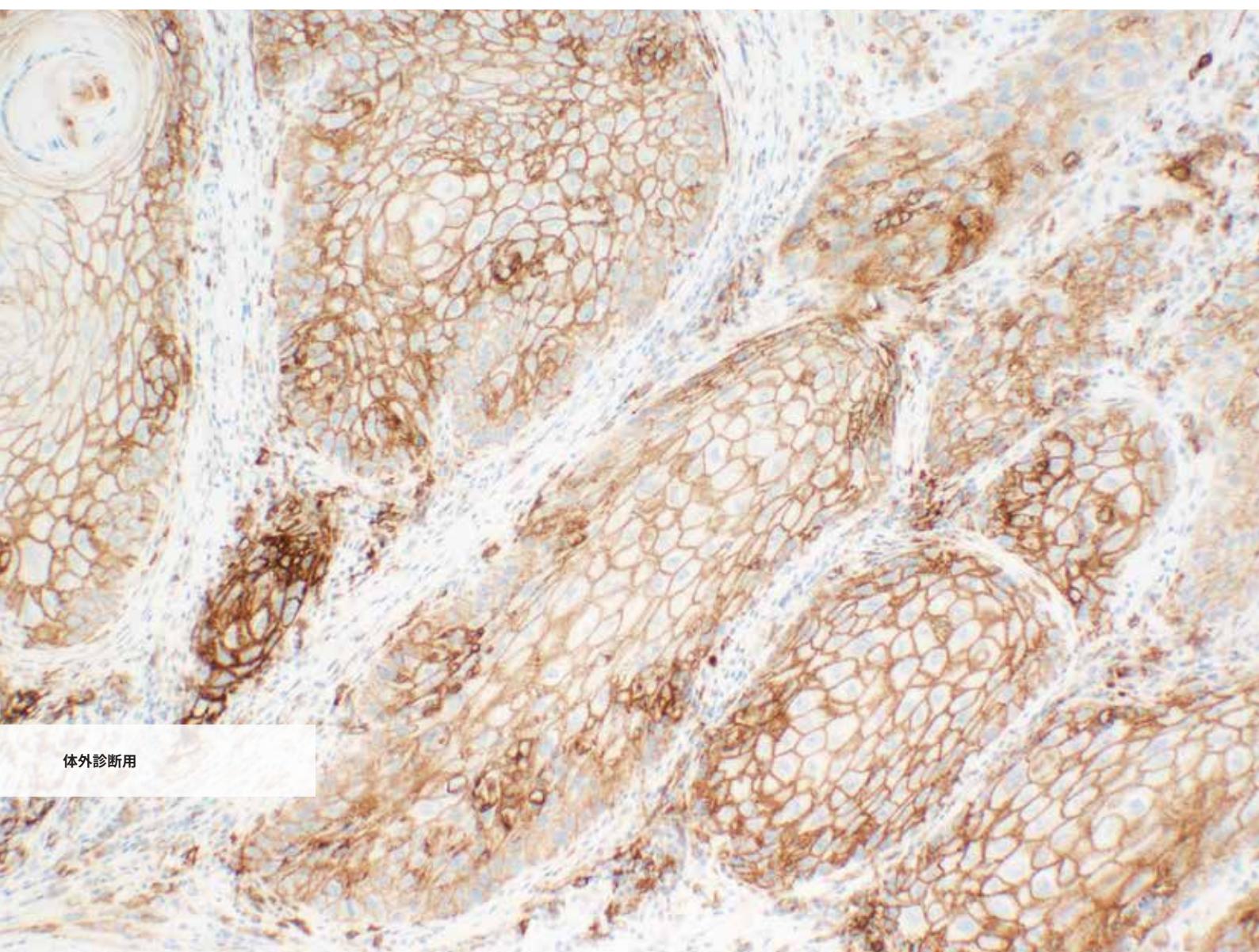


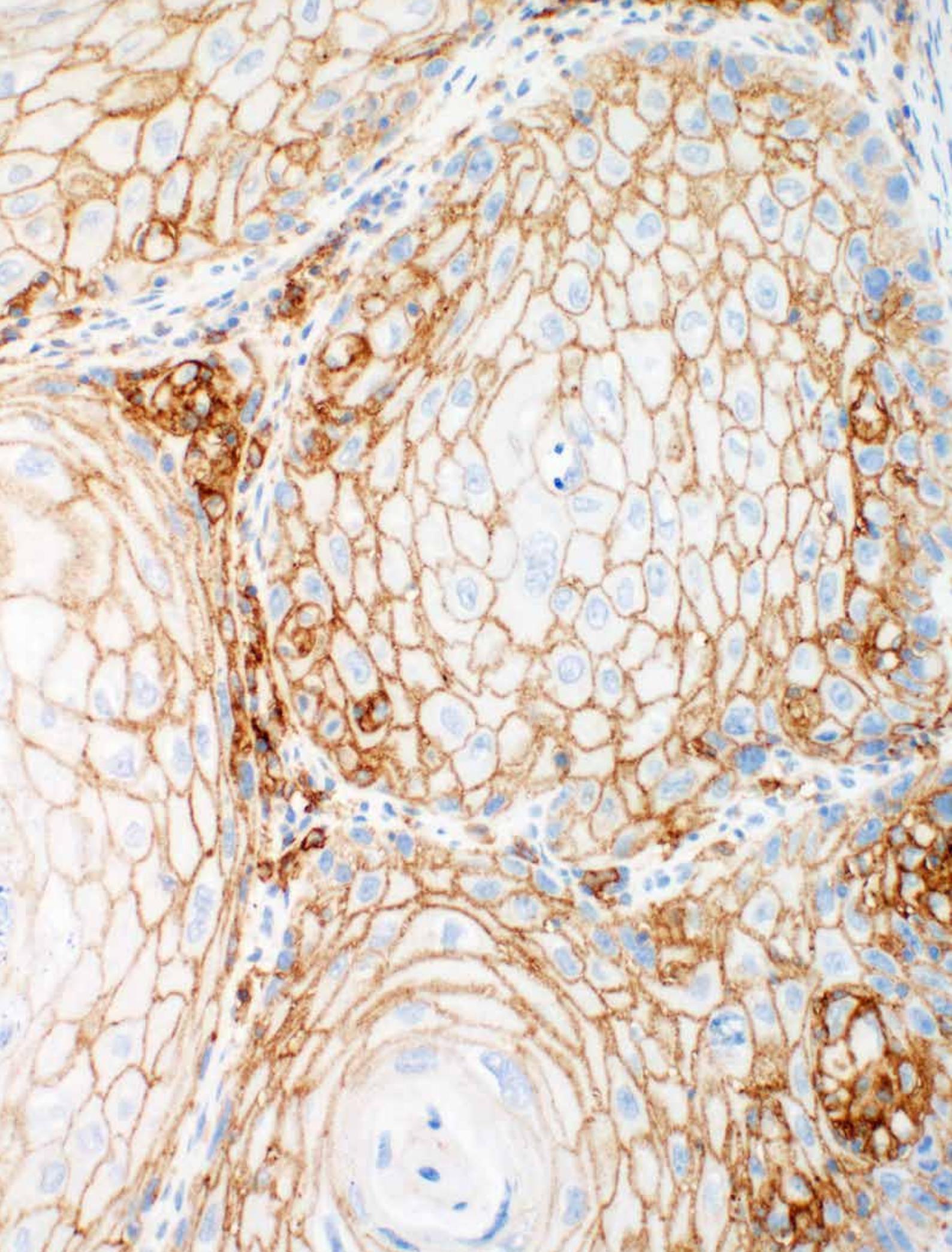
頭頸部癌 (HNC)

体外診断用医薬品 承認番号: 22800EZX00077000



目次

はじめに	5
頭頸部癌における使用目的	5
PD-L1 IHC 28-8 pharmDx 「ダコ」 染色結果判定マニュアルの使用法	5
PD-1/PD-L1 パスウェイの役割	6
頭頸部癌における PD-L1 IHC 28-8 pharmDx 「ダコ」 の臨床的価値	7
頭頸部癌患者に対する PD-L1 IHC 28-8 pharmDx 「ダコ」 の試験データ	8
PD-L1 IHC 28-8 pharmDx 「ダコ」 の概要	10
最適な染色結果を得るために	12
検体採取と処理	12
コントロール組織	12
組織の前処理	12
PD-L1 IHC 28-8 pharmDx 「ダコ」 染色手順	12
試薬の保管	12
試薬の調製	12
染色評価のためのコントロール	13
染色プロトコール	13
脱パラフィン、親水化、抗原賦活	13
染色と対比染色	13
封入	13
PD-L1 IHC 28-8 pharmDx 「ダコ」 テクニカルチェックリスト	14
PD-L1 IHC 28-8 pharmDx 「ダコ」 スコアリングガイドライン	15
PD-L1 IHC 28-8 pharmDx 「ダコ」 の推奨スライド判定順序	16
頭頸部癌に対する PD-L1 IHC 28-8 pharmDx 「ダコ」 の結果判定に関する推奨事項	18
HE 染色した組織検体	18
本品中のコントロールスライド	18
陽性対照のコントロール組織スライド	19
陰性対照のコントロール組織スライド	19
一次抗体陰性コントロールで染色した組織検体	19
一次抗体で染色した組織検体	19
ヒントおよび考慮事項	19
不適正検体	19
判定不可検体	19
結果の報告	20
頭頸部癌における PD-L1 IHC 28-8 pharmDx 「ダコ」 の免疫染色例	21
PD-L1 IHC 28-8 pharmDx 「ダコ」 では評価が困難な頭頸部癌の例	26
PD-L1 IHC 28-8 pharmDx 「ダコ」 トラブルシューティングガイド	30
参考文献	31



はじめに

頭頸部癌における使用目的

体外診断用

PD-L1 IHC 28-8 pharmDx 「ダコ」は、抗 PD-L1 ウサギモノクローナル抗体 (Clone 28-8) を用いた免疫組織化学的手法を原理としたアッセイキットです。ダコ Autostainer Link 48 (IHC 自動染色装置) を使用し、ホルマリン固定パラフィン包埋 (FFPE) 非扁平上皮非小細胞肺癌および頭頸部癌組織中の PD-L1 発現率の測定に使用することを目的としています。PD-L1 発現率は、添付文書の測定結果の判定法に記載のとおり、強度を問わず部分的または完全に細胞膜が染色される腫瘍細胞の割合により判定されます。

がん組織、細胞中の PD-L1 発現率の測定 (非扁平上皮非小細胞肺癌患者および頭頸部癌患者におけるニボルマブ (遺伝子組換え) の適切な投与を行うための補助に用いる。)

PD-L1 IHC 28-8 pharmDx 「ダコ」

染色結果判定マニュアルの使用方法

本書は、病理医および検査室の技術者の方に正確で再現性のある検査結果を得るために役立てるための参考書です。PD-L1 IHC 28-8 pharmDx 「ダコ」で染色した頭頸部癌検体をスコアリングするための要件を十分に理解していただくことを目的としています。参考のため、症例の顕微鏡写真も掲載しています。

PD-L1 IHC 28-8 pharmDx 「ダコ」の添付文書には、信頼性の高い染色結果を得るための使用方法や注意事項が記載されています。

本書の内容を確認いただくことで、PD-L1 IHC 28-8 pharmDx 「ダコ」で染色した頭頸部癌検体の結果判定に関する基礎知識を確実に身に付けることができます。詳細については、PD-L1 IHC 28-8 pharmDx 「ダコ」に付属する最新の添付文書または www.agilent.com をご覧ください。

特に記載のない限り、掲載している顕微鏡写真は頭頸部癌のものです。

PD-1/PD-L1 パスウェイの役割



頭頸部癌における PD-L1 IHC 28-8 pharmDx 「ダコ」 の臨床的価値

頭頸部癌患者における PD-L1 発現は、ニボルマブの治療による全生存期間延長の程度に関連する可能性があります。

- PD-L1 IHC 28-8 pharmDx 「ダコ」 の臨床的有用性は、第 III 相臨床試験 (CA209141 試験) で検証されました。この試験では、プラチナ製剤抵抗性の再発または転移性の頭頸部扁平上皮癌 (SCCHN) 患者において、ニボルマブ療法と治験担当医師によって選択された治療 (対照群) とを比較しました。
- ニボルマブ投与群は治験担当医師が選択した対照群の治療法と比べて統計的に有意な生存率を示したことから、本試験の主要評価項目が達成されました。

第 III 相試験 (CA209141 試験) では、事前に規定した中間解析 (最終解析に対して計画されたイベント数の 78 %) で、対照群と比較して統計的に有意な生存率が実証されました。全生存期間 (OS) 中央値はニボルマブ群の被験者では 7.5 ヶ月、対照群の被験者では 5.1 ヶ月であり、ハザード比は 0.70 でした。

PD-L1 IHC 28-8 pharmDx 「ダコ」 を用いて、事前に規定した探索的なサブグループ解析が行われました。解析結果を以下に示します。

表 1: PD-L1 IHC 28-8 pharmDx 「ダコ」 による PD-L1 発現レベルおよび投与群別の OS の要約

CA209141 試験 (N = 361) での事前規定予備解析 (N = 260) データ

PD-L1 発現率	1 % 未満		1 % 以上	
	ニボルマブ投与群	対照群	ニボルマブ投与群	対照群
OS 中央値 (95 % CI)	5.7 ヶ月 (4.4 ~ 12.7)	5.8 ヶ月 (4.0 ~ 9.8)	8.7 ヶ月 (5.7 ~ 9.1)	4.6 ヶ月 (3.8 ~ 5.8)
ハザード比	0.89 (95 % CI: 0.54 ~ 1.45)		0.55 (95 % CI: 0.36 ~ 0.83)	

略語:CI = 信頼区間

頭頸部癌患者に対する PD-L1 IHC 28-8 pharmDx「ダコ」の試験データ

PD-L1 IHC 28-8 pharmDx「ダコ」を用いて測定した PD-L1 発現率が、ニボルマブの治療による全生存期間の延長に関連することが臨床試験によって示されました。⁽¹⁾

頭頸部癌は世界で 6 番目に多く、毎年罹患数は約 55 万人、死亡数は 30 万人と報告されています。初期に転移性疾患を呈する患者はほんの少数(約 10 %、ステージ IV-C)であるものの、局所進行性の状況で初期に治療された集団のうち約半数は、最終的に腫瘍の再発がみられたり、難治性に至ったりします。

