

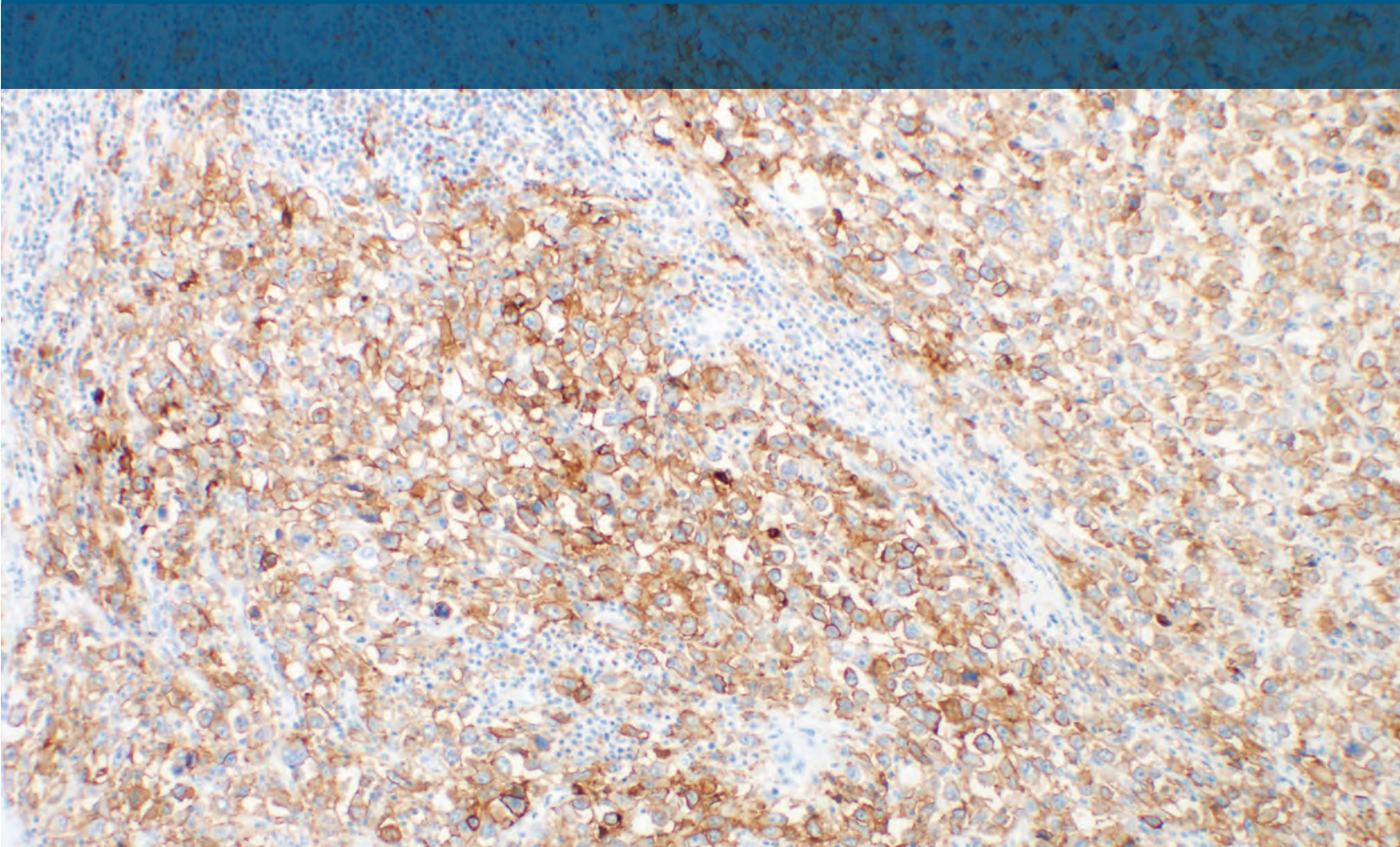
PD-L1 IHC 28-8 pharmDx「ダコ」

染色結果判定マニュアル

悪性黒色腫 (Melanoma)

体外診断用

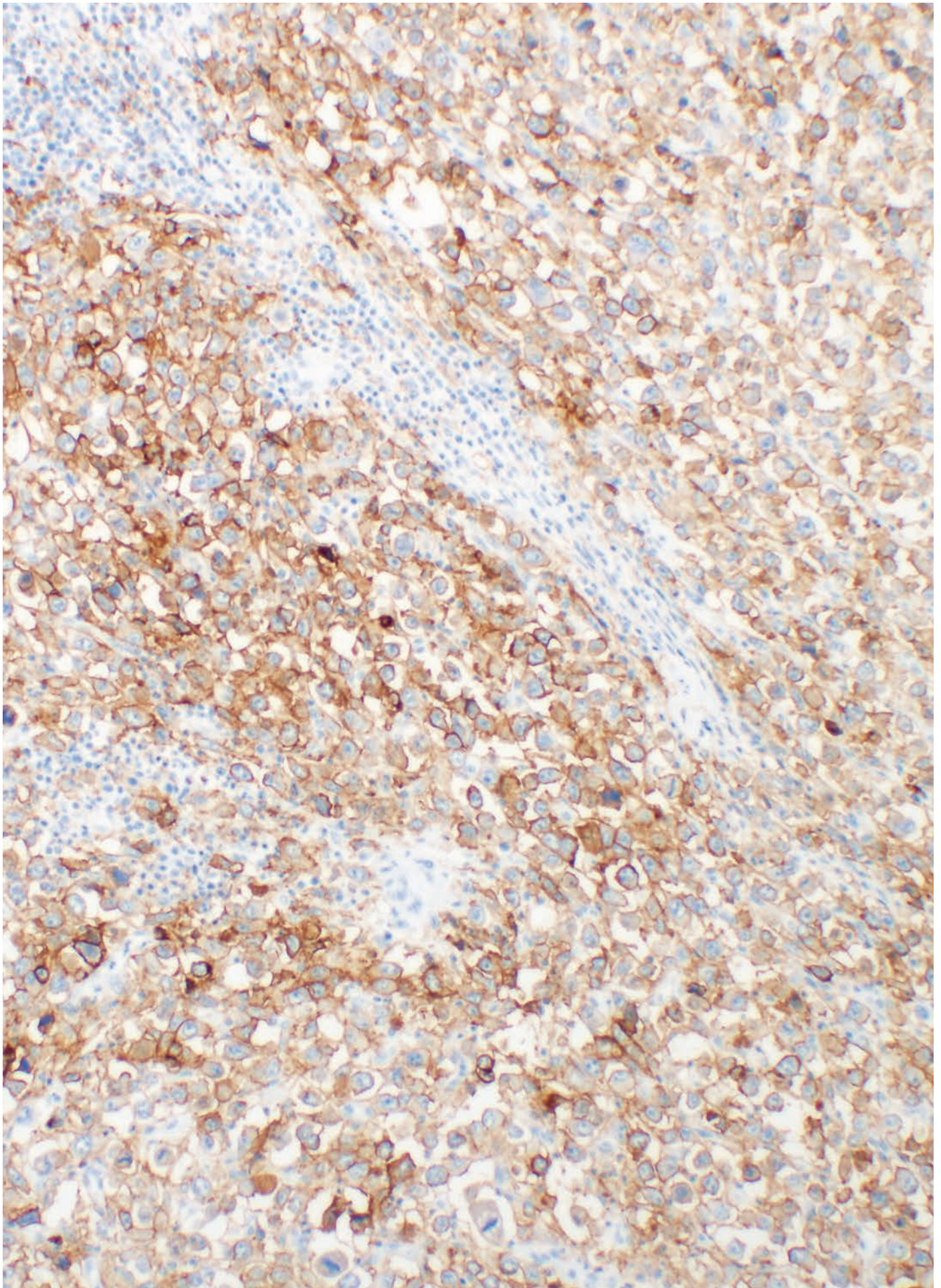
体外診断用医薬品 承認番号: 22800EZ00077000



目次

はじめに	5
悪性黒色腫における体外診断	5
PD-L1 IHC 28-8 pharmDx「ダコ」染色結果判定マニュアルの使用方法	5
CTLA-4 および PD-1/PD-L1 パスウェイの役割	6
悪性黒色腫患者に対する PD-L1 IHC 28-8 pharmDx「ダコ」の臨床試験データ	7
悪性黒色腫におけるPD-L1 IHC 28-8 pharmDx「ダコ」の臨床的価値	8
PD-L1 IHC 28-8 pharmDx「ダコ」の概要	10
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～	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
濃縮抗原賦活液	12
洗浄液	12
基質溶液	13
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、抗原賦活化	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
悪性黒色腫に対する PD-L1 IHC 28-8 pharmDx「ダコ」の結果判定に関する推奨事項	18
H&E 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
悪性黒色腫における PD-L1 IHC 28-8 pharmDx「ダコ」の免疫染色例	21
PD-L1 IHC 28-8 pharmDx「ダコ」では評価が困難な悪性黒色腫の例	24
PD-L1 IHC 28-8 pharmDx「ダコ」トラブルシューティングガイド	29
参考文献	30



PD-L1 の発現率が高い悪性黒色腫 (対物レンズ 20 倍)

はじめに

悪性黒色腫における体外診断

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) を用いて、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、頭頸部癌および悪性黒色腫組織中の 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 の発現率は、強度を問わず完全または部分的に細胞膜が染色される判定可能な腫瘍細胞の割合により判断します。腫瘍細胞の PD-L1 の発現は、特異的な染色により判断します。

使用目的について

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及び頭頸部癌患者におけるニボルマブ (遺伝子組み換え) の適切な投与を行うための補助に用いる。
- 悪性黒色腫患者におけるニボルマブとイピリムマブの併用療法の適切な投与を行うための補助に用いる。

