

卵巣癌における腹水セルブロックスの  
診断および予後予測因子としての  
有用性に関する検討

いわはし ひでき  
岩橋 秀樹

(産科婦人科学専攻)

防衛医科大学校

令和4年度

# 目 次

## 第 1 章 緒言

## 第 2 章 卵巣明細胞癌の腹水細胞診における腹水セルブロックの意義

### 第 1 節 背景及び目的

### 第 2 節 症例選択基準

### 第 3 節 腹水セルブロックの作成方法

### 第 4 節 免疫組織化学染色のプロトコール

### 第 5 節 免疫組織化学染色の評価方法

### 第 6 節 腹水細胞診の評価方法

### 第 7 節 結果

#### 第 1 項 免疫組織化学的染色および細胞診判定結果

#### 第 2 項 腹水細胞診およびセルブロックの比較

## 第 3 章 卵巣漿液性癌の腹水セルブロックにおける CD8 陽性リンパ球の臨床的意義

### 第 1 節 背景及び目的

### 第 2 節 症例選択基準

第 3 節 腹水セルブロックの作成方法

第 4 節 免疫組織化学染色のプロトコール

第 5 節 免疫組織化学染色の評価方法

第 6 節 CD8 陽性リンパ球数の計測方法

第 7 節 統計学的解析方法

第 8 節 結果

第 4 章 考察

第 1 節 卵巣明細胞癌の腹水細胞診における腹水セルブロックの  
意義

第 2 節 卵巣漿液性癌の腹水セルブロックにおける CD8 陽性リン  
パ球の臨床的意義

第 5 章 結論

謝辞

略語一覧

引用文献

図表

## 第1章 緒言

本邦の卵巣悪性腫瘍患者数は近年増加傾向にあり、年間約 13,400 人が発症し、約 4,800 人の死亡が報告されている [1]。卵巣悪性腫瘍は、初期には自覚症状がなく、進行期となって腹水貯留に伴う膨満感、食欲低下、腹痛などの症状を呈する。診断時には International Federation of Gynecology and Obstetrics (FIGO) 進行期分類 [2] で III 期及び IV 期 (表 1 に手術進行期分類を示す) の症例が 4 割以上を占め [3, 4]、女性生殖器を原発とする悪性腫瘍の中で最も予後不良な疾患となっている [1, 5]。また、FIGO 進行期分類 I 期においては、腹水細胞診陽性であることが予後不良因子である [6]。

卵巣癌は、手術または生検により採取された腫瘍組織の病理学的検索により診断が確定することから、診断のために患者への侵襲が求められる。一方で、腹水は腹腔穿刺により容易に採取が可能であり、手術等と比べて患者に与える侵襲が低く、より簡便な病理検査材料となりうる。腹水セルブロックは、腹水中に浮遊する細胞を遠心分離により集積させ、パラフィン包埋して固めたものであり、通常のパラフィンブロックに包埋された手術材料検体と同様、各種染

色を同一検体で繰り返し行うことができ、腹水貯留を呈する腫瘍性疾患の鑑別診断に用いられる。腹水セルブロックの腫瘍細胞の質的診断における意義についての報告はあるが [7, 8]、その染色パターンや背景に存在するリンパ球などの炎症細胞と予後に関する報告は少なく、さらに検討すべき点が多いと考えられる。

本研究では、卵巣癌のうち、特に明細胞癌と高異型度漿液性癌の腹水に注目し、それぞれの質的診断および予後予測に有用なセルブロック上の所見を明らかにすることを目的とした。これらの患者から採取された腹水検体から作製したセルブロックについて、各種免疫組織化学的染色（免疫染色）を実施し、従来 of 腹水細胞診の結果や外科的切除された腫瘍組織標本との診断の対比を行った。また患者予後との対比も行った。本研究は防衛医科大学校倫理委員会の承認（承認番号 3078）を得て実施した。

## 第2章 卵巣明細胞癌の腹水細胞診における腹水セルブロックの意義

### 義

#### 第1節 背景と目的

卵巣明細胞癌は、淡明で広い細胞質や hobnail 状の大型核を有する腫瘍細胞が、乳頭状、管状またはシート状に増殖する病理学的特徴を示す [9]。西洋人よりもアジア人での発症が多く、FIGO 進行期分類で I 期や II 期で診断されることが多いが [10, 11]、化学療法に対する感受性は低く、予後不良な疾患である [12, 13]。

FIGO 進行期分類（表 1）では、腫瘍が片側の卵巣あるいは卵管に限局し、被膜表面への浸潤がなく、腹水細胞診が陰性の場合には IA 期、腫瘍が両側の卵巣あるいは卵管に限局し、被膜表面への浸潤がなく、腹水細胞診で悪性細胞がみられない場合は IB 期と診断される。IC 期は腫瘍が片側または両側の卵巣または卵管に限局するが、手術操作による被膜破綻があった場合は IC1 期、手術操作によらない自然被膜破綻または被膜表面への浸潤があった場合は IC2 期、腹水または腹腔洗浄細胞診で悪性細胞が見られた場合

は IC3 期に細分類される。同じ IC 期であっても IC3 期は最も予後不良であり [11]、腹水細胞診の診断結果は臨床的に重要な意義を持っている。

Papanicolaou 染色 (Pap 染色) および May-Grünwald-Giemsa 染色 (MGG 染色) は腹水細胞診を評価する際の染色法として広く使用されている [14]。卵巣明細胞癌に特徴的な細胞診所見には、細胞外基質と腫瘍細胞から構成される raspberry body、globe-like structure、核が外方近くに突出した腫瘍細胞形態の hobnail cell が報告されているが、これらの細胞診所見が出現率は必ずしも高くなく、各々 73.9%、82.6%、52.2%である [15]。また、細胞診検査はスライドグラスに塗布した検体のみで検索されるため、追加染色による情報を得ることは困難である。

一方、腹水セルブロックは、ホルマリン固定、パラフィン包埋したブロックを用いるため、同一検体を用いて幾度も組織・細胞像の解析や免疫染色が実施可能である [16、17]。卵巣明細胞癌の特異的な抗原として、hepatocyte nuclear factor-1 $\beta$  (HNF-1 $\beta$ ) があり、組織検体および腹水検体で感度はほぼ 100%陽性となるが [18]、腹水セルブロックは、このような腫瘍特異的に発現

する分子の免疫染色も追加できる利点を有している。

本研究の目的は、卵巣明細胞癌に対する腹水セルブロックの免疫染色の診断的有用性を、従来の腹水細胞診の診断、ならびに切除標本の組織病理所見の結果と比較し評価することである。

## 第 2 節 症例選択基準

2012 年 1 月から 2019 年 12 月の間に、防衛医科大学校病院で手術を施行し卵巣明細胞癌と術後病理診断された患者のうち、術中に腹水が採取され、Pap 染色および MGG 染色が行われ、同一腹水検体から腹水セルブロックを作製した症例を対象とした。初回手術による組織及び腹水採取前に化学療法が施行された症例、他の悪性腫瘍を合併していた症例、腹腔洗浄細胞診検体のみが採取された症例は除外した。年齢、FIGO 進行期分類、腹水細胞診の診断結果といった臨床病理学的因子は、診療録及び手術記録を用いて後方視的に収集した。FIGO 進行期分類は、手術進行期分類 FIGO 2014 を用いて決定した。

## 第 3 節 腹水セルブロックの作製方法



手術で開腹直後に採取された腹水を、採取後速やかに 3,000 回転/分の速度で 10 分間遠心分離させた。上清液を除去したのちに、沈殿物の 2 倍量の 4%パラホルムアルデヒド・リン酸緩衝液 (WAKO #163-21045<sup>®</sup>) を加えて固定を行った。4%パラホルムアルデヒド・リン酸緩衝液を除去し、蒸留水 40 ml を加え、1,500 回転/分の速度で 5 分間遠心分離した。上清液を除去し、70%エタノール (#057-00451<sup>®</sup>、WAKO、東京)、を加え、1,500 回転/分の速度で 5 分間遠心分離し、上清を除去した。沈殿物をパラフィン固定用かセットに留置し、バキュームロータリー (Sakura Tissue Tek VIP6<sup>®</sup>、サクラ精機、東京) を使用して 99.7%エタノール槽で脱水、キシレン槽で脱脂させたのちに、パラフィン浸透させた。Sakura Tissue-Tek Dispensing Console IV<sup>®</sup> (サクラ精機) を用いてパラフィン包埋して、腹水セルブロックを作製した。

#### 第 4 節 免疫組織化学染色のプロトコール

免疫染色には、作製した腹水セルブロック、および対象症例の手術検体から切り出され、当院検査部で保管されているホルマリン固定パラフィン包埋腫瘍組織ブロックを用いた。腫瘍組織につ

いてはhematoxylin-eosin染色（HE染色）のスライド組織像から、卵巣明細胞癌の特徴的な腫瘍組織を有するブロックを抽出して使用した。腹水セルブロック、手術材料の組織ブロックとも、4  $\mu$  mの厚さに薄切、スライドグラスに貼付し、免疫組織化学染色を行った。一次抗体には、HNF-1 $\beta$ に対するウサギモノクローナル抗体（sc-8986, Santa Cruz, CA, USA. 希釈率 1:200）、progesterone receptor（PR）に対するマウスモノクローナル抗体（PgR636, Dako/Agilent, Santa Cruz, CA, USA. 希釈率 1:100）、Wilms tumor-1（WT-1）に対するマウスモノクローナル抗体（6F-H2, Dako/Agilent. 希釈率 1:200）を用いた。薄切した検体は、キシレンで脱パラフィン化後に、エタノールで脱キシレン処理を行った。0.3%過酸化水素水で内因性ペルオキシダーゼ反応を停止させた。HNF-1 $\beta$ 、PR、WT-1に対する一次抗体の抗原賦活は10 mMのクエン酸緩衝液（pH 6.0）を用い、オートクレーブを121°Cで5分間行った。その後、室温となるまで静置した。一次抗体を各スライドグラスの切片上に載せたのちに4°Cで一晩おいて抗原抗体反応をさせた。二次抗体として、ビオチン標識抗マウスIgG抗体（H+L）（BA-9200, Vector Laboratories, Newark,

CA, USA)ないしビオチン標識抗ラビットIgG抗体(H+L) (BA-1000, Vector Laboratories)を用い、室温で30分間静置した。その後 VECTASTAIN Elite ABC kit (Vector Laboratories)を用いて室温で30分間静置した。特異的抗原反応の可視化は0.2%ジアミノベンジジン四塩酸塩と5%過酸化水素水を用いた。対比染色としてMayer hematoxylin液を用いた。陽性コントロールは、HNF-1 $\beta$ については卵巣明細胞癌の腫瘍組織、PRについては正常乳腺、WT-1については正常腎を用いた。各抗体において、陰性コントロールは一次抗体を使用せず上記過程を実施したものを用い、全ての陰性コントロールで特異的な反応が無いことを確認した。なお、腹水セルブロック、手術材料の腫瘍組織ブロックとも、HE染色されたスライドを用いてその形態を観察した。

## 第5節 免疫組織化学染色の評価方法

腫瘍組織標本におけるHNF-1 $\beta$ 、PR、WT-1の免疫染色像の評価は、50%以上の腫瘍細胞において陽性コントロールと同等かそれ以上の染色強度を示すものを陽性とした。セルブロック標本におけるこれらの分子の免疫染色像の評価は、腫瘍細胞集塊もしくは

腫瘍細胞の可能性のある異型細胞集塊が、腫瘍組織と同等かそれ以上の染色強度を示すものを陽性とした。染色像の判定については、細胞診専門医の資格を有する3名の独立した観察者により臨床情報が伏せられた状態で実施し、不一致症例については再度3名で鏡検して判定した。

#### 第6節 腹水細胞診の評価方法

Pap染色及びMGG染色された腹水細胞診スライドを検鏡し、International Systems for Reporting Serous Fluid Cytopathologyの分類に準じて、“non-diagnostic” , “negative for malignancy (NFM)” , “atypia of undetermined significance (AUS)” , “suspicious for malignancy (SFM)” , および “malignant (MAL)” の5段階に分類した [19]。NFMおよびAUSを腹水細胞診陰性、SFMおよびMALを腹水細胞診陽性と定義した。

“raspberry body” は、淡明な胞体と明瞭な細胞膜を有する腫瘍細胞によって囲まれた細胞外基質成分を持つ細胞集塊、“globe-like structure” は、同様の腫瘍細胞により構成される大きな球

状の細胞集塊、“hobnail cell”は腫瘍細胞の核が細胞の遊離面近くに突出する像と定義した。図1に各細胞診所見の代表的写真を示す。細胞診の判定については、3名の独立した観察者によって実施し、不一致症例については再度3名で鏡検して判定した。

## 第7節 結果

### 第1項 腹水細胞診判定および免疫組織化学的染色結果

適格基準に当てはまると判定された卵巣明細胞癌の症例は17例であった。この17例（症例1～症例17）の概要を表2に示す。FIGO進行期分類のIA期が5例（29.4%）、IC期が4例（23.5%）、IIB期が2例（11.8%）、III期が5例（29.4%）、IV期が1例（5.9%）であった。