プラチナ製剤を含む化学療法後の進行患者(プラチナ製剤抵抗性または耐性を示す疾患)の予後は不良であり、OS 中央値は約 4 ~ 6 ヶ月であることから、再発性または転移性の頭頸部癌は依然として、医学上高いニーズのある領域です。つまり、プラチナ製剤抵抗性の再発または転移性の頭頸部癌患者に対して、延命効果をもたらす有効な標準療法はありません。

頭頸部癌に対する PD-L1 IHC 28-8 pharmDx「ダコ」の臨床的有用性は、臨床試験 CA209141(プラチナ製剤抵抗性の再発または転移性の頭頸部癌に対してニボルマブと治験担当医師が選択した治療法(対照群)とを比較するための無作為化、第 III 相臨床試験)の登録患者の検体を用いて評価されました。

治験の主要目的:

- 再発または転移性の SCCHN 患者で、プラチナ製剤(アジュバント療法、ネオアジュバント療法、原発性(切除不能で局所進行性)または転移性のいずれか)を投与中または投与から 6 ヶ月以内に疾患の進行が認められた患者に、ニボルマブまたは対照薬剤を投与した際の OS を比較すること。

治験の副次的目的:

- ニボルマブ投与群の無増悪生存率(PFS)を対照群と比較すること。
- ニボルマブ投与群の客観的奏効率(ORR)を対照群と比較すること。

ベースライン(試験開始前)の腫瘍組織検体は、無作為割付け前に採取されました。

CA209141 試験で、無作為化した全被験者について事前に規定した各ベースラインレベルの PD-L1 発現頻度を表 2 に示します。

表 2: SCCHN を対象とした CA209141 試験の定量可能なサンプルでの PD-L1 発現率

PD-L1 発現率	ニボルマブ投与群 (N = 161)	対照群 (N = 99)	合計 (N = 260)
PD-L1 発現率 1 % 以上の被験者数	88 (54.7 %)	61 (61.6 %)	149 (57.3 %)
PD-L1 発現率 1 % 未満の被験者数	73 (45.3 %)	38 (38.4 %)	111 (42.7 %)

* CA209141 試験において 361 例のサンプル中 327 例で PD-L1 が定量可能でした。

15ヶ国の 55 施設で、361 名の患者が、2 投与群 (ニボルマブ投与群 240 名、対照群 121 名) のうちの1つに無作為化され、セツキシマブの投与歴 (あり/なし) に基づいて層別化されました。CA209141 試験の主要有効性評価項目は OS でした。さらに有効性評価項目として、無増悪生存率 (PFS) および客観的奏効率 (ORR) が含まれました。

表 3: ベースラインの SCCHN 検体の由来 - CA209141 試験⁽¹⁾

腫瘍検体は、本試験の組み入れ要件に従い、原発性または転移性のいずれかの部位の SCCHN 腫瘍から採取されました。被験者 327 名 (総被験者 361 名) のベースラインで採取された腫瘍組織は、次のような部位別比率でした:

原発腫瘍	転移性腫瘍	報告無し
29.7 % (97/327)	52.0 % (170/327)	18.3 % (60/327)

PD-L1 IHC 28-8 pharmDx 「ダコ」 の概要

型番 : SK00521-5J

PD-L1 IHC 28-8 pharmDx 「ダコ」 には、ダコ Autostainer Link 48 (IHC 自動染色装置) と PT Link 前処理システムを用いて FFPE 細胞切片の IHC 染色を完了するために必要な、最適化された試薬とプロトコールが含まれています (図 1 を参照)。検体を一次抗体または一次抗体陰性コントロールと反応させた後、一次抗体に特異的なリンカー試薬と反応させます。次に、デキストランポリマー骨格に二次抗体分子とペーオキシダーゼ (HRP) 分子を結合させた検出試薬を反応させます。

その後、発色試薬を添加すると、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。発色反応の色は DAB エンハンサー試薬により変化します。さらに、検体を対比染色し、カバーガラスで封入します。検査結果は光学顕微鏡を使用して判定します。キットには、染色過程を検証・確認するのに役立つ、ホルマリン固定パラフィン包埋されたヒト細胞株 2 種類が貼付されたコントロールスライドが含まれています。

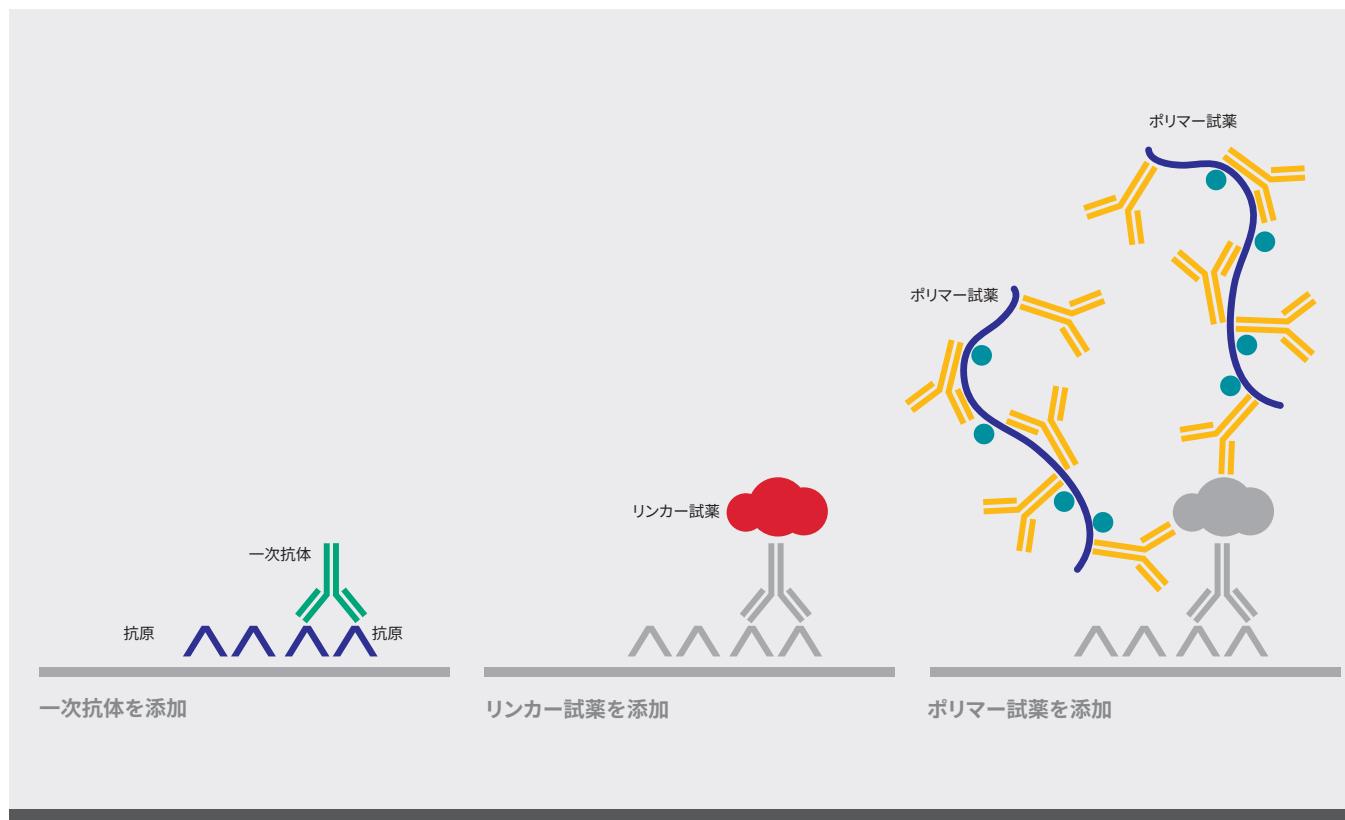


図 1: PD-L1 IHC 28-8 pharmDx 「ダコ」 の染色手順

PD-L1 IHC 28-8 pharmDx 「ダコ」には、コントロールスライド 15 枚と 50 テスト分の試薬が含まれています(図 2)。

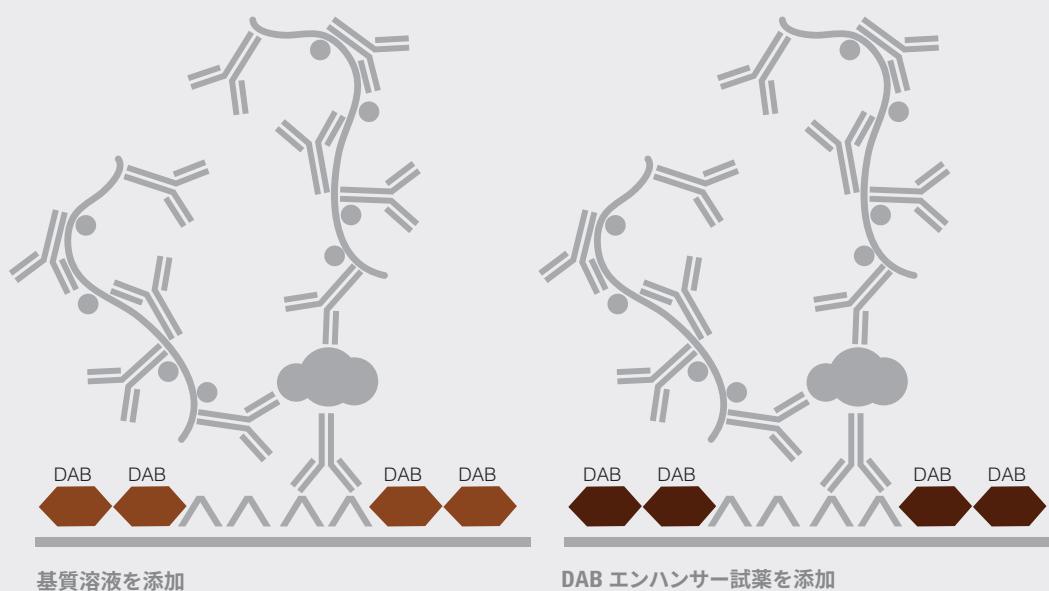
- 濃縮抗原賦活液
- ブロッキング試薬
- 一次抗体: 抗 PD-L1 ウサギモノクローナル抗体 (Clone 28-8)
- 一次抗体陰性コントロール
- リンカー試薬
- ポリマー試薬
- 基質緩衝液
- 発色基質
- DAB エンハンサー試薬
- コントロールスライド

この他、ダコ Envision FLEX 洗浄液 (20 x) (型番: K800721-2) およびダコ EnVision FLEX ヘマトキシリン (AutostainerLink 用) (型番: K800821-2) が別途必要です(キットには含まれません)。必要な試薬および装置の全リストについては、添付文書をご覧ください。



図 2: PD-L1 IHC 28-8 pharmDx 「ダコ」 キットの内容

PD-L1 IHC 28-8 pharmDx 「ダコ」はダコ Autostainer Link 48 (IHC 自動染色装置)で使用します。染色結果の信頼性を保証するため、添付文書の記載内容に従って使用してください。



PD-L1 IHC 28-8 pharmDx 「ダコ」を適切に使用するために～技術的な留意点～

最適な染色性は、PD-L1 IHC 28-8 pharmDx 「ダコ」プロトコールに準拠することにより得ることができます。以下に最適な染色性を得るためにのヒントを示します。PD-L1 IHC 28-8 pharmDx 「ダコ」の検査結果に影響をおぼす要因は、染色前の検体前処理や、本製品を使用する染色工程にあります。これらの要因を最小限に留めるため本章では、検体処理技術の留意点と本製品使用上の注意点について述べます。

検体採取と処理

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。検体採取後すみやかに処理し、組織を染色して結果を判定してください。組織ブロックの PD-L1 免疫反応の安定性は評価されていません。組織は時間の経過とともに PD-L1 免疫反応性が失われていく可能性があります。腫瘍形態が診断するにふさわしい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いることを確認してください。検体はすべて推奨方法に準じて処理してください。

コントロール組織

検査室内での組織検体の処理および包埋方法のばらつきは、検査結果の不安定さの原因となります。染色ラン毎に、本製品のコントロールスライドに加え、施設内組織を用いた陽性対照および陰性対照のコントロール組織標本を染色する必要があります。

陽性対照および陰性対照のコントロール組織は、新鮮な頭頸部癌検体から選択してください。患者検体と異なる方法で処理した組織では、試薬の性能評価はできても、標本の作製状態の良し悪しを確認することはできません。最適な陽性対照のコントロール組織として、弱から中等度に PL-D1 発現を示す症例が理想的です。また、多くの組織に存在する多様な細胞は、内因性陰性対照のコントロールとして機能しますが、この検証は各自施設内で実施する必要があります。最適な頭頸部癌の陰性対照のコントロール組織では、腫瘍細胞に染色性を認めず、マクロファージやリンパ球などの免疫細胞が染色されます。

組織の前処理

検査には、ホルマリン固定パラフィン包埋組織が適しています。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の一連の処理後、パラフィンを浸透

させます。組織切除後遅くとも 30 分以内に固定を開始し、その後、10 % の中性緩衝ホルマリンに 24 ~ 48 時間浸漬することを推奨します。パラフィンの温度が 60 °C を超えないようにします。組織の脱灰操作が PD-L1 IHC 28-8 pharmDx 「ダコ」の染色結果に及ぼす影響は検証されていないため、推奨しません。組織検体は 4 ~ 5 μm に薄切します。薄切した組織をコーティングスライドに載せ、58 ± 2 °C で 1 時間ベーキングします。抗原性を保つために、スライドにのせた組織切片は 2 ~ 8 °C または室温 25 °C 以下の暗所で保管し、薄切から 4 ヶ月以内に染色してください。スライドの保管および取り扱い条件は、抗原性を保つために、常に 25 °C 以下にしてください。

PD-L1 IHC 28-8 pharmDx 「ダコ」の染色手順

PD-L1 IHC 28-8 pharmDx 「ダコ」の試薬とプロトコールは、最適な検査結果が得られるようあらかじめ設計されています。正しく検査を実施するためにも、試薬を希釈したり、反応時間や温度または機器を変更しないでください。

試薬の保管

使用時以外は、本品中のコントロールスライドを含む PD-L1 IHC 28-8 pharmDx 「ダコ」のすべての構成試薬を 2 ~ 8 °C の暗所で保管してください。

試薬の調製

すべての構成試薬を使用前に室温 (20 ~ 25 °C) に戻し、パッケージ外側に印刷されている使用期限を遵守して使用してください。

濃縮抗原賦活液

濃縮抗原賦活液を精製水で 1:50 に希釈します。30 mL の濃縮液ボトル 1 本で PT Link タンク 1 つ分にあたる 1.5 L を調製できます。1 回あたり最大 24 枚のスライドの処理が可能です。調製後の pH は 6.1 ± 0.2 でなければなりません。抗原賦活液は 3 回使用したら廃棄し、希釈後 5 日を過ぎたものは使用しないでください。