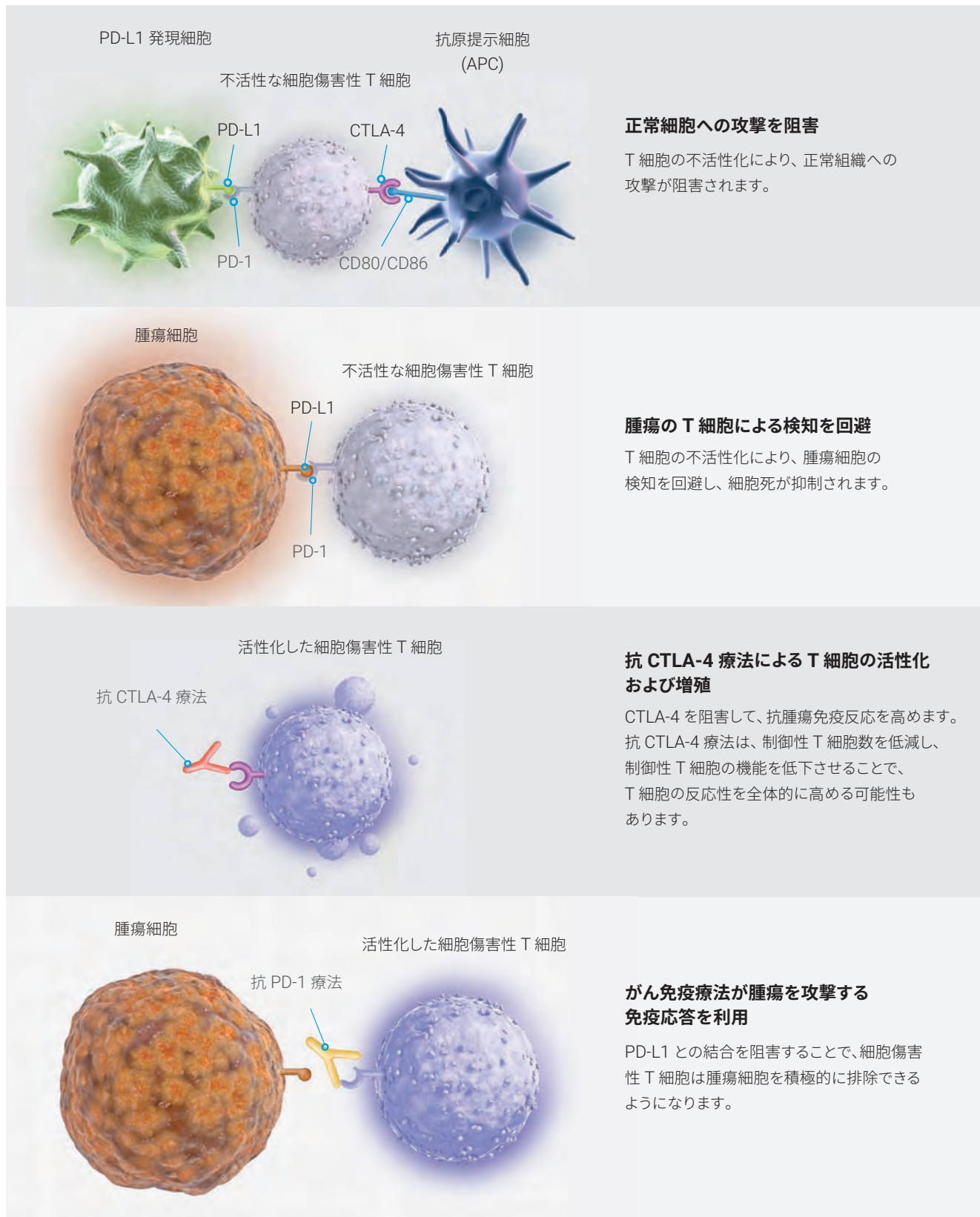
PD-L1 IHC 28-8 pharmDx「ダコ」 染色結果判定マニュアルの使用方法

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お役立ていただくものです。PD-L1 IHC 28-8 pharmDx「ダコ」で染色した悪性黒色腫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」で染色した悪性黒色腫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。

CTLA-4 および PD-1/PD-L1 パスウェイの役割



悪性黒色腫患者に対する PD-L1 IHC 28-8 pharmDx「ダコ」の臨床試験データ

CA209067 (CHECKMATE-067) 試験のデータでは、悪性黒色腫患者におけるニボルマブの単剤療法とニボルマブ + イピリムマブの併用療法による治療効果の程度に関連する可能性のある PD-L1 発現率の測定において、PD-L1 IHC 28-8 pharmDx「ダコ」の臨床的有用性が実証されました。

世界保健機構によれば、世界中で年間約 23.2 万人が新たに悪性黒色腫と診断されています¹。日本では年間約 1370 人が新たに悪性黒色腫と診断され、約 690 人が死亡しています。悪性黒色腫はすべてのがんの約 2 %をしめており、4 人に 1 人が死に至っています¹。日本における悪性黒色腫の罹患率は低いものの²、進行性悪性黒色腫患者の予後は良くありません。

PD-L1 IHC 28-8 pharmDx「ダコ」は、臨床試験 CHECKMATE-067 (治療歴のない転移性悪性黒色腫患者に対するニボルマブの単剤療法またはニボルマブとイピリムマブとの併用療法をイピリムマブの単剤療法と比較する無作為化第III相二重盲検比較臨床試験) の登録患者の検体を用いて評価されました。

21 カ国の 137 施設において合計 1296 人の患者が登録されました。登録患者 1296 人のうち 945 人が 1:1:1 の割合で 3 つの治療群に無作為化し、PD-L1 の発現率で層別されました。悪性黒色腫患者から採取した腫瘍検体 (試験開始前のベースライン) のうち 86 %は、転移部位から採取したものでした。検討した患者のうち 843 人 (89 %) で PD-L1 発現率を測定しました。腫瘍のPD-L1 発現率が 1 % 以上と 1 % 未満の患者の割合は、治療

群間で均衡していました。PD-L1 IHC 28-8 pharmDx「ダコ」で評価された CHECKMATE-067 試験で検討した患者検体の PD-L1 発現率を表 1 に示します。

試験デザイン

- CHECKMATE-067 試験では、治療歴のない転移性悪性黒色腫患者に対する、ニボルマブ単剤療法またはニボルマブとイピリムマブとの併用療法のいずれかをイピリムマブ単剤療法と比較しました。
- 事前に計画した、PD-L1 発現率からみた腫瘍検体に対する有効性のレトロスペクティブ分析が行われました。

表 1. 悪性黒色腫を有する無作為化した被験者全体の腫瘍 PD-L1 発現率: CHECKMATE-067

PD-L1 定量可能な検体数*	ニボルマブ投与群 N = 288	ニボルマブ + イピリムマブ投与群 N = 278	イピリムマブ投与群 N = 277	合計 N = 843
PD-L1 発現率 1 % 未満 被験者数 (%)	117 (40.6)	123 (44.2)	113 (40.8)	353 (41.9)
PD-L1 発現率 1 % 以上 被験者数 (%)	171 (59.4)	155 (55.8)	164 (59.2)	490 (58.1)

*PD-L1 の定量可能検体数のみで、判定不可検体は含みません。

悪性黒色腫における PD-L1 IHC 28-8 pharmDx「ダコ」の臨床的価値

PD-L1 IHC 28-8 pharmDx「ダコ」検査により第 III 相臨床試験 (CHECKMATE-067) の臨床結果が示されました。

- － ニボルマブとイピリムマブとの併用療法またはニボルマブ単剤療法では、イピリムマブ単剤療法と比較して、PD-L1 の発現に関係なく全生存期間 (OS) が改善されることが示されました。
- － ニボルマブ単剤療法とニボルマブとイピリムマブとの併用療法を比較した CHECKMATE-067 試験のデータは、予備解析から得ました。
- － 腫瘍細胞における PD-L1 発現率が 1 % 未満の悪性黒色腫患者については、ニボルマブとイピリムマブとの併用療法の方が、ニボルマブ単剤療法と比較して全生存期間 (OS) が**数値的に**改善されました。

CA209067 (CHECKMATE-067) 試験により、PD-L1 発現率を測定することによる PD-L1 IHC 28-8 pharmDx「ダコ」の臨床的有用性が示されました。全生存期間 (OS) に対する、ニボルマブおよびイピリムマブの併用療法の有効性の程度は、PD-L1 IHC 28-8 pharmDx「ダコ」で測定した腫瘍細胞の PD-L1 発現率に関連している事が示されました。

CHECKMATE-067 試験では、事前に計画した PD-L1 発現率に基づく有効性のレトロスペクティブ分析が行われました。3 治療群すべての PD-L1 サブグループにおいて、全生存期間 (OS) を評価しました。PD-L1 発現率別の OS ハザード比 (HR) および OS 中央値を表 2 に示します。

表 2. 無作為化した悪性黒色腫を有する全被験者における PD-L1 発現率および治療群による全生存期間の要約 – CHECKMATE-067 試験

PD-L1 発現率	ニボルマブ投与群 OS 中央値 (95 % CI)	イビリムマブ投与群 OS 中央値 (95 % CI)	ハザード比 (95 % CI) ^a
1 % 未満	23.46 (13.01, NR)	18.56 (13.67, 23.20)	0.80 (0.57, 1.12)
1 % 以上	NR (NR)	22.11 (17.08, 29.67)	0.52 (0.38, 0.71)

PD-L1 発現率	ニボルマブ + イビリムマブ投与群 OS 中央値 (95 % CI)	イビリムマブ投与群 OS 中央値 (95 % CI)	ハザード比 (95 % CI) ^a
1 % 未満	NR (26.45, NR)	18.56 (13.67, 23.20)	0.60 (0.42, 0.84)
1 % 以上	NR (NR)	22.11 (17.08, 29.67)	0.53 (0.38, 0.74)

PD-L1 発現率 (予備解析)	ニボルマブ + イビリムマブ投与群 OS 中央値 (95 % CI)	ニボルマブ投与群 OS 中央値 (95 % CI)	ハザード比 (95 % CI) ^a
1 % 未満	NR (26.45, NR)	23.46 (13.01, NR)	0.74 (0.52, 1.06)
1 % 以上	NR (NR)	NR (NR)	1.03 (0.72, 1.48)

^a 治療有効性のハザード比は、治療方法、PD-L1 発現率、PD-L1 発現率別の治療方法を用いた Cox 比例ハザードモデルに基づいて算出。

略語: CI = 信頼区間、NR = 未到達、OS = 全生存期間

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 と PT Link 前処理システムを用いて FFPE 組織切片の IHC 染色手順を完了するために必要な、最適化された試薬とプロトコ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 (NCR) 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パーオキシダーゼ (HRP) 分子を結合させたポリマー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、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。