腫瘍組織標本におけるHNF-1 $\beta$ は全例で陽性、PRおよびWT-1は全例で陰性であった。セルブロックにおいてHNF-1 $\beta$ 陽性となったのは10例（58.8%）であった。図2にセルブロックおよび腫瘍組織における同一患者のHNF-1 $\beta$ 陽性例の代表的な写真を示す。腹水細胞診の判定は、8例（47.1%）がNFM、2例（11.8%）がAUS、7例（41.1%）がMALであり、non-diagnosticおよびSFMと

判定された例はなかった。これらの結果は日常診療における当初の腹水細胞診の診断と相違はなく、FIGO病期IA期の5例はNFM、IC1期の2例はAUS、IC2期の1例はNFM、IC3期の1例はMALおの判定だった。MALと診断された7例のうち、“raspberry body”は4例（57.1%）、“globe-like structure”は6例（85.7%）、“hobnail cell”は1例（14.3%）で観察された。従来のFIGO進行期分類でIA期と診断された5例のうち3例はセルブロックのHNF-1 $\beta$ が陰性となったが、2例においてセルブロックのHNF-1 $\beta$ が陽性となった（症例1：図3、症例2：図4）。また、IC1期と診断された2例のうち1例で、セルブロックのHNF-1 $\beta$ が陽性となった（症例3：図5）。

## 第2項 腹水細胞診およびセルブロックの比較

腹水細胞診の良悪性判定とセルブロックの良悪性診断が一致したのは14例（82.4%）、不一致であったのは3例（17.6%、症例1-3）であった。症例1のPap染色およびMGG染色された腹水細胞診では、明らかな異型細胞は存在せず、少量の中皮細胞及び組織球が観察されるのみであった。一方、腫瘍組織では、明るい細

胞質と間質の硝子化を伴う腫瘍細胞から構成されたシート状の充実性増殖像が観察され、腫瘍細胞の核はHNF-1 $\beta$ にびまん性に陽性となった。また、セルブロックでは、HE染色で異型細胞からなる細胞集塊がみられ、同一部位の細胞核はHNF-1 $\beta$ に陽性となった（図3）。

症例2のPap染色およびMGG染色された腹水細胞診では、少量のリンパ球及び好中球が散在性にみられ、明らかな異型細胞はみられなかった。腫瘍組織は、淡明な細胞質を有する腫瘍細胞が乳頭状および管状に増殖する像を呈しており、hobnail状の大型核を有する腫瘍細胞もみられ、腫瘍細胞の核はHNF-1 $\beta$ にびまん性陽性となった。セルブロックでは、HE染色で管状構造を呈する異型細胞集塊がみられ、同一部位の腫瘍細胞核はHNF-1 $\beta$ に陽性であった（図4）。

症例3のPap染色およびMGG染色された腹水細胞診では、軽度の核腫大を呈する異型細胞がごく少量みられた。腫瘍組織は、淡明な細胞質およびHobnail状の大型核を有する腫瘍細胞が乳頭状に増殖する像を示し、HNF-1 $\beta$ はびまん性に核陽性となった。セルブロックでは、HE染色で核は小さいものの、核/細胞質比の比

較的低い細胞から構成される管状構造を呈する細胞集塊がみられ、同一部位のHNF-1 $\beta$ は核陽性像を示した（図5）。

症例1、2はFIGO進行期分類でIA期、症例3はIC1期と診断されていたが、セルブロックの結果を適用した場合にはいずれもIC3期と判定される可能性があった。



### 第3章 卵巣漿液性癌の腹水セルブロックにおけるCD8陽性リンパ球

#### の臨床的意義

#### 第1節 背景及び目的

卵巣癌の組織型、診断時年齢、FIGO 進行期、手術の完遂度（残存腫瘍径）は重要な予後規定因子である [20-24]。卵巣癌の組織型で最も頻度が高いのは、高異型度漿液性癌（high-grade serous carcinoma: HGSC）である [25]。HGSC の臨床的特徴として、FIGO 進行期分類の III 期または IV 期で診断され、化学療法に対する感受性が高い例が多いという特徴を持つ [25]。

近年、癌に対する免疫応答が予後因子として注目されており、中でも CD8 陽性リンパ球は、直接腫瘍細胞を攻撃することで抗腫瘍効果を発揮する [26]。近年の研究では、CD8 陽性リンパ球は腫瘍浸潤リンパ球の一つを担っており、数々のがん種で腫瘍組織中の CD8 陽性リンパ球の高発現は、予後良好な因子と報告されており、HGSC でも同様な傾向とされている [27-31]。同様に、HGSC 患者の腹水中に含まれる CD8 陽性リンパ球数が多い症例は、予後良好との報告が散見されており [32-34]、近年 CD8 陽性リンパ球は予後

を規定するバイオマーカーの一つとして注目されている。

一方で、CD4 陽性リンパ球は、樹状細胞などの抗原提示細胞や腫瘍細胞が発現する主要組織適合遺伝子複合体クラス II 分子を認識する T リンパ球であり、免疫応答の調節に関与している [35]。そのサブセットの一つである forkhead box P3 (FoxP3) 陽性リンパ球は、抗腫瘍活性を抑制的に制御していることが知られている [36-38]。また、腫瘍細胞における programmed death ligand 1 (PD-L1) の発現は、腫瘍細胞の抗腫瘍免疫からの逃避機構に関連する分子として近年注目されている [39, 40]。卵巣癌においても CD4 陽性リンパ球および PD-L1 は、HGSC 患者の予後に関連する因子として報告されており [36-40]、これらの抗腫瘍免疫に関するメカニズムの解明が卵巣癌に対する免疫チェックポイント阻害薬の効果判定に関わる新規診断ツールの開発につながる可能性がある。加えて、腫瘍組織のミスマッチ修復 (mismatch repair: MMR) 欠損があると、PD-L1 を含む抗腫瘍免疫を減弱させる因子が高発現し、腫瘍細胞を攻撃するリンパ球からの逃避が起こる [39, 40]。実際に、大腸癌や子宮体癌において MMR 欠損は、免疫チェックポイント阻害薬の奏効と極めて深く関連している [38, 40]。

本研究の目的は、HGSC 患者の腹水から作製した腹水セルブロックを用いて、腫瘍免疫に関連する T リンパ球および分子発現に関する免疫染色を行い、腫瘍組織におけるこれらの免疫染色結果と比較検討し、腫瘍免疫に関わる T リンパ球の数や関連分子発現と、患者予後との関連を調べることである。

## 第 2 節 症例選択基準

2014 年 1 月から 2019 年 12 月の間に、防衛医科大学校病院で初回の腫瘍減量手術を行い HGSC と術後病理診断された症例（53 例）のうち、術中に採取した腹水からセルブロックを作製した症例（38 例）を対象とした。術中に採取された腹水が洗浄腹水細胞診のみであった症例、および術前に化学療法が施行された症例は除外した。年齢、FIGO 進行期分類、手術完遂度、転帰などの臨床病理学的因子は、診療録及び手術記録を用いて後方視的に収集した。

## 第 3 節 腹水セルブロックの作成方法

第 2 章、第 3 節に同じ。

#### 第4節 免疫組織化学染色のプロトコール

作製した腹水セルブロック、および対象症例の手術検体から切り出され、当院検査部で保管されているホルマリン固定パラフィン包埋腫瘍組織ブロックを用いた。腫瘍組織についてはHE染色されたスライドから、HGSCの特徴的な腫瘍組織を有する卵巣原発巣のブロックを抽出した。腹水セルブロックおよび腫瘍組織ブロックとも、4  $\mu$ mの厚さに薄切、スライドグラスに貼付し、免疫染色を行った。

一次抗体には、CD8に対するマウスモノクローナル抗体 (C8/144B, Dako/Agilent. 希釈率 1:50)、CD4に対するマウスモノクローナル抗体 (SP35, Abcam, Cambridge, UK. 希釈率 1:50)、FoxP3に対するマウスモノクローナル抗体 (236A/E7, Abcam. 希釈率 1:100)、MutL homolog 1 (MLH1)に対するマウスモノクローナル抗体 (ES05, Dako/Agilent. 希釈率 1:100)、MutS homolog 2 (MSH2)に対するマウスモノクローナル抗体 (FE11, Dako/Agilent. 希釈率 1:400)、MutS homolog 6 (MSH6)に対するウサギモノクローナル抗体 (clone 44, Biocare

Medical, Pacheco, CA, USA. 希釈率 1:200) 、 postmeiotic segregation increased 2 (PMS2)に対するウサギモノクローナル抗体 (EP51, Dako/Agilent. 希釈率 1:10) 、 PD-L1に対するウサギモノクローナル抗体 (EPR19759, Abcam. 希釈率 1:250) 、 を用いた。抗体の一覧を表3に示す。

薄切した検体は、キシレンで脱パラフィン化後に、エタノールで脱キシレン処理を行った。0.3%過酸化水素水で内因性ペルオキシダーゼ反応を停止させた。CD8、PD-L1に対する一次抗体の抗原賦活は10 mMのクエン酸緩衝液 (pH 6.0) を用い、オートクレーブを121°Cで5分間行った。その後、室温となるまで静置した。

CD4、FoxP3、MLH1、MSH2、MSH6、PMS2に対する一次抗体の抗原賦活については1 mMのEDTA緩衝液 (pH 8.0) を用い、98°Cで40分を行った。その後、各々室温となるまで静置した。

一次抗体を各スライドガラスの切片上に載せたのちに4°Cで一晩おいて抗原抗体反応をさせた。二次抗体として、ビオチン標識抗マウスIgG抗体 (H+L) (BA-9200, Vector Laboratories) ないしビオチン標識抗ラビットIgG抗体 (H+L) (BA-1000, Vector Laboratories) を用い、室温で30分間静置した。その後

VECTASTATIN Elite ABC kit (Vector Laboratories)を用いて室温で30分間静置した。特異的抗原反応の可視化は0.2%ジアミノベンジジン四塩酸塩と5%過酸化水素水を用いた。対比染色としてMayer hematoxylin液を用いた。陽性コントロールは、CD8およびFoxP3については扁桃、CD4については脾臓、MLH1、MSH2、PMS2については虫垂、MSH6については大腸、PD-L1については胎盤を用いた。各抗体において、陰性コントロールは一次抗体を使用せず上記過程を実施したものを用い、全ての陰性コントロールで特異的な反応が無いことを確認した。

#### 第5節 腹水セルブロックの免疫染色像評価方法

腫瘍組織は原発巣の腫瘍組織を用い、転移巣の腫瘍組織は用いなかった。腹水セルブロックの判定において、10個以上の腫瘍細胞により構成された細胞集塊を腫瘍細胞集塊と定義した。腫瘍細胞集塊が30個未満の症例は判定対象から除外した。

セルブロック標本におけるPD-L1の免疫染色像の評価は、腫瘍細胞集塊もしくは腫瘍細胞の可能性のある異型細胞集塊が、腫瘍組織と同等かそれ以上の染色強度を示すものを陽性とした。

腹水セルブロック中のCD8陽性リンパ球、CD4陽性リンパ球、FoxP3陽性リンパ球の評価において、各々これらの陽性リンパ球が1個以上腫瘍細胞集塊上に存在する症例を陽性リンパ球陽性とし、存在しない症例は陽性リンパ球陰性と定義した。CD8陽性リンパ球陽性となった群をA群、陰性となった群をB群とした。染色像の判定については、細胞診専門医の資格を有する3名の独立した観察者により臨床情報が伏せられた状態で実施し、不一致症例については再度3名で鏡検して判定した。セルブロック標本におけるCD8、CD4、FoxP3の陽性例および陰性例を図6に示す。

また、腹水セルブロックにおけるMLH1、MSH2、MSH6、PMS2の免疫染色の判定は、わずかでも免疫染色に反応がある場合は陽性、全く免疫染色反応がなかったものを陰性とした。MLH1、MSH2、MSH6、PMS2の全てが陽性の場合にはMMR保持、いずれか一つでも陰性の場合にはMMR欠損と定義した。PD-L1の判定は、腫瘍細胞集塊を構成する細胞の1%以上に免疫染色反応があるものをPD-L1陽性、それ以外をPD-L1陰性と定義した。MLH1、MSH2、MSH6、PMS2、PD-L1の陽性例およびMSH6とPD-L1の陰性例を図7に示す。

## 第 6 節 腹水セルブロックおよび組織標本における CD8 陽性リンパ球数の計測方法

腹水セルブロック中の CD8 陽性リンパ球数は、腫瘍細胞集塊の存在しない背景部分を無作為に 9 か所選定し、Hybrid Cell Count software (BZ-X800, Keyence, 大阪)<sup>®</sup>で認識させ、その絶対数を計測した。CD8 陽性リンパ球数の和をその症例のセルブロックにおける CD8 陽性リンパ球数と定義した。また、切除腫瘍組織標本においては、腫瘍組織および間質との境界部 (腫瘍先進部) を 9 か所選定し、腫瘍先進部の写真が、腫瘍組織:境界部:間質の面積比が概ね 1:1:1 になるように、×20 の対物レンズを通して撮影した。同部位の CD8 陽性リンパ球を Hybrid Cell Count software (BZ-X800, Keyence) で認識させ、撮影された領域内でその絶対数を計測した。9 か所の選定部位のうち、CD8 陽性リンパ球数の最大値をその症例の腫瘍組織 CD8 陽性リンパ球数と定義した (図 8)。

