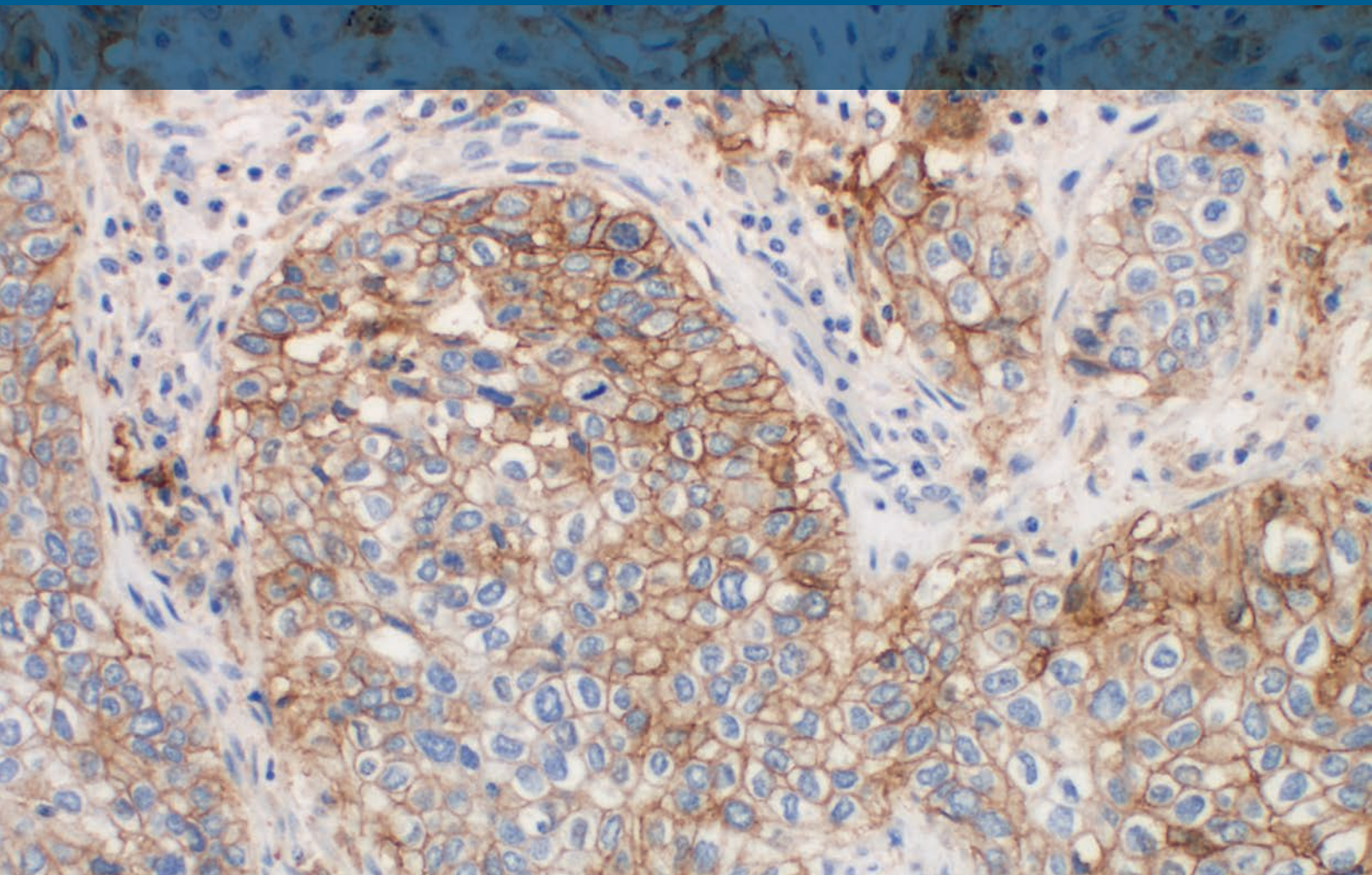


# PD-L1 IHC 28-8 pharmDx 「ダコ」染色結果判定マニュアル： 非小細胞肺癌（NSCLC）

体外診断用

体外診断用医薬品 承認番号：22800EZ00077000

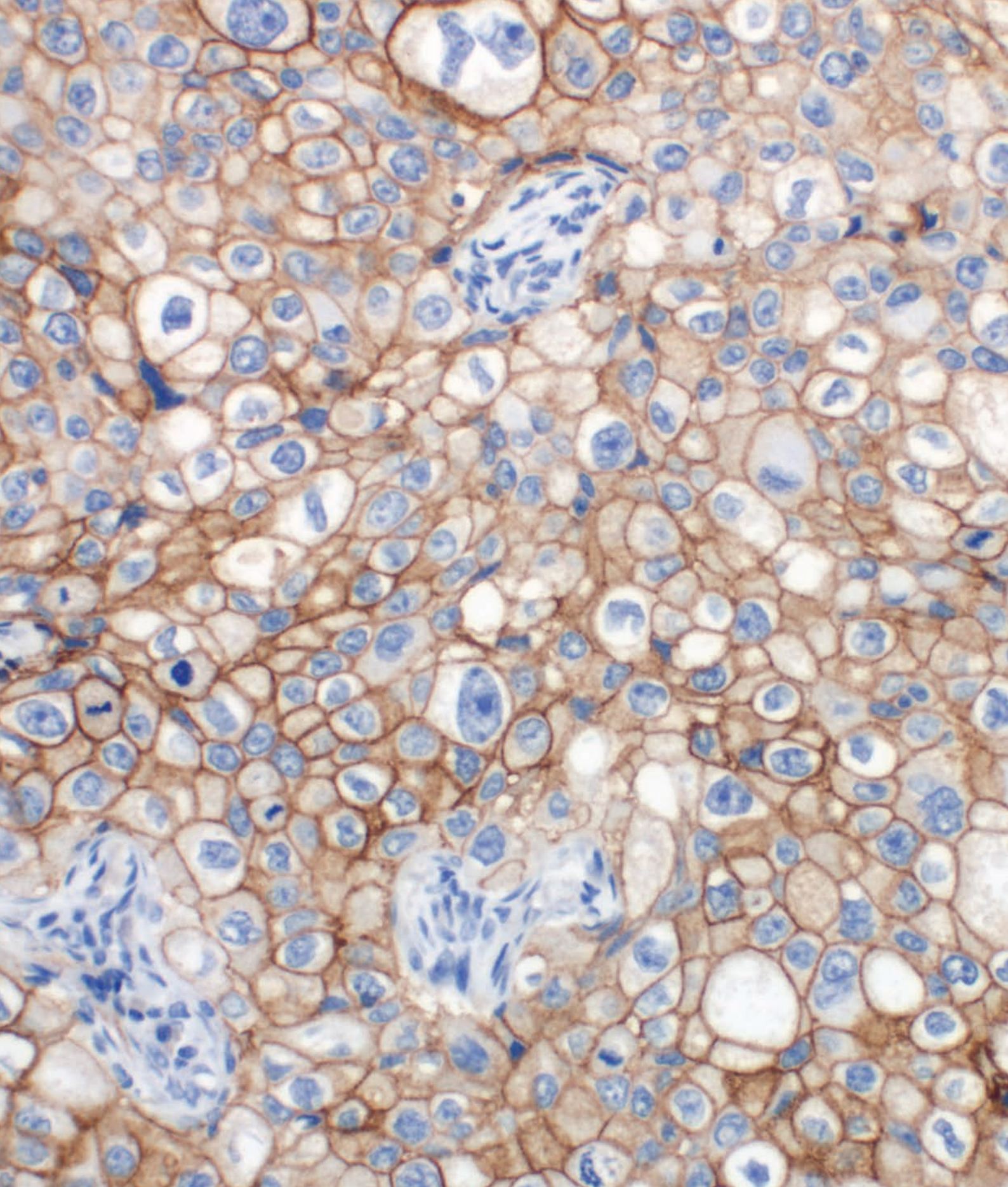




# 目次

|                                                           |           |
|-----------------------------------------------------------|-----------|
| <b>はじめに</b>                                               | <b>5</b>  |
| PD-L1 IHC 28-8 pharmDx「ダコ」の使用目的                           | 5         |
| PD-L1 IHC 28-8 pharmDx「ダコ」染色結果判定マニュアル:概要                  | 5         |
| <b>PD-1/PD-L1 バスウェイの役割</b>                                | <b>6</b>  |
| <b>非小細胞肺癌に対する PD-L1 IHC 28-8 pharmDx「ダコ」の臨床試験データ</b>      | <b>7</b>  |
| <b>非小細胞肺癌における PD-L1 IHC 28-8 pharmDx「ダコ」の臨床的価値</b>        | <b>8</b>  |
| <b>PD-L1 IHC 28-8 pharmDx「ダコ」の概要</b>                      | <b>10</b> |
| <b>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～</b>     | <b>12</b> |
| 検体採取と作製                                                   | 12        |
| 組織の前処理                                                    | 12        |
| 陽性対照および陰性対照のコントロール組織                                      | 13        |
| PD-L1 IHC 28-8 pharmDx「ダコ」の染色手順                           | 13        |
| 試薬の保管                                                     | 13        |
| 試薬の調製                                                     | 13        |
| コントロールスライド                                                | 14        |
| 染色プロトコール                                                  | 14        |
| 脱パラフィン、親水化、抗原賦活化                                          | 14        |
| 染色と対比染色                                                   | 15        |
| 封入                                                        | 15        |
| <b>PD-L1 IHC 28-8 pharmDx「ダコ」テクニカルチェックリスト</b>             | <b>16</b> |
| <b>PD-L1 IHC 28-8 pharmDx「ダコ」スコアリングガイドライン</b>             | <b>17</b> |
| <b>PD-L1 IHC 28-8 pharmDx「ダコ」の推奨スライド判定順序</b>              | <b>18</b> |
| <b>非小細胞肺癌に対する PD-L1 IHC 28-8 pharmDx「ダコ」の結果判定に関する推奨事項</b> | <b>20</b> |
| H&E 染色した組織検体                                              | 20        |
| 本品中のコントロールスライド                                            | 20        |
| 陽性対照のコントロール組織スライド                                         | 22        |
| 陰性対照のコントロール組織スライド                                         | 22        |
| 一次抗体陰性コントロールで染色した組織検体                                     | 22        |
| 一次抗体で染色した組織検体                                             | 23        |
| <b>ヒントおよび考慮事項</b>                                         | <b>23</b> |
| <b>判定不可検体</b>                                             | <b>23</b> |
| <b>腫瘍 PD-L1 発現率の算出に関して推奨されるスコアリング方法</b>                   | <b>24</b> |
| <b>結果の報告</b>                                              | <b>27</b> |
| <b>非小細胞肺癌における PD-L1 IHC 28-8 pharmDx「ダコ」の免疫染色例</b>        | <b>28</b> |
| <b>PD-L1 IHC 28-8 pharmDx「ダコ」の非小細胞肺癌症例</b>                | <b>31</b> |
| <b>PD-L1 IHC 28-8 pharmDx「ダコ」では評価が困難な非小細胞肺癌の例</b>         | <b>39</b> |
| <b>アーチファクト</b>                                            | <b>44</b> |
| <b>PD-L1 IHC 28-8 pharmDx「ダコ」トラブルシューティングガイド</b>           | <b>46</b> |
| <b>参考文献</b>                                               | <b>47</b> |





PD-L1 IHC 28-8 pharmDx「ダコ」  
染色結果判定マニュアル：非小細胞肺癌



## はじめに

### PD-L1 IHC 28-8 pharmDx「ダコ」の使用目的\*

#### 体外診断用医薬品

がん組織、細胞中の PD-L1 発現率の測定

- ニボルマブ（遺伝子組換え）の非小細胞肺癌患者又は頭頸部癌患者への適切な投与を行うための補助に用いる。
- ニボルマブ（遺伝子組換え）及びイピリムマブの併用療法の悪性黒色腫患者へ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」で PD-L1 発現率を測定し、以下の医薬品の投与可否を判断することが望ましい。

- 化学療法既治療の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（遺伝子組換え）
- 化学療法未治療の非小細胞肺癌患者におけるニボルマブ（遺伝子組換え）と化学療法の併用療法
- 悪性黒色腫におけるニボルマブ（遺伝子組換え）とイピリムマブの併用療法

ただし、PD-L1 IHC 28-8 pharmDx「ダコ」を用いて PD-L1 発現率を測定することができない場合には、ニボルマブ（遺伝子組換え）及びイピリムマブの添付文書等を参照の上、投与の可否を適切に判断すること。

PD-L1 検査の指針となる特定の臨床状況については、ニボルマブの添付文書をご参照ください。

\* 本染色結果判定マニュアルには、非小細胞肺癌の適応症についてのみを記載しています。



PD-L1 IHC 28-8 pharmDx「ダコ」により測定される PD-L1 発現は、ニボルマブと化学療法の併用療法による非小細胞肺癌患者の無増悪生存期間（PFS）延長の程度、また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（OS）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：概要

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。PD-L1 の発現 1 % 以上、5 % 以上、10 % 以上でカットオフした非扁平上皮非小細胞肺癌患者の検体の評価に関しては、非扁平上皮非小細胞肺癌染色結果判定マニュアルを参照してください。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する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」で染色した非小細胞肺癌の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](http://www.agilent.com) をご覧ください。

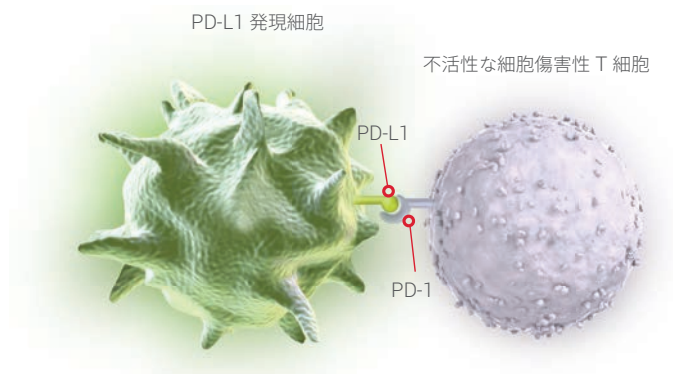
掲載されている顕微鏡写真は、特に記載のない限り非小細胞肺癌のものです。

\* M.D. Hellmann, et al. Nivolumab plus Ipilimumab in Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer, The New England Journal of Medicine, 2019.

## PD-1/PD-L1 パスウェイの役割

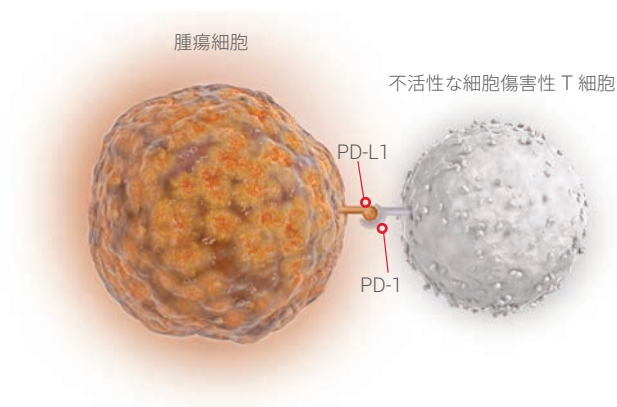
### 正常細胞への攻撃を阻害

T 細胞の不活性化により、正常組織への攻撃が阻害されます。



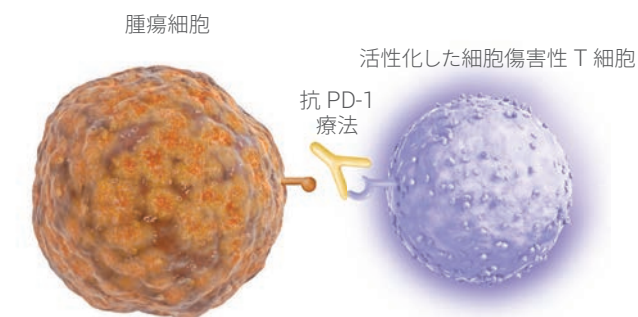
### 腫瘍細胞が T 細胞による検知を回避

T 細胞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。



### がん免疫療法により、腫瘍細胞を攻撃する免疫反応を活性化

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



# 非小細胞肺癌に対する PD-L1 IHC 28-8 pharmDx「ダコ」の臨床試験データ

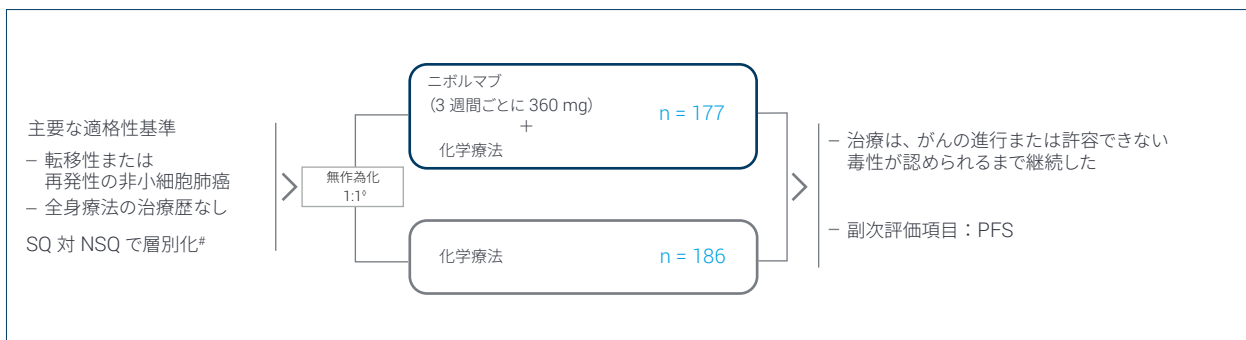
**CHECKMATE-227試験（パート 1b）において、PD-L1 発現が 1 % 未満の化学療法歴のない切除不能な進行・再発の非小細胞肺癌患者へのニボルマブと化学療法の併用療法は化学療法に対して無増悪生存期間（PFS）を有意に延長することが示されました。**

- CHECKMATE-227 試験により、ニボルマブと化学療法の併用療法を行った非小細胞肺癌患者の PD-L1 発現率の評価に関する PD-L1 IHC 28-8 pharmDx「ダコ」の妥当性が検証されました。
- 本試験は、化学療法歴のない切除不能な進行・再発の非小細胞肺癌患者を対象とした多施設国際共同無作為化非盲検第 III 相臨床試験でした。

転移性非小細胞肺癌患者を対象とした

## 多施設国際共同無作為化非盲検第 III 相臨床試験概要

**CHECKMATE-227** パート 1b：PD-L1 発現 1 % 未満 (n = 363) 試験デザイン<sup>#</sup>



<sup>°</sup> 患者は、ニボルマブ (3 週間ごとに 360 mg) + 化学療法群に無作為に割り付けられました (n = 363)。

<sup>#</sup> CHECKMATE-227 試験において、最大 4 サイクルのプラチナダブルット化学療法 (q3w) を受けた比較群の患者、NSQ：ペメトレキセド + シスプラチンまたはカルボプラチンと化学療法後オプションでペメトレキセドの追加投与、SQ：ゲムシタビン + シスプラチンまたはカルボプラチン

CHECKMATE-227 試験パート 1b で、副次評価項目は、無増悪生存期間（PFS）でした。PFS は、HR を用いて確認しました。

PFS：無増悪生存期間

HR：ハザード比

<sup>^</sup>M.D. Hellmann, et al. Nivolumab plus Ipilimumab in Advanced Non-Small Cell Lung Cancer, The New England Journal of Medicine, 2019.

