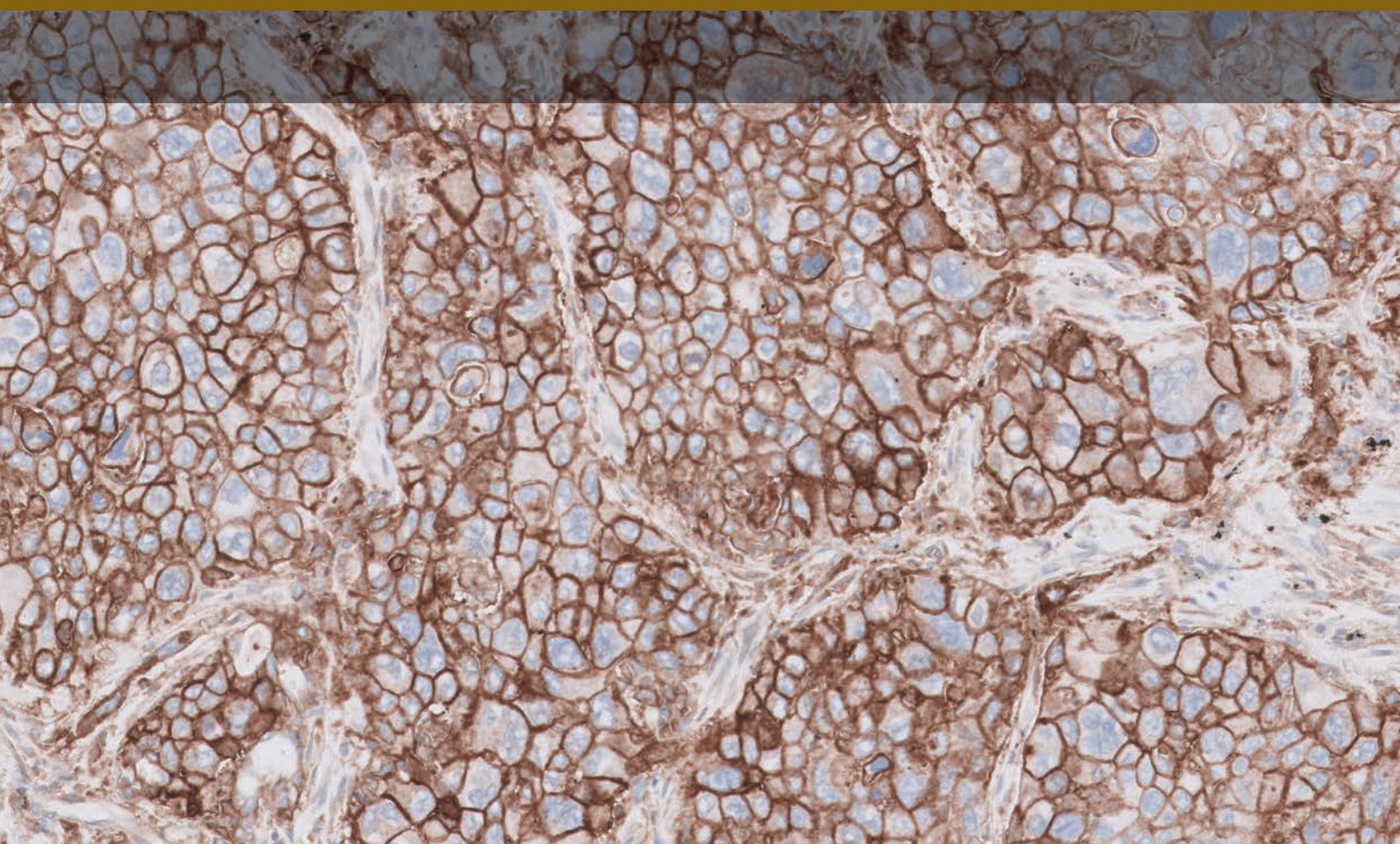


PD-L1 IHC 22C3 pharmDx「ダコ」の 非小細胞肺癌染色結果判定マニュアル

体外診断用

体外診断用医薬品 承認番号：22800EZ00078000



目次

非小細胞肺癌での使用目的	04
はじめに	06
PD-L1 の概要	08
PD-L1 IHC 22C3 pharmDx「ダコ」の概要	10
製品内容 (SK00621-5JおよびGE00621-5J)	11
技術的留意点	12
検体の準備	12
施設内コントロール組織	12
追加 (オプション) の施設内コントロール：扁桃組織	13
組織の処理	13
未染スライドの保管	13
染色手順 (型番：SK00621-5J)	14
染色手順 (型番：GE00621-5J)	16
テクニカルチェックリスト	18
判定ガイドライン	19
一般的留意点	19
組織の評価基準	19
コントロールの評価	20
スライド評価フローチャート	24
染色評価および Tumor Proportion Score (TPS) の決定	25
Tumor Proportion Score (TPS) の定義	25
PD-L1 染色性の評価	25
Tumor Proportion Score (TPS) 決定のためのガイドラインおよび方法	26
スコアリングガイドライン	27
TPS 決定のための推奨方法	28
治療対象となる非小細胞肺癌患者の選定	30
結果の報告	32
PD-L1 染色の特徴	33
PD-L1 IHC 22C3 pharmDx「ダコ」を使用した結果判定における注意事項	33
非小細胞肺癌症例のさまざまな染色像とその解釈	34
PD-L1 IHC 22C3 pharmDx「ダコ」 (型番：SK00621-5J) の	
TPS < 1 % の症例	40
PD-L1 IHC 22C3 pharmDx「ダコ」 (型番：SK00621-5J) の	
TPS 0 ~ 10 % の症例	44
PD-L1 IHC 22C3 pharmDx「ダコ」 (型番：SK00621-5J) の	
TPS 1 ~ 49 % の症例	49
PD-L1 IHC 22C3 pharmDx「ダコ」 (型番：SK00621-5J) の	
TPS ≥ 50 % の症例	53
PD-L1 IHC 22C3 pharmDx「ダコ」 (型番：SK00621-5J) の	
TPS 40 ~ 60 % の症例	60
PD-L1 IHC 22C3 pharmDx「ダコ」 (型番：GE00621-5J) の	
TPS < 1 % の症例	65
PD-L1 IHC 22C3 pharmDx「ダコ」 (型番：GE00621-5J) の	
TPS 1 ~ 49 % の症例	66
PD-L1 IHC 22C3 pharmDx「ダコ」 (型番：GE00621-5J) の	
TPS ≥ 50 % の症例	67
アーチファクト	68
トラブルシューティングガイド	73
参考文献	74

使用目的

ダコ Autostainer Link 48 用の PD-L1 IHC 22C3 pharmDx 「ダコ」(型番：SK00621-5J)

体外診断用

がん組織、細胞中の PD-L1 発現率の測定（非小細胞肺癌患者、頭頸部癌患者又は食道癌患者におけるペムブロリズマブ（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 22C3 pharmDx「ダコ」(型番：SK00621-5J) は、抗 PD-L1 マウスモノクローナル抗体（Clone 22C3）を用いた定性的な免疫組織化学染色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）上で EnVision FLEX 検出試薬を使用し、ホルマリン固定パラフィン包埋（FFPE）非小細胞肺癌組織、頭頸部癌組織又は食道癌組織中の PD-L1 発現率を測定するためのものです。

非小細胞肺癌

非小細胞肺癌組織中の PD-L1 発現率は、強度 1+ 以上で部分的または完全な細胞膜の染色を示す陽性腫瘍細胞の割合である Tumor Proportion Score（TPS）を用いて決定します。検体は $TPS \geq 1\%$ の場合、PD-L1 発現があると判断します。

PD-L1 IHC 22C3 pharmDx「ダコ」は、非小細胞肺癌患者のうちキイトルーダ（ペムブロリズマブ）の適切な投与を行うための補助として用いることを目的としています。PD-L1 検査に基づく治療にあたっては、キイトルーダの添付文書および最適使用推進ガイドラインを参照してください。

その他の適応症における使用目的の説明については、ダコ Autostainer Link 48 用 PD-L1 IHC 22C3 pharmDx「ダコ」(型番：SK00621-5J) の最新版の添付文書を参照してください。

ダコ Omnis 用の PD-L1 IHC
22C3 pharmDx「ダコ」
(型番：GE00621-5J)

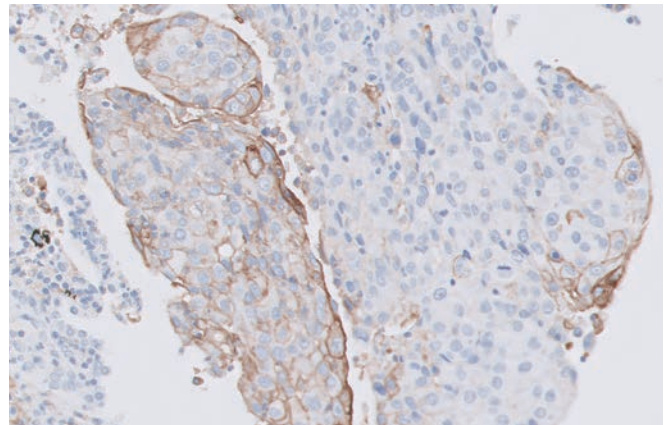
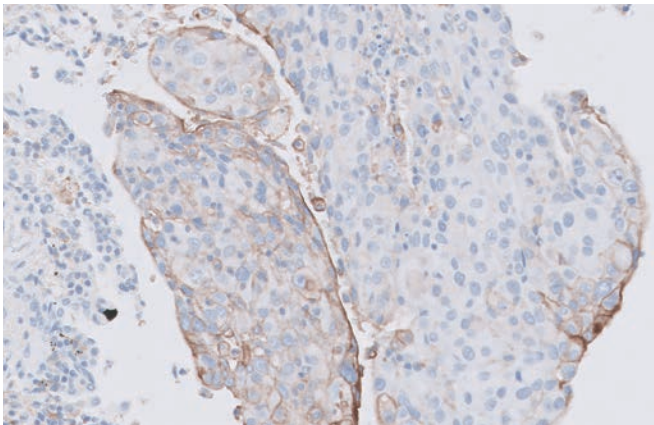
体外診断用

PD-L1 IHC 22C3 pharmDx「ダコ」(型番：GE00621-5J) は、抗 PD-L1 マウスモノクローナル抗体 (Clone 22C3) を用いた定性的な免疫組織化学染色法を原理としたアッセイキットです。ダコ Omnis 上で EnVision FLEX 検出試薬を使用し、ホルマリン固定パラフィン包埋 (FFPE) 非小細胞肺癌 (NSCLC) 組織中の PD-L1 発現率を測定するためのものです。

非小細胞肺癌

非小細胞肺癌組織中の PD-L1 発現率は、強度 1+ 以上で部分的または完全な細胞膜の染色を示す陽性腫瘍細胞の割合である Tumor Proportion Score (TPS) を用いて決定します。検体は $TPS \geq 1\%$ の場合、PD-L1 発現があると判断します。

PD-L1 IHC 22C3 pharmDx「ダコ」は、非小細胞肺癌患者のうちキイトルーダ（ペムブロリズマブ）の適切な投与を行うための補助として用いることを目的としています。PD-L1 検査に基づく治療にあたっては、キイトルーダの添付文書および最適使用推進ガイドラインを参照してください。



PD-L1 IHC 22C3 pharmDx「ダコ」の実例。以下の製品で染色した $TPS > 1\%$ での非小細胞肺癌検体の連続切片

左側：PD-L1 IHC 22C3 pharmDx「ダコ」(型番：SK00621-5J)

右側：PD-L1 IHC 22C3 pharmDx「ダコ」(型番：GE00621-5J)

はじめに

ダコ Autostainer Link 48 用の PD-L1 IHC 22C3 pharmDx「ダコ」(型番: SK00621-5J) は、キイトルーダ臨床試験で確立され、非小細胞肺癌患者におけるキイトルーダ (ペムブロリズマブ) の適切な投与を行うための補助として用いることを目的とした最初のコンパニオン診断薬です。

PD-L1 IHC 22C3 pharmDx「ダコ」(型番: GE00621-5J) はダコ Omnisでの使用を目的に再構成されました。PD-L1 IHC 22C3 pharmDx「ダコ」(型番: SK00621-5J) および GE00621-5J) はどちらも同一試薬を同一濃度で用いますが、それぞれ装置専用のバイアルを使用します。型番 GE00621-5J 用の試薬は、4 章および 5 章に一覧表示したダコ Omnis 専用バイアルのモジュール形式でご利用いただけます。PD-L1 IHC 22C3 pharmDx「ダコ」(型番: SK00621-5J) を用いた非小細胞肺癌の比較試験で臨床的な同等性が確認されています。両アッセイとも、非小細胞肺癌患者におけるキイトルーダ (ペムブロリズマブ) の適切な投与を行うための補助として用いることを目的としたコンパニオン診断薬です。これらの製品は互換性がなく、試薬バイアルおよび添付文書はそれぞれの染色装置専用であるにご注意ください。

この染色結果判定マニュアルは、病理医や検査担当者が、ホルマリン固定パラフィン包埋非小細胞肺癌組織中の PD-L1 発現率の評価において、正確で再現性のある結果を得られるようサポートするためのものです。PD-L1 発現の評価は、抗 PD-1 抗体による免疫療法に適した患者の特定に使用できます。

このマニュアルでは、高品質な染色と診断評価が得られるよう、PD-L1 IHC 22C3 pharmDx「ダコ」の判定法と技術情報を詳述します。これらの製品を用いた非小細胞肺癌の染色のスコアリングに必要な事項を十分に知って頂くために、さまざまな PD-L1 発現率の症例を参考として紹介しています。施設で再現性のある信頼性の高い結果を得るために、本マニュアル内の症例や本品により染色された非小細胞肺癌検体の判定のための詳細な推奨事項をお読みください。

PD-L1 IHC 22C3 pharmDx「ダコ」は、定性的な免疫組織化学染色法を原理とするアッセイキットです。非小細胞肺癌組織中の PD-L1 発現率は、強度 1+ 以上で部分的または完全な細胞膜の染色を示す陽性腫瘍細胞の割合である Tumor Proportion Score (TPS) を用いて決定します。

PD-L1 発現を検査する非小細胞肺癌検体をスコアリングし、Tumor Proportion Score (TPS) に基づき、発現レベルを分けます。

- TPS < 1 %
- TPS $\geq$ 1 %
- TPS $\geq$ 50 %

注意事項：PD-L1 発現レベルが TPS $\geq$ 50 % の場合、治療担当医の参考となる可能性があります。ケイトルーダ単独療法の適格性を決定するものではありません。

染色と判定方法についての詳細は、PD-L1 IHC 22C3 pharmDx「ダコ」(型番：SK00621-5J) または PD-L1 IHC 22C3 pharmDx「ダコ」(型番：GE00621-5J) に同梱されている最新版の添付文書を参照するか、www.agilent.com をご確認ください。

結果の判定

本品は、体外診断用医薬品です。染色性を臨床的に判定するには、コントロールを適切に評価する必要があります。評価は、患者の病歴や他の診断検査の枠内で、病理医が行う必要があります。これらの製品は、体外診断用医薬品です。

結果の報告

治療担当医師に報告すべき情報については、本マニュアル 32 ページの「結果の報告」の章を参照してください。

顕微鏡写真

別途記載のない限り、掲載されている顕微鏡写真は非小細胞肺癌のものです。

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

PD-L1 の概要

PD-1/PD-L1 経路は、正常細胞における免疫応答を制御する

PD-L1 (Programmed death-ligand 1) は、免疫系の応答時に PD-1 (Programmed death-1 receptor) に結合する膜貫通型タンパク質です。PD-1 受容体は通常、細胞傷害性T細胞などの免疫細胞上に発現します。PD-L1 は通常正常な細胞上に発現します。正常な細胞は、PD-1 と PD-L1 の相互作用を利用し、T 細胞を不活性化することで免疫認識に対する保護機構として利用しています (図 1)。細胞傷害性 T 細胞が不活性化すると、免疫応答のダウンレギュレートが起こり、その結果、不活性化した T 細胞が細胞分裂を停止して枯渇し、最終的にはプログラム細胞死、すなわちアポトーシスに至ります。

腫瘍は PD-1/PD-L1 経路を利用して免疫応答から免れる

多くの腫瘍細胞は、人体の自然な免疫応答を免れるためのメカニズムとして、PD-L1 の発現をアップレギュレートすることができます。活性化された T 細胞は、腫瘍細胞上の PD-L1 を認識します。これは正常細胞の場合と類似しており、PD-L1 のシグナル伝達により、T 細胞は不活性化されます (図 2)。腫瘍細胞は免疫サイクルを免れて排除されず、増殖することができます。

抗 PD-1 治療薬により、腫瘍に対する免疫応答が可能

キイトルーダ (ペムブロリズマブ) は腫瘍細胞と活性化した T 細胞の間の PD-1/PD-L1 相互作用をブロックする抗 PD-1 がん免疫治療薬です (図 3)。腫瘍細胞と活性化した T 細胞との相互作用をブロックすることで、腫瘍細胞による免疫抑制を防ぐことができます。

PD-L1 IHC 22C3 pharmDx「ダコ」は非小細胞肺癌組織中の PD-L1 を検出する

非小細胞肺癌における PD-L1 のアップレギュレートは、抗 PD-1 治療薬への反応性に対するバイオマーカーとなります。PD-L1 IHC 22C3 pharmDx 「ダコ」は、PD-L1 発現と臨床効果の関係を評価するための、キイトルーダ (ペムブロリズマブ) の臨床試験 (KEYNOTE-010、KEYNOTE-024、KEYNOTE-042) * で用いられた唯一のコンパニオン診断薬です。キイトルーダはヒト化抗ヒト PD-1 モノクローナル抗体です。

* 添付文書を参照してください

PD-1/PD-L1 経路

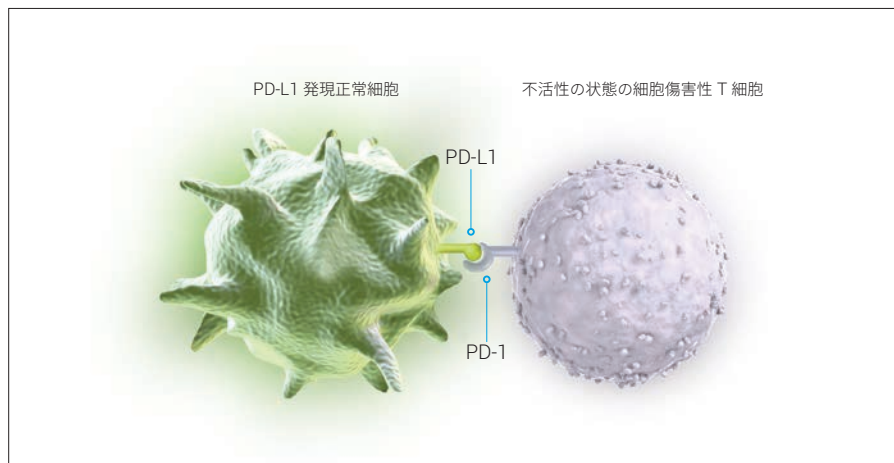


図 1: T 細胞が不活性化すると、正常組織へのダメージが抑制される。

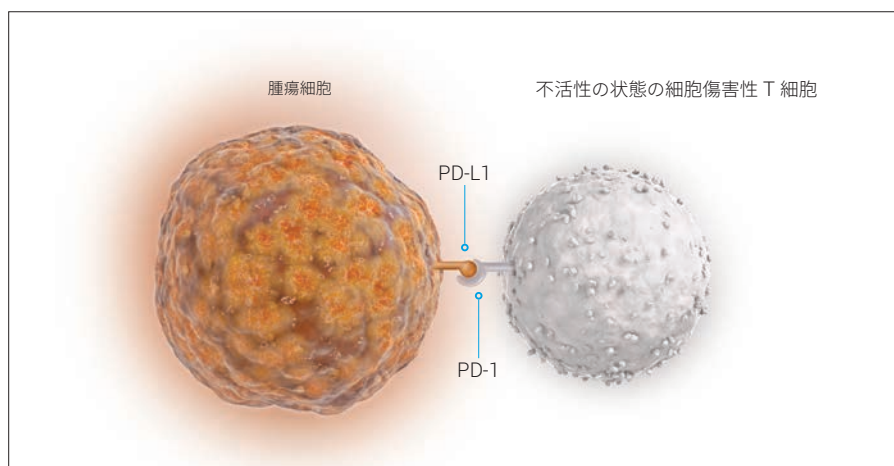


図 2: T 細胞が不活性化すると、腫瘍の細胞死が抑制される。

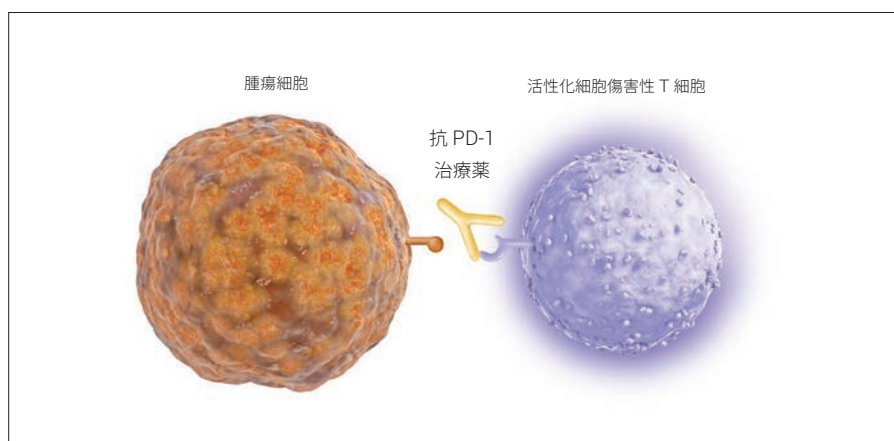
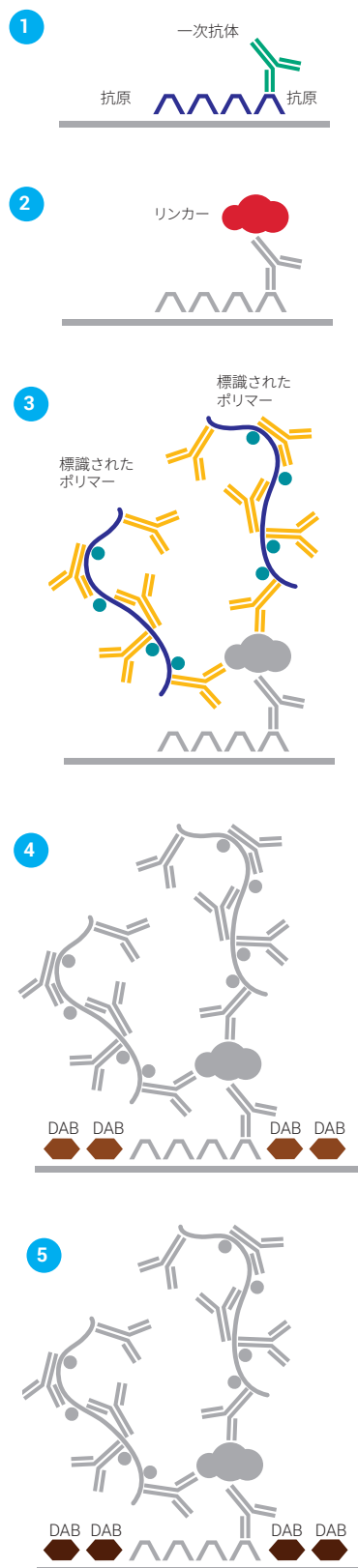


図 3: PD-1/PD-L1 の相互作用が阻害されると、活性化した T 細胞の働きが有効になり、腫瘍細胞を積極的に排除できるようになる。

PD-L1 IHC 22C3 pharmDx「ダコ」の概要



PD-L1 IHC 22C3 pharmDx「ダコ」とは

PD-L1 IHC 22C3 pharmDx「ダコ」は、KEYNOTE 臨床試験で確立され、非小細胞肺癌患者におけるキイトルーダ（ペムブロリズマブ）の適切な投与を行うための補助として用いることを目的とした最初のコンパニオン診断薬です。PD-L1 IHC 22C3 pharmDx「ダコ」（型番：GE00621-5J）はダコ Omnis 用に再構成され、ダコ Omnis 上での PD-L1 IHC 22C3 pharmDx「ダコ」（型番：GE00621-5J）とダコ Autostainer Link 48 上での PD-L1 IHC 22C3 pharmDx「ダコ」（型番：SK00621-5J）との比較試験によって臨床的な同等性が確認されています。両製品とも、定性的な免疫組織化学的（IHC）アッセイであり、ホルマリン固定パラフィン包埋（FFPE）非小細胞肺癌組織中の PD-L1 発現率を EnVision FLEX 検出試薬を使用して測定するためのものです。

両アッセイでは、リンカー試薬を用いた IHC 染色手順を実施するための最適化された試薬と、DAB エンハンサー試薬を使用します（図 4）。

SK00621-5J については、脱パラフィン、親水化、抗原賦活は PT Link での 3-in-1 処理を用いて実施します。Autostainer に載せた後、検体をブロッキング試薬で処理し、PD-L1 に特異的なモノクローナル抗体、または一次抗体陰性コントロールとともに反応させます。

GE00621-5J については、脱パラフィン、親水化、抗原賦活はダコ Omnis 上で脱パラ試薬および Low pH 濃縮抗原賦活液の 2 ステップの処理を用いて実施します。次に、ブロッキング試薬の処理前に、検体を PD-L1 に対するモノクローナル抗体または一次抗体陰性コントロール（NCR）で反応させます。

SK00621-5J および GE00621-5J とともに、一次抗体/NCR/ブロッキング試薬で処理後、リンカー試薬を反応させ、次にポリマー試薬（デキストランポリマーに二次抗体とパーオキシダーゼが結合）を反応させ、さらに調製した基質溶液を反応させます。基質溶液中の DAB がポリマー試薬中のパーオキシダーゼにより酸化されて抗原部位に可視産物が生成され、抗原部位が暗褐色に染色されます。最後に、対比染色を行い、脱水、透徹処理後、非水溶性の永久標本用封入剤で封入し、カバーガラスをのせます。結果の判定には光学顕微鏡を用います。

図 4：PD-L1 IHC 22C3 pharmDx「ダコ」染色手順

1. 一次抗体の添加
2. リンカー試薬の添加
3. ポリマー試薬の添加
4. 調製した基質溶液の添加
5. DAB エンハンサー試薬の添加

製品内容



図 5.0 : PD-L1 IHC 22C3 pharmDx「ダコ」(型番:SK00621-5J) の構成試薬

PD-L1 IHC 22C3 pharmDx「ダコ」(型番:SK00621-5J) には、50 テスト分に相当する試薬およびコントロールスライド 15 枚がすべて含まれています (図 5.0)。

- － 濃縮抗原賦活液 (50×)
- － ブロッキング試薬
- － 一次抗体：抗 PD-L1 マウスモノクローナル抗体 (Clone 22C3)
- － 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 *

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 (ダコ AutostainerLinik 用) (型番:K800821-2) が別途必要です。



図 5.1 : PD-L1 IHC 22C3 pharmDx「ダコ」(型番:GE00621-5J) の構成試薬 (モジュール形式)

PD-L1 IHC 22C3 pharmDx「ダコ」(型番:GE00621-5J) はダコOmnis 用に構成されたモジュール形式のアッセイです。複数の個別のランで 60 テストを行うには、次の試薬すべてが必要です (図 5.1)。

- － 一次抗体：抗 PD-L1 マウスモノクローナル抗体 (Clone 22C3) および一次抗体陰性コントロール (型番:GE00621-5J)
 - － DAB エンハンサー試薬 (型番:GC80611-2J)
 - － コントロールスライド * (型番:T139130-2J) (オプション)
- また、次のダコ Omnis バルク試薬およびポリマー試薬等の構成試薬も必要です。
- － PD-L1 IHC 22C3 pharmDx「ダコ」ブロッキング試薬、ポリマー試薬、基質緩衝液および発色基質 (型番:GV80011-2J、600 テストまたは、GV82311-2J、150 テスト)
 - － 濃縮抗原賦活液 (50 x) (EnVision FLEX Target Retrieval Solution, Low pH (50×) (Dako Omnis)) (型番:GV80511-2)
 - － PD-L1 IHC 22C3 pharmDx「ダコ」リンカー試薬 (型番:GV82111-2J)
 - － ダコ Omnis ヘマトキシリン (ダコ Omnis 用) (型番:GC80811-2)
 - － 洗浄液 (20 x) (ダコ Omnis 用) (型番:GC80211-2)
 - － Clearify (型番:GC81030-2)
 - － 0.3 M 硫酸 (ピペット洗浄用試薬) (型番:GC20330-2)

* NIH の Dr. AF Gazdar および Dr. JD Minna は、NCI-H226 (ATCC Number : CRL-5826™) の開発に対する貢献で広く知られています。

技術的留意点

SK00621-5J および GE00621-5J の添付文書（参考文献を参照）には詳細な注意事項と包括的な取り扱い説明が記載されています。PD-L1 IHC 22C3 pharmDx「ダコ」の構成試薬およびプロトコールは個々のダコ装置が最適な結果を出すように開発されており、互換性はありません。ガイドラインについては添付文書をご参照ください。装置を変更したり、試薬を希釈したり、反応時間や温度を変更することは、不適切な結果を招く原因になります。必要な全ステップと各反応時間は該当するダコ装置ソフトウェア上にあらかじめ設定されています。染色には所定のプロトコールを使用してください。