## 第 7 節 統計学的解析方法

統計ソフトウェアの JMP<sup>®</sup> Pro ver. 14.0.0 (SAS Institution Inc, Cary, NY, USA.) を用いて統計学的解析を行った。群間の比



較にはカイ二乗検定およびフィッシャーの正確確率検定を用いた。FIGO 進行期分類は、手術進行期分類 FIGO 2014 を用いて決定した。手術時の残存腫瘍径が 10mm 未満であった場合は optimal surgery、10mm 以上であった場合は suboptimal surgery と定義した。術後に施行した化学療法の効果は、Response Evaluation Criteria in Solid Tumors (RECIST) ver1.1 に準拠して判定した [41]。無増悪生存期間 (progression-free survival: PFS) は、初回治療開始日から再発、増悪と判定または死亡までの期間と定義した。全生存期間 (overall survival: OS) は、初回治療開始日から死亡または最終生存確認日までの期間と定義した。受信者動作特性 (receiver operating characteristic : ROC) 曲線により、セルブロックの CD8 陽性リンパ球の判定と、組織の CD8 陽性リンパ球数を係数とし、CD8 陽性リンパ球数のカットオフ値を計算した。PFS および OS の生存曲線は Kaplan-Meier 法を用いて描出し、PFS および OS における両群間の比較はログランク検定を用いた。単変量解析および多変量解析は、コックス比例ハザードモデルを用いて解析し、単変量解析で有意と判断された項目を抽出して多変量解析を行った。p 値が両側 0.05 未満の場合に統計

学的に有意とした。

## 第 8 節 結果

腹水セルブロックが作製された 38 例の HGSC 患者を検討の対象とし、その全てにおいて 30 個以上の腫瘍細胞集塊が観察された。腫瘍細胞集塊上に CD8 陽性リンパ球が存在する A 群と存在しない B 群とに分類したところ、25 例 (65.8%) が A 群に、13 例 (34.2%) が B 群に分類された。両群間のセルブロック標本および腫瘍組織標本中の CD8 陽性リンパ球数の比較、およびセルブロックの CD8 陽性リンパ球の判定と、腫瘍組織の CD8 陽性リンパ球数を係数とした ROC 曲線を図 9 に示す。セルブロック中の背景の CD8 陽性リンパ球数の中央値は A 群で 354 個 (四分位範囲 [interquartile range: IQR] 269 - 679)、B 群で 454 個 (IQR 269 - 679) であり、両群間に有意差はなかった ( $p = 0.89$ )。また、組織中の CD8 陽性リンパ球数の中央値は A 群で 219 個 (IQR 100-530)、B 群で 153 個 (IQR 84 - 250) であり、両群間に有意差はなかった ( $p = 0.17$ )。ROC 曲線の area under the curve (AUC) は 0.637、感度 0.92、特異度 0.55 となり、腫瘍組織中の CD8 陽性リンパ球数のカットオフ

値は 88 個と算出された。

A 群、B 群の両群間の臨床病理学的特徴およびその比較を表 4 に示す。年齢 ( $p = 0.70$ )、FIGO 進行期 ( $p > 0.99$ )、残存腫瘍径 ( $p > 0.99$ )、リンパ節転移の有無 ( $p > 0.99$ )、術後化学療法の有無 ( $p > 0.99$ )、化学療法の奏効度 ( $p = 0.49$ )については、両群間で有意差はなかった。一方で、CD4 陽性リンパ球陽性 ( $p < 0.01$ )、PD-L1 陽性 ( $p = 0.02$ )、FoxP3 陽性リンパ球陽性 ( $p = 0.02$ )となった症例は B 群より A 群の方が有意に多かった。MMR 欠損と判定された症例は 1 例のみ (2.6%)であり、両群間で有意差はなかった ( $p > 0.99$ )。組織中の CD8 陽性リンパ球数がカットオフ値 (88 個)より多い症例は、B 群より A 群の方が有意に多かった ( $p = 0.03$ )。

予後に関する検討では、A 群は B 群よりも有意に PFS ( $p < 0.01$ ) および OS ( $p = 0.04$ )が良好であった (図 10A, B)。一方で CD4 陽性リンパ球陽性群 ( $n = 20$ )と陰性群 ( $n = 18$ )の比較では、PFS ( $p = 0.18$ )および OS ( $p = 0.98$ )に有意差はなく、FoxP3 陽性リンパ球陽性群 ( $n = 20$ )と陰性群 ( $n = 18$ )の比較でも、PFS ( $p = 0.83$ ) および OS ( $p = 0.44$ )に有意差はなかった (図 10C-F)。

PFS および OS に対するコックスの単変量ならびに多変量解析では、Optimal surgery の達成は、良好な PFS (Hazard ratio [HR] 0.17、95%信頼区間 [Confidence interval: CI] 0.05 - 0.53 ;  $p < 0.01$ ) および OS (HR 0.03、95%CI 0.08 - 0.94 ;  $p = 0.03$ ) に関連した。同時に、A 群であることは PFS (HR 0.24、95%CI 0.10 - 0.65 ;  $p < 0.01$ ) および OS (HR 0.21、95%CI 0.11 - 0.91 ;  $p = 0.03$ ) の独立した予後良好因子であった (表 5)。

## 第4章 考察

### 第1節 卵巣明細胞癌の腹水細胞診における腹水セルブロックの意義

卵巣明細胞癌で特徴的な腹水細胞診の特徴的所見の出現頻度は、過去の報告でraspberry bodyは23例中17例（73.9%）、globe-like structureは23例中19例（82.6%）、hobnail cellは23例中12例（52.2%）だった [15, 42, 43]。raspberry bodyおよびglobe-like structureの出現度は比較的高く容易に識別が可能だが [14]、hobnail cellの出現頻度は低いので、細胞診判定の際には注意が必要である [42]。

今回の検討では、raspberry body、globe-like structureおよびhobnail cellが観察されなかった症例は、NFMまたはAUSと診断されたが、腹水細胞診陰性と診断された10例中3例において、セルブロック中に悪性細胞が観察された。一般に細胞診の判定において、中皮細胞や腹水中に浮遊し変性した細胞は悪性細胞と形態が似ていることがあり、判定に苦慮する [43, 44]。raspberry body、globe-like structureおよびhobnail cellが観察されない

卵巣明細胞癌の腹水細胞診判定では、このような変性細胞は偽陰性となってしまふ可能性がある。

卵巣明細胞癌の腫瘍組織は、ほぼ全例でHNF-1 $\beta$ が陽性 [45, 46]、ER、WT-1は陰性という免疫組織学的特徴を持っており [47, 48]、腹水セルブロックにおける卵巣明細胞癌の細胞でもHNF-1 $\beta$ が陽性になる [49]。ただし、子宮内膜症においてもHNF-1 $\beta$ が弱陽性になることがあるが、卵巣明細胞癌におけるHNF-1 $\beta$ の発現よりも強度が弱いことが知られている [18]。本研究では、卵巣明細胞癌の腫瘍組織は全例でHNF-1 $\beta$ 陽性かつER陰性、WT-1陰性であり、腹水セルブロック中の腫瘍細胞と推定される細胞集塊も同様の結果であったことから、腹水セルブロック中の細胞集塊は卵巣明細胞癌の腫瘍細胞と推定された。この結果からは、腹水細胞診で中皮の異型か腫瘍細胞かの判定に迷った際に、免疫染色が有用となる場合があることが示唆される。

卵巣癌は、手術による可及的な腫瘍減量および、術後にプラチナ製剤およびタキサン製剤を組み合わせた化学療法を施行することが標準的治療である。近年のシステマティックレビューやメタアナリシスによると、FIGO進行期分類でIA期またはIB期の卵巣明

細胞癌に対しては、術後化学療法を省略できる可能性が示唆されている [50]。最新のNational Comprehensive Cancer Network guidelinesによれば、両側付属器切除、子宮全摘、大網切除、骨盤及び傍大動脈リンパ節廓清を含めた完全ステージング手術による完全切除を達成できたFIGO進行期分類でIA期の卵巣明細胞癌の症例については、術後化学療法を積極的に推奨していない [51]。しかし、FIGO進行期分類でIC期の卵巣明細胞癌の症例では、術後化学療法を施行することが推奨されている [51]。また、本邦ではJapan Clinical Oncology Groupの婦人科腫瘍グループが実施中の試験（上皮性卵巣癌の妊孕性温存治療の対象拡大のための非ランダム化検証的試験）では、妊娠を希望する女性に対して、子宮及び健側の卵巣を温存できる条件として、卵巣明細胞癌についてはIA期に限定している [52]。従って、特にI期の卵巣明細胞癌の治療方針決定において、腹水細胞診の判定により治療方針が大きく変わることになる。セルブロックを用いた腹水細胞診の判定が用いられるようになった場合、従来はIA期と診断していた症例がIC期に変更となる可能性があり、術後化学療法や妊孕性温存の適応および治療方針決定に影響を与える可能性があ

る。

本研究の限界は、単施設における症例数の少ない後方視的検討であり、本検討の結果が予後に影響を与えるかどうかの検討を行っていない点である。しかしながら、腹水セルブロックにより、従来のPap染色およびMGG染色を用いた細胞診判定では検出できなかった腹水中の腫瘍細胞を検出できたという点で新規知見と考える。

## 第2節 卵巣漿液性癌の腹水セルブロックにおけるCD8陽性リンパ球の臨床的意義

本検討において、腫瘍細胞集塊上に1個以上のCD8陽性リンパ球数が存在することは、腫瘍細胞集塊におけるPD-L1の高発現およびFoxP3陽性リンパ球が陽性であること、組織中のCD8陽性リンパ球数が多いことのいずれとも有意な関連があり、さらにHGSC患者における予後良好因子でもあることが示された。

過去の報告では、腫瘍組織におけるPD-L1の発現率は19.5～69.3%と報告されており [32, 53, 54]、セルブロックを用いた本検討では38例中22例 (57.9%)で腫瘍細胞集塊におけるPD-L1が



陽性となった。このことから、腫瘍細胞集塊における PD-L1 発現率は、腫瘍組織における PD-L1 発現率と同程度であると推測された。腫瘍浸潤リンパ球や CD8 陽性 T リンパ球による腫瘍細胞の攻撃は、腫瘍細胞の表面における PD-L1 の発現を誘導し、抗腫瘍免疫からの認識に対する逃避を誘導する可能性が報告されている [33, 55]。同様に、抗腫瘍免疫の抑制調節因子として作用する FoxP3 陽性リンパ球も、CD8 陽性リンパ球などの免疫反応に応答して出現することが報告されている [36, 56]。A 群において、腫瘍細胞集塊での PD-L1 陽性例が多く、CD4 陽性リンパ球および FoxP3 陽性リンパ球陽性例が多かったという結果は、上述のような免疫応答が関連していると推測された。

CD8 陽性リンパ球の臨床的意義についての過去の報告では、HGSC の組織中における CD8 陽性リンパ球の高発現は、予後良好な因子として報告されている [32, 57-61]。しかしながら、腫瘍組織の間質部分に存在する CD8 陽性リンパ球数を評価した報告や [57, 58]、腫瘍組織の浸潤先進部に存在する間質部分における CD8 陽性リンパ球数を測定した報告 [32, 59]、およびその両方を測定した報告など [60, 61]、それぞれの報告によって、その測定・評価方

法が異なっている。今回の検討では、腫瘍組織における CD8 陽性リンパ球数を測定する際には、腫瘍組織の間質部分および浸潤先進部に存在する間質部分の両方を評価することとした。その結果、A 群では腫瘍組織における CD8 陽性リンパ球数が有意に多いという結果が得られた。従って、腫瘍細胞集塊上の CD8 陽性リンパ球を評価することは、腫瘍組織における CD8 陽性リンパの状態を予測できる可能性があると考えられた。

HGSC の腫瘍組織を用いた検討における MMR 欠損の頻度は 0～13.4%と報告されており [40, 62]、セルブロックを用いた本検討では 38 例中 1 例 (2.6%) だった。この結果から、セルブロックでも腫瘍組織と同様に MMR 欠損の有無を評価できる可能性があると考えられた。また、MMR 欠損がある症例では腫瘍浸潤リンパ球が高発現するという他癌腫での報告があるが [28]、本検討では両者の間の相関を検討できなかった。この原因として、MMR 欠損と判定された症例が 1 例と少なかったことが考えられ、更に症例数を増やして検討する必要がある。

本検討の限界として、単施設における症例数の少ない後方視的検討であることが挙げられる。本研究は、HGSCにおける組織中の

CD8陽性リンパ球の状態が、セルブロック中のCD8陽性リンパ球にどのように反映されるのかを検討した研究で、複雑な抗腫瘍免疫機構の一部を簡便に評価でき、予後予測が可能だった点で有用であると考えられる。

## 第5章 結論

卵巣明細胞癌患者の腹水セルブロックを用いた免疫染色により、腹水細胞診陰性と判定された症例でも、腹水中の悪性細胞を検出することができた。また、卵巣漿液性癌患者の腹水セルブロック中の腫瘍細胞集塊上に、1個以上のCD8陽性リンパ球数が存在することは、卵巣漿液性癌患者の予後良好な因子であり、腫瘍組織中のCD8陽性リンパ球数とも関連することが示された。