# 非小細胞肺癌における PD-L1 IHC 28-8 pharmDx「ダコ」の臨床的価値

－ CHECKMATE-227 試験（パート 1b）の結果によると、PD-L1 発現が 1 % 未満の化学療法歴のない切除不能な進行・再発の非小細胞肺癌患者において、ニボルマブと化学療法の併用療法群の無増悪生存期間（PFS）の中央値は 5.55 か月、化学療法群は 4.70 か月であり、ハザード比（HR）は 0.73 でした

腫瘍 PD-L1 発現 1 % 未満の患者の有効性評価項目：  
PFS

表 1. 有効性の結果（PD-L1 発現 1 % 未満）：CHECKMATE-227 試験（パート 1b）

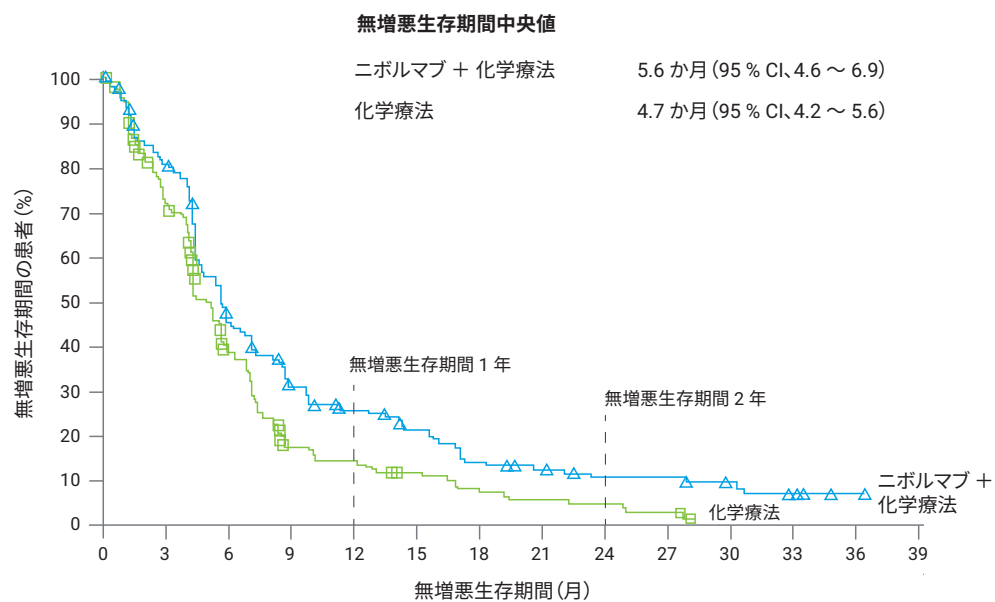
|                                 | ニボルマブと化学療法の併用療法群<br>(n = 177)  | 化学療法群<br>(n = 186) |
|---------------------------------|--------------------------------|--------------------|
| 無増悪生存期間                         |                                |                    |
| ハザード比 (97.72 % CI) <sup>a</sup> | 0.73 (0.56, 0.95; p値 = 0.0070) | －                  |
| 中央値 (月) <sup>b</sup> (95 % CI)  | 5.55 (4.63, 6.90)              | 4.70 (4.21, 5.59)  |

<sup>a</sup> 層別 Cox 比例ハザードモデルに基づく

<sup>b</sup> カプラン・マイヤー推定量



腫瘍 PD-L1 発現 1 % 未満の患者の有効性評価項目



**患者数**

|              |     |     |    |    |    |    |    |    |    |    |    |   |   |   |
|--------------|-----|-----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|---|---|---|
| ニボルマブ + 化学療法 | 177 | 135 | 73 | 48 | 37 | 29 | 19 | 15 | 10 | 10 | 17 | 4 | 1 | 0 |
| 化学療法         | 186 | 121 | 57 | 22 | 18 | 13 | 8  | 6  | 5  | 3  | 0  | 0 | 0 | 0 |

## PD-L1 IHC 28-8 pharmDx「ダコ」の概要

### 型番：SK00521-5J

PD-L1 IHC 28-8 pharmDx「ダコ」には、ダコ Autostainer Link 48 (IHC 自動染色装置) とダコ 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に必要な、最適化された試薬とプロトコールが含まれています。

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パーオキシダーゼ (HRP) 分子を結合させた検出試薬を反応させます。その後、発色試薬を添加すると、酵素変換により生成された反応生成物の沈殿物が抗原部位に形成されます。発色反応の色は DAB エンハンサー試薬により変化します。さらに、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・確認するための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。

### PD-L1 IHC 28-8 pharmDx「ダコ」の染色手順

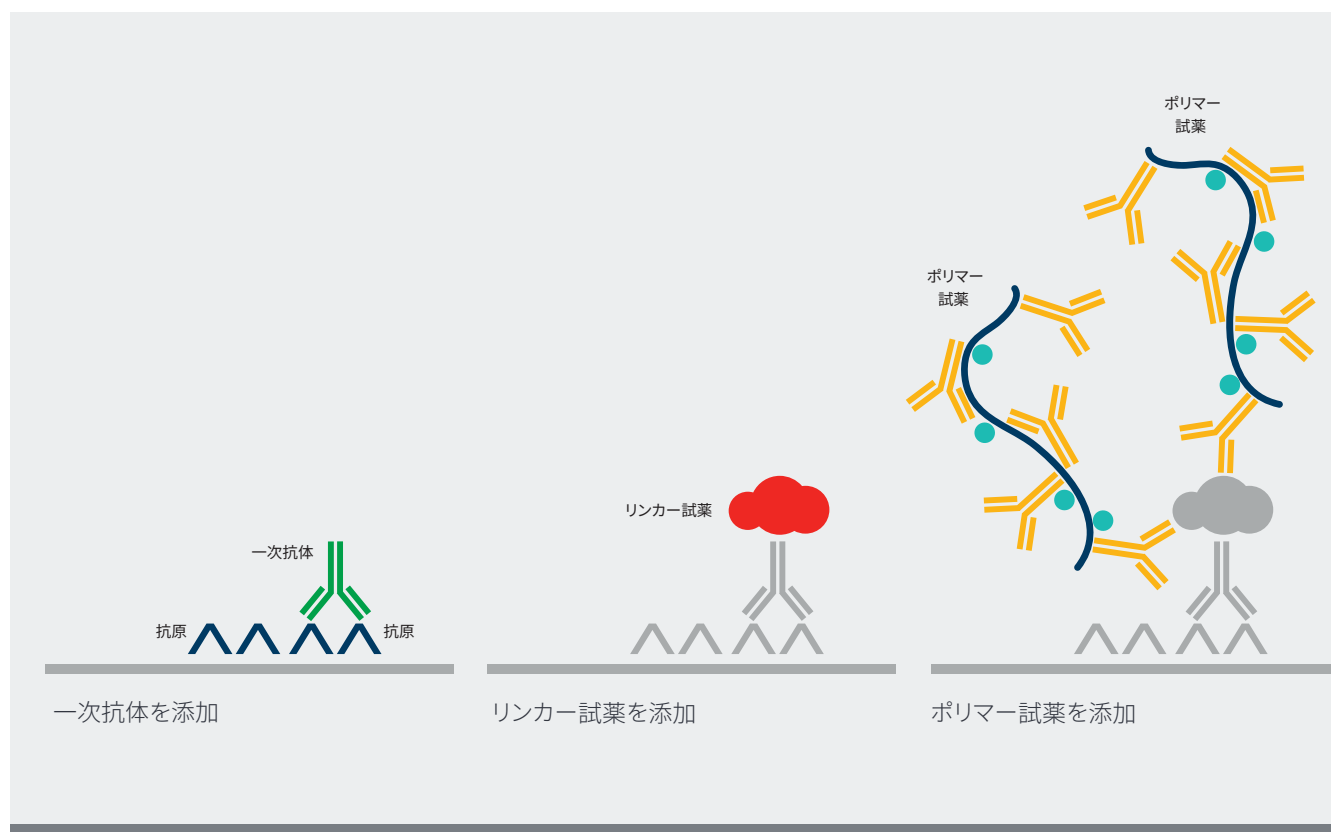




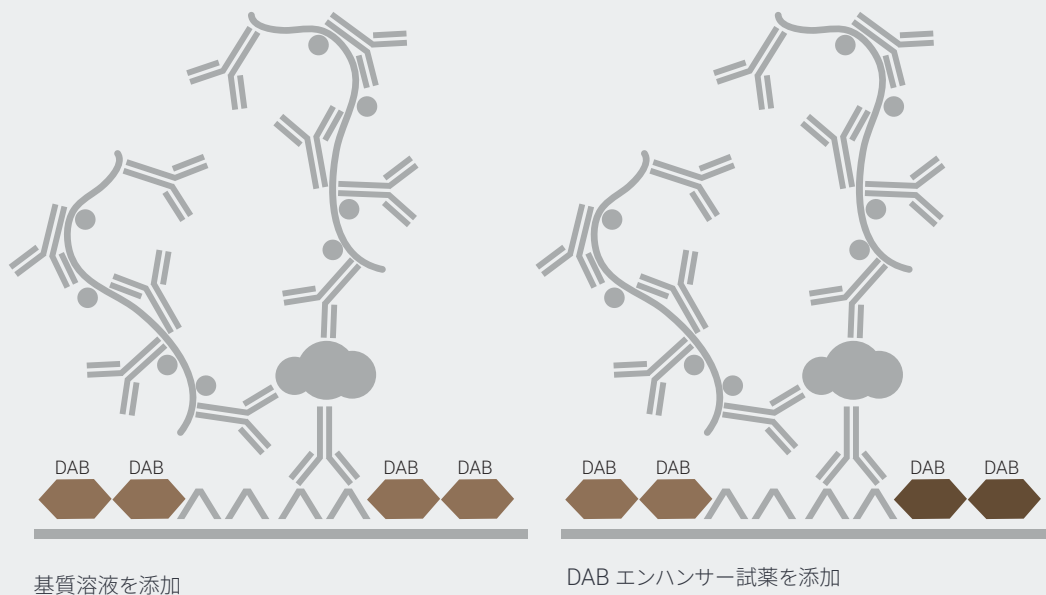
図 1. PD-L1 IHC 28-8 pharmDx「ダコ」の染色構成試薬

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」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 1)。

- － 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)、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については、添付文書をご覧ください。





# 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。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ります。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す。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ます。

## 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。検体はすべて推奨方法に準じて処理してください。

## 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をお使いください。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 分以内にホルマリン固定を開始し、その後、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  $\mu\text{m}$  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、一度薄切されたホルマリン固定パラフィン包埋組織検体は、暗所で 2 ～ 8 °C /室温 (25 °Cまで) にて保存し、扁平上皮非小細胞肺癌以外は薄切から 4 か月以内に染色してください。室温で保管した扁平上皮非小細胞肺癌組織切片は薄切から 2 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。

## 陽性対照および陰性対照の コントロール組織(検査室供給)

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。各染色ランには、本品中のコントロールスライドに加えて陽性対照および陰性対照のコントロール組織が必要です。

陽性対照および陰性対照のコントロール組織は、非小細胞肺癌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ても、組織の作製状態の良し悪しを確認することはできません。陽性対照のコントロール組織は、弱から中程度の陽性の染色を示すものが理想的です。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。

## 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。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。

### 試薬の調製

すべての構成試薬を使用前に室温 (20 ～ 25 °C) に戻します。

### 濃縮抗原賦活液

濃縮抗原賦活液 Low pH (50x) を精製水で 1 : 50 に希釈して十分な量の抗原賦活液 (1x) を調製します (希釈後の抗原賦活液の pH は 6.1 ± 0.2 である必要があります)。濃縮抗原賦活液 Low pH (50x) の 30 mL のボトル 1 本を 1 : 50 で希釈して、PT Link タンク 1 つ分に当たる 1.5 L の抗原賦活液 (1x) を調製でき、1 回あたり最大 24 枚のスライドの処理が可能です。3 回使用した後、抗原賦活液 (1x) を廃棄します。抗原賦活液 (1x) は希釈後 5 日を超えて使用できません。濃縮抗原賦活液 Low pH (50x) は、赤色の溶液であることにご注意ください。

ダコ EnVision FLEX 濃縮抗原賦活液 Low pH (50x) は、必要に応じて追加購入できます (型番: K800521-2)。

### ダコ EnVision FLEX 洗浄液 (20 x)

洗浄ステップ用に、ダコ Envision FLEX 洗浄液 (20 x) を、精製水で 1 : 20 に希釈し、十分な量の洗浄液を調製する。希釈後未使用の洗浄液 (1x) は 2 ～ 8 °C で保管し、1 か月以内に使い切ってください。洗浄液が濁った場合は廃棄してください。詳細については、ダコ Autostainer Link 48 の取扱説明書を参照してください。ダコ EnVision FLEX 洗浄液 (20 x) は購入可能です (型番: K800721-2)。

## 基質溶液

DAB+ 基質緩衝液 1 mL あたり DAB+ 発色基質を 1 滴加え、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。この試薬は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、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。
- DAB+ 発色基質は、透明からラベンダーブラウンに変色することがあります。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。

## コントロールスライド

各スライドには、以下の 2 つのペレット状のホルマリン固定パラフィン包埋細胞株の切片が含まれています。PD-L1 タンパク質の発現が陽性の NCI-H226\*\* (PD-L1 タンパク質の発現が陽性のヒト肺扁平上皮癌由来) と PD-L1 タンパク質の発現が陰性の MCF-7 (PD-L1 タンパク質の発現が陰性のヒト乳腺癌由来)。

## 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 (型番: PT100/PT101/PT200) 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 ラックを PT Link 内の予熱済み抗原賦活液に浸漬します。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 分間浸漬します。

\*\*NCI-H226は、NIH の AF Gazdar 博士と JD Minna 博士が開発した細胞株です (ATCC 番号: CRL-5826™)。

## 染色と対比染色

- － 検体スライドをセットした Autostainer ラックをダコ Autostainer Link 48 にセットします。この際、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」プロトコールを選択します。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。この染色プロトコールには、ダコ Envision FLEX ヘマトキシリン（AutostainerLink用）（コード：K800821-2）による 7 分間の対比染色も含まれています。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。



# 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：\_\_\_\_\_

|                                                                                                                  | はい                       | いいえ                      |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------|--------------------------|
| 1. 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"/> |
| 2. 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"/> |
| 3. 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"/> |
| 4. 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"/> |
| 5. 適切な非小細胞肺癌の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"/> |
| 6. 組織は、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"/> |
| 7. 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"/> |
| 8. 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？                                                                        | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| 9. 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？                             | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| 10. 保管されていた扁平上皮非小細胞肺癌の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 または薄切後 2 か月以内かつ暗所で室温 25 °C 以下で保管していたものですか？  | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| 11. 抗原賦活液は適切に調製されていますか？                                                                                          | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| 12. 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"/> |
| 13. 基質溶液は適切に調製されていますか？                                                                                           | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| 14. 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"/> |
| 15. 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润状態を保っていますか？                          | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| 16. 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"/> |
| 17. 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"/> |
| 18. 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・試薬などなどがすべて用意されていますか？<br>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。 | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |

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」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 2 に、スコアリングガイドラインと推奨される報告例を示します。PD-L1 IHC 28-8 pharmDx「ダコ」の病理報告例については、25 ページをご参照ください。

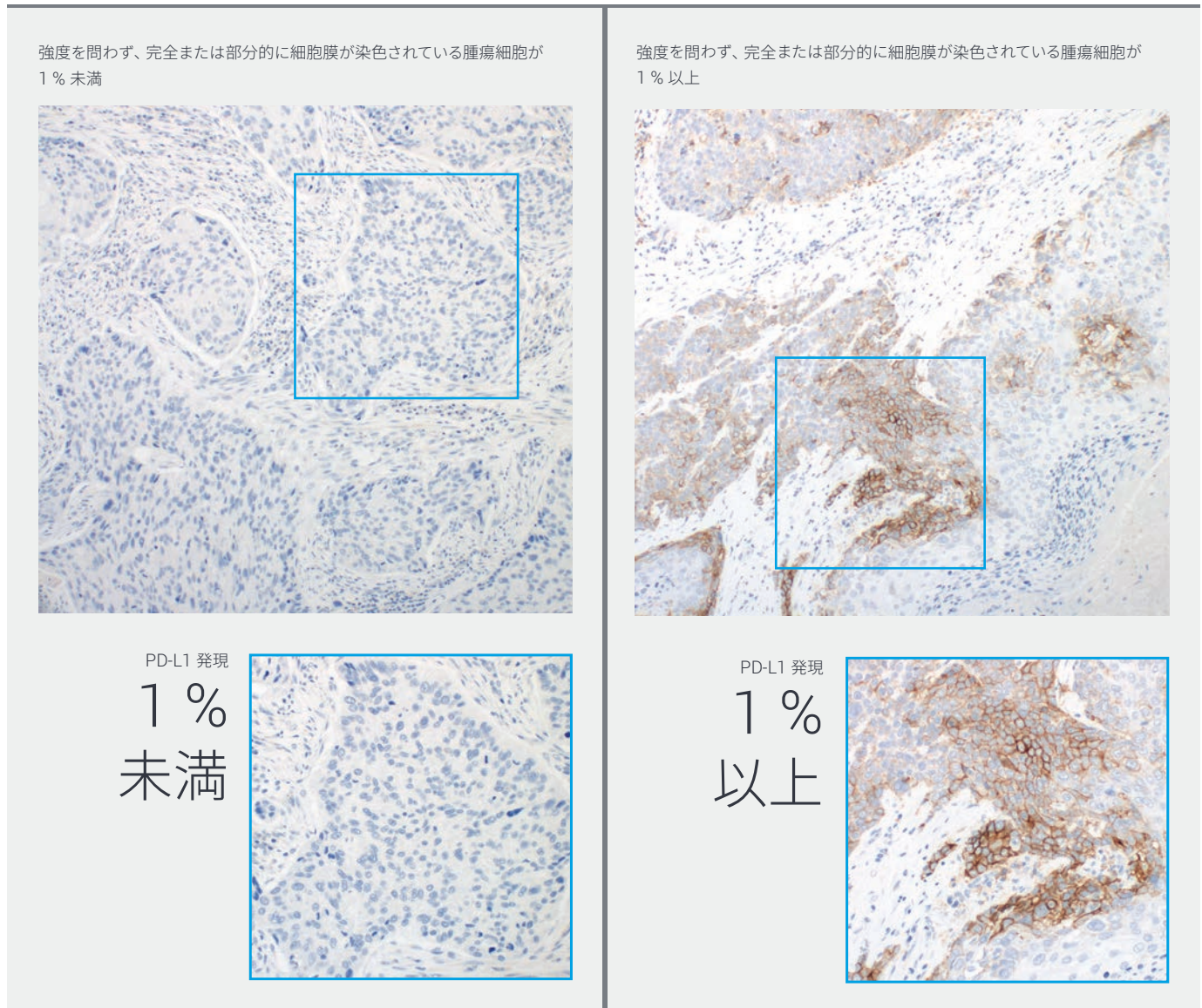


図 2. PD-L1 IHC 28-8 pharmDx「ダコ」の染色結果のスコアリングおよび報告に関するガイドライン

顕微鏡写真協力

このプロジェクトで使用されたデータと生物試料は、フランス、ニースの Center Hospitalier Universitaire de Nice と米国、メリーランド州ゲセズバーグの US Biolab Corporation, Inc. から、適切な倫理的承認を得て、Trans-Hit Biomarkers Inc. を通じて提供されました。

このプロジェクトで使用されたデータと非小細胞肺癌組織検体の画像は、TransHit Bulgaria, SofiaBioから、適切な倫理的承認を得て、Trans-Hit Biomarkers Inc. を通じて提供されました。

組織検体は Asterand Bioscience より提供されました。



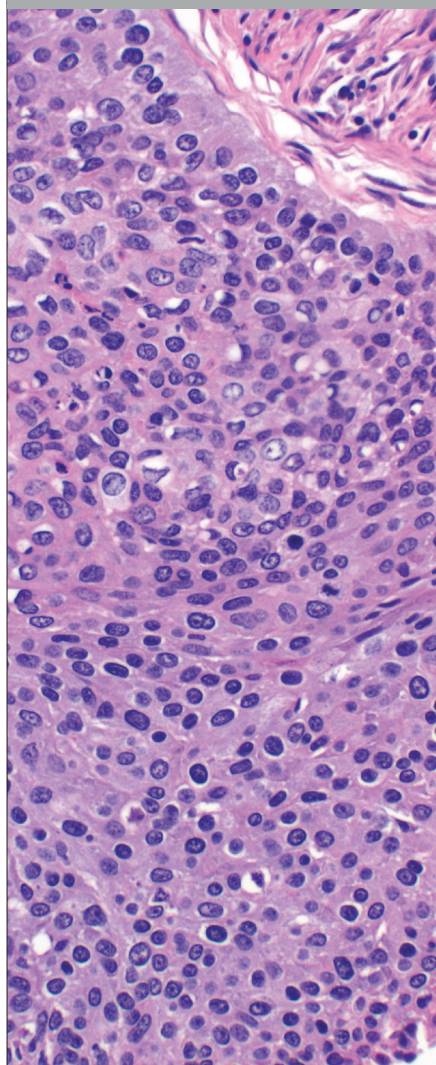
## PD-L1 IHC 28-8 pharmDx「ダコ」の推奨スライド判定順序

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、20 ～ 22 ページをご参照ください。

**1**

H&E 染色した組織検体  
組織型および細胞形態の保存状態

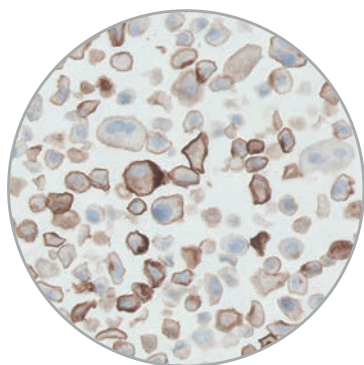
条件を満たす



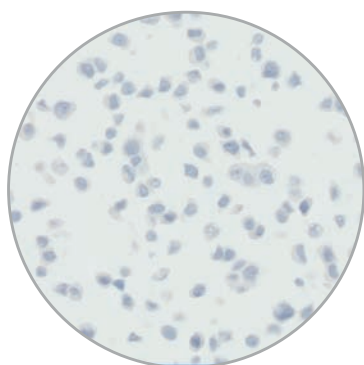
**2**

本品中の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

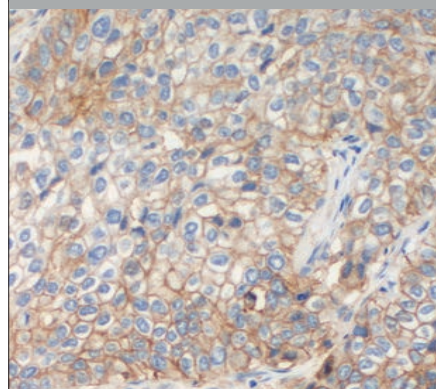


PD-L1 陰性対照のコントロール

**3A**

陽性対照のコントロール組織  
一次抗体で染色

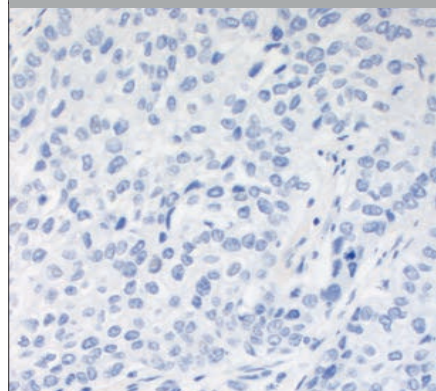
条件を満たす



**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

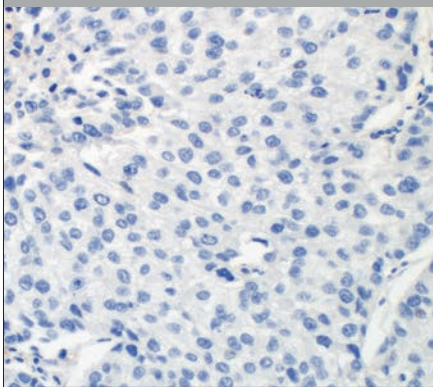


## 4A

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

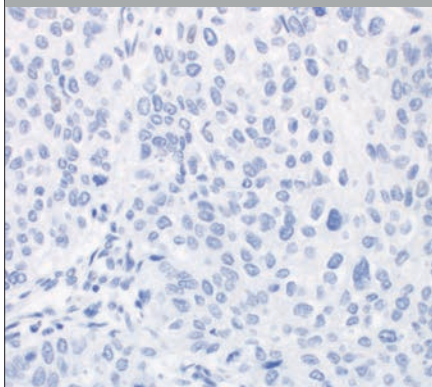


## 5

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

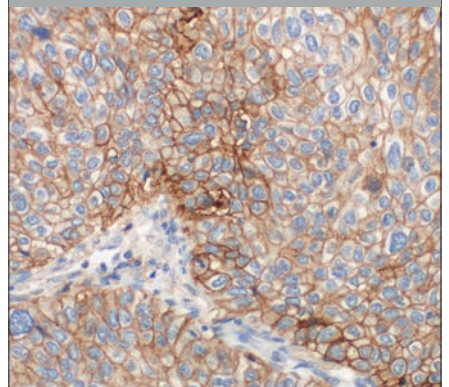


## 6

組織検体

一次抗体で染色

条件を満たす



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
- － 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：

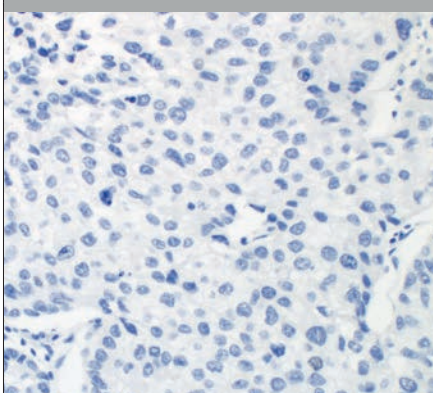
- － 細胞質染色
- － 免疫細胞
- － 正常細胞
- － 壊死細胞
- － 細胞残屑

## 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



# 非小細胞肺癌に対する PD-L1 IHC 28-8 pharmDx「ダコ」の結果判定に関する推奨事項

PD-L1 IHC 28-8 pharmDx「ダコ」の評価は、病理医が明視野顕微鏡を使用して実施します。組織検体で PD-L1 の染色性評価をする前に、組織検体での 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スライド、一次抗体陰性コントロールで染色した組織検体のスライドを観察します。最後に、一次抗体で染色した組織検体を調べ、腫瘍細胞の染色を評価します。

PD-L1 の染色では、強度を問わず部分的または完全な細胞膜染色が確認されている腫瘍細胞を陽性と判定します。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判定せず除外します。非腫瘍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りますが、その場合にもスコアリングからは除外します。

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。PD-L1 IHC 28-8 pharmDx「ダコ」に含まれるのは、コントロールスライドのみです。

## 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。

## 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 3）。コントロールスライド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の結果を無効と見なします。コントロール組織は、患者の染色結果を判定するための染色参考例として使用しないでください。



PD-L1 IHC



PD-L1 陽性



PD-L1 陰性

細胞膜の陽性腫瘍細胞の割合とその染色強度を評価してください。下記を参考に、全体的な染色強度を評価してください。

|    |       |
|----|-------|
| 0  | 陰性    |
| 1+ | 弱陽性   |
| 2+ | 中等度陽性 |
| 3+ | 強陽性   |

図 3. 本品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。



PD-L1 陽性の細胞では、次の所見を確認する（図 4）。

- － 細胞膜染色を 80 % 以上の細胞で認める
- － 平均染色強度が 2+ 以上
- － 1+ 未満の染色強度の非特異的な染色

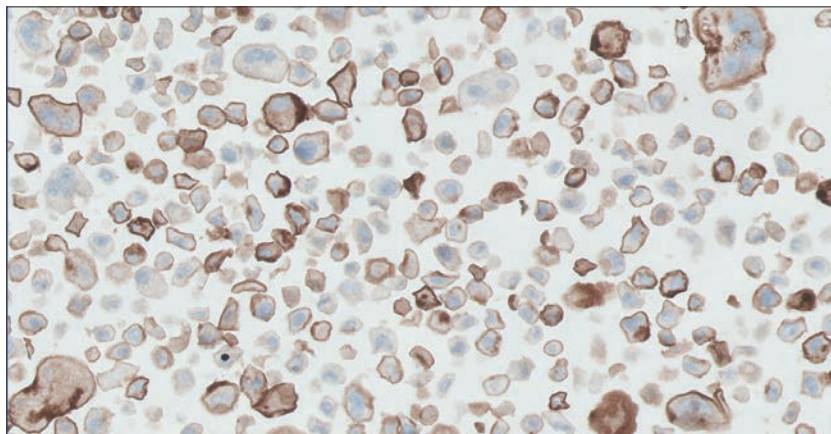


図 4. 条件を満たす染色性を示す PD-L1 陽性コントロール

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）。

- － 細胞膜染色を認めない
- － バックグラウンド染色の強度が 1+ 未満

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。

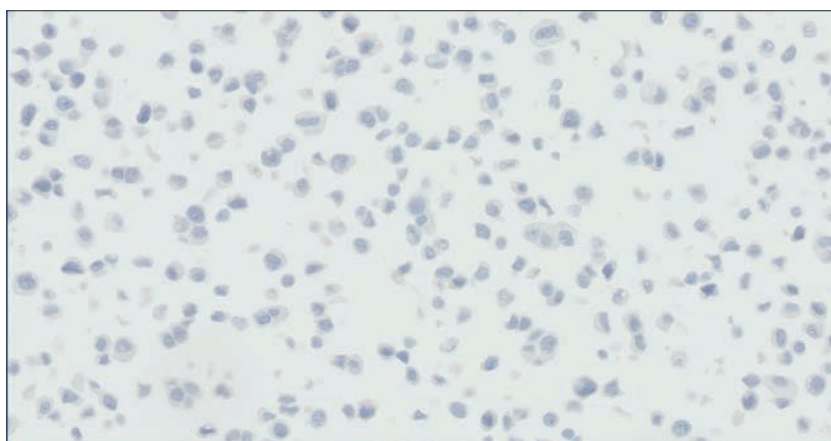


図 5. 条件を満たす染色性を示す PD-L1 陰性コントロール

### 陽性対照のコントロール組織スライド

非小細胞肺癌の陽性対照のコントロール組織を観察し（一次抗体または一次抗体陰性コントロール）、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+ 未満でなければなりません。評価する際は、壊死または死滅した腫瘍細胞を除外します。陽性対照のコントロール組織で良好な染色が得られていない場合は、組織検体のすべての結果を無効と見なします。コントロール組織は、患者の染色結果を判定するための染色参考例として使用しないでください。

### 陰性対照のコントロール組織スライド

非小細胞肺癌の陰性対照のコントロール組織（一次抗体または一次抗体陰性コントロール）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+ 未満でなければなりません。陰性対照のコントロール組織で腫瘍細胞の細胞膜が染色されている場合は、該当する組織検体の結果を無効と見なします。コントロール組織は、患者の染色結果を判定するための染色参考例として使用しないでください。

### 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調べ、試薬が正常に機能していることを確認します。腫瘍細胞の細胞膜が染色されていない場合は染色過程は良好です。一次抗体陰性コントロールで染色した組織検体は、細胞膜染色は陽性を示さず、非特異的バックグラウンド染色は染色強度が 1+ 以下である必要があります。良好でない場合は、該当する組織検体の結果を無効と見なします。

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す（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ます）。

## 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の非特異的なバックグラウンド染色と比較しながら行います。患者スライドを評価するには、PD-L1 染色された患者スライドに少なくとも 100 個の腫瘍細胞が存在しなければなりません。

|   |                                                                                                                                                                                                      |
|---|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 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。非腫瘍細胞、壊死細胞、細胞残屑を除外します。非特異的な細胞質染色がもしあれば除外します。                                                                                                      |
| 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。非腫瘍細胞および浸潤したリンパ球やマクロファージなどの免疫細胞の PD-L1 も染色されることがありますが、除外します。 |
| 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。                                                                                                          |

$$\text{PD-L1 発現率 (\%)} = \frac{\text{PD-L1 陽性腫瘍細胞数}}{\text{全腫瘍細胞数}} \times 100$$