検査は、その染色工程のみならず、検体の前処理工程からも大きな影響を受けます。本章では、検査を正しく実施して頂くため、製品の特性と技術的留意点についてご確認ください。

検体の準備

免疫組織化学染色に適した処理をされた検体を用います。形態が保たれ評価するのに十分な数の腫瘍細胞が含まれる部位を選定してください。すべての検体は、標準的な（一般病理検査室の標準的な前処理）方法に準じて処理してください。

施設内コントロール組織

施設内における検体の前処理工程の差異が、結果に大きな影響を与える可能性があります。実施に際し、染色ランごとに、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検体を必ず立ててください。

各コントロール組織は、組織検体と同様に腫瘍細胞が含まれる新鮮な検体から選択し、固定、パラフィン包埋などの前処理も組織検体と同様に実施してください。本品中のコントロールスライドは、試薬の妥当性を評価するためのものであり、検体処理の適正を判断するためのものではありません。

陽性コントロール組織には、弱から中等度の細胞膜染色を呈する腫瘍細胞が含まれることが理想的です。陰性コントロール組織は、腫瘍細胞は染色されないが、内因性陽性コントロールとして PD-L1 の発現が認められる腫瘍関連マクロファージ/免疫細胞を含んでいることが理想的です。

* PD-L1 IHC 22C3 pharmDx「ダコ」（型番：GE00621-5J）ではオプション使用

追加（オプション）の施設内 コントロール：扁桃組織

PD-L1 IHC 22C3 pharmDx「ダコ」（型番：SK00621-5J）について、扁桃組織は、一次抗体で染色すると陰窩上皮が多数強度に染色され、胚中心では濾胞性マクロファージが弱から中等度に染色されます。コントロールに用いる場合には、あらかじめ扁桃組織の染色性を確認してください。内皮細胞、線維芽細胞、表層上皮に PD-L1 タンパクは発現していません。扁桃組織の使用はPD-L1 IHC 22C3 pharmDx「ダコ」（型番：GE00621-5J）に対しては評価されていません。

組織の処理

ホルマリン固定パラフィン包埋組織での使用は評価済みです。検体は 3 ～ 4 mm に切り出し、アルコールでの脱水、キシレン置換を経て、パラフィンを浸透させます。パラフィンの温度は 60 °C を超えないようにしてください。NSCLC 組織検体において、10 % 中性緩衝ホルマリンで 12 ～ 72 時間固定で使用できることが確認されています。固定時間が 3 時間以下の場合には PD-L1 検出に変動が生じる場合があります。また、ホルマリン固定パラフィン包埋（FFPE）検体での使用は評価済みですが、脱灰や、他の固定液を使用して処理された組織の評価は実施されておらず、推奨できません。

組織検体は 4 ～ 5 μ m に薄切します。その後、適切なコーティングスライドを使用し、58 $\pm$ 2 °C で 1 時間ベーキングします。

未染スライドの保管

PD-L1 IHC 22C3 pharmDx「ダコ」（型番：SK00621-5J）では、抗原性を保つために組織切片を 2 ～ 8 °C の冷暗所（推奨）、または 25 °C までの室温で保管し、薄切後 6 か月以内に染色してください。PD-L1 IHC 22C3 pharmDx「ダコ」（型番：GE00621-5J）では、組織切片を 2 ～ 8 °C（推奨）または 25 °C で保管する場合は 5 か月以内に染色する必要があります。

ダコ Autostainer Link 48 用の PD-L1 IHC 22C3 pharmDx「ダコ」 (型番：SK00621-5J) 染色手順

PD-L1 IHC 22C3 pharmDx「ダコ」(型番：SK00621-5J) の構成試薬およびプロトコールは、PT Link とダコ Autostainer Link 48 上でのみ最適な結果を出すように開発されています。このため、試薬を希釈したり、反応時間や温度を変更することは、不適切な結果を招く原因になります。必要な全ステップと各反応時間は DakoLink ソフトウェア上にあらかじめ設定されています。染色には所定のプロトコールを使用してください。

試薬の保管

使用しない時は、本品中のコントロールスライドを含むすべてのキット内の構成試薬を、2 ～ 8 °C の冷暗所に保管してください。

試薬の調製

染色前に、使用するすべての試薬を室温（20 ～ 25 °C）に戻します。パッケージに記載されている使用期限を過ぎている試薬は、絶対に使用しないでください。

抗原賦活液

濃縮抗原賦活液を精製水で 50 倍希釈します。30 mL ボトル 1 本で、PT Link のタンク 1 つ分（1.5 L）が調製できます。希釈後、5 日以内に使用してください（再利用は 3 回まで）。

ダコ EnVision FLEX 洗浄液

ダコ EnVision FLEX 洗浄液（20 x）を、精製水で 20 倍希釈します。希釈後、未使用の洗浄液は、2 ～ 8 °C で 1 か月まで保管できます。液に濁りが観察された場合は、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、発色基質を 1 滴加え混合します。調製後は 2 ～ 8 °C の冷暗所で保管し 5 日間使用できます。本基質溶液は使用に先立ち調製し、使用の際には十分に混ぜてから使用します。溶液中に沈殿が生じることがありますが、染色の品質には影響しません。

- ー 基質緩衝液 1 本を全量使用する場合には、発色基質を 9 滴を加え混合してください。（ボトルラベルには、7.2 mL と記載されていますが、ボトルにはデッドボリューム分の緩衝液が余分に入っています）
- ー 発色基質の溶液の色には幅があり、透明からラベンダーブラウン色を呈します。この色調の差異は品質に影響しません。上記のガイドラインに従って調製してください。過剰に発色基質を加えると、陽性反応を損なう原因になります。

染色精度管理のためのコントロール

染色ごとに、以下の染色精度管理コントロールを含めてください。

- － 染色ごとに、本品中のコントロールスライドを 1 枚、一次抗体を滴下させるプロトコールで染色
- － 施設内の陽性対照ならびに陰性対照のコントロールに一次抗体を滴下させるプロトコールで染色
- － 続いて、各患者の検体の切片を一次抗体陰性コントロールで染色

脱パラフィン、親水化、および抗原賦活

PT Link の 3-in-1 処理機能を使用して、脱パラフィン、親水化、抗原賦活を実行します。

- － 予熱と冷却を 65 °C に設定し、加熱を 97 °C で 20 分に設定します。
- － PT Link には、1 タンクあたり 1.5 L の抗原賦活液を充填します（組織を完全に浸漬させるため、この量は厳守してください）。
- － 抗原賦活液を 65 °C に予熱します。
- － 組織検体を載せたスライドガラスを Autostainer 用スライドラックに装填し、ラックごと PT Link に浸漬させます。97 °C、20 分で処理します。
- － PT Link リンスステーション（型番：PT10930）には、室温の洗浄液を満たしておきます。
- － 処理が終わり、タンク内の温度が 65 °C に下がったらスライドラックを取り出し、直ちに PT Link リンスステーションに移し、5 分間浸漬します。

染色および対比染色

- － スライドガラスを装填したスライドラックをダコ Autostainer Link 48 にのせます。
- － スライドの装填中または機器の準備中にスライドが乾かないよう、装填後直ちに、スライド表面にダコ EnVision FLEX 洗浄液をかけてください。組織の乾燥は、非特異染色の原因になります。
- － PD-L1 IHC 22C3 pharmDx「ダコ」プロトコールを選択します。
あらかじめプログラミングされた手順に則って染色および対比染色が実施されます。
- － 対比染色には、ダコ EnVision FLEX ヘマトキシリン（ダコ AutostainerLink 用）、型番：K800821-2 を使用します。

封入

非水溶性封入剤を使用してください。封入後の退色を防ぐため、スライドは室温（20 ～ 25 °C）暗所で保管してください。

ダコ Omnis 用のPD-L1 IHC 22C3 pharmDx「ダコ」 (型番：GE00621-5J) 染色手順

PD-L1 IHC 22C3 pharmDx「ダコ」(型番：GE00621-5J) の構成試薬およびプロトコールは、ダコ Omnis 上でのみ最適な結果を出すように開発されています。このため、試薬を希釈したり、反応時間や温度を変更することは、不適切な結果を招く原因になります。染色に必要な全ステップと各反応時間はアッセイプロトコールに含まれているため、ご使用前にプロトコールをダコ Omnis ソフトウェアにインストールする必要があります。

試薬の保管

使用しない時は、添付文書に従って、コントロールスライド（型番：T1391）を含むすべての構成試薬を保管してください。

試薬の調製

試薬は、染色手順を開始する前に装置にロードしておく必要があり、これにより十分な時間で室温に戻すことができます。

濃縮抗原賦活液（50 x）（EnVision FLEX Target Retrieval Solution, Low pH（50×）（Dako Omnis））（型番：GV80511-2）および洗浄液（20 X）（ダコ Omnis 用）（型番：GC 80211-2）は添付文書に従って希釈してください。

ダコ Omnis 装置にバルクボトルすべてをロードし、登録します。試薬保管モジュールに必要な試薬をロードする前に、すべてのバイアルキャップが開いており、固定していることを確認します。

染色精度管理のためのコントロール

染色ごとに、以下の染色精度管理コントロールを含めてください。

- － 染色ごとに、本品中のコントロールスライドを 1 枚、一次抗体を滴下させるプロトコールで染色（オプション）
- － 施設内の陽性対照ならびに陰性対照のコントロールに一次抗体を滴下させるプロトコールで染色
- － 続いて、各患者の検体の切片を一次抗体陰性コントロールで染色

染色および対比染色

- Dako Link Omnis ワークステーションソフトウェアから、PD-L1 IHC 22C3 pharmDX と PD-L1 22C3 pharmDX Negative Control Reagent プロトコールを選んで、各スライドに適用させます。
- スライドラックにスライドを配置します。スライドラックは 1 ～ 5 枚のスライドを配置できます。ダコ Omnis にスライドラックをロードします。タッチスクリーンの説明に従って、「Done (完了)」をタップし、染色手順を開始します。装置が抗原賦活、染色および対比染色すべてを実施します。

封入

非水溶性封入剤を使用してください。封入後の退色を防ぐため、スライドは室温（20 ～ 25 °C）暗所で保管してください。

テクニカルチェックリスト

PD-L1 IHC 22C3 pharmDx「ダコ」を正しくご使用頂くために、本チェックリストをご利用ください。

施設名/所属 _____

氏名と職名 _____

装置シリアル番号 _____

ソフトウェアバージョン _____

	はい	いいえ
装置ユーザーガイドに従って、装置に対し、定期的なメンテナンスを実施していますか？	☐	☐
箱に記載されている使用期限までに試薬を使用しましたか？	☐	☐
すべての試薬およびコントロールスライドを含む構成試薬は、2 ～ 8 °C の暗所に保管されていますか？	☐	☐
すべての試薬およびコントロールスライドを含む構成試薬は（該当する場合）、染色前に添付文書の染色手順に従って室温に戻しましたか？	☐	☐
施設内陽性対照・陰性対照のコントロールスライドには、非小細胞肺癌組織を選択しましたか？	☐	☐
組織は 10 % 中性緩衝ホルマリンで固定していますか？	☐	☐
組織へのパラフィン浸透は 60 °C 以下で実施しましたか？	☐	☐
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？	☐	☐
組織検体を 58 ± 2 °C で 1 時間ベーキングしましたか？	☐	☐
組織検体は推奨事項に従い保管し染色していますか？（添付文書参照）	☐	☐
抗原賦活液は、正しく調製しましたか？（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。）	☐	☐
洗浄液は適切に調製していますか？	☐	☐
基質溶液は適切に調製していますか？（SK00621-5J のみ）	☐	☐
対比染色には、ダコ Envision FLEX ヘマトキシリンを使用していますか？	☐	☐
脱パラフィン・親水化・抗原賦活は、PT Link (3-in-1 処理) で実施しましたか？（SK00621-5J のみ）	☐	☐
スライドを機器へ搭載時、機器の準備中に、スライド表面が乾燥しないように洗浄液をかけて湿潤状態を保っていますか？（SK00621-5J のみ）	☐	☐
装置に正しいプロトコールを選択していますか？	☐	☐
PD-L1 IHC 22C3 pharmDx「ダコ」プロトコールを実施するにあたり、必要な試薬や備品はすべて準備できていますか？不足しているものがあれば、以下のコメント欄に記載してください。	☐	☐

追加事項またはコメント：

判定ガイドライン

一般的留意点

染色した検体の評価は、光学顕微鏡を用いて観察し、病理医が判定してください。スコアリング方法については、27 ページを参照してください。組織検体の判定に先立ち、本品中のコントロールスライドで染色性の妥当性を確認してください。

最も信頼できる検査結果を出すために、3 枚の連続切片を作製し、HE、一次抗体染色、一次抗体陰性コントロールでの染色を実施してください。HE 染色標本上で該当腫瘍細胞が確認できれば妥当性が担保されます。

PD-L1 IHC 22C3 pharmDx「ダコ」(型番：SK00621-5J) 中のコントロールスライドは、ランごとに必ず 1 枚染色してください。コントロールスライドの染色結果を判定するガイドラインは 20 ページをご確認ください (PD-L1 IHC 22C3 pharmD「ダコ」(型番：GE00621-5J)を使用する際は、コントロールスライド (T139130-2J) はオプション)。また、施設内コントロールスライドもランごとに加え染色してください。

組織の評価基準

適切な腫瘍細胞が 100 個以上あることを確認

まず組織の HE 染色を実施して、組織検体の妥当性を確認してください。HE 染色と PD-L1 IHC 22C3 pharmDx「ダコ」での染色には、同ブロックから作製された連続切片を用いてください。組織検体は形態が保たれており、保存状態がよいものである必要があります。また、適応腫瘍を確認してください。

腫瘍細胞が 100 個に満たない場合には、正しく評価できないと判断し、検体不適としてください。

腫瘍細胞が 100 個未満の検体

ブロックを深く切り込むことで必要な腫瘍細胞を得られたり、別のブロックを採用することで十分数の細胞を得られる場合があります。

コントロールの評価

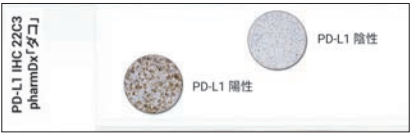


図 6:本品中のコントロールスライドには、PD-L1 発現陽性と陰性の細胞が含まれています。

コントロールスライド*

コントロールスライドを観察し、試薬の性能に問題がないかを評価してください。コントロールスライドには、PD-L1 陽性対照ならびに陰性対照のセルブロック切片が貼付されています（図 6）。陽性細胞の割合および染色強度を評価します。コントロール検体の染色性が不十分だと判断された場合には、同ランで染色されたすべての組織検体結果を無効とみなします。本品中のコントロールスライドを、結果の解釈に使用しないでください。下記のガイドラインに従って、全体の染色強度をスコアリングしてください。

0	陰性
1+	弱陽性
2+	中等度陽性
3+	強陽性

陽性対照のコントロール細胞

以下の染色性を満たしている場合、PD-L1 陽性とします（図 7）。

- － 細胞の 70 % 以上の細胞膜染色
- － 平均染色強度 2+ 以上
- － 染色強度 1+ 未満の非特異的染色

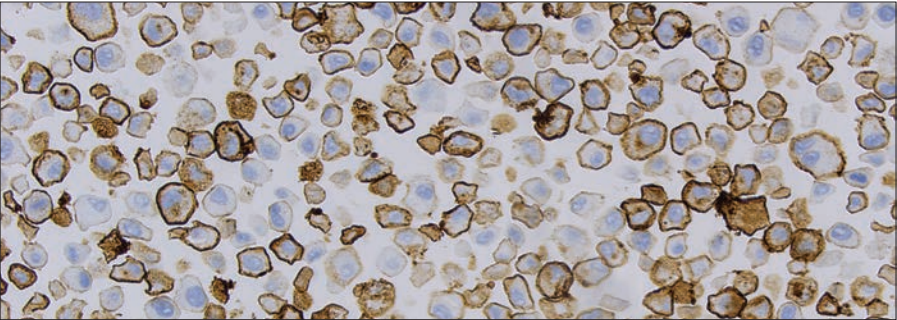


図 7：PD-L1（型番：SK00621-5J）で染色した本品中のコントロールスライド（陽性対照のコントロール細胞）の染色性（対物レンズ 20 倍）

* PD-L1 IHC 22C3 pharmDx「ダコ」（型番：GE00621-5J）でのオプション使用

陰性対照のコントロール細胞

以下の染色性を満たしている場合、PD-L1 陰性とします（図 8）。

- － 大部分の細胞が染色されていない。**注意事項：**明らかな細胞膜陽性像を認めても、その数が 10 個以下である場合には陰性と判断してよい。
- － 染色強度 1+ 未満の非特異的染色

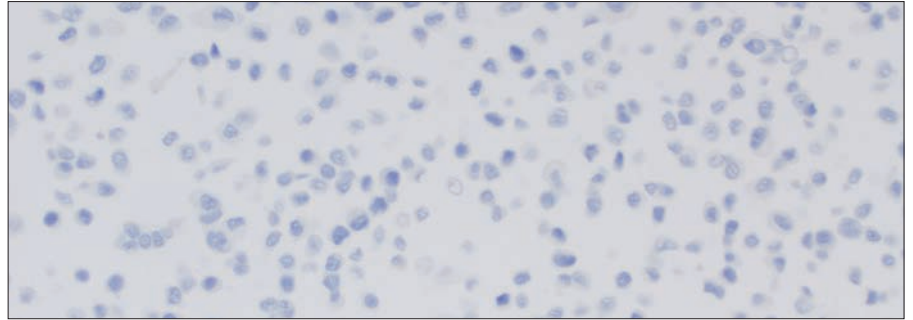


図 8：PD-L1（型番：SK00621-5J）で染色した本品中のコントロールスライド（陰性対照のコントロール細胞）の染色性（対物レンズ 20 倍）。

本品中のコントロールスライドを、結果の解釈に使用しないでください。

陽性および陰性対照の施設内コントロール組織（非小細胞肺癌）

施設内陽性対照のコントロールを観察し、組織が適切に処理され、試薬で正しく染色できていることを確認してください。陽性コントロール組織には、弱から中等度の細胞膜染色を呈する腫瘍細胞が含まれることが理想的です（図 9）。陽性の施設内コントロールの染色性が不十分だと判断された場合には、同ランで染色されたすべての組織検体結果を無効とみなします。

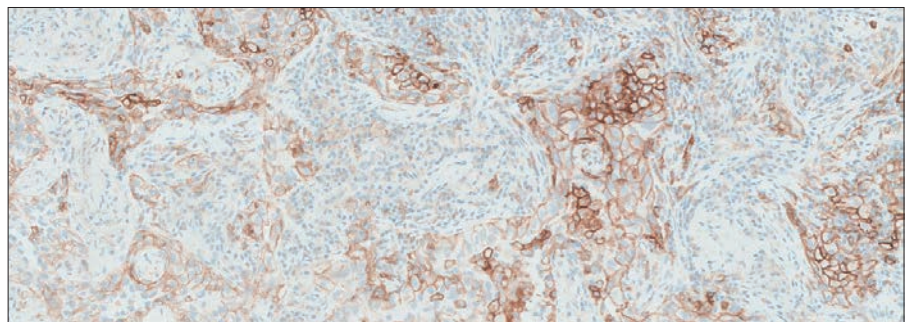


図 9：PD-L1（型番：SK00621-5J）で染色した理想的な陽性対照の施設内コントロール組織（対物レンズ 10 倍）。

理想的な非小細胞肺癌の陰性コントロール組織は、腫瘍細胞は染色されず、内因性陽性コントロールとして PD-L1 の発現が認められる腫瘍関連マクロファージ/免疫細胞が認められます（図 10）。検査室内での陰性対照のコントロールスライドを染色して、期待される染色結果が得られたかを判定してください。各施設の陽性対照・陰性対照のコントロール組織は、検査対象の患者検体と同じスライド上に貼付すると、より厳密に染色の妥当性を確認することができます。

万が一、施設内コントロール組織に不適当な染色像を認めた場合には、同ランで染色されたすべての組織検体結果を無効とみなします。

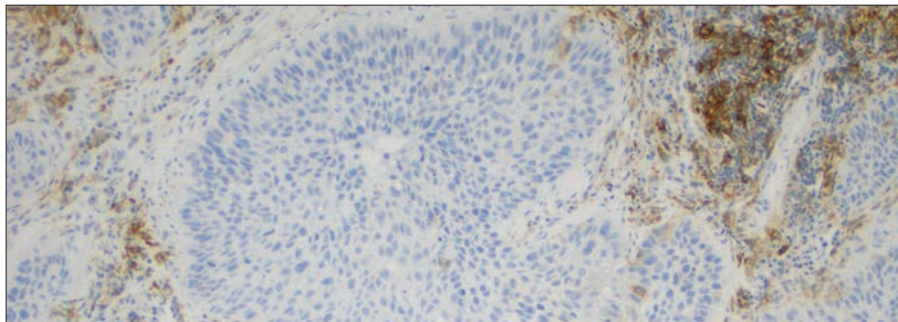


図 10：PD-L1（型番：SK00621-5J）で染色した腫瘍細胞が陰性を呈する理想的な施設内陰性コントロール組織（対物レンズ 10 倍）。

オプションのコントロール組織

コントロールスライドおよび施設内コントロール組織に加えて、FFPE 扁桃組織も PD-L1 IHC 22C3 pharmDx「ダコ」（型番：SK00621-5J）で染色したコントロール組織として使用することができます。一次抗体で染色すると陰窩上皮が多数強度に染色され、胚中心では濾胞性マクロファージが弱から中程度に染色されます（図 11）。

内皮細胞、線維芽細胞、表層上皮には PD-L1 発現を認めません。

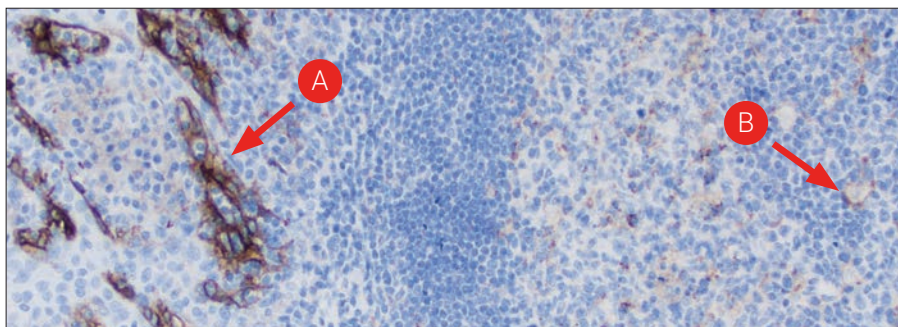


図 11：PD-L1（型番：SK00621-5J）で染色した扁桃組織は、陰窩上皮で部分的に強い膜染色を示し（A）、胚中心で濾胞性マクロファージに弱から中程度の膜染色を示します（B）（対物レンズ 10 倍）。

施設内コントロール細胞を、結果の解釈の補助として使用しないでください。

一次抗体陰性コントロール

一次抗体陰性コントロールで染色したスライドを観察し、一次抗体染色スライドの判定を妨げ、組織を評価不能にする可能性のある非特異的バックグラウンド染色が存在するかどうかを確認します。細胞膜が染色されていないことが必要です（図 12）。

一次抗体陰性コントロールで染色した組織検体スライドを観察し、一次抗体染色スライドの判定を妨げになる可能性のある非特異的染色が存在するかどうかを確認します。非特異的染色は強度 1+ 以下のものです。

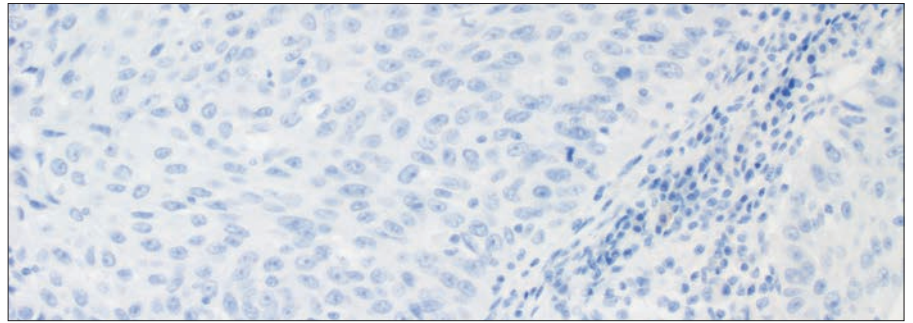


図 12：一次抗体陰性コントロール（型番：SK00621-5J）で染色した理想的な陰性対照の施設内コントロール組織（対物レンズ 20 倍）。

一次抗体陰性コントロールで染色した検体と照らし合わせることで、一次抗体で染色した検体上の非特異的な染色を把握でき、より正確に判定することが可能です。

スライド評価フローチャート



図 13：スライド評価の推奨される順番

染色評価および Tumor Proportion Score (TPS) の決定

Tumor Proportion Score (TPS) の定義

Tumor Proportion Score (TPS) は、検体中のすべての生存腫瘍細胞中で染色強度が 1+ 以上の部分的または完全な細胞膜染色を示す生存腫瘍細胞の割合のことで、
TPS は以下のとおり定義します：

$$\text{TPS (\%)} = \frac{\text{PD-L1 陽性細胞数 (腫瘍細胞)}}{\text{生存腫瘍細胞の総数}} \times 100$$

表 1:非小細胞肺癌に対する TPS の分子の組み入れ/除外基準

組織成分	非小細胞肺癌に対する TPS の組み入れ	非小細胞肺癌に対する TPS の除外
腫瘍細胞	腫瘍細胞のはっきりとした部分的または完全な細胞膜染色（強度 1+ 以上）	細胞質染色はすべて除外
免疫細胞	除外	染色を示す次のような免疫細胞は除外。 - 単核炎症細胞（大リンパ球、単球、肺マクロファージ） - 形質細胞 - 好中球
その他の細胞	除外	染色を示す次の細胞はすべて除外。 - 腫瘍細胞に隣接する正常細胞 - 間質細胞（線維芽細胞） - 壊死細胞または細胞片 - 炭粉色素

PD-L1 染色の評価

細胞質染色とは区別される、陽性腫瘍細胞のはっきりとした部分的または完全な細胞膜染色（強度 1+ 以上）をスコアリング対象とします。細胞質染色は、非特異的染色と判断し、染色強度の評価から除外します。

生存腫瘍細胞のみをスコアリングします。単核炎症細胞（大リンパ球、単球、肺マクロファージ）、形質細胞、および好中球などの染色を呈する免疫細胞すべてを除外します。腫瘍細胞に隣接する正常細胞、間質細胞（線維芽細胞）、壊死細胞または細胞片、炭粉色素の染色をすべて除外します。

Tumor Proportion Score (TPS)

決定のためのガイドラインおよび方法

- － 低倍率にて、良好に形態が保持されている全腫瘍細胞領域を観察します。PD-L1 陽性腫瘍細胞の全領域を評価します。陽性と判断するためには、部分的または完全な細胞膜染色を呈している必要がありますが、低倍率での観察では膜染色の評価に注意を要することがある点に留意してください。組織検体上に 100 個以上の判定対象の腫瘍細胞が存在することを確認してください。
- － 10 倍、20 倍および 40 倍の高倍率では、細胞膜の染色に関わらず全腫瘍細胞領域を観察します。
- － 複数の倍率で検証する段階では、最優先で次の分析を行います。
 - 腫瘍関連免疫細胞と腫瘍細胞の区別
 - PD-L1 陽性および陰性の腫瘍細胞の判定
 - 部分的および完全な腫瘍細胞の細胞膜染色 (≥ 1+) の判定
- － 検体中のすべての生存腫瘍細胞に対する PD-L1 染色腫瘍の割合を評価して Tumor Proportion Score (TPS) を算出します。

注：明らかな細胞膜染色が認められない腫瘍細胞を含む領域の判定には、十分な注意が必要です。

スコアリングから免疫細胞および壊死細胞を必ず除外してください

次の検討事項が腫瘍細胞と免疫細胞の区別に役立ちます。

- － 免疫細胞は腫瘍細胞よりも核が小さい
- － マクロファージは細胞質に色素性粒子を含む
- － マクロファージは散在性に認められ、肺胞マクロファージは肺胞壁に認められる。
肺マクロファージは肺胞腔に存在する

スコアリングガイドライン

TPS を用いて PD-L1 発現レベルを判定します。スコアリングガイドラインの例は、下記の表をご覧ください。

表 2：TPS および PD-L1 発現レベル

TPS	発現レベル	画像(対物レンズ 20 倍)
	< 1 %	PD-L1 発現なし
	≥ 1 %	PD-L1 発現

TPS 決定のための推奨方法

スコアリングは病理医が実施してください。ここでは例として 2 つの評価方法を示します。種々の染色パターンにおいて個々の Tumor Proportion Scores (TPS) を決定する方法として参考にしてください。