洗浄液

ダコ Envision FLEX 洗浄液 (20 x) を、精製水で 1:20 に希釈します。希釈後未使用的洗浄液は 2 ~ 8 °C で保管し、1 ヶ月以内に使い切ってください。この洗浄液は 25 °C で最大 7 日間保管することもできます。洗浄液が濁った場合は、使用せず廃棄してください。

基質溶液

基質緩衝液 1 mLあたり 1 滴の発色基質を加え、混合します。調製済みの基質溶液は 2 ~ 8 °C の暗所で保管すれば、5 日間有効です。使用前に十分混合してください。溶液中に沈殿物が生じても、品質には影響しません。

- 基質緩衝液のボトル全量を使用する場合は、発色基質を 9 滴加えます。基質緩衝液のラベルには、7.2 mL と記載されていますが、これは使用可能な容積を示しており、実際には、Dead volume 分の余分な基質緩衝液が含まれています。
- 発色基質は、透明からラベンダーブラウンに変色する場合がありますが、変色しても製品の性能には影響しません。上記のガイドラインに従って希釈します。基質緩衝液に過剰に発色基質を加えると、陽性染色が損なわれます。

染色評価のためのコントロール

PD-L1 IHC 28-8 pharmDx 「ダコ」の染色結果が適切で、試薬が正しく機能していることを判断するために、コントロールスライドを使用することを推奨します。各染色ラン毎に、以下のコントロールスライドが必要です。

- 一次抗体で染色した PD-L1 IHC 28-8 pharmDx 「ダコ」コントロールスライド 1 枚
- 陽性対照のコントロール組織スライド 2 枚 (一次抗体および一次抗体陰性コントロール試薬で染色したスライド各 1 枚)
- 陰性対照のコントロール組織スライド 2 枚 (一次抗体および一次抗体陰性コントロール試薬で染色したスライド各 1 枚)
- 一次抗体で染色した組織検体ごとに、一次抗体陰性コントロール試薬で染色した組織検体の連続切片

染色プロトコール

スライドを設定し、DakoLink ドロップダウンメニューの選択肢から PD-L1 IHC 28-8 pharmDx 「ダコ」染色プロトコールを選択します。必要な全ステップと各反応時間は、DakoLink ソフトウェアにあらかじめプログラムされているプロトコールを使用します。スライドラベルを印刷し、各スライドに貼付します。

脱パラフィン、親水化、抗原賦活

PT Link 前処理システムを使用して、脱パラフィン、親水化、抗原賦活の 3 つを 3-in1 処理で行います。

- 「Preheat and Cool」を 65 °C に設定し、抗原賦活処理温度を 97 °C、20 分間に設定します。
- PT Link タンクに、抗原賦活液を 1.5 L 調製して充填し、65 °C に予熱します。
- 検体スライドをセットした Autostainer ラックを PT Link 内の予熱済み抗原賦活液に浸漬します。PT Link のプログラムを開始し、97 °C で 20 分間抗原賦活処理を行います。
- 処理が完了し、タンク内の温度が 65 °C まで冷却されたら、PT Link からスライドラックを取り出し、すぐに室温の洗浄液の入った PT Link リンスステーション (型番: PT10930) に入れます。
- スライドは、リンスステーション内で 5 分間浸漬します。

染色と対比染色

検体スライドをセットした Autostainer ラックをダコ Autostainer Link 48 にセットします。この際、ランの開始前にスライド表面が乾燥する事がないように、洗浄液をかけて湿潤状態を保つ必要があります (切片が乾燥すると、非特異的な染色が増強する可能性があるため)。

PD-L1 IHC 28-8 pharmDx 「ダコ」プロトコールを実行します。ダコ Autostainer Link 48 は、適切な試薬を滴下し、反応時間の制御、および各ステップ間のスライド洗浄を適切に実行します。対比染色には、ダコ EnVision FLEX ヘマトキシリン (AutostainerLink 用) を使用します。封入前にスライドを乾燥させないでください。

封入

非水溶性封入剤を使用します。退色を最小限に抑えるために、スライドは室温 (20 ~ 25 °C) の暗所で保管します。

適切な脱水手順例

95 %	EtOH	(1 分)
95 %	EtOH	(1 分)
100 %	EtOH	(1 分)
100 %	EtOH	(1 分)
キシレン		(3 分)
キシレン		(3 分)

Autostainer 稼働終了後から封入操作の間に、スライドを乾燥させないでください。キシレンの代替品として Histo-Clear 液を使用することもできます。

PD-L1 IHC 28-8 pharmDx 「ダコ」 テクニカルチェックリスト

施設名 _____

氏名および職名 _____

ダコ Autostainer Link 48 シリアル番号 _____ ソフトウェアバージョン _____

ダコ Autostainer Link 48 および PT Link の定期保守点検を実施していますか? はい いいえ

PD-L1 IHC 28-8 pharmDx 「ダコ」 をプロトコールに従って実施するにあたり、必要な機器・試薬などがすべて用意されていますか? はい いいえ

PD-L1 IHC 28-8 pharmDx 「ダコ」 は、パッケージ外装に印字された使用期限内のものを使用していますか? はい いいえ

本品中のコントロールスライドを含む PD-L1 IHC 28-8 pharmDx 「ダコ」 のすべての構成試薬を 2 ~ 8 °C の暗所で保管していますか? はい いいえ

免疫染色前に、コントロールスライドを含む PD-L1 IHC 28-8 pharmDx 「ダコ」 のすべての構成試薬を室温(20 ~ 25 °C)に戻していますか? はい いいえ

頭頸部癌から選別された適切な陽性対照および陰性対照のコントロールをそろえていますか? はい いいえ

組織は、10 % 中性緩衝ホルマリンで固定していますか? はい いいえ

組織へのパラフィン浸透は 60 °C 以下で実施しましたか? はい いいえ

組織は 4 ~ 5 µm に薄切り、コーティングスライドを使用していますか? はい いいえ

組織切片を、58 ± 2 °C で 1 時間 ベーキングしましたか? はい いいえ

保管されていた未染スライドを使用した場合、そのスライドは、薄切後 4 ヶ月以内かつ暗所で 2 ~ 8 °C または室温 25 °C 以下で保管していたものですか? はい いいえ

抗原賦活液は、適切に調製されていますか? (希釀後の抗原賦活溶液の pH は 6.1 ± 0.2 である必要があります)
ダコ Envision FLEX 洗浄液 (20 x) は適切に調製されていますか? はい いいえ
 はい いいえ

基質溶液は適切に調製されていますか? はい いいえ

PT Link を使用して、脱パラフィン、親水化、および抗原賦活を 3-in-1 処理で実施していますか? はい いいえ

染色前にスライド表面が乾燥しないように、ダコ Autostainer Link 48 にスライドをセットする際、スライドガラスに洗浄液をかけ湿潤状態を保っていますか? はい いいえ

ダコ Autostainer Link 48 で PD-L1 IHC 28-8 pharmDx 「ダコ」 プロトコールを選択していますか? はい いいえ

ダコ Envision FLEX ヘマトキシリンで対比染色していますか? はい いいえ

上記のいずれかの質問で「いいえ」を選択した場合は、アジレントテクニカルサポート担当者にご相談ください。

特記事項 _____

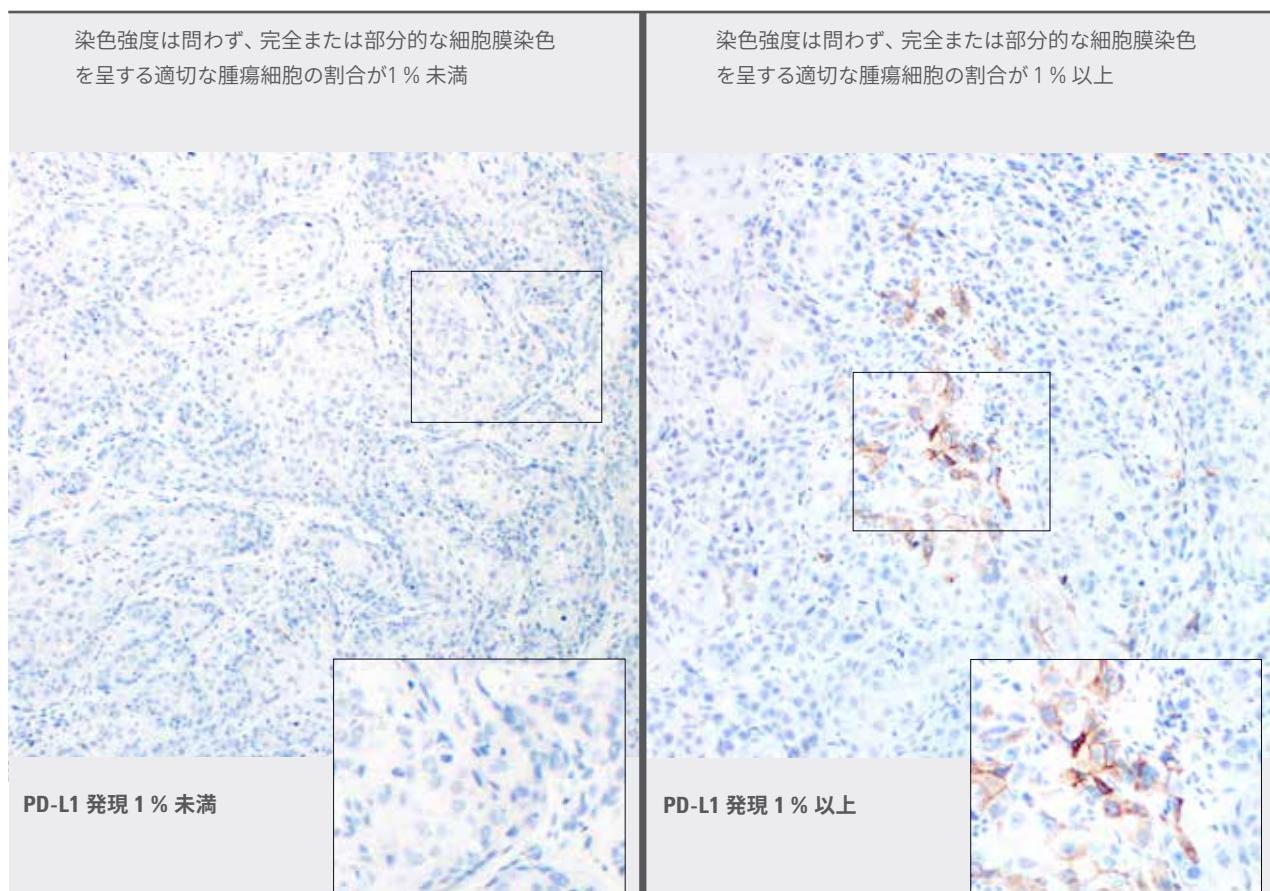
PD-L1 IHC 28-8 pharmDx「ダコ」 スコアリングガイドライン

PD-L1 IHC 28-8 pharmDx 「ダコ」のスコアリングは、添付文書に記載されている手順に従い、最適な方法で、病理医の経験を考慮した上で実施してください。

この検査は、浸潤性の頭頸部癌組織サンプルに対して検証されており、異形成または上皮内癌の病巣に対して検証されていません。HE染色されたスライドは、それぞれの PD-L1 染色サンプルとともに用いることで、浸潤性腫瘍、上皮内癌、および隣接する正常な上皮を正しく鑑別することができます。

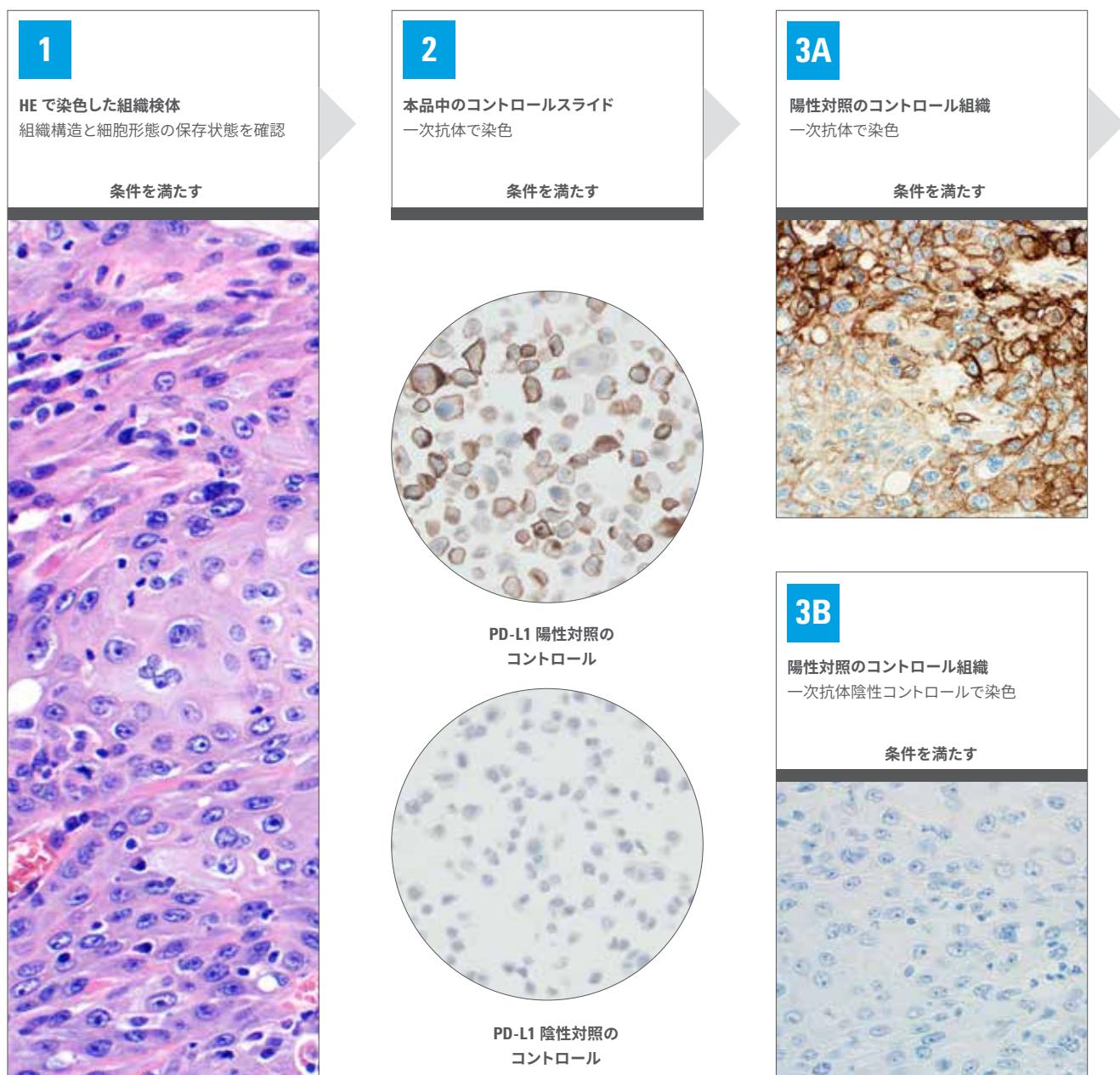
検体の陽性腫瘍細胞の染色割合により、PD-L1 IHC 28-8 pharmDx 「ダコ」の染色結果が判定されます。図 3 に、スコアリングガイドラインと推奨される報告例を示します。PD-L1 IHC 28-8 pharmDx 「ダコ」の病理報告例については、20 ページをご参照ください。

