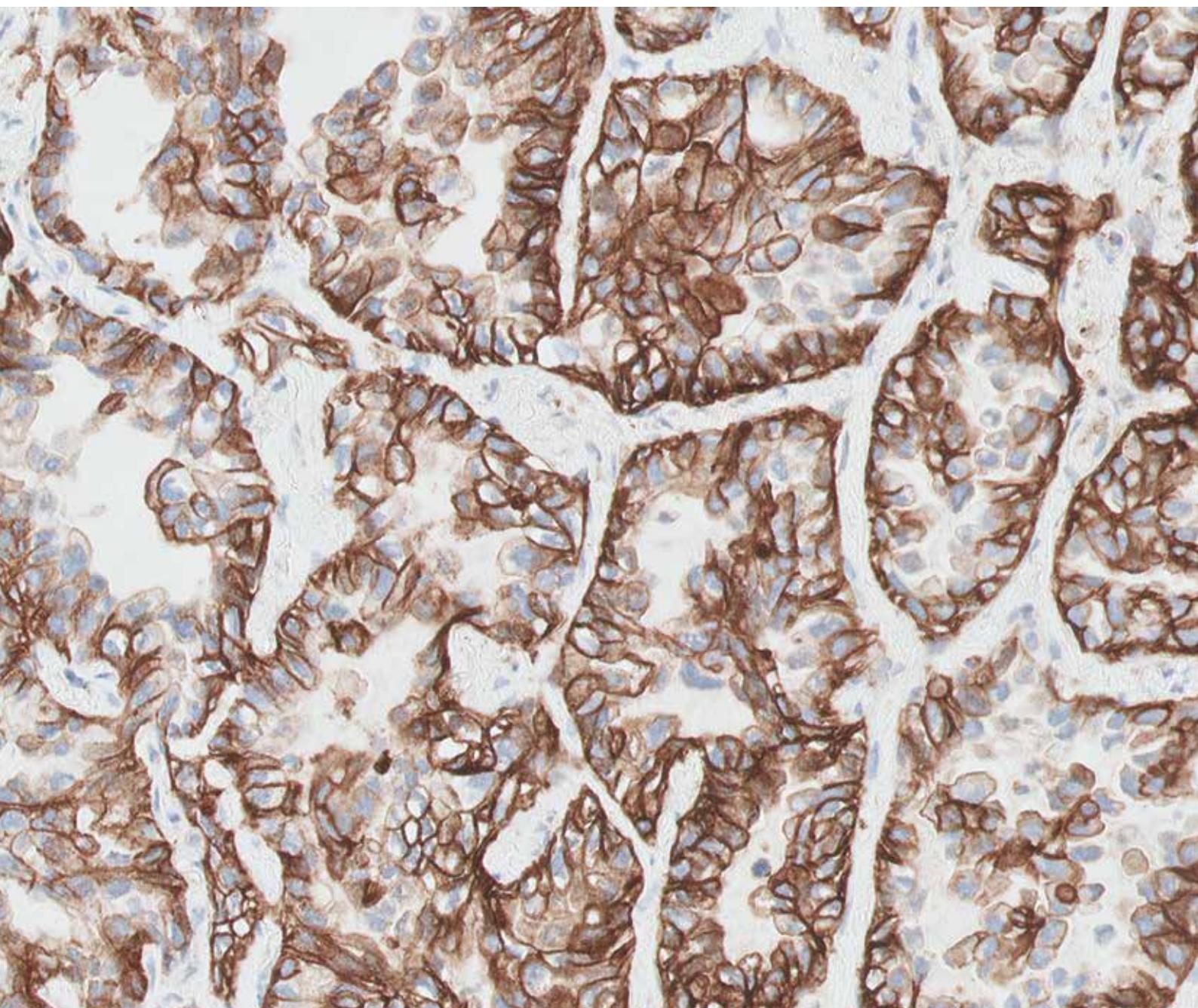


体外診断用医薬品 承認番号 : 22800EZX00077000



Agilent Technologies

目次

| | |
|--|----|
| はじめに..... | 4 |
| PD-L1 IHC 28-8 pharmDx「ダコ」の用途..... | 4 |
| PD-L1 IHC 28-8 pharmDx「ダコ」染色結果判定マニュアル..... | 4 |
| PD-1/PD-L1 パスウェイの役割..... | 5 |
| PD-L1 IHC 28-8 pharmDx「ダコ」、コード: SK00521-5J..... | 6 |
| 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..... | 8 |
| 検体採取と作製..... | 8 |
| コントロール組織..... | 8 |
| 組織の前処理..... | 8 |
| PD-L1 IHC 28-8 pharmDx「ダコ」 染色手順..... | 9 |
| 試薬の保管..... | 9 |
| 試薬の調製..... | 9 |
| 染色評価のためのコントロール..... | 9 |
| 脱パラフィン、親水化、抗原賦活..... | 10 |
| 染色と対比染色..... | 10 |
| 封入..... | 10 |
| PD-L1 IHC 28-8 pharmDx「ダコ」実施テクニカルチェックリスト..... | 11 |
| PD-L1 IHC 28-8 pharmDx「ダコ」の結果判定に関する推奨事項 | 12 |
| HE 染色した組織検体 | 14 |
| 本品中のコントロールスライド | 14 |
| 陽性対照のコントロール組織スライド..... | 15 |
| 陰性対照のコントロール組織スライド..... | 15 |
| 一次抗体陰性コントロールで染色した組織検体..... | 15 |
| 一次抗体で染色した組織検体..... | 16 |
| PD-L1 IHC 28-8 pharmDx「ダコ」スコアリングガイドライン..... | 18 |
| PD-L1 IHC 28-8 pharmDx「ダコ」検査結果の臨床的解釈 | 19 |
| PD-L1 IHC 28-8 pharmDx「ダコ」の免疫染色例..... | 20 |
| PD-L1 IHC 28-8 pharmDx「ダコ」トラブルシューティングガイド | 25 |
| 参考文献..... | 26 |

はじめに

PD-L1 IHC 28-8 pharmDx「ダコ」の用途

本品は、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。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(NSCLC) 細胞中の 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、強度を問わず完全または部分的な細胞膜染色を示す陽性腫瘍細胞の割合により判断します。

PD-L1 IHC 28-8 pharmDx「ダコ」により測定される PD-L1 の発現率は、ニボルマブ投与による非扁平上皮非小細胞肺癌患者の全生存期間延長の程度に関連する可能性があります。

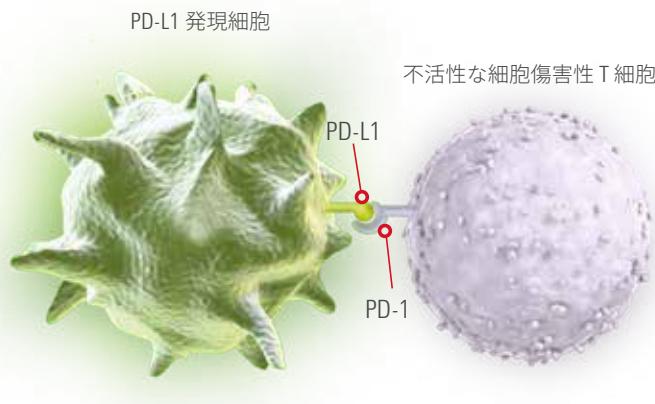
PD-L1 IHC 28-8 pharmDx「ダコ」 染色結果判定マニュアル

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ついただくものです。PD-L1 IHC 28-8 pharmDx「ダコ」で染色した非扁平上皮非小細胞肺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、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なヒント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」で染色したスライドの評価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。