## 謝辞

本稿を終えるにあたり、多大なる御指導を賜りました防衛医科大学校産科婦人科学講座前教授 古谷健一先生ならびに防衛医科大学校産科婦人科学講座教授 高野政志先生に深甚なる謝意を表します。論文の作成にあたり、大変有用な御助言、多くの知識や示唆を賜りました防衛医科大学校臨床検査医学教授 松熊晋先生、防衛医科大学校病態病理学講座教授 津田均先生に心より御礼申し上げます。また、本研究を行うにあたり大変熱心なご指導を賜りました防衛医科大学校産科婦人科学講座講師 宮本守員先生に深謝いたします。本研究期間を通じ、ご支援を賜りました防衛医科大学校産科婦人科学講座助教 鈴木亜矢子助教に深謝いたします。

## 略語一覽

- AUC area under the curve
- AUS atypia of undetermined
- CA California
- CD cluster of differentiation
- FIGO International Federation of Gynecology and

## Obstetrics

- FoxP3 forkhead box P3
- HE 染色 hematoxylin eosin 染色
- HGSC high-grade serous carcinoma
- HNF-1 $\beta$  hepatocyte nuclear factor-1 $\beta$
- HR hazard ratio
- IQR interquartile range
- MAL malignant
- MGG 染色 May-Grunwald-Giemsa 染色
- MLH1 MutL homolog 1
- MMR mismatch repair
- MSH2 MutS homolog 2

- MSH6 MutS homolog 6
- NFM negative for malignancy
- OS overall survival
- Pap 染色 Papanicolaou 染色
- PD-L1 programmed death ligand 1
- PFS progression-free survival
- PMS2 postmeiotic segregation increased 2
- PR progesterone receptor
- RECIST Response Evaluation Criteria in Solid Tumors
- ROC receiver operating characteristic
- SFM suspicious for malignancy
- USA United States of America
- WT-1 Wilms tumor-1

## 引用文献

[1] 国立がん研究センターがん対策情報センター、がん情報サービス

[https://ganjoho.jp/reg\\_stat/statistics/stat/summary.html](https://ganjoho.jp/reg_stat/statistics/stat/summary.html) (閲

覧日:2022年5月20日)

[2] Mutch DG, Prat J. 2014 FIGO staging for ovarian,

fallopian tube and peritoneal cancer. *Gynecol Oncol.*

2014;133:401-404.

[3] Torre LA, Bray F, Siegel RL, Ferlay J, Lortet-Tieulent J,

Jemal A. Global cancer statistics, 2012. *CA Cancer J Clin.*

2015;65:87-108.

[4] Nagase S, Ohta T, Takahashi F, Enomoto T, 2017 Committee

on Gynecologic Oncology of the Japan Society of Obstetrics and

Gynecology. Annual report of the committee on gynecologic

oncology, the Japan Society of Obstetrics and Gynecology:

annual patients report for 2015 and annual treatment report

for 2010. *J Obstet Gynaecol Res.* 2019;45:289-298.

[5] 日本婦人科腫瘍学会編、卵巣がん・卵管癌・腹膜癌治療ガイドラ

イン 2020年版、金原出版、2020年、p.24-25, p.59



- [6] Quan Q, Zhou S, Liu Y, Yin W, Liao Q, Ren S, Zhang F, Meng Y, Mu X. Relationship between ascites volume and clinical outcomes in epithelial ovarian cancer. *J Obstet Gynaecol Res.* 2021;47:1527-1535.
- [7] Pereira TC, Saad RS, Liu Y, Silverman JF. The diagnosis of malignancy in effusion cytology: a pattern recognition approach. *Adv Anat Pathol.* 2006;13:174-184.
- [8] Wiseman W, Michael CW, Roh MH. Diagnostic utility of PAX8 and PAX2 immunohistochemistry in the identification of metastatic Müllerian carcinoma in effusions. *Diagn Cytopathol.* 2011;39:651-656.
- [9] Kurman RJ, Carcangiu ML, Herrington CS, Young RH. WHO Classification of Tumours of Female Reproductive Organs. 4th ed. Lyon: IARC; 2014:33-35p.
- [10] Korenaga TR, Ward KK, Saenz C, McHale MT, Plaxe S. The elevated risk of ovarian clear cell carcinoma among Asian Pacific islander women in the United States is not affected by birthplace. *Gynecol Oncol.* 2020;157:62-66.

- [11] Takano M, Kikuchi Y, Yaegashi N, Kuzuya K, Ueki M, Tsuda H, Suzuki M, Kigawa J, Takeuchi S, Moriya T, Sugiyama T. Clear cell carcinoma of the ovary: a retrospective multicentre experience of 254 patients with complete surgical staging. *Br J Cancer*. 2006;94:1369-1374.
- [12] Miyamoto M, Takano M, Goto T, Kato M, Sasaki N, Tsuda H, Furuya K. Clear cell histology as a poor prognostic factor for advanced epithelial ovarian cancer: a single institutional case series through central pathologic review. *J Gynecol Oncol*. 2013;24:37-43.
- [13] Okamoto A, Glasspool RM, Mabuchi S, Matsumura N, Nomura H, Itamochi H, Takano M, Takano T, Susumu N, Aoki D, Konishi I, Covens A, Ledermann J, Mezzanzanica D, Steer C, Millan D, McNeish IA, Pfisterer J, Kang S, Gladieff L, Bryce J, Oza A. Gynecologic Cancer InterGroup (GCIg) consensus review for clear cell carcinoma of the ovary. *Int J Gynecol Cancer*. 2014;24:S20-S25.
- [14] Aslam N, Marino CR. Malignant ascites: new concepts in

pathophysiology, diagnosis, and management. Arch Intern Med. 2001;161:2733-2737.

[15] Damiani D, Suciu V, Genestie C, Vielh P. Cytomorphology of ovarian clear cell carcinomas in peritoneal effusions. Cytopathology. 2016;27:427-432.

[16] Pereira TC, Saad RS, Liu Y, Silverman JF. The diagnosis of malignancy in effusion cytology: a pattern recognition approach. Adv Anat Pathol. 2006;13:174-184.

[17] Wiseman W, Michael CW, Roh MH. Diagnostic utility of PAX8 and PAX2 immunohistochemistry in the identification of metastatic Müllerian carcinoma in effusions. Diagn Cytopathol. 2011;39:651-656.

[18] Kato N, Sasou S, Motoyama T. Expression of hepatocyte nuclear factor-1beta (HNF-1beta) in clear cell tumors and endometriosis of the ovary. Mod Pathol. 2006;19:83-89.

[19] Chandra A, Crothers B, Kurtycz D, Schmitt F. Announcement: the international system for reporting serous fluid cytopathology. Acta Cytol. 2019;63:349-351.

[20] Kobel M, Kalloger SE, Huntsman DG, Santos JL, Swenerton KD, Seidman JD. Differences in tumor type in low-stage versus high-stage ovarian carcinomas. *Int J Gynecol Pathol.* 2010;29:203-211.

[21] Lheureux S, Gourley C, Vergote I, Oza AM. Epithelial ovarian cancer. *Lancet.* 2019;393:1240-1253.

[22] Winter WE 3rd, Maxwell GL, Tian C, Carlson JW, Ozols RF, Rose PG, Markman M, Armstrong DK, Muggia F, McGuire WP. Prognostic factors for stage III epithelial ovarian cancer: a Gynecologic Oncology Group Study. *J Clin Oncol.* 2007;25:3621-3627.

[23] Crawford SC, Vasey PA, Paul J, Hay A, Davis JA, Kaye SB. Does aggressive surgery only benefit patients with less advanced ovarian cancer? Results from an international comparison within the SCOTROC-1 Trial. *J Clin Oncol.* 2005;23:8802-8811.

[24] Klar M, Hasenburg A, Hasanov M, Hilpert F, Meier W, Pfisterer J, Pujade-Lauraine E, Herrstedt J, Reuss A, du

Bois A. Prognostic factors in young ovarian cancer patients: an analysis of four prospective phase III intergroup trials of the AGO Study Group, GINECO and NSGO. *Eur J Cancer*. 2016;66:114-124.

[25] Rauh-Hain JA, Melamed A, Wright A, Gockley A, Clemmer JT, Schorge JO, Del Carmen MG, Keating NL. Overall survival following neoadjuvant chemotherapy vs primary cytoreductive surgery in women with epithelial ovarian cancer: analysis of the National Cancer Database. *JAMA Oncol*. 2017;3:76-82.

[26] Steele KE, Tan TH, Korn R, Dacosta K, Brown C, Kuziora M, Zimmermann J, Laffin B, Widmaier M, Rognoni L, Cardenes R, Schneider K, Boutrin A, Martin P, Zha J, Wiestler T. Measuring multiple parameters of CD8+ tumor-infiltrating lymphocytes in human cancers by image analysis. *J Immunother Cancer*. 2018;6:20.

[27] Hoesli R, Birkeland AC, Rosko AJ, et al. Proportion of CD4 and CD8 tumor infiltrating lymphocytes predicts survival in persistent/recurrent laryngeal squamous cell carcinoma.

Oral Oncol. 2018;77:83-89.

[28] Wang K, Shen T, Siegal GP, Wei S. The CD4/CD8 ratio of tumor-infiltrating lymphocytes at the tumor-host interface has prognostic value in triple-negative breast cancer. Hum Pathol. 2017;69:110-117.

[29] Mazzaschi G, Madeddu D, Falco A, Bocchialini G, Goldoni M, Sogni F, Armani G, Lagrasta CA, Lorusso B, Mangiaracina C, Vilella R, Frati C, Alfieri R, Ampollini L, Veneziani M, Silini EM, Ardizzoni A, Urbanek K, Aversa F, Quaini F, Tiseo M. Low PD-1 Expression in Cytotoxic CD8+ Tumor-infiltrating lymphocytes confers an immune-privileged tissue microenvironment in NSCLC with a prognostic and predictive value. Clin Cancer Res. 2018;24:407-419.

[30] Okadome K, Baba Y, Yagi T, Kiyozumi Y, Ishimoto T, Iwatsuki M, Miyamoto Y, Yoshida N, Watanabe M, Baba H. Prognostic nutritional index, tumor-infiltrating lymphocytes, and prognosis in patients with esophageal cancer. Ann Surg. 2020;271:693-700.

[31] Hendry S, Salgado R, Gevaert T, Russell PA, John T, Thapa B, Christie M, van de Vijver K, Estrada MV, Gonzalez-Ericsson PI, Sanders M, Solomon B, Solinas C, Van den Eynden GGM, Allory Y, Preusser M, Hainfellner J, Pruneri G, Vingiani A, Demaria S, Symmans F, Nuciforo P, Comerma L, Thompson EA, Lakhani S, Kim SR, Schnitt S, Colpaert C, Sotiriou C, Scherer SJ, Ignatiadis M, Badve S, Pierce RH, Viale G, Sirtaine N, Penault-Llorca F, Sugie T, Fineberg S, Paik S, Srinivasan A, Richardson A, Wang Y, Chmielik E, Brock J, Johnson DB, Balko J, Wienert S, Bossuyt V, Michiels S, Ternes N, Burchardi N, Luen SJ, Savas P, Klauschen F, Watson PH, Nelson BH, Criscitiello C, O'Toole S, Larsimont D, de Wind R, Curigliano G, André F, Lacroix-Triki M, van de Vijver M, Rojo F, Floris G, Bedri S, Sparano J, Rimm D, Nielsen T, Kos Z, Hewitt S, Singh B, Farshid G, Loibl S, Allison KH, Tung N, Adams S, Willard-Gallo K, Horlings HM, Gandhi L, Moreira A, Hirsch F, Dieci MV, Urbanowicz M, Brcic I, Korski K, Gaire F, Koeppen H, Lo A, Giltnane J, Rebelatto

MC, Steele KE, Zha J, Emancipator K, Juco JW, Denkert C, Reis-Filho J, Loi S, Fox SB. Assessing tumor-infiltrating lymphocytes in solid tumors: a practical review for pathologists and proposal for a standardized method from the international immuno-oncology biomarkers working group: part 2: TILs in melanoma, gastrointestinal tract carcinomas, non-small cell lung carcinoma and mesothelioma, endometrial and ovarian carcinomas, squamous cell carcinoma of the head and neck, genitourinary carcinomas, and primary brain tumors. *Adv Anat Pathol.* 2017;24:311-335.

[32] Ovarian Tumor Tissue Analysis (OTTA) Consortium, Goode EL, Block MS, Kalli KR, Vierkant RA, Chen W, Fogarty ZC, Gentry-Maharaj A, Tołoczko A, Hein A, Bouligny AL, Jensen A, Osorio A, Hartkopf A, Ryan A, Chudecka-Głaz A, Magliocco AM, Hartmann A, Jung AY, Gao B, Hernandez BY, Fridley BL, McCauley BM, Kennedy CJ, Wang C, Karpinskyj C, de Sousa CB, Tiezzi DG, Wachter DL, Herpel E, Taran FA, Modugno F, Nelson G, Lubiński J, Menkiszak J, Alsop J, Lester J, García-Donas



J, Nation J, Hung J, Palacios J, Rothstein JH, Kelley JL, de Andrade JM, Robles-Díaz L. Dose-response association of CD8+ tumor-infiltrating lymphocytes and survival time in high-grade serous ovarian cancer. *JAMA Oncol.* 2017;3:e173290.