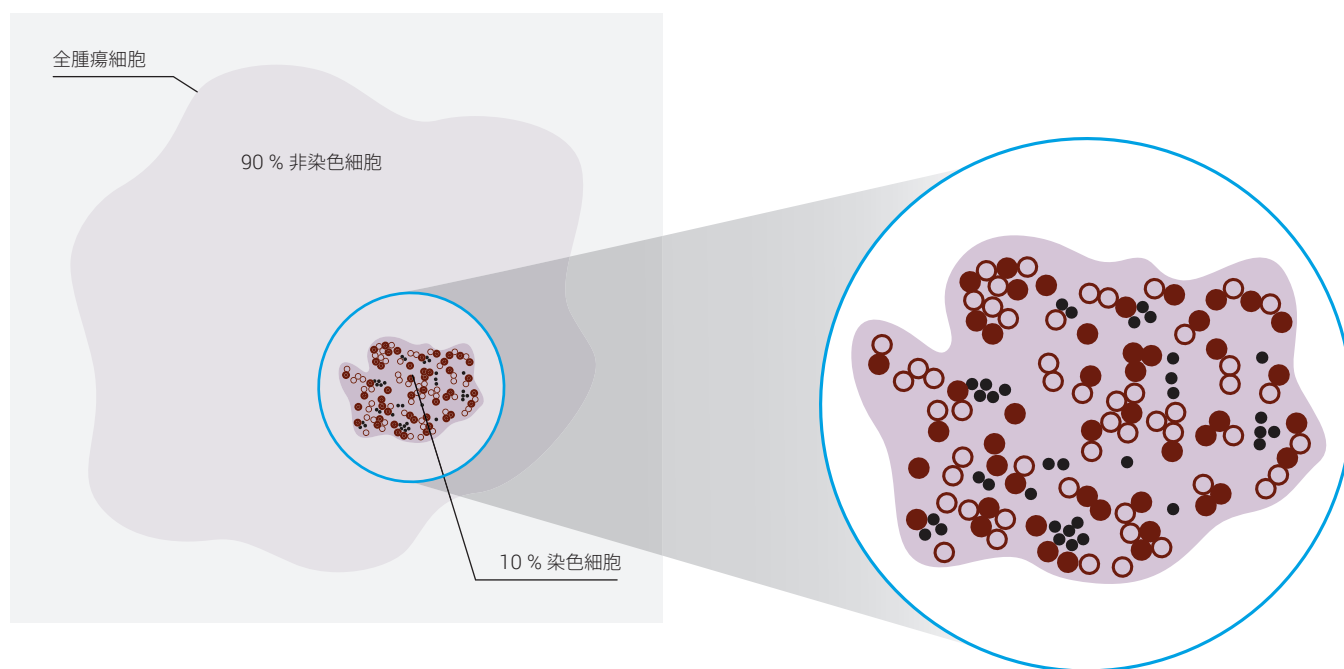
例 1: 狭い PD-L1 陽性領域に基づく Tumor Proportion Scores (TPS) の計算

低倍率：強度 1+ 以上で明らかな細胞膜染色を示す腫瘍領域を評価します。

判定：全腫瘍領域の 90 % は染色されておらず、染色領域は 10 %

高倍率：染色領域を評価し、PD-L1 陽性腫瘍細胞の割合を概算します。

判定：50 % の腫瘍細胞が PD-L1 陽性



Tumor Proportion Score (TPS) の計算：全体の腫瘍領域に対して PD-L1 陽性腫瘍細胞の全割合を決定します。

判定：Tumor Proportion Score (TPS)：

$10\% \times 50\% = 5\%$

臨床的な判定：TPS $\geq 1\%$ 、PD-L1 発現

- 陰性腫瘍細胞
- 強度 1+, 2+, 3+ の PD-L1 陽性腫瘍細胞
- 免疫細胞

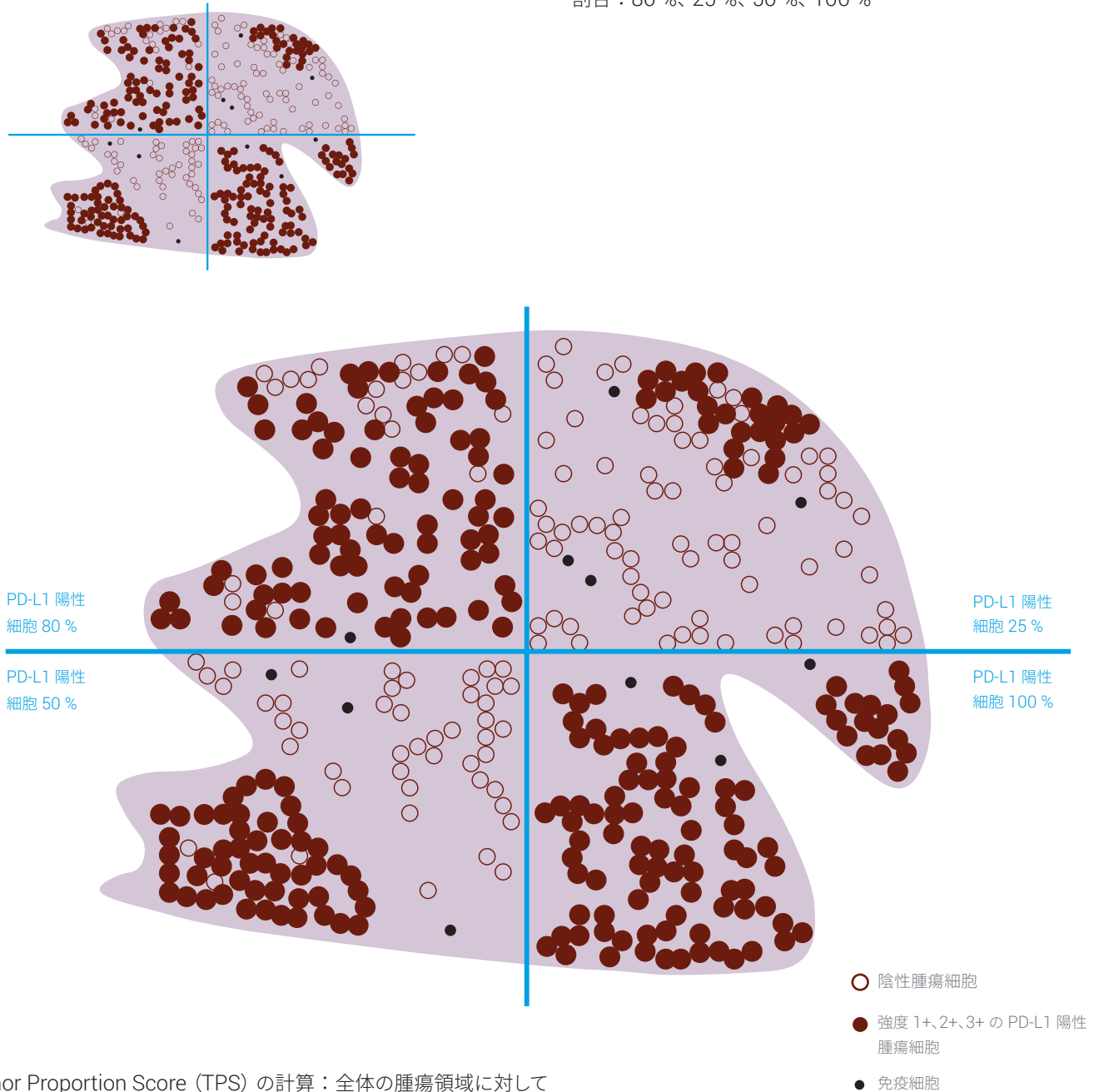
図 14：PD-L1 陽性領域が狭い腫瘍の例

例 2：不均一な PD-L1 陽性領域に基づく Tumor Proportion Scores(TPS) の計算

低倍率：視覚的に腫瘍領域を分割します。

高倍率：各領域内の PD-L1 陽性細胞の割合について細胞膜が染色されている腫瘍領域を観察します。

判定： 別々の 4 領域のそれぞれにおける PD-L1 陽性細胞の割合：80 %、25 %、50 %、100 %



Tumor Proportion Score (TPS) の計算：全体の腫瘍領域に対して PD-L1 陽性腫瘍細胞の全割合を決定します。

判定：Tumor Proportion Score (TPS)：

$$(80 \% + 25 \% + 50 \% + 100 \%) / 4 = 60 \%$$

臨床的な判定：TPS $\geq$ 1 %、PD-L1 発現

図 15：PD-L1 陽性領域が不均一な腫瘍の例：

治療対象となる非小細胞肺癌患者の選定

未治療（一次治療）非小細胞肺癌患者に対する PD-L1 IHC 22C3 pharmDx「ダコ」を用いた臨床試験

未治療の非小細胞肺癌患者の PD-L1 発現（TPS $\geq$ 1 %）を評価する PD-L1 IHC 22C3 pharmDx「ダコ」の臨床的妥当性は、Merck Sharp & Dohme Corp 社によるキイトルーダの KEYNOTE-042 試験に基づいています。PD-L1 IHC 22C3 pharmDx「ダコ」を使用して、未治療の非小細胞肺癌患者由来検体の PD-L1 発現試験が行われました。TPS が 1 % 以上であった患者のみが KEYNOTE-042 試験に組み入れられました。

表 3：KEYNOTE-042 試験でスクリーニングされた非小細胞肺癌患者（N=1274）における患者特性 *

PD-L1 発現レベル	TPS 1 ～ 49 %	TPS $\geq$ 50 %
患者の割合（%）	53 %	47 %

* 割合は、PD-L1 発現（TPS $\geq$ 1 %）の患者に基づいて算出しました。腫瘍に PD-L1 発現が認められない患者は除外しました。

PD-L1 IHC 22C3 pharmDx「ダコ」 検査の流れ

以下のフローチャートを用いて、TPS に基づいてどの患者がキイトルーダ（ペムブロリズマブ）治療適応となるかを確認することができます。

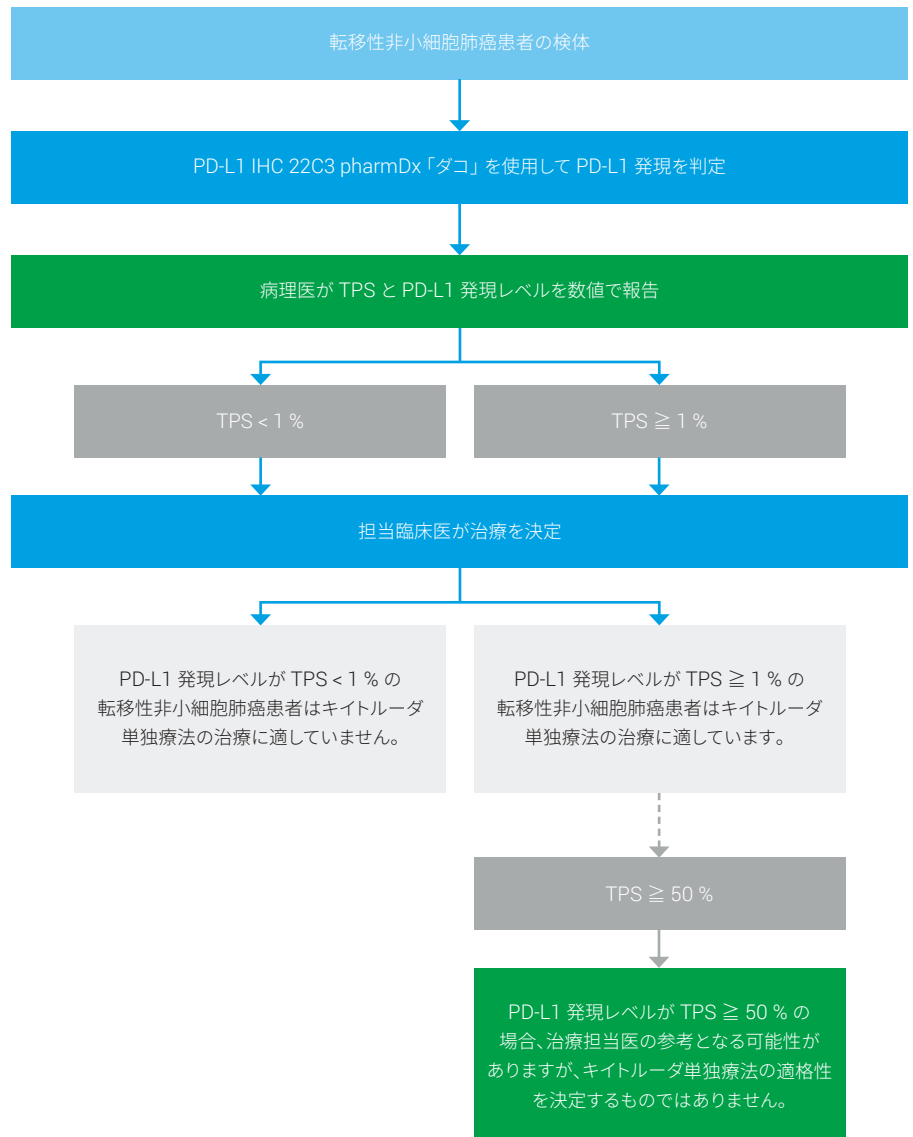


図 16 : PD-L1 IHC 22C3 pharmDx「ダコ」の検査計画

結果の報告

PD-L1 IHC 22C3 pharmDx「ダコ」の結果報告の際には下記の内容を含めることが推奨されます。

PD-L1 IHC 22C3 pharmDx「ダコ」の検査内容など：

検査日： _____

PD-L1 IHC 22C3 pharmDx「ダコ」(型番：SK00621-5J)、ロット番号： _____

または

PD-L1 IHC 22C3 pharmDx「ダコ」(型番：GE00621-5J)、ロット番号： _____

(本装置で使用了試薬すべてのロット番号を記録してください)

染色実行ログ 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： _____

施設の非小細胞肺癌パネルに PD-L1 が含まれている： はい： ☐ いいえ： ☐

組織タイプ： 扁平上皮癌： ☐ 非扁平上皮癌： ☐

染色結果：

本品中のコントロールスライド染色結果： 合： ☐ 否： ☐

十分な腫瘍細胞数（100 個以上）： ☐

治療担当医への結果報告

Tumor Proportion Score (TPS)： _____

TPS < 1 %： ☐ TPS ≥ 1 %： ☐

TPS ≥ 50 %： ☐

注意事項：PD-L1 発現レベルが TPS ≥ 50 % の場合、治療担当医の参考となる可能性がありますが、キイトルーダ（ペムブロリズマブ）単独療法の適格性を決定するものではありません。

PD-L1 染色の特徴

PD-L1 IHC 22C3 pharmDx「ダコ」 での染色結果判定における 注意事項

結果を正しく判定するためには、以下の内容が重要です。

- － 生存腫瘍細胞が 100 個以上存在している。
- － 適切な細胞を評価している—生存腫瘍細胞のみを判定する必要があります。
- － 適切な細胞局在を特定している—腫瘍細胞の細胞膜染色のみを評価する必要があります。
- － 染色は適切に判定されている。

病理医の経験と判断が PD-L1 陽性の評価に重要です。免疫組織化学染色および判定の評価には、10 倍、20 倍、40 倍の拡大倍率での観察が適しています。

ただし、Tumor Proportion Score (TPS) の算出時に検討すべきいくつかの染色性の特徴を以下に示します。

- － すべての強度 (1 ～ 3+) の腫瘍細胞の細胞膜染色を含めます。
- － 部分的または完全な細胞膜染色を含めます。
- － はっきりと確認できる腫瘍細胞の細胞膜染色を含めます。
- － 細胞質染色は含め**ない**でください。
- － 浸潤性のリンパ球やマクロファージなどの免疫細胞は含め**ない**でください。
- － 顆粒状の染色は、明らかに細胞膜と判定できる細胞のみを含めます。

以下のページに種々の染色性に関するガイダンスを示します。

非小細胞肺癌症例のさまざまな 染色像とその解釈

明らかな細胞膜染色

スコアリングには強度 1+ 以上でいずれの倍率でもはっきりと確認できる細胞膜染色を含めます。明らかな細胞膜染色を確認するには、より高倍率での確認が必要になることがあります。

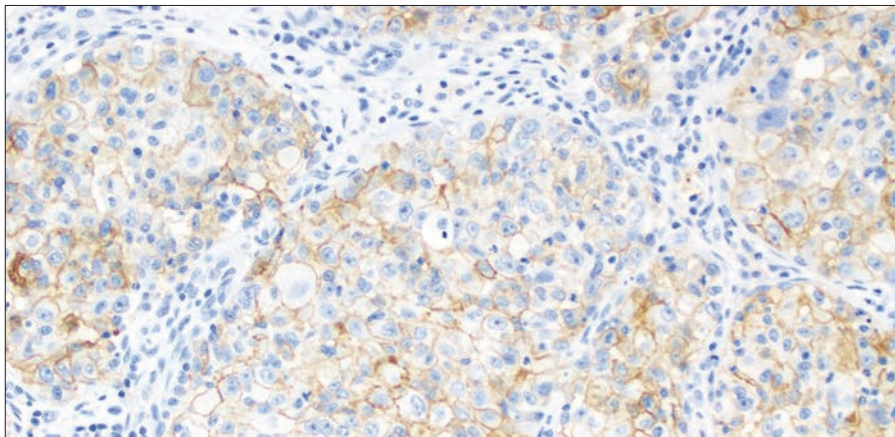


図 17a: PD-L1 (型番: SK00621-5J) で染色した非小細胞肺癌検体 (対物レンズ 10 倍)。弱い細胞膜染色を呈する腫瘍細胞が認められます。

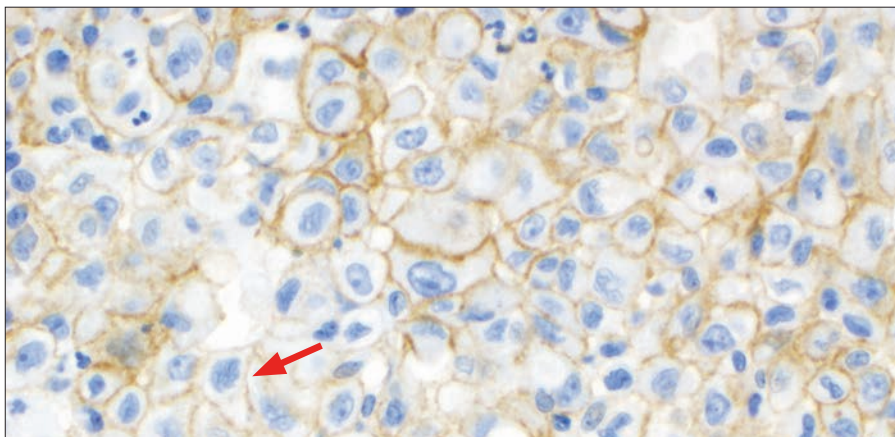


図 17b: PD-L1 (型番: SK00621-5J) で染色した非小細胞肺癌検体 (対物レンズ 40 倍)。染色強度は弱いものの、腫瘍細胞に明らかな細胞膜染色が認められます (矢印)。

重要なポイント

腫瘍細胞の明らかな細胞膜染色 ($\geq 1+$) を TPS に含めます。

染色強度が弱陽性の細胞膜染色

染色強度が 1+ でも、細胞膜染色と明らかに判断できる細胞はすべてスコアリングに含めます。

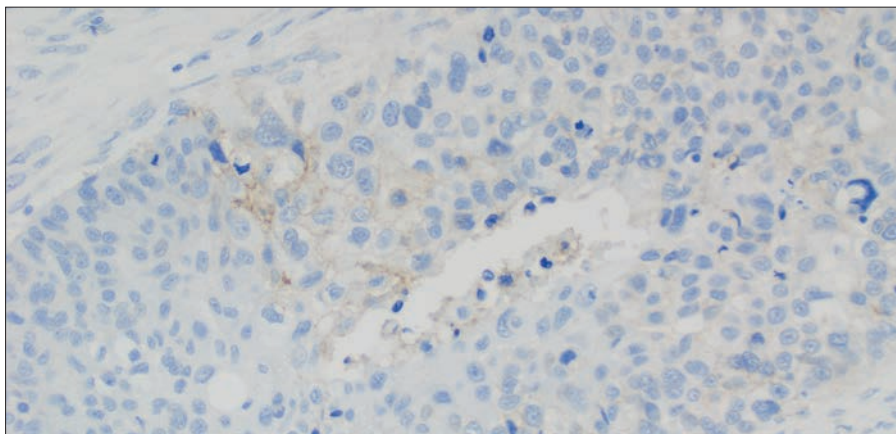


図 18a：PD-L1（型番：SK00621-5J）で染色した非小細胞肺癌検体（対物レンズ 20 倍）。染色強度は弱いものの、腫瘍細胞に明らかな細胞膜染色が認められます。

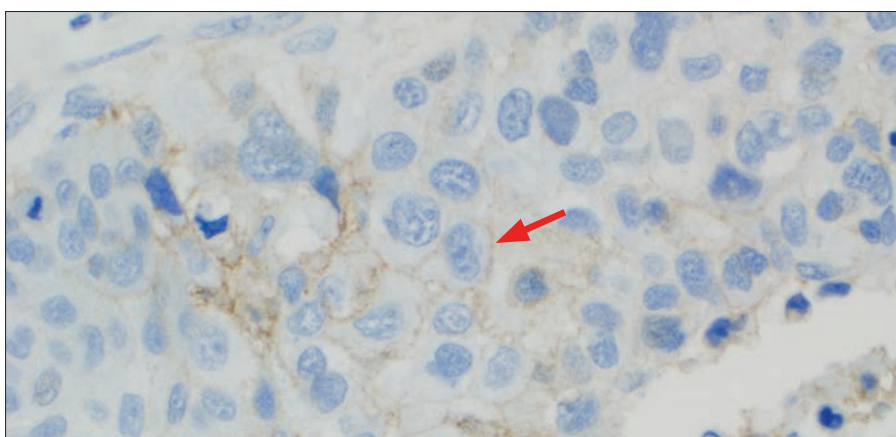


図 18b：PD-L1（型番：SK00621-5J）で染色した非小細胞肺癌検体（対物レンズ 40 倍）。染色強度は弱いものの、腫瘍細胞に明らかな細胞膜染色が認められます（矢印）。

重要なポイント

弱陽性でも腫瘍細胞のはっきりとした細胞膜染色（1+）は TPS に含めます。

腫瘍細胞と免疫細胞の区別

スコアリングには細胞膜が染色されている ($\geq 1+$) すべての生存腫瘍細胞のみを含めます。腫瘍関連免疫細胞はスコアリングから除外します。

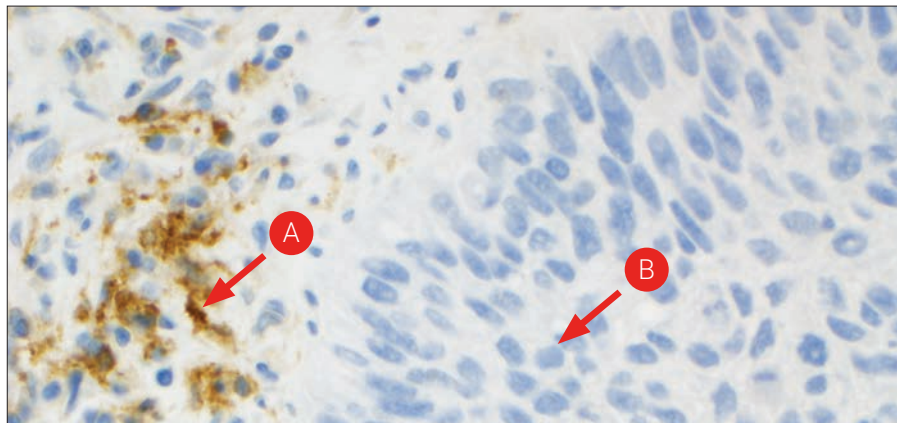


図 19 : PD-L1 (型番 : SK00621-5-J) で染色された非小細胞肺癌。(A) 強く染色された免疫細胞および (B) PD-L1 陰性の腫瘍細胞。免疫細胞はスコアリングから除外します (対物レンズ 20 倍)。

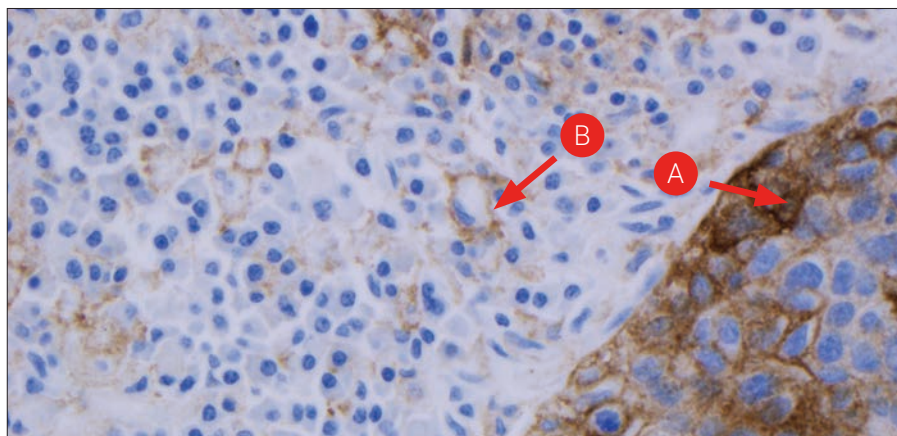


図 20 : PD-L1 (型番 : SK00621-5-J) で染色した非小細胞肺癌検体 (対物レンズ 20 倍)。(A) 強陽性を認める腫瘍細胞および (B) 中程度に染色された免疫細胞。免疫細胞の染色はスコアリングから除外します。

重要なポイント

免疫細胞は TPS から除外します。

不均一な染色強度

非小細胞肺癌の PD-L1 細胞膜染色は多くの場合不均一で、さまざまな染色強度が存在します (1 ~ 3+)。

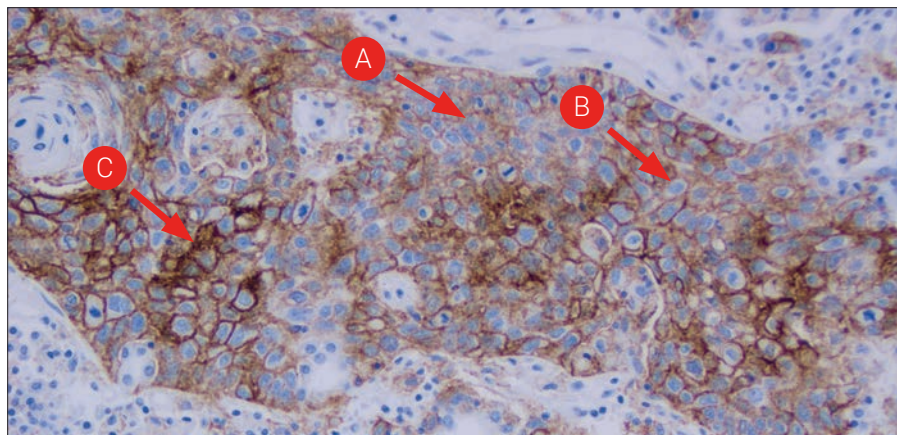


図 21 : PD-L1 (型番 : SK00621-5J) で染色した非小細胞肺癌検体。さまざまな強度で不均一な細胞膜染色パターンが認められます : (A) 強度 1+、(B) 強度 2+、(C) 強度 3+ (対物レンズ 20 倍)。

重要なポイント

すべての強度 (1~3+) の膜染色を呈する腫瘍細胞を TPS に含めます。

部分的または完全な細胞膜染色

スコアリングには強度 1+ 以上の部分的または完全な細胞膜染色を示す生存腫瘍細胞を含めます。

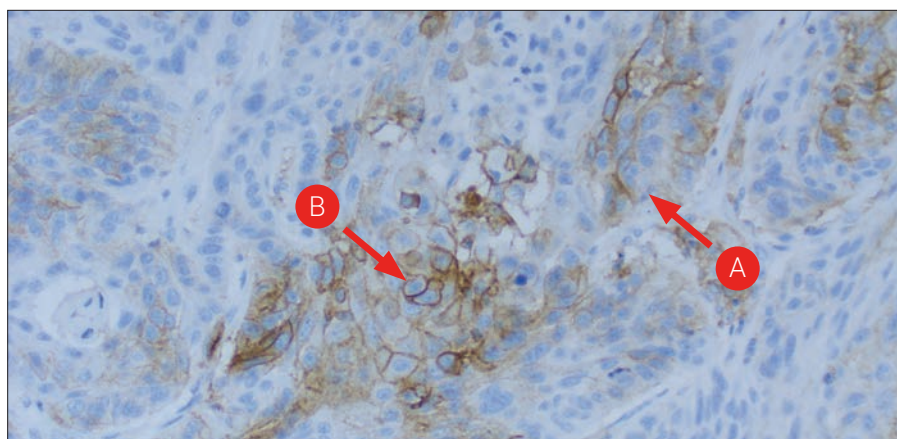


図 22 : PD-L1 (型番 : SK00621-5J) で染色した非小細胞肺癌検体 (対物レンズ 20 倍)。
さまざまな強度 (1 ~ 3+) で不均一な細胞膜染色パターンが認められます : 腫瘍細胞の (A) 部分的な細胞膜染色および (B) 完全な細胞膜染色。