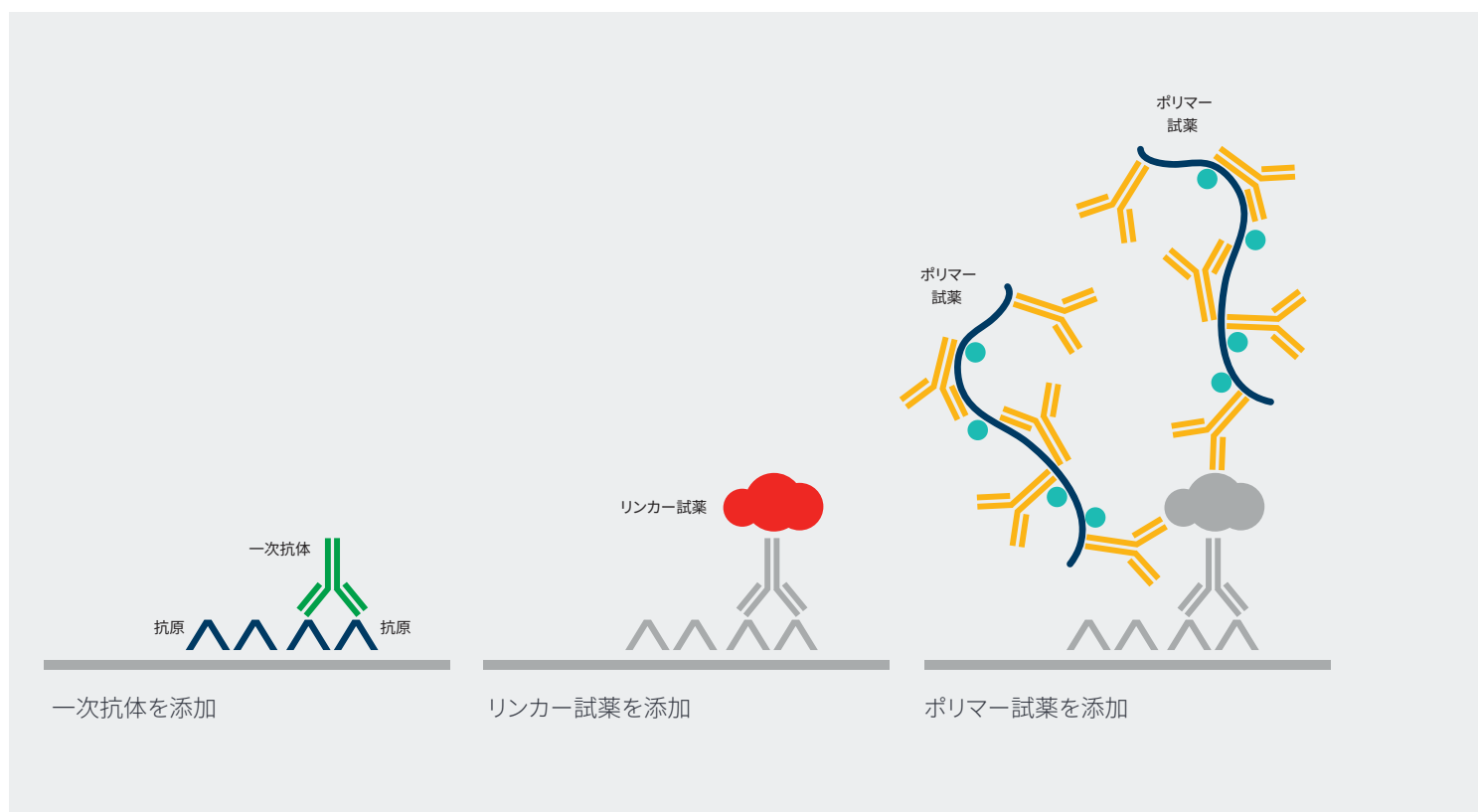


図 1. PD-L1 IHC 28-8 pharmDx「ダコ」の染色手順

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

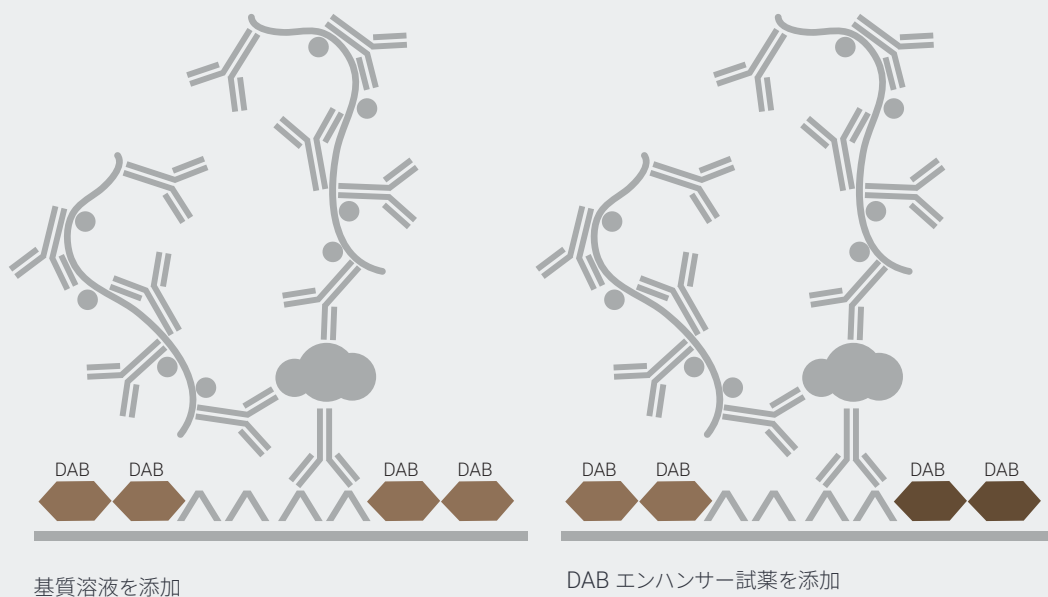
この他、ダコ Envision FLEX 洗浄液 (20 x) (型番: K800721-2) および ダコ EnVision FLEX ヘマトキシリン (AutostainerLink 用) (型番: K800821-2) が別途必要です (キットには含まれません)。

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」の試薬はすべて、ダコ Autostainer Link 48 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よぼすいくつかの技術的な要因は、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ません。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に起因します。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、新鮮な悪性黒色腫検体から選択してください。患者検体と同じ方法で固定、包埋します。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 PD-L1 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。最適な悪性黒色腫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された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てください。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、脱灰された組織の使用は推奨していません。組織検体は 4 ～ 5 μ m 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 \pm 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 か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。

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 つ分に当たる 1.5 L 分が調製できます。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 \pm 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。希釈後未使用の洗浄液は 2 ～ 8 °C で保管し、1 か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。基質緩衝液のボトルラベルには 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てください。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。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 本品中のコントロールスライド 1 枚
- 陽性コントロール組織スライド 2 枚 (一次抗体または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)
- 陰性コントロール組織スライド 2 枚 (一次抗体または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。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、抗原賦活化

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-in-1 処理で行います。

- 「Preheat and Cool」(予熱および冷却温度) 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、濃縮抗原賦活液を 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 スライドラックを 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、65 °C まで冷却されたら、PT Link のタンクから Autostainer 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 (室温) 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 スライドラックをダコ Autostainer Link 48 にセットします。この際、染色開始前にスライド表面が乾燥することがないように、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 7 分間染色します。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 溶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 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 ☐

悪性黒色腫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 に薄切し、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 か月以内かつ暗所で 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？ (希釈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) はい ☐ いいえ ☐

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 ☐

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、および抗原賦活化を 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ガイドラインに従い、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。

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陽性腫瘍細胞の割合から、PD-L1 IHC 28-8 pharmDx「ダコ」の染色結果を判定します。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。

悪性黒色腫患者の検体の結果を判定する際、褐色のメラニン沈着がみられる場合があります。細胞膜染色のスコアリング時には、メラニンを除外する必要があります。NCR で染色した次のスライドとの比較が、メラニンを確認して除外するのに有用です。腫瘍細胞の細胞膜染色スコアリングを妨げるほどメラニンが大幅に増加している場合は、その検体は染色結果から除外し判定不可とみなします。

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。

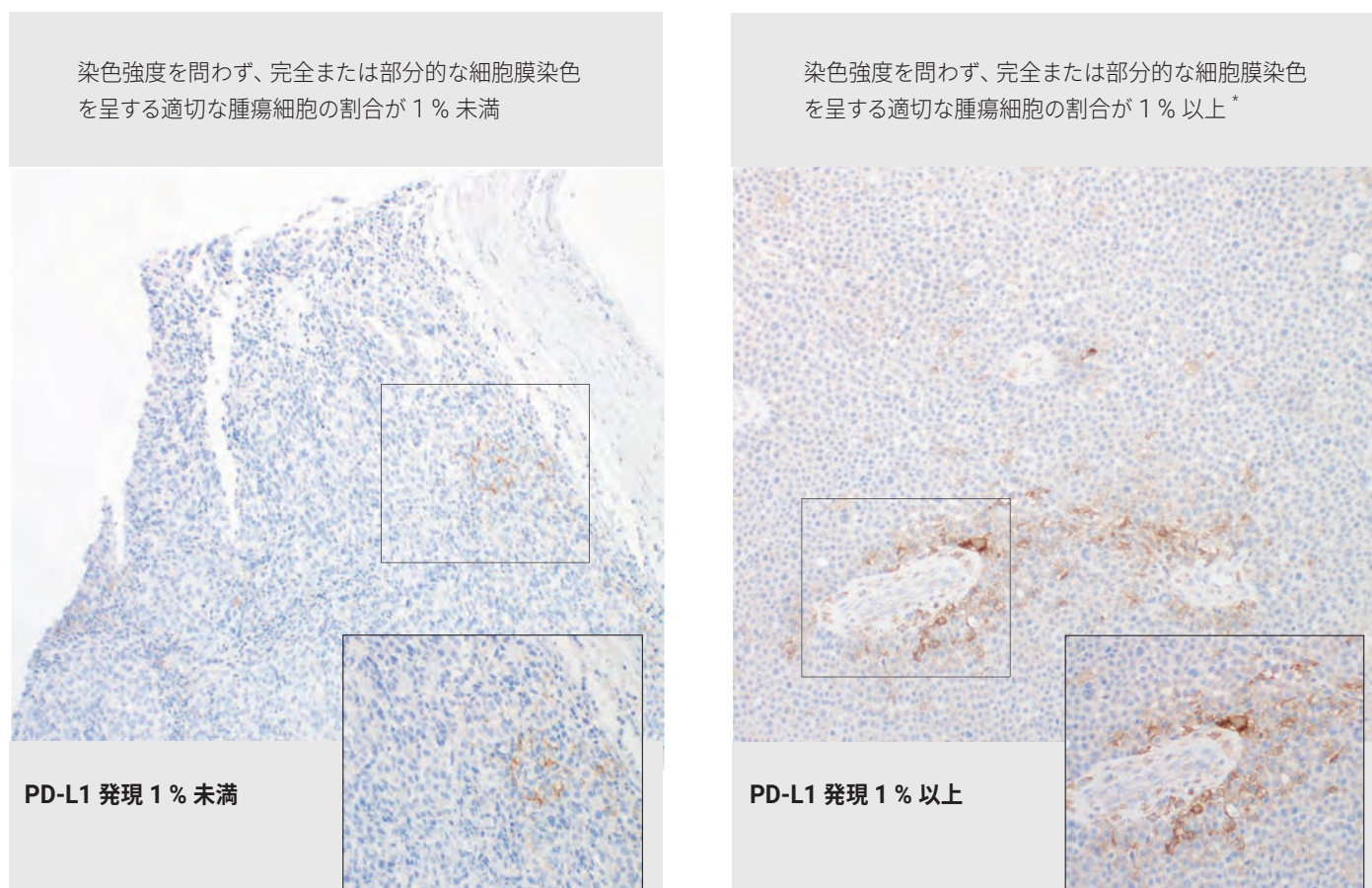


図 3. PD-L1 IHC 28-8 pharmDx「ダコ」の染色結果のスコアリングおよび報告に関するガイドライン

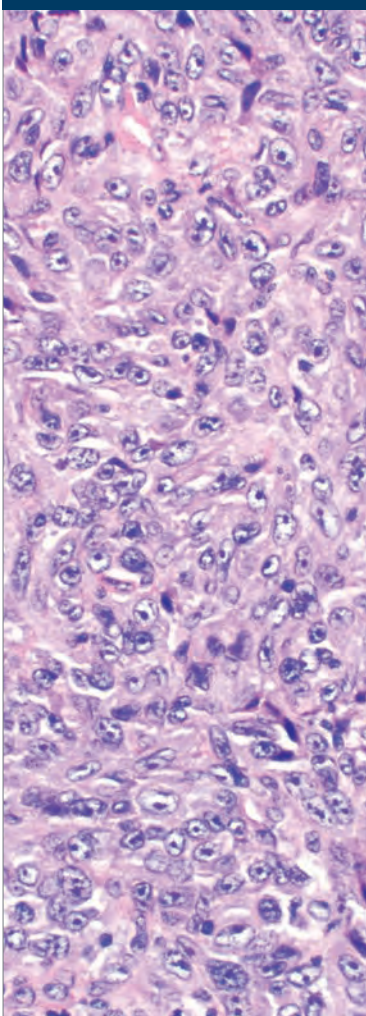
* 悪性黒色腫の検体画像は、Centre Hospitalier Universitaire (CHU) de Nice (ニース大学医学部、フランス、ニース) より提供。
Trans-Hit Biomarkers 社による承認済み。