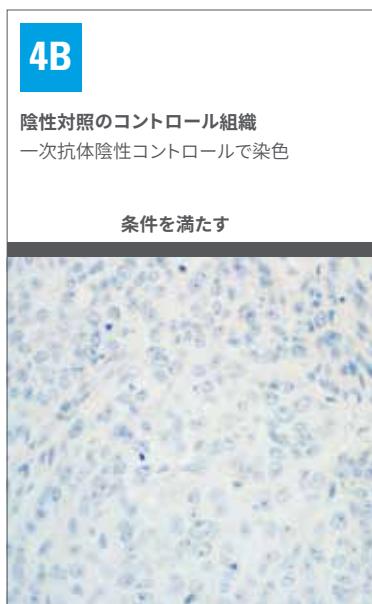
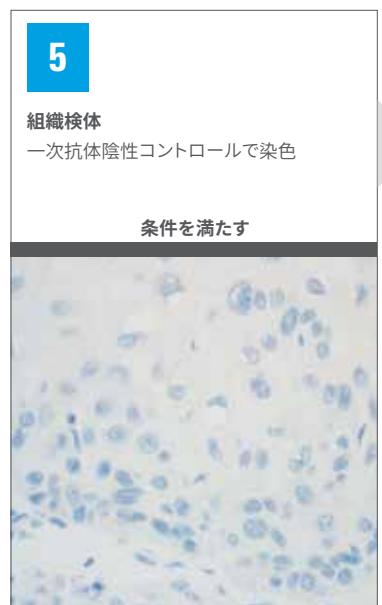
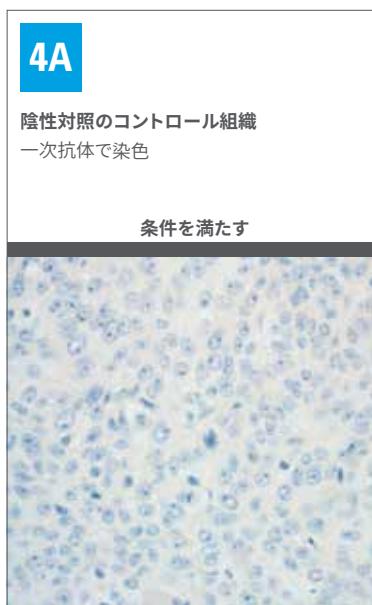
図 3: PD-L1 IHC 28-8 pharmDx 「ダコ」の染色結果のスコアリングおよび報告に関するガイドライン



PD-L1 IHC 28-8 pharmDx「ダコ」の推奨スライド判定順序

PD-L1 IHC 28-8 pharmDx「ダコ」の結果判定には、次の順序でのスライド評価を推奨します。
詳しくは、18～19ページをご参照ください。





スコアリングには 100 個以上の腫瘍細胞が必要。

スコアリング対象:

- 強度を問わず細胞膜が完全または部分的に染色されている適切な腫瘍細胞を陽性対象としてスコアリング
- 検体全体に対する陽性腫瘍細胞の割合 (発現率) を算出

スコアリング対象外:

- 細胞質染色
- 免疫細胞
- 正常細胞
- 壊死細胞
- 上皮内癌 (異形成)

頭頸部癌に対する PD-L1 IHC 28-8 pharmDx 「ダコ」の結果判定に関する推奨事項

PD-L1 IHC 28-8 pharmDx 「ダコ」の評価は、病理医が明視野顕微鏡を使用して実施します。組織検体で PD-L1 の染色性評価をする前に、組織検体での HE 染色ならびに本品中のコントロールスライドの染色性評価をすることが必須です。HE 染色組織検体では、組織構造(組織型)と細胞形態の保存状態を確認評価します。次に、本品中のコントロールスライド、陽性対照および陰性対照のコントロール組織スライド、一次抗体陰性コントロールおよび一次抗体で染色した各検査条件のスライドを観察します。最後に、一次抗体陰性コントロールおよび一次抗体で染色した組織検体を調べ、腫瘍細胞の染色の割合を評価します。

PD-L1 の染色では、強度を問わず部分的または完全な細胞膜染色が確認されている腫瘍細胞を陽性と判定します。本製品に含まれるのは、PD-L1 IHC 28-8 pharmDx 「ダコ」コントロールスライドのみです。陽性対照および陰性対照のコントロール組織スライドは、施設ごとに用意します。施設で用意した陽性対照および陰性対照のコントロール組織は、組織検体として同じスライド上に乗せることも可能です。

1. HE 染色した組織検体

組織構造および細胞形態の保存状態は、HE 染色標本で評価します。PD-L1 IHC 28-8 pharmDx 「ダコ」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ます。

異形成と上皮内癌の病巣はスコアリングの対象外です。HE 染色標本をともに用いることで、浸潤性腫瘍、上皮内癌、および隣接する正常な上皮を正しく鑑別することができます。

2.PD-L1 IHC 28-8 pharmDx 「ダコ」

コントロールスライド

本品中のコントロールスライドは、試薬が正しく機能していることを確認するために用います。各スライドには、PD-L1 発現陽性および陰性の腫瘍細胞セルブロック標本が貼付されています(図 4)。コントロールスライドで良好な染色が得られない場合は、該当するすべての組織検体結果を無効と見なします。コントロール組織は、患者の染色結果を判定するための染色参考例として使用しないでください。

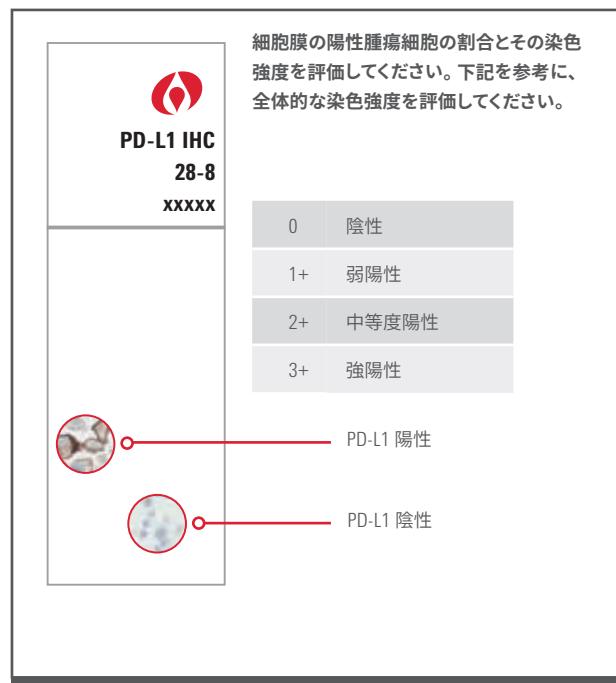


図 4: 本品中に含まれる各コントロールスライドには、PD-L1 発現が陽性および陰性の細胞の切片が含まれています。

本品中のコントロールスライドの PD-L1 陽性対照の培養細胞切片では、以下の染色結果を妥当とします(図 5 参照)。

- 80 % 以上の腫瘍細胞の細胞膜に平均強度 2+ 以上の染色を認める
- バックグラウンド染色が強度 1+ 未満に抑えられている

本品中のコントロールスライドの PD-L1 陰性対照の細胞培養切片では、以下の染色結果を妥当とします(図 6 参照)。

- 細胞膜染色を認めない
- バックグラウンド染色が強度 1+ 未満に抑えられている

陰性コントロール細胞内に数個の染色された細胞を観察する場合があります。その場合でも、10 個以下または、強度 1+ 以上の細胞質染色細胞が観察された細胞を認めて、条件を満たすものと判断します。

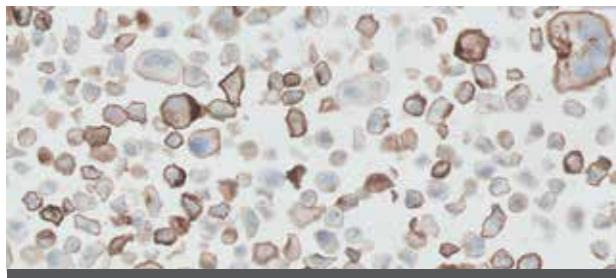


図 5: 条件を満たす染色性を示す陽性 PD-L1 コントロール

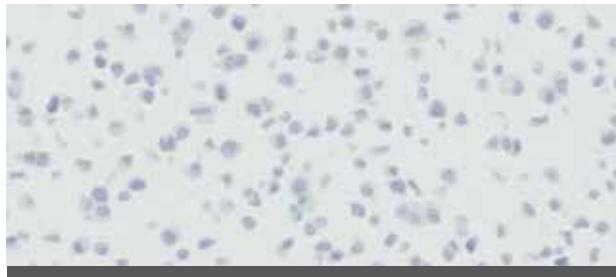


図 6: 条件を満たす染色性を示す陰性 PD-L1 コントロール

3.陽性対照のコントロール組織スライド

頭頸部癌の陽性対照のコントロール組織 (一次抗体または一次抗体陰性コントロールで染色したスライド各 1 枚) を観察し、組織が適切に作製され、試薬が正常に機能していることを確認します。バックグラウンド染色は、染色強度が 1+ 以下でなくてはなりません。評価する際は、壊死または変性した細胞を除外します。陽性対照のコントロール組織で良好な染色が得られない場合は、該当するすべての組織検体結果を無効と見なします。コントロール組織は、患者の染色結果を判定するための染色参考例として使用しなでください。

4.陰性対照のコントロール組織スライド

頭頸部癌の陰性対照のコントロール組織 (一次抗体または一次抗体陰性コントロールで染色したスライド各 1 枚) を観察し、非特異染色がないことを確認します。バックグラウンド染色は、染色強度が 1+ 以下でなくてはなりません。陰性対照のコントロール組織で、腫瘍細胞の細胞膜に染色が認められた場合は、該当する組織検体の結果を無効と見なします。コントロール組織は、患者の染色結果を判定するための染色参考例として使用しなでください。

5.一次抗体陰性コントロールで染色した組織検体

一次抗体陰性コントロールでの染色は、組織検体に非特異的バックグラウンド染色が存在しうるかを評価するのに有用です (一次抗体で染色した該当組織検体と比較することでより正確に判定することが可能)。一次抗体陰性コントロールで染色した組織検体を観察し、非特異的なバックグラウンド染色を確認します。一次抗体陰性コントロールで染色した場合、細胞膜染色は陽性を示さず、非特異的バックグラウンド染色は 1+ 以下である必要があります。良好な染色が得られない場合は、組織検体の結果を無効と見なします。

6.一次抗体で染色した組織検体

染色の評価は、一次抗体陰性コントロールで染色した組織検体と比較しながら実施します (特に組織検体に生じる非特異的染色の有無を判別するのに有効)。PD-L1 染色をスコアリングするにあたり、100 個以上の適切な腫瘍細胞が存在している必要があります。

- 1 4 倍の倍率で検体全体の腫瘍領域を注意深く観察してください。検体の腫瘍細胞の全領域を評価してください。細胞質の染色は判定対象外とします。免疫細胞、壊死細胞、正常細胞、および上皮内癌はスコアリングから除外します。
- 2 対物レンズの 10 ~ 20 倍の倍率を用いて、細胞膜が PD-L1 で染色された陽性腫瘍細胞の割合を判断します。必要に応じて、確認用に 40 倍の倍率を使用することができます。腫瘍細胞は、染色強度を問わず細胞膜が完全または部分的に染色されている場合、PL-D1 陽性と判断されます。
- 3 検体の PD-L1 発現率が 1 % 未満か 1 % 以上かを記録します。PD-L1 発現率を算出する場合、分子は染色された腫瘍細胞の数であり、分母は検体中の腫瘍細胞の総数です。

$$\text{PD-L1 発現率} = \frac{\text{PD-L1 陽性の細胞膜染色を示した腫瘍細胞数}}{\text{切片内の腫瘍細胞の総数}}$$

ヒントおよび注意事項

- PD-L1 発現評価には標本全体を対象とします
- 細胞の鑑別および細胞膜染色が認められない領域は、高倍率で確認します
- 4 倍や 10 倍の倍率では見落とす可能性のある強度 1+ の弱い染色に注意します

不適正検体: 腫瘍細胞が 100 個未満の場合、その検体は判定不適正としてください。同じブロックの別の切片あるいは同患者の別のブロックから、PD-L1 IHC 28-8 pharmDx 「ダコ」の評価用に十分な量の腫瘍細胞が存在する検体が必要となる場合があります。

判定不可検体: 腫瘍細胞の細胞膜は、検体前処理の不適当さからではなく腫瘍組織検体の生物学的理由で除外されます。例えば、腫瘍細胞の強い細胞質染色は、細胞膜染色のスコアリングの妨げとなる可能性があります。別の薄切片または同患者の別のブロックの切片が、PD-L1 IHC 28-8 pharmDx 「ダコ」の評価用に必要となる場合があります。

結果の報告

注意事項: PD-L1 IHC 28-8 pharmDx「ダコ」は、浸潤性の頭頸部癌組織検体のために検証されており、異形成または上皮内癌の病巣のために検証されていません。HE 染色されたスライドは、それぞれの PD-L1 染色サンプルとともに用いることで、浸潤性腫瘍、上皮内癌、および隣接する正常な上皮を正しく評価することができます

頭頸部癌に対する PD-L1 IHC 28-8 pharmDx「ダコ」の染色結果報告時の推奨記載事項

PD-L1 IHC 28-8 pharmDx「ダコ」、(型番: SK00521-5J) 検査内容など:

検査日 _____ PD-L1 IHC 28-8 pharmDx「ダコ」ロット番号 _____

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 _____

組織タイプ _____

PD-L1 IHC 28-8 pharmDx「ダコ」に加えて実施された検査 _____

PD-L1 IHC 28-8 pharmDx「ダコ」コントロール結果:

PD-L1 IHC 28-8 pharmDx「ダコ」コントロールスライド 合格 不合格

陽性対照のコントロール組織スライド 合格 不合格

陰性対照のコントロール組織スライド 合格 不合格

組織検体、陰性対照のコントロール組織スライド 合格 不合格

PD-L1 染色結果: 頭頸部癌患者における PD-L1 発現は、ニボルマブの治療における全生存期間延長の程度に関連する可能性があります。

腫瘍細胞の存在 100 細胞以上 不適正

PD-L1 発現率が 1% 未満:

部分的または完全な PD-L1 の細胞膜染色がみられた頭頸部癌細胞の割合が 1% 未満

PD-L1 発現率が 1% 以上:

部分的または完全な PD-L1 の細胞膜染色がみられた頭頸部癌細胞の割合が 1% 以上

PD-L1 発現腫瘍細胞の割合 _____ %

担当医師 (臨床医)へのコメント _____

頭頸部癌における PD-L1 IHC 28-8 pharmDx 「ダコ」の免疫染色例

次の画像は、PD-L1 IHC 28-8 pharmDx 「ダコ」で染色された頭頸部癌腫瘍検体の例を表しています。

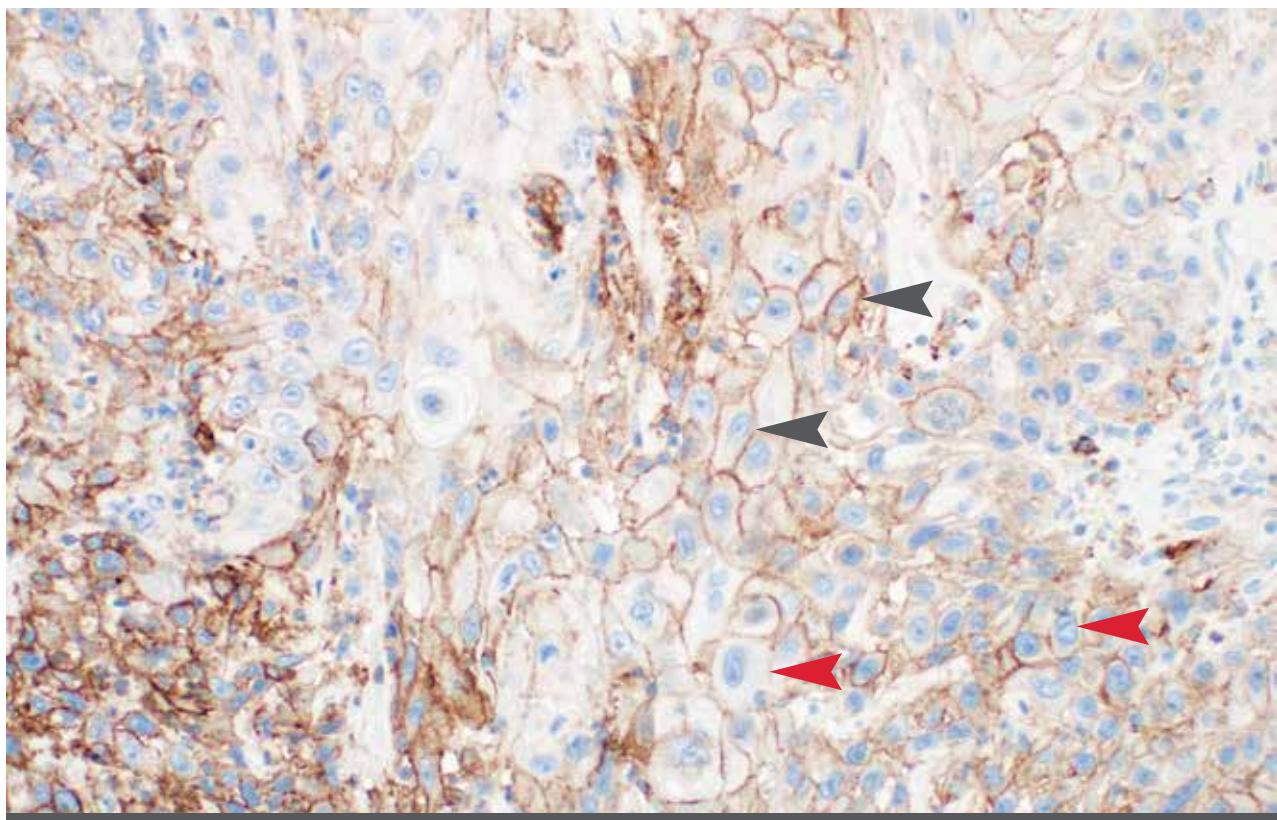


図 7: PD-L1 IHC 28-8 pharmDx 「ダコ」で染色した扁桃組織の扁平上皮腫瘍の例。ここでは様々な PD-L1 染色パターンを示しています。この検体は陽性対照のコントロール検体として、分析感度の微妙な変化の検出に使用することができます。ここに示されているのは、部分的 (赤矢印) または完全な (黒矢印) 細胞膜染色です。