## 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
- － 非特異的な細胞質の染色を除外します
- － 壊死組織が染色されることがありますが、除外します
- － 非腫瘍細胞および免疫細胞を除外します
- － 顆粒状染色は、知覚可能で確証的な膜パターンを示さなければなりません

## 判定不可検体

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

## 腫瘍 PD-L1 発現率の算出に関して推奨されるスコアリング方法

異なる染色パターンを示す染色検体を評価する場合に使用するスコアリング方法として、以下の 2 つの例をご紹介します。

### 例 1：PD-L1 染色腫瘍領域が小さい検体における PD-L1 発現率（%）を算出する

低倍率で、腫瘍細胞における PD-L1 染色の存在について染色強度を問わず検体全体を評価します。PD-L1 陽性となる非腫瘍細胞および免疫細胞は除外しなければなりません。

- － この例では、腫瘍細胞が腫瘍内に均等に分布しており、検体全体に合計 1,000 個の腫瘍細胞があると仮定します。
- － 腫瘍領域の 10 % が染色され、腫瘍領域の 90 % が染色されません。

高倍率で、PD-L1 陽性の腫瘍領域を注意深く観察します（図 6、青丸）。PD-L1 の陽性染色では、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。

- － 100 個の腫瘍細胞のうち 50 個が、腫瘍領域の単一領域で PD-L1 陽性となっています（方法 1）。これは次のようにも説明できます。腫瘍領域の 10 % に相当する単一領域で 50 % PD-L1 陽性（方法 2）。



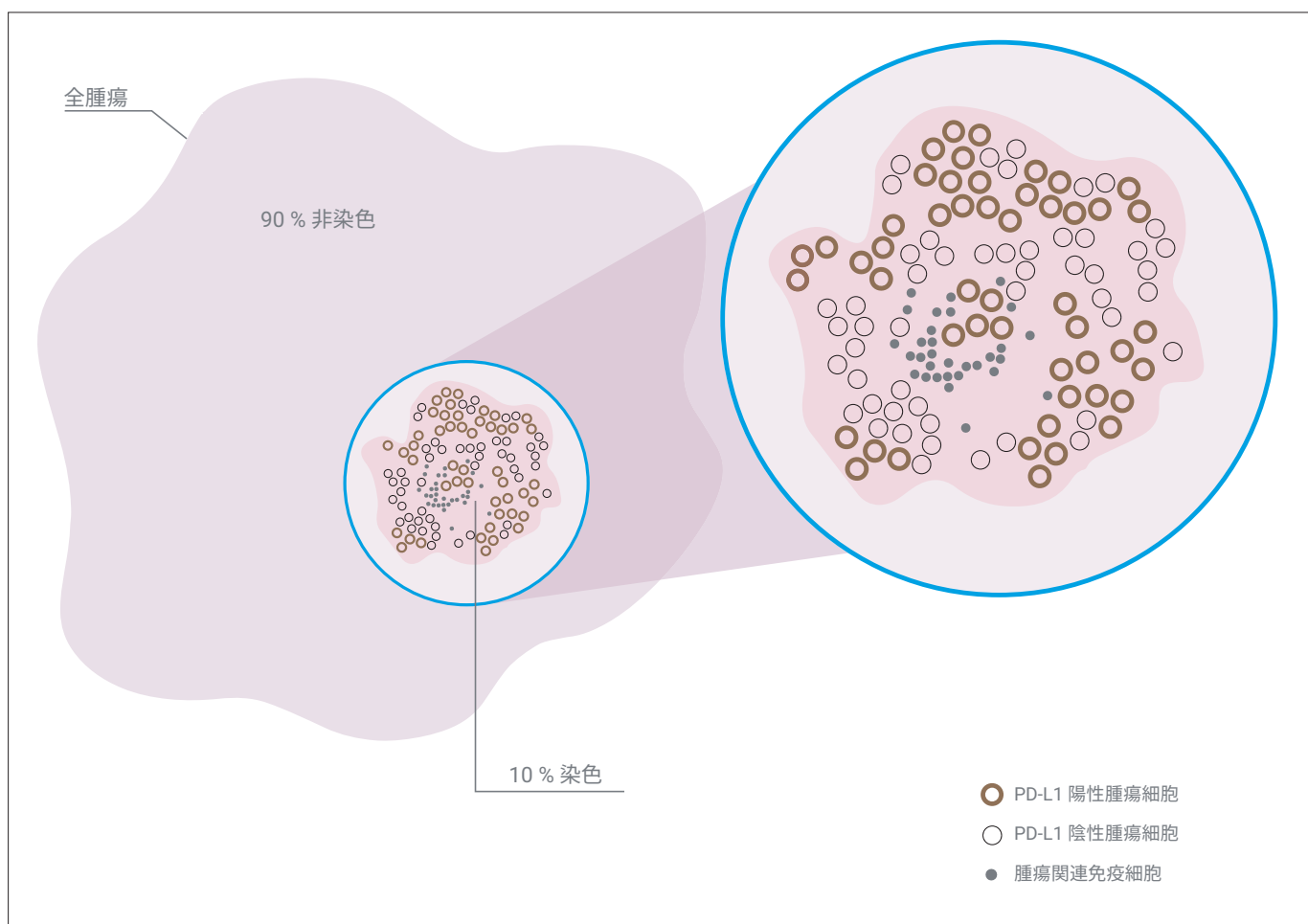


図 6. PD-L1 の染色領域が小さい腫瘍の例

以下に示されているように、検体全体に対する PD-L1 陽性腫瘍細胞の全体的な割合を決定します。

#### 方法 1

$$\frac{50 \text{ 個の PD-L1 陽性腫瘍細胞}}{1000 \text{ 個の腫瘍細胞}} \times 100 = \text{PD-L1 発現率 } 5 \%$$

#### 方法 2

$$\frac{50 \% \times 10 \%}{100} = \text{PD-L1 発現率 } 5 \%$$

## 例 2：不均一に染色された検体における PD-L1 発現率 (%) を算出する

低倍率で、腫瘍細胞における PD-L1 染色の存在について染色強度を問わず検体全体を評価します。腫瘍領域を目視で分割します。PD-L1 陽性となる非腫瘍細胞および免疫細胞は除外しなければなりません。

－ 図 7 では、腫瘍領域が 4 つの同面積の象限に分割されています。

高倍率で、各象限の PD-L1 染色腫瘍細胞の割合を評価、算出します。PD-L1 の陽性染色では、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。

－ 各 4 セクションの PD-L1 陽性腫瘍細胞の割合は以下のとおりです。  
80 %、30 %、50 %、100 %

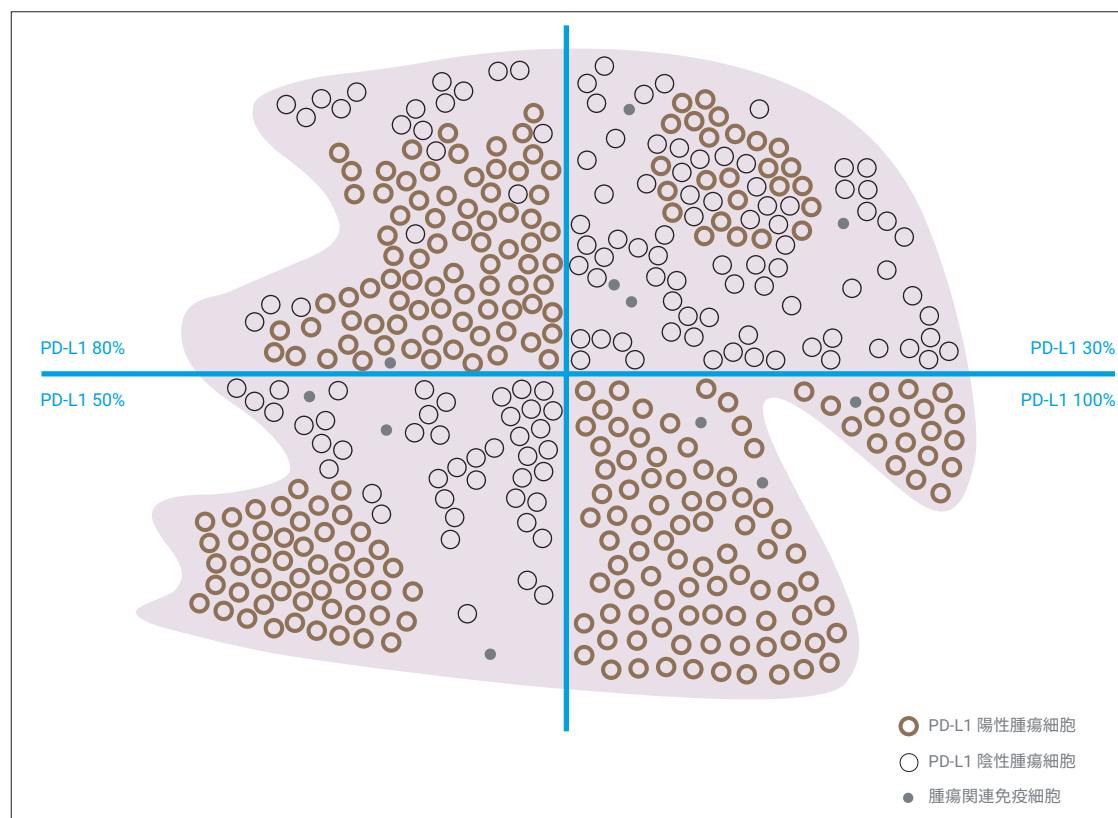


図 7. 不均一な PD-L1 染色領域の例

以下に示されているように、検体全体の PD-L1 陽性腫瘍細胞の全体的なパーセンテージを決定します。

$$\frac{(80 \% + 30 \% + 50 \% + 100 \%)}{4 \text{ セクション}} = \text{PD-L1 発現率 } 65 \%$$

# PD-L1 IHC 28-8 pharmDx「ダコ」 結果の報告非小細胞肺癌

## 非小細胞肺癌に対する PD-L1 IHC 28-8 pharmDx「ダコ」の染色結果報告時の推奨記載事項

**PD-L1 IHC 28-8 pharmDx「ダコ」、型番：SK00521-5J**

### 検査内容など：

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

染色 Log ID：\_\_\_\_\_ 検体 ID：\_\_\_\_\_

患者番号：\_\_\_\_\_

検査タイプ：検査タイプマニュアル判定による IHC 染色

その他：\_\_\_\_\_

組織タイプ：\_\_\_\_\_

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

### PD-L1 IHC 28-8 pharmDx「ダコ」コントロール結果：

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

陽性対照のコントロール組織スライド 合格 ☐ 不合格 ☐

陰性対照のコントロール組織スライド 合格 ☐ 不合格 ☐

一次抗体陰性コントロールで染色した組織検体 合格 ☐ 不合格 ☐

**PD-L1 染色結果：**PD-L1 IHC 28-8 pharmDx「ダコ」は、ニボルマブと化学療法の併用療法を行う非小細胞肺癌患者の特定のための補助に用います。

腫瘍細胞の存在： ☐ 100 細胞以上 ☐ 不適正

該当する PD-L1 の発現率を選択してください。

☐ **PD-L1 発現 1 % 以上：**部分的または完全な PD-L1 の細胞膜染色がみられた非小細胞肺癌の腫瘍細胞の割合が 1 % 以上

☐ **PD-L1 発現 1 % 未満：**部分的または完全な PD-L1 の細胞膜染色がみられた非小細胞肺癌の腫瘍細胞の割合が 1 % 未満

担当医師（臨床医）へのコメント：\_\_\_\_\_

ニボルマブは、その腫瘍に PD-L1 が発現している非扁平上皮非小細胞肺癌患者の生存率の向上に関連している可能性があることに注意してください（腫瘍細胞では 1 % 以上、5 % 以上、10 % 以上）。特定の臨床状況については、PD-L1 IHC 28-8 pharmDx「ダコ」の添付文書（IFU）およびニボルマブの添付文書を参照してください。

OPDIVO は、ブリストル・マイヤーズスクイブ社の登録商標です。

## 非小細胞肺癌における PD-L1 IHC 28-8 pharmDx 「ダコ」の免疫染色例

### 陽性対照のコントロール検体

PD-L1 IHC 28-8 pharmDx 「ダコ」による非小細胞肺癌の染色例。ここではさまざまな PD-L1 染色パターンと染色強度を示しています。この検体は陽性対照のコントロール検体として、染色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。

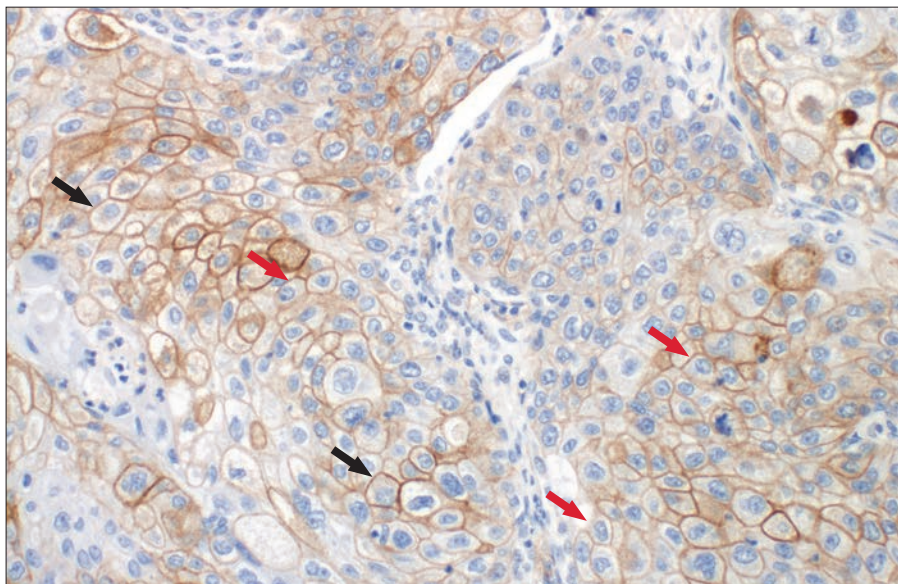


図 8. 対物レンズ 20 倍

### 腫瘍細胞と免疫細胞の区別

腫瘍関連免疫細胞に（**赤矢印**）強い染色が認められる非小細胞肺癌。ただし、腫瘍細胞は PD-L1 陰性（**黒矢印**）。

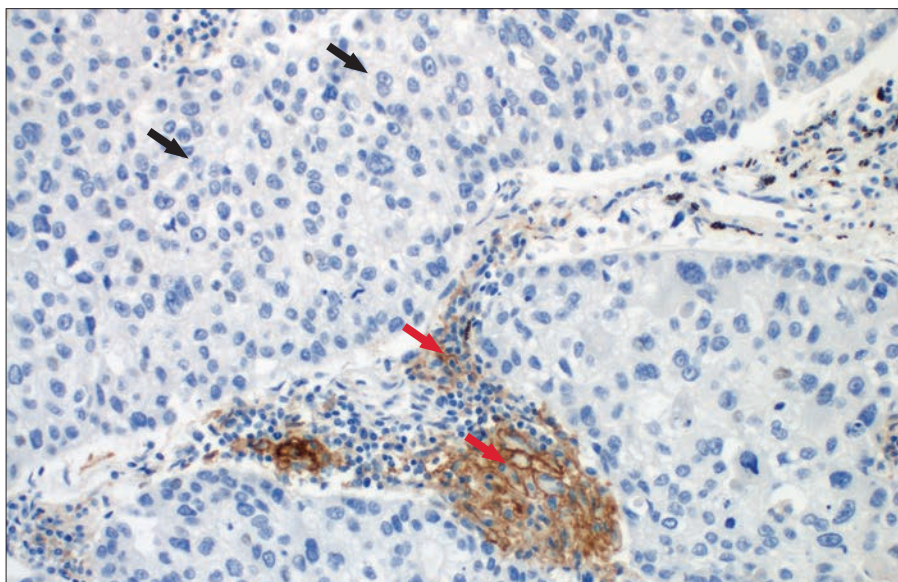


図 9. 対物レンズ 20 倍



### 腫瘍細胞と免疫細胞の区別

炭粉沈着は、吸入された煙や炭塵による炭素の蓄積です。この例は、免疫細胞（**赤矢印**）内にある黒い顆粒状の斑点を呈す炭粉沈着を示しています。これは、腫瘍細胞と区別するのに役立ちます。炭粉沈着は、PD-L1 陰性の腫瘍細胞（**黒矢印**）内には認められません。