[33] Webb JR, Milne K, Kroeger DR, Nelson BH. PD-L1 expression is associated with tumor-infiltrating T cells and favorable prognosis in high-grade serous ovarian cancer. *Gynecol Oncol.* 2016;141:293-302.

[34] Wan C, Keany MP, Dong H, Al-Alem LF, Pandya UM, Lazo S, Boehnke K, Lynch KN, Xu R, Zarrella DT, Gu S, Cejas P, Lim K, Long HW, Elias KM, Horowitz NS, Feltmate CM, Muto MG, Worley MJ Jr, Berkowitz RS, Matulonis UA, Nucci MR, Crum CP, Rueda BR, Brown M, Liu XS, Hill SJ. Enhanced efficacy of simultaneous PD-1 and PD-L1 immune checkpoint blockade in high-grade serous ovarian cancer. *Cancer Res.* 2021;81:159-173.

[35] Hadrup S, Donia M, Thor SP. Effector CD4 and CD8 T cells and their role in the tumor microenvironment. *Cancer*

Microenviron. 2013;6:123-133.

[36] Wolf D, Wolf AM, Rumpold H, Fiegl H, Zeimet AG, Muller-Holzner E, Deibl M, Gastl G, Gunsilius E, Marth C. The expression of the regulatory T cell-specific forkhead box transcription factor FoxP3 is associated with poor prognosis in ovarian cancer. *Clin Cancer Res.* 2005;11:8326-8331.

[37] Conrad C, Gregorio J, Wang YH, Ito T, Meller S, Hanabuchi S, Anderson S, Atkinson N, Ramirez PT, Liu YJ, Freedman R, Gilliet M. Plasmacytoid dendritic cells promote immunosuppression in ovarian cancer via ICOS costimulation of Foxp3(+) T-regulatory cells. *Cancer Res.* 2012;72:5240-5249.

[38] Milne K, Köbel M, Kalloger SE, Barnes RO, Gao D, Gilks CB, Watson PH, Nelson BH. Systematic analysis of immune infiltrates in high-grade serous ovarian cancer reveals CD20, FoxP3 and TIA-1 as positive prognostic factors. *PLoS One.* 2009;4:e6412.

[39] Llosa NJ, Cruise M, Tam A, Wicks EC, Hechenbleikner EM,

Taube JM, Blosser RL, Fan H, Wang H, Lubber BS, Zhang M, Papadopoulos N, Kinzler KW, Vogelstein B, Sears CL, Anders RA, Pardoll DM, Housseau F. The vigorous immune microenvironment of microsatellite instable colon cancer is balanced by multiple counter-inhibitory checkpoints. *Cancer Discov.* 2015;5:43-51.

[40] Xiao X, Dong D, He W, Song L, Wang Q, Yue J, Xie L. Mismatch repair deficiency is associated with MSI phenotype, increased tumor-infiltrating lymphocytes and PD-L1 expression in immune cells in ovarian cancer. *Gynecol Oncol.* 2018;149:146-154.

[41] Eisenhauer EA, Therasse P, Bogaerts J, Schwartz LH, Sargent D, Ford R, Dancey J, Arbuck S, Gwyther S, Mooney M, Rubinstein L, Shankar L, Dodd L, Kaplan R, Lacombe D, Verweij J. New response evaluation criteria in solid tumours: revised RECIST guideline (version 1.1). *Eur J Cancer.* 2009;45:228-247.

[42] Vrdoljak-Mozetic D, Stanković T, Krasević M, Versa-

Ostojić D, Stemberger-Papić S, Rupčić S. Intraoperative cytology of clear cell carcinoma of the ovary.

Cytopathology. 2006;17: 390-395.

[43] Atahan S, Ekinçi C, Içli F, Erdogan N. Cytology of clear cell carcinoma of the female genital tract in fine needle aspirates and ascites. *Acta Cytol.* 2000;44:1005-1009.

[44] Higashiguchi A, Yamada T, Susumu N, Mori T, Suzuki A, Aoki D, Sakamoto M. Specific expression of hepatocyte nuclear factor-1beta in the ovarian clear cell adenocarcinoma and its application to cytological diagnosis. *Cancer Sci.* 2007;98: 387-391.

[45] Yamamoto S, Tsuda H, Aida S, Shimazaki H, Tamai S, Matsubara O. Immunohistochemical detection of hepatocyte nuclear factor 1beta in ovarian and endometrial clear-cell adenocarcinomas and nonneoplastic endometrium. *Hum Pathol.* 2007;38:1074-1080.

[46] Tsuchiya A, Sakamoto M, Yasuda J, Chuma M, Ohta T, Ohki M, Yasugi T, Taketani Y, Hirohashi S. Expression profiling

in ovarian clear cell carcinoma: identification of hepatocyte nuclear factor-1 beta as a molecular marker and a possible molecular target for therapy of ovarian clear cell carcinoma. *Am J Pathol.* 2003;163:2503-2512.

[47] Nisolle M, Casanas-Roux F, Donnez J.

Immunohistochemical analysis of proliferative activity and steroid receptor expression in peritoneal and ovarian endometriosis. *Fertil Steril.* 1997;68:912-919.

[48] Köbel M, Bak J, Bertelsen BI, Carpen O, Grove A, Hansen ES, Levin Jakobsen AM, Lidang M, Måsbäck A, Tolf A, Gilks CB, Carlson JW. Ovarian carcinoma histotype determination is highly reproducible, and is improved through the use of immunohistochemistry. *Histopathology.* 2014;64:1004-1013.

[49] Kato N, Toukairin M, Asanuma I, Motoyama T.

Immunocytochemistry for hepatocyte nuclear factor-1beta (HNF-1beta): a marker for ovarian clear cell carcinoma. *Diagn Cytopathol.* 2007;35:193-197.

[50] Bogani G, Ditto A, Lopez S, Bertolina F, Murgia F,

Pinelli C, Chiappa V, Raspagliesi F. Adjuvant chemotherapy vs. observation in stage I clear cell ovarian carcinoma: a systematic review and meta-analysis. *Gynecol Oncol.* 2020;157:293-298.

[51] Morgan RJ Jr, Armstrong DK, Alvarez RD, Bakkum-Gamez JN, Behbakht K, Chen LM, Copeland L, Crispens MA, DeRosa M, Dorigo O, Gershenson DM, Gray HJ, Hakam A, Havrilesky LJ, Johnston C, Lele S, Martin L, Matulonis UA, O'Malley DM, Penson RT, Percac-Lima S, Pineda M, Plaxe SC, Powell MA, Ratner E, Remmenga SW, Rose PG, Sabbatini P, Santoso JT, Werner TL, Burns J, Hughes M. Ovarian cancer, Version 1.2016, NCCN clinical practice guidelines in oncology. *J Natl Compr Canc Netw.* 2016;14:1134-1163.

[52] Satoh T, Tsuda H, Kanato K, Nakamura K, Shibata T, Takano M, Baba T, Ishikawa M, Ushijima K, Yaegashi N, Yoshikawa H; Gynecologic Cancer Study Group of the Japan Clinical Oncology Group. Gynecologic Cancer Study Group of the Japan Clinical Oncology. A non-randomized confirmatory

study regarding selection of fertility-sparing surgery for patients with epithelial ovarian cancer: Japan clinical oncology Group study (JCOG1203). *Jpn J Clin Oncol.* 2015;45:595-599.

[53] Schmoeckel E, Hofmann S, Fromberger D, Rottmann M, Luthardt B, Burges A, Jeschke U, Kirchner T, Lax SF, Mayr D. Comprehensive analysis of PD-L1 expression, HER2 amplification, ALK/EML4 fusion, and mismatch repair deficiency as putative predictive and prognostic factors in ovarian carcinoma. *Virchows Arch.* 2019;474:599-608.

[54] Buderath P, Mairinger F, Mairinger E, Böhm K, Mach P, Schmid KW, Kimmig R, Kasimir-Bauer S, Bankfalvi A, Westerwick D, Hager T. Prognostic significance of PD-1 and PD-L1 positive tumor-infiltrating immune cells in ovarian carcinoma. *Int J Gynecol Cancer.* 2019;29:1389-1395.

[55] Darb-Esfahani S, Kunze CA, Kulbe H, Sehouli J, Wienert S, Lindner J, Budczies J, Bockmayr M, Dietel M, Denkert C, Braicu I, Jöhrens K. Prognostic impact of programmed cell

death-1 (PD-1) and PD-ligand 1 (PD-L1) expression in cancer cells and tumor-infiltrating lymphocytes in ovarian high grade serous carcinoma. *Oncotarget*. 2016;7:1486-1499.

[56] Martin de la Fuente L, Westbom-Fremer S, Arildsen NS, Hartman L, Malander S, Kannisto P, Måsbäck A, Hedenfalk I. PD-1/PD-L1 expression and tumor-infiltrating lymphocytes are prognostically favorable in advanced high-grade serous ovarian carcinoma. *Virchows Arch*. 2020;477:83-91.

[57] Zhang L, Conejo-Garcia JR, Katsaros D, Gimotty PA, Massobrio M, Regnani G, Makrigiannakis A, Gray H, Schlienger K, Liebman MN, Rubin SC, Coukos G. Intratumoral T cells, recurrence, and survival in epithelial ovarian cancer. *N Engl J Med*. 2003;348:203-213.

[58] Sato E, Olson SH, Ahn J, Bundy B, Nishikawa H, Qian F, Jungbluth AA, Frosina D, Gnjjatic S, Ambrosone C, Kepner J, Odunsi T, Ritter G, Lele S, Chen YT, Ohtani H, Old LJ, Odunsi K. Intraepithelial CD8+ tumor-infiltrating



lymphocytes and a high CD8+/regulatory T cell ratio are associated with favorable prognosis in ovarian cancer. Proc Natl Acad Sci USA. 2005;102:18538-18543.

[59] Wang Q, Lou W, Di W, Wu X. Prognostic value of tumor PD-L1 expression combined with CD8+ tumor infiltrating lymphocytes in high grade serous ovarian cancer. Int Immunopharmacol. 2017;52:7-14.

[60] James FR, Jiminez-Linan M, Alsop J, Mack M, Song H, Brenton JD, Pharoah PDP, Ali HR. Association between tumour infiltrating lymphocytes, histotype and clinical outcome in epithelial ovarian cancer. BMC Cancer. 2017;17:657.

[61] Pinto MP, Balmaceda C, Bravo ML, Kato S, Villarroel A, Owen GI, Roa JC, Cuello MA, Ibañez C. Patient inflammatory status and CD4+/CD8+ intraepithelial tumor lymphocyte infiltration are predictors of outcomes in high-grade serous ovarian cancer. Gynecol Oncol. 2018;151:10-17.

[62] Fraune C, Rosebrock J, Simon R, Hube-Magg C, Makrypidi-Fraune G, Kluth M, Büscheck F, Höflmayer D, Schmalfeldt B,

Müller V, Wölber L, Witzel I, Paluchowski P, Wilke C,  
Heilenkötter U, von Leffern I, Clauditz TS, Wilczak W,  
Sauter G, Steurer S, Burandt E. High homogeneity of MMR  
deficiency in ovarian cancer. *Gynecol Oncol.*  
2020;156:669-675.