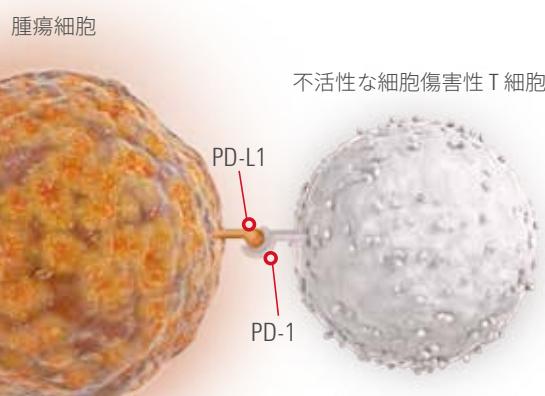
掲載されている顕微鏡写真は、特に記載のないかぎり非扁平上皮非小細胞肺癌のものです。

PD-1/PD-L1 パスウェイの役割



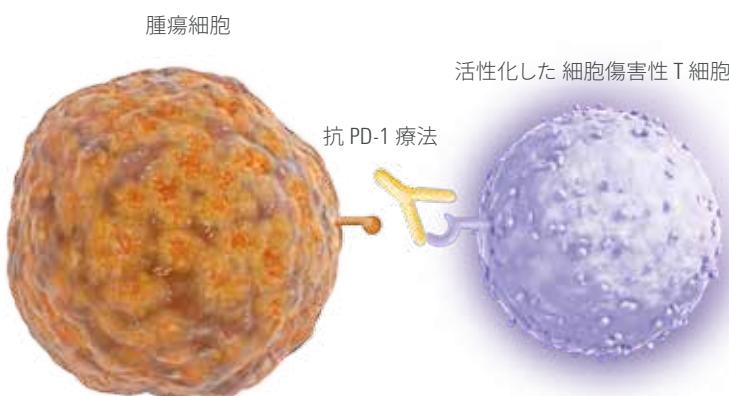
正常細胞への攻撃を阻害

T 細胞を不活性化し、正常細胞への攻撃が阻害されます。



腫瘍の T 紹介による検知を回避

T 紹介を不活性化することにより、腫瘍細胞の検知を回避し、細胞死が抑制されます。



がん免疫療法が腫瘍を攻撃する 免疫応答を利用

PD-L1 との結合を阻害することで、細胞傷害性 T 紹介は腫瘍細胞を積極的に排除できるようになります。

PD-L1 IHC 28-8 pharmDx「ダコ」

コード: SK00521-5J

PD-L1 IHC 28-8 pharmDx「ダコ」には、ダコ Autostainer Link 48 (IHC自動染色装置) とダコ PT Link 前処理システムを用いて FFPE 検体の IHC 染色手順を完了するため必要な、最適化された試薬とプロトコールが含まれています。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。発色反応の色は発色エンハンサー試薬により変化します。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・確認するために、ホルマリン固定パラフィン包埋されたヒト細胞株 2 種類のコントロールスライドが含まれています。