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。

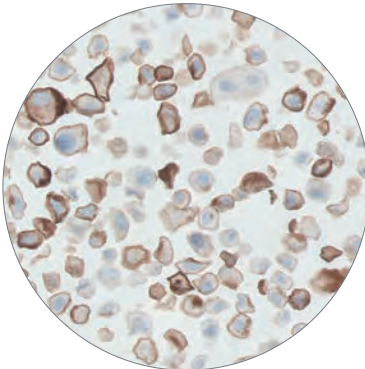
1
H&E で染色した組織検体
組織構造と細胞形態の保存状態を確認

条件を満たす

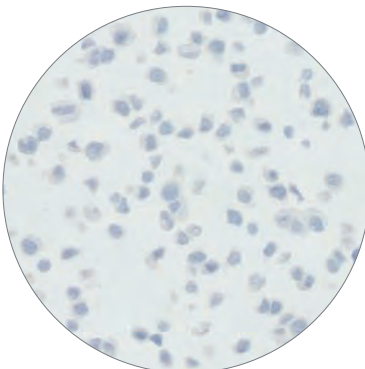


2
PD-L1 IHC 28-8 pharmDx「ダコ」
コントロールスライド
一次抗体で染色

条件を満たす



PD-L1 陽性対照のコントロール



PD-L1 陰性対照のコントロール

3A
陽性対照のコントロール組織
一次抗体で染色

条件を満たす



3B
陽性対照のコントロール組織
一次抗体陰性コントロールで染色

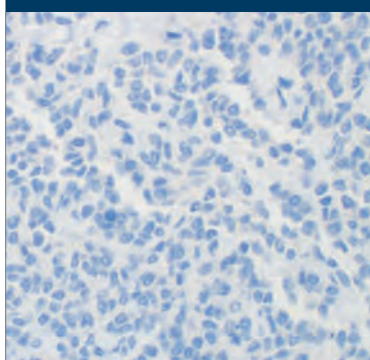
条件を満たす



4A

陰性対照のコントロール組織*
一次抗体で染色

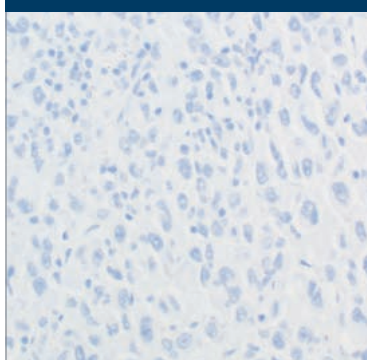
条件を満たす



5

組織検体*
一次抗体陰性コントロールで染色

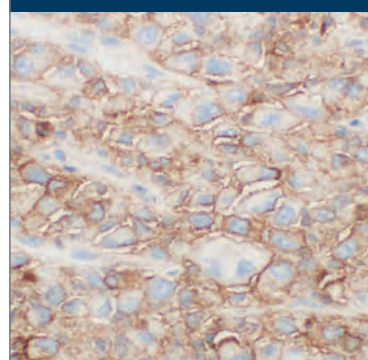
条件を満たす



6

組織検体*
一次抗体で染色

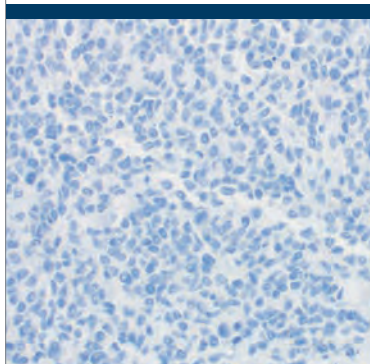
条件を満たす



4B

陰性対照のコントロール組織*
一次抗体陰性コントロールで染色

条件を満たす



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としてスコアリングする。
- 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
- メラニン

* 組織検体は Asterand Bioscience より提供

悪性黒色腫に対する 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 H&E 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。H&E 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、強度を問わず完全または部分的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、細胞株 2 種類を貼付した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. H&E 染色した組織検体

組織構造および保存状態は、H&E 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、H&E 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。

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。

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 % 以上の細胞の細胞膜が平均染色強度 2+ 以上で染色を認める
- バックグラウンド染色が強度 1+ 未満に抑えられている

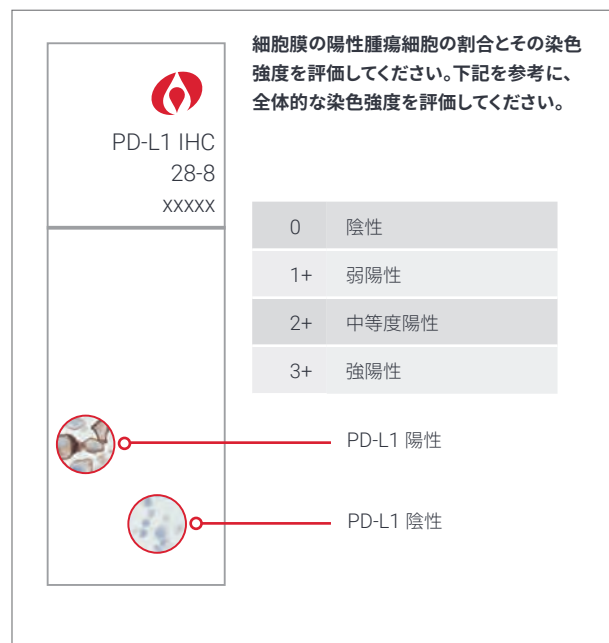


図 4. 本品中に含まれる各コントロールスライドには、PD-L1 発現が陽性および陰性の細胞の切片が含まれています。

本品中のコントロールスライドの PD-L1 陰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 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も、条件を満たすものと判断します。

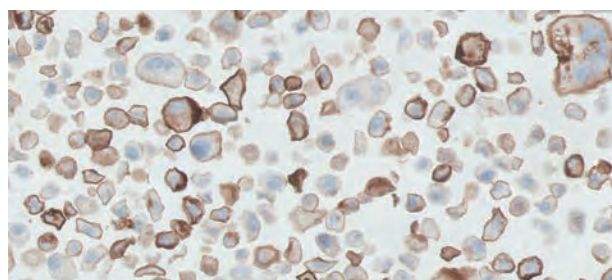


図 5. 条件を満たす染色性を示す陽性 PD-L1 コントロール

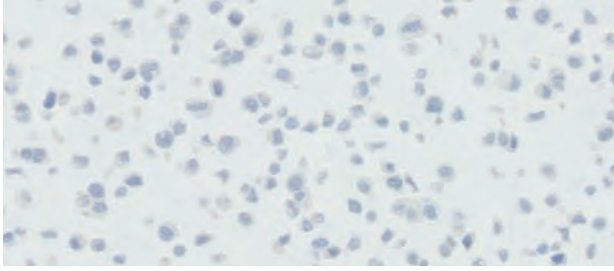


図 6. 条件を満たす染色性を示す陰性 PD-L1 コントロール

3. 陽性対照のコントロール組織スライド

悪性黒色腫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 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いでください。

4. 陰性対照のコントロール組織スライド

悪性黒色腫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一次抗体陰性コントロールで染色したスライド 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に特異的な細胞膜染色が認められた場合は、組織検体の結果を無効とみなします。

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す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標本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、非特異的バックグラウンド染色およびメラニンの含有を確認します。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しめさず、非特異的な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みなします。

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、メラニンおよび正常細胞も除外します。
- 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。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、PD-L1 陽性と判断されます。
- 3 検体の腫瘍 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。

$$\text{PD-L1 発現率} = \frac{\text{PD-L1 陽性の細胞膜染色を示した腫瘍細胞数}}{\text{切片内の腫瘍細胞の総数}} \times 100$$

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」の評価用には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または多数のメラニン色素は、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

悪性黒色腫に対する 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 <input type="checkbox"/>	不合格 <input type="checkbox"/>
陽性対照のコントロール組織スライド	合格 <input type="checkbox"/>	不合格 <input type="checkbox"/>
陰性対照のコントロール組織スライド	合格 <input type="checkbox"/>	不合格 <input type="checkbox"/>
組織検体、一次抗体陰性コントロール組織スライド	合格 <input type="checkbox"/>	不合格 <input type="checkbox"/>

PD-L1 染色結果:PD-L1 の発現が陰性とは、PD-L1 IHC 28-8 pharmDx「ダコ」での測定をもとに、悪性黒色腫腫瘍細胞の PD-L1 発現率が 1 % 未満の場合をいいます。

腫瘍細胞の存在 ☐ 100 細胞以上 ☐ 不適正

☐ PD-L1 発現率が 1 % 未満:

完全または部分的な PD-L1 の細胞膜染色がみられた悪性黒色腫細胞の割合が 1 % 未満

☐ PD-L1 発現率が 1 % 以上:

完全または部分的な PD-L1 の細胞膜染色がみられた悪性黒色腫細胞の割合が 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 _____

悪性黒色腫における 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」で染色された悪性黒色腫腫瘍検体の例を表しています。

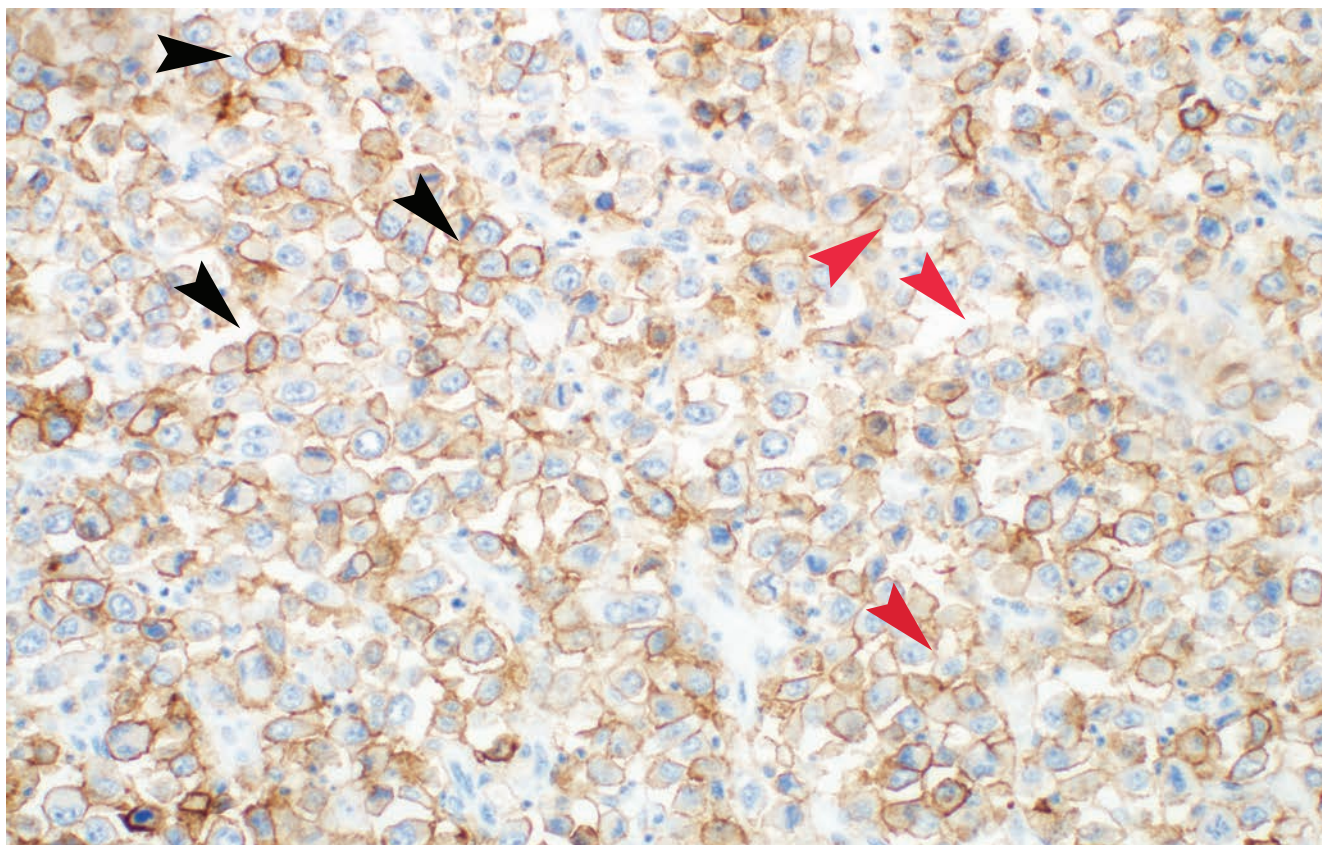


図 7. PD-L1 IHC 28-8 pharmDx「ダコ」による悪性黒色腫の染色例

ここではさまざまな 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)