図表

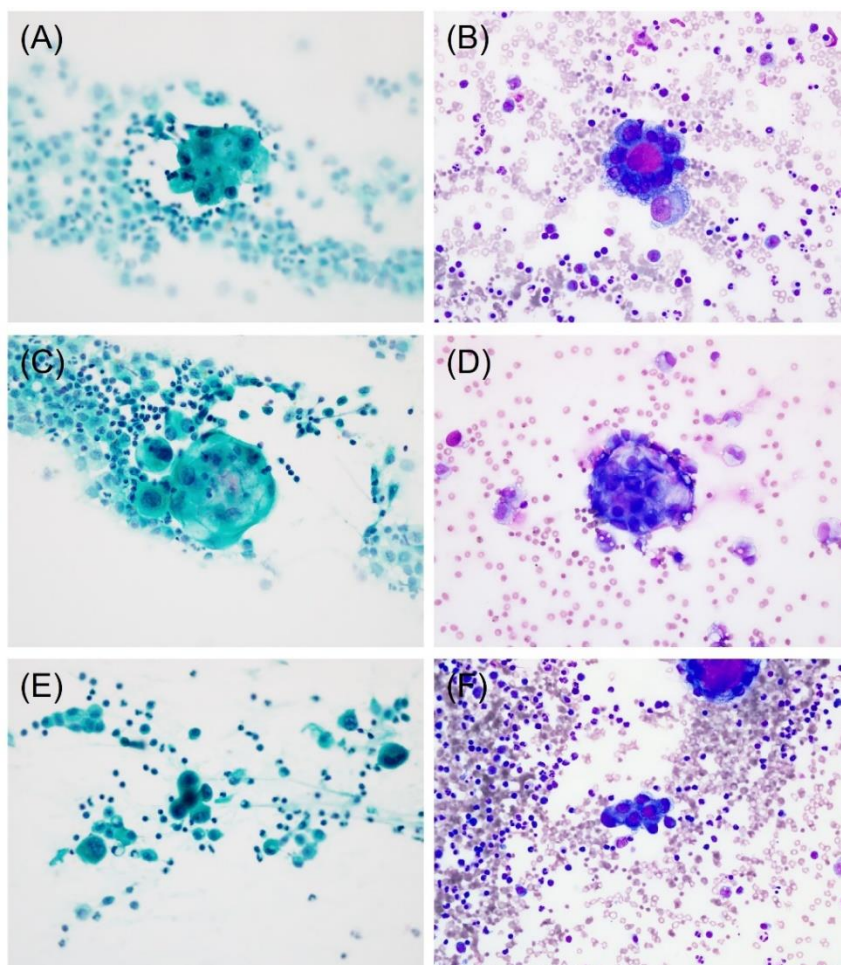


図1腹水中に出現した代表的な卵巣明細胞癌の細胞像

(A, B) raspberry body : 細胞外基質成分を取り囲む淡明な胞体と明瞭な細胞膜を有する腫瘍細胞の構成がみられる (A: Pap染色、B: MGG染色)。 (C, D) Globe-like structure : 大きな球状の腫瘍細胞集塊がみられる (C: Pap染色、D: MGG染色)。 (E, F) hobnail cell : 核が細胞の遊離面近くに突出する腫瘍細胞像がみられる (E: Pap染色、F: MGG染色)。(倍率: 400倍)

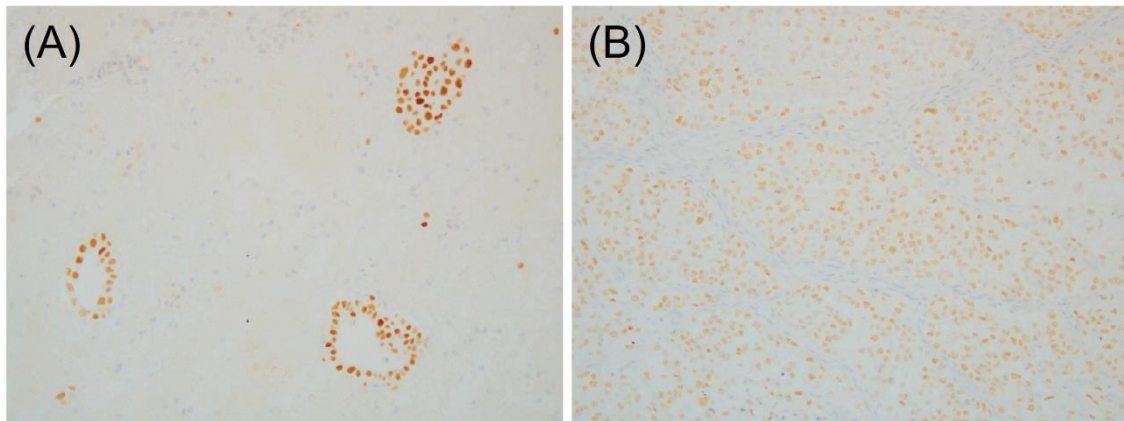


図 2 同一症例のセルブロック標本および腫瘍組織標本における

HNF-1 $\beta$  染色例

(A) セルブロック中の腫瘍細胞集塊および (B) 腫瘍組織において、ともに腫瘍細胞の核が HNF-1 $\beta$  に陽性となっている。(陽性例、  
倍率：200 倍)

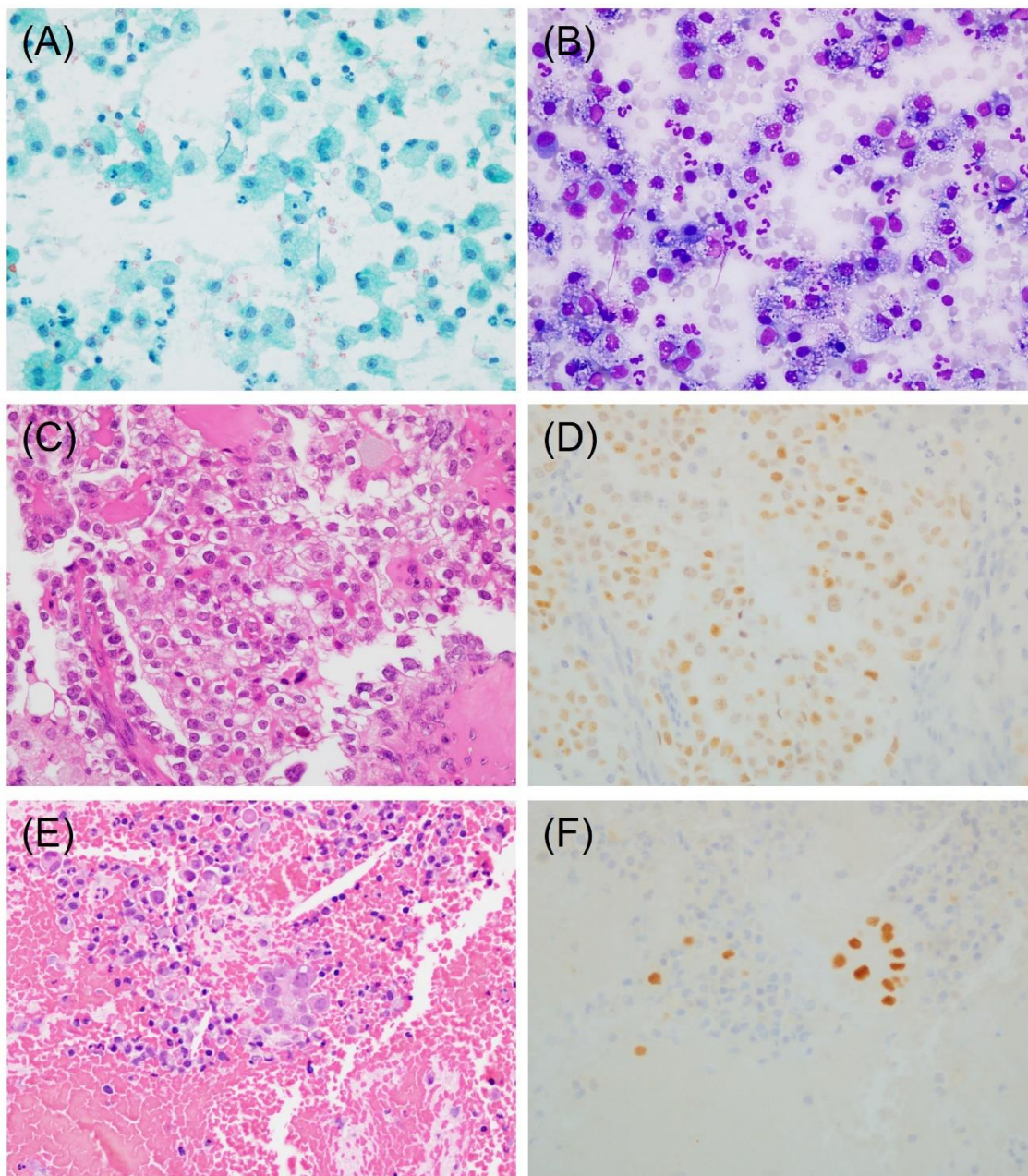


図 3 症例 1 の細胞診、腫瘍組織、およびセルブロックの顕微鏡写真

(A, B) 腹水細胞診では、好中球を背景に、小さな異型の乏しいの円形の核を有する中皮細胞が散在性にみられる (A: Papanicolaou 染色、B: May-Grünwald-Giemsa 染色)。 (C) 腫瘍組織の HE 染色で

は、悪性細胞から構成されるロゼット型の細胞集塊がみられる。

(D) 腫瘍組織の HNF-1 $\beta$  染色では、C と同一部位において、腫瘍細胞の核が染色されている。(E) 腹水セルブロックの HE 染色では、淡明な細胞質を有する hobnail 細胞からなる腫瘍組織が乳頭状に増殖している像がみられる。(F) 腹水セルブロックの HNF-1 $\beta$  染色では、E と同一部位の腫瘍細胞核にびまん性に陽性となっている。(倍率：400 倍)



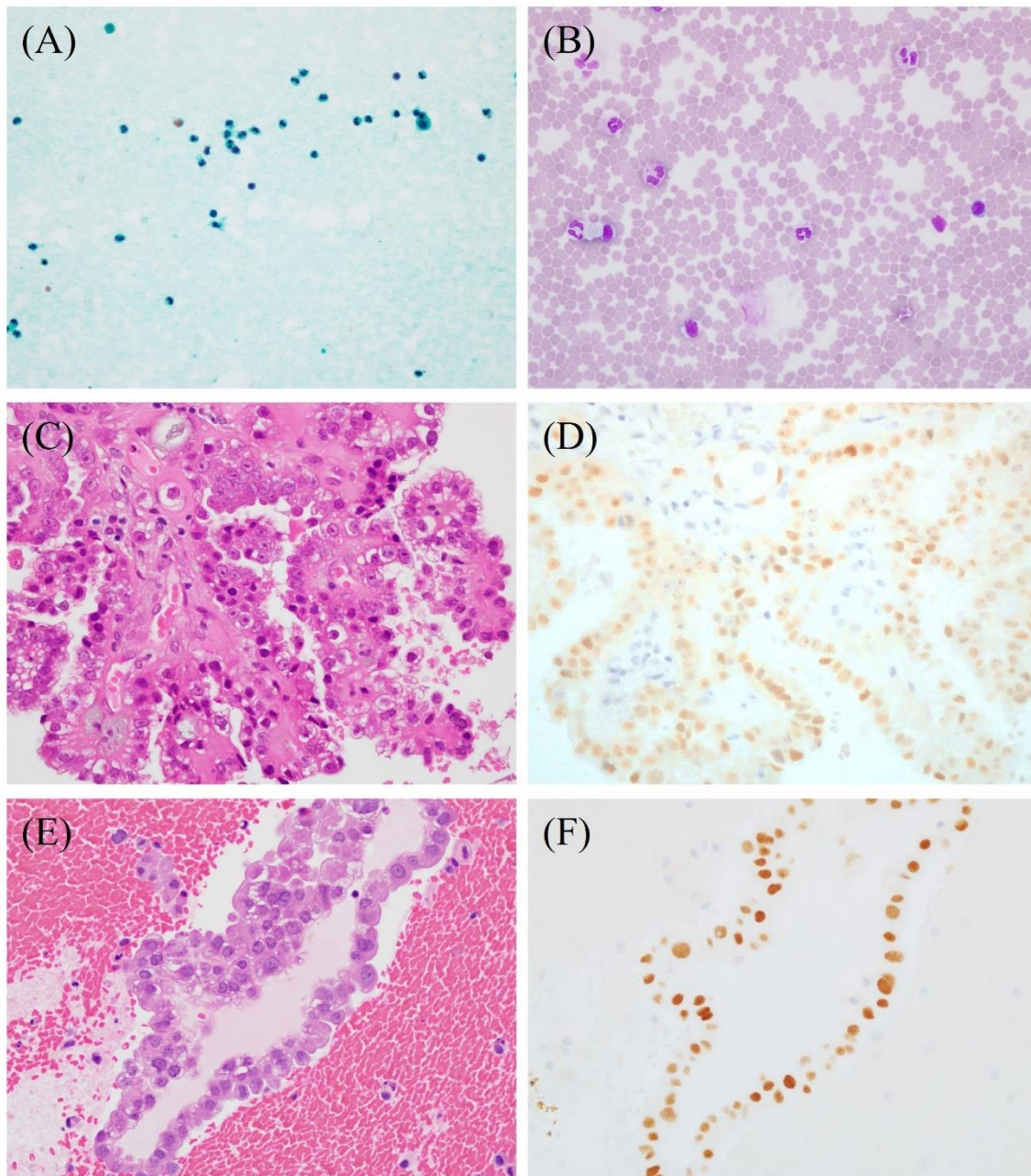


図 4 症例 2 の細胞診、腫瘍組織、およびセルブロックの顕微鏡写真

(A, B) 腹水細胞診では、好中球および赤血球を背景に、異型の乏しい細胞が散在性にみられる (A: Papanicolaou 染色、B: May-Grünwald-Giemsa 染色)。 (C) 腫瘍組織の HE 染色では、淡明な細胞

質を有する核異型の強い腫瘍細胞からなる腫瘍組織が乳頭状構造を呈している像がみられる。(D) 腫瘍組織の HNF-1 $\beta$  染色では、C と同一部位の腫瘍細胞核にびまん性に陽性となっている。(E) 腹水セルブロックの HE 染色では、悪性細胞から構成される管状の細胞集塊がみられる。(F) 腹水セルブロックの HNF-1 $\beta$  染色では、E と同一部位において、腫瘍細胞の核が染色されている。(倍率：400 倍)