重要なポイント

腫瘍細胞の部分的または完全な細胞膜染色 ($\geq 1+$) を TPS に含めます。

細胞質染色および細胞膜染色

腫瘍細胞は細胞質染色または細胞膜染色を示す場合があります。細胞質染色は TPS スコアリング評価から除外します。

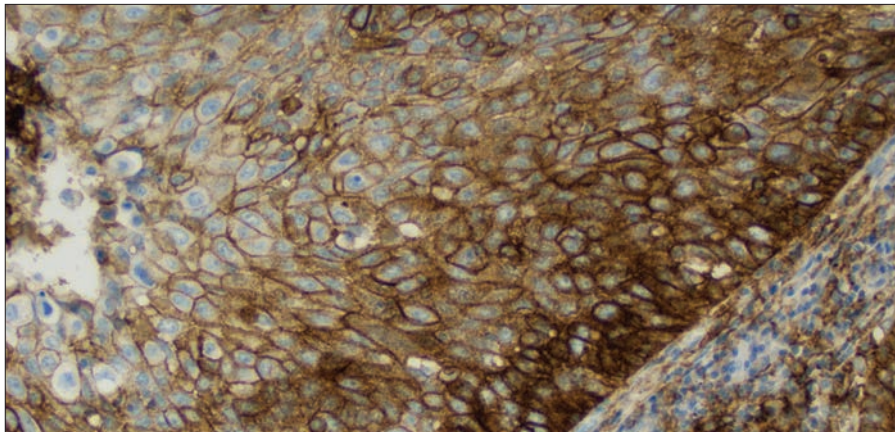


図 23:PD-L1 (型番:SK00621-5J) で染色した非小細胞肺癌検体 (対物レンズ 20 倍)。強い細胞質染色と細胞膜染色を呈する腫瘍細胞が認められます。

重要なポイント

細胞膜が染色された腫瘍細胞のみを TPS に含めます。

顆粒状の染色

PD-L1 細胞膜染色は、染色パターンが顆粒状に見える場合、区別できないことがあります。顆粒状染色は判定が難しく、細胞質染色と簡単に混同することがあります。明らかに細胞膜染色と認識できる細胞のみを TPS スコアに含めます。

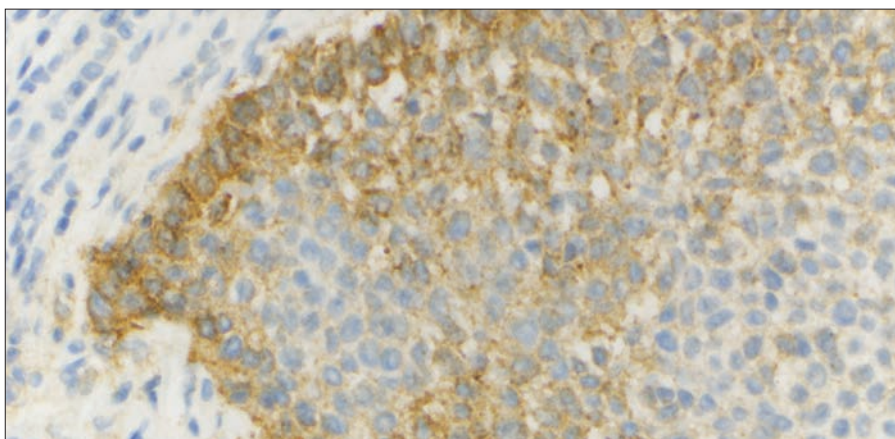


図 24 : PD-L1 (型番 : SK00621-5J) で染色した非小細胞肺癌検体 (対物レンズ 20 倍)。
ほとんどの腫瘍細胞では、顆粒状染色ですが細胞膜染色であることがはっきりと認識できます。

重要なポイント

顆粒状の染色を呈する腫瘍細胞は、明らかに細胞膜と判定できる細胞のみを TPS に含めます。

不均一な染色

非小細胞肺癌の PD-L1 染色は組織検体全体に偏り（不均一性）のある染色性を呈することがあります。正しいスコアリングを行うため、高倍率で検体の各領域を確認する必要があります。

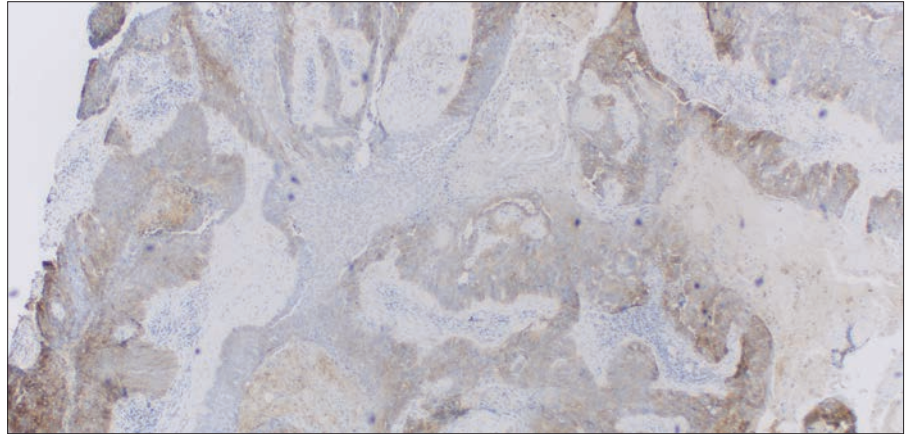


図 25：PD-L1（型番：SK00621-5.J）で染色した非小細胞肺癌検体（対物レンズ 10 倍）。組織検体全体に不均一な染色性を認めます。

重要なポイント

正確な TPS を決定するために検体全体を評価します。

炭粉色素

炭粉色素は煙や炭塵の吸引から肺に炭素が蓄積したものです。炭粉色素は顆粒状の黒い斑点として現れますが、炭粉色素は肺胞マクロファージ内にあり、腫瘍細胞内にはないため、腫瘍細胞と免疫細胞の区別に役立つことがよくあります。

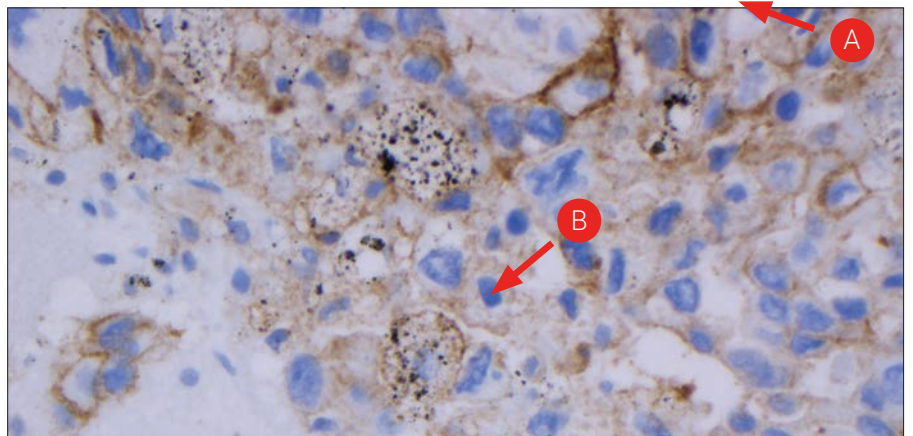


図 26：PD-L1（型番：SK00621-5.J）で染色した非小細胞肺癌検体（対物レンズ 20 倍）。(A) 強陽性を認める腫瘍細胞および (B) 中程度に染色された免疫細胞。免疫細胞の染色はスコアリングから除外します。

重要なポイント

炭粉色素は評価しないでください。

PD-L1 IHC 22C3 pharmDx「ダコ」(型番：SK00621-5J) の TPS < 1 % の症例

症例 1：TPS < 1 %

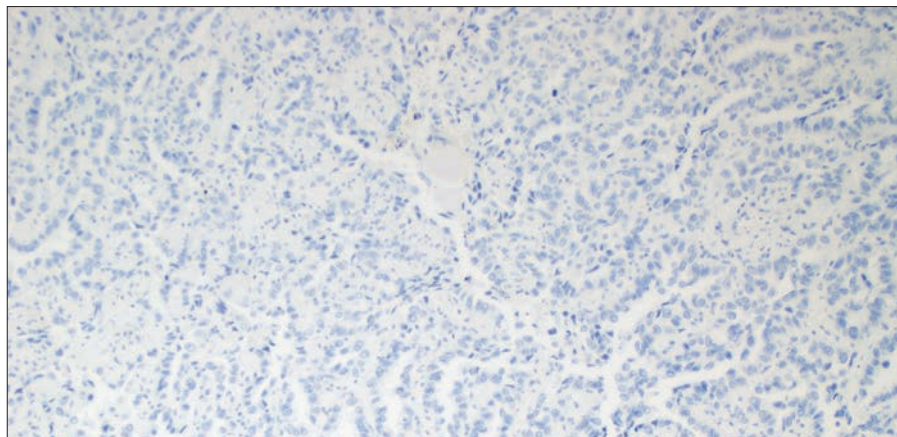


図 27a:対物レンズ 10 倍

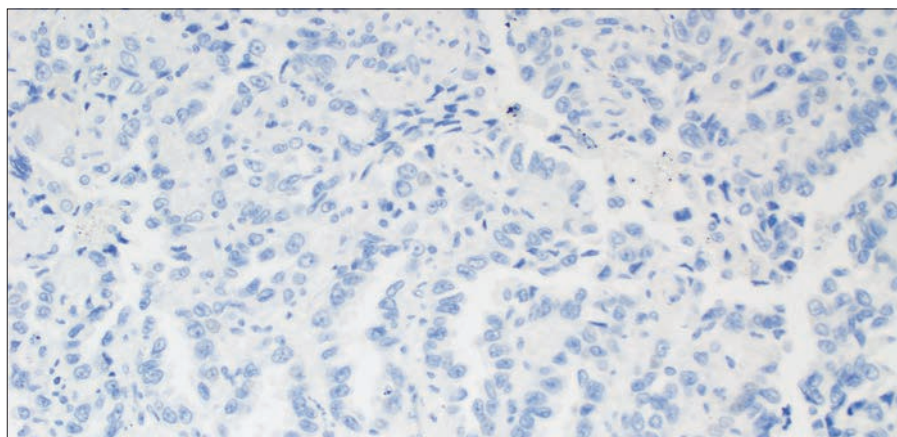


図 27b:対物レンズ 20 倍

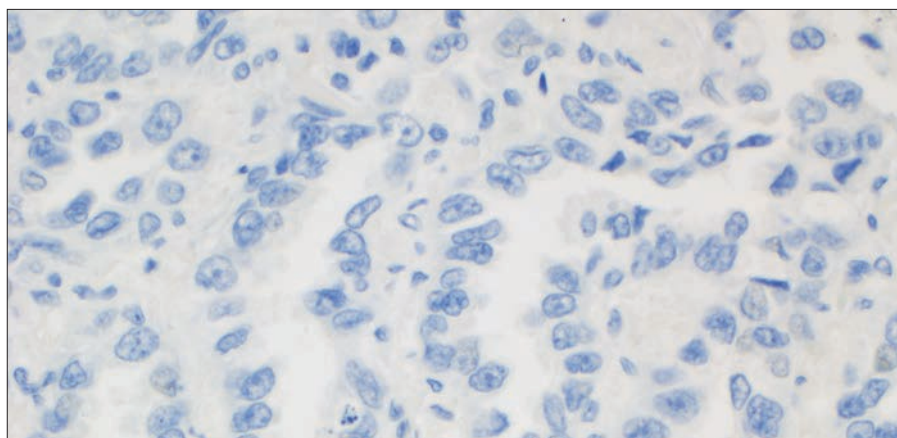


図 27c:対物レンズ 40 倍

図 27a ~ 27c：TPS < 1 % を示す PD-L1 (型番：SK00621-5J) で染色した
非小細胞肺癌検体。

症例 2 : TPS < 1 %

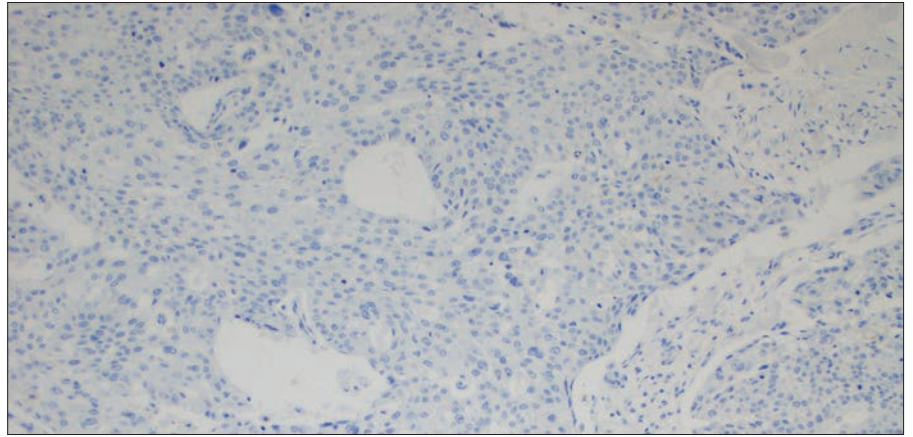


図 28a:対物レンズ 10 倍

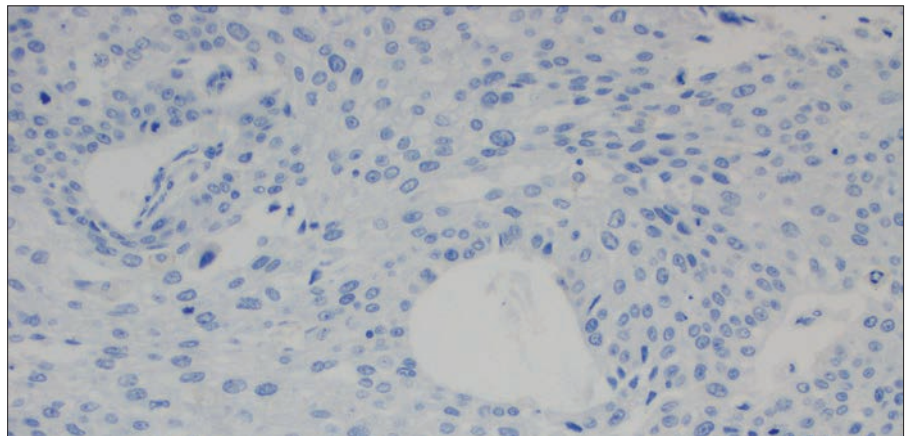


図 28b:対物レンズ 20 倍

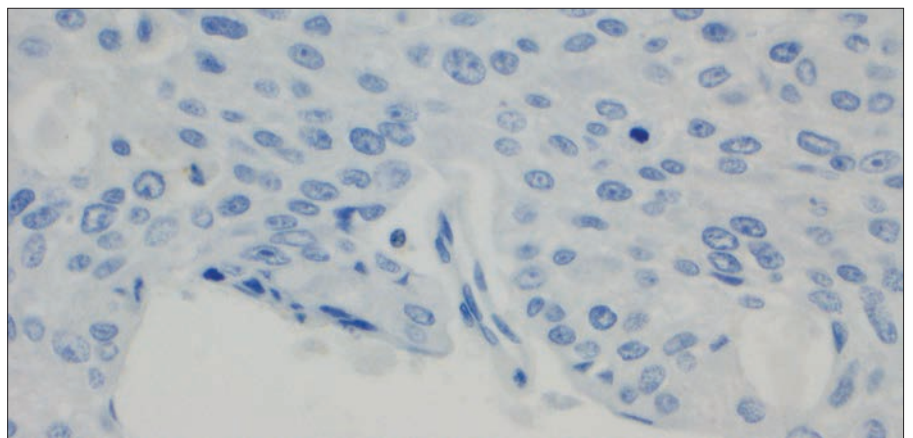


図 28c:対物レンズ 40 倍

図 28a ~ 28c : TPS < 1 % を示す PD-L1 (型番 : SK00621-5J) で染色した非小細胞肺癌検体。

症例 3 : TPS < 1 %

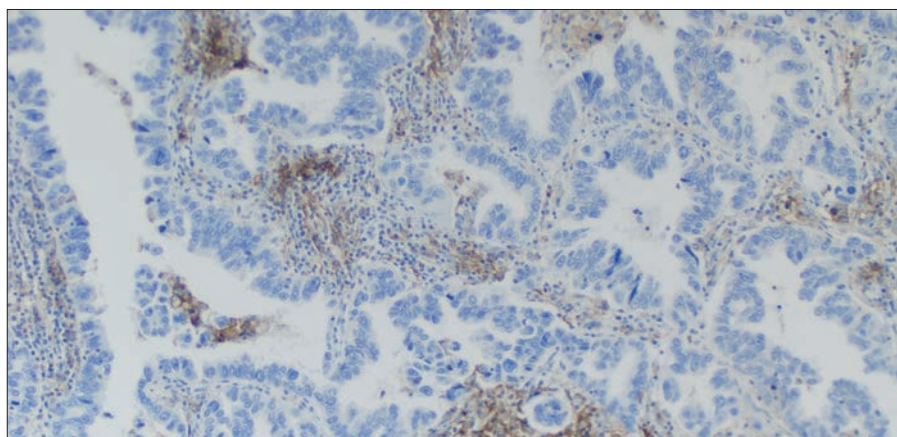


図 29a: 対物レンズ 10 倍

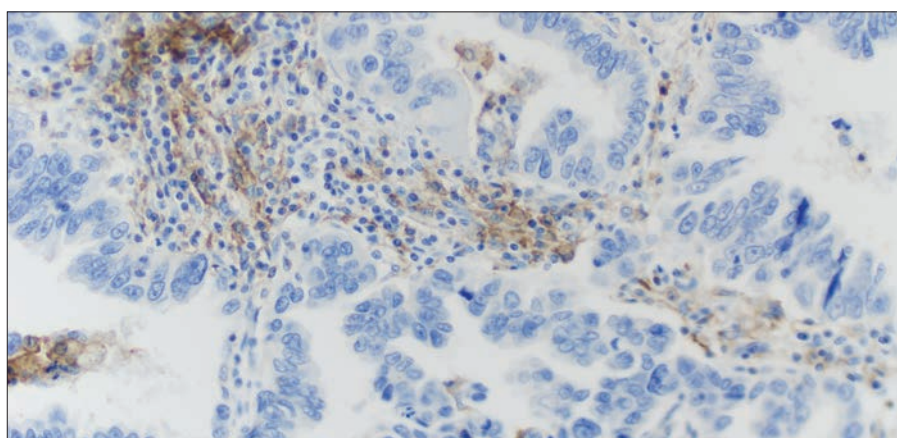


図 29b: 対物レンズ 20 倍

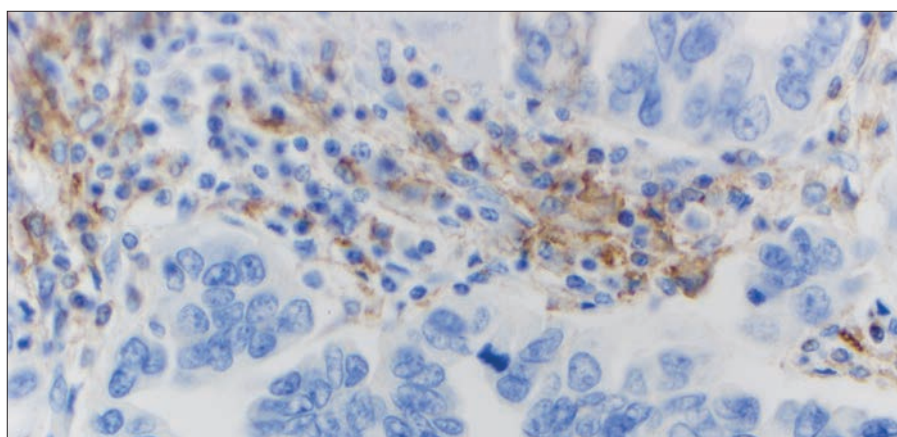


図 29c: 対物レンズ 40 倍

図 29a ~ 29c : TPS < 1 % を示す PD-L1 (型番 : SK00621-5J) で染色した非小細胞肺癌検体。免疫細胞は染色されていますが、スコアリングから除外します。

症例 4:TPS < 1 %

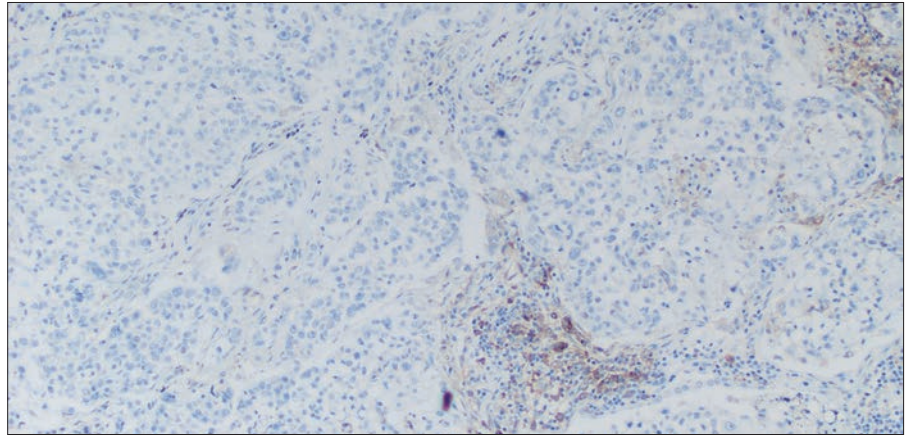


図 30a:対物レンズ 10 倍

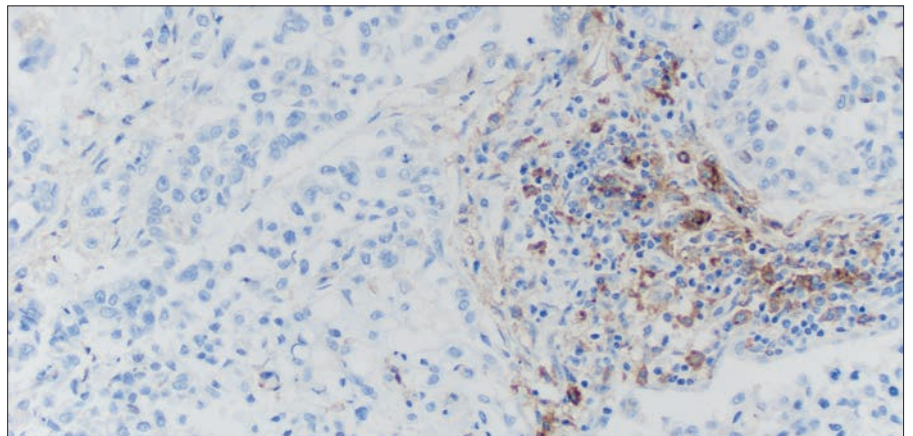


図 30b:対物レンズ 20 倍

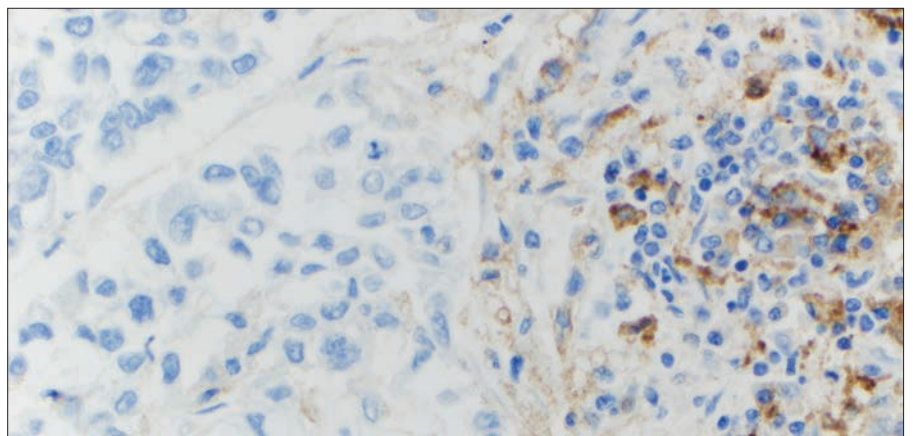


図 30c:対物レンズ 40 倍

図 30a ~ 30c : TPS < 1 % を示す PD-L1 (型番 : SK00621-5J) で染色した非小細胞肺癌検体。免疫細胞は染色されていますが、スコアリングから除外します。