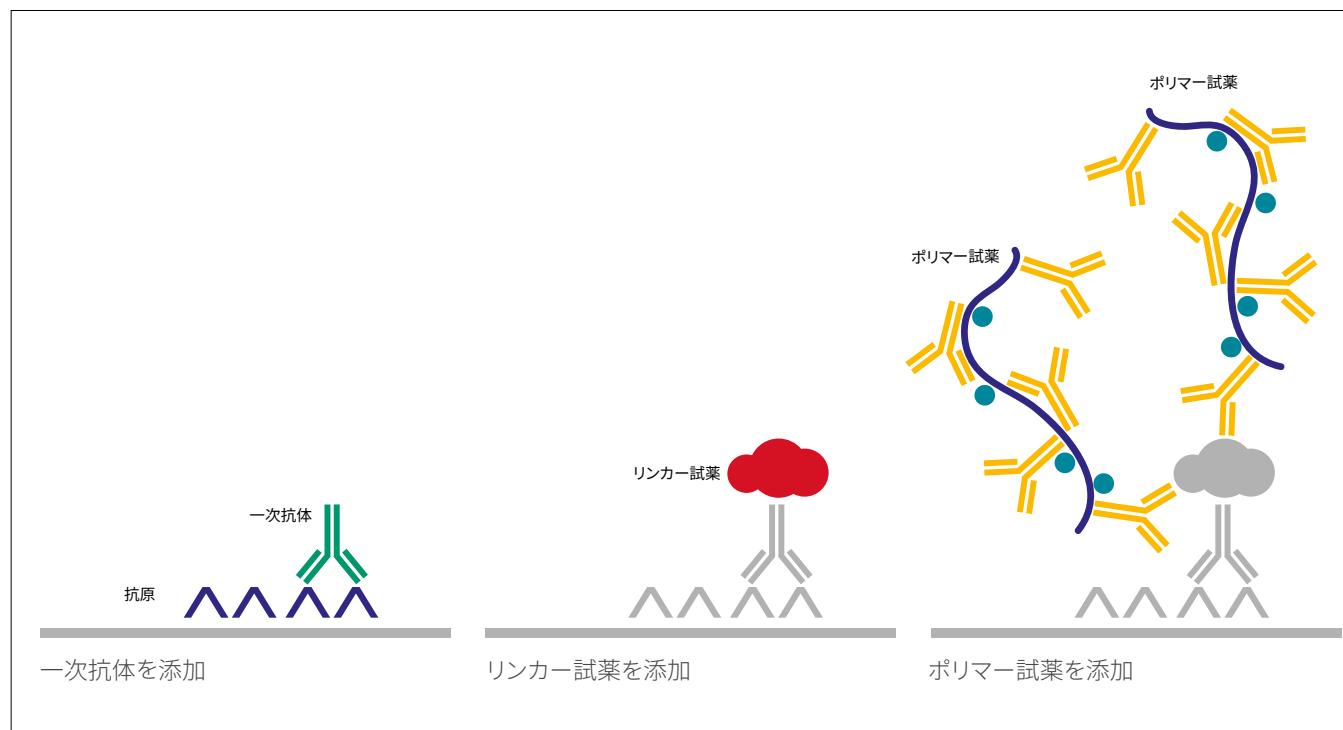


図 1: PD-L1 IHC 28-8 pharmDx「ダコ」の染色手順

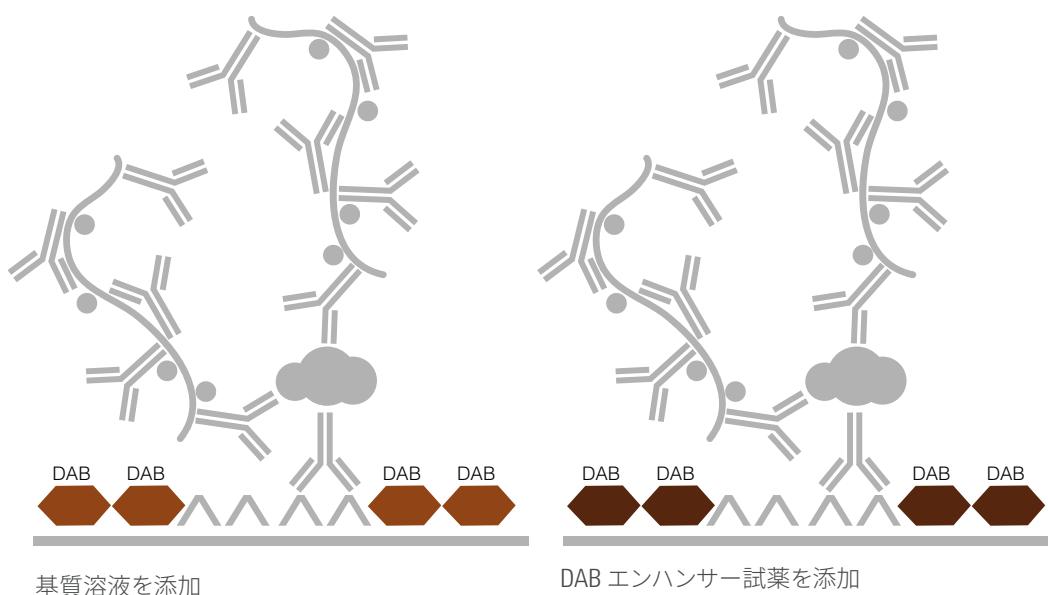
PD-L1 IHC 28-8 pharmDx「ダコ」には、コントロールスライド 15 枚と 50 テスト分の試薬が含まれています(図 2)。

- 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)(コード: K800721-2)およびダコ EnVision FLEX ヘマトキシリン(AutostainerLink用)(コード: 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」を適切に使用するために～技術的な留意点～

PD-L1 IHC 28-8 pharmDx 「ダコ」の検査結果に影響をおよぼす 2 つの大きな要因がある。染色前の検体前処理におけるエラーと、本製品を使用する染色工程に発生しうるエラーである。これらのエラー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る。

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る。腫瘍形態が診断するにふさわしい状態に保持され、評価に十分な数の細胞が存在していくなくてはならない。検体処理方法は、標準法を用いて実施する。

コントロール組織

検査室内での組織検体の処理 (tissue processing) および包埋方法のばらつきは、検査結果の不安定さに起因する。染色ラン毎に、本品中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る。

陽性対照および陰性対照のコントロール組織は、新鮮かつ組織検体と同じ方法で前処理された非扁平上皮非小細胞肺癌症例検体を選択する。組織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、組織の作製状態の良し悪しを確認することはできない。最適な陽性対照のコントロール組織として、弱から中等度に陽性染色を示す症例が望ましい。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するが、この検証は各自施設内で実施する必要がある。最適な非扁平上皮非小細胞肺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、正常な肺胞マクロファージが染色される。

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る。

検体を厚さ 3 ~ 4 mm に切り出し、ホルマリンで固定する。次に、アルコールとキシレンの一連の脱水処理後、パラフィンを浸透させる。組織切除後遅くとも 30 分以内に固定を開始する。10 % 中性緩衝ホルマリンで 24 ~ 48 時間固定する。パラフィンの温度が 60 °C を超えないようにする。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、推奨しない。

4-5 μm に薄切り、作製した標本を保存する場合には、抗原性を保持するために、2 ~ 8 °C の暗所で保管し、4 ヶ月以内に染色する。薄切した組織をコーティングスライドに載せる。組織切片は、抗原性を維持するために 2 ~ 8 °C の暗所で保管し、4 ヶ月以内に染色する。

PD-L1 IHC 28-8 pharmDx「ダコ」 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予め設計されている。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こと。ソフトウェアに予めプログラムされているプロトコールを使用する。

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 の暗所で保管する。

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する。

抗原賦活液

濃縮抗原賦活液を精製水で 1:50 に希釈する。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 を調製できる。調製後の pH は 6.1 ± 0.2 でなければならない。抗原賦活液は、5 日以内に使用する。また、再使用は 3 回までとしこれを厳守する。

洗浄液

ダコ Envision FLEX 洗浄液 (20 x) を、精製水で 1:20 に希釈する。希釈後未使用的洗浄液は 2 ~ 8 °C で保管し、1 ヶ月以内に使い切る。洗浄液が濁った場合は、使用せず廃棄する。

基質溶液

基質緩衝液 1 mLあたり 1 滴の発色基質を加え、混合する。調製済みの基質発色液は、2 ~ 8 °C の暗所で保管すれば、5 日間有効。この試薬は染色に先立って調製しておく。溶液中に沈殿物が生じても、品質には影響しない。

- 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 滴加える。基質緩衝液のラベルに印字されている量は 7.2 mL であるが、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る。
- 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るが、変色しても製品の性能には影響しない。上記のガイドラインに従って希釈する。基質緩衝液に過剰に発色試薬を加えると、陽性染色が損なわれる。

染色評価のためのコントロール

染色ラン毎に一次抗体で本品中のコントロールスライド 1 枚染める。また、検査ごとに、一次抗体および陰性コントロール試薬で陽性対照および陰性対照のコントロール組織を染色して評価する。これには施設内でコントロールとした組織検体の連続切片を用いる。

脱パラフィン、親水化、抗原賦活

PT Link を使用して、脱パラフィン、親水化、抗原賦活の 3つを 3-in1 処理で行う。

- 「Preheat and Cool」を 65 °C に設定し、抗原賦活処理温度を 97 °C、20 分間に設定する。
- PT Link タンクに、抗原賦活液を 1.5 L 調製し、充填する。
- 調製した抗原賦活液の入った PT Link を 65 °C に予熱する。
- 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する。97 °C で 20 分間抗原賦活処理を行う。
- 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タンク PT Link リンスステーション（コード: PT10930）に入れる。
- スライドは、リンスステーション内で 5 分間浸漬する。

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 にセットする。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る（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」プロトコールを選択する。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する。このプロトコールには、ダコ Envision FLEX ヘマトキシリソル（AutostainerLink 用）（コード: K800821-2）による対比染色も含まれる。

封入

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

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

施設名 _____

氏名および役職 _____

ダコ Autostainer Link 48 シリアル番号 _____

ソフトウェアバージョン _____

| | はい | いいえ |
|--|--------------------------|--------------------------|
| 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?..... | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| 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?..... | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| 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? | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| 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?..... | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| 非扁平上皮非小細胞肺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?..... | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| 組織を 10 % 中性緩衝ホルマリンで固定していますか? | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| 組織へのパラフィン浸透は 60 °C 以下で実施しましたか? | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| 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? | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| 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 2 ~ 8 °C の暗所で保管され、薄切後 4 ヶ月以内のものですか?..... | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| 抗原賦活液は適切に調製されていますか?..... | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| ダコ Envision FLEX 洗浄液 (20 x) は適切に調製されていますか?..... | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| 基質溶液は適切に調製されていますか? | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| 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? | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| 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?..... | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| 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? | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| ダコ EnVision FLEX ヘマトキシリンで対比染色していますか?..... | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| PD-L1 IHC 28-8 pharmDx「ダコ」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? | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| 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。 | | |

上記のいずれかの質問で「いいえ」を選択した場合は、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」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する。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 染色並びに、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ある。HE 染色標本では、組織構造(組織型)と細胞形態の保存状態を確認評価する。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スライド、一次抗体陰性コントロールで染色した各患者症例のスライドを観察する。最後に、一次抗体で染色した組織検体を鏡検し、形態が保持され評価に値する腫瘍細胞の染色性を評価判定する。

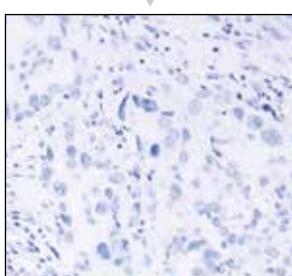
PD-L1 の染色では、強度を問わず細胞膜が完全または部分的に染色されている腫瘍細胞を陽性と判定する。