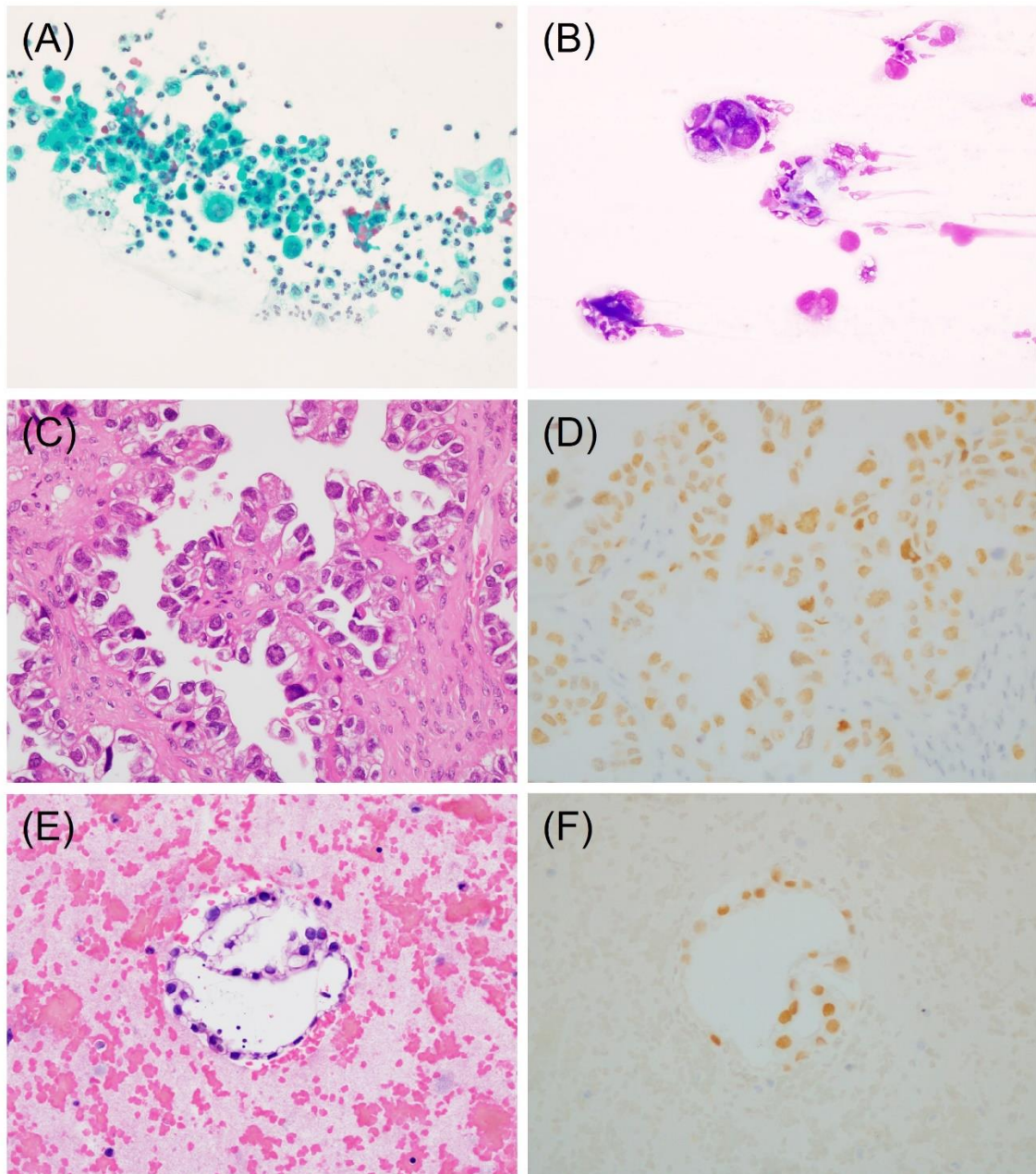


図 5 症例 3 の細胞診、腫瘍組織、およびセルブロックの顕微鏡写真

(A, B) 腹水細胞診では、軽度の核腫大と核縁の不整および核小体を有する細胞が少数見られる (A: Papanicolaou 染色、B: May-Grünwald-Giemsa 染色)。 (C) 腫瘍組織の HE 染色では、淡明な細胞

質と Hobnail 細胞を有し、乳頭状に増殖する腫瘍組織がみられる。

(D) 腫瘍組織の HNF-1 $\beta$  染色では、C と同一部位の腫瘍細胞核にびまん性に陽性となっている。(E) 腹水セルブロックの HE 染色では、核異型を伴う細胞から構成される管状の細胞集塊がみられる。

(F) 腹水セルブロックの HNF-1 $\beta$  染色では、E と同一部位において、腫瘍細胞の核が染色されている。(倍率：400 倍)

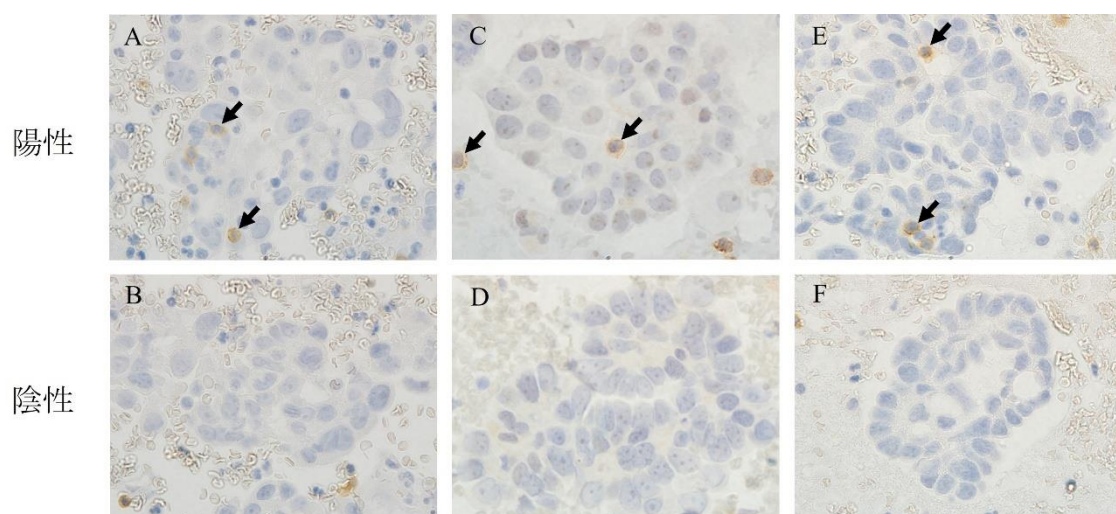


図 6 腹水セルブロックにおける CD8, CD4, FoxP3 陽性例および陰性例。(A, B) CD8 染色。(C, D) CD4 染色。(E, F) FoxP3 染色。

セルブロック中に存在する腫瘍細胞集塊上に1個以上の陽性細胞(矢印)が存在するものをそれぞれ陽性とし (A, C, E)、陽性細胞が1個も存在しないものをそれぞれ陰性とした (B, D, F)。Bでも陽性細胞がみられるが、腫瘍細胞集塊上ではないためカウントされない。

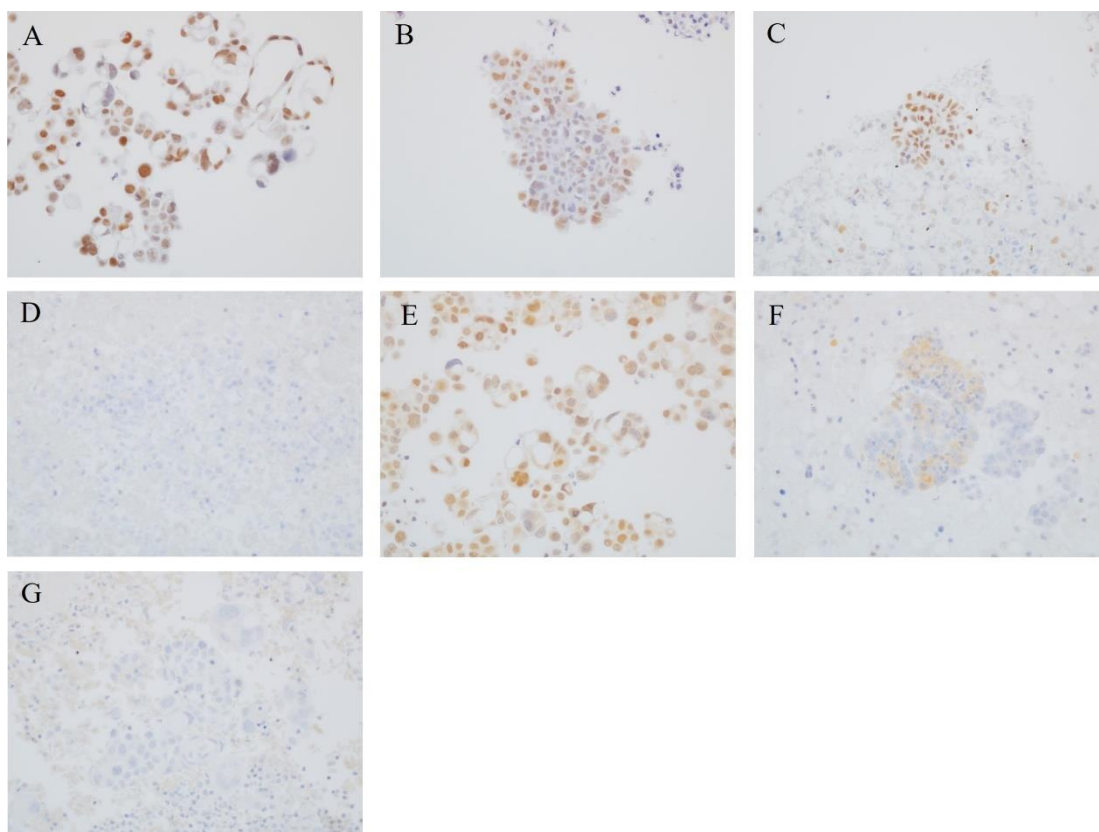


図7 腹水セルブロックにおけるミスマッチ修復タンパクおよびPD-L1の陽性例及び陰性例。(A) MLH1染色。(B) MSH2染色。(C, D) MSH6染色。(E) PMS2染色。(F, G) PD-L1染色。

MLH1、MSH2、MSH6、PMS2はそれぞれ核に強い染色性を示し、セルブロックのスライド中で一部でも染色されていた場合は陽性とし(A-C, E)、全く反応がないものを陰性とした(D)。PD-L1は細胞膜が染色され、セルブロックのスライド中で一部でも染色されていた場合は陽性とし、全く反応がないものを陰性とした。

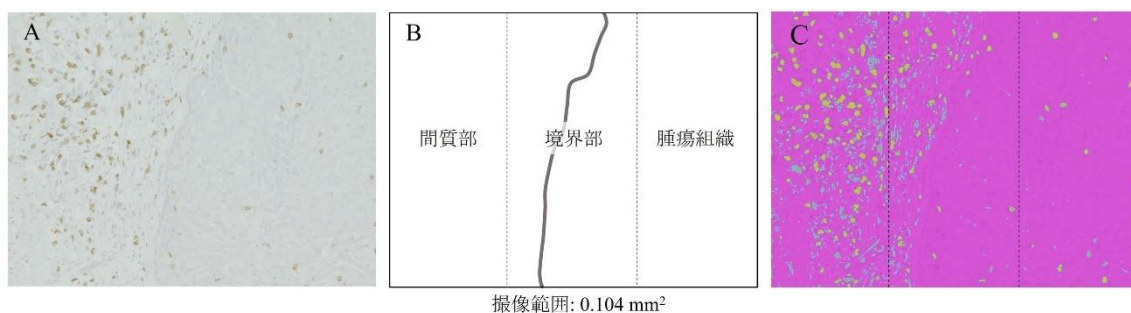


図8 腫瘍組織のCD8陽性リンパ球測定方法

(A, B) 腫瘍先進部において、腫瘍組織:境界部:間質の面積比が概ね1:1:1になるように撮影した。(C) Aと同じ視野をHybrid Cell Count software (BZ-X800, Keyence)を用いてCD8陽性リンパ球を標識し計測した。1検体につき9か所を選定して測定を行い、その最大値をその症例のCD8陽性リンパ球数と定義した。



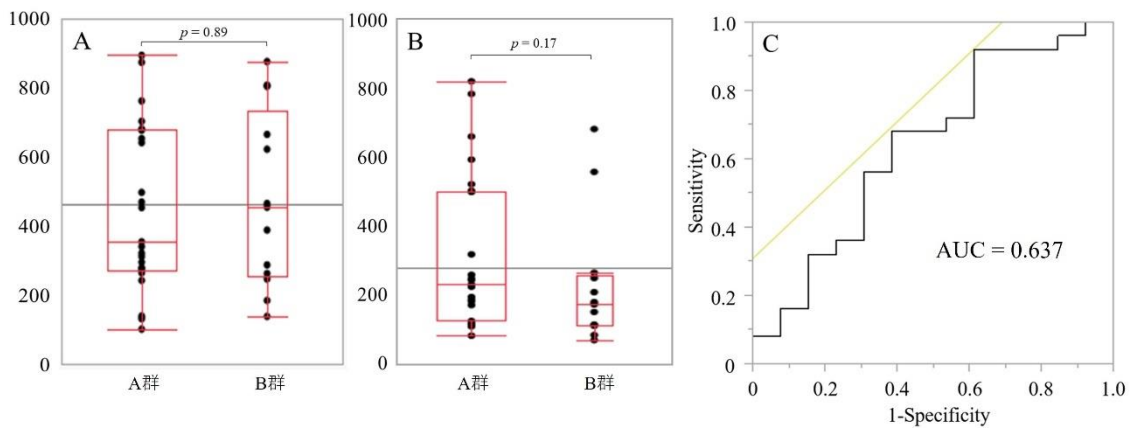


図 9 A 群と B 群における腹水セルブロックの背景の CD8 陽性リンパ球数、および腫瘍組織の CD8 陽性リンパ球数の比較、ならびに A 群に対する腫瘍組織中の CD8 陽性リンパ球数の ROC 曲線