PD-L1 IHC 22C3 pharmDx「ダコ」(型番：SK00621-5J) の TPS 0 ～ 10 % の症例

判定が困難な症例 1：

TPS 0 ～ 10 %

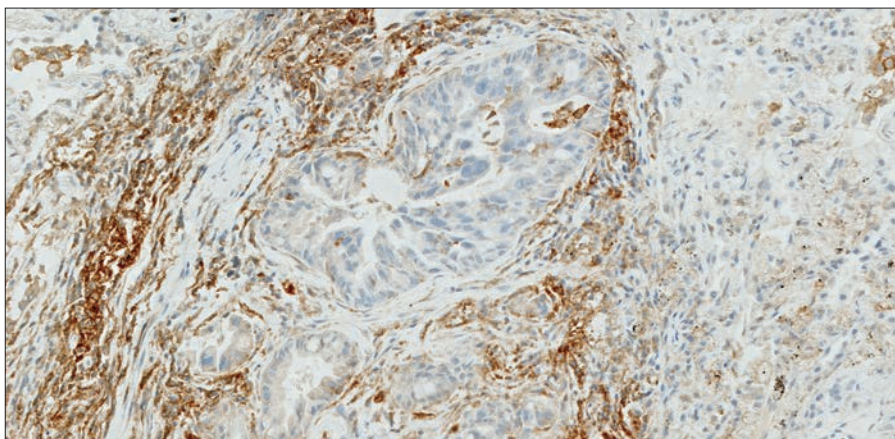


図 31a: 対物レンズ 10 倍

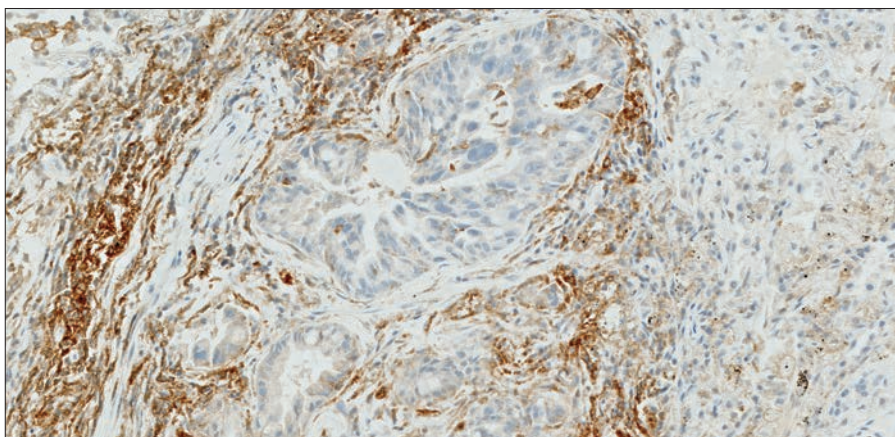


図 31b: 対物レンズ 20 倍

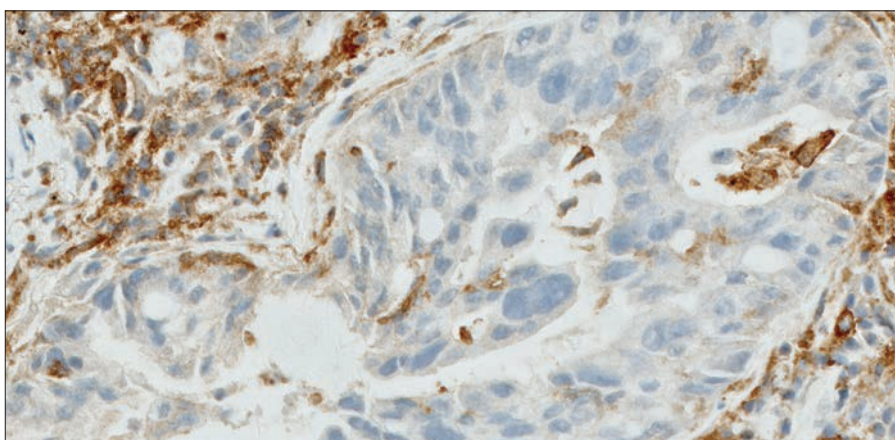


図 31c: 対物レンズ 40 倍

図 31a ～ 31c：TPS < 1 % を示す PD-L1 (型番：SK00621-5J) で染色した
非小細胞肺癌検体。

判定が困難な症例 2 :
TPS 0 ~ 10 %

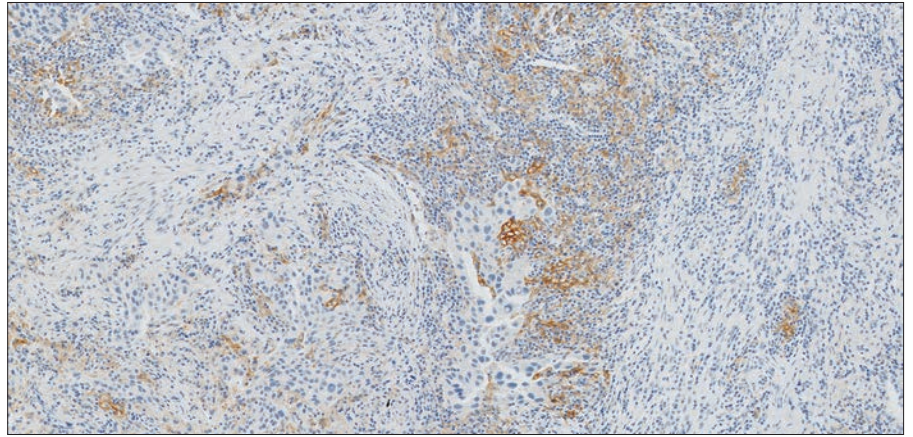


図 32a: 対物レンズ 10 倍

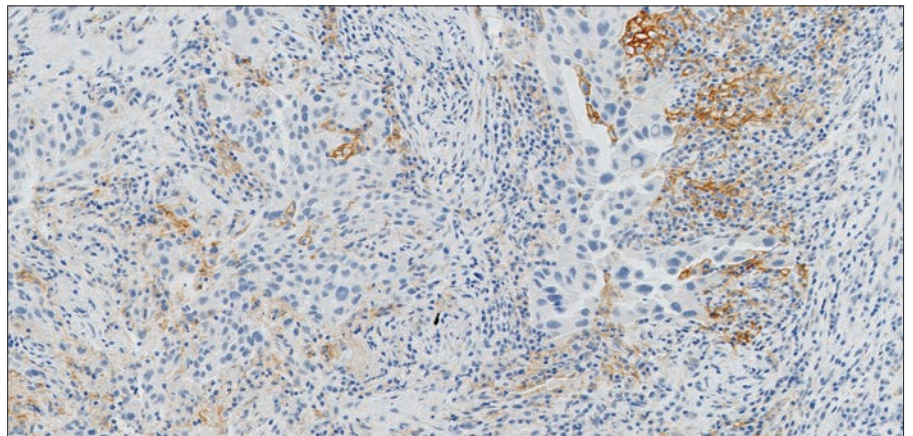


図 32b: 対物レンズ 20 倍

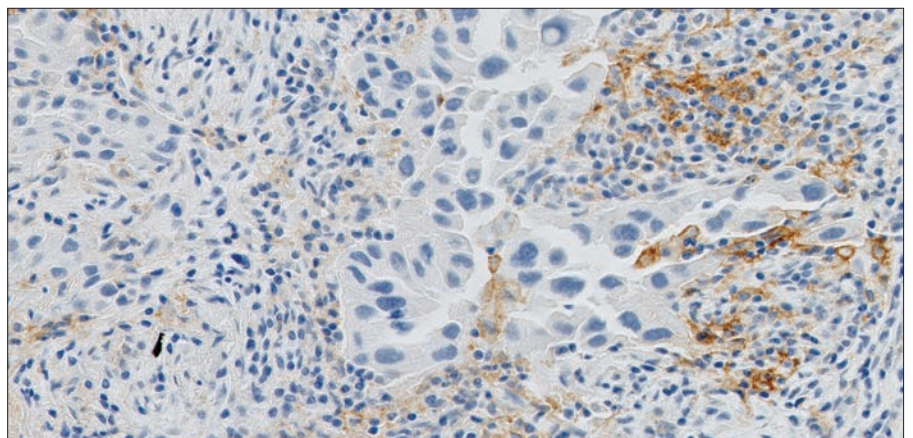


図 32c: 対物レンズ 40 倍

図 32a ~ 32c : TPS < 1 % を示す PD-L1 (型番 : SK00621-5J) で染色した非小細胞肺癌検体。

判定が困難な症例 3 :
TPS 0 ~ 10 %

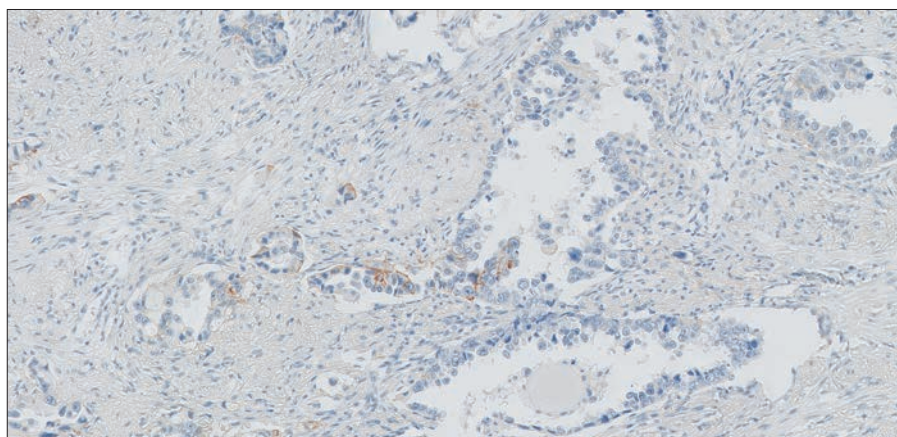


図 33a: 対物レンズ 10 倍

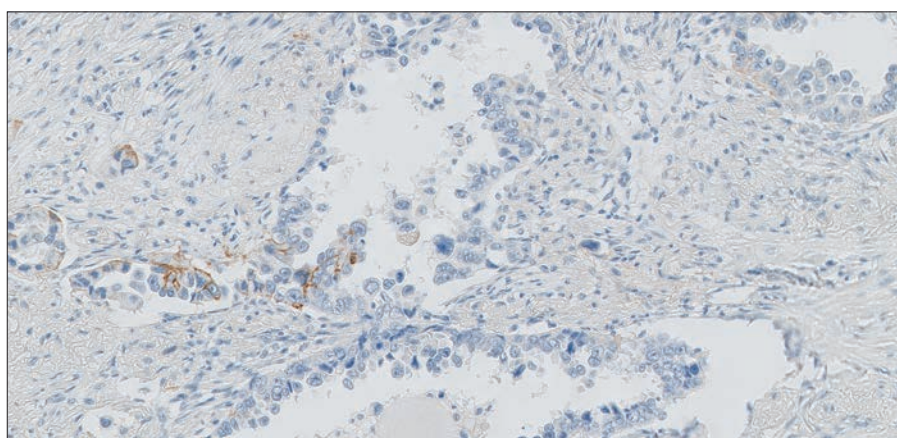


図 33b: 対物レンズ 20 倍

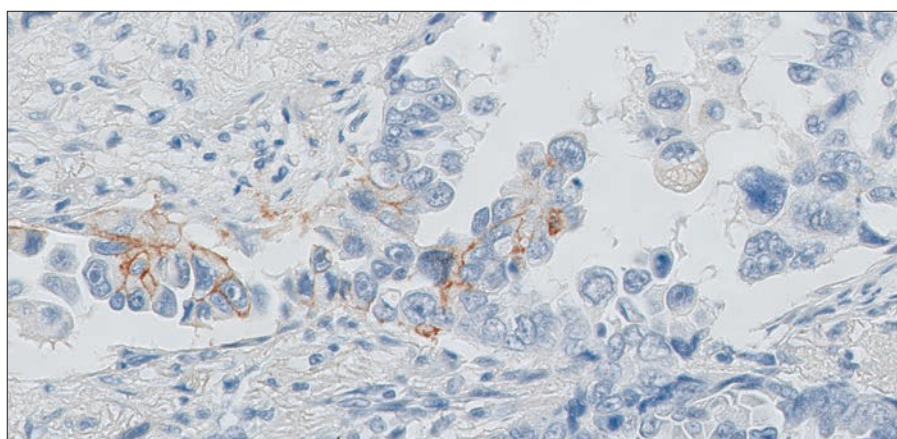


図 33c: 対物レンズ 40 倍

図 33a ~ 33c : TPS 1 ~ 10 % を示す PD-L1 (型番 : SK00621-5J) で染色した非小細胞肺癌検体。

判定が困難な症例 4：
TPS 0 ～ 10 %

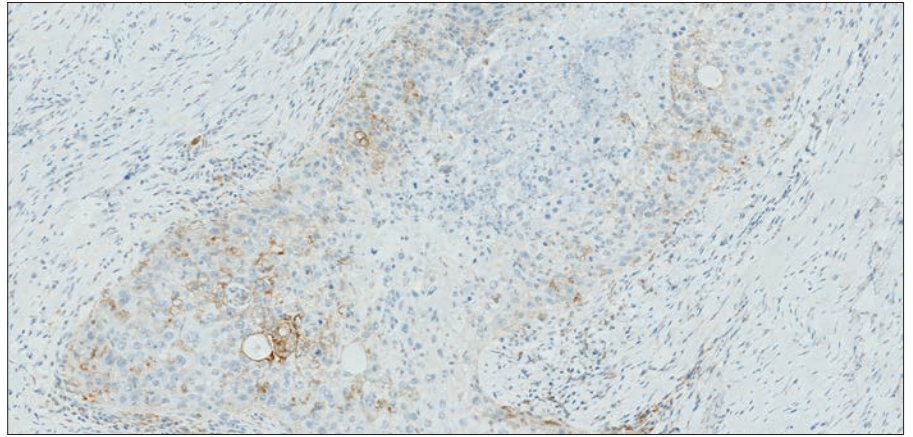


図 34a: 対物レンズ 10 倍

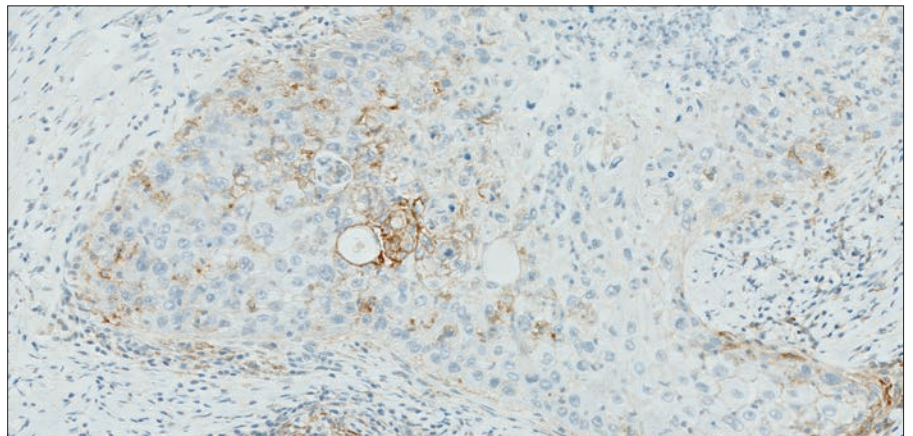


図 34b: 対物レンズ 20 倍

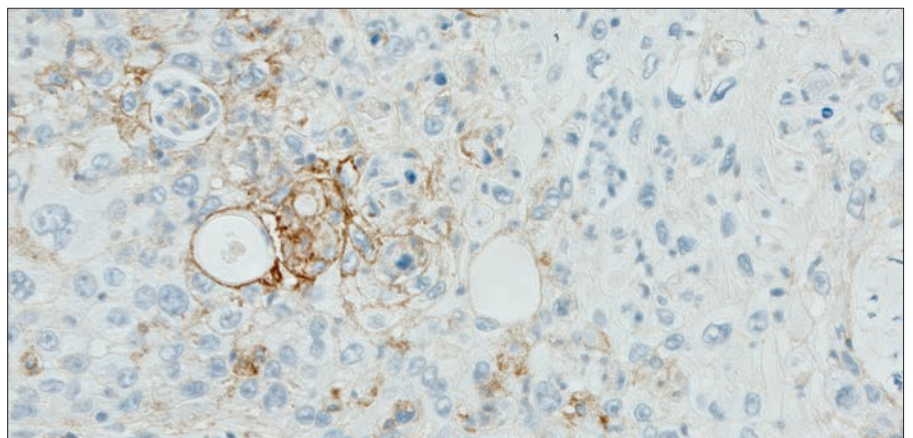


図 34c: 対物レンズ 40 倍

図 34a ～ 34c : TPS 1 ～ 10 % を示す PD-L1 (型番 : SK00621-5J) で染色した非小細胞肺癌検体。

判定が困難な症例 5 :
TPS 0 ~ 10 %

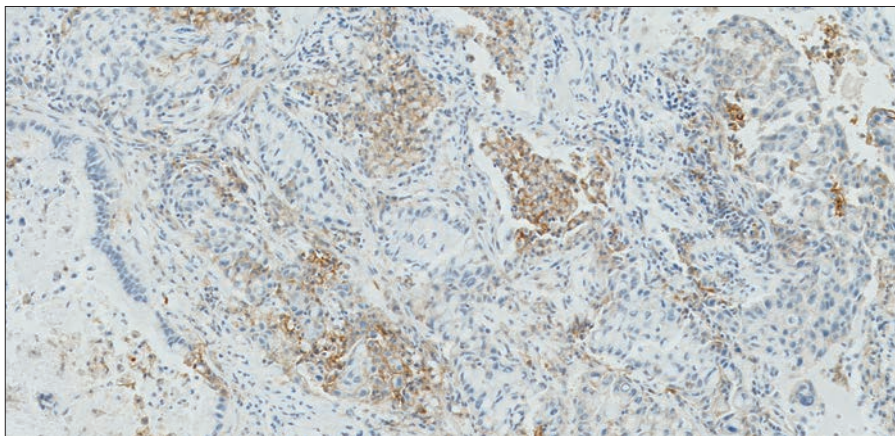


図 35a: 対物レンズ 10 倍

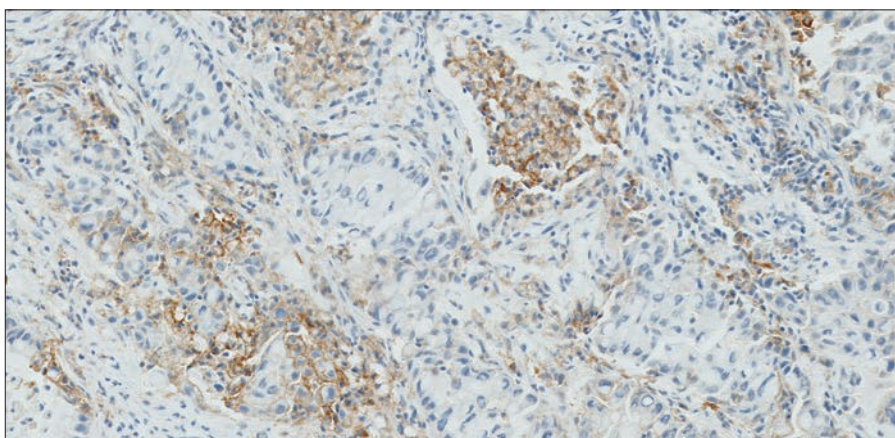


図 35b: 対物レンズ 20 倍

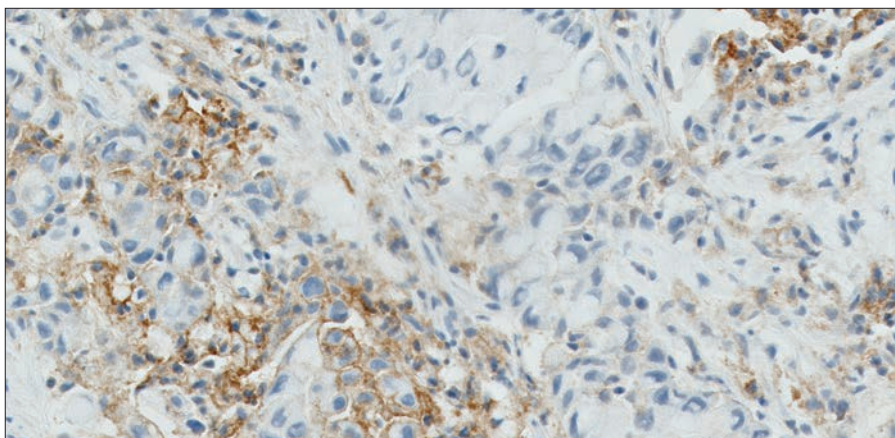


図 35c: 対物レンズ 40 倍

図 35a ~ 35c : TPS 1 ~ 10 % を示す PD-L1 (型番 : SK00621-5J) で染色した非小細胞肺癌検体。

PD-L1 IHC 22C3 pharmDx「ダコ」(型番：SK00621-5J) の TPS 1 ～ 49 % の症例

症例 5 : TPS 1 ～ 49 %

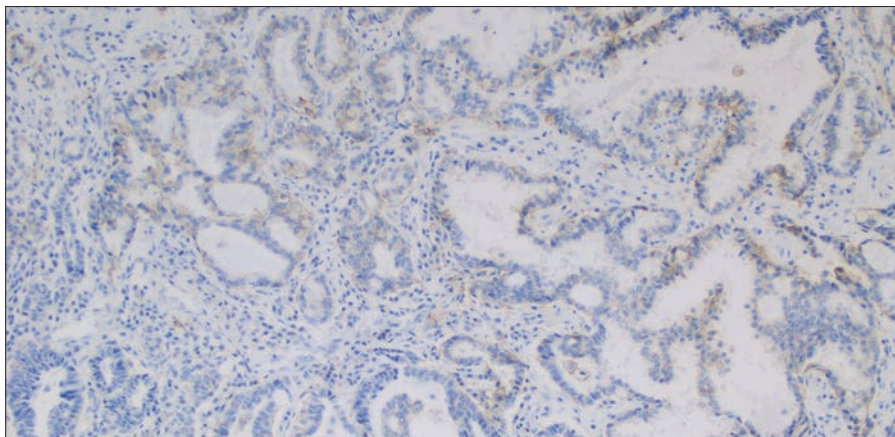


図 36a: 対物レンズ 10 倍

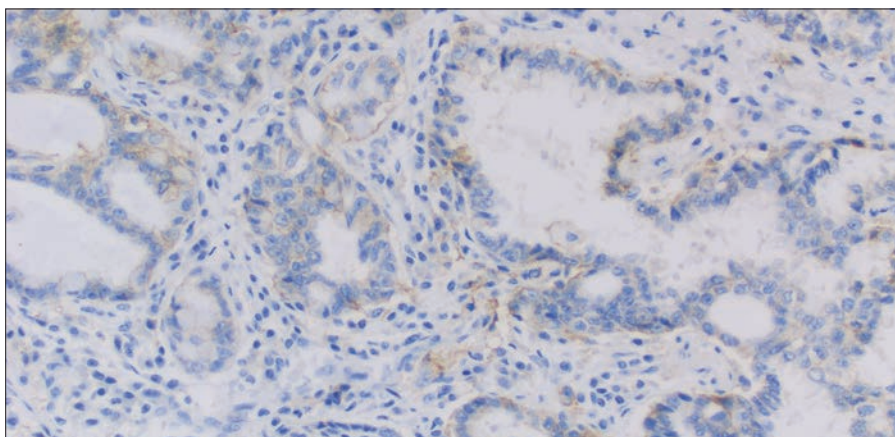


図 36b: 対物レンズ 20 倍

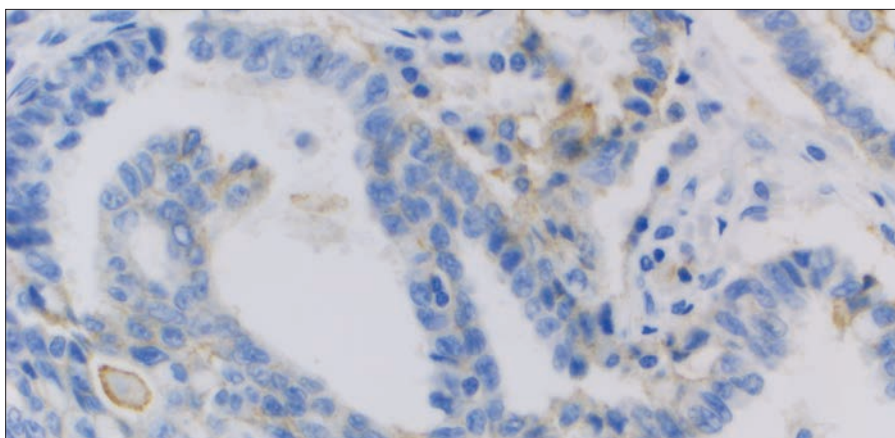


図 36c: 対物レンズ 40 倍

図 36a ～ 36c : TPS 1 ～ 49 % を示す PD-L1 (型番：SK00621-5J) で染色した非小細胞肺癌検体。

症例 6 : TPS 1 ~ 49 %

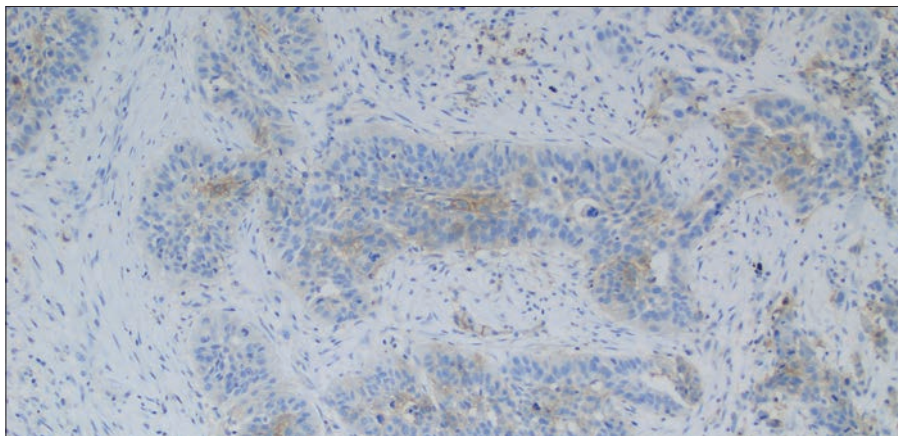


図 37a: 対物レンズ 10 倍

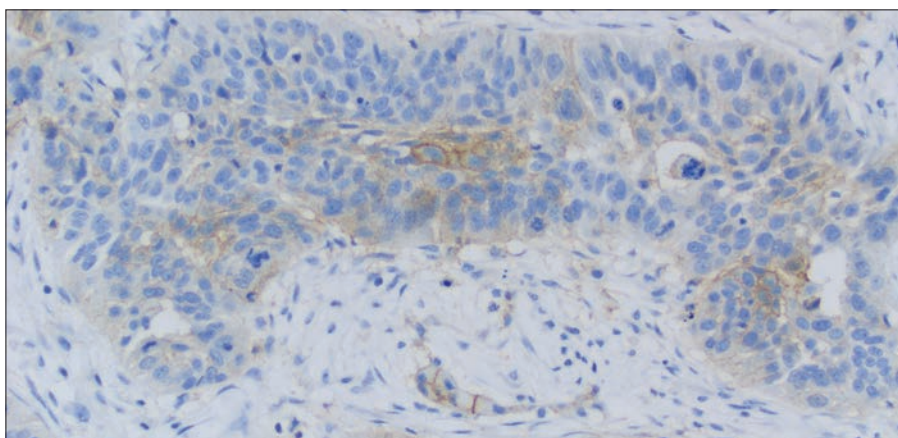


図 37b: 対物レンズ 20 倍

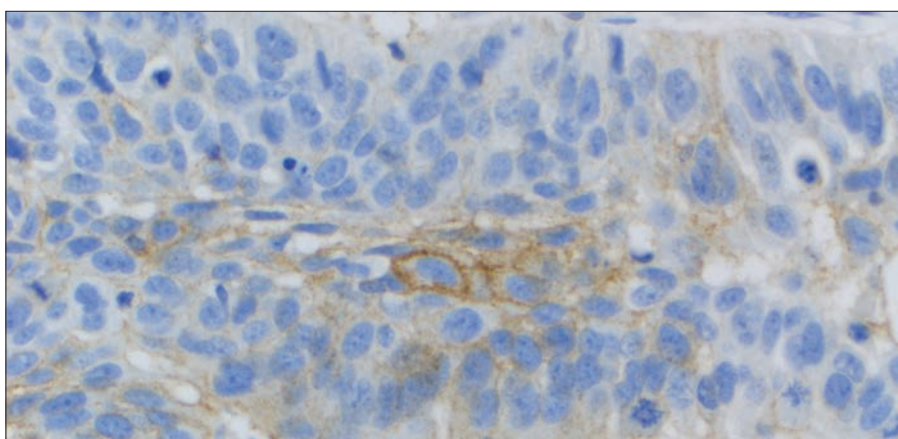


図 37c: 対物レンズ 40 倍

図 37a ~ 37c : TPS 1 ~ 49 % を示す PD-L1 (型番 : SK00621-5J) で染色した非小細胞肺癌検体。

症例 7 : TPS 1 ~ 49 %

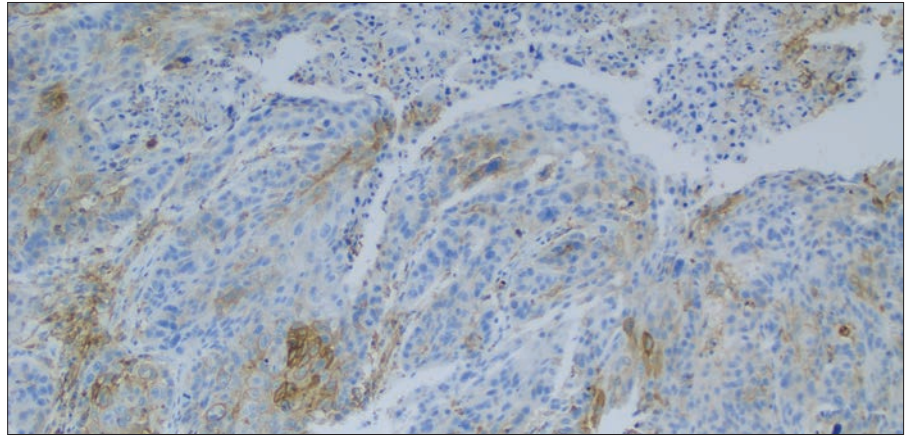


図 38a:対物レンズ 10 倍

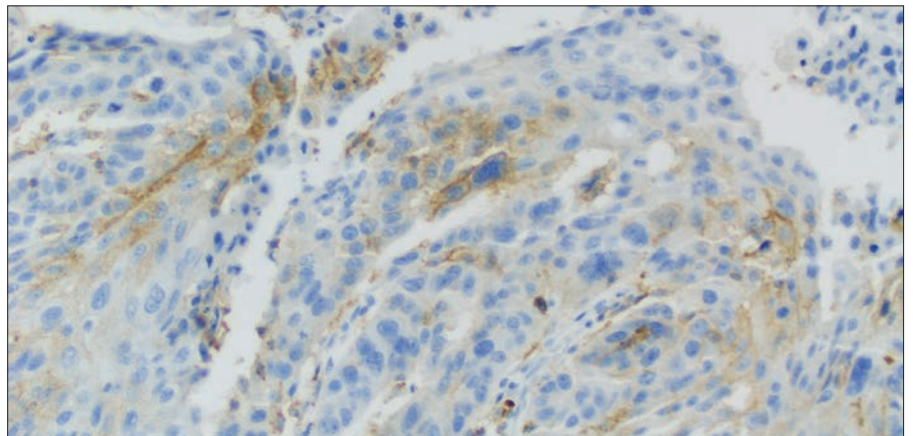


図 38b:対物レンズ 20 倍

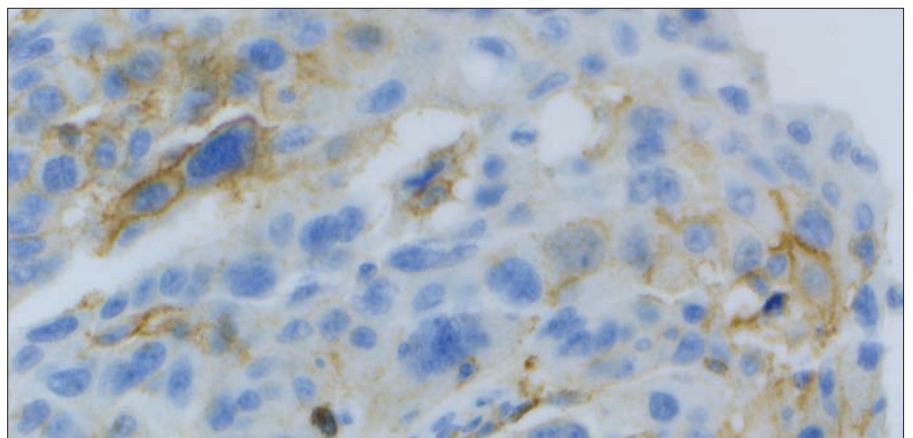


図 38c:対物レンズ 40 倍

図 38a ~ 38c : TPS 1 ~ 49 % を示す PD-L1 (型番 : SK00621-5J) で染色した非小細胞肺癌検体。

症例 8 : TPS 1 ~ 49 %

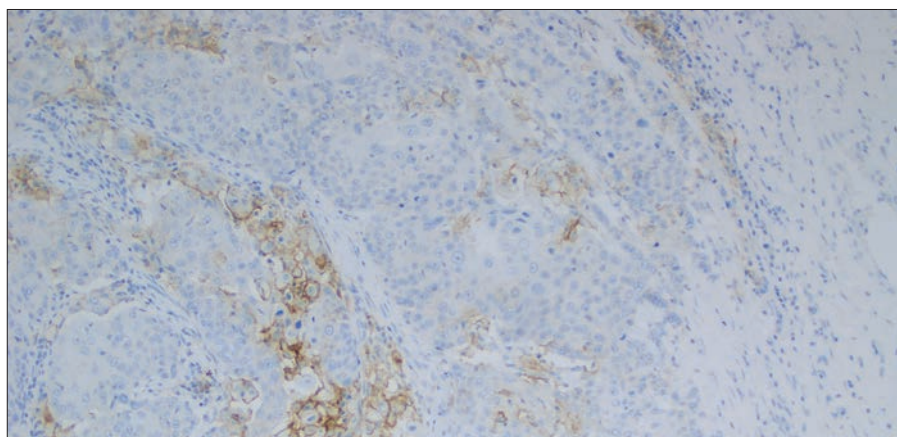


図 39a:対物レンズ 10 倍

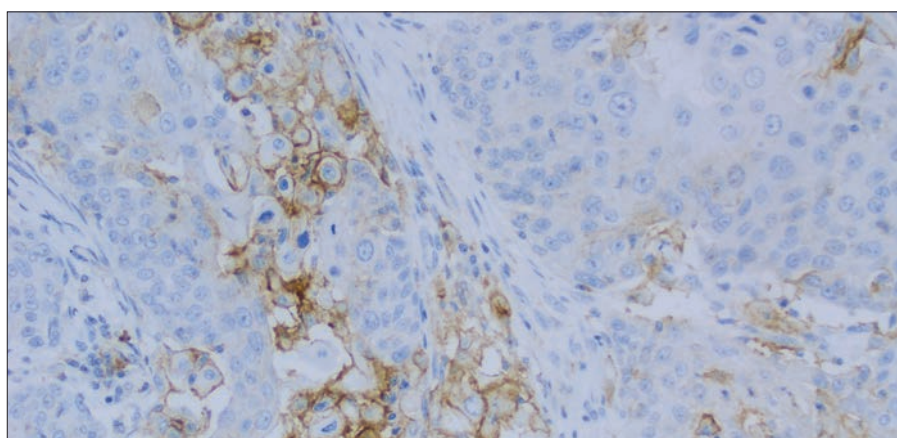


図 39b:対物レンズ 20 倍

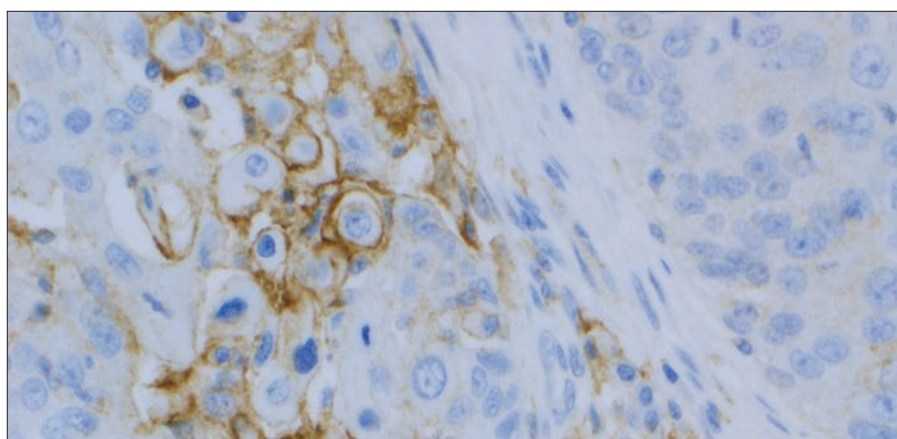


図 39c:対物レンズ 40 倍

図 39a ~ 39c : TPS 1 ~ 49 % を示す PD-L1 (型番 : SK00621-5J) で染色した非小細胞肺癌検体。

PD-L1 IHC 22C3 pharmDx「ダコ」(型番：SK00621-5J) の TPS $\geq$ 50 % の症例

症例 9: TPS $\geq$ 50 %

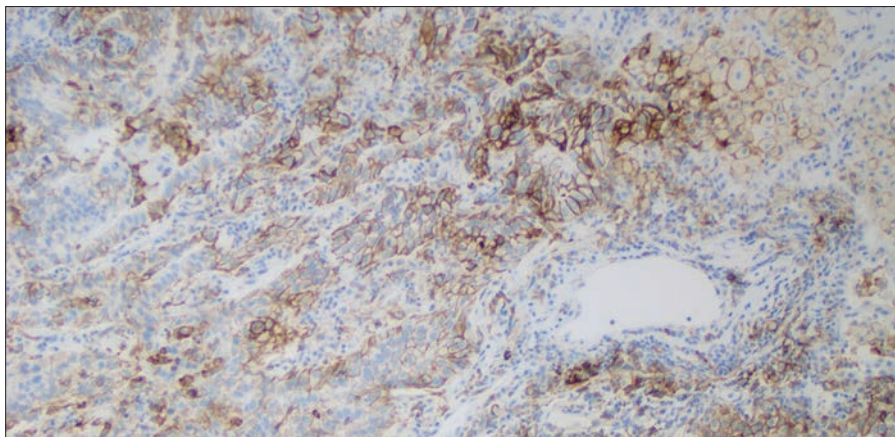


図 40a: 対物レンズ 10 倍

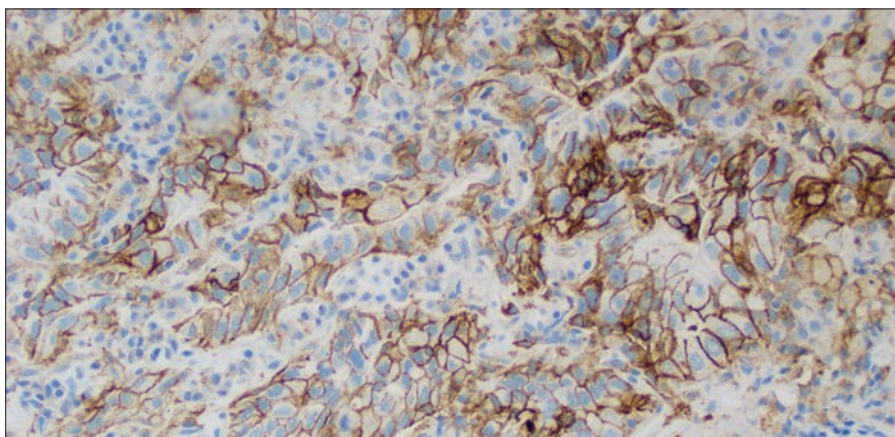


図 40b: 対物レンズ 20 倍

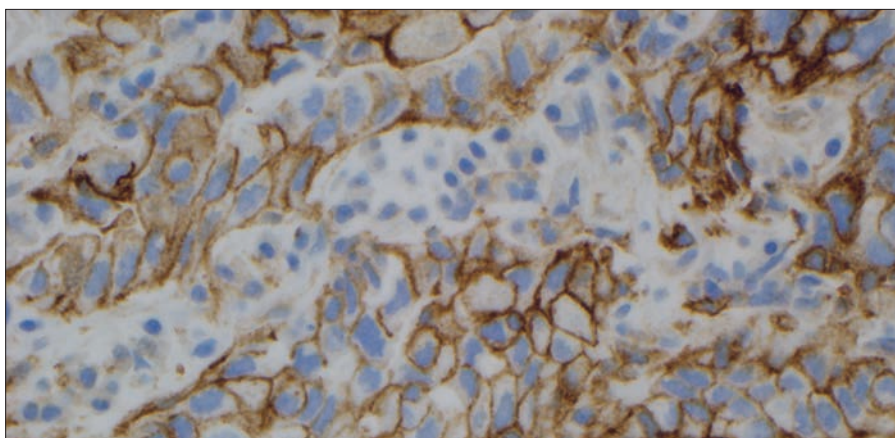


図 40c: 対物レンズ 40 倍

図 40a ~ 40c : TPS $\geq$ 50 % を示す PD-L1 (型番：SK00621-5J) で染色した
非小細胞肺癌検体。

症例 10 : TPS $\geq$ 50 %

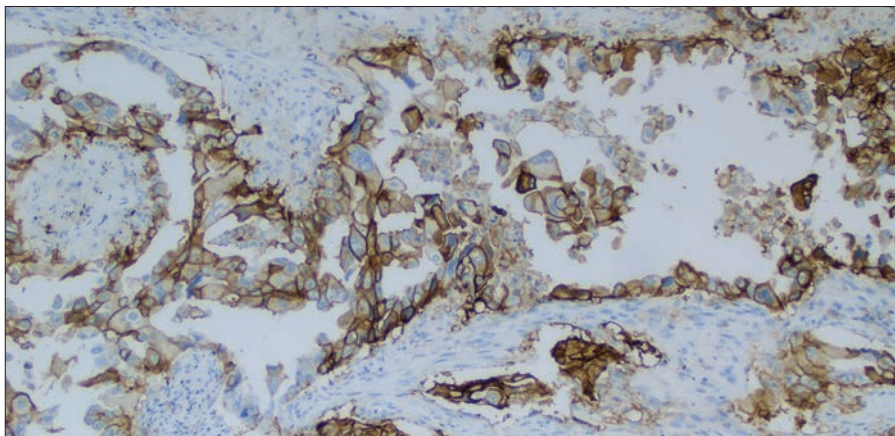


図 41a: 対物レンズ 10 倍

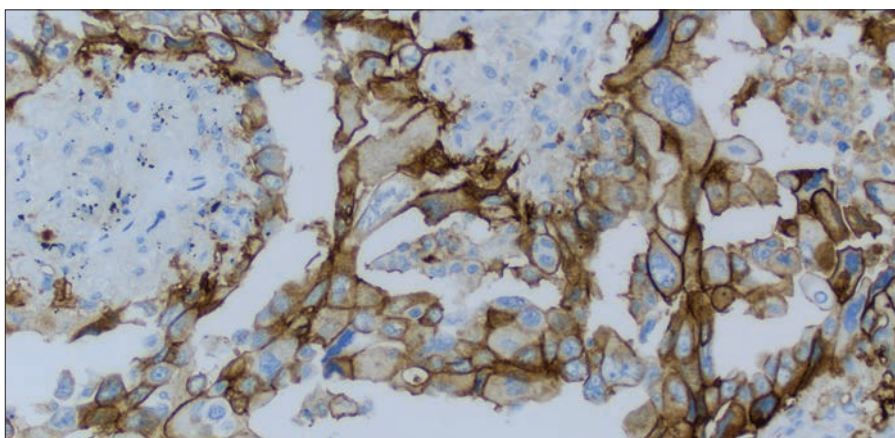


図 41b: 対物レンズ 20 倍

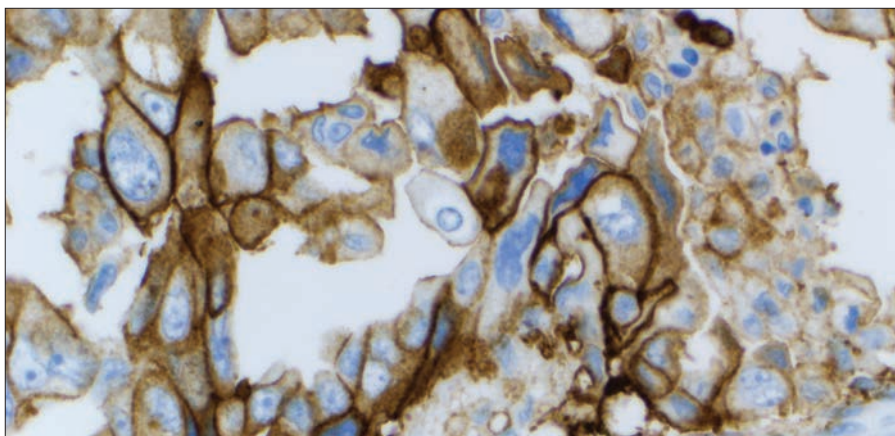


図 41c: 対物レンズ 40 倍

図 41a ~ 41c : TPS $\geq$ 50 % を示す PD-L1 (型番 : SK00621-5J) で染色した非小細胞肺癌検体。

症例 11 : TPS $\geq$ 50 %

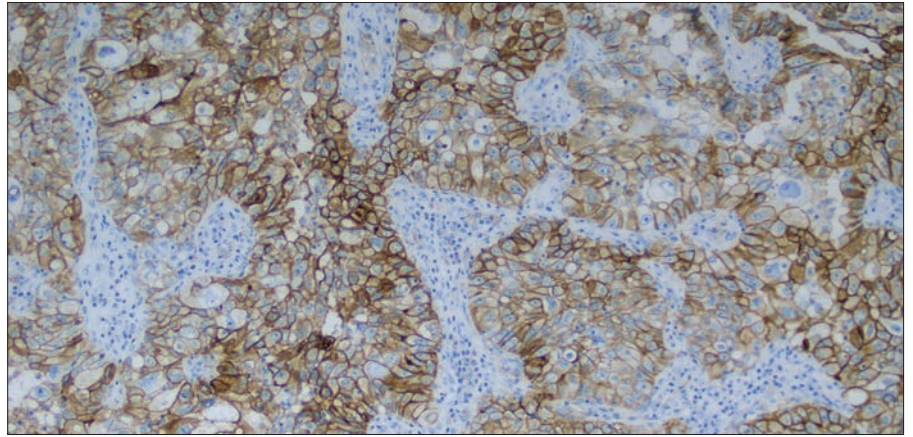


図 42a: 対物レンズ 10 倍

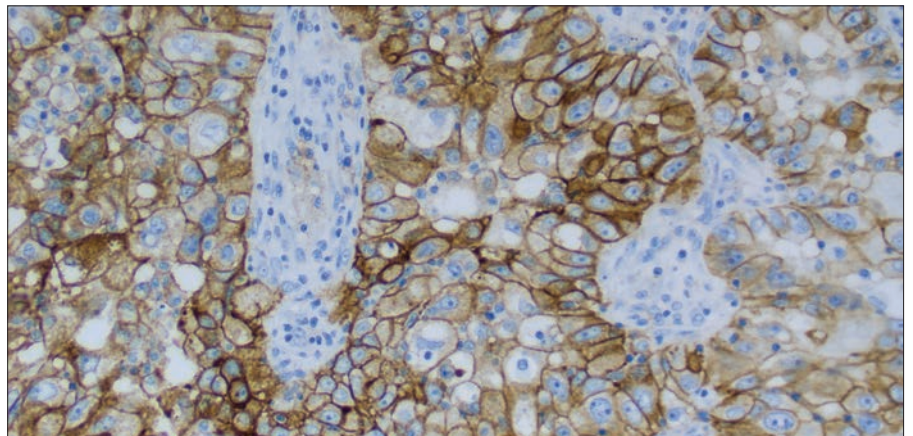


図 42b: 対物レンズ 20 倍

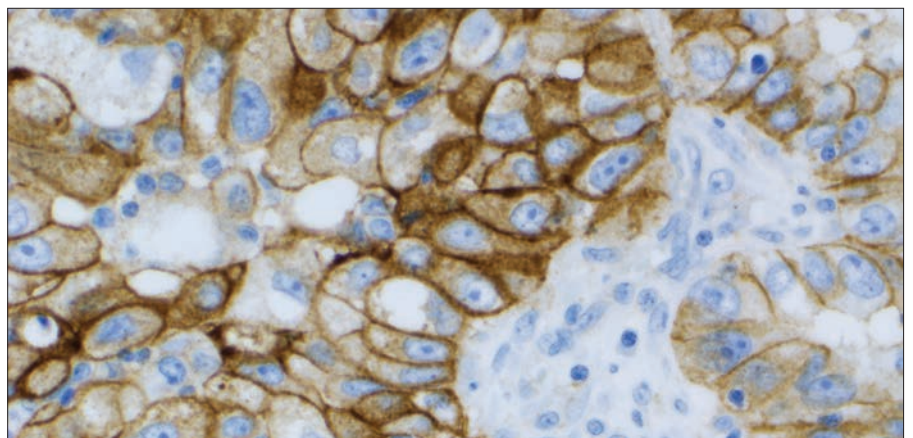


図 42c: 対物レンズ 40 倍

図 42a ~ 42c : TPS $\geq$ 50 % を示す PD-L1 (型番 : SK00621-5J) で染色した非小細胞肺癌検体。

症例 12 : TPS $\geq$ 50 %

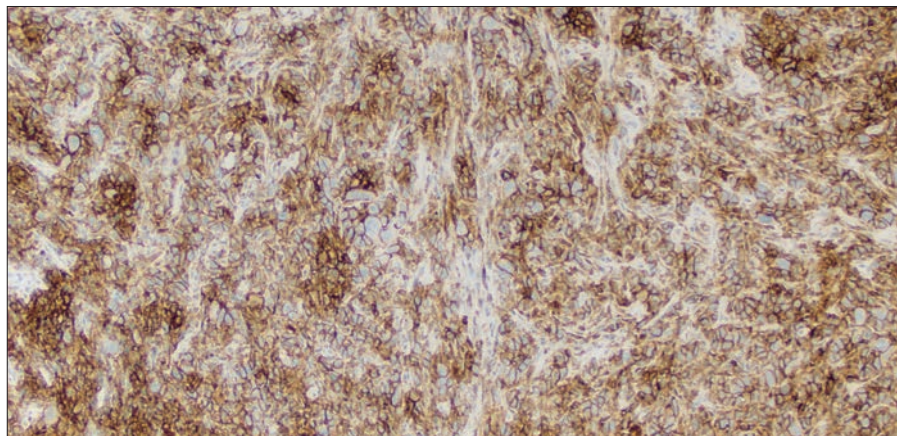


図 43a: 対物レンズ 10 倍

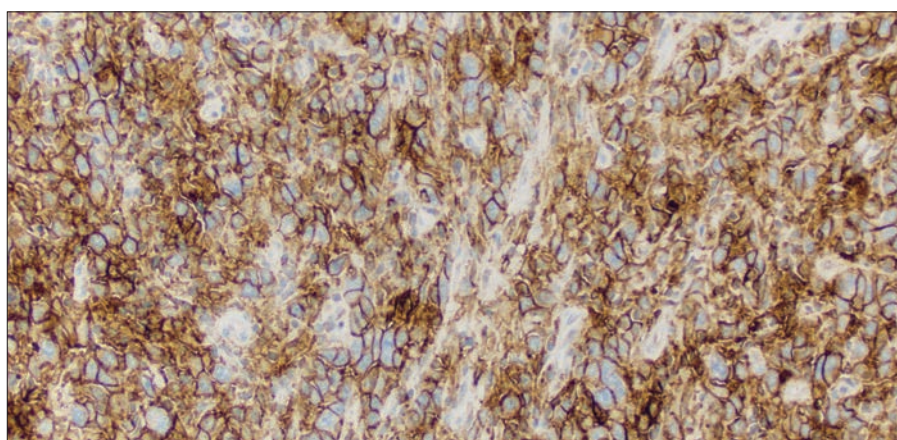


図 43b: 対物レンズ 20 倍

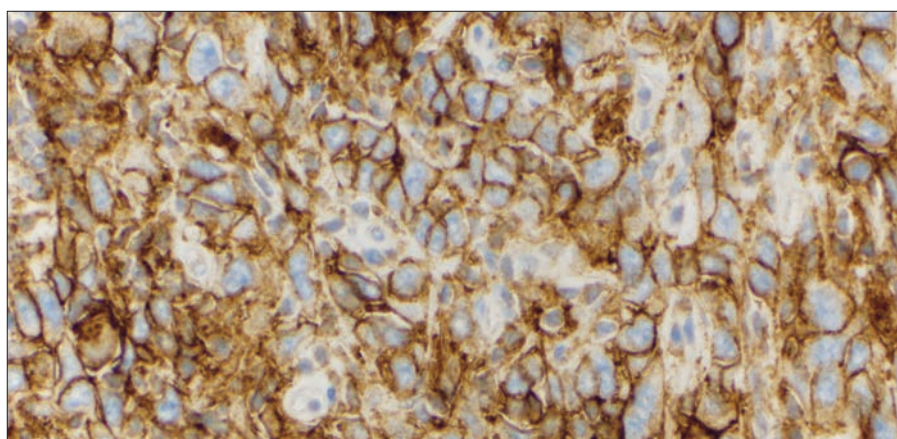


図 43c: 対物レンズ 40 倍

図 43a ~ 43c : TPS $\geq$ 50 % を示す PD-L1 (型番 : SK00621-5J) で染色した非小細胞肺癌検体。