細胞質染色を認める場合でも、スコアリングでは陽性とは見なさず除外する。非悪性細胞および免疫細胞(浸潤リンパ球やマクロファージなど)が PD-L1 で染色されることがあるが、その場合にもスコアリングからは除外する。

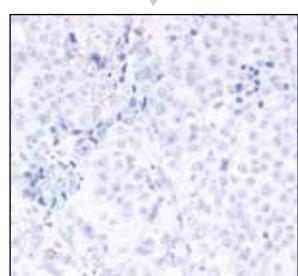
陽性対照および陰性対照のコントロール組織スライドは、各施設ごとに用意する。本製品に含まれるのは、細胞株 2 種類を貼付したコントロールスライドのみである。



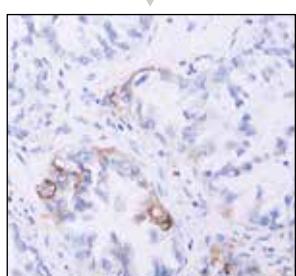
強度を問わず細胞膜が完全または部分的に染色されている適切な腫瘍細胞を陽性としてスコアリングする。
標本全体に対する陽性腫瘍細胞の割合を算出する。



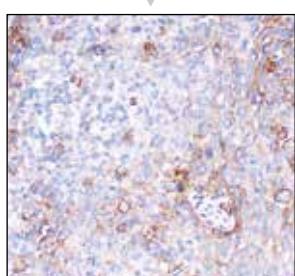
PD-L1 発現 1 % 未満



PD-L1 発現 1 % 以上



PD-L1 発現 5 % 以上



PD-L1 発現 10 % 以上

① HE 染色した組織検体

組織構造および保存状態は、HE 染色標本で評価する。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する。

② 本品中の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る。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が貼付されている(図 3)。この本品中の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、該当する全組織検体の結果を無効とみなす。本品中のコントロールスライドは、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。

PD-L1 陽性の細胞では、次の所見を確認する(図 4)。

- 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

PD-L1 陰性の所見を確認する条件を満たすこととする(図 5)。

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

注意事項：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る。細胞膜染色を示す場合でも、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ても、条件を満たすものと判断する。



図 3: 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。

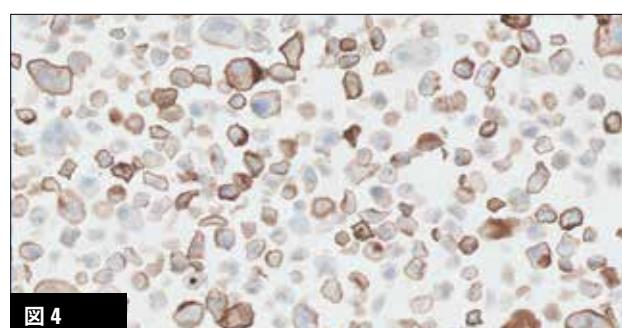


図 4

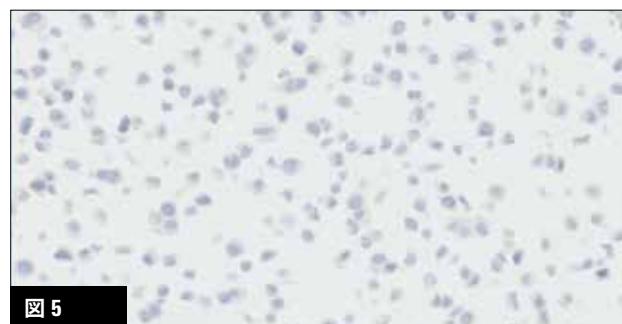


図 5

図 4: 条件を満たす染色を示す陽性の培養細胞セルブロック
図 5: 条件を満たす染色を示す陰性の培養細胞セルブロック

③ 陽性対照のコントロール組織スライド*

非扁平上皮非小細胞肺癌の陽性対照のコントロール組織を観察し、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する。バックグラウンド染色は、染色強度が 1+ 以下でなくてはならない。評価する際は、壊死または変性した腫瘍細胞を除外する。陽性対照のコントロール組織で良好な染色が得られていない場合は、該当するすべての組織検体結果を無効と見なす。

④ 陰性対照のコントロール組織スライド*

非扁平上皮非小細胞肺癌の陰性対照のコントロール組織を観察し、非特異的染色がないことを確認する。バックグラウンド染色は、染色強度が 1+ 以下でなくてはならない。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を認めた場合は、すべての組織検体結果を無効と見なす。

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。

* コントロール組織は、検査対象の組織検体と同じスライド上に貼付して染色することでより厳密に染色の妥当性が確認できる。

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染色した組織検体を観察し、試薬が正常に機能していることを確認する。評価に該当する腫瘍細胞の細胞膜は、ここでは染色されない(図 6)。良好な染色が得られていない場合は、組織検体の結果を無効と見なす。

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ある(一次抗体で染色した該当組織標本を比較することでより正確に判定することができる)。

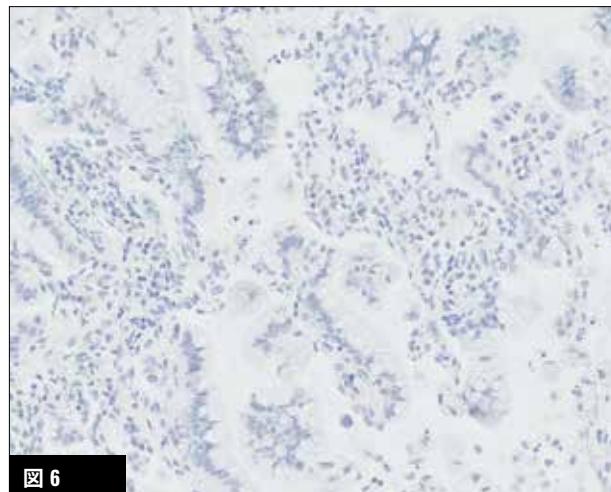


図 6

図 6: 一次抗体陰性コントロールで染色した非扁平上皮非小細胞肺癌。細胞膜染色を認めない。

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標本と比較しながら実施する。(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る。

| | |
|----------|---|
| 1 | 4 倍の倍率で、検体全体の腫瘍領域を注意深く観察。PD-L1 染色の評価には、細胞形態が適切に保存され、良好に染色された腫瘍細胞領域を選択する。 |
| 2 | 10 ~ 40 倍の倍率で、強度を問わず完全または部分的に細胞膜が染色されている腫瘍細胞をスコアリングする。細胞質の染色は対象外とし、免疫細胞、正常細胞、および壊死細胞スコアリングから除外する。 |
| 3 | 10 ~ 40 倍の倍率で、検体全体に対する陽性腫瘍細胞の割合を算出する。 |