対物レンズ 20 倍

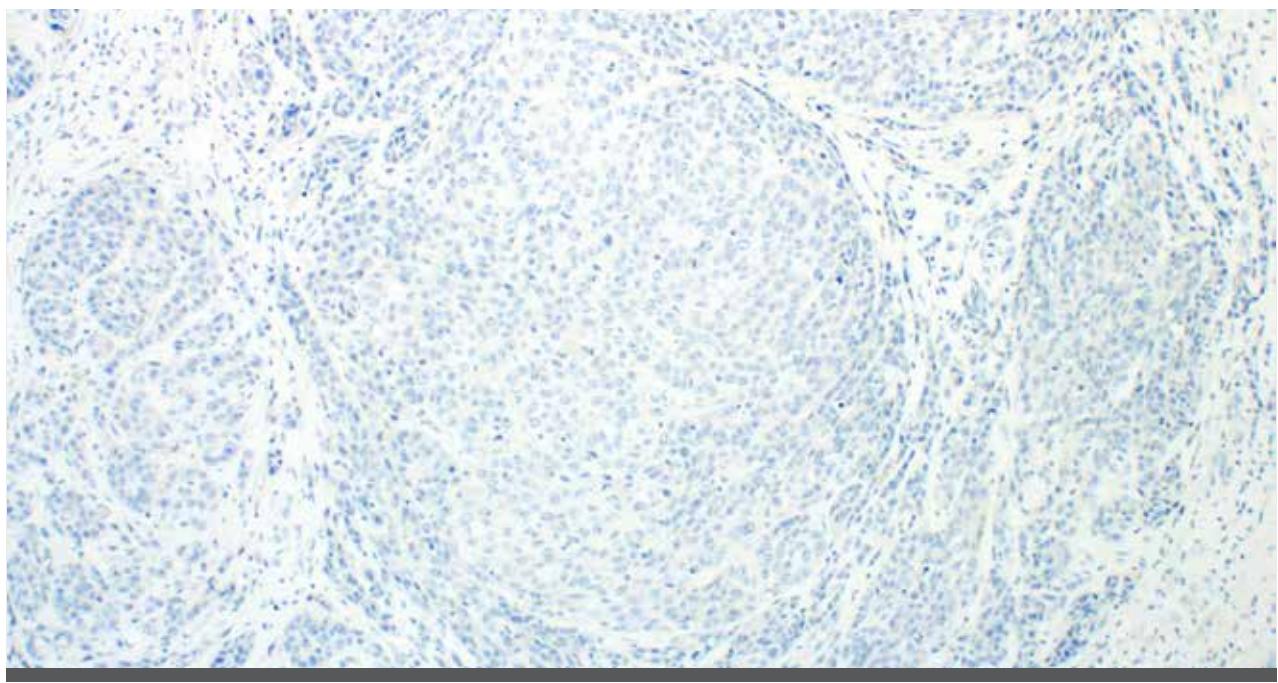


図 8: 喉頭の扁平上皮腫瘍。PD-L1 発現 1 % 未満。対物レンズ 10 倍

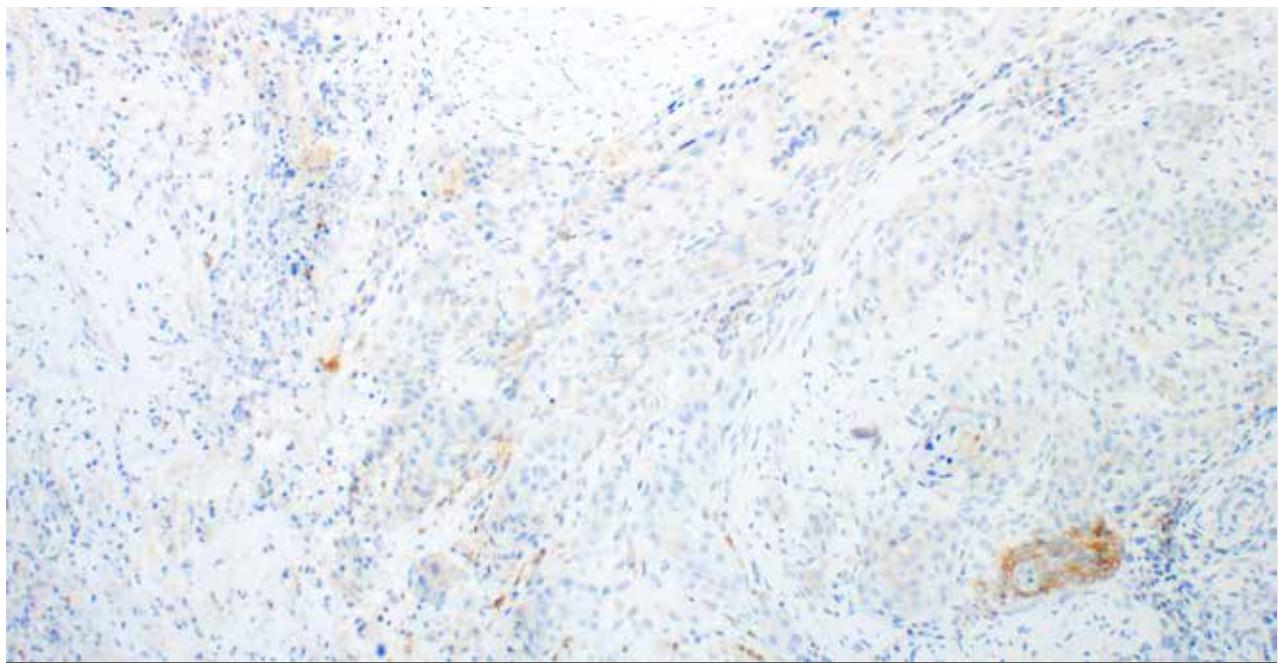


図 9: 喉頭の扁平上皮腫瘍。PD-L1 発現 1 % 以上。対物レンズ 10 倍

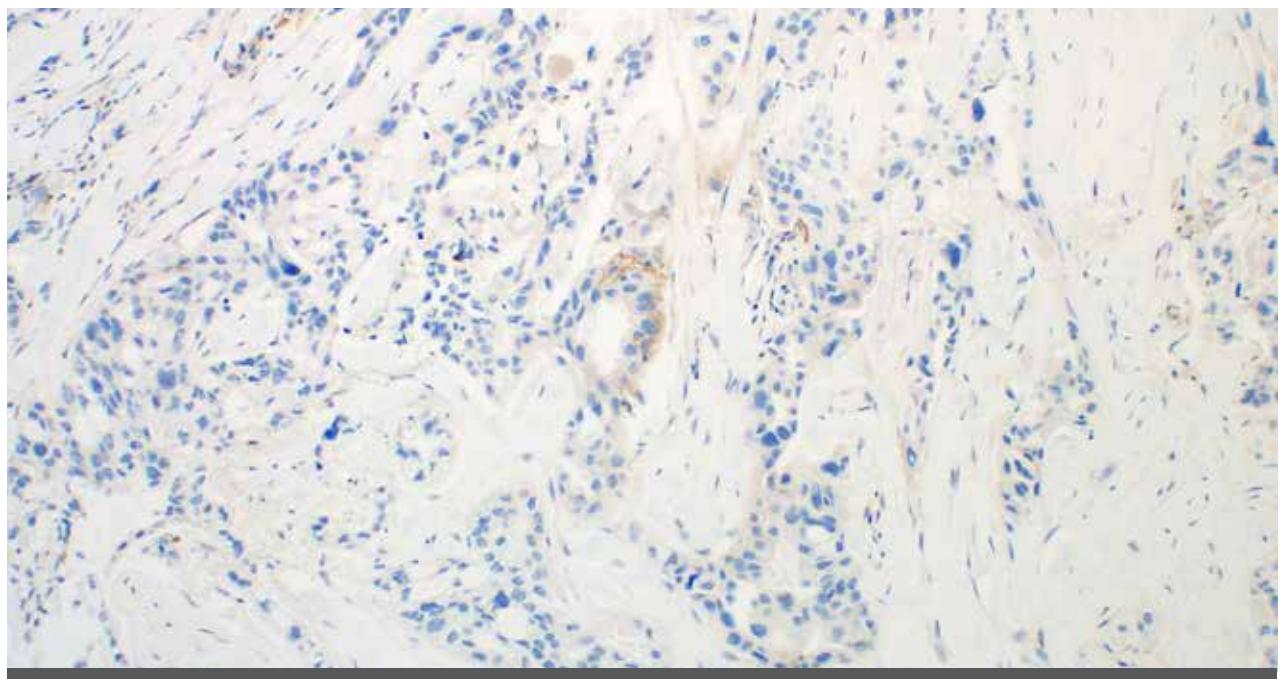


図 10: 1 % 以上の PD-L1 陽性を示す唾液腺の腺癌。対物レンズ 10 倍

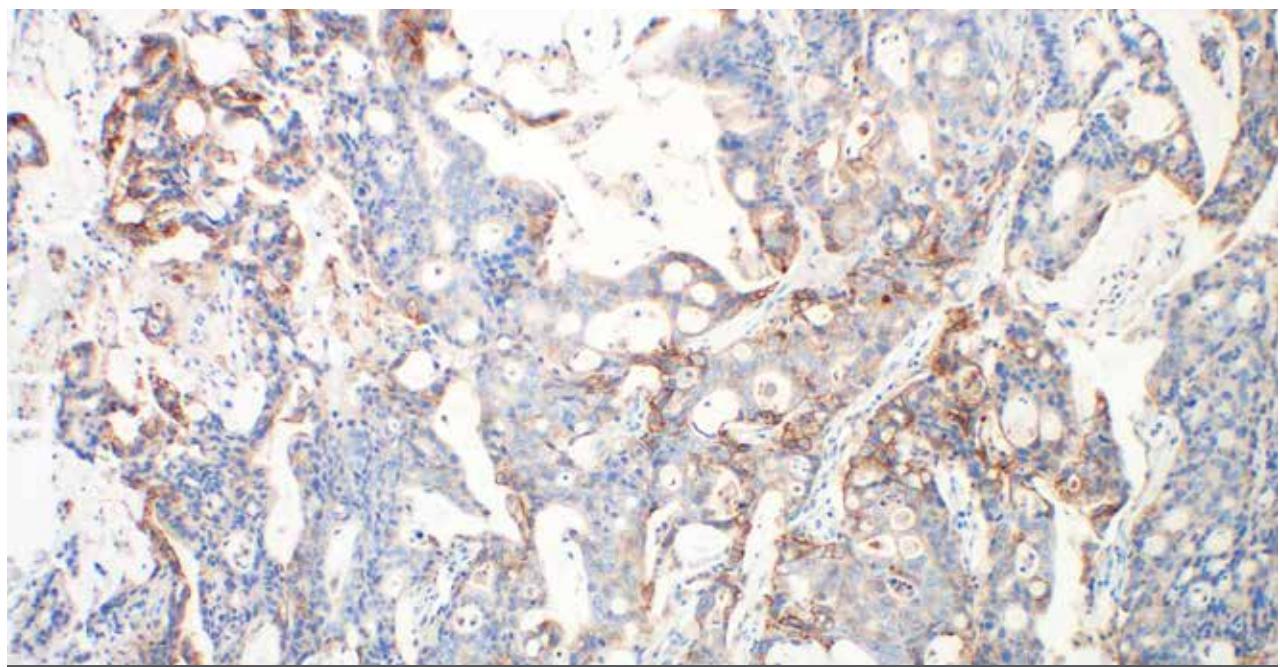


図 11: さまざま強度で PD-L1 陽性の染色を示す鼻咽腔の腺癌。対物レンズ 10 倍

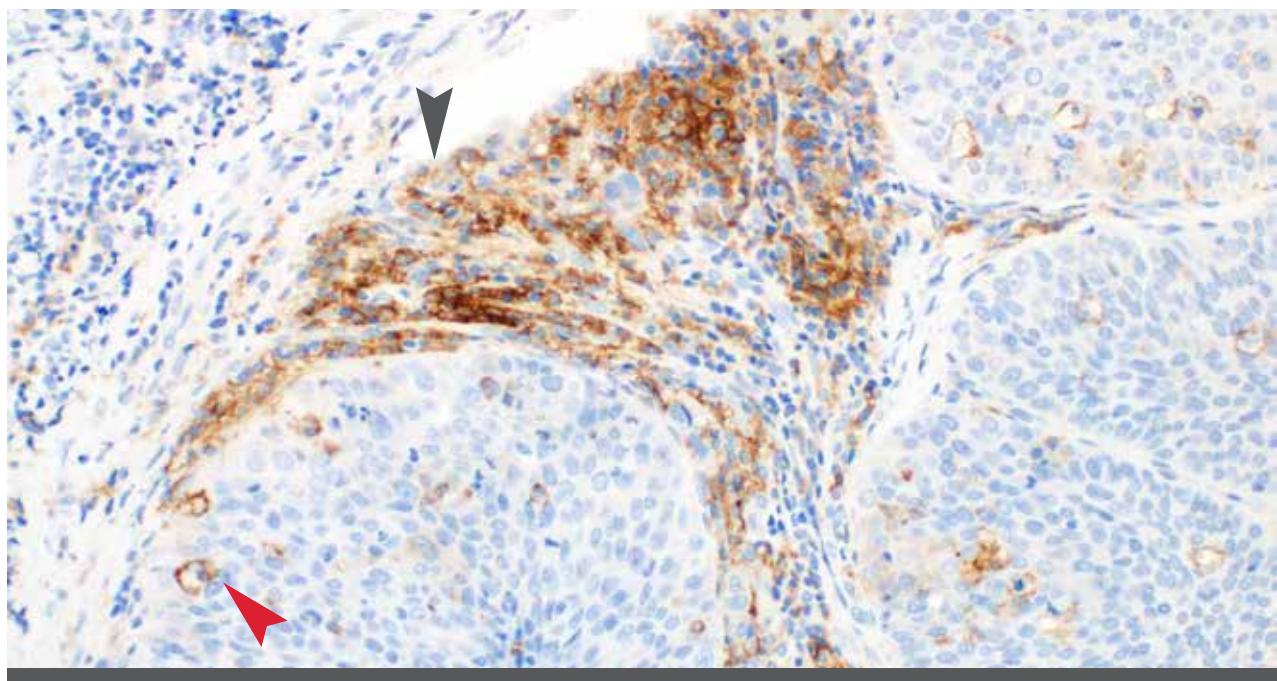


図 12: 腫瘍周囲に会合する免疫細胞に(黒矢印)強い染色が認められる咽頭の扁平上皮癌。ただし、腫瘍細胞は PD-L1 陰性。
腫瘍内組織球(赤矢印)の染色。PD-L1 陽性スコア判定の対象外です。対物レンズ 20 倍

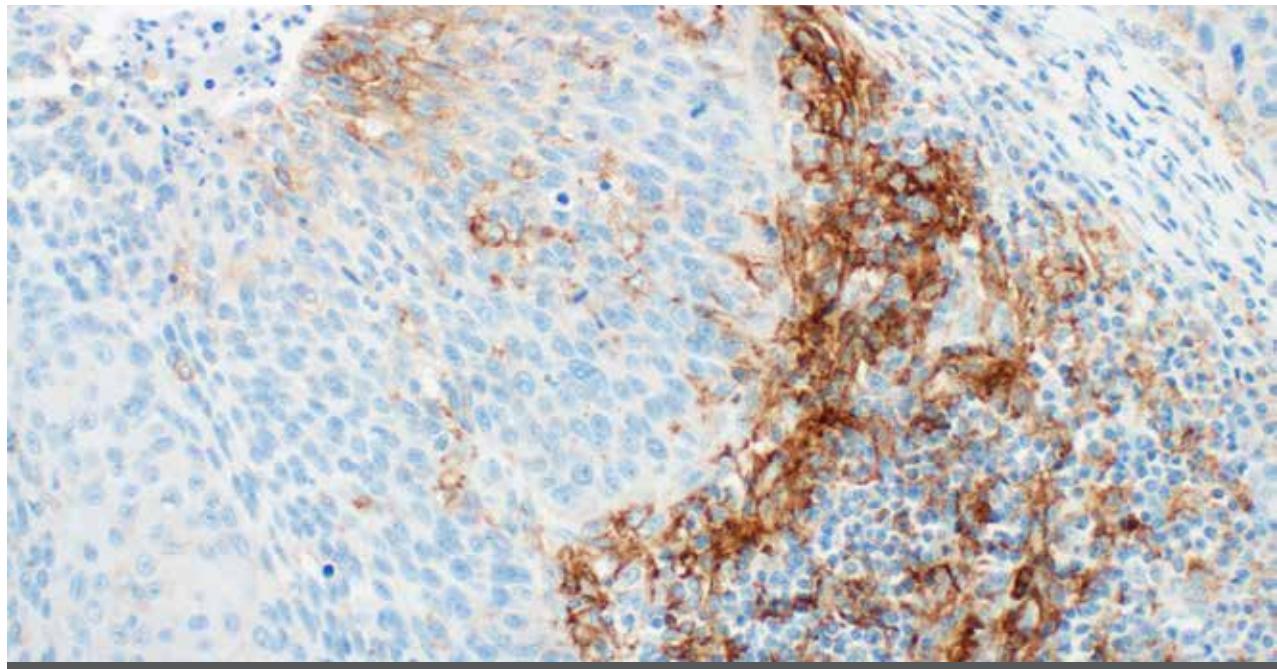


図 13: 免疫細胞の染色および腫瘍内の陽性染色を示す、舌の扁平上皮腫瘍。対物レンズ 20 倍

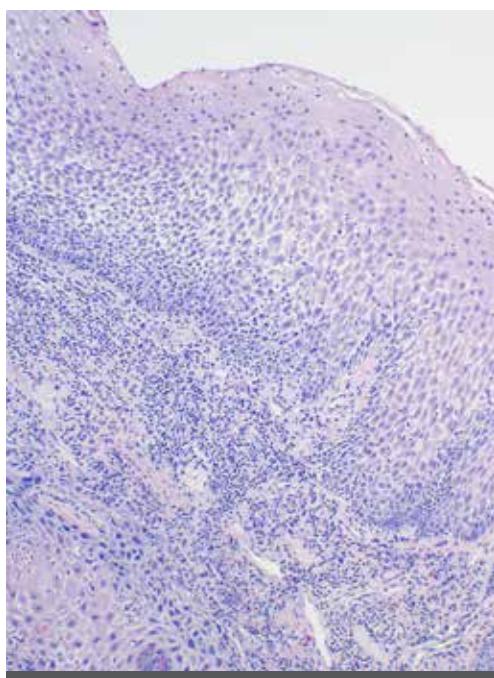


図 14A: 舌の扁平上皮腫瘍の HE 染色

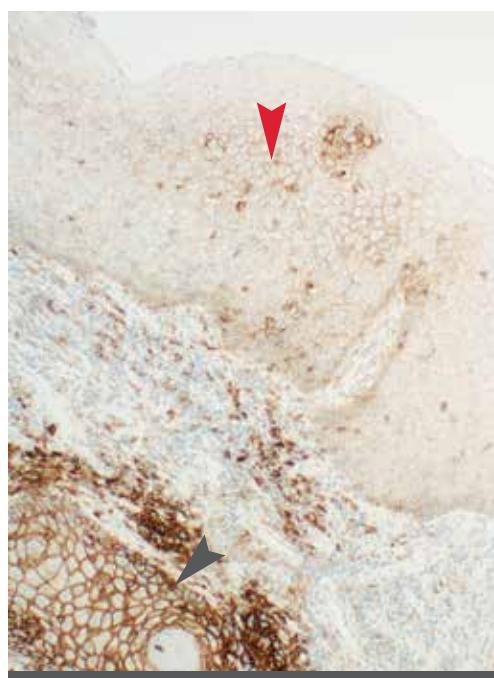


図 14B: 強い PD-L1 の陽性染色が、浸潤性の扁平上皮腫瘍 (黒矢印) に認められます。この場合、正常な扁平上皮 (赤矢印) にも染色が認められます。正常な扁平上皮の染色はPD-L1 陽性の腫瘍染色割合の計算に含まれません。対物レンズ 10 倍

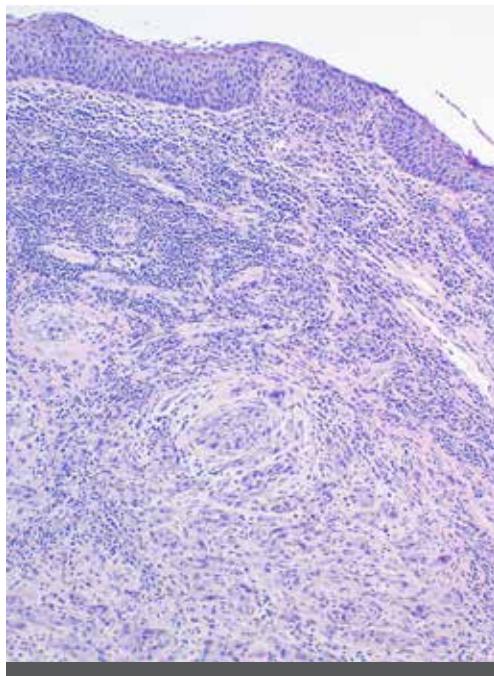


図 15A: 喉頭の扁平上皮腫瘍の HE 染色

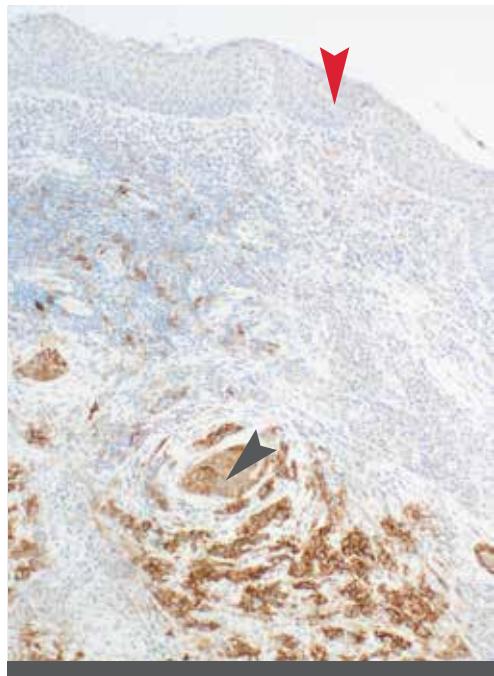


図 15B: 浸潤性の扁平上皮腫瘍 (黒矢印) の強い陽性の細胞膜染色この場合、上皮内成分 (赤矢印) は PD-L1 陽性ではありません。染色の有無にかかわらず、上皮内成分は、検体の PD-L1 陽性スコアを判定するための分母には含まれません。浸潤性の部分のみが評価対象です。対物レンズ 10 倍

PD-L1 IHC 28-8 pharmDx「ダコ」では評価が困難な頭頸部癌の例

非特異的バックグラウンド染色

バックグラウンド染色とは、組織検体の広範囲にみられる非特異的染色と定義されます。これには、さまざまな要因が関与します。例えば、検体の固定などの前処理や組織検体作製時のプロセスが正しく実施されなかったり、脱パラフィン不良やスライドの洗浄不良などからも引き起こされます。

10 % 中性緩衝ホルマリン以外の固定液を使用することもバックグラウンド染色の原因となることがあります。

バックグラウンド染色を生じうる要因

- スライドの染色前の乾燥 (ダコ Autostainer Link 48 ヘスライドをのせる際、機器の稼動前にスライドが乾いてしまうことを防ぐため、スライド表面に洗浄液をかけ、湿潤状態を保つ)
- 脱パラフィン不良
- スライドの洗浄不良

陰性対照のコントロールと、組織検体上のバックグラウンド染色状態を照らし合わせることで、その程度を把握することができます。検体はすべて非特異的バックグラウンド染色が 1+ 以下である必要がります。