症例 13 : TPS $\geq$ 50 %

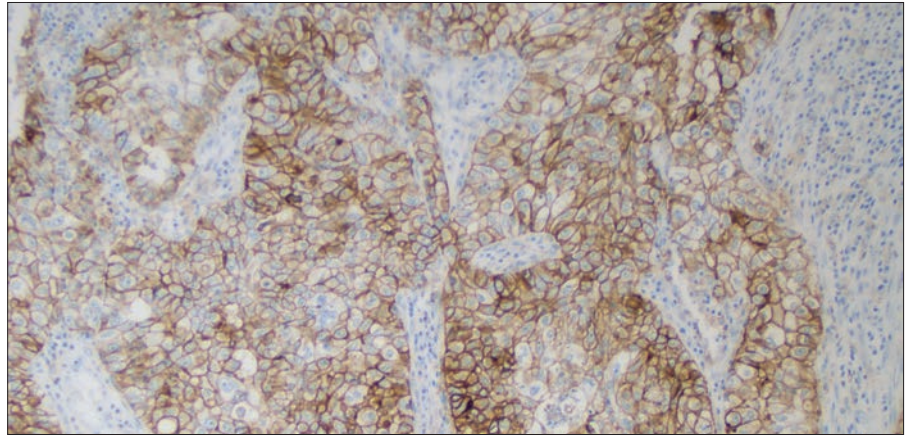


図 44a: 対物レンズ 10 倍

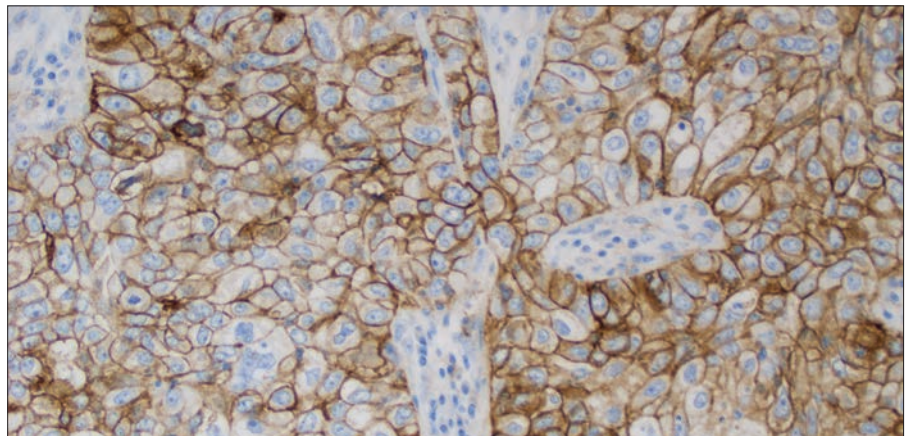


図 44b: 対物レンズ 20 倍

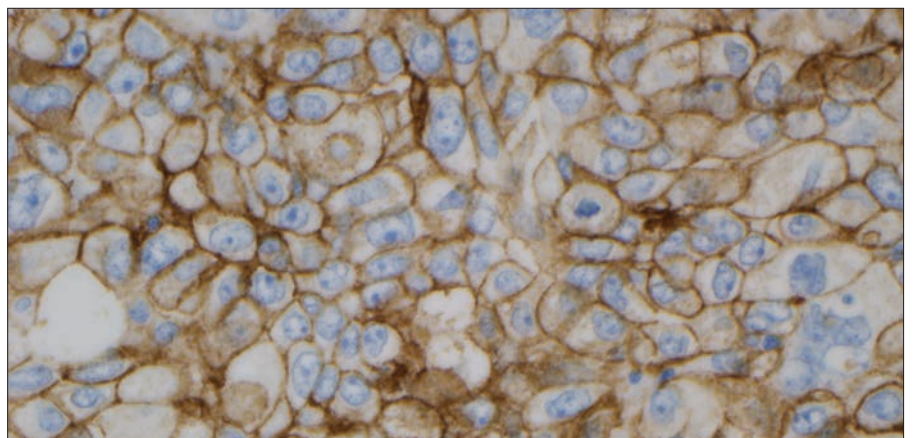


図 44c: 対物レンズ 40 倍

図 44a ~ 44c : TPS $\geq$ 50 % を示す PD-L1 (型番 : SK00621-5J) で染色した非小細胞肺癌検体。

症例 14 : TPS $\geq$ 50 %

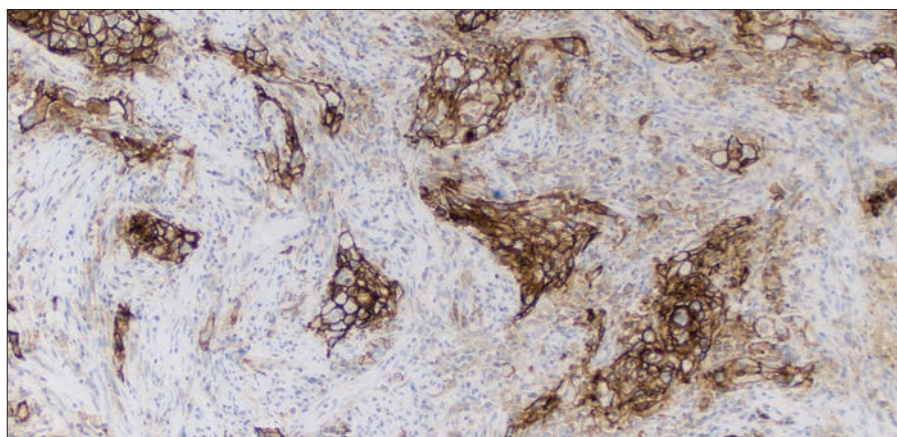


図 45a: 対物レンズ 10 倍

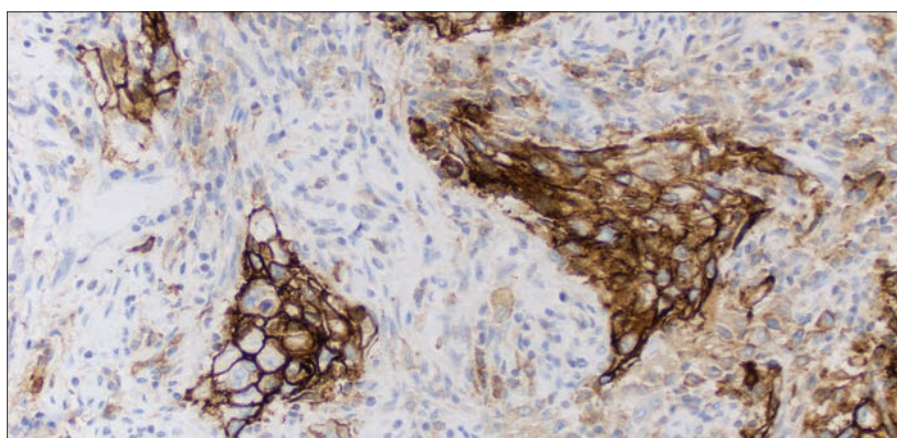


図 45b: 対物レンズ 20 倍

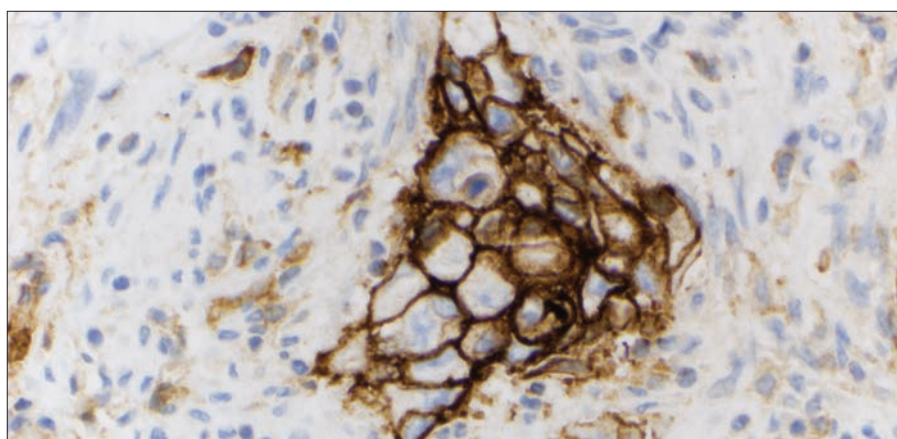


図 45c: 対物レンズ 40 倍

図 45a ~ 45c : TPS $\geq$ 50 % を示す PD-L1 (型番 : SK00621-5J) で染色した非小細胞肺癌検体。

症例 15 : TPS $\geq$ 50 %

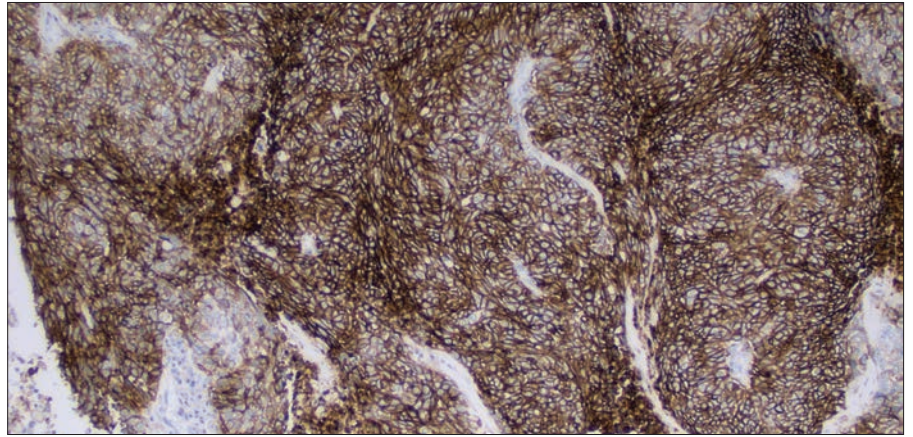


図 46a: 対物レンズ 10 倍

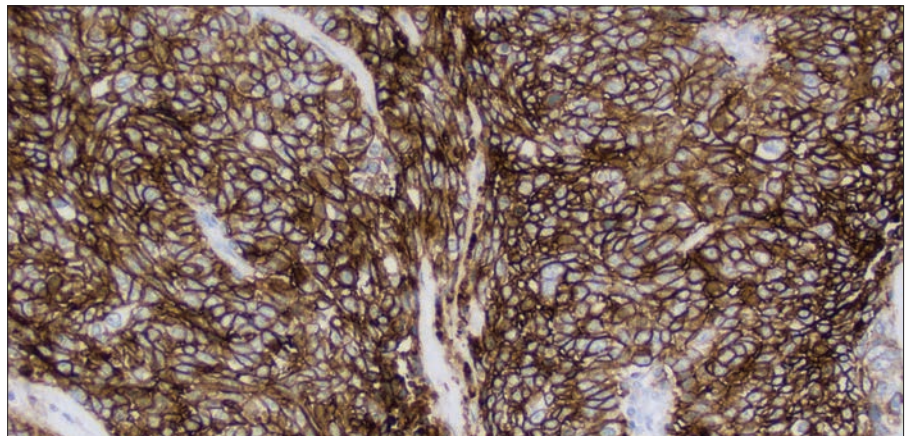


図 46b: 対物レンズ 20 倍

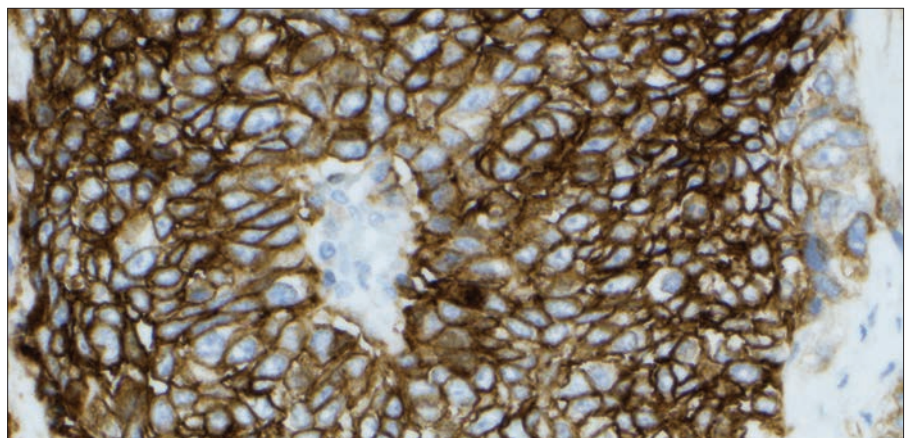


図 46c: 対物レンズ 40 倍

図 46a ~ 46c : TPS $\geq$ 50 % を示す PD-L1 (型番 : SK00621-5J) で染色した非小細胞肺癌検体。

PD-L1 IHC 22C3 pharmDx「ダコ」(型番：SK00621-5J) の TPS 40 ～ 60 % の症例

判定が困難な症例 6：
TPS 40 ～ 60 %

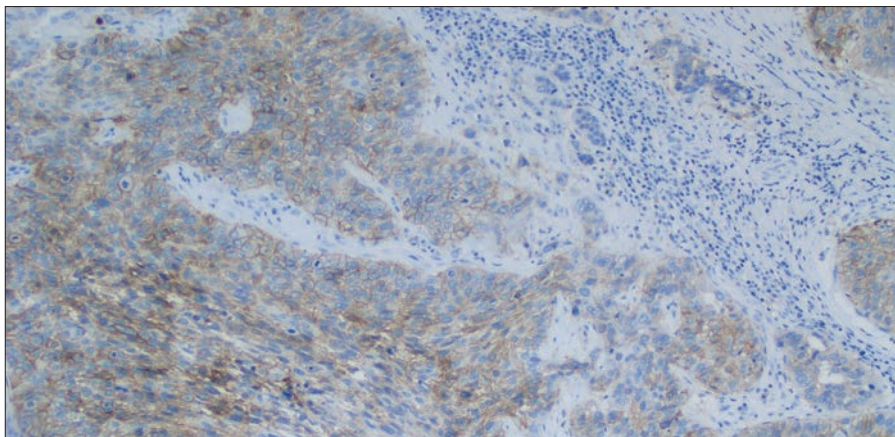


図 47a: 対物レンズ 10 倍

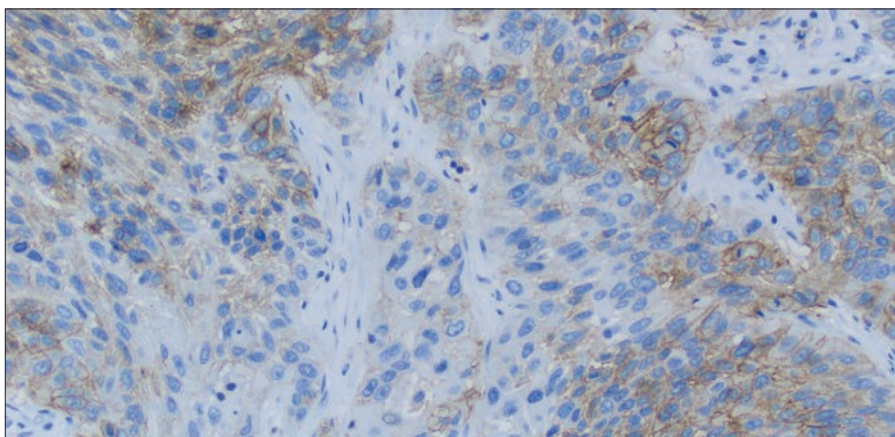


図 47b: 対物レンズ 20 倍

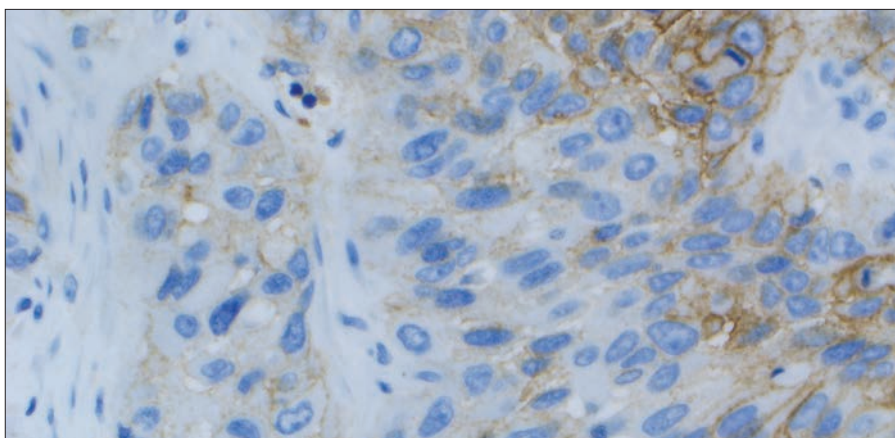


図 47c: 対物レンズ 40 倍

図 47a ～ 47c：TPS 40 % を示す PD-L1 (型番：SK00621-5J) で染色した
非小細胞肺癌検体。

判定が困難な症例 7 :
TPS 40 ~ 60 %

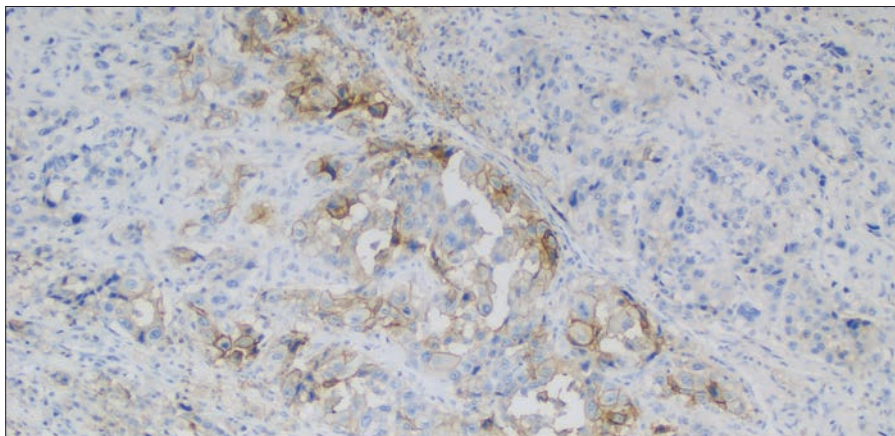


図 48a: 対物レンズ 10 倍

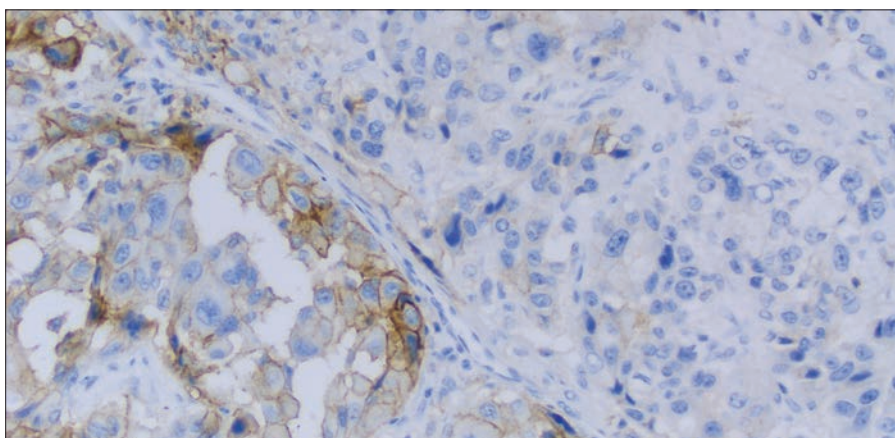


図 48b: 対物レンズ 20 倍

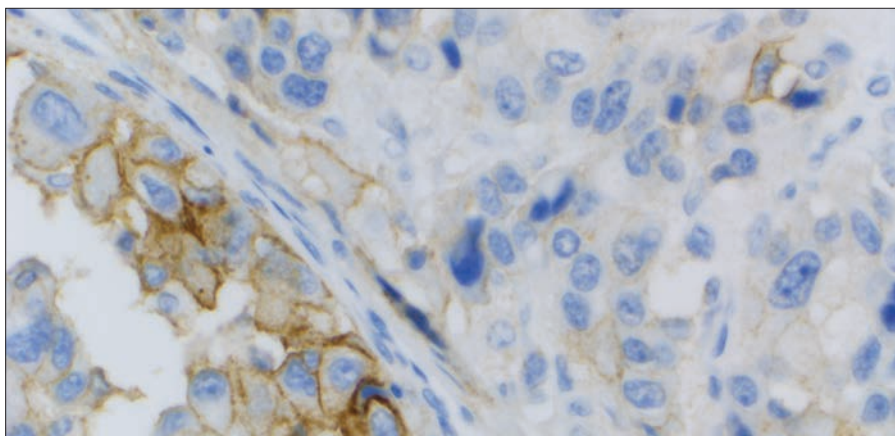


図 48c: 対物レンズ 40 倍

図 48a ~ 48c : TPS 40 % を示す PD-L1 (型番 : SK00621-5J) で染色した非小細胞肺癌検体。

判定が困難な症例 8 :
TPS 40 ~ 60 %

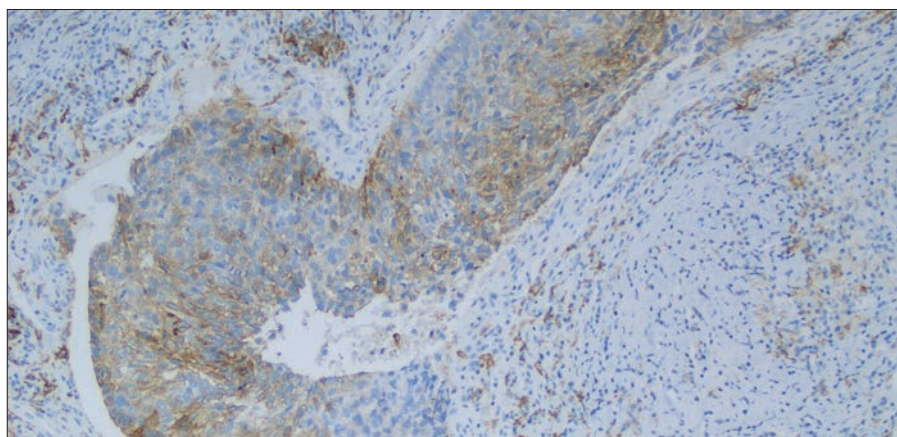


図 49a: 対物レンズ 10 倍

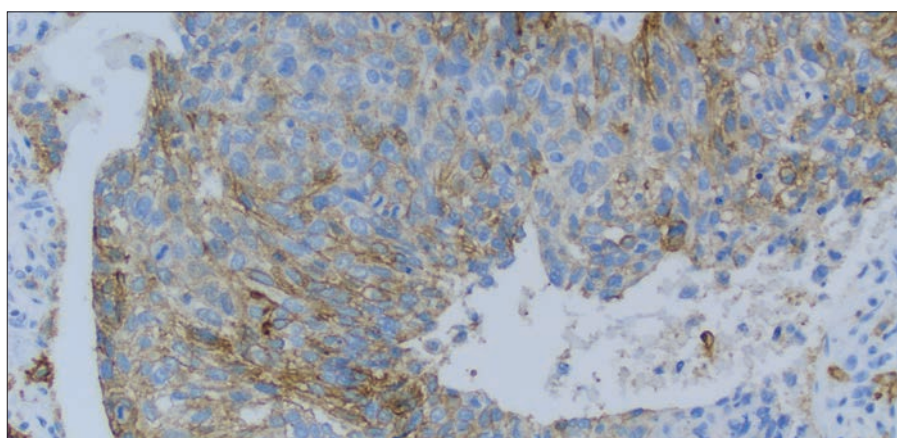


図 49b: 対物レンズ 20 倍

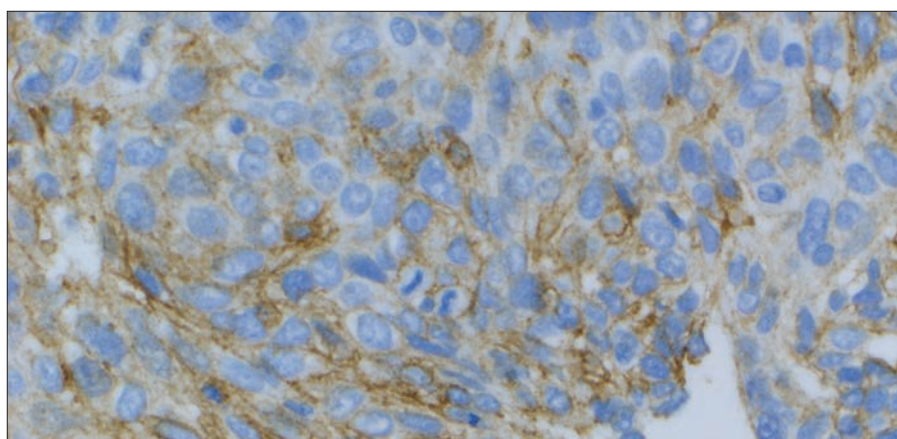


図 49c: 対物レンズ 40 倍

図 49a ~ 49c : TPS 50 % を示す PD-L1 (型番 : SK00621-5J) で染色した非小細胞肺癌検体。

判定が困難な症例 9 :
TPS 40 ~ 60 %

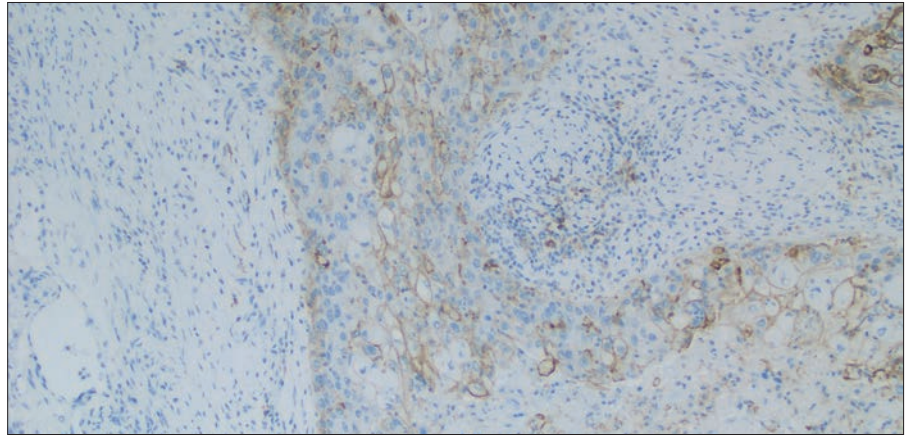


図 50a: 対物レンズ 10 倍

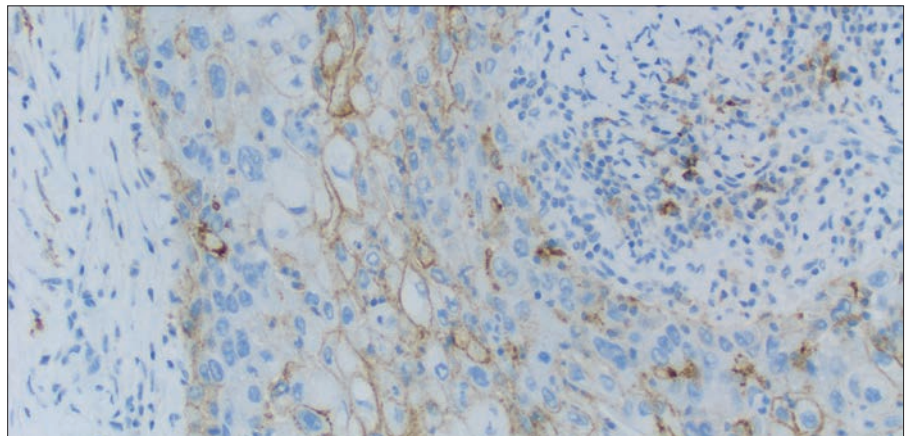


図 50b: 対物レンズ 20 倍

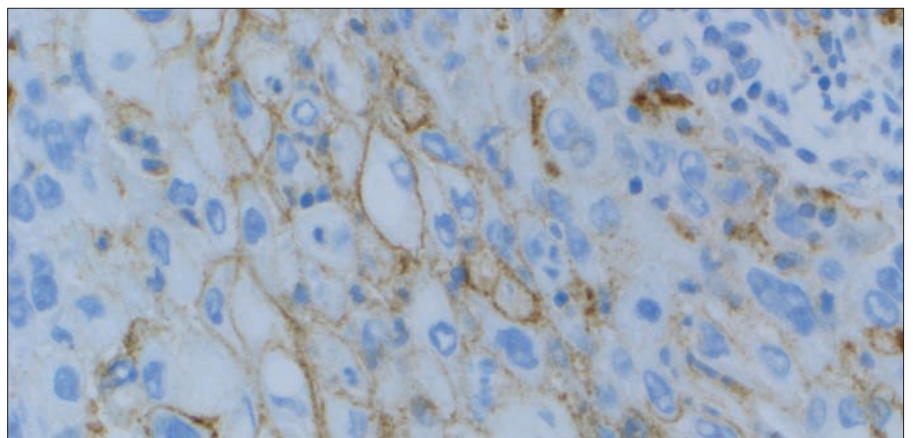


図 50c: 対物レンズ 40 倍

図 50a ~ 50c : TPS 60 % を示す PD-L1 (型番 : SK00621-5J) で染色した非小細胞肺癌検体。

判定が困難な症例 10 :
TPS 40 ~ 60 %

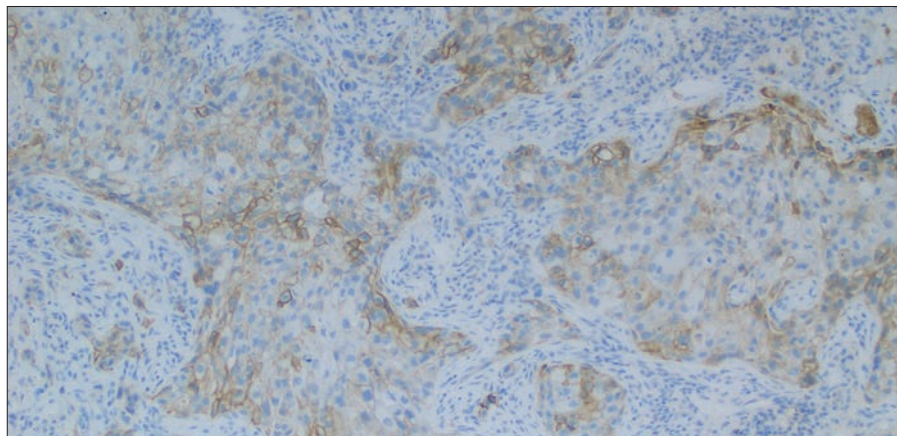


図 51a: 対物レンズ 10 倍

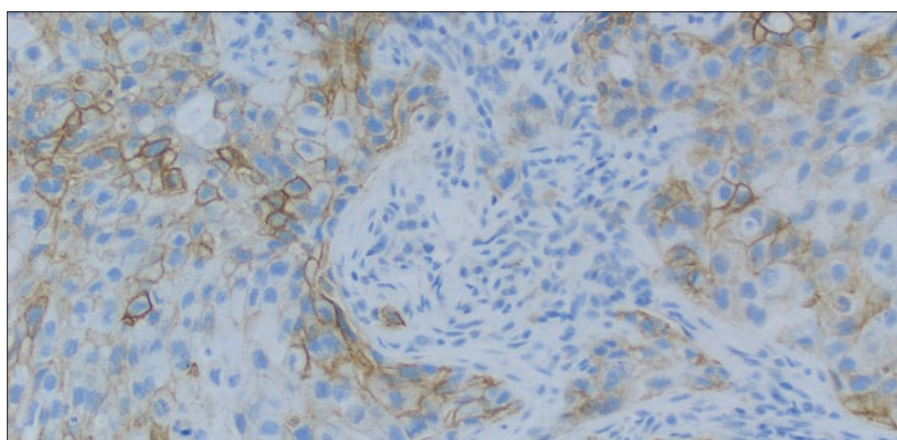


図 51b: 対物レンズ 20 倍

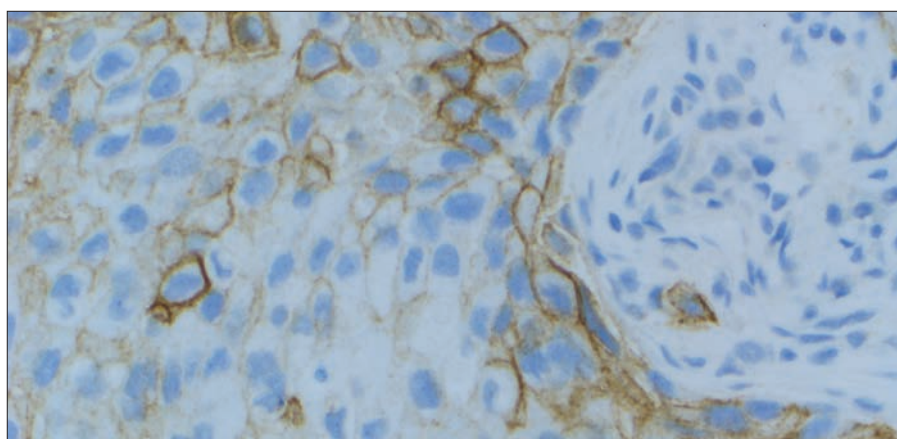


図 51c: 対物レンズ 40 倍

図 51a ~ 51c : TPS 60 % を示す PD-L1 (型番 : SK00621-5J) で染色した非小細胞肺癌検体。

PD-L1 IHC 22C3 pharmDx「ダコ」(型番：GE00621-5J) の TPS < 1 % の症例

症例 16 : TPS < 1 %

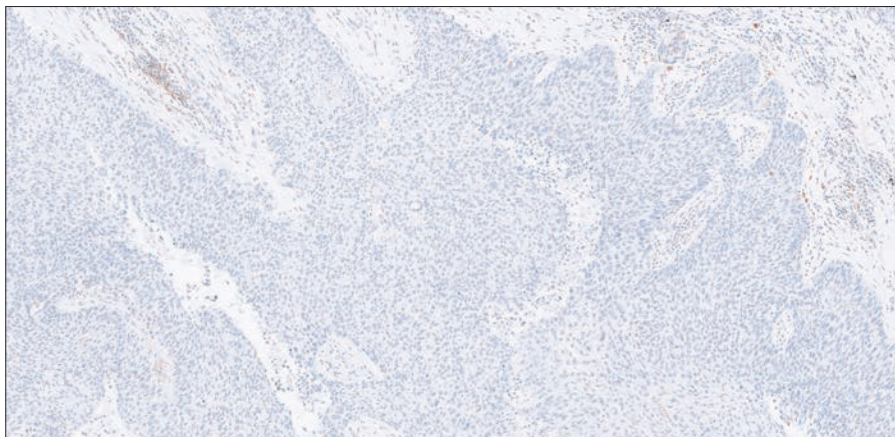


図 52a: 対物レンズ 10 倍

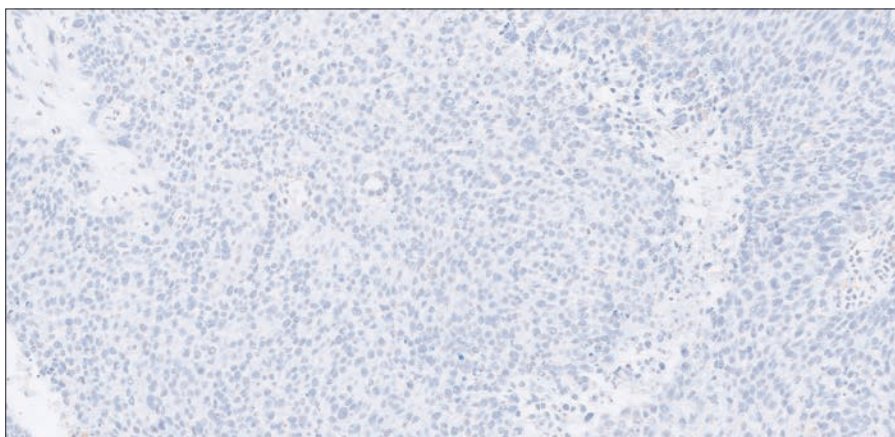


図 52b: 対物レンズ 20 倍

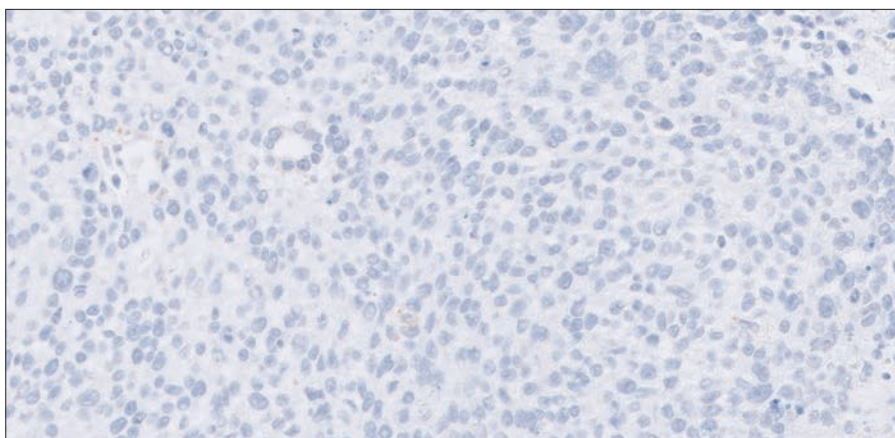


図 52c: 対物レンズ 40 倍

図 52a ~ 52c : TPS < 1 % を示す PD-L1 (型番：GE00621-5J) で染色した
非小細胞肺癌検体。

PD-L1 IHC 22C3 pharmDx「ダコ」(型番：GE00621-5J) の TPS 1 ～ 49 % の症例

症例 17：TPS 1 ～ 49 %

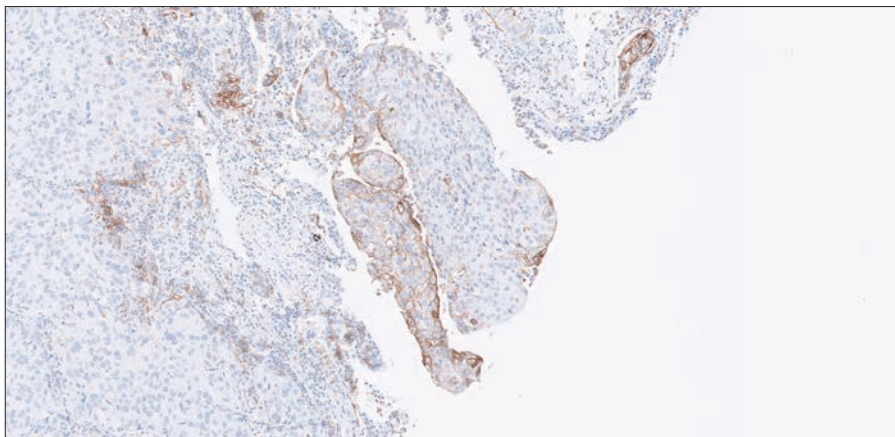


図 53a: 対物レンズ 10 倍

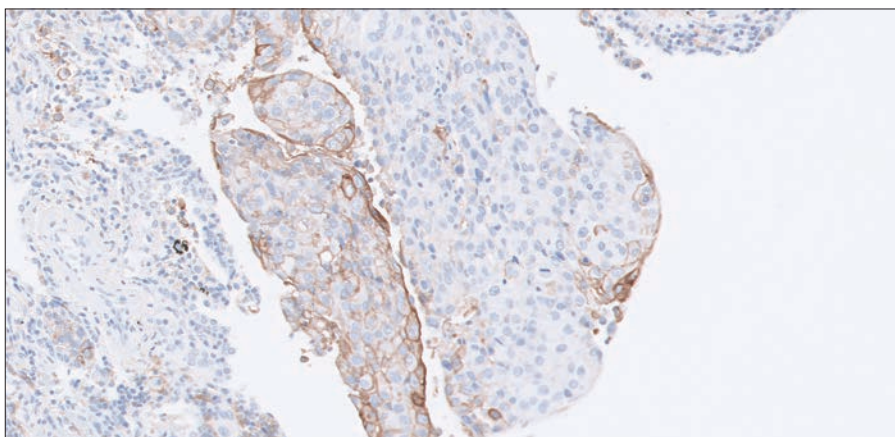


図 53b: 対物レンズ 20 倍

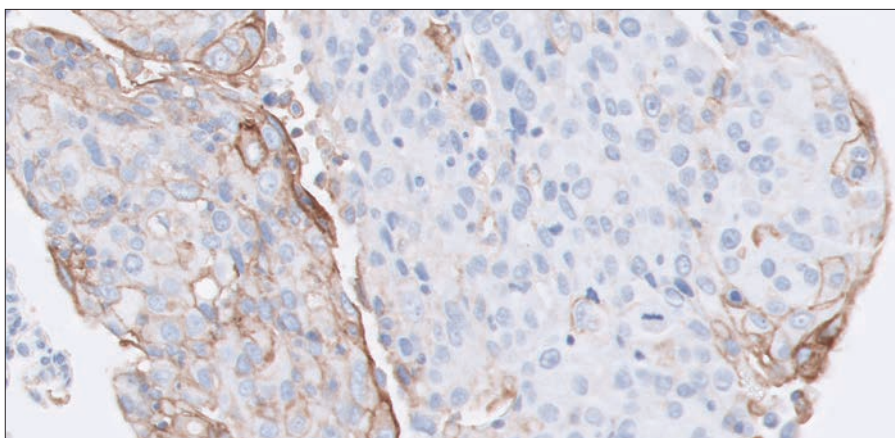


図 53c: 対物レンズ 40 倍

図 53a ～ 53c： TPS 1 ～ 49 % を示す PD-L1 (型番：GE00621-5J) で染色した非小細胞肺癌検体。

PD-L1 IHC 22C3 pharmDx「ダコ」(型番：GE00621-5J) の TPS $\geq$ 50 % の症例

症例 18 : TPS $\geq$ 50 %

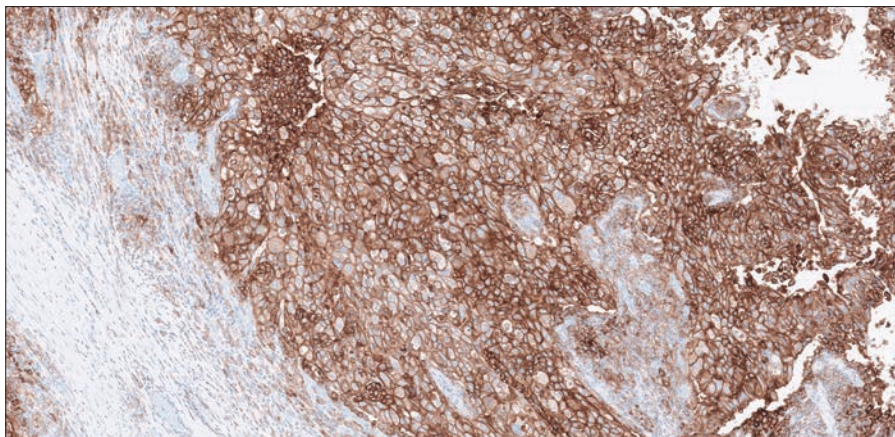


図 54a: 対物レンズ 10 倍

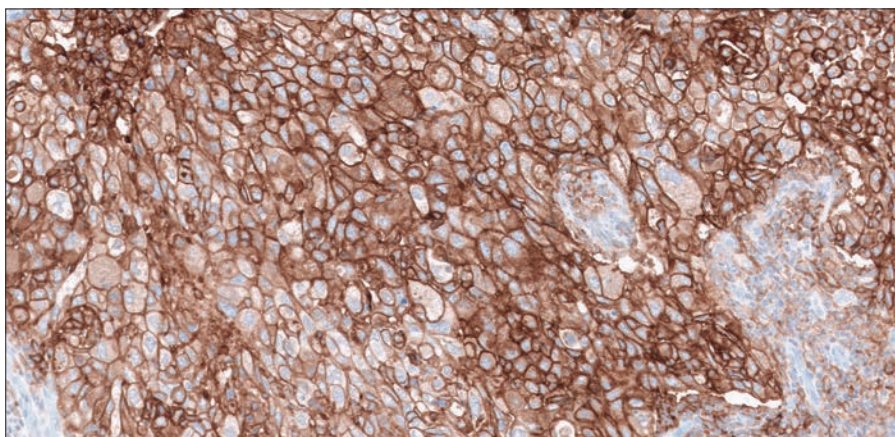


図 54b: 対物レンズ 20 倍

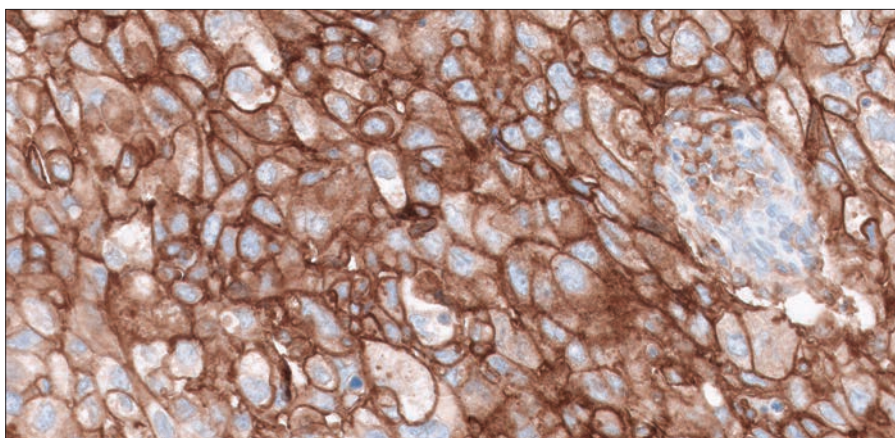


図 54c: 対物レンズ 40 倍

図 54a～54c: TPS $\geq$ 50 % を示す PD-L1 (型番:GE00621-5J) で染色した
非小細胞肺癌検体。

アーチファクト

PD-L1 IHC 22C3 pharmDx「ダコ」による染色の際に遭遇しうるアーチファクトを以降のページに示します。

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。このような要因には以下が含まれますが、これだけに限定されません。

- － 固定と検体の処理
- － 脱パラフィン不良
- － 染色中のスライドの洗浄不良
- － スライドの乾燥。Autostainer Link 48 にスライドを載せる時、また、機器稼動前に、スライドが洗浄液で湿潤状態であることを確認してください。(SK00621-5J のみ)
- － 不適切な脱パラフィン工程
- － 洗浄不良

一次抗体陰性コントロール（NCR）で染色した検体の非特異的バックグラウンド染色状態と、陽性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。すべての組織検体において、非特異的バックグラウンド染色は、 $\leq 1+$ である必要があります。