一次抗体で染色した非扁平上皮非小細胞肺癌の例については、図 7~10 を参照。

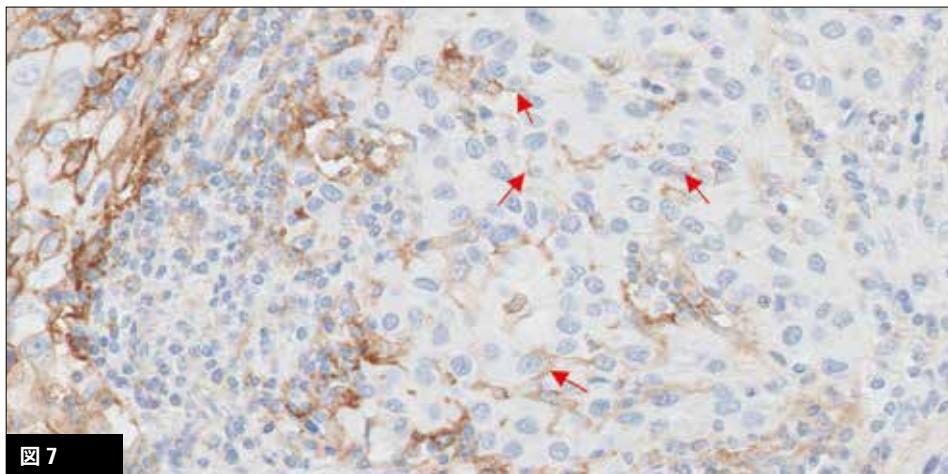


図 7: 評価対象となる腫瘍細胞の細胞膜染色。細胞膜が部分的に線状に染色されている(赤矢印)。

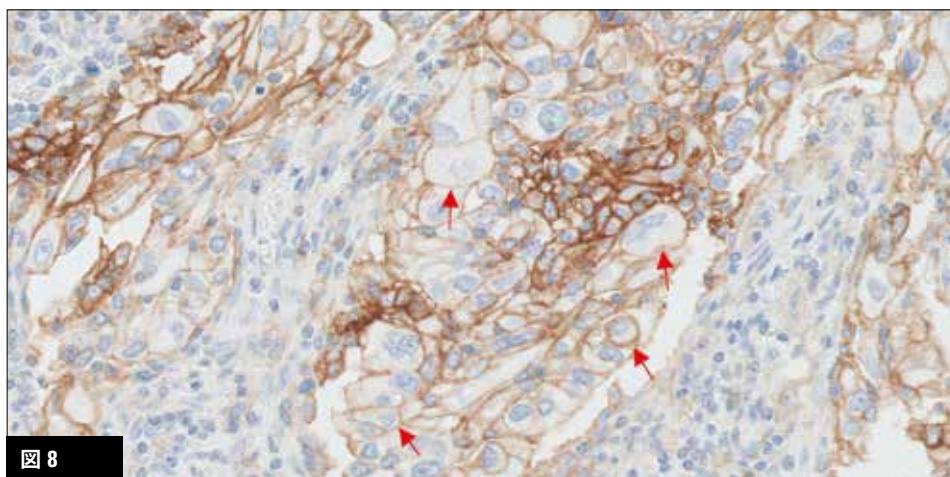


図 8

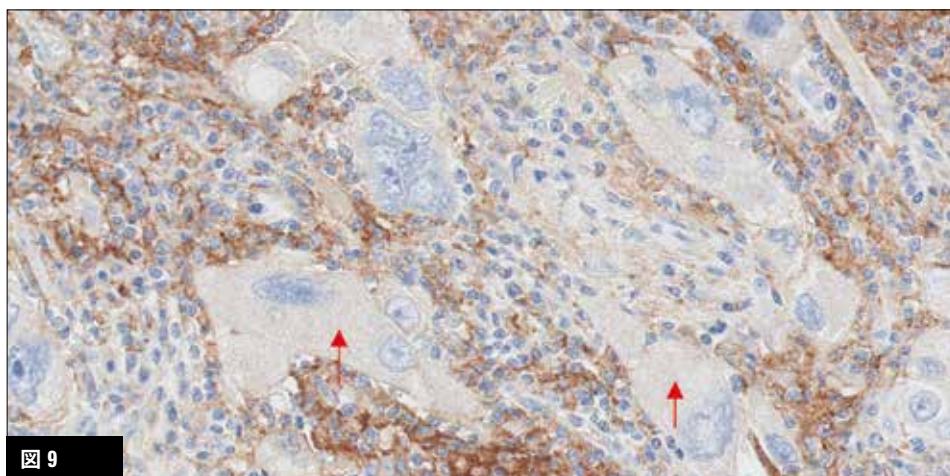


図 9

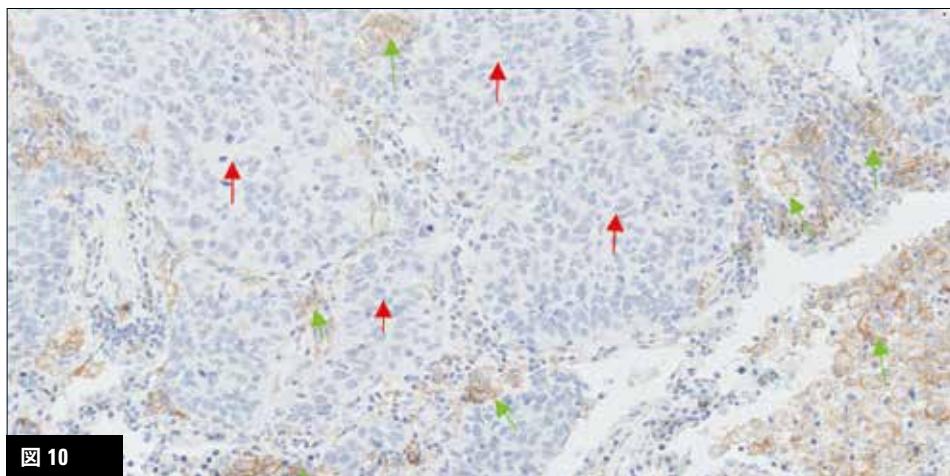


図 10

図 8: 判定対象となる腫瘍細胞に完全な細胞膜染色を認める(赤矢印)。

図 9: 標本全体に認められた細胞質染色(赤矢印)。スコアリングから除外する。

図 10: 判定対象となる腫瘍細胞(赤矢印)と、陽性を示す免疫細胞(緑矢印)。免疫細胞はスコアリングから除外する。

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判定法に従い、最適な方法で、病理医の経験および最善の医学的判断を考慮した上で実施する。

検査結果は、標本全体に対する腫瘍細胞の割合として判定するが、腫瘍細胞は形態を適切に保った細胞のみをその対象とし、染色強度に関わらず完全または部分的な細胞膜染色を示す場合を陽性とみなす。(ガイドラインと報告例は表1を参照)。

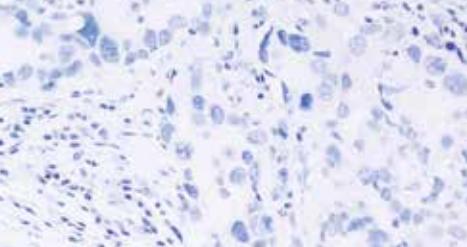
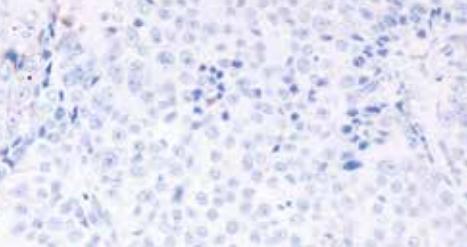
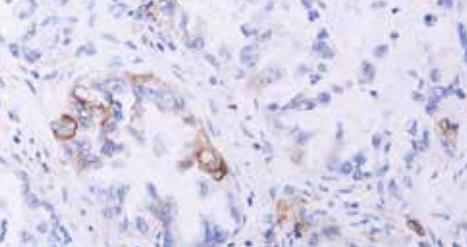
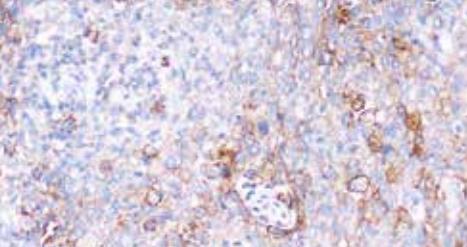
| 染色パターン | 非扁平上皮非小細胞肺癌の染色例 | 報告例 |
|---|--|-----------------|
| 染色強度は問わず、完全または部分的な細胞膜染色を呈する適切な腫瘍細胞の割合が1%未満 |  | PD-L1 発現 1% 未満 |
| 染色強度は問わず、完全または部分的な細胞膜染色を呈する適切な腫瘍細胞の割合が1%以上 |  | PD-L1 発現 1% 以上 |
| 染色強度は問わず、完全または部分的な細胞膜染色を呈する適切な腫瘍細胞の割合が5%以上 |  | PD-L1 発現 5% 以上 |
| 染色強度は問わず、完全または部分的な細胞膜染色を呈する適切な腫瘍細胞の割合が10%以上 |  | PD-L1 発現 10% 以上 |

