画像の倍率は、画像サイズの調整のため、それぞれの注釈で表示されている値とは異なって見える可能性があります。

- 組織検体は Conversant Biologic, Inc. より提供されました。
- このプロジェクトで使用されたデータと生検組織は、Azenta, Inc. から適切な倫理的承認を得て、提供されました。
- 組織検体は米国国立がん研究所が出資する Cooperative Human Tissue Network より提供されました。他の研究員は、同じ被験者から検体を得ている可能性があります。
- 組織検体は BioIVT, LLC (米国ニューヨーク州ヒックスヴィル) より提供されました。

参考文献

1. Bateman. A.C. DNA mismatch repair proteins: scientific update and practical guide. *J Clin Pathol.* **2021**, 74, 264-268.
2. Bupathi. M. and Wu. C. Biomarkers for immune therapy in colorectal cancer: mismatch-repair deficiency and others. *J Gastrointest Oncol.* **2016**, 7(5), 713-720.
3. He. Y., Zhang. L., et al. The role of DNA mismatch repair in immunotherapy of human cancer. *Int J Biol Sci.* **2022**, 18(7), 2821–2832.
4. Hsieh. P. and Yamane. K. DNA mismatch repair: molecular mechanism, cancer, and ageing. *Mech Ageing Dev.* **2008**, 129(7-8):391-407.
5. Kheirelseid. E.A., Miller. N., et al. Mismatch repair protein expression in colorectal cancer. *J Gastrointest Oncol.* **2013**, 4(4), 397-408.
6. Lee. C.T., Chow. N.H., et al. Clinicopathological features of mismatch repair protein expression patterns in colorectal cancer. *Pathology - Research and Practice. Pathol Res Pract.* **2021**, 217, 153288.
7. Li. G.M. Mechanisms and functions of DNA mismatch repair. *Cell Res.* **2008**, 18, 85-98.
8. MLH1 IHC pharmDx「ダコ Omnis」, MSH2 IHC pharmDx「ダコ Omnis」, MSH6 IHC pharmDx「ダコ Omnis」, PMS2 IHC pharmDx「ダコ Omnis」 [電子添文](#).
9. Nadji. M., Morales. A.R. Immunoperoxidase techniques. A practical approach to tumor diagnosis. Chicago: Amer Soc Clin Pathol Press, **1986**.
10. Overman. M., Ernstoff. M., and Morse. M. Where We Stand With Immunotherapy in Colorectal Cancer: Deficient Mismatch Repair, Proficient Mismatch Repair, and Toxicity Management. *Am Soc Clin Oncol Educ Book.* **2018**, 38, 239-247.
11. Pecina-Šlaus. N., Kafka. A., et al. Mismatch Repair Pathway, Genome Stability and Cancer. *Front Mol Biosci.* **2020**, 7(122).
12. Siraj. A.K., Parvathareddy. S.K., et al. PD-L1 Expression Is Associated with Deficient Mismatch Repair and Poor Prognosis in Middle Eastern Colorectal Cancers. *J Pers Med.* **2021**, 11(2), 73.
13. Stadler. Z.K. Diagnosis and Management of DNA Mismatch Repair-Deficient Colorectal Cancer. *Hematol Oncol Clin North Am.* **2015**, 29(1), 29–41.
14. Taylor. C.R. and Rudbeck. L. Education Guide: Immunohistochemical Staining Methods – Sixth Edition. Dako, Carpinteria, California, **2013**.
15. Tubbs. R.R., Gephardt. G.N., Petras. R.E. Specimen processing and quality assurance. *Atlas of immunohistology.* Chicago: Amer Soc Clin Pathol Press, **1986**, 16.
16. Yi. M., Jiao. D., et al. Biomarkers for predicting efficacy of PD-1/PD-L1 inhibitors. *Mol Cancer.* **2018**, 17(129).
17. Zhao. P., Li. L., et al. Mismatch repair deficiency/microsatellite instability-high as a predictor for anti-PD-1/PD-L1 immunotherapy efficacy. *J Hematol Oncol.* **2019**, 12(54).

[お問い合わせ窓口]

アジレント・テクノロジー株式会社

芝浦オフィス / 〒108-0023 東京都港区芝浦四丁目16番36号 住友芝浦ビル

●カスタマコンタクトセンター ☎ 0120-477-111

mail: email_japan@agilent.com

※仕様は予告なく変更する場合があります。

P250548

www.agilent.com

© Agilent Technologies, Inc. 2025

本書の一部または全部を書面による事前の許可なしに複製、
改変、翻訳することは、著作権法で認められている場合を除き、
法律で禁止されています。

Printed in Japan, Nov., 2025

29666JA 2025NOV