10 % 中性緩衝ホルマリン以外の固定液の使用もバックグラウンド染色の原因となることがあるため推奨しません。PD-L1 IHC 22C3 pharmDx「ダコ」によるバックグラウンド染色は稀です。

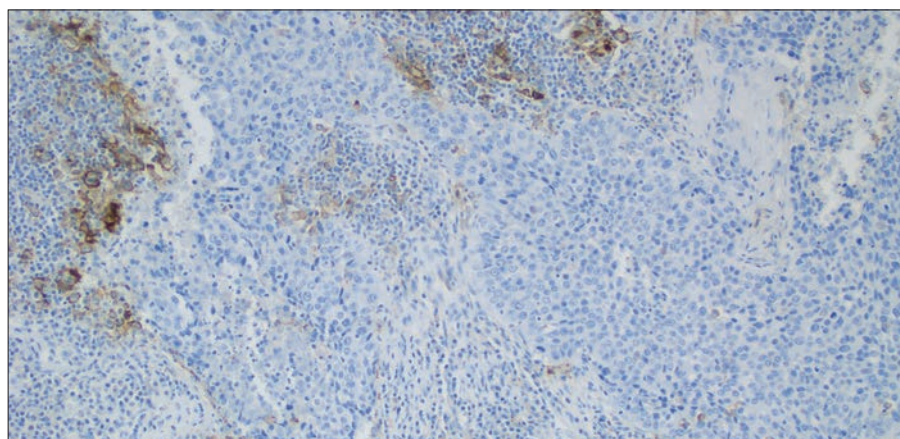


図 52：PD-L1（型番：SK00621-5J）で染色した非小細胞肺癌検体（対物レンズ 20 倍）。許容範囲の非特異的バックグラウンド染色が認められます。

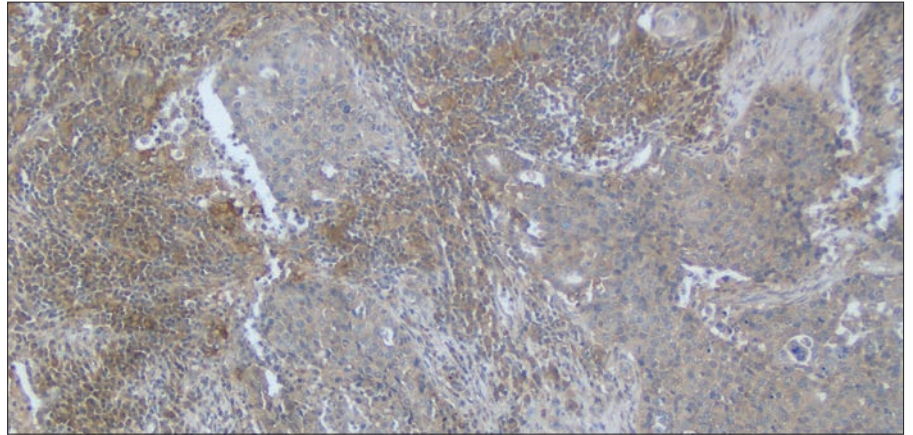


図 53：PD-L1（型番：SK00621-5J）で染色した非小細胞肺癌検体（対物レンズ 20 倍）。許容範囲外の非特異的バックグラウンド染色（ $> 1+$ ）が認められます。

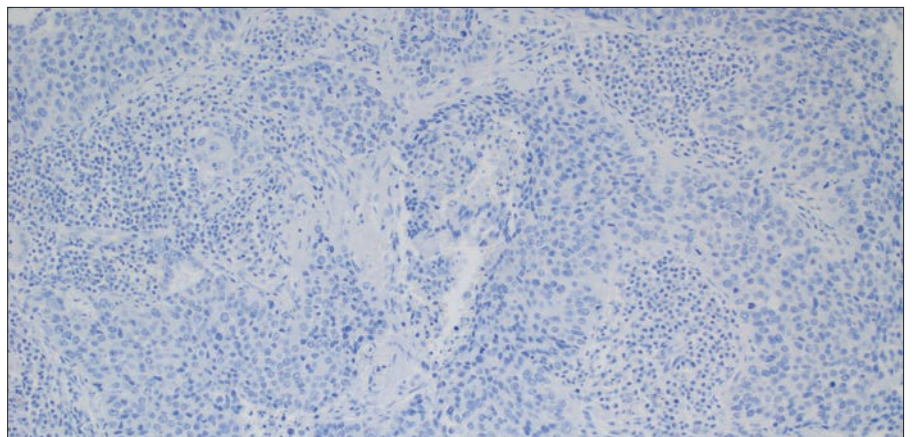


図 54：一次抗体陰性コントロール（型番：SK00621-5J）で染色した非小細胞肺癌検体（対物レンズ 20 倍）。許容範囲の非特異的バックグラウンド染色が認められます。

重要なポイント

すべての組織検体において、非特異的バックグラウンド染色は $\leq 1+$ である必要があります。

エッジアーチファクト

一般的に、エッジアーチファクトは、次の前処理工程の因子に関係します。

- － 厚い組織切片
- － 固定前あるいは染色工程中の組織の乾燥

いずれの因子も、結果として切片の周縁部の染色が強調され、中心部がごくわずかな染色あるいは非染色となることがあります。組織切片の縁にのみ染色が認められるものは、スコアリングから除外します。

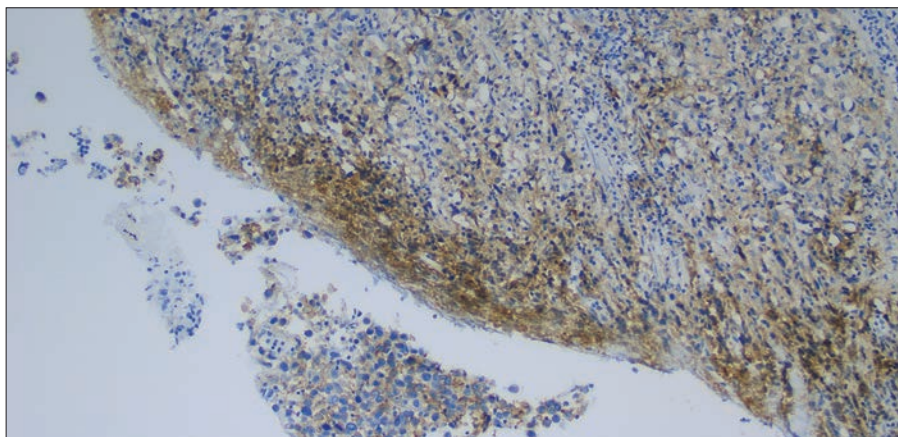


図 55a：PD-L1（型番：SK00621-5J）で染色した非小細胞肺癌検体（対物レンズ 4 倍）。エッジアーチファクトを示しています。エッジ染色はスコアリングから除外します。

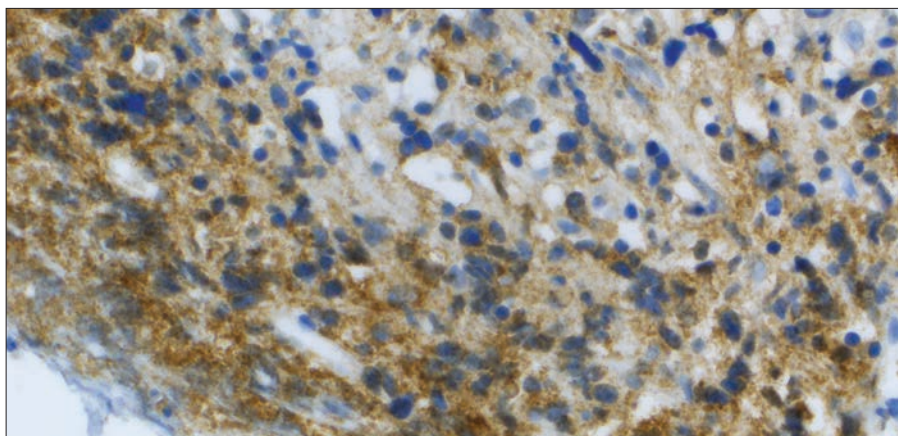


図 55b：PD-L1（型番：SK00621-5J）で染色した非小細胞肺癌検体（対物レンズ 20 倍）。エッジアーチファクトを示しています。エッジ染色はスコアリングから除外します。

重要なポイント

これらの要因により残りの組織検体部分が染まりムラ（不均一性）を呈していると考えられる場合には、周辺部のスコアリングは避けてください。

クラッシュアーチファクト

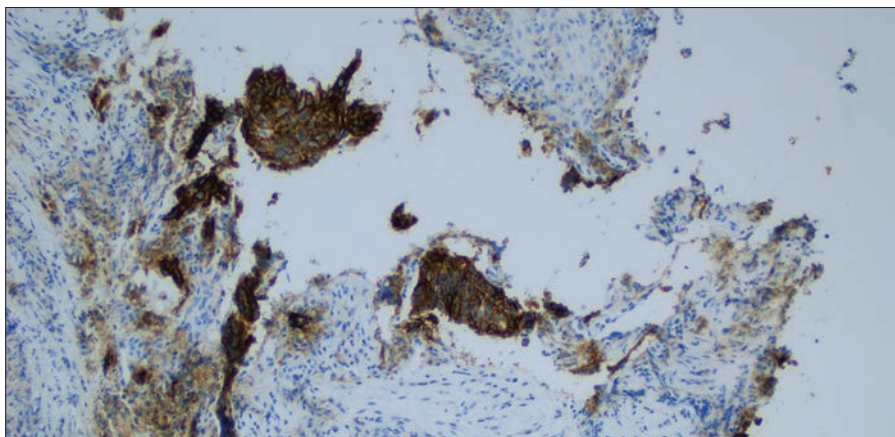


図 56:PD-L1 (型番:SK00621-5J) で染色した非小細胞肺癌検体 (対物レンズ 10 倍)。
クラッシュアーチファクトを示しています。

検体採取の際に、強い力が加わったことにより、組織が挫滅し、形態学的に組織構造に歪みを生じます。挫滅した細胞は、強い非特異染色を示すことがあるためスコアリングから除外します。

重要なポイント

クラッシュアーチファクト部位でのスコアリングは避けてください。

壊死

壊死は細胞死を示す形態学的変化ですが、その詳細は明確に定義されていません。壊死細胞は非小細胞肺癌検体で高頻度に認められますが、スコアリングから除外します。

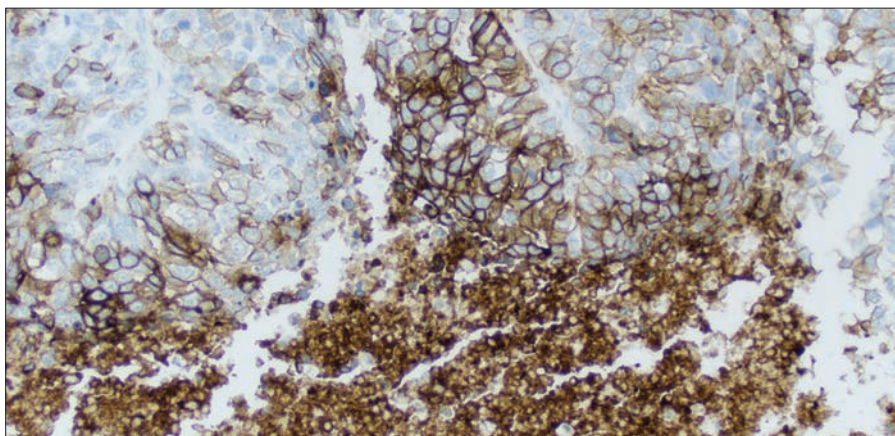


図 57 : PD-L1 (型番 : SK00621-5J) で染色した非小細胞肺癌検体 (対物レンズ 20 倍)。
壊死細胞と生存腫瘍細胞の強陽性を認めます。壊死細胞の染色はスコアリングから除外します。

重要なポイント

壊死領域のスコアリングは TPS から除外します。

固定不良

固定法の標準化は、PD-L1 IHC 22C3 pharmDx「ダコ」の使用において、きわめて重要です。組織固定が最適でない場合、染色結果に影響を与える可能性があります。

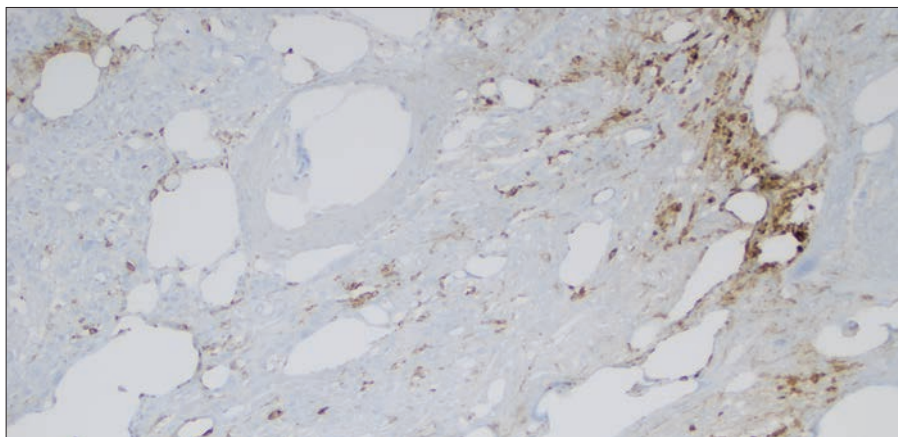


図 58 : PD-L1 (型番 : SK00621-5J) で染色した非小細胞肺癌検体 (対物レンズ 10 倍)。
組織固定が不十分です。

重要なポイント

正確な診断には、適切な組織固定法が重要です。

トラブルシューティングガイド

PD-L1 IHC 22C3 pharmDx 「ダコ」の一般的な トラブルシューティングガイド

アッセイ特異的なトラブルシューティングガイドは関連する製品の添付文書を確認してください。詳細な支援が必要な場合には、テクニカルサポート担当者またはカスタマーサポートまでご連絡ください。

問題	考えられる原因	推奨される処置
染色されていない	プロトコルエラー	スライドオーダーに際し、正しいプロトコルが選択されていることを確認
	DAB の発色不足	基質発色液が適切に調製されていることを確認
	洗浄液中のアジ化ナトリウム	ダコ Envision FLEX 洗浄液のみを使用すること。添付文書を確認
	本品中のコントロールスライドの劣化	外装に印刷されているキットの使用期限と保存条件を確認
染色が弱い	不適切な固定法の使用	必ず中性緩衝ホルマリンと検証された固定方法を使用してください。
	滴下した試薬の量が不十分	組織切片の大きさと滴下した試薬の量を確認してください。
	不適切な洗浄液の使用	ダコ Envision FLEX 洗浄液のみを使用すること。添付文書を確認
本品中のコントロールスライドあるいは検体スライドの染色が弱い	不適切な抗原賦活液の調整	3-in-1 処理が正しく行われたことを確認
	不適切な洗浄液の使用	ダコ Envision FLEX 洗浄液のみを使用すること。添付文書を確認
過度のバックグラウンド染色を認める	脱パラフィン不良	3-in-1 処理が正しく行われたことを確認
	機器搭載時など染色前にスライドが乾燥した	染色前のいずれの段階においてもスライドが緩衝液で湿润状態であることを確認
	試薬と組織切片の非特異的吸着	検体が適切に固定されていることや、壊死の有無を確認
	不適切な固定法の使用	必ず中性緩衝ホルマリンと推奨される固定方法を使用してください。
スライドから組織が剥がれる	不適切なスライドガラスの使用	適切なコーティング済みスライドを使用
	検体作製が不適切	切片は、染色前に 58 ± 2 °C で 1 時間ベーキングすること
染色性が強すぎる	不適切な固定法の使用	検証された固定液と固定方法のみを使用していることを確認
	不適切な洗浄液の使用	ダコ Envision FLEX 洗浄液のみを使用すること。添付文書を確認
抗原賦活液が濁る	加熱時、抗原賦活液が濁る	これは正常であり、染色には影響しない

注意事項：問題が上記以外の原因によるものである場合、あるいは推奨される是正措置をとっても問題が解決しない場合、アジレントのテクニカルサポートまでお問い合わせください。染色技術や検体作製についての詳細な情報は、ダコの教育ガイドに記載されています。免疫組織化学的染色法（アジレント・テクノロジーから入手できます）。

参考文献

- － キイトルーダ添付文書MSD 株式会社; 2020
- － PD-L1 IHC 22C3 pharmDx「ダコ」添付文書（型番：SK00621-5J）アジレント・テクノロジー株式会社
- － PD-L1 IHC 22C3 pharmDx「ダコ」添付文書（型番：GE00621-5J）アジレント・テクノロジー株式会社
- － Reck M, Rodríguez-Abreu D, Robinson AG, et al. Pembrolizumab versus chemotherapy for PD-L1-positive non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med*. 2016; 375(19):1823-1833.
- － Herbst RS, Baas P, Kim DW, et al. Pembrolizumab versus docetaxel for previously treated, PD-L1-positive, advanced non-small-cell lung cancer (KEYNOTE-010): a randomised controlled trial. *Lancet*. 2016;387(10027):1540-1550.
- － Roach C, Zhang N, Corigliano E, et al. Development of a companion diagnostic PD-L1 immunohistochemistry assay for pembrolizumab therapy in non-small-cell lung cancer. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 2016;24:392-397.