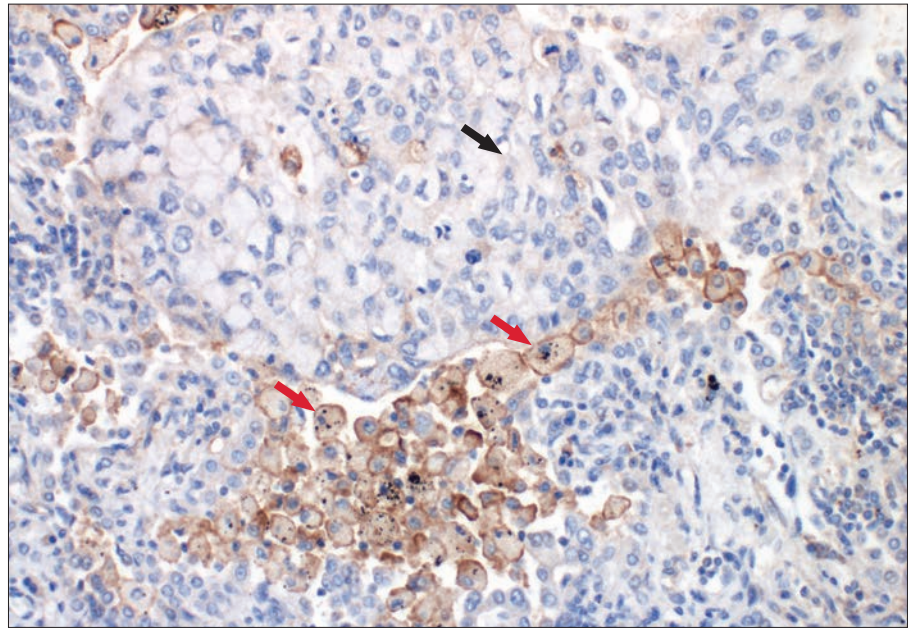


図 10. 対物レンズ 20 倍

### 腫瘍細胞と免疫細胞の区別

マクロファージ（**赤矢印**）やリンパ球（**青矢印**）などの免疫細胞と腫瘍細胞（**黒矢印**）が PD-L1 陽性染色を示す非小細胞肺癌。陽性染色を示す免疫細胞は、PD-L1 発現率判定の対象外です。

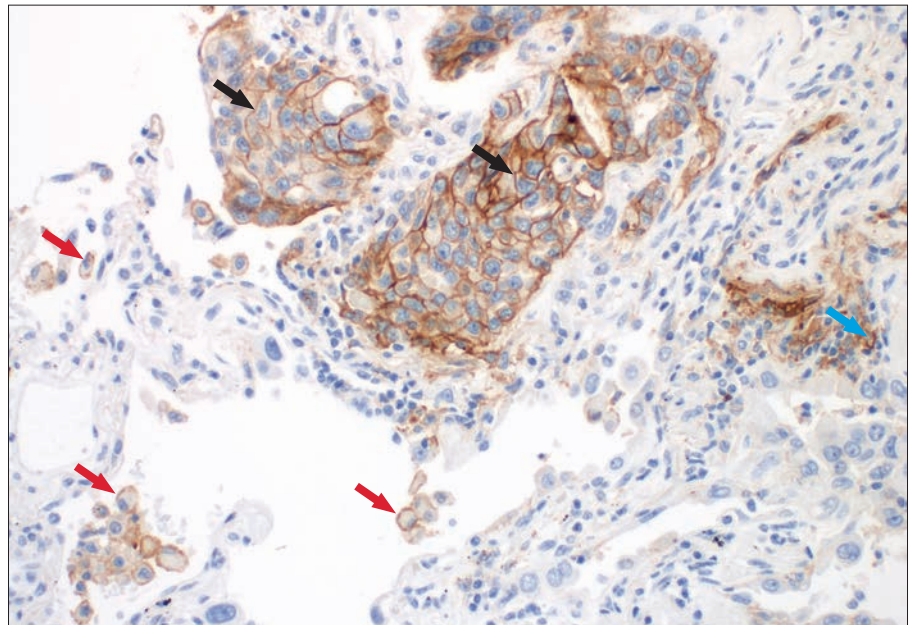


図 11. 対物レンズ 20 倍



### 細胞質染色

腫瘍の細胞膜染色（黒矢印）が認められ、細胞質染色から鑑別することが可能です。

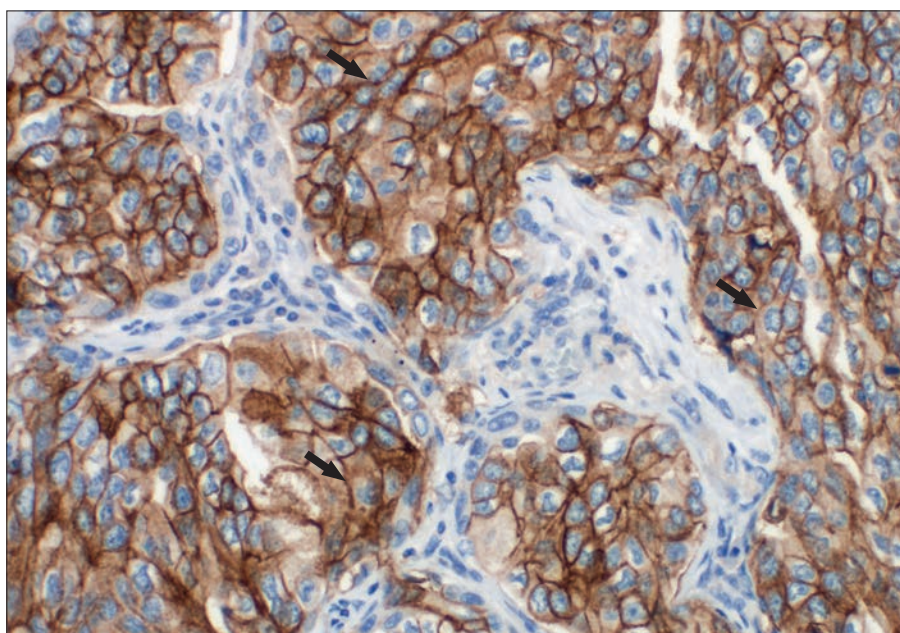


図 12. 対物レンズ 20 倍

### 顆粒状染色

腫瘍細胞の細胞質中に顆粒状染色が認められます（赤矢印）。腫瘍の細胞膜染色が認められます（黒矢印）。

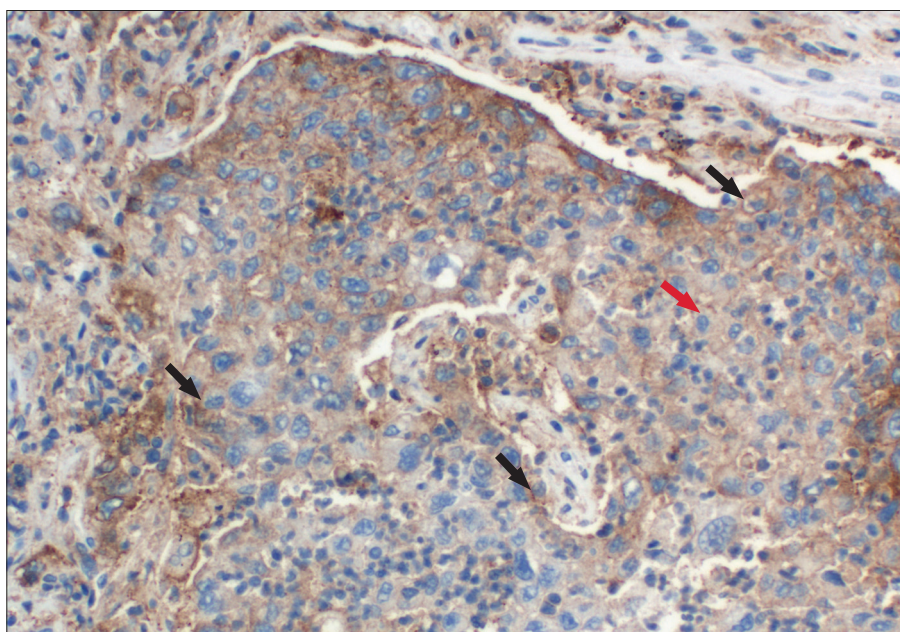


図 13. 対物レンズ 20 倍

## PD-L1 IHC 28-8 pharmDx「ダコ」の非小細胞肺癌症例

### 症例 1：PD-L1 発現 1 % 未満

この症例には、PD-L1 染色が認められる腫瘍細胞はありません。PD-L1 発現 0 %。

図 14a. 対物レンズ 10 倍

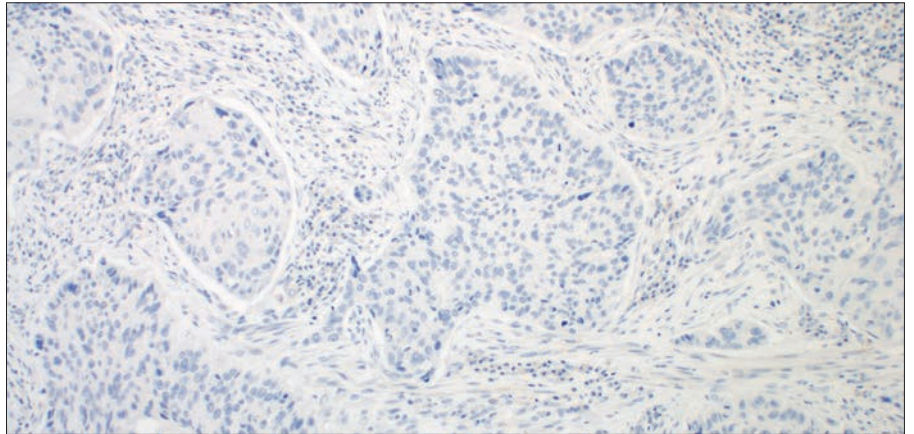


図 14b. 対物レンズ 20 倍

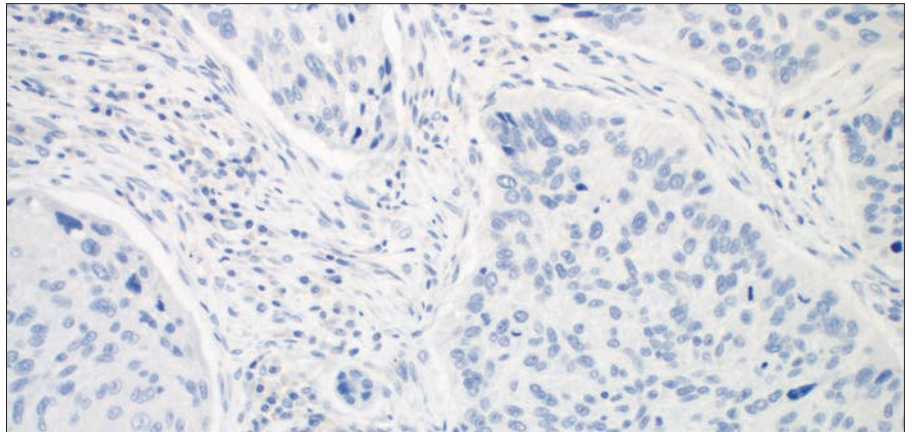
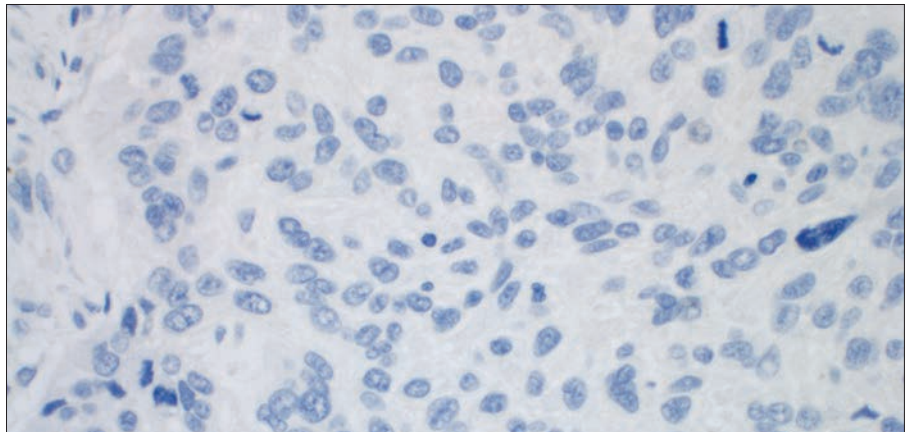


図 14c. 対物レンズ 40 倍





## 症例 2 : PD-L1 発現 1 % 未満

この症例には、PD-L1 染色が認められます。部分的な細胞膜染色が認められるいくつかの腫瘍細胞を除いて、ほとんどの染色は非特異的ですが、PD-L1 発現 1 % 未満。

図 15a. 対物レンズ 10 倍

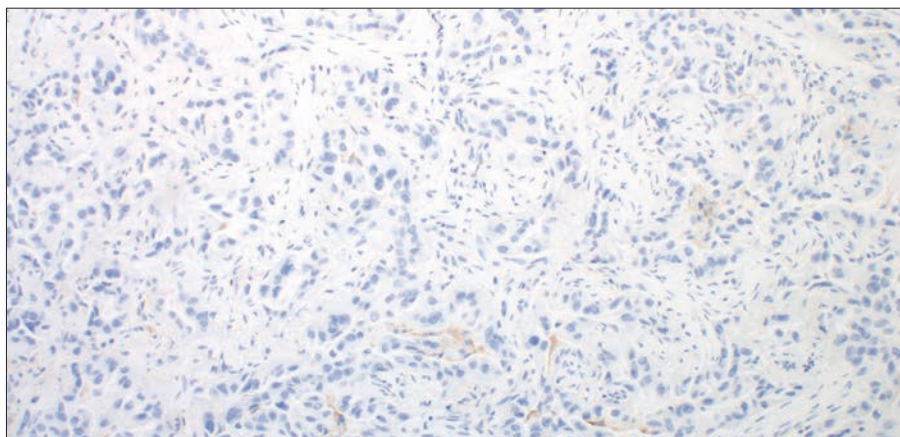


図 15b. 対物レンズ 20 倍

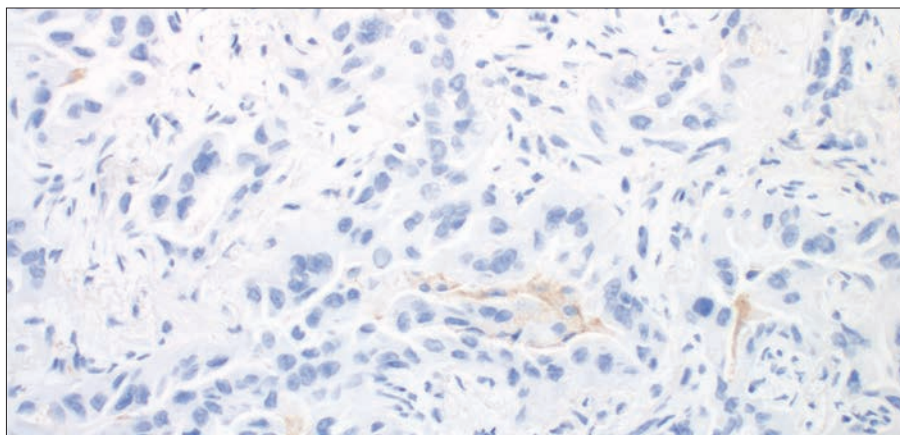
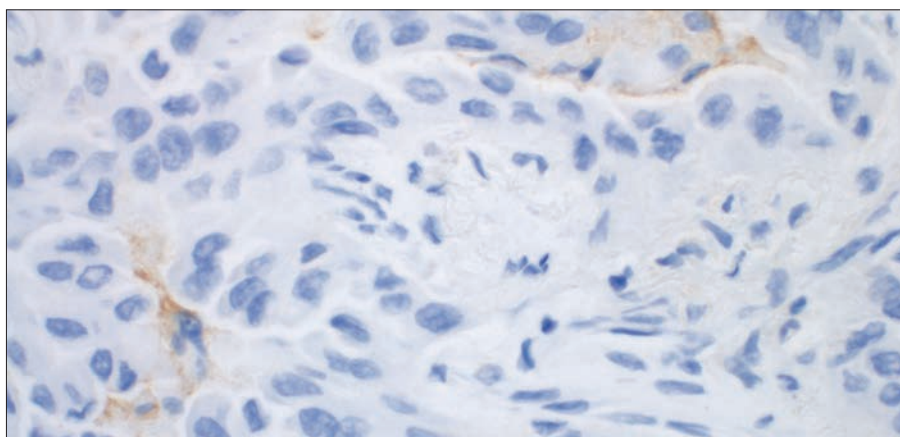


図 15c. 対物レンズ 40 倍



### 症例 3 : PD-L1 発現 1 % 未満

この症例には、PD-L1 染色が認められます。ほとんどの染色は免疫細胞に認められます。いくつかの腫瘍細胞に PD-L1 発現が認められます。PD-L1 発現 1 % 未満。