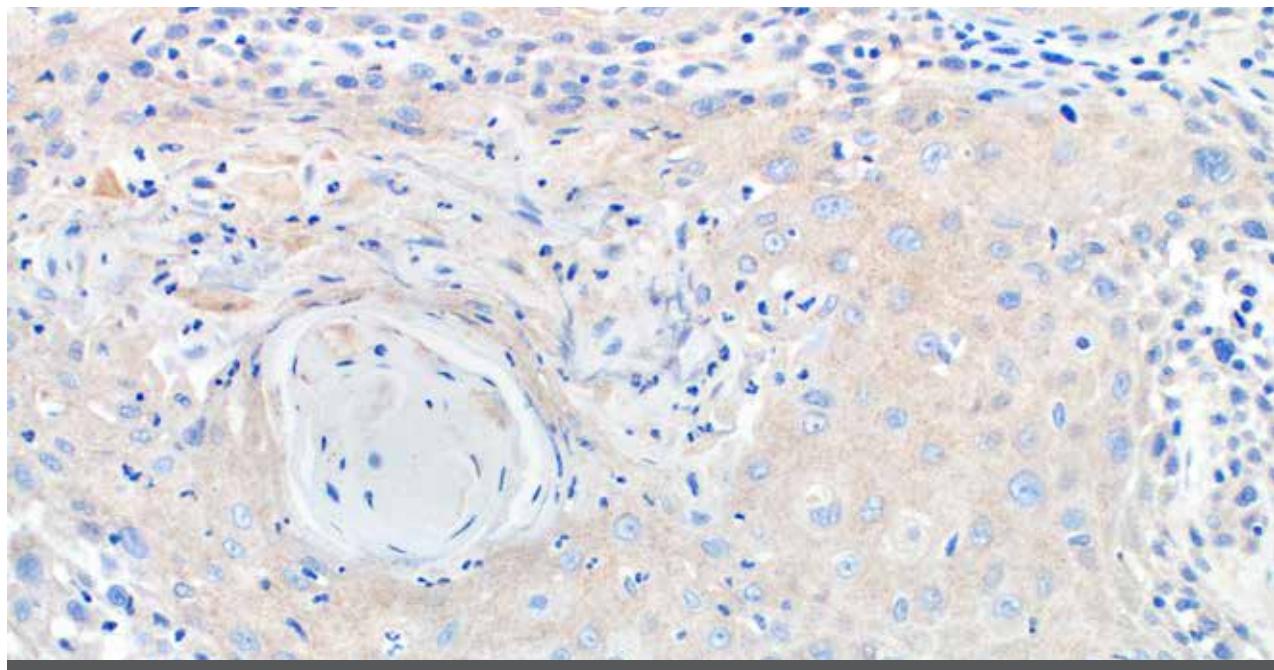


図 16: 舌の扁平上皮腫瘍。細胞膜染色のない腫瘍細胞の細胞質中の顆粒状染色は、陽性とみなしません。対物レンズ 20 倍

免疫細胞

腫瘍中の浸潤した炎症細胞に強い染色が認められることがあります。炎症細胞は腫瘍の陽性染色割合の判定対象外です。

壊死

壊死組織は非特異的染色を示す場合があるため、腫瘍陽性割合のスコアリング対象から外します。

扁平細胞の鑑別

この腫瘍タイプでは、細胞分化により、様々なサイズの細胞が認められる可能性があります。細胞サイズにはらつきがあるため、染色領域により陽性染色のおおよその割合を掴もうとすると、スコアが不正確になる場合があります。一次抗体で染色された組織検体のスコアリングの手順については、19 ページをご参照ください。

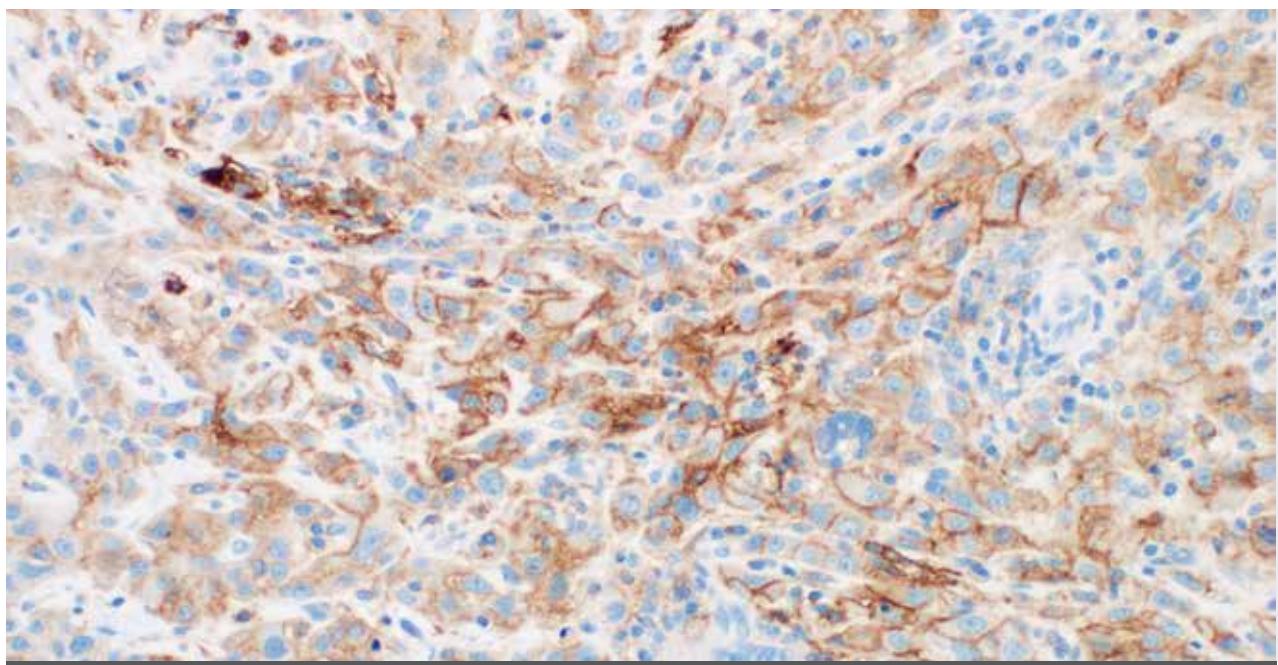


図 17: 舌の扁平上皮腫瘍。腫瘍の細胞膜染色が認められ、非特異的な細胞質染色から鑑別することが可能です。対物レンズ 20 倍

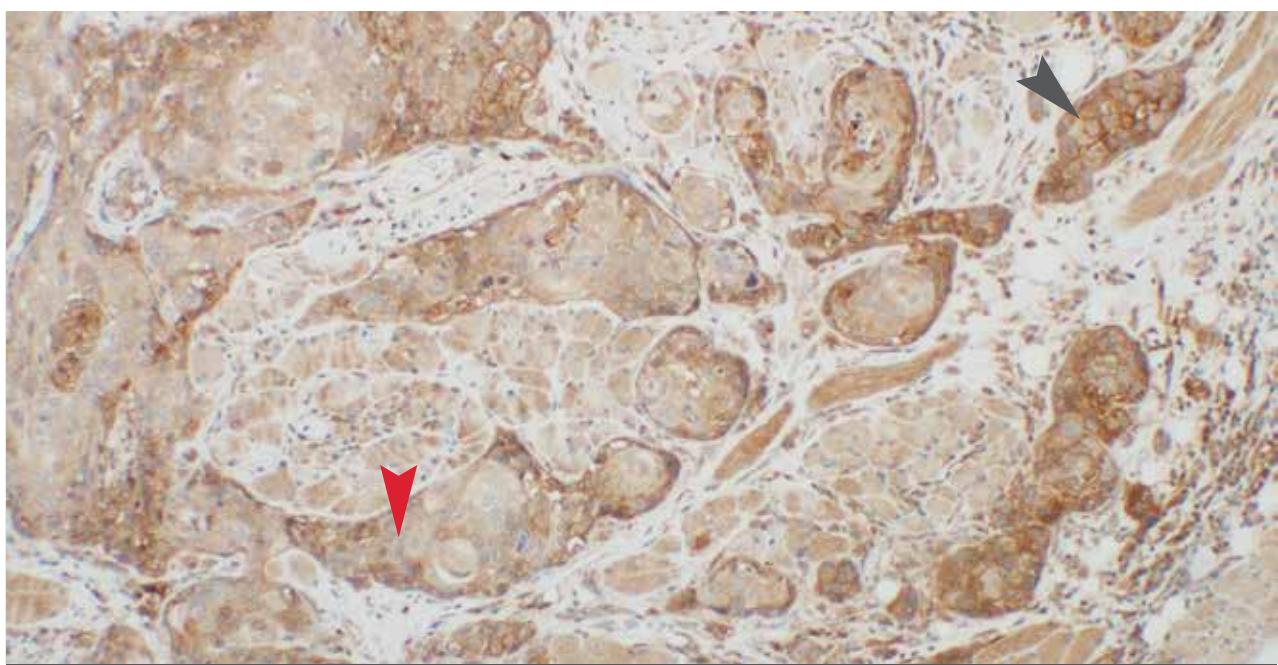


図 18: 舌の扁平上皮腫瘍。これは、スコアリングを妨げる過剰な細胞質の染色による判定不可検体の例です。腫瘍の細胞膜染色が認められます (黒矢印)、検体の多くの部分で細胞質が過剰に染色されています (赤矢印)。対物レンズ 10 倍

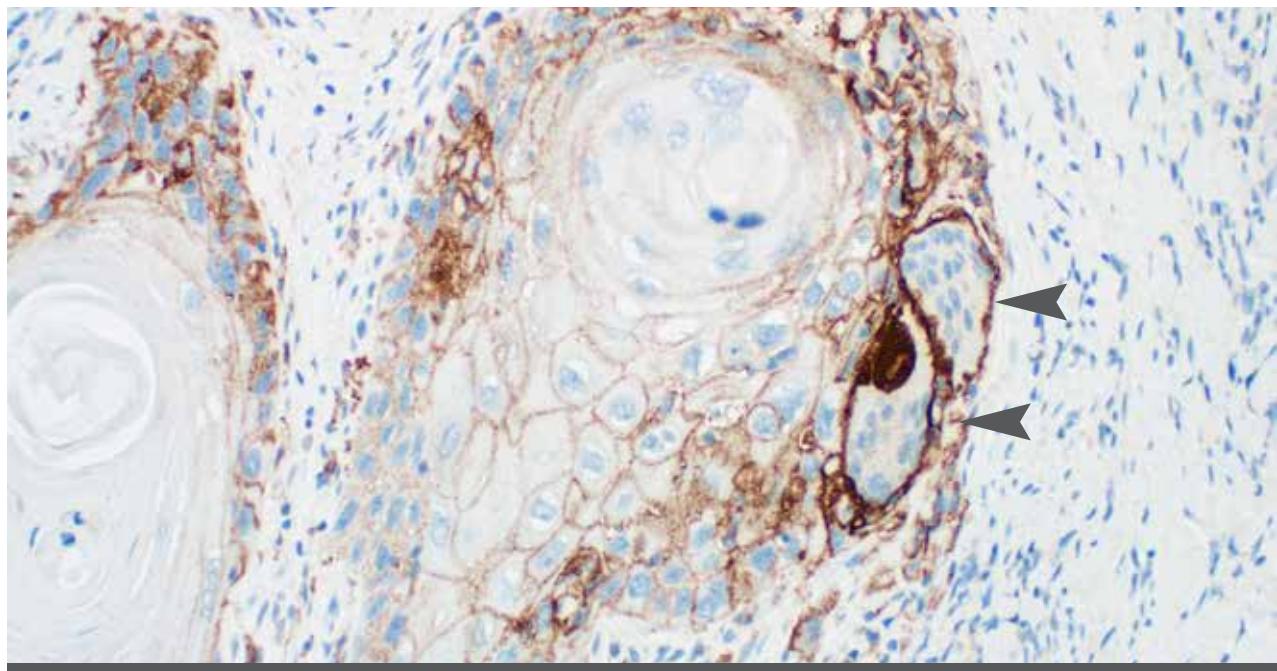


図 19: 高度～中程度に分化し角化した、舌の扁平上皮腫瘍。異物巨細胞 (FBGC) の細胞膜染色に注意してください。この腫瘍の性質上、FBGC は高分化扁平上皮癌に認められ、間質に溢流した腫瘍細胞によって產生されたケラチン塊などの異物に対する反応であることを示します。FBGC はマクロファージの融合によって形成されます。FBGC は腫瘍の PD-L1 陽性染色評価のスコアリング対象から除外してください。対物レンズ 20 倍

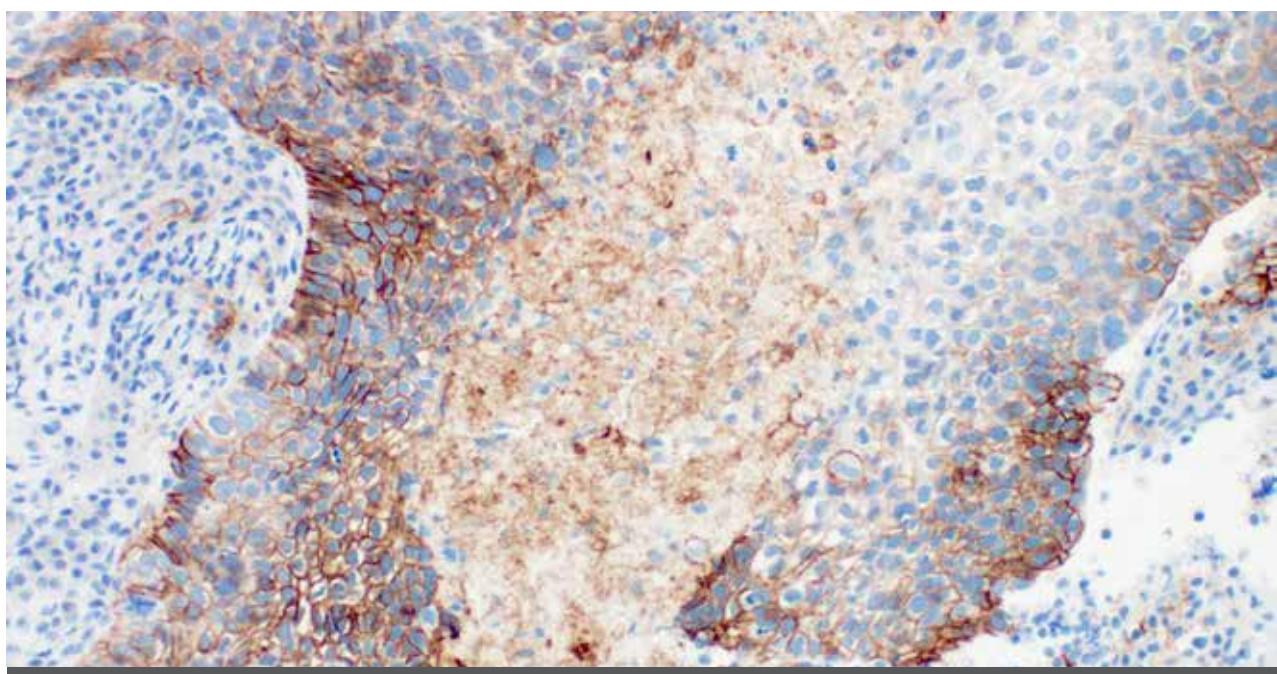


図 20: 壊死領域を示す、喉頭の扁平上皮腫瘍。隣接する腫瘍細胞は PD-L1 陽性染色の評価対象となります。壊死領域ではなく、判定対象となる腫瘍細胞のみをスコアリングの対象としてください。検体が過度に壊死している場合、不適正とみなします。検体を評価するには、100 個以上の腫瘍細胞が存在する必要があります。対物レンズ 20 倍