(A) 腹水セルブロックの腫瘍細胞集塊を除いた背景に存在する CD8 陽性リンパ球数の中央値は、A 群では 354 (四分位範囲 [IQR] 269 - 679)、B 群では 454 (IQR 254 - 734) であり、両群間に有意差はなかった ( $p = 0.89$ )。 (B) 腫瘍組織における CD8 陽性リンパ球数の中央値は、A 群で 219 (IQR 100 - 530)、B 群で 153 (IQR 84 - 250) であり、両群間に有意差はなかった ( $p = 0.17$ )。腫瘍組織における A 群に対する腫瘍組織中の CD8 陽性リンパ球数の ROC 曲線では、CD8 陽性リンパ球数のカットオフ値は 88 と計算された。

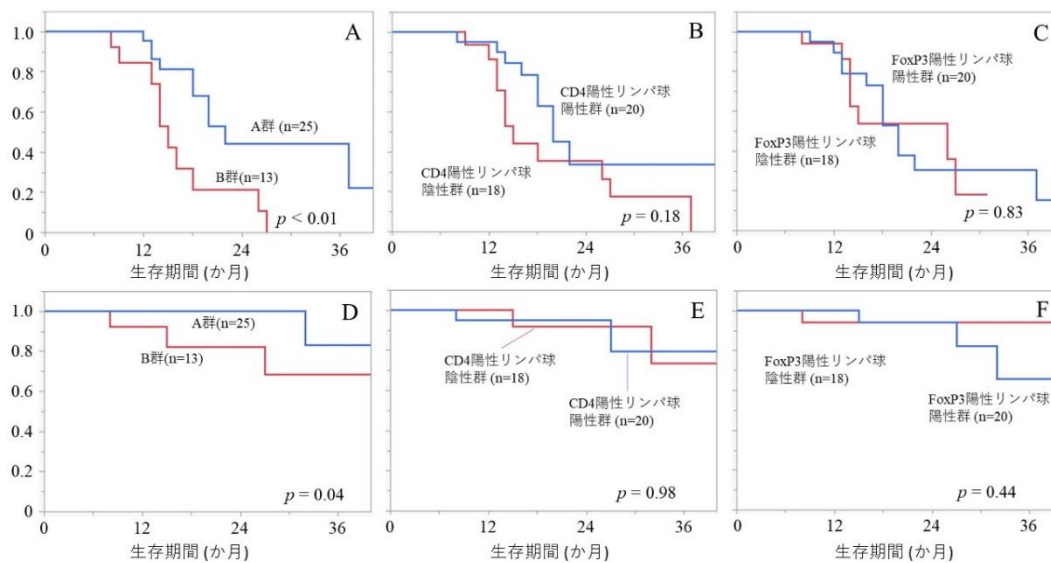


図 10 CD8、CD4 および FoxP3 で層別化した高異型度漿液性癌患者の生存曲線

(A, B) 腹水セルブロックにおいて CD8 陽性リンパ球陽性であった A 群は、陰性であった B 群よりも無増悪生存期間 (A,  $p = 0.01$ ) および全生存期間 (B,  $p = 0.04$ ) において予後良好であった。(C, D) 腹水セルブロックにおいて CD4 陽性リンパ球陽性であった群と、陰性であった群の間には、無増悪生存期間、全生存期間とも有意差がなかった (C,  $p = 0.18$ ; D,  $p = 0.98$ )。腹水セルブロックにおいて FoxP3 陽性リンパ球陽性であった群と、陰性であった群の間には、無増悪生存期間、全生存期間とも有意差がなかった (C,  $p = 0.83$ ; D,  $p = 0.44$ )。

表1 FIGO手術進行期分類(2014)[2]

I期	卵巣あるいは卵管内限局発育
IA期	腫瘍が一侧の卵巣(被膜破綻がない)あるいは卵管に限局し、被膜表面への浸潤が認められないもの。腹水または洗浄液の細胞診にて悪性細胞の認められないもの。
IB期	腫瘍が両側の卵巣(被膜破綻がない)あるいは卵管に限局し、被膜表面への浸潤が認められないもの。腹水または洗浄液の細胞診にて悪性細胞の認められないもの。
IC期	腫瘍が一侧または両側の卵巣あるいは卵管に限局するが、以下のいずれかが認められるもの
IC1期	手術操作による被膜破綻
IC2期	自然被膜破綻あるいは被膜表面への浸潤
IC3期	腹水または腹腔洗浄細胞診に悪性細胞が認められるもの
II期	腫瘍が一侧または両側の卵巣あるいは卵管に存在し、さらに骨盤内(小骨盤腔)への進展を認めるもの、あるいは原発性腹膜癌
IIA期	進展ならびに/あるいは転移が子宮ならびに/あるいは卵管ならびに/あるいは卵巣に及ぶもの
IIB期	他の骨盤部腹腔内臓器に進展するもの
III期	腫瘍が一侧または両側の卵巣あるいは卵管に存在し、あるいは原発性腹膜癌で、細胞学的あるいは組織学的に確認された骨盤外の腹膜播種ならびに/あるいは後腹膜リンパ節転
IIIA1期	後腹膜リンパ節転移のみを認めるもの(細胞学的あるいは組織学的に確認)
IIIA1(i)期	転移巣最大径10 mm以下
IIIA1(ii)期	転移巣最大径10 mmをこえる
IIIA2期	後腹膜リンパ節転移の有無にかかわらず、骨盤外に顕微鏡的播種を認めるもの
IIIB期	後腹膜リンパ節転移の有無にかかわらず、最大径2 cm以下の腹腔内播種を認めるもの
IIIC期	後腹膜リンパ節転移の有無にかかわらず、最大径2 cmをこえる腹腔内播種を認めるもの(実質転移を伴わない肝および脾の被膜への進展を含む)
IV期	腹膜播種を除く遠隔転移
IVA期	胸水中に悪性細胞を認める
IVB期	実質転移ならびに腹腔外臓器(鼠径リンパ節ならびに腹腔外リンパ節を含む)に転移を認めるもの

FIGO, International Federation of Gynecology and Obstetrics.



表2 検索した卵巣明細胞癌17例の所見のまとめ

症例 No.	腹水細胞診	HNF-1 $\beta$ 発現		FIGO進行期	
		セルブロック 標本	腫瘍組織 標本	Pap染色 MGG染色	セルブロック
1	NFM	Positive	Positive	IA	IC3
2	NFM	Positive	Positive	IA	IC3
3	AUS	Positive	Positive	IC1	IC3
4	NFM	Negative	Positive	IA	IA
5	NFM	Negative	Positive	IA	IA
6	NFM	Negative	Positive	IA	IA
7	AUS	Negative	Positive	IC1	IC1
8	NFM	Negative	Positive	IC2	IC2
9	MAL	Positive	Positive	IC3	IC3
10	MAL	Positive	Positive	IIB	IIB
11	MAL	Positive	Positive	IIB	IIB
12	NFM	Negative	Positive	IIIA	IIIA
13	NFM	Negative	Positive	IIIA	IIIA
14	MAL	Positive	Positive	IIIB	IIIB
15	MAL	Positive	Positive	IIIB	IIIB
16	MAL	Positive	Positive	IIIC	IIIC
17	MAL	Positive	Positive	IVB	IVB

AUS, atypia of undetermined; FIGO, International Federation of Gynecology and Obstetrics; HNF-1 $\beta$ , hepatocyte nuclear factor-1 $\beta$ ; MAL, malignant; MGG, May-Grünwald-Giemsa; NFM, negative for malignancy; Pap, Papanicolaou.

表3 第3章研究で使用した一次抗体

抗体	種類	クローン	製造元	希釈倍率	染色部位	コントロール
CD8	Monoclonal (Mouse)	C8/144B	Dako	x50	細胞膜	扁桃
CD4	Monoclonal (Mouse)	SP35	Abcam	x50	細胞膜	脾臓
FoxP3	Monoclonal (Mouse)	236A/E7	Abcam	x100	核	扁桃
PD-L1	Monoclonal (Rabbit)	EPR19759	Abcam	x250	細胞膜	胎盤
MLH1	Monoclonal (Mouse)	ES05	Dako	x100	核	虫垂
MSH2	Monoclonal (Mouse)	FE11	Dako	x400	核	虫垂
MSH6	Monoclonal (Rabbit)	44	Biocare Medical	x200	核	大腸
PMS2	Monoclonal (Rabbit)	EP51	Dako	x10	核	虫垂

CD, cluster of differentiation; FoxP3, forkhead box P3;

MLH1, MutL protein homolog 1; MSH2, MutS protein homolog 2;

MSH6, MutS protein homolog 6; PMS2, postmeiotic segregation

increased 2; PD-L1, programmed death ligand 1.

表4 高異型度漿液性癌におけるA群、B群間の臨床病理学的特徴の比較

	A群 (n = 25) 症例数 (%)	B群 (n = 13) 症例数 (%)	p値
年齢 (中央値)	66 (39 - 84)	64 (29 - 82)	0.70
FIGO進行期			
I	0 (0.0)	0 (0.0)	
II	1 (4.0)	0 (0.0)	
III	19 (76.0)	7 (53.9)	†0.14
IV	5 (20.0)	6 (46.1)	
残存腫瘍径			
Optimal	12 (48.0)	6 (46.2)	>0.99
Suboptimal	13 (52.0)	7 (53.8)	
リンパ節転移			
あり	9 (36.0)	4 (30.8)	>0.99
なし	14 (56.0)	8 (61.5)	
採取なし	2 (8.0)	1 (7.7)	
術後化学療法			
あり	25 (100)	13 (100)	>0.99
なし	0 (0.0)	0 (0.0)	
化学療法の奏効			
CR/PR	14 (56.0)	12 (92.3)	††0.49
SD/PD	2 (8.0)	0 (0.0)	
測定可能病変なし	9 (36.0)	1 (7.7)	
CD4陽性リンパ球			
陽性	18 (72.0)	2 (15.3)	<0.01
陰性	7 (28.0)	11 (84.7)	
PD-L1発現			
陽性	18 (72.0)	4 (30.8)	0.02
陰性	7 (28.0)	9 (69.2)	
FoxP3陽性リンパ球			
陽性	17 (68.0)	3 (23.1)	0.02
陰性	8 (32.0)	10 (76.9)	
腫瘍細胞集塊数			
≥ 100	14 (56.0)	10 (76.9)	0.29
< 100	11 (44.0)	3 (23.1)	
MMR			
保持	24 (96.0)	13 (100)	>0.99
欠損	1 (4.0)	0 (0.0)	
腫瘍組織のCD8陽性リンパ球数			
cut-off値 (≥88)	23 (92.0)	8 (61.5)	0.03
cut-off値 (<88)	2 (8.0)	5 (38.5)	

† III期とIV期で比較、†† CR/PRとSD/PDで比較

CD, cluster of differentiation; CR, complete response;

FoxP3, forkhead box P3; MMR, mismatch repair; PD,

progressive disease; PR, partial response; PD-L1, programmed

death ligand 1; SD, stable disease.

表5 高異型度漿液性癌における無増悪生存期間および全生存期間

に対する単変量解析と多変量解析

	Progression-free survival				Overall survival			
	Univariate analysis		Multivariate analysis		Univariate analysis		Multivariate analysis	
	HR (95% CI)	p値	HR (95% CI)	p値	HR (95% CI)	p値	HR (95% CI)	p値
年齢								
<65 vs ≥65	0.74 (0.28 - 1.84)	0.53			0.42 (0.29 - 3.68)	0.51		
FIGO進行期								
III vs IV	0.43 (0.16 - 1.26)	0.12			0.51 (0.12 - 3.94)	0.47		
残存腫瘍								
Optimal vs Suboptimal	0.24 (0.08 - 0.72)	0.01	0.17 (0.05 - 0.53)	<0.01	0.32 (0.12 - 0.93)	0.03	0.12 (0.08 - 0.94)	0.03
患者群								
A群 vs B群	0.25 (0.14 - 0.88)	0.03	0.24 (0.10 - 0.65)	<0.01	0.26 (0.08 - 0.96)	0.04	0.21 (0.11 - 0.91)	0.03
CD4陽性リンパ球								
陽性 vs 陰性	0.55 (0.22 - 1.36)	0.19			1.02 (0.14 - 7.39)	0.98		
PD-L1発現								
陽性 vs 陰性	0.87 (0.30 - 3.62)	0.78			1.36 (0.13 - 22.8)	0.79		
FoxP3陽性リンパ球								
陽性 vs 陰性	0.90 (0.93 - 16.9)	0.84			2.58 (0.14 - 47.2)	0.46		

CI, confidence interval; FIGO, International Federation of

Gynecology and Obstetrics; FoxP3, forkhead box P3; HR,

hazard ratio; PD-L1, programmed death ligand 1.