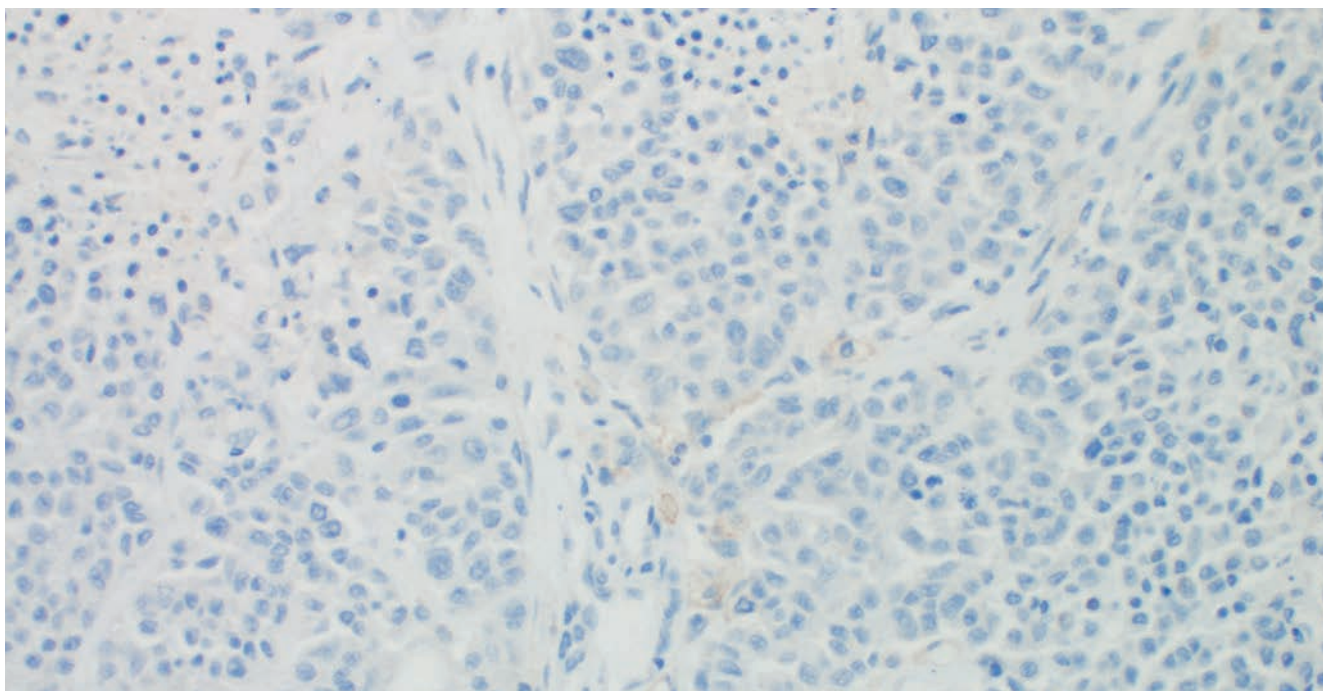


図 8. 悪性黒色腫
PD-L1 発現 1 % 未満 (対物レンズ 20 倍) **

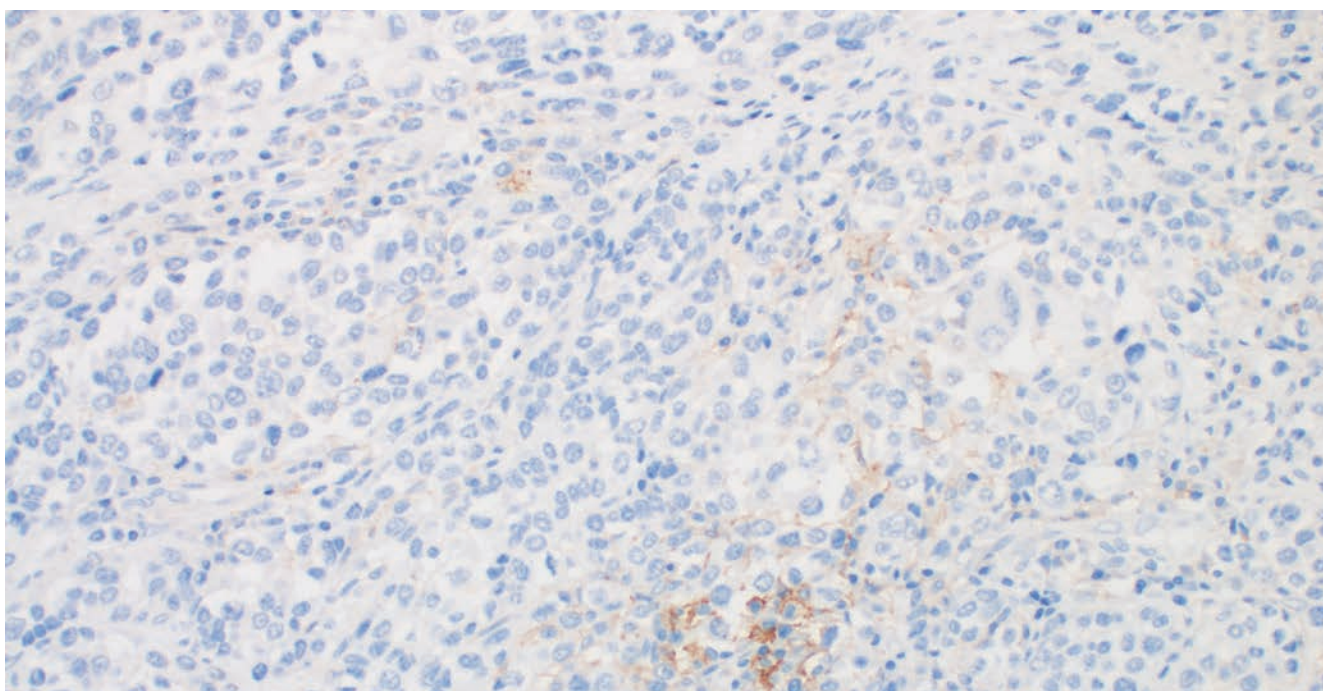


図 9. 悪性黒色腫
PD-L1 発現 1 % 以上 (対物レンズ 20 倍) *

* 組織検体は Asterand Bioscience より提供

** 組織検体は TransHit Biomarkers より提供

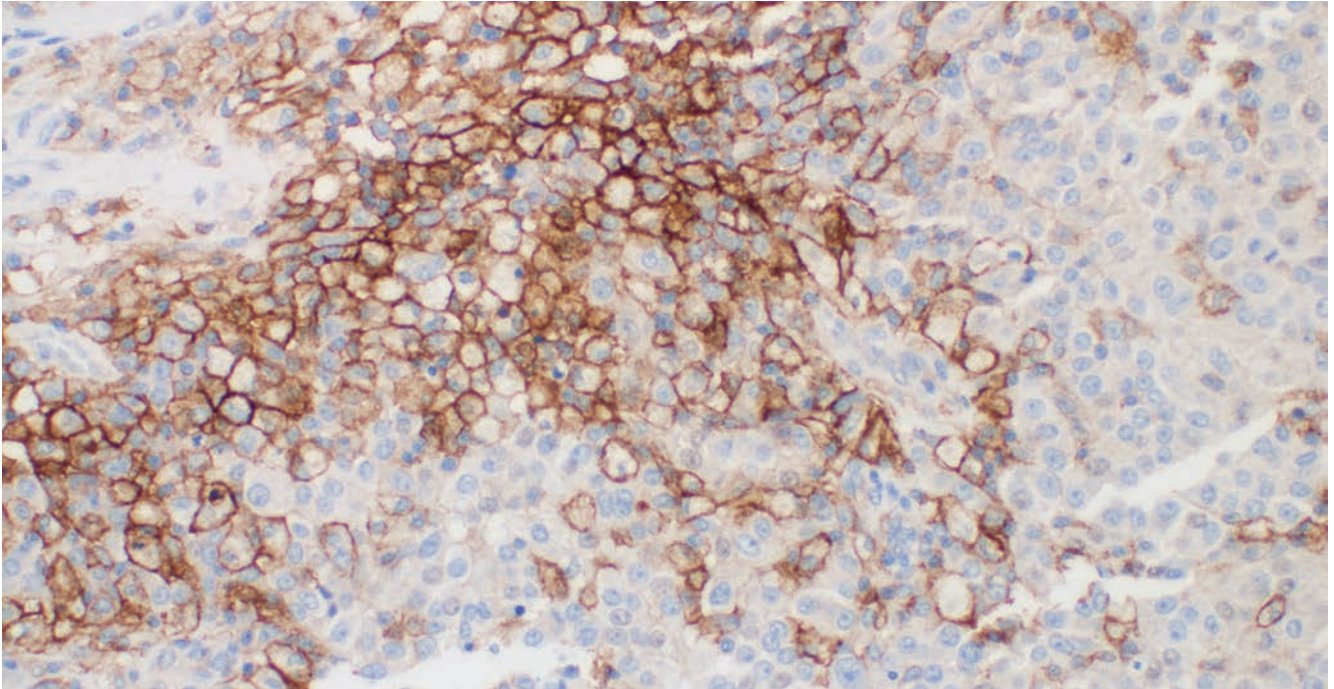


図 10. 中等度から強度に PD-L1 の発現が高い悪性黒色腫 (対物レンズ 20 倍)*

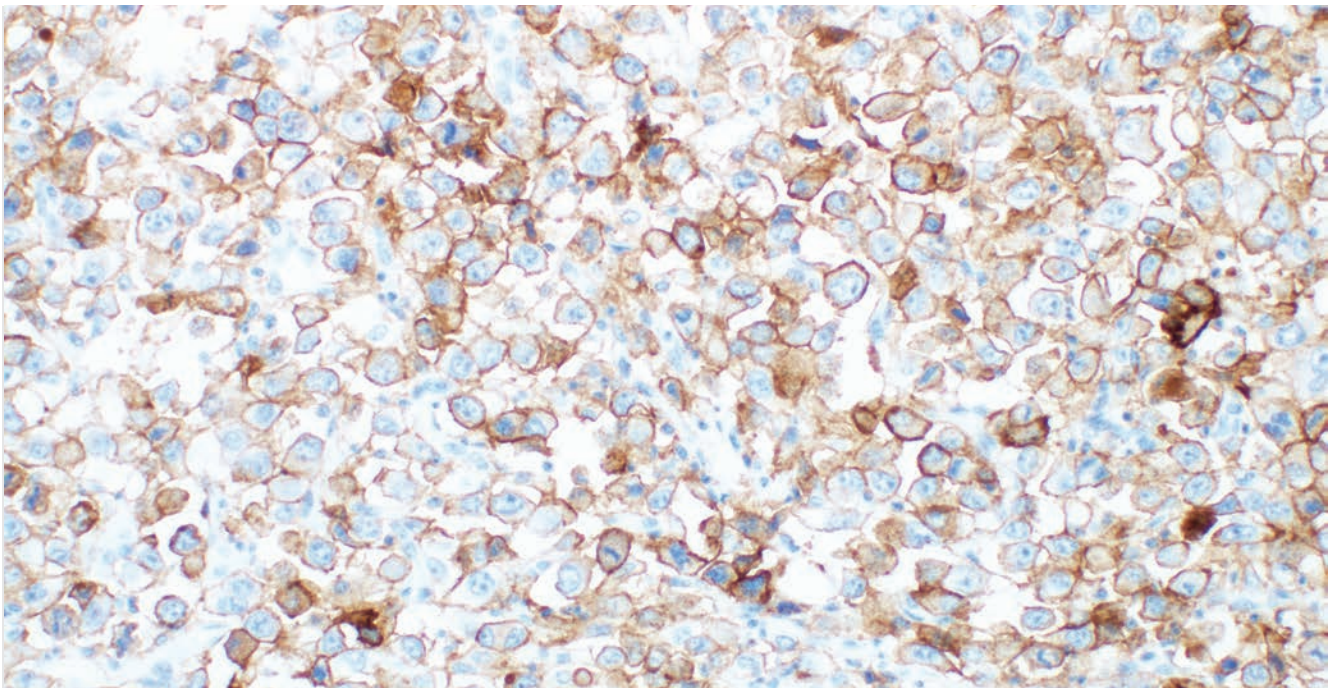


図 11. PD-L1 の発現率 1 % 以上の悪性黒色腫 (対物レンズ 20 倍)

PD-L1 IHC 28-8 pharmDx「ダコ」では 評価が困難な悪性黒色腫の例

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

陰性試験検体の非特異的バックグラウンド染色により、陽性試験検体のバックグラウンド染色状態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+ 以下である必要があります。