- － Dolled-Filhart M, Roach C, Toland G, et al. Development of a companion diagnostic for pembrolizumab in non-small cell lung cancer using immunohistochemistry for programmed death ligand-1. *Arch Pathol Lab Med*. 2016. doi:10.5858/arpa.2015-0542-OA.
- － Herbst RS, Soria JC, Kowanetz M, et al. Predictive correlates of response to the anti-PD-L1 antibody MPDL3280A in cancer patients. *Nature*. 2014;515(7528):563-567.
- － Tumeh PC, Harview CL, Yearley JH, et al. PD-1 blockade induces responses by inhibiting adaptive immune resistance. *Nature*. 2014;515(7528):568-571.
- － Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011;144(5):646-674.
- － Sharpe AH, Freeman GJ. The B7-CD28 superfamily. *Nat Rev Immunol*. 2002;2(2):116-126.
- － Keir ME, Butte MJ, Freeman GJ, Sharpe AH. PD-1 and its ligands in tolerance and immunity. *Annu Rev Immunol*. 2008;26:677-704.
- － Freeman GJ, Long AJ, Iwai Y, et al. Engagement of the PD-1 immunoinhibitory receptor by a novel B7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation. *J Exp Med*. 2000;192(7):1027-1034.
- － Dong H, Strome SE, Salomao DR, et al. Tumor-associated B7-H1 promotes T-cell apoptosis: a potential mechanism of immune evasion. *Nat Med*. 2002;8(8):793-800.
- － Mu CY, Huang JA, Chen Y, Chen C, Zhang XG. High expression of PD-L1 in lung cancer may contribute to poor prognosis and tumor cells immune escape through suppressing tumor infiltrating dendritic cells maturation. *Med Oncol*. 2011;28(3):682-688.

- Gettinger S, Herbst RS. B7-H1/PD-1 blockade therapy in non-small cell lung cancer: current status and future direction. *Cancer J*. 2014;20(4):281-289.
- Brahmer JR, Tykodi SS, Chow LQ, et al. Safety and activity of anti-PD-L1 antibody in patients with advanced cancer. *N Engl J Med*. 2012;366(26):2455-2465.
- Topalian SL, Hodi FS, Brahmer JR, et al. Safety, activity, and immune correlates of anti-PD-1 antibody in cancer. *N Engl J Med*. 2012;366(26):2443-2454.
- Boland JM, Kwon ED, Harrington SM, et al. Tumor B7-H1 and B7-H3 expression in squamous cell carcinoma of the lung. *Clin Lung Cancer*. 2013;14(2):157-163.
- Chen YB, Mu CY, Huang JA. Clinical significance of programmed death-1 ligand-1 expression in patients with non-small cell lung cancer: a 5-year-follow-up study. *Tumori*. 2012;98(6):751-755.
- Velcheti V, Schalper KA, Carvajal DE, et al. Programmed death ligand-1 expression in non-small cell lung cancer. *Lab Invest*. 2014;94(1):107-116.
- Garon EB, Rizvi NA, Hui R, et al. Pembrolizumab for the treatment of non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med*. 2015;372(21):2018-2028.
- 社内資料 Agilent Technologies, Inc.

注意事項

[illegible]

注意事項

This image shows a single sheet of white paper with horizontal ruling lines. The lines are evenly spaced and run across the width of the page. There are no margins, text, or other markings on the paper.

注意事項

[illegible]

PD-L1 向けのアジレントの教育資料

病理専門医の協力によって作成されたこれらの教育資料は、非小細胞肺癌用の本染色結果判定マニュアル上での自己学習の機会を広げ、サポートします。いつでも、どこでも、お客様のペースでオンデマンドの e ラーニングが行えます。



PD-L1 IHC 22C3 pharmDx「ダコ」非小細胞肺癌染色結果判定トレーニングプログラム

オンライントレーニングでは、非小細胞肺癌患者の PD-L1 発現を正確に評価し判定します。PD-L1 IHC 22C3 pharmDx「ダコ」染色結果判定トレーニングプログラムには、詳細で専門的な内容、さまざまな症例が盛り込まれた実践問題が含まれており、以下のことが確実にできるようになることを目的としています。

- PD-L1 病理の原理を理解し、PD-L1 発現を示す染色像について評価するためのプロセスを習得する
- PD-L1 スコアリングに影響する要件を理解し、実際の症例を用いて PD-L1 発現に対するスコアリング画像で練習

アジレント・テクノロジー株式会社

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

●カスタマーサポート：03-5232-9968 フリーダイヤル：0800-800-8910

mail：email_japan@agilent.com

※仕様は予告なく変更する場合があります。

<https://www.agilent.com/>

P210216-1

© Agilent Technologies, Inc. 2021

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

Printed in Japan, Feb. 2021

29403JA D62944/02 2021Feb.