図 16a. 対物レンズ 10 倍

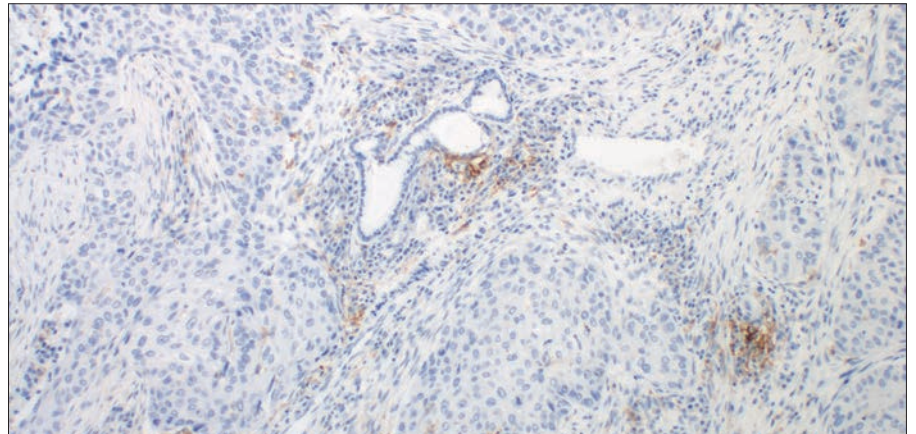


図 16b. 対物レンズ 20 倍

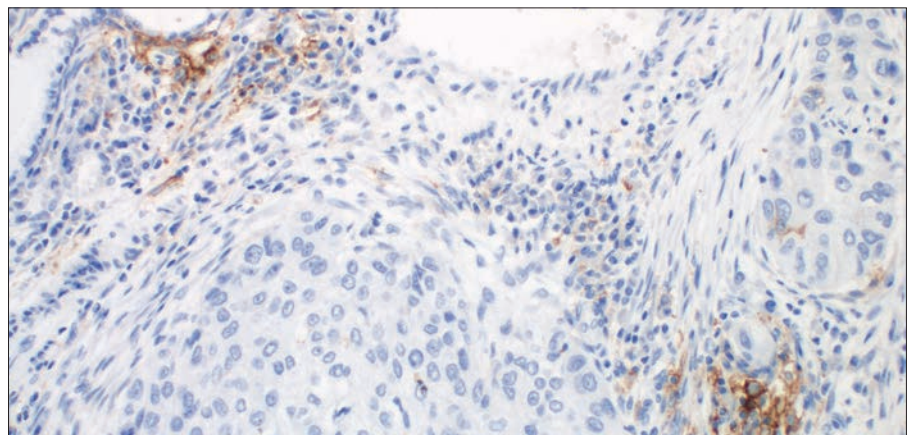
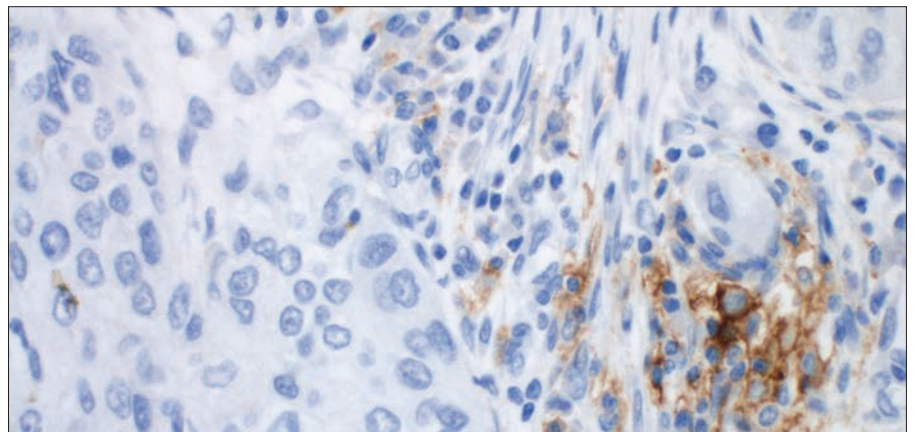


図 16c. 対物レンズ 40 倍





#### 症例 4 : PD-L1 発現 1 % 以上

この症例では、腫瘍細胞の部分的または完全な細胞膜染色が示されています。PD-L1 発現はカットオフ値 1 % に近く上回っています (PD-L1 発現 1 ~ 3 %)。

図 17a. 対物レンズ 10 倍

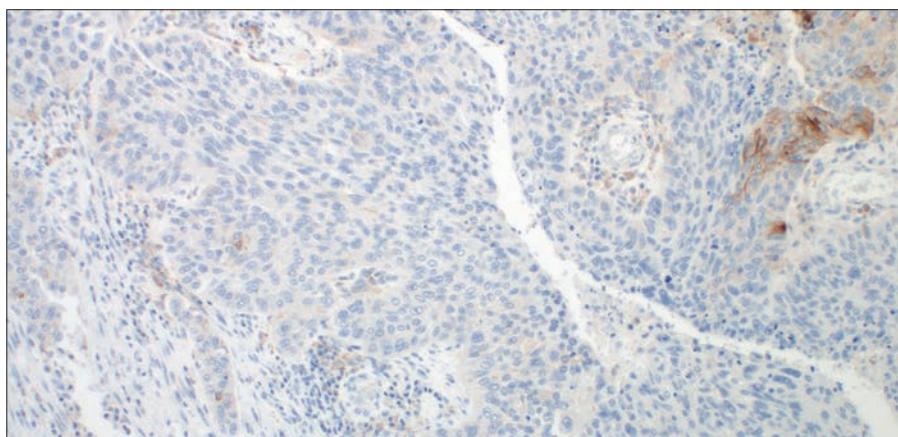


図 17b. 対物レンズ 20 倍

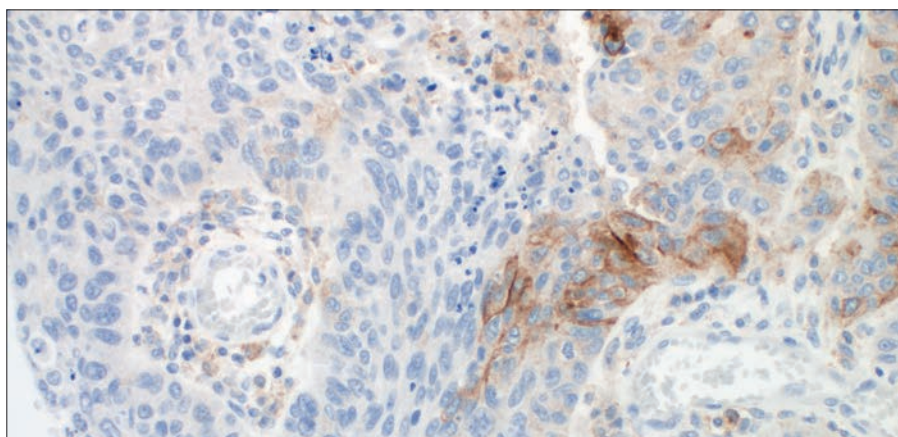
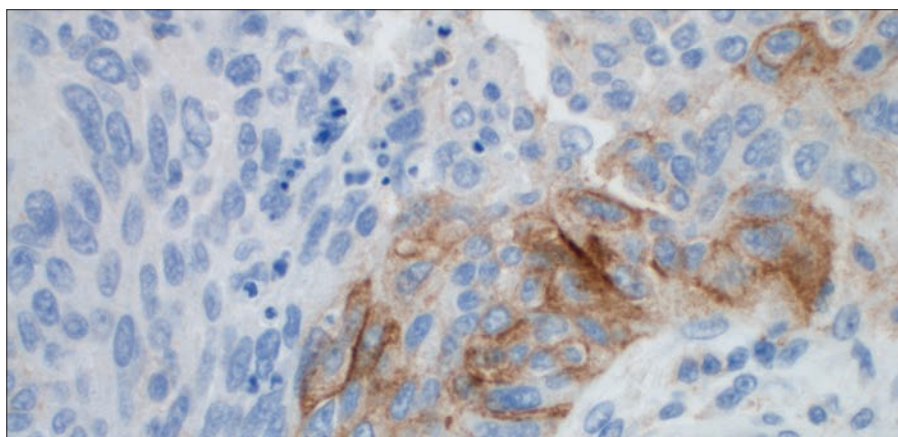


図 17c. 対物レンズ 40 倍



## 症例 5 : PD-L1 発現 1 % 以上

この症例では、腫瘍細胞の部分的または完全な細胞膜染色が示されています。PD-L1 発現はカットオフ値 1 % に近く上回っています (PD-L1 発現 5 ~ 10 %)。

図 18a. 対物レンズ 10 倍

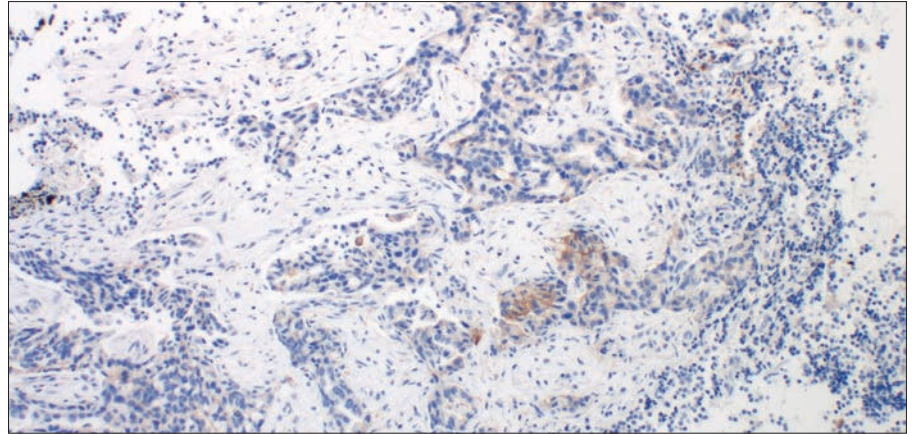


図 18b. 対物レンズ 20 倍

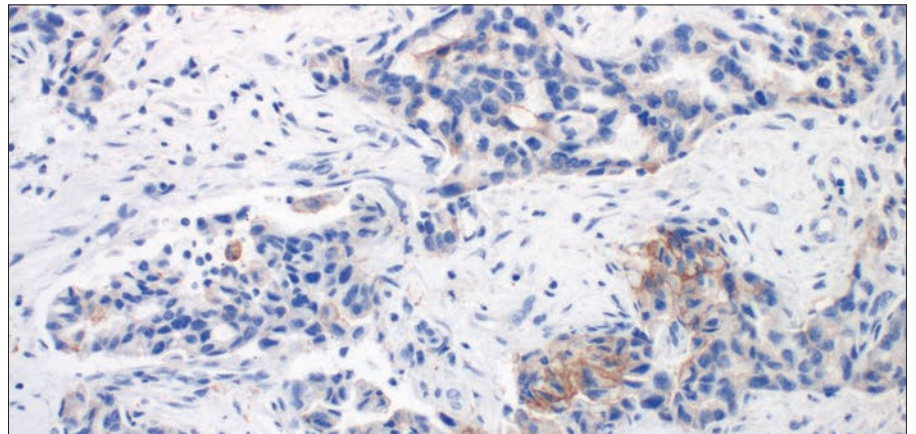
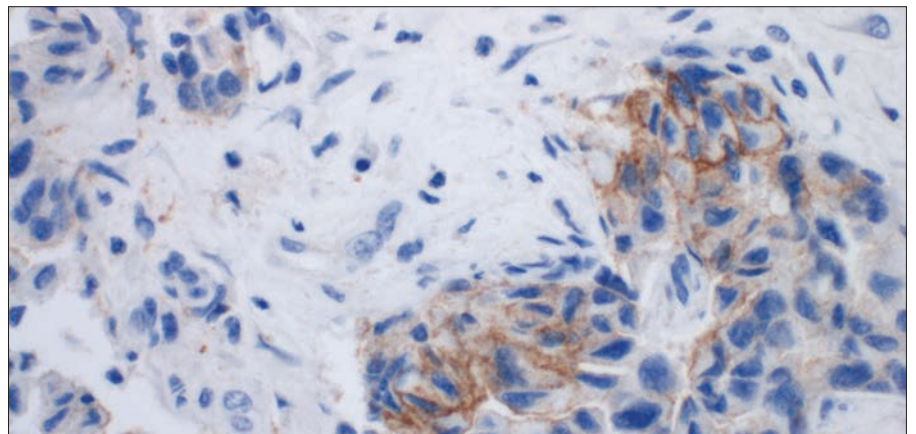


図 18c. 対物レンズ 40 倍





## 症例 6 : PD-L1 発現 1 % 以上

この症例では、腫瘍細胞の部分的または完全な細胞膜染色が示されています。この症例では、20 ～ 30 % の中程度の PD-L1 発現が示されています。

図 19a. 対物レンズ 10 倍

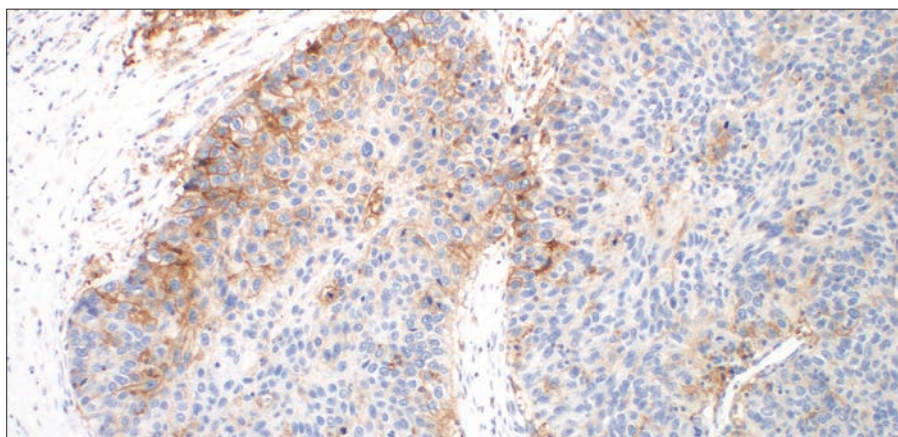


図 19b. 対物レンズ 20 倍

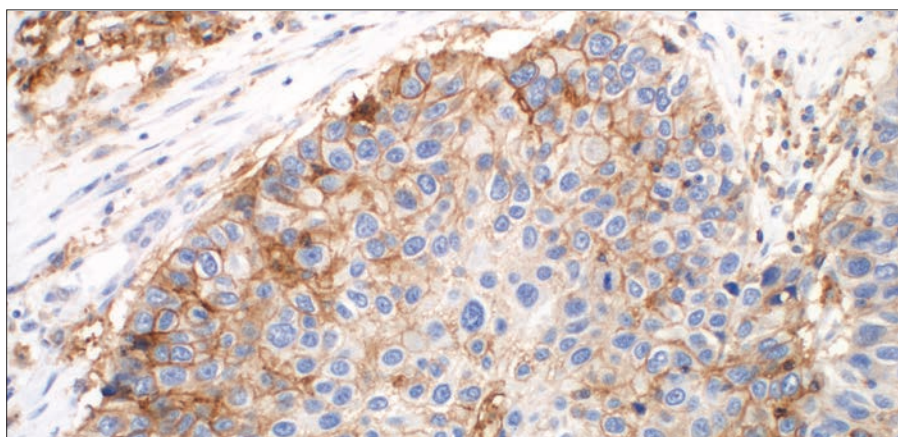
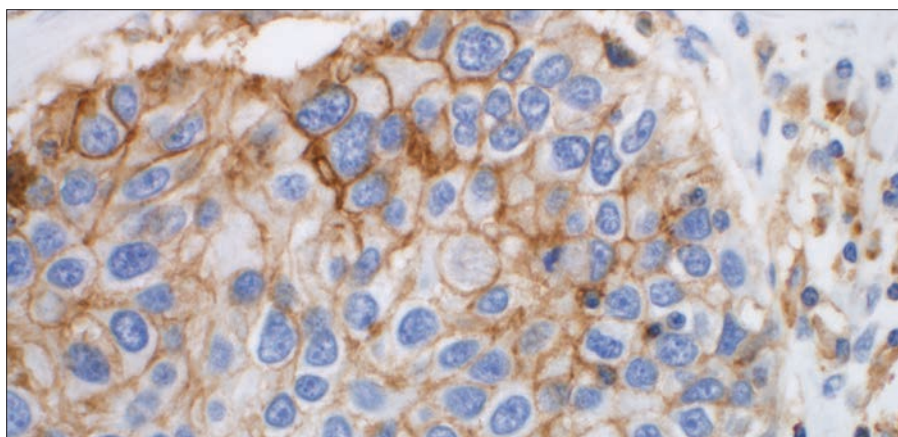