表1: PD-L1 IHC 28-8 pharmDx「ダコ」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」 検査結果の臨床的解釈

PD-L1 IHC 28-8 pharmDx 「ダコ」では、ニボルマブ 投与による非扁平上皮非小細胞肺癌患者の全生存期間延長の程度に関連する可能性のある PD-L1 発現率を測定することができる。

PD-L1 IHC 28-8 pharmDx 「ダコ」の臨床的有用性は、第 III 相無作為化非盲検試験 CheckMate -057 (CA209057) 試験で検証された。この試験では、プラチナ製剤 2剤併用化学療法で効果が得られなかった進行性または転移性非扁平上皮非小細胞肺癌の成人 (19 歳以上) 患者を対象に、ニボルマブとドセタキセルの有効性を比較した。被験対象者を維持療法経験の有無、第二選択療法か第三選択療法か (チロシンキナーゼ阻害剤使用の有無を考慮するため) によって 1:1 で層別無作為化した。無作為化に先立ち、事前に規定したベースラインの PD-L1 発現率 (副次的目的) に従って有効性評価をするための初期治療を開始する前に、ベースラインの腫瘍組織を採取した。一次エンドポイントは全生存期間 (OS) とし、その他の二次エンドポイントは、奏効率、無増悪生存期間、および肺癌症状スケールにより評価された 12 週目までの疾患関連症状の改善とした。

CA209057 試験では、既定したすべての発現率で PD-L1 を発現していた患者において、ニボルマブ投与群はドセタキセル投与群に比べて生存率改善をみせた。一方、PD-L1 が発現していない患者では、両群の生存率は同等であった。PD-L1 発現レベルによって解析した場合には、ドセタキセル投与群に比べ、ニボルマブ投与群では OS 中央値に有意差を認めた。PD-L1 発現が 1 % 以上、5 % 以上、および 10 % 以上の各発現を比較すると、患者の OS の中央値は、ドセタキセル群では、9.0、8.1、および 8.0 ヶ月だったのに対し、ニボルマブ群では 17.1、18.2、および 19.4 ヶ月であった。発現が 1 % 未満、5 % 未満、および 10 % 未満では、ニボルマブ群で 9.7 ~ 10.4 ヶ月、ドセタキセル群で 10.1 ~ 10.3 ヶ月と、両群間の OS に差は認めなかった。