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。

メラニン

メラニンの存在は腫瘍細胞の細胞膜染色のスコアリングを妨害する場合があります。メラニンの含有量が増えると、スコアリングが妨げられて検体を判定できなくなる場合があります。

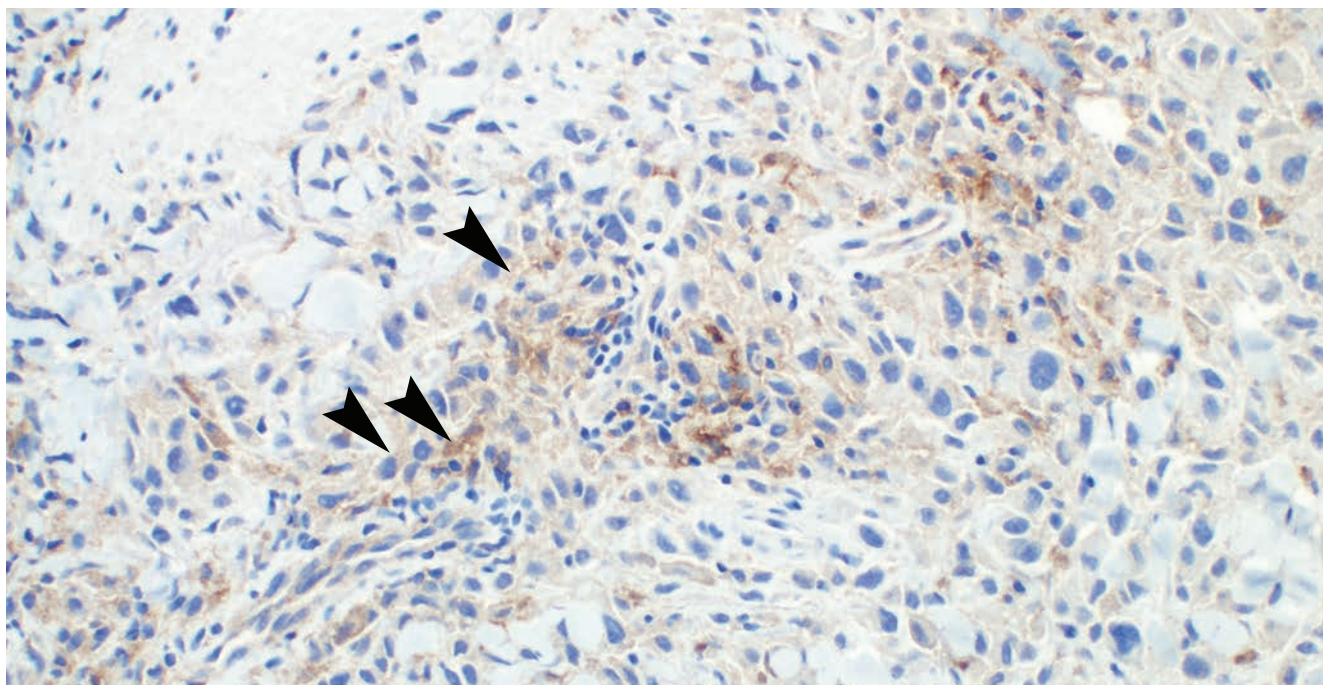


図 12. 悪性黒色腫

黒矢印は、顆粒状の細胞質染色のある腫瘍細胞を示します。細胞質染色は陽性とはみなしません。細胞膜染色のみを陽性とみなします。(対物レンズ 20 倍) *

* 組織検体は Asterand Bioscience より提供

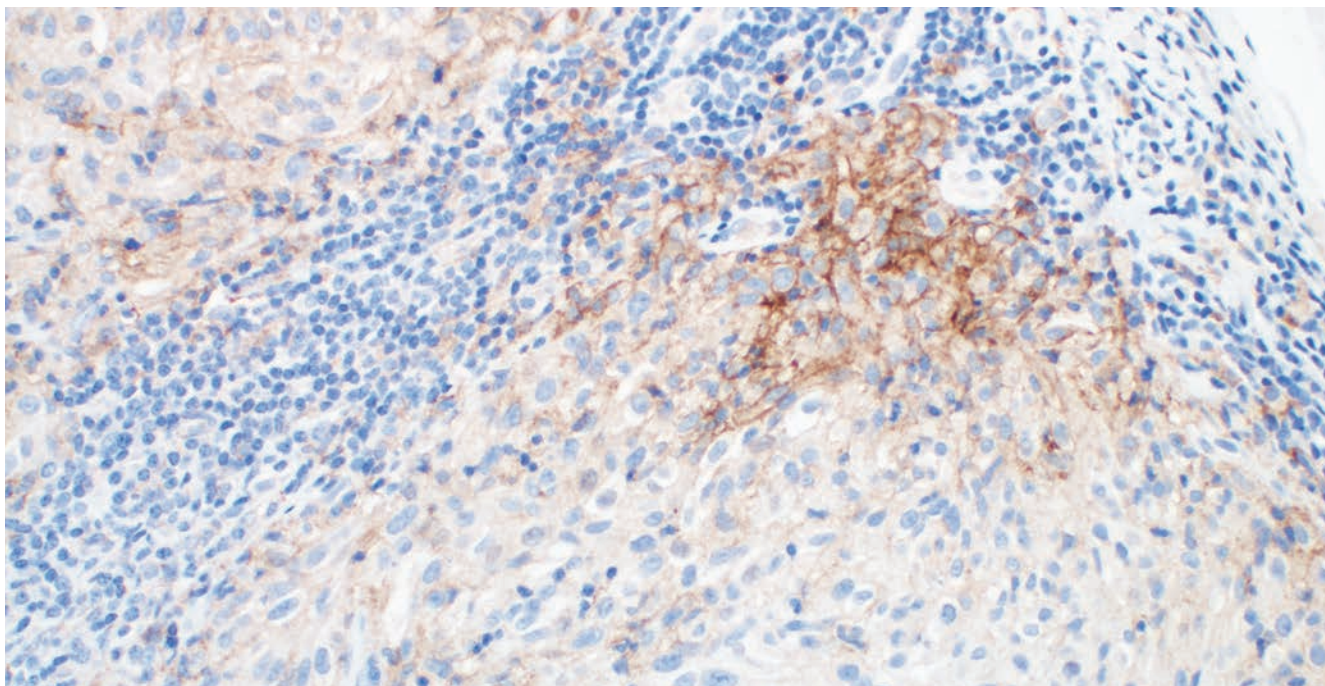


図 13. 悪性黒色腫
腫瘍の細胞膜染色が認められ、細胞質染色から鑑別することが可能です。(対物レンズ 20 倍)

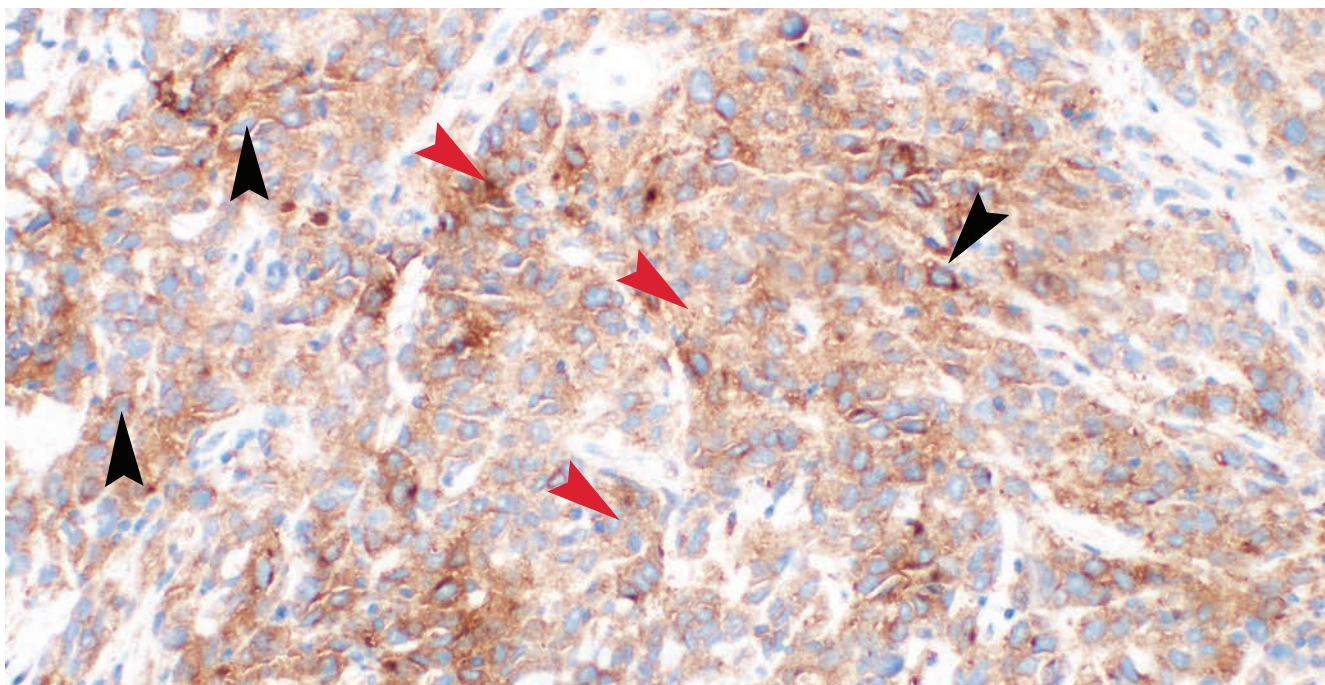


図 14. 悪性黒色腫
過剰な細胞質染色がスコアリングを妨害する場合には、その測定は判定不可とみなす場合があります。
腫瘍の細胞膜染色が認められますが (黒矢印)、検体の多くの部分で細胞質が過剰に染色されています (赤矢印)。(対物レンズ 20 倍)*