図 19c. 対物レンズ 40 倍



**症例 7 : PD-L1 発現 1 % 以上**

この症例では、腫瘍細胞の部分的または完全な細胞膜染色が示されています。この症例では、50 ～ 60 % の中程度から高度の PD-L1 発現が示されています。

図 20a. 対物レンズ 10 倍

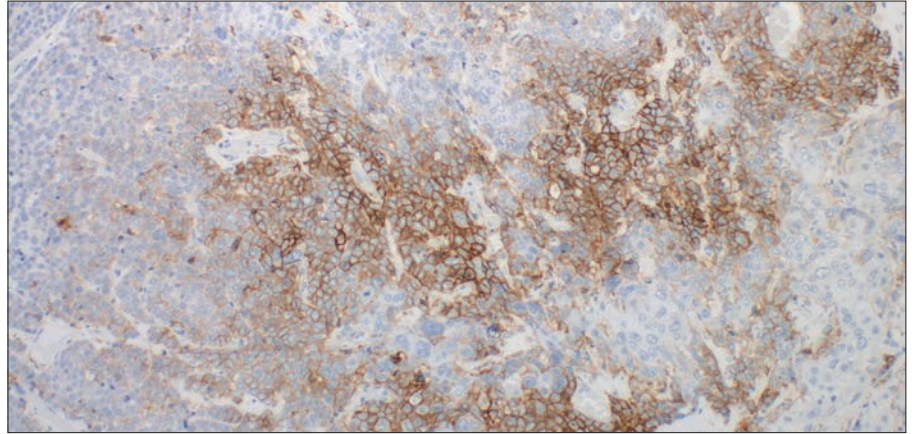


図 20b. 対物レンズ 20 倍

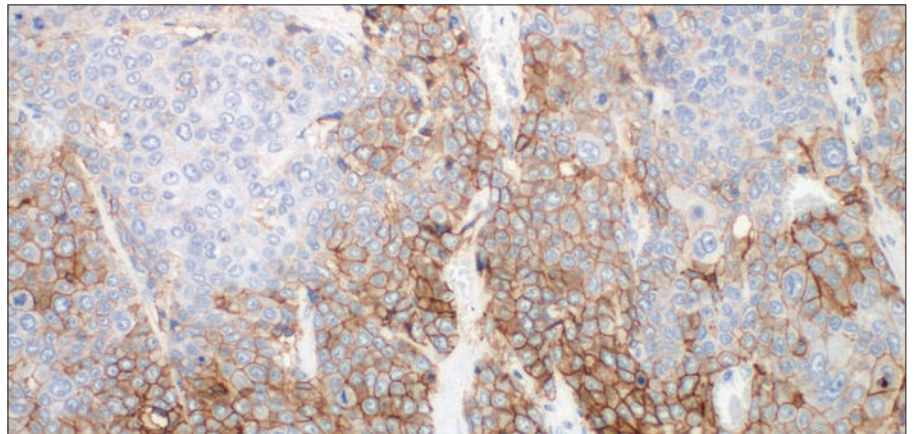
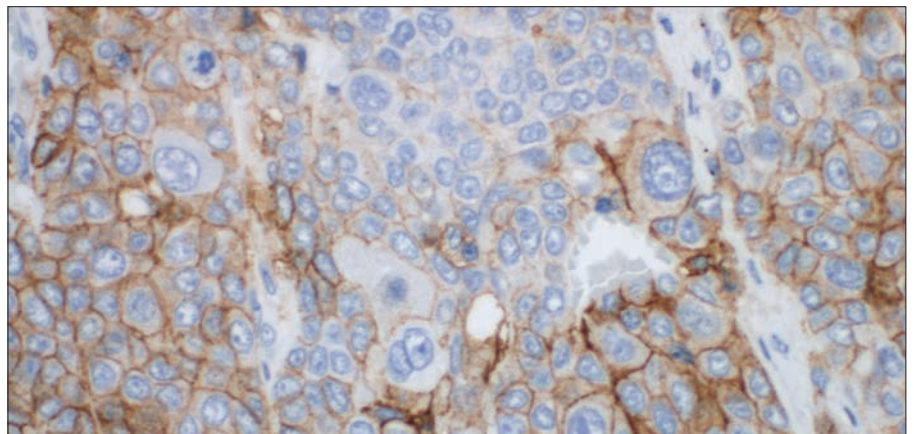


図 20c. 対物レンズ 40 倍





### 症例 8 : PD-L1 発現 1 % 以上

この症例では、腫瘍細胞の部分的または完全な細胞膜染色が示されています。この症例では、95 ～ 100 % の高度の PD-L1 発現が示されています。

図 21a. 対物レンズ 10 倍

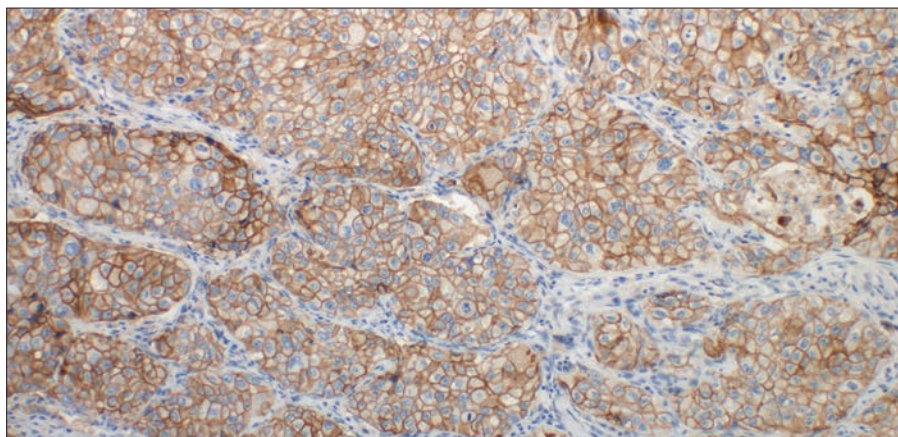


図 21b. 対物レンズ 20 倍

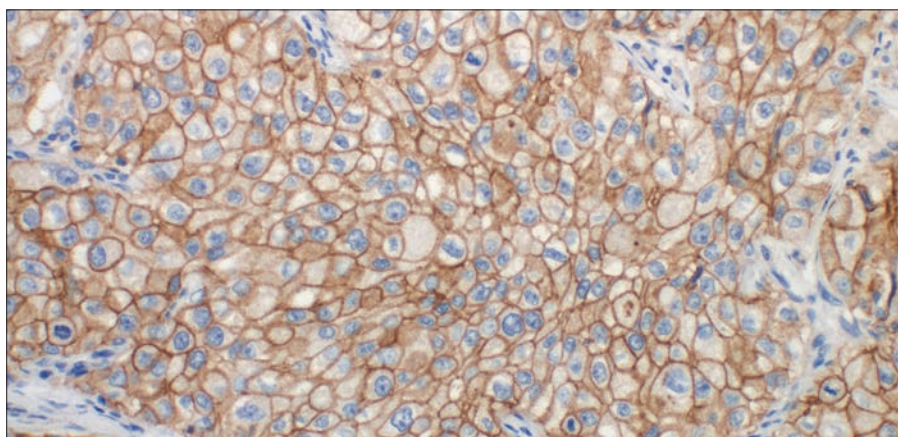
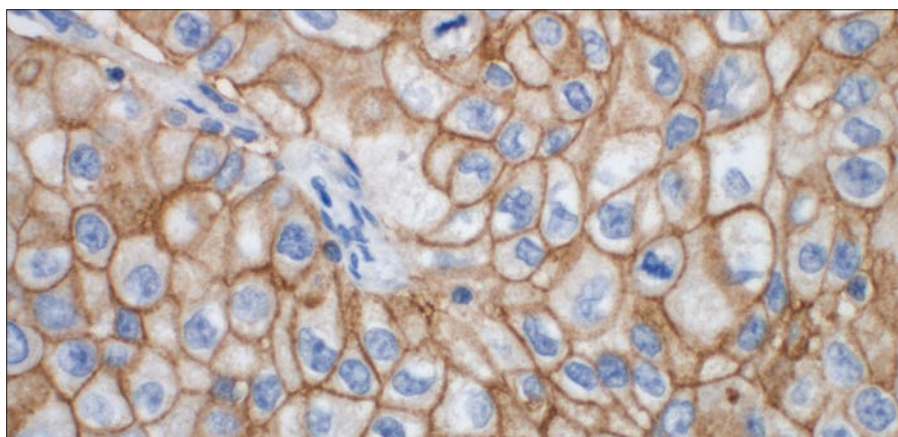


図 21c. 対物レンズ 40 倍



## PD-L1 IHC 28-8 pharmDx「ダコ」では評価が困難な 非小細胞肺癌の例

### 症例 1 : PD-L1 発現 1 % 未満

この症例では、PD-L1発現率の判定の対象外である多数の PD-L1 陽性免疫細胞が示されています。

図 22a. 対物レンズ 10 倍

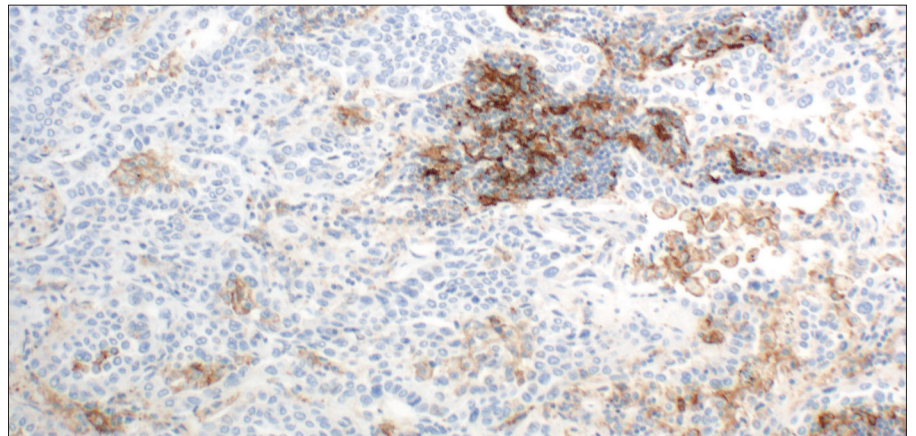


図 22b. 対物レンズ 20 倍

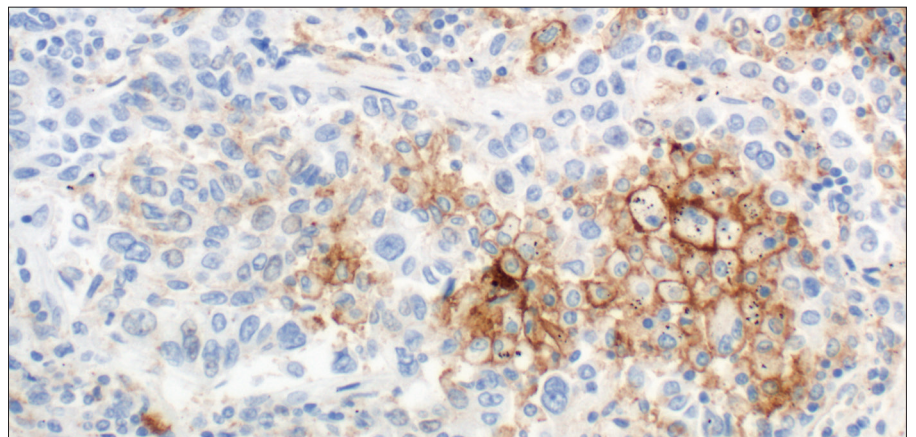
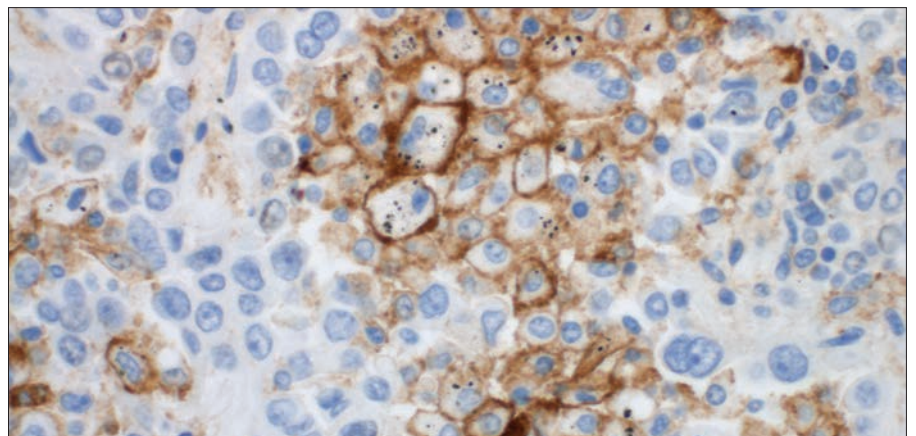


図 22c. 対物レンズ 40 倍





## 症例 2 : PD-L1 発現 1 % 未満

この症例では、高倍率（20x、40x）で確認された少数の PD-L1 陽性腫瘍細胞が示されています。しかし、PD-L1 陽性腫瘍細胞の数を検体全体の腫瘍細胞の総数で割った場合、1 % 未満です。

図 23a. 対物レンズ 10 倍

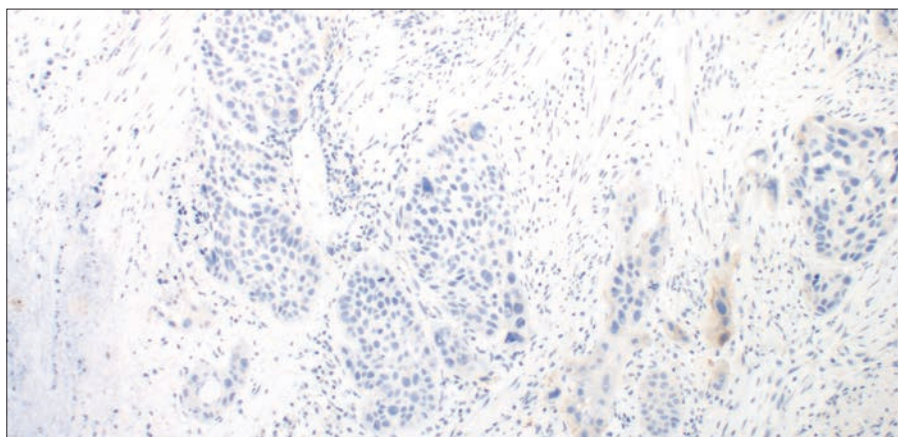


図 23b. 対物レンズ 20 倍

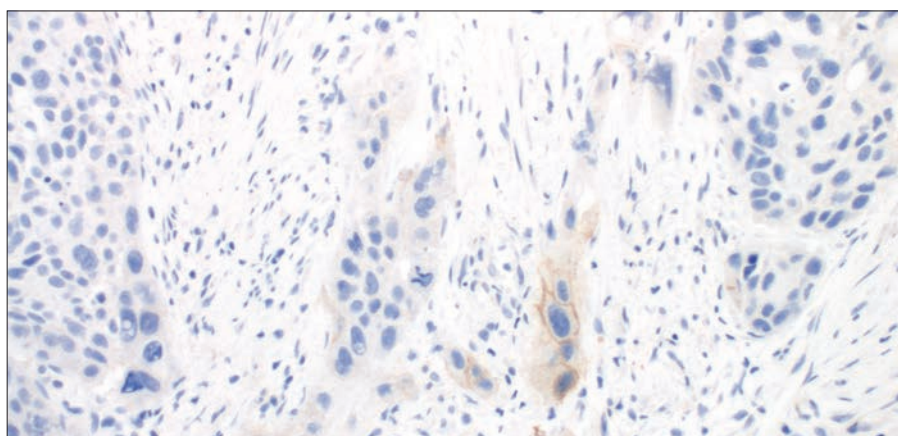
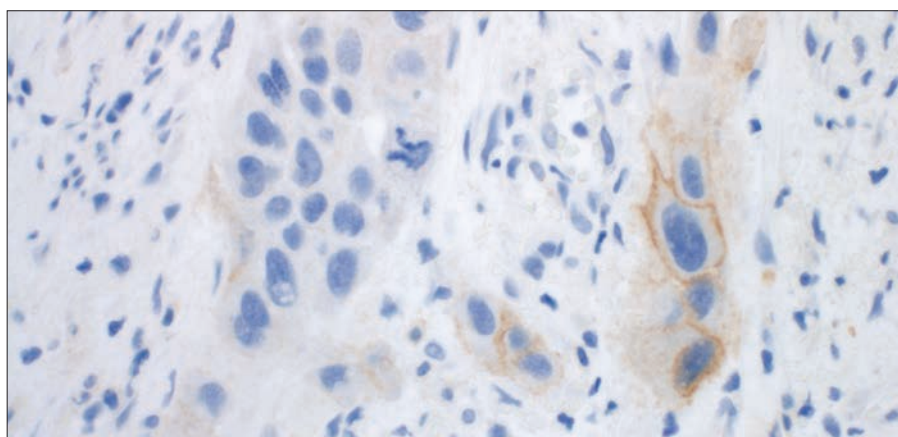


図 23c. 対物レンズ 40 倍





### 症例 3 : PD-L1 発現 1 % 以上

この症例では、弱い PD-L1 陽性腫瘍細胞が示されています。これは、低倍率（4x、10x）では見落とされる可能性がありますが、高倍率（20x、40x）では確認されます。