PD-L1 IHC 28-8 pharmDx「ダコ」の免疫染色例

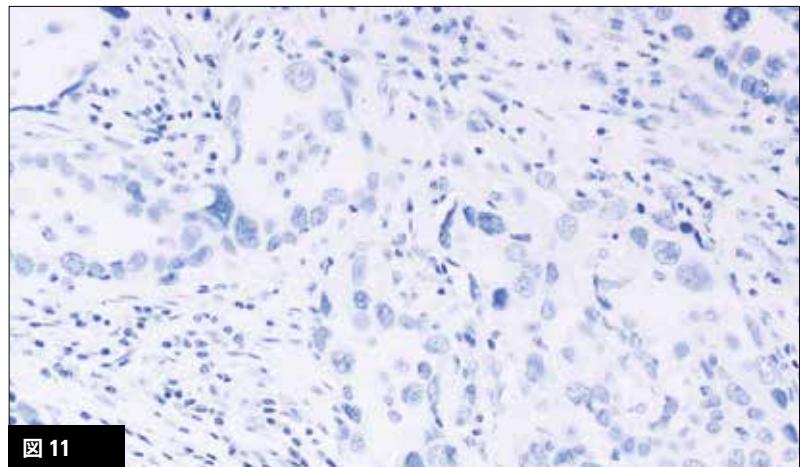


図 11

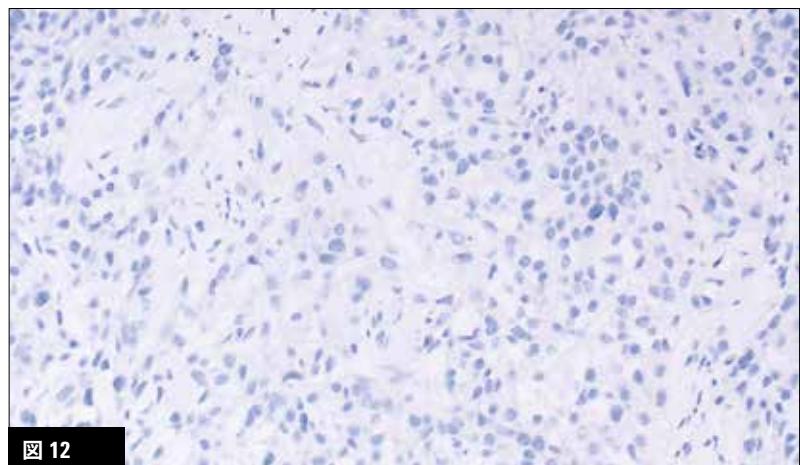


図 12

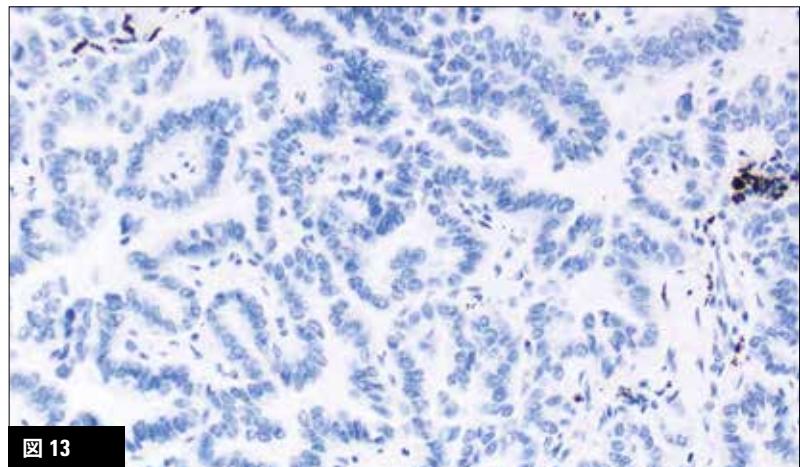


図 13

図 11: PD-L1 発現 1 % 未満
対物レンズ 20x

図 12: PD-L1 発現 1 % 未満
対物レンズ 20x

図 13: PD-L1 発現 1 % 未満
対物レンズ 20x

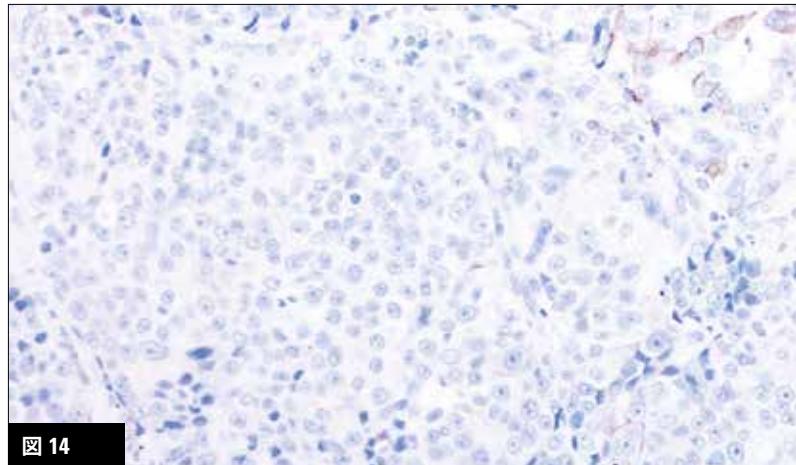


図 14

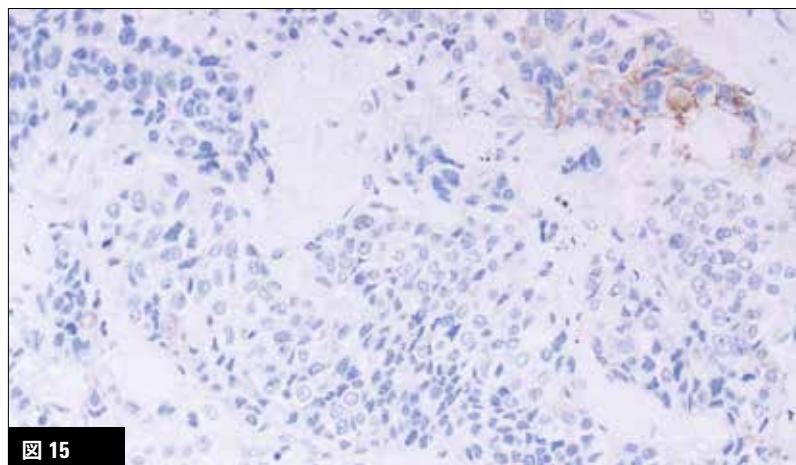


図 15

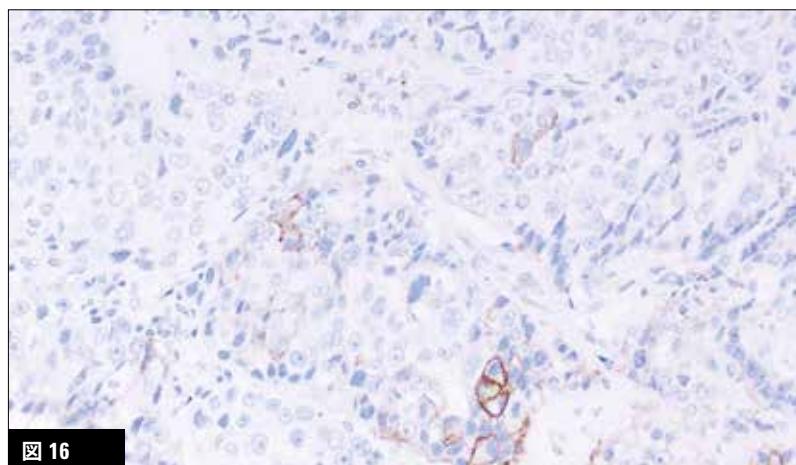


図 16

図 14: PD-L1 発現 1 % 以上
対物レンズ 20x

図 15: PD-L1 発現 1 % 以上
対物レンズ 20x

図 16: PD-L1 発現 1 % 以上
対物レンズ 20x

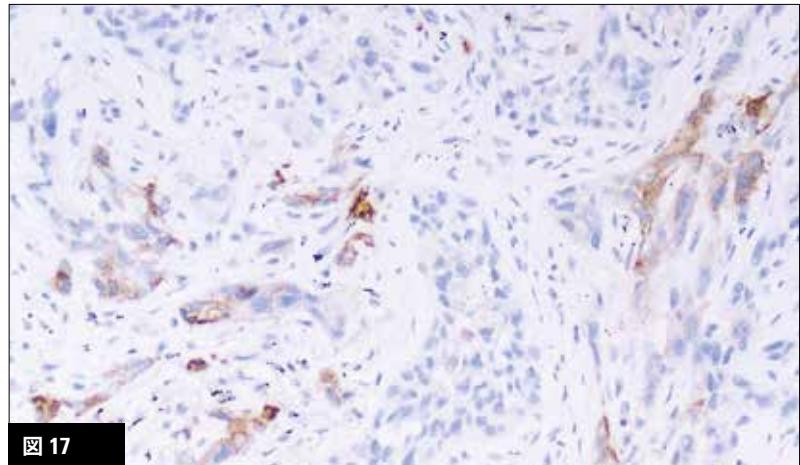


図 17

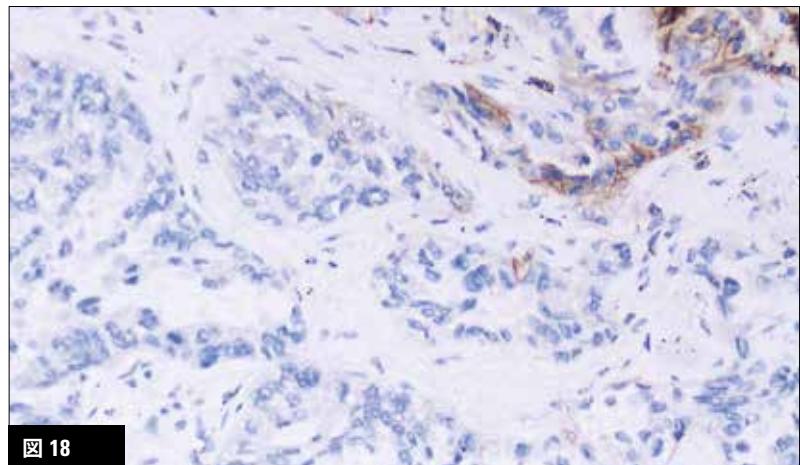


図 18

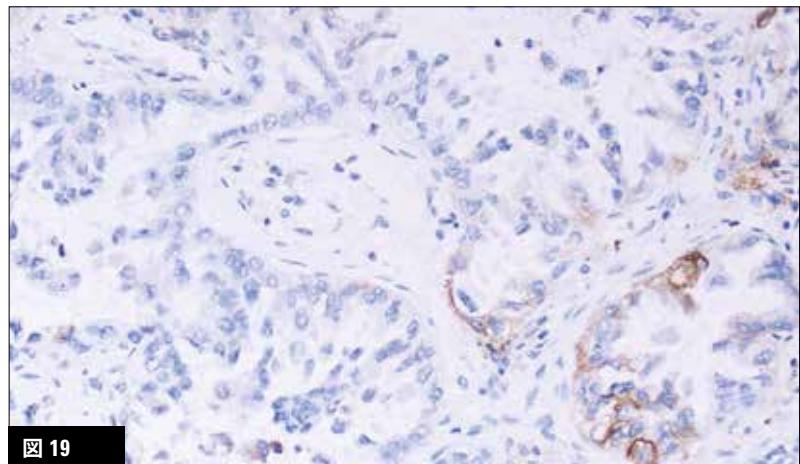


図 19

図 17: PD-L1 発現 5 % 以上
対物レンズ 20x

図 18: PD-L1 発現 5 % 以上
対物レンズ 20x

図 19: PD-L1 発現 5 % 以上
対物レンズ 20x

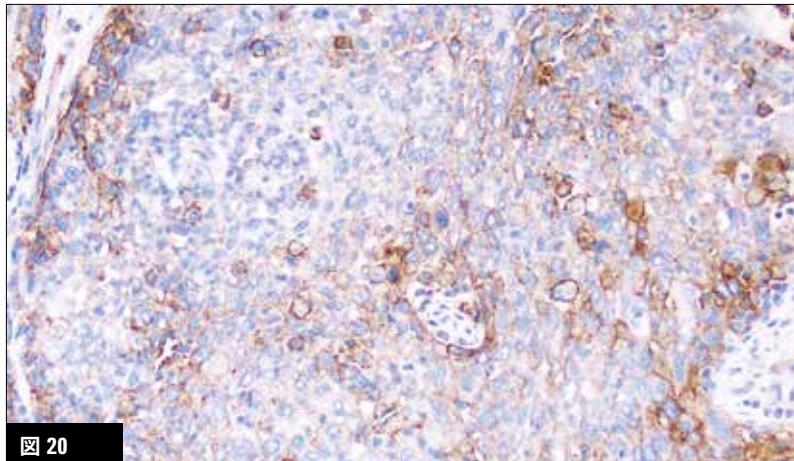


図 20

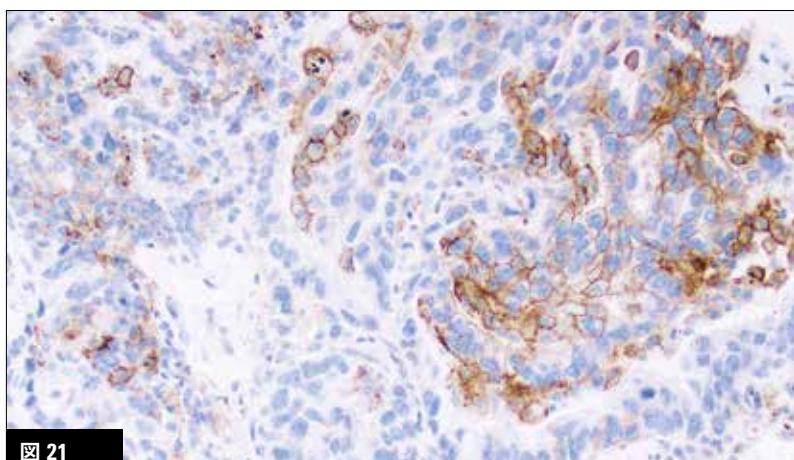


図 21

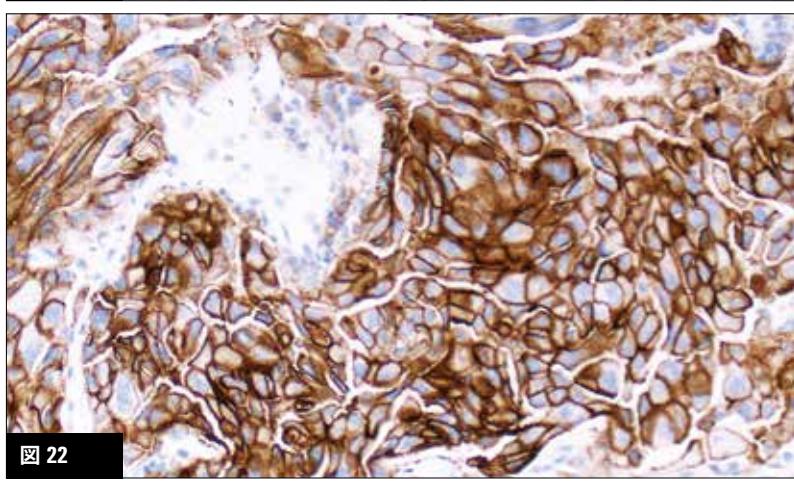


図 22

図 20: PD-L1 発現 10 % 以上
対物レンズ 20x

図 21: PD-L1 発現 10 % 以上
対物レンズ 20x

図 22: PD-L1 発現 10 % 以上
対物レンズ 20x

PD-L1 IHC 28-8 pharmDx「ダコ」 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. スライドが染色されない | 1a. プログラミングエラー | 1a. 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 | 1b. 基質溶液が正しく調製されていることを確認する |
| | 1c. 洗浄液中のアジ化ナトリウム | 1c. ダコ Envision FLEX 洗浄液 (20 x) (コード: 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 | 1d. 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 |
| 2a. 組織検体スライドの染色が弱い | 2a. 不適切な固定方法 | 2a. 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. 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 | 2b. 抗原賦活が不十分 | 2b. ダコ PT Link 上での 3-in-1 処理が正しく実施されていることを確認する |
| 3. スライドのパックグラウンドが過剰に染色されている | 3a. 脱パラフィン不良 | 3a. ダコ PT Link 上での 3-in-1 処理が正しく実施されていることを確認する |
| | 3b. ダコ Autostainer Link 48 へ装填時にスライドが乾燥した。 | 3b. 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?) |
| | 3c. 試薬の非特異吸着 (反応) | 3c. 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 |