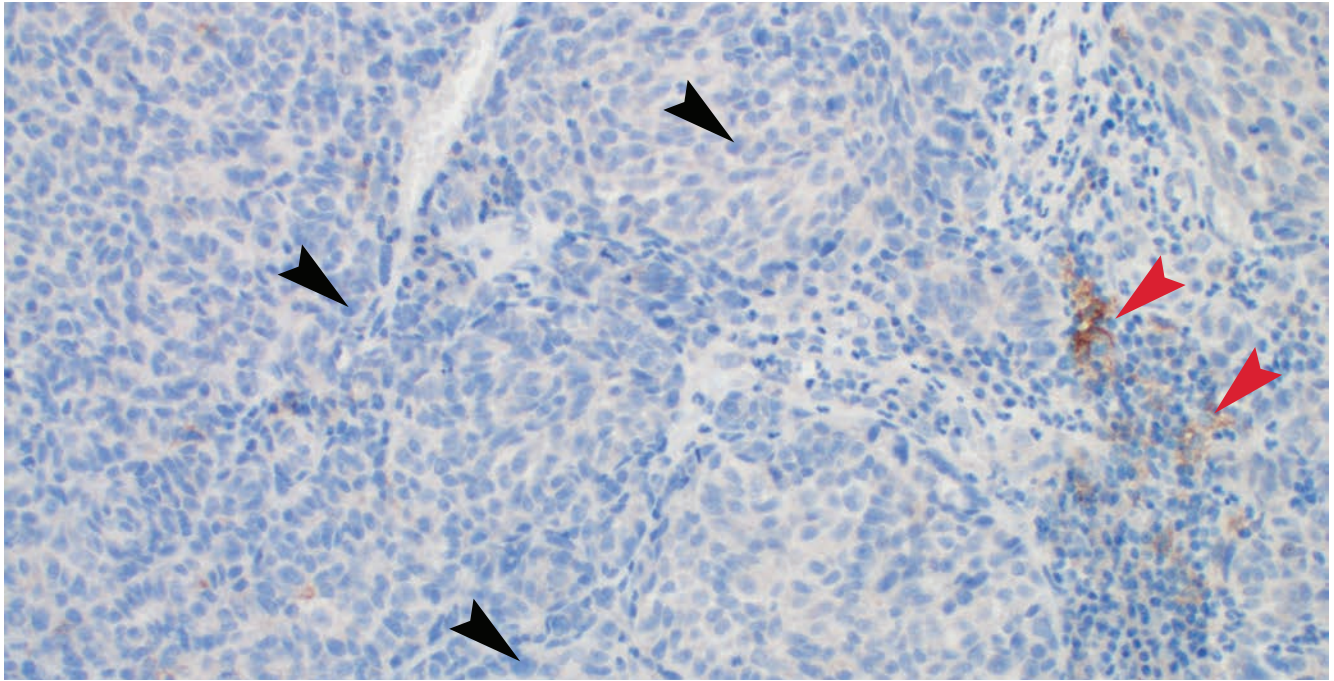


図 15. 悪性黒色腫は腫瘍関連免疫細胞に PD-L1 陽性染色を示し (赤矢印)、腫瘍細胞ではPD-L1 陰性です (黒矢印)。
染色された免疫細胞は、PD-L1 陽性スコア判定の対象外です。(対物レンズ 20 倍) *

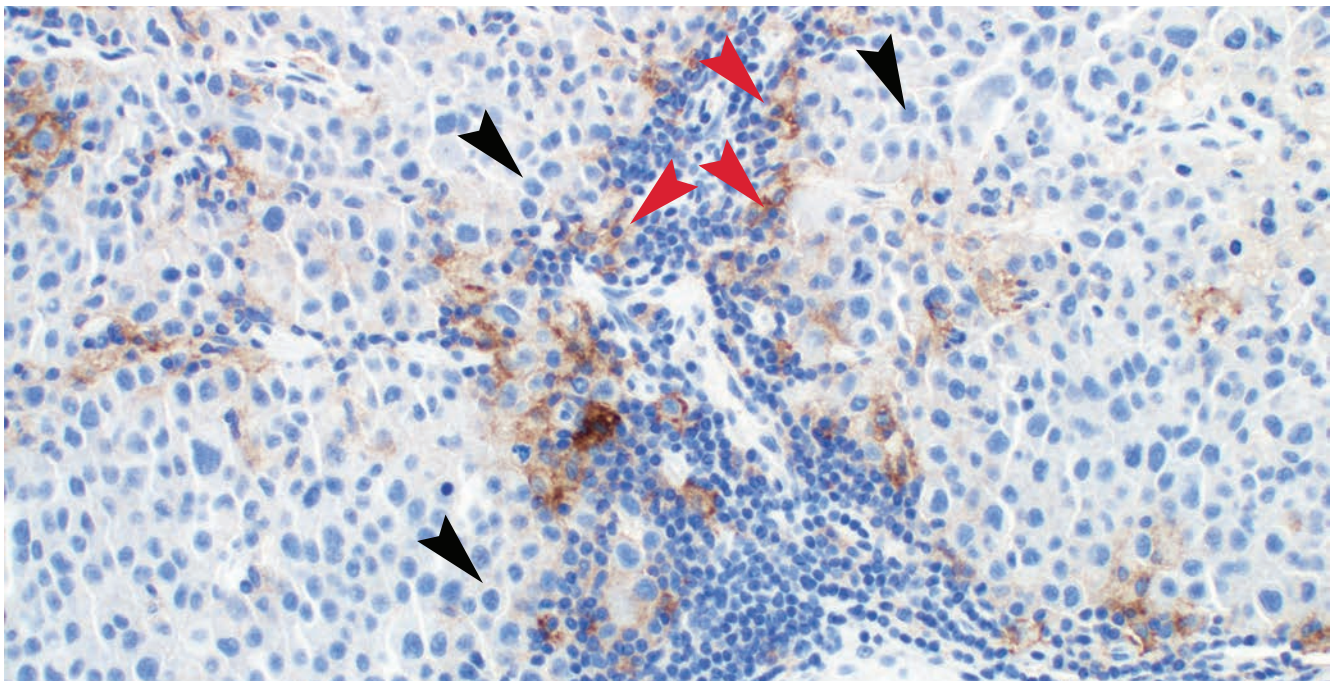


図 16. 悪性黒色腫は腫瘍関連免疫細胞に強い PD-L1 陽性染色を示し (赤矢印)、腫瘍細胞は大多数がPD-L1 陰性です (黒矢印)。
染色された腫瘍関連免疫細胞は、PD-L1 陽性スコア判定の対象外です。(対物レンズ 20 倍) *

* 組織検体は Asterand Bioscience より提供

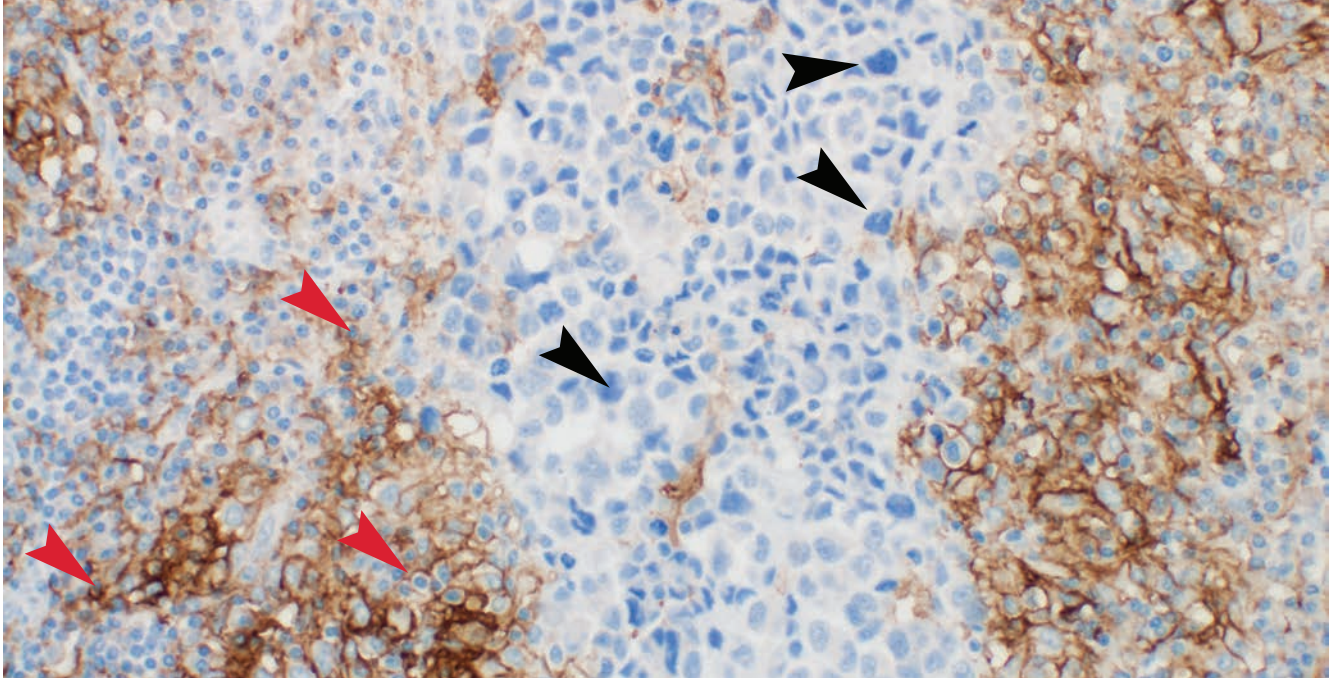


図 17. 悪性黒色腫は腫瘍周辺にある腫瘍関連免疫細胞に強い PD-L1 陽性染色を示し (赤矢印)、腫瘍細胞は大多数が PD-L1 陰性です (黒矢印)。
染色された腫瘍関連免疫細胞は、PD-L1 陽性スコア判定の対象外です。(対物レンズ 20 倍) *