図 24a. 対物レンズ 10 倍

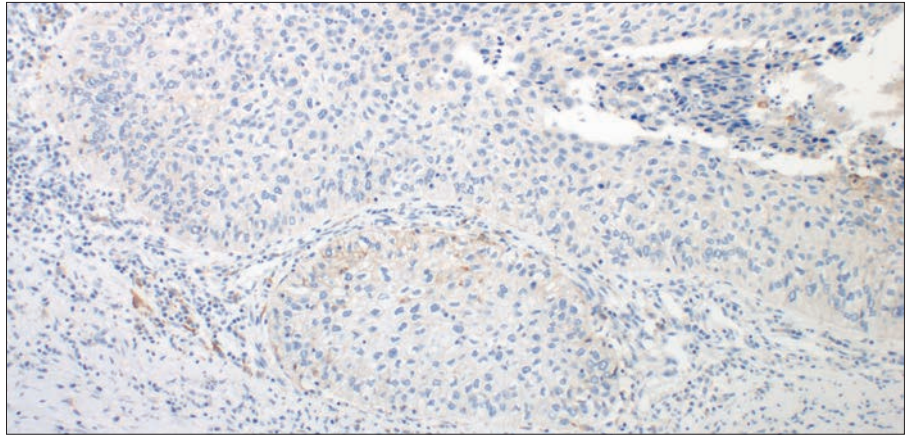


図 24b. 対物レンズ 20 倍

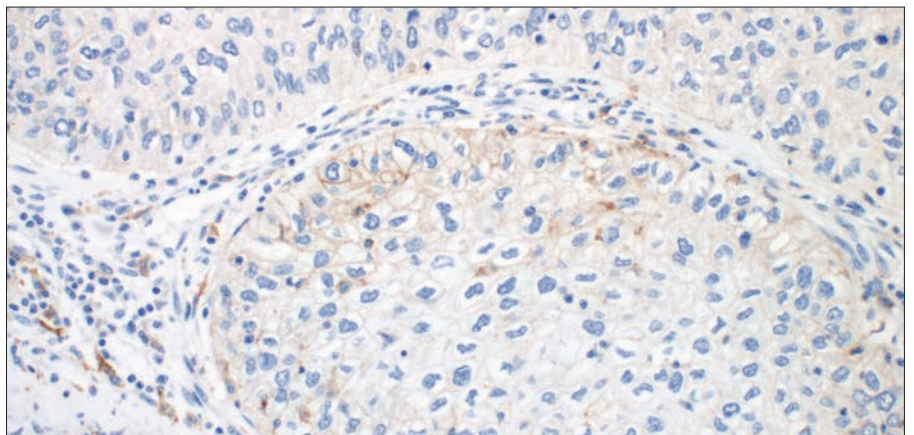
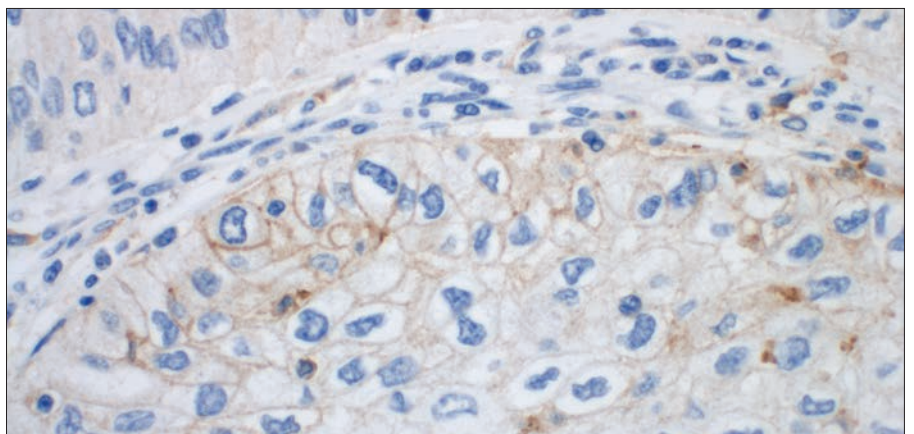


図 24c. 対物レンズ 40 倍



#### 症例 4 : PD-L1 発現 1 % 以上

この症例では、非腫瘍細胞の存在下での腫瘍細胞における PD-L1 染色の陽性例が示されています。PD-L1 の発現率を決定する際に、PD-L1 陽性の線維芽細胞を腫瘍細胞と間違えたり、分母に含めたりしてはいけません。H&E を参照すると、43 ページに示すように、PD-L1 陽性の線維芽細胞と腫瘍細胞を区別する際に役立つ場合があります。細胞質が染色されることがあります。

図 25a. 対物レンズ 10 倍

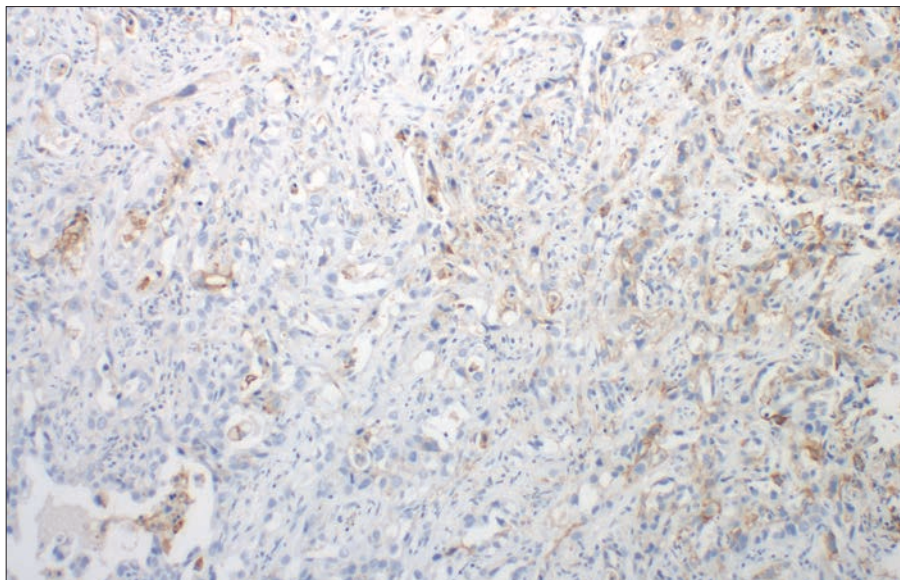
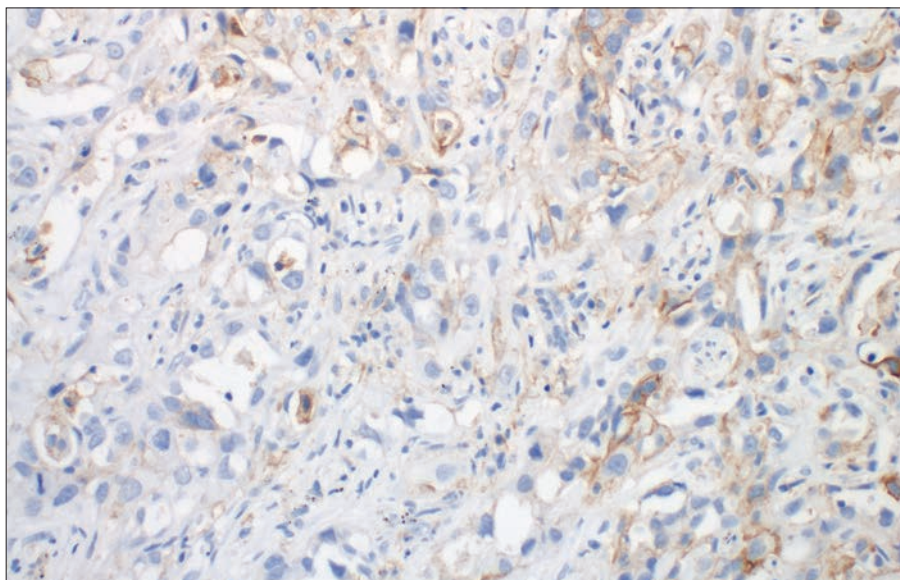


図 25b. 対物レンズ 20 倍





PD-L1 陽性の線維芽細胞（**赤矢印**）を腫瘍細胞（**黒矢印**）と間違える可能性があります。細胞の種類は、図に示すように H&E のスライドで確認する必要があります。PD-L1 陽性の線維芽細胞は非特異的な染色を示す可能性がありますが、スコアリングから除外しなければなりません。腫瘍細胞における PD-L1 発現率を決定する際に、PD-L1 陽性および陰性の腫瘍細胞を観察し、判定します。

図 25c. 対物レンズ 40 倍

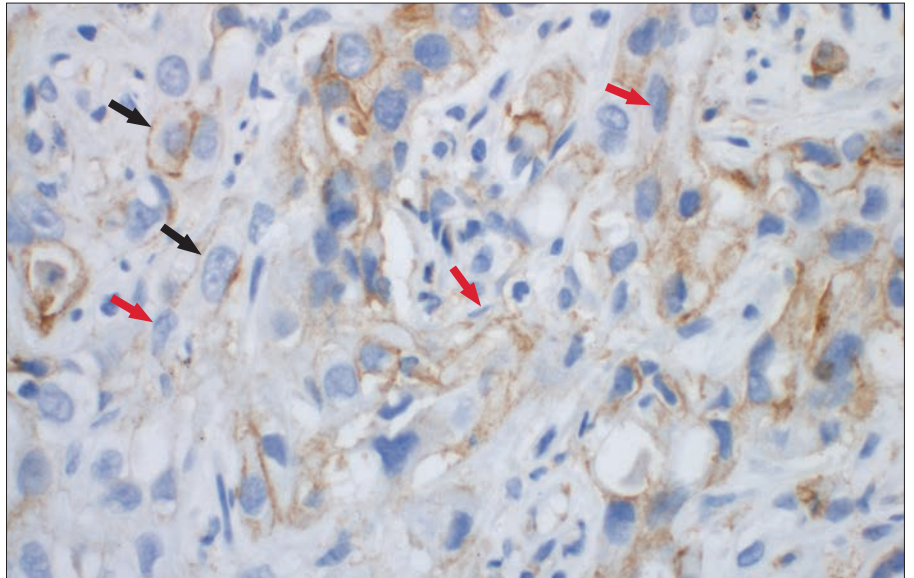
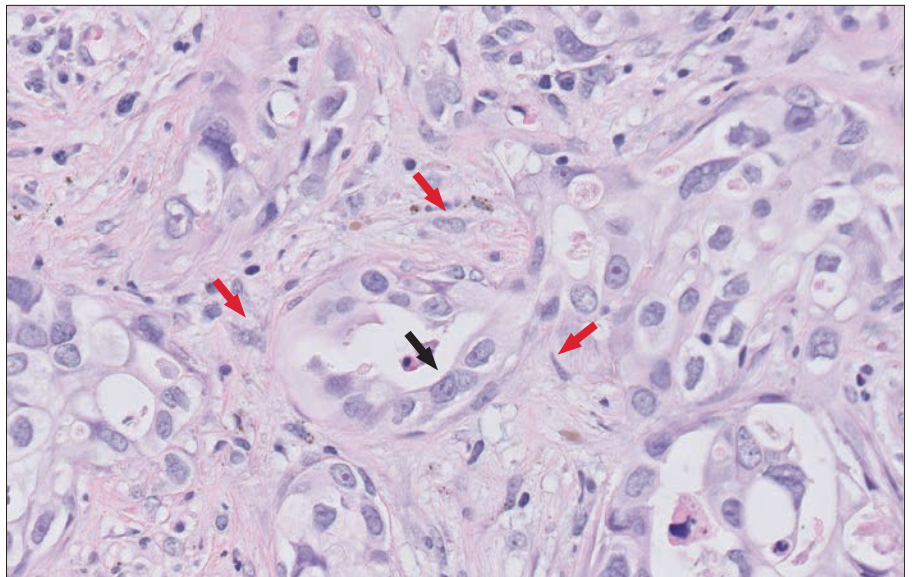


図 25d. 対物レンズ 40 倍





## アーチファクト

### 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、同じ患者組織の PD-L1 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。

過剰な細胞質染色がスコアリングを妨害する場合には、その非小細胞肺癌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**）。

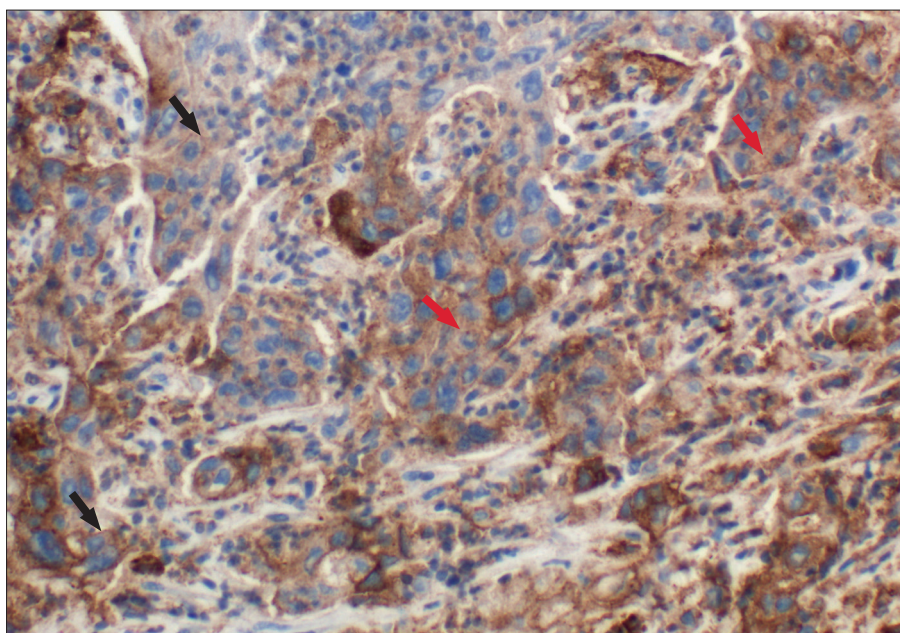


図 26.対物レンズ 20 倍

## 壊死

壊死組織は非特異的染色を示す場合があるため、スコアリング対象から外します。

注意事項：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。

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。

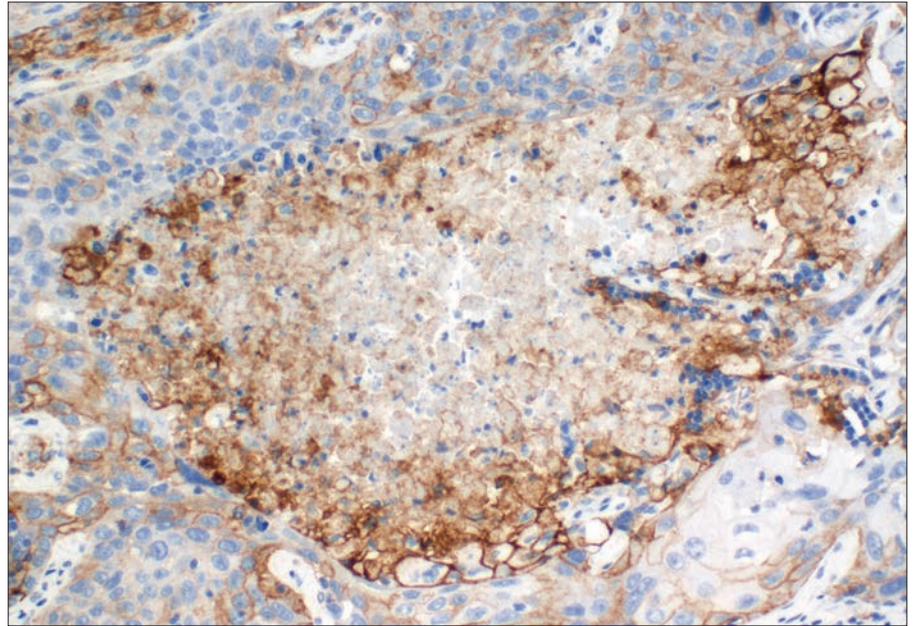


図 27.対物レンズ 20 倍

# 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                             | 1a. PD-L1 IHC 28-8 pharmDx「ダコ」用のプログラム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 (DAB)                       | 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) (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                    | 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                                   |
| 2. 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. 試薬量の添加不足                               | 2b. 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                             | 2c. 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            |
| 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                               | 3a. ダコ PT Link 上での 3-in-1 処理が正しく行われたことを確認する                             |
|                                      | 3b. 不適切な洗浄液を使用                             | 3b. 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                               | 4a. ダコ PT Link 上での 3-in-1 処理が正しく行われたことを確認する                             |
|                                      | 4b. ダコ Autostainer Link 48 への装填時にスライドが乾燥した | 4b. 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. 組織切片への試薬の非特異吸着 (反応)                    | 4c. 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                               | 4d. 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                         | 5a. コーティングスライドを使用する                                                     |
|                                      | 5b. 不適切な検体処理                               | 5b. 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                               | 6a. 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. 不適切な洗浄液の使用                             | 6b. 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            |
| 7. 染色が強すぎる                           | 7. 加熱時に抗原賦活液が濁って見える                        | 7. これは正常であり、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 – 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 (ISBN1-56238-745-6) 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
- M.D. Hellmann, et al.Nivolumab plus Ipilimumab in Advanced Non–Small-Cell Lung Cancer, The New England Journal of Medicine, 2019
- Omata M, Liew C-T, Ashcavai M, Peters RL. Non-immunologic binding of Horseradish Peroxidase to Hepatitis B surface antigen: a possible source of error in immunohistochemistry.Am J Clin Path 1980; 73:626
- ニボルマブ添付文書:小野薬品工業株式会社
- PD-L1 IHC 28-8 pharmDx「ダコ」添付文書
- PhelpsRM,etal.NCI-navy medical oncology branch cell line database.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
- Taylor CR and Rudbeck L. Education Guide: Immunohistochemical Staining Methods.Sixth Edition.Dako, Carpinteria, California; 2013
- 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,etal.Invitro 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
- Jules M. Elias.Special Report: Quality Control in Immunohistochemistry: Report of a Workshop Sponsored by the Biological Stain Commission.Am J Clin Pathol 1989; 92:836-843
- R.Phelps, et al., Journal of Cellular Biochemistry Supplement (1996) 24:32-91

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/>

© 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, Jan. 2021

29406JA D63112 2021Jan.