| 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. コーティングスライドを使用する |
| | 4b. 不適切な検体処理 | 4b. 薄切した切片を染色前に 58 ± 2 °C のオーブン内で 1 時間ペーリングする |
| 5. 染色が強すぎる | 5a. 不適切な固定方法 | 5a. 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。 |
| | 5b. 不適切な洗浄液を使用 | 5b. 必ずダコ Envision FLEX 洗浄液 (20 x) (コード: K800721-2) を使用しているか確認する |
| 6. 加熱時に抗原賦活液が濁って見える | 6. 抗原賦活液に含まれる成分により、加熱時に試薬が濁る | 6. これは正常な現象で、染色には影響しない |

参考文献

- Clinical and Laboratory Standards Institute (formerly NCCLS). Protection of Laboratory Workers From Occupationally Acquired Infections; Approved Guideline – *Third Edition. CLSI document M29-A3* [ISBN 1-56238-567-4]. Clinical and Laboratory Standards Institute, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087 – 1898 USA, 2000
- Clinical and Laboratory Standards Institute (formerly NCCCLS). Quality assurance for Immunocytochemistry ; Approved guideline. *CLSI document MM4-A (1-56238-396-5)* CLSI, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA; 1999
- 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
- Herman GE, Elfent EA. The taming of immunohistochemistry : the new era of quality control. *Biotech & Histochem* 1991 ; **66** : 194
- Omata M, Liew C-T, Ashcavai M, Peters RL. Nonimmunologic binding of horseradish peroxidase to hepatitis B s surface antigen: a possible source of error in immuno-histochemistry. *Am J Clin Path* 1980 ; **73** : 626
- 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
- Taylor CR, 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
- Wang C, Thudium KB, Han M, Wang X, Huang H, Feingersh D 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

Trusted Answers. Together.



Agilent Pathology Solutions

© Agilent Technologies, Inc. 2016

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2016年12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。
掲載された製品は体外診断用です、それ以外の用途には用いないでください。

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