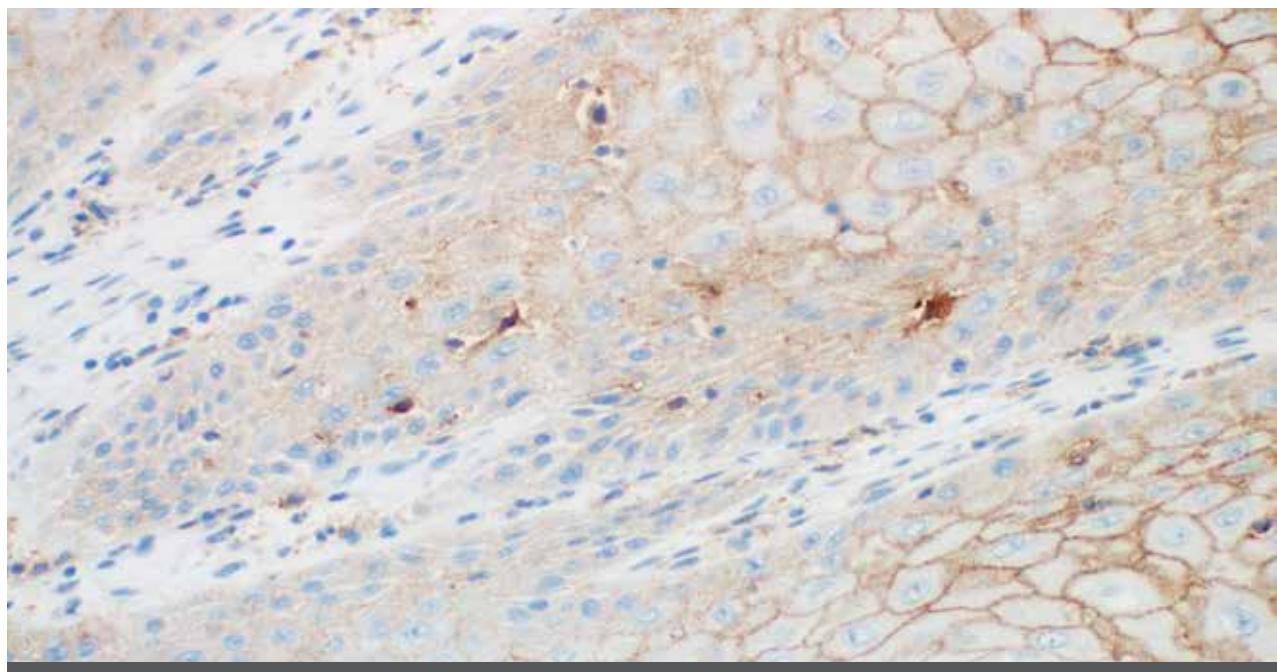


図 21: 喉頭の扁平上皮腫瘍に認められる PD-L1 陽性の染色。陽性の割合をスコアリングする場合、割合は領域ではなく陽性染色された細胞数によって判定します。この例では、密集した類基底細胞は染色されておらず、同数の陽性染色された高分化扁平上皮細胞が占める面積よりも小さい面積を占めています。細胞の大多数が表面的には陽性に見えますが、細胞を数えてみると、陽性の腫瘍細胞は 30 % のみです。対物レンズ 20 倍

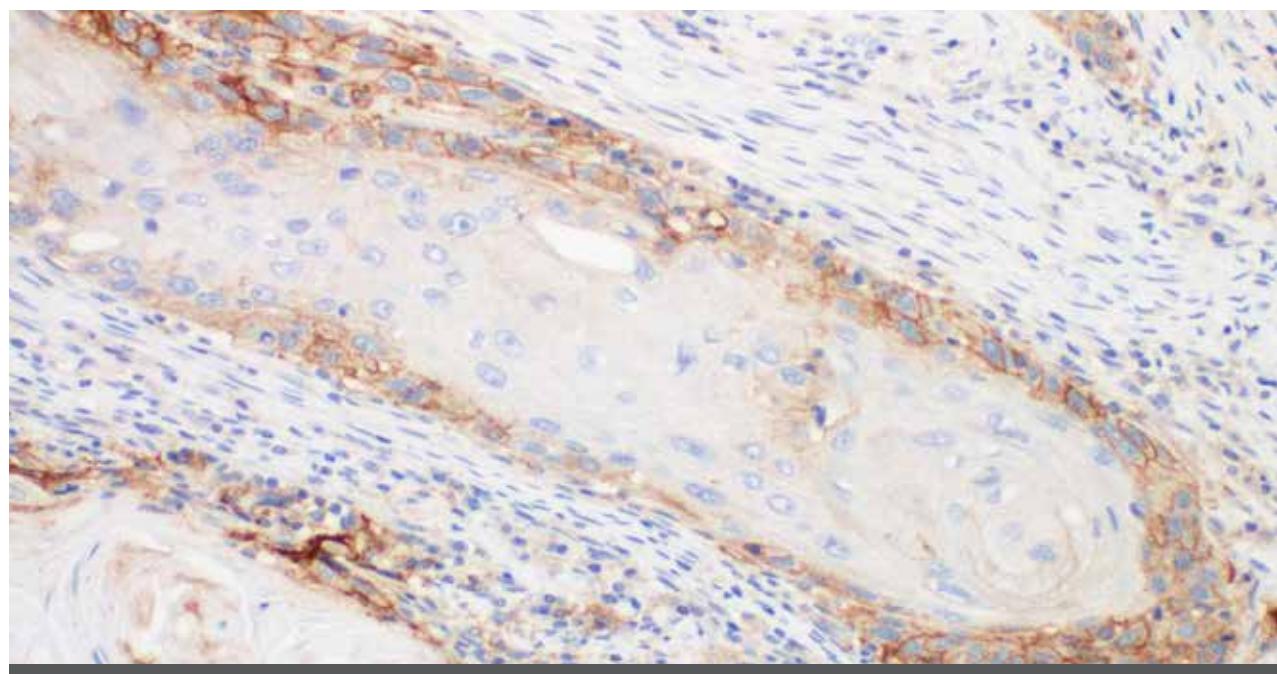


図 22: 下咽頭の扁平上皮腫瘍。この例では、密集した類基底細胞が、PD-L1 陽性を示していますが、高分化扁平上皮細胞は陰性を示しています。染色された表面積に基づいて腫瘍の陽性割合を判定すると、この例では、スコアを誤って 20 % と記録してしまいます。しかし、正しいスコアリングアルゴリズムを使って、腫瘍細胞の総数から陽性染色された腫瘍細胞数を計測すると、正しい PD-L1 陽性割合である 60 % が得られます。対物レンズ 20 倍

PD-L1 IHC 28-8 pharmDx「ダコ」のトラブルシューティングガイド

問題	考えられる原因	推奨される処置
1 コントロールスライドも検体スライドも染色されない	1a プログラミングエラー	PD-L1 IHC 28-8 pharmDx「ダコ」用のプロトコールが選択されていることを確認する
	1b 基質溶液との反応不足	基質溶液が適切に調製されていることを確認する
	1c 非推奨の洗浄液に含まれるアジ化ナトリウム	ダコ Envision FLEX 洗浄液 (20 x) 型番: K800721-2) を使用しているか確認する
	1d 本品中のコントロールスライド自体の劣化	パッケージ外装に印字されているキットの使用期限と保管条件を確認する
2 検体スライドの染色が弱い	2a 不適切な固定方法	適切な固定液と固定方法で実施していることを確認する
	2b 試薬量の添加不足	組織切片のサイズと試薬添加量を確認する
	2c 不適切な洗浄液を使用	ダコ Envision FLEX 洗浄液 (20 x) (型番: K800721-2) を使用しているか確認する
	2d 試薬の温度が使用時に低かった	染色前に試薬を室温 (20 ~ 25 °C) に戻す
3 組織検体スライド、または本品中の陽性対照のコントロールの染色が弱い	3a 抗原賦活が不十分	ダコ PT Link 上での 3-in-1 処理が正しく行われたことを確認する
	3b 不適切な洗浄液を使用	ダコ Envision FLEX 洗浄液 (20 x) (型番: K800721-2) を使用しているか確認する
4 スライドのバックグラウンドが過剰に染色されている	4a 脱パラフィン不良	ダコ PT Link 上での 3-in-1 処理が正しく行われたことを確認する
	4b ダコ Autostainer Link 48 へ装填時にスライドが乾燥した	機器への装填時、または染色開始前にスライドが湿潤状態に置かれていることを確認する (スライド表面に緩衝液をかけ乾燥を防止しているか?)
	4c 試薬の非特異吸着 (反応)	固定が適切に行われているか、また、壊死の強い検体でないことを確認する
	4d 不適切な固定方法	適切な固定液と固定方法で実施していることを確認する
5 組織がスライドから剥離する	5a 不適切なスライドガラスを使用	コーティングスライドを使用する
	5b 不適切な検体処理	薄切した切片を染色前に 58 ± 2 °C のオープン内で 1 時間ベーキングする
6 染色が強すぎる	6a 不適切な固定方法	適切な固定液と固定方法で実施していることを確認する
	6b 不適切な洗浄液を使用	ダコ Envision FLEX 洗浄液 (20 x) (型番: K800721-2) を使用しているか確認する
	6c 染色試薬の温度が高すぎる	試薬は染色前に 20 ~ 25 °C の温度に戻すことを推奨します
7 加熱時に抗原賦活液が濁って見える	7 加熱時に抗原賦活液が濁って見える	これは正常であり、染色には影響しない
8 染色時の気泡の混入をもたらす検体のアーチファクト	8 スライド封入前のスライドの脱水が不十分	適切なスライド脱水手順を確認する本マニュアル内に脱水手順の一例が記載されています。

参考文献

- Argiris A, Karamouzis MV, Raben D, et al. Head and neck cancer. *Lancet* 2008; 371:1695-709.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (formerly NCCLS). Protection of Laboratory Workers From Occupationally Acquired Infections; Approved Guideline – Fourth Edition. CLSI document M29-A4 [ISBN 1-56238-962-9]. Clinical and Laboratory Standards Institute, 950 West Valley Road, Suite 2500, Wayne, Pennsylvania 19087 – 1898 USA, 2014.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (formerly NCCCLS). Quality assurance for Design Control and Implementation of Immunohistochemistry Assays; Approved guideline. CLSI document I/LA28-A2; Vol. 31 No. 4 (ISBN 1-56238-745-6) CLSI, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087 USA; 2011.
- Colevas AD. Systemic therapy for metastatic or recurrent squamous cell carcinoma of the head and neck. *J Natl Compr Canc Netw* 2015; 13: e37-e48.
- Department of Health, Education and Welfare, National Institutes for Occupational Safety and Health, Rockville, MD. “Procedures for the decontamination of plumbing systems containing copper and/or lead azides.” DHHS (NIOSH) Publ.No. 78-127, Current 13. August 16, 1976.
- Ferris RL, Blumenschein G, Fayette J, et. al. Nivolumab for Recurrent Squamous-Cell Carcinoma of the Head and Neck, *N Engl J Med*. 2016; DOI:10.1056/NEJMoa1602252.
- Omata M, Liew C-T, Ashcavai M, Peters RL. Nonimmunologic binding of horseradish peroxidase to hepatitis B surface antigen: a possible source of error in immunohistochemistry. *Am J Clin Path* 1980; 73:626.
- OPDIVO package insert.
- Phelps RM, et al. NCI-navy medical oncology branch cell line data base. *J Cell Biochem*. 1996; 63:32-91.
- Phillips T, Simmons P, Inzunza HD, et al. Development of an automated PD-L1 immunohistochemistry (IHC) assay for non-small cell lung cancer. *Appl Immuno Molec Morph* 2015; 23(8):541-9.
- Pignon JP, Bourhis J, Domènec C, et al. Chemotherapy added to locoregional treatment for head and neck squamous-cell carcinoma: three meta-analyses of updated individual data. MACH-NC Collaborative Group. *Meta-Analysis of Chemotherapy on Head and Neck Cancer. Lancet* 2000; 355:949-55.
- Siegel RL, Miller KD, Jemal A. *Cancer Statistics 2016. Cancer J Clin* 2016; 7-30.
- Taylor CR and Rudbeck L. *Education Guide: Immunohistochemical Staining Methods. Sixth Edition. Dako*, Carpinteria, California; 2013.
- Topalian SL, Drake CG, Pardoll DM. Targeting the PD-1/B7-H1 (PD-L1) pathway to activate anti-tumor immunity. *Curr Opin Immunol* 2012; 24(2):207-212.
- Topalian SL, Hodi FS, Brahmer JR, et. al. Safety, Activity, and Immune Correlates of Anti-PD-1 Antibody in Cancer. *New Eng. J. Med.* 2012; 366(26):2455-2465.
- Wang C, Thudium KB, Han M, et al. In vitro characterization of the anti-PD-1 antibody nivolumab, BMS-936558, and in vivo toxicology in non-human primates. *Cancer Immunol Res* 2014; 2(9):846-56.

参考資料

- (1) PD-L1 IHC 28-8 pharmDx Instructions for Use.

Trusted Answers.Together.



Agilent Pathology Solutions

© Agilent Technologies, Inc. 2017
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。
掲載内容は2017年6月現在のものです。掲載内容は予告なく変わる場合がございます。

アジレント・テクノロジー株式会社
www.agilent.com

<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

Tel : 03-5232-9970
Fax : 03-5232-9969