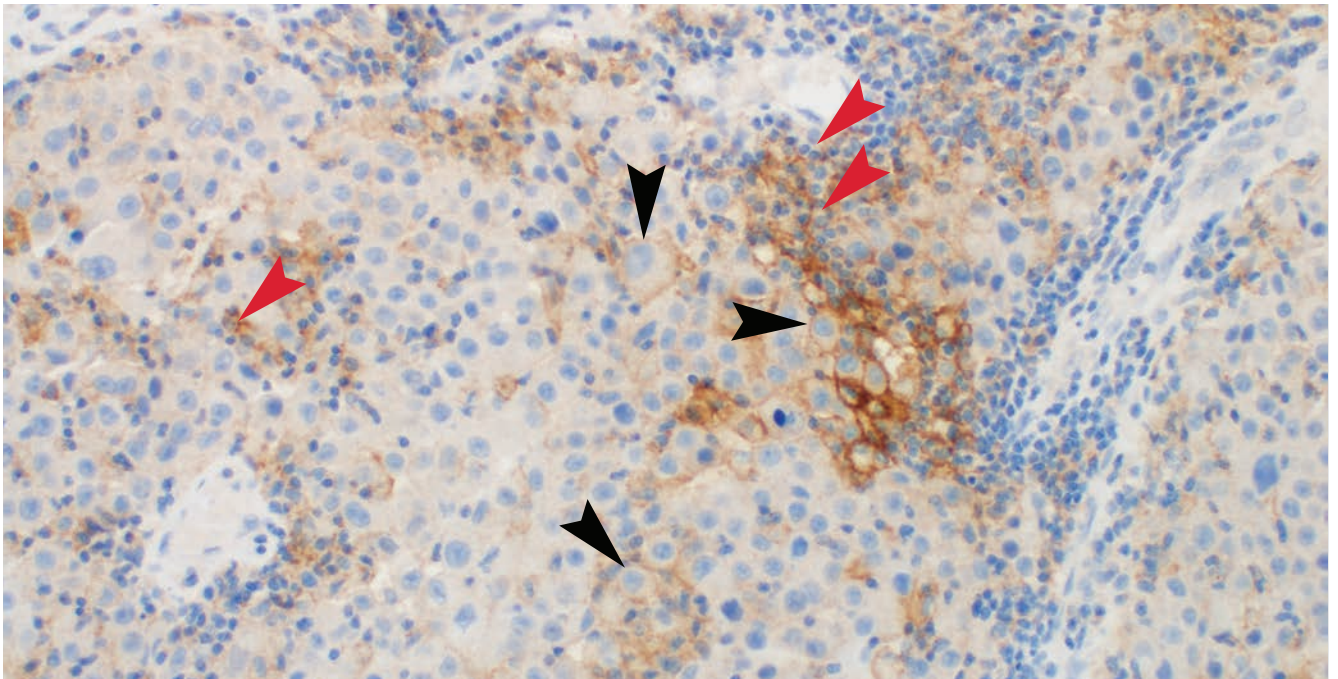


図 18. 腫瘍関連免疫細胞に PD-L1 陽性染色を示す悪性黒色腫 (赤矢印) と陽性の腫瘍細胞です (黒矢印)。
染色された免疫細胞は、PD-L1 陽性スコア判定の対象外です。(対物レンズ 20 倍)

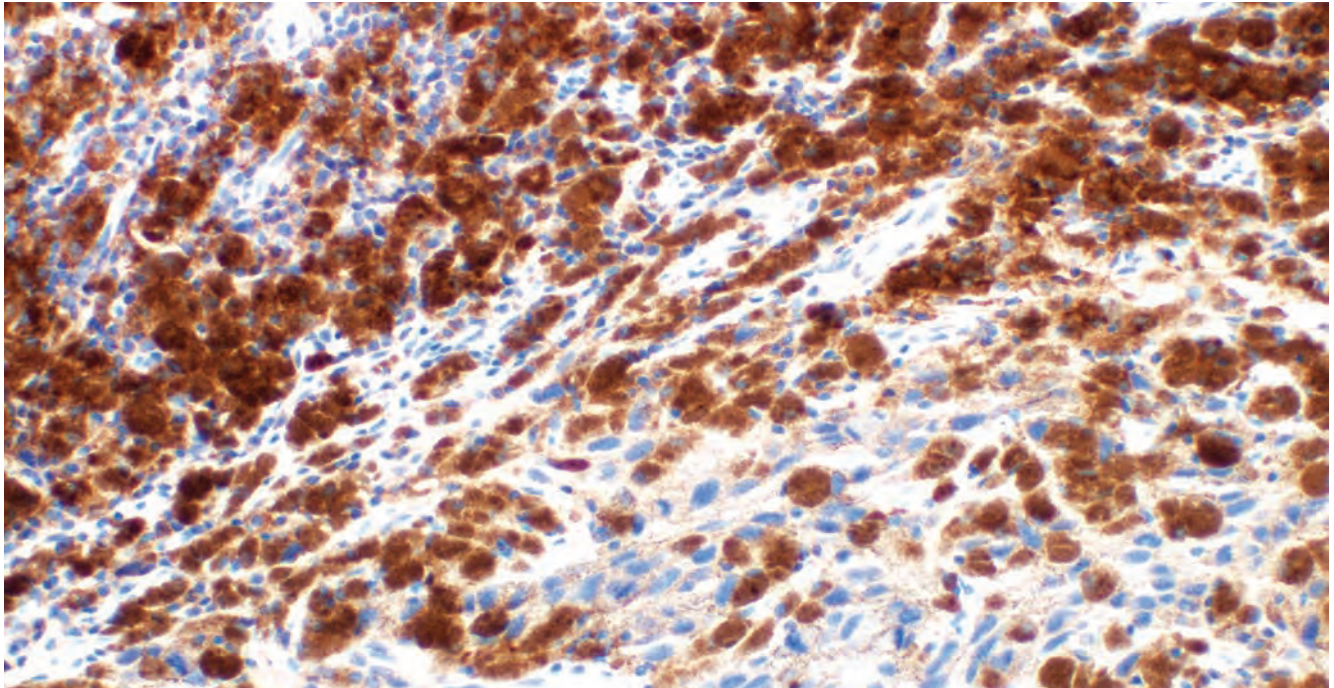


図 19. 悪性黒色腫

この例は、褐色のメラニン色素がかなり増加して細胞膜染色のスコアリングを妨害しているため、判定不可とみなされる場合があります。NCR で染色した連続切片との比較が、メラニンを確認して除外するのに有用です。(対物レンズ 20 倍) *

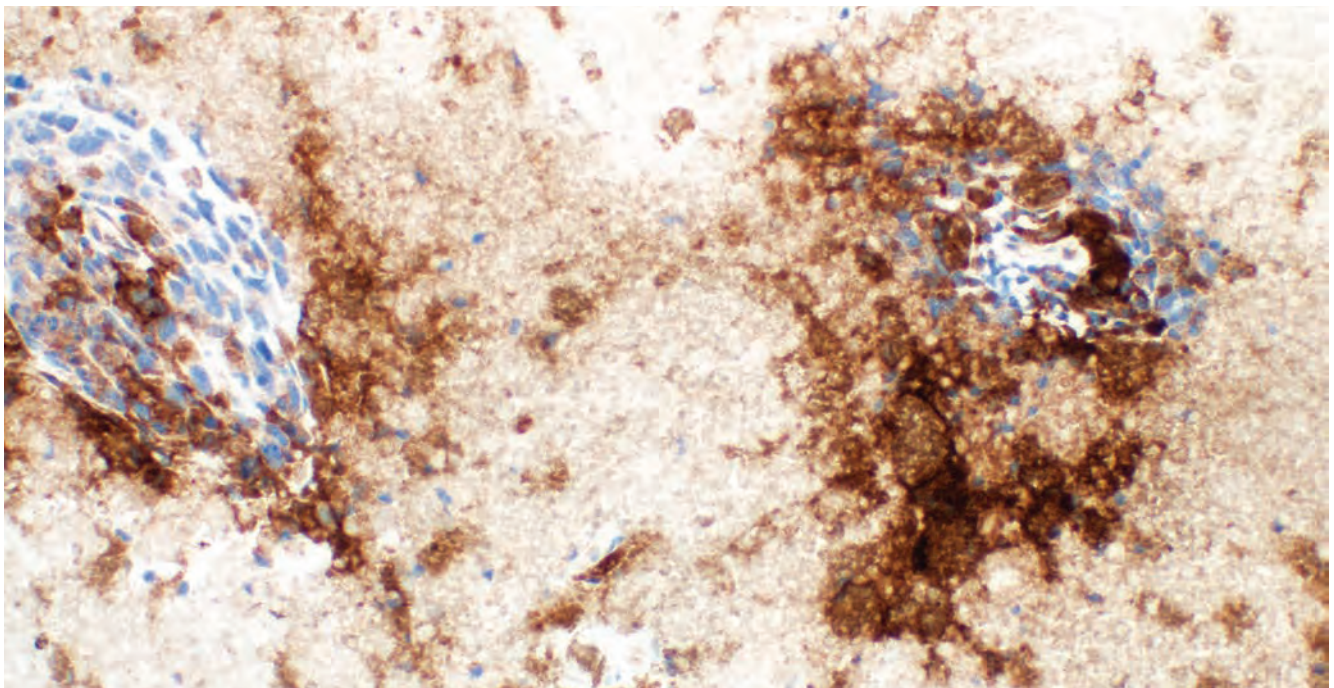


図 20. 悪性黒色腫

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。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。検体が過度に壊死しており含まれる腫瘍細胞が 100 個未満の場合、その検体は不適正検体とみなします。(対物レンズ 20 倍) *

* 組織検体は Asterand Bioscience より提供

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 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	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	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 への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 (スライド表面に洗浄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。

参考資料

- Clinical and Laboratory Standards Institute (旧 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
- 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.
- Larkin J, Chiarion-Sileni V, Gonzalez R et al. Combined Nivolumab and Ipilimumab or Monotherapy in Untreated Melanoma. N Engl J Med 2015;373(1):23-34.
- 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.
- YERVOY 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.
- Postow M, Chesney J, Pavlick A, et al. Nivolumab and ipilimumab versus ipilimumab in untreated melanoma. N Engl J Med. 2015;372(21):2006-17.
- Siegel, R. L., Miller, K. D. and Jemal, A. (2017), Cancer statistics, 2017. CA: A Cancer Journal for Clinicians, 67:7-30.
- 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.
- Weber JS, D’ Angelo SP, Minor D, et al. Nivolumab versus chemotherapy in patients with advanced melanoma who progressed after anti-CTLA-4 treatment (CheckMate-037): a randomised, controlled, open-label, phase 3 trial. Lancet Oncol 2015; 16:375-84.

参考文献

- [1] International Agency for Research on Cancer (IARC), World Health Organization (WHO) Fact Sheet: Cancer Incidence and Mortality Worldwide (2012). <https://gco.iarc.fr/today/fact-sheets-populations?population=900&sex=0#collapse1> (August 2018)
- [2] International Agency for Research on Cancer (IARC), World Health Organization (WHO) Fact Sheet: Cancer Incidence and Mortality Japan (2012). <https://gco.iarc.fr/today/fact-sheets-populations?population=392&sex=0#collapse1> (August 2018)

© Agilent Technologies, Inc. 2018

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 2018 年